

谷 英典, 関口 勇地, 常田 聡, 野田 尚宏
海洋生物抽出物より取得した複数種の硫酸化合物に
よる C 型肝炎ウイルス NS3 helicase 阻害作用
第 64 回日本生物工学会大会, 神戸, 平成 24 年 10
月

後藤才郎, 照沼脩, 黒崎久仁彦, 植田信太, 王瀝,
Acuna Victor, Celta Gomez-Trejo, Julio Granados,
杉山三郎, 山下篤哉,
黒崎直子
メキシコ先住民族における HBV 感染および遺伝子型
の分析 (第 2 報)
第 35 回日本分子生物学会, 福岡, 平成 24 年 12 月

葛西 宏威, 河上 國洋, 平田 有佳理, 山下 篤
哉, 池田 正徳, 加藤 宣之,
岡本 徹, 松浦 善治, 楠木 正巳,
森石 恆司
HCV 複製増殖に関わる新規宿主因子 FKBP6:FKBP6 は
NS5A と結合し HCV 複製を制御する
第 35 回日本分子生物学会, 福岡, 平成 24 年 12 月

Atsuya Yamashita, Nobuyoshi Akimitsu, Naohiro Noda,
Satoshi Tsuneda, Masayoshi Tsubuki, Nobuyuki
Enomoto, Junichi Tanaka, Kohji Moriishi.
Inhibition of hepatitis C virus replication and viral
helicase by ethyl acetate extract of the marine feather
star *Alloeocomatella polycladia*.
25th International Conference on Antiviral Research,
April 2012, Sapporo.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

C型肝炎ウイルス（HCV）NS2-3 プロテアーゼを標的とする抗 HCV 薬探索のためのスクリーニング系の開発と NS2 タンパク質立体構造情報に基づく NS2-3 プロテアーゼ阻害化合物の探索

分担研究者：松本武久 理化学研究所 上級研究院

研究要旨

HCV NS2 タンパク質の立体構造情報に基づいて、インシリコで探索した NS2-3 プロテアーゼ阻害候補化合物のうち、HCV 全長ゲノムレプリコンアッセイあるいは HCV 増殖阻害試験、HCV トランスパッケージングシステムによるアッセイでヒットしてきた 6 化合物のうち、細胞内で発現した NS2-3, NS3-4A プロテアーゼによるポリペプチドプロセッシング活性を反映するレポーターアッセイ系による 2 次スクリーニングでヒットした 3 化合物の、直接的な NS2-3 プロテアーゼに対する阻害活性を評価するために、大腸菌セルフリー合成系で可溶性で比活性が高い NS2-3 プロテアーゼタンパク質を合成し、その合成タンパク質による触媒反応の最適化を実施し、アッセイ系を完成させた。このアッセイ系を用いて上記 3 化合物の直接的な NS2-3 プロテアーゼ阻害活性を測定した。

A. 研究目的

松本らは前年度まで、HCV 増殖を阻害する NS3-4A プロテアーゼ阻害剤の発見に続いて、NS2-3 プロテアーゼタンパク質の立体構造情報に基づいて、コンピューター上でプロテアーゼ活性部位に結合する化合物を探索するとともに、細胞ベースでの阻害剤スクリーニング系の構築を実施してきた。本研究では NS2/3 プロテアーゼ阻害剤スクリーニング系を完成させ、阻害剤を探索・設計し、VX-950(telaprevir)、等の分子標的薬に続く、新たな薬剤標的を狙う C 型肝炎治療薬のシーズとする。

HCV タンパク質前駆体をプロセッシングする主たる酵素 NS3-4A プロテアーゼは、NS2-3 プロテアーゼがその N 端をポリペプチド鎖から切り離すことにより初めて活性化される。NS2-3 プロテアーゼは膜タンパク質であるため、一般に膜貫通ドメインを除いた不溶性のタンパク質を発現させた後、リフォールディングによって活性型に変化させるが、一過性に生じた活性はオートプロセッシング後に消失するため、阻害剤のアッセイには不向きである。近年、その立体構造が発表された (Nature, 442: 831-835, 2006)

ことからインシリコによる薬剤設計の道が開かれた。本研究では NS2-3 プロテアーゼタンパク質発現細胞を阻害剤の二次スクリーニングに使用して、これまでに滞っていた NS2-3 プロテアーゼ阻害剤探索研究を実施する。さらに二次スクリーニングでヒットした化合物については、大腸菌セルフリー合成系で可溶性で比活性が高い NS2-3 プロテアーゼタンパク質を合成して、直接的な NS2-3 プロテアーゼ阻害活性を評価できるアッセイ系を確立し、これを三次スクリーニングとしてヒット化合物を探索する。

B. 研究方法

前年度までに、HCV NS2 の膜貫通ドメインを N 端に有する全長 NS2-3 プロテアーゼタンパク質のリフォールディングと酵素活性化を細胞内環境において実現させるように、レポーター遺伝子として GAL4 を上流にもつホタルルシフェラーゼタンパク質と、CMV プロモーターの下流には NS2-3 プロテアーゼ、NS3-4A プロテアーゼおよび核内移行シグナルを付けた VP-16/GAL4 転写因子 DNA 結合ドメインが連結する融合タンパク質の両方を経常的に発現するコンストラ

クトを作成し、その遺伝子を組み込んだ細胞に化合物を投与した後の光学的変化を測定するレポーターアッセイ系を完成させ、化合物の NS2-3 プロテアーゼ阻害活性あるいは NS3-4A プロテアーゼ阻害活性を測定した。インシリコスクリーニングで探索された活性阻害剤候補低分子化合物のうち、一次スクリーニングとしての、ウイルスの完全長ゲノムレプリコンアッセイ、HCV 増殖阻害試験、あるいは HCV トランスパッケージングシステムによるアッセイでヒットした化合物について、さらに二次スクリーニングとしてのレポーターアッセイを実施した。今年度は、可溶性で比活性が高い NS2-3 プロテアーゼタンパク質を合成し、触媒反応条件を最適化したアッセイ系を完成させ、二次スクリーニングでもヒットした化合物の直接的な NS2-3 プロテアーゼ阻害活性を評価した。

C. 研究結果

2006年に公表された NS2 の立体構造(PDB ID: 2HDO)の座標に基づいてインシリコスクリーニングでデータベースから探索した NS2-3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物 5 6 種類のうち、山梨大が実施した全長ゲノムレプリコンアッセイでヒットした 4 化合物 (#6, #25, #44, #47) と浜松医科大で実施した HCV trans-packaging system によるアッセイでヒットした NS2-3 プロテアーゼ活性に依存しない HCV 産生阻害化合物 2 種類 (#41, #42) のうち、我々が創出したレポーターアッセイ系で阻害活性 ($IC_{50} < 50 \cdot M$) を示した #25, #42 および #47 の NS2-3 プロテアーゼ活性に対する直接的な阻害活性の評価に NS2-3 プロテアーゼタンパク質を資する目的で、大腸菌セルフリー合成系で NS2-3 プロテアーゼタンパク質を合成し、化合物評価に利用できるよう合成タンパク質の触媒反応条件の最適化を実施した結果、以下のようなことが明らかになった。

①NS2-3 プロテアーゼタンパク質の合成量、可溶性およびプロテアーゼ比活性は、合成反応液に添加する界面活性剤に依存する。

②NS2-3 プロテアーゼタンパク質の合成およびフォールディングには、界面活性剤としてジギトニンを濃度依存的に必要とする。

③NS2-3 プロテアーゼタンパク質のプロテアーゼ活性は亜鉛イオン濃度に依存する。

④NS2-3 プロテアーゼ活性は NS3-4A プロテアーゼ活性に依存しない。

上記の大腸菌セルフリー合成系で合成した NS2-3 プロテアーゼタンパク質を用いたアッセイでは、ウイルス増殖阻害あるいはレプリコン複製阻害が確認されたのち、レポーターアッセイでもヒットした 3 化合物(#25, #42 および #47)の直接的な NS2-3 プロテアーゼ阻害活性は検出されなかった。

D. 考察

これまで、NS2-3 プロテアーゼタンパク質の活性は、ウサギ網状赤血球破碎液内で放射性同位元素を取り込ませながらごく微量に発現させた上で測定するか、あるいは大腸菌の菌体内で不溶性に発現させた後に、効率と再現性が低いリフォールディングによって活性化した NS2-3 プロテアーゼタンパク質でしか測定できなかった。本研究では、大腸菌セルフリー合成系を用いることにより、比活性が高い NS2-3 プロテアーゼタンパク質を効率よく合成し、触媒反応条件の最適化を図ることにより、合成後の触媒反応を制御することが可能になった。これにより、NS2-3 プロテアーゼの生化学的プロフィールをさらに詳細に解析できるだけでなく、NS2-3 プロテアーゼ活性阻害剤候補化合物のスクリーニングにも使用できる。ただし、最終的な触媒反応産物の検出には、SDS-PAGE とウェスタンブロットのようなロースルーブットな工程を経なければならないことから、大腸菌セルフリー合成した NS2-3 プロテアーゼタンパク質を用いたアッセイ系のハイスルーブット化には、検出面で解決すべき課題が残る。

ウイルス増殖阻害あるいはレプリコン複製阻害(#25, #42 および #47) が確認されたのち、レポーターアッセイでもヒットした 3 化合物は、いずれも NS2-3 プロテアーゼ活性を直接には阻害しなかった。なお、#42 はウイルス増殖阻害試験と HCV trans-packaging

systemによるアッセイでヒットした化合物であることから、NS2に直接結合してウイルス粒子形成を阻害する可能性が残る。

E. 結論

大腸菌セルフリー合成系で合成したNS2-3プロテアーゼタンパク質を用いることにより、NS2-3プロテアーゼに対する化合物の直接的な阻害活性を評価するのに非常に適したアッセイ系を確立した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

インターフェロンの応答性に関わるウイルス・宿主免疫機構の解明

研究分担者 朝比奈靖浩 東京医科歯科大学 教授

研究要旨

テラプレビル 3 剤併用療法でも IFN 不応例では治療成績は十分でない。これまで本研究では、IL28B 遺伝子近傍の SNP と宿主自然免疫系遺伝子発現およびインターフェロン治療におけるインターフェロン応答性との関連について検討し、PEG-IFN/RBV 併用療法における NVR に、IL28B minor type および RIG-I などの自然免疫系遺伝子や IFN 誘導遺伝子の治療前の肝内高発現が関与していることを明らかとしてきた。本年度は、IL28B major type と minor type の配列を持つ promoter reporter plasmid を構築し、自然免疫シグナル刺激による promoter 活性を解析し、患者末梢血単核球(PBMC)における ex vivo 刺激による IL28B 発現誘導能と治療効果との関連について検討した。その結果、IL28B minor type の配列を持つ promoter の活性は major type のものよりも低く、患者 PBMC における ex vivo 刺激による IL28B 発現誘導能は治療効果と関連し、NVR 例で有意に低値であった。従って、IL28B 近傍の SNP が規定するインターフェロン不応性には、インターフェロン治療における IL28B 発現誘導が障害されていることが関与していると考えられた。

A. 研究目的

テラプレビル 3 剤併用療法でも IFN 不応例では治療成績は十分でない。宿主による C 型肝炎ウイルス (HCV) の排除には RIG-I/IPS-1 系を中心とした自然免疫及び IFN 応答性が重要である。一方、HCV は NS3/4A プロテアーゼで IPS-1 を特異的に切断することで宿主自然免疫から逃避する。今回治療不応性に関わる自然免疫分子機構及び HCV 逃避機構を臨床的・基礎的に検討した。

B. 研究方法

PEG-IFN/RBV 施行 genotype 1b 型 C 型慢性肝炎 416 例を対象とし、IFN 応答性に関わるウイルス・宿主因子を明らかとすると共に RIG-I/IPS-1 系を中心とした宿主自然免疫と HCV の逃避機構を治療前肝組織、末梢血単核球 (PBMC) 及び細胞培養系を用いて解析した。

(倫理面の配慮)

臨床データのデータベースにおいては、氏名、年齢など個人情報を連結可能匿名化するなど、患者プライバシーを完全に保護すること、患者尊厳、人権、利益を完全な形で尊重すること、研究の目的と手段が科学的に理にかなったものであることなど倫理面で配慮する。本研究における遺伝子組換え実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく「研究開発二種省令・研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」に準拠し遂行する。研究の施行に当たっては、東京医科歯科大学組み換え DNA 実験安全管理委員会の承認、および文部科学大臣の確認を取得している。

C. 研究結果

PEG-IFN/RBV 療法において NVR に関わる治療前の宿主・ウイルス因子は年齢、肝線維化、rs8099917 non-TT、肝内 RIG-I・ISG-15 遺伝子高発現及び HCV

コア変異であった。rs8099917 non-TT では肝内 RIG-I・ISG15 遺伝子が高発現し IPS-1 は低発現していたが、non-TT でも非 NVR 例ではこれら遺伝子は低発現で、SVR 例では NVR 例に比し HCV による IPS-1 蛋白の切断産物の割合が低値であった。一方、RNF125 などの抑制系の ISG は NVR 例で低発現であった。患者由来の PBMC において IFN α 及び poly (I:C) 刺激による IL28B の発現誘導は rs8099917 nonTT で低い傾向を認め、NVR 例では有意に低かった ($p = 0.004$) が、IL28A や IFN β の誘導能には差を認めなかった。nonTT 患者由来 IL28B promoter を用いた reporter assay では RIG-I、IRF7、p50-p65 による promoter の活性化が TT 患者由来のものに比べて低かった。一方、in vitro では RIG-I 誘導性 IFN β の活性は NS3/4A の他 NS4B によっても抑制され、切断体 IPS-1 の強制発現により活性化される IFN β の promoter 活性は NS3/4A では抑制されないが、NS4B では完全に抑制された。また NS4B は IPS-1 の下流分子である STING と共局在し、これを介して RIG-I 誘導性 IFN 経路を抑制していると考えられた。

D. 考察

IFN 応答性には HCV コア変異、IL28B SNP とともに、宿主自然免疫の IFN 促進系と抑制系の遺伝子発現が関連し、NVR 例では PBMC における外因性 IFN に対する IL28B 誘導能が VR 症例に比し低く、これには IL28B の SNP で規定される promoter 活性の差が関与している可能性が考えられた。一方、IFN 治療効果には NS3/4A・4B による HCV 逃避機構が関連していることが示唆された

E. 結論

C型慢性肝炎に対する治療効果には IFN 応答性と HCV 逃避機構が複雑に関連していると考えられるが、プロテアーゼ阻害剤 3 剤併用療法の難治例である IFN 不応例では RIG-I/IPS-1 を中心とした自然免疫経路が新規治療の標的となり得ると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M: Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology*. 57(1):46-58, 2013.
2. Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology Research* 2013; 43: 1-34
3. 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 interleukin 28B with antiviral response. *Hepatology*. 55: 20- 29, 2012.
4. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fujiki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M. Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. *Hepatology*. 2012; in press.
5. 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, Morikawa H, Adachi K, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsushashi H, Oketani M, Kumada H: Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFN α 2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multi-center cooperative study. *J Gastroenterol*. (Epub ahead of print) 2012.

6. Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Ttoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T: Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. PLoS One 7(6):e39175, 2012.
 7. Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K: No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. BMC Med Genet. 13: 47 2012.
 8. Tamaki N, Kurosaki M, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Izumi N: Noninvasive estimation of fibrosis progression overtime using the FIB-4 index in chronic hepatitis CN. J Viral Hepat. 20(1):72-76, 2012.
 9. Toyoda J, Ozeki I, Asahina Y, Izumi N, Takahashi S, Kawakami Y, Chayama K, Kamiya N, Aoki K, Yamada I, Suzuki Y, Suzuki F, Kumada H: Virologic response and safety of 24-week telaprevir alone in Japanese patients infected with hepatitis C virus subtype 1b. J Viral Hepat. 20(3):167-173, 2012.
 10. 朝比奈靖浩、泉 並木、桶谷 眞、熊田博光、小池和彦、鈴木文孝、滝川 一、田中 篤、坪内博仁、林 紀夫、平松直樹、四柳 宏 (日本肝臓学会肝炎ガイドライン作成委員会) : C型肝炎治療ガイドライン (第1版) 肝臓. 53(6) : 355-395 社団法人日本肝臓学会, 2012
2. 著書
 1. 朝比奈靖浩 : 肝疾患 臨床検査のガイドライン. 272-278 株式会社宇宙堂八木書店, 2012
 2. 朝比奈靖浩 : C型肝炎ウイルスマーカー 感度と特異度からひもとく 感染症診療の Decision Making 242-247 文光堂, 2012
 3. 朝比奈靖浩 : C型肝炎の経過と予後 肝炎ウイルス-B型・C型 70-75 医薬ジャーナル社, 2012
 4. 朝比奈靖浩 : 肝発癌抑制を目指したインターフェロン療法 最新! C型肝炎の使いかた. 43-45 診断と治療社, 2012
 5. 朝比奈靖浩 : 4. ウイルス学的検査 A. A型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版. 34 南江堂, 2012
 6. 朝比奈靖浩 : 4. ウイルス学的検査 B. B型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版. 35-40 南江堂, 2012
 7. 朝比奈靖浩 : 4. ウイルス学的検査 C. C型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版. 40-43 南江堂, 2012
 8. 朝比奈靖浩 : 4. ウイルス学的検査 D. D型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版. 43-44 南江堂, 2012
 9. 朝比奈靖浩 : 4. ウイルス学的検査 E. E型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版. 44 南江堂, 2012
 10. 朝比奈靖浩 : 6. C型慢性肝炎 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版. 95-101 南江堂, 2012
 11. 朝比奈靖浩 : A-2. C型慢性肝炎 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版. 189-219 南江堂, 2012
 2. 学会発表
 1. Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Katoh T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Izumi N: Suppression of Alpha-fetoprotein by Interferon Therapy Reduces The Risk of Hepatocarcinogenesis in Patients with Chronic Hepatitis C. EASL: The international liver congress 2012. Barcelona, 2012年4月21日

2. Akiko Kusano-Kitazume, Naoya Sakamoto, Yukiko Okuno, Kenichi Mori, Mina Nakagawa; Sei Kakinuma, Sayuri Nitta, Miyako Murakawa, Seishin Azuma, Yuki Nishimura-Sakurai, Akihiro Matsumoto, Masatoshi Hagiwara, Yasuhiro Asahina, Mamoru Watanabe; Antiviral effects and action mechanisms of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds against hepatitis C virus. 63rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-11-2012, Boston, MA. USA.
3. Yasuhiro Asahina, Miyako Murakawa, Naoya Sakamoto, Sei Kakinuma, Mina Nakagawa, Seishin Azuma, Yuki Nishimura-Sakurai, Sayuri Nitta, Akiko Kusano-Kitazume, Mamoru Watanabe; Impaired IL28B gene induction and poor IL28B promoter activity influenced by the IL28B minor allele are closely associated with a null response to interferon in chronic hepatitis C patients. 63rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-11-2012, Boston, MA. USA.
4. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Kusano-Kitazume A, Murakawa M, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Watanabe M: HCV-NS4B Protein Binds STING and Blocks the RIG-I Mediated IFN Pathway. The 10th JSH Single Topic Conference, Nov-21-2012, Tokyo.
5. Asahina Y, Murakawa M, Nitta S, Watanabe M: Association of Gene Expression Involving Innate Immunity and IFN Signaling with Genetic Variation in IL28B in Patients with Chronic Hepatitis C. The 10th JSH Single Topic Conference, Nov-21-2012, Tokyo.
6. Akiko Kusano-Kitazume, Naoya Sakamoto, Yukiko Okuno, Sei Kakinuma, Mina Nakagawa, Masatoshi Hagiwara, Yasuhiro Asahina, Mamoru Watanabe; Discovery of N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. The 10th JSH Single Topic Conference, Nov-21-2012, Tokyo.
7. Murakawa M, Sakamoto N, Nakagawa M, Kawai F, Fuziki J, Otani S, Yamanaka H, Kitazume A, Nitta S, Watanabe T, Sakurai Y, Kakinuma S, Asahina Y, Watanabe M : Impaired induction of IL28B expression in PBMC is associated with null response to interferon therapy in chronic hepatitis C. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Oct-8-2012, Venice, Italy.
8. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Mishima K, Murakawa M, Kitazume-Kusano A, Yoshino K, Kiyohashi K, Kakinuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Watanabe M: HCV-NS4B blocks the RIG-I mediated IFN pathway through targeting of STING. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Oct-8-2012, Venice, Italy.
9. 朝比奈靖浩、村川美也子、渡辺守：C型肝炎治療不能性に関わる自然免疫分子機構とHCV逃避機構（シンポジウム1）第39回日本肝臓学会東部会 2012年12月6日 東京。
10. 柿沼晴、中川美奈、朝比奈靖浩：Matrix Metalloproteinase-2の肝線維化過程における機能の解析（特別企画3）第39回日本肝臓学会東部会 2012年12月7日 東京。
11. 柿沼晴、朝比奈靖浩、渡辺守：Non-canonical Wnt経路による肝幹/前駆細胞の増殖/分化の調節（シンポジウム8 肝発癌・進展機序研究に与える幹細胞学のインパクト）JDDW 2012 第16回日本肝臓学会大会 2012年10月11日 神戸。
12. 新田沙由梨 坂本直哉 吉野耕平 村川美也子 北詰晶子 幾世橋佳 東正新 柿沼晴 中川美奈 朝比奈靖浩 渡辺守：HCV NS4B 蛋白による RIG-I 誘導性 Interferon 発現経路の抑制機構についての解析（一般演題）JDDW 2012 第16回日本肝臓学会大会 2012年10月10日 神戸。
13. 新田沙由梨、朝比奈靖浩、坂本直哉、村川美也子、北詰晶子、幾世橋佳、東正新、柿沼晴、中川美奈、渡辺守：IFN 不応例における宿主自然免疫応答

と HCV 逃避機構 (シンポジウム 1 ウイルス増殖制御機構の最新情報)第 77 回インターフェロンサイトカイン学会 2012 年 6 月 21 日 神戸.

14. 鈴木祥子、朝比奈靖浩、村岡 優、田中佳祐、鈴木雄一朗、玉城信治、星岡賢英、安井 豊、加藤知爾、細川貴範、上田 研、土谷 薫、中西裕之、板倉 潤、高橋有香、黒崎雅之、泉 並木: ペグインターフェロン・リバビリン併用療法の早期 HCV 動態からみた IL28B genotype とインターフェロン応答性の予測 第 48 回 日本肝臓学会総会 金沢, 2012 年 6 月 8 日

15. 朝比奈靖浩、土谷 薫、泉 並木: 肝癌悪性度評価を考慮した治療アルゴリズムの有用性の検討 第 48 回 日本肝臓学会総会 金沢, 2012 年 6 月 7 日

16. 黒崎雅之、朝比奈靖浩、泉 並木: 臨床背景の評価に基づく C 型肝炎の治療選択 第 48 回 日本肝臓学会総会 金沢, 2012 年 6 月 7 日

17. 土谷 薫、小無田美菜、村岡 優、田中佳祐、鈴木雄一朗、星岡賢英、玉城信治、加藤知爾、安井 豊、細川貴範、上田 研、中西裕之、板倉 潤、高橋有香、黒崎雅之、朝比奈靖浩、坂元亨宇: 肝癌 RFA 治療例における progenitor cell feature marker の臨床的有用性 第 48 回 日本肝臓学会総会 金沢, 2012 年 6 月 7 日

18. 村岡 優、加藤知爾、土谷 薫、田中佳祐、鈴木雄一朗、星岡賢英、玉城信治、安井 豊、細川貴範、上田 研、中西裕之、板倉 潤、高橋有香、黒崎雅之、朝比奈靖浩、泉 並木: C 型肝炎ウイルス陽性肝細胞癌局所根治療法後ペグインターフェロン・リバビリン併用療法における IL-28B 遺伝子多型の臨床的意義 第 48 回 日本肝臓学会総会 金沢, 2012 年 6 月 7 日

19. 朝比奈靖浩、泉 並木: インターフェロン応答性とプロテアーゼ阻害薬 3 剤併用療法の治療効果 第 48 回 日本肝臓学会総会 金沢, 2012 年 6 月 8 日

20. 板倉 潤、村岡 優、星岡賢英、田中佳祐、鈴木雄一朗、加藤知爾、玉城信治、安井 豊、細川貴範、山田航希、上田 研、土谷 薫、中西裕之、黒崎雅之、朝比奈靖浩、泉 並木: B 型・C 型慢性肝炎患者に対する医療費助成の効果と拠点病院 第 48 回 日本肝臓学会総会 金沢, 2012 年 6 月 8 日

21. 朝比奈靖浩、泉 並木: インターフェロン不応性の予測とプロテアーゼ阻害薬 3 剤併用療法の治療効果 第 98 回 日本消化器病学会総会 東京, 2012 年 4 月 20 日

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

C型慢性肝炎のインターフェロン応答性と治療法選択に関する研究

分担研究者：黒崎雅之 武蔵野赤十字病院 部長

研究要旨

テラプレビル併用療法は、治療効果も高いが副作用発現も多く、治療無効例では耐性変異が出現するため、治療が有効な症例を把握することは重要である。治療開始前、あるいは治療開始後早期に抗ウイルス効果を予測することで、テラプレビル併用療法を行うべき症例の選択ができる。テラプレビル併用療法を開始する前に、Peg-IFN・RBVを4週間先行投与するLead-in治療を行い、Lead-in反応性と治療有効性、耐性変異リスクの関連を検討した。Lead-in治療反応性が良好な症例では、治療開始前にNS3変異があっても早期にHCV陰性化が得られ、Breakthroughも生じないのに対し、Lead-in治療反応性が不良の症例では、治療開始前にNS3変異がなくても治療中にNS3変異が出現しBreakthroughが生じることを見出した。すなわち、Lead-in治療反応性により治療有効性と耐性変異リスクが把握できる。

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対する標準治療は、ペグインターフェロン・リバビリンとテラプレビルの3剤併用療法である。3剤併用療法は治療効果が高いが副作用の発現頻度も高く、また治療無効例では高頻度に耐性ウイルスが出現することも明らかとなっている。テラプレビルに対する耐性ウイルスは、今後登場する予定の次世代NS3/4阻害剤に対しても交叉耐性を有するため、治療が無効となる可能性の高い症例にはテラプレビルを含む3剤併用療法以外の治療法を選択すべきである。今回の研究では、テラプレビル治療効果と2剤併用に対する反応性との関連性、および耐性ウイルス出現のリスクについて検討した。

B. 研究方法

ペグインターフェロン・リバビリン2剤併用療法を施行した症例のIL28B、Core70変異、および治療中のHCV Dynamicsとウイルス陰性化との関連を解析した。4週間の2剤併用Lead-in後に3剤併用療法を開始した症例のデータをもとに、Lead-inにおける治療反応性と、テラプレビル

add-on後のウイルス動態、治療効果について検討した。NS3/4領域について、治療開始前後にSequencingを施行し、Lead-in治療反応性と耐性変異出現リスクとの関連性を検討した。

C. 研究結果

テラプレビル3剤併用療法では2剤併用療法の前治療で治療中にHCVが陰性化した症例では88%でSVRが達成されることが国内臨床試験で示されている。そこで、2剤併用療法により治療中にHCV RNAが陰性化するVirological Response (VR)と早期HCV減衰との関連性を検討した。早期HCV減衰によるVR予測精度のROC解析では、1週0.900、2週0.910、4週0.931、8週0.942であり、4週間の治療で2.0Log以上のHCV RNA減衰が得られれば、全治療期間の中でHCVが陰性化するVRは95%で達成され、一方2.0Log減少しなかった場合には、治療中のHCVが陰性化しないnon-VRが58%であった。VRの予測精度は感度85%、特異度83%であった。IL28B(rs8099917)がTTのMajor型では、4週間で2.0Log以上のHCV RNA減衰が87%で達成されたのに対し、IL28BがTG/GGのMinor型では、わずかに26%であった。特にIL28B

がMinor型の症例におけるCore70アミノ酸置換に注目すると、野生型では4週間でのHCV減衰2.0Log以上が36%、1.0-1.9Logが45%、1.0Log未満が18%であったのに対し、変異型では4週間でのHCV減衰2.0Log以上が20%、1.0-1.9Logが25%、1.0Log未満が55%と、治療反応性が極めて不良であった。このような治療前因子の組み合わせで、2剤併用によるHCV陰性化のある程度の予測は可能であったが、予測乖離例も存在することも判明した。

4週間の2剤併用のLead-inに引き続きテラプレビルをadd-onし3剤併用療法に移行した45症例の検討では、Lead-inの4週間でのHCV減衰が2.0Log以上であればテラプレビルadd-on後1週間以内でのHCVRNA陰性化の予測精度が、感度96%、特異度67%であり、さらに3.3Log以上減衰した場合には、テラプレビルadd-on後1日でのHCVRNA陰性化の予測精度が、感度88%、特異度74%であった。IL28BがMajor型の症例では、4週間でのHCV減衰が2.0Log以上の症例が90%を占めており、これらの治療反応良好症例においてテラプレビルadd-on後1日でのHCVRNA陰性化は31%、1週間以内でのHCVRNA陰性化は96%であり、現時点でのSVR4は100%であった。一方IL28BがMinor型では、4週間でのHCV減衰が2.0Log未満の症例が80%を占めており、これらの治療反応性不良症例におけるテラプレビルadd-on後1日でのHCVRNA陰性化は0%、1週間以内でのHCVRNA陰性化は25%であり、現時点でのSVR4は0%であった。

治療開始前にNS3/4に遺伝子変異(T54S)を有した症例は、44歳女性の初回治療例でIL28BのMajor型であったが、4週間のLead-inで2.3LogのHCV RNA減衰が得られ、テラプレビルadd-on後1日でHCV RNAの陰性化が得られ、治療中のBreakthroughや治療終了後の再燃、耐性ウイルスの再増殖もなく、SVR4が達成できている。一方、治療開始前には耐性変異がなかった症例で、Lead-inのHCV減衰が0.8Logと不良であった67歳の前治療無効例、IL28BはMinor型の症例では、テラプレビルadd-on後に早期のHCV RNA陰性は得られず、4週時点で一過性のHCV RNA陰性化が得られた後に7週目にHCVRNAの再出現すな

わちBreakthroughを生じ、この時点でT54A耐性変異が出現した。

4週間の2剤併用治療で2.0LogのHCV減衰が得られなかった症例においては、そのまま2剤併用療法を継続しResponse-guideで治療した場合のSCR率が25%であったのに対し、テラプレビルをadd-onした場合のSVR4は29%に留まっており、このような治療効果不良例に対するテラプレビル併用で、治療効果の向上が得られなかった。

D. 考察

インターフェロン治療反応性は、治療前にIL28BとCoreアミノ酸置換で予測することが可能であるが、予測乖離例が13-36%存在する。4週間の2剤併用のLead-in治療では、早期のHCV減衰とテラプレビルadd-on後のHCVRNA陰性化時期が密接に関連し、特にIL28BがMajor型で2剤に対する治療反応性の良い症例では、テラプレビル3剤併用に対する反応性も極めて良好で、高率にSVRが期待できる。また治療開始前に耐性ウイルスが存在しても、2剤に対する反応性が良好な症例では、テラプレビル併用でもBreakthroughを生じることがない。これとは対照的に、IL28BがMinor型で2剤に対する治療反応性が悪い症例では、テラプレビル3剤併用に対する反応性も悪く、SVR率も低いのみならず、治療中に耐性ウイルスの出現によるBreakthroughをきたすリスクがある。

E. 結論

ペグインターフェロン・リバビリンに対する反応性を評価することで、テラプレビル3剤併用療法の治療効果および耐性変異リスクを評価することができる。治療開始前のHCV遺伝子変異は、テラプレビル治療開始後のBreakthroughの予測には有用ではなく、インターフェロン治療に対する反応性が耐性ウイルス出現リスクを規定する。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1)Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Yatsunami H & Izumi N. Age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among early virological responders to peg-interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. Antiviral Therapy 2012;17(1):35-43.

(2)Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N. A model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin

therapy for chronic hepatitis C. J Med Virol 2013 in press

2. 学会発表

米国肝臓学会 2012 : Kurosaki, M et al. Predictive factors for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C following sustained virological response to interferon therapy

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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：インターフェロン・リバビリン起因性貧血に関わる宿主因子の解析

分担研究者：坂本 直哉 北海道大学医学研究科消化器内科学分野

研究要旨

インターフェロン・リバビリン薬剤抵抗性にはウイルス因子および遺伝子多型を含む宿主因子が密接に関連する。しかし両者の併用投与が標準治療であるためリバビリン単独の血球系の変動と IPTA 遺伝子多型の関連についての解析は困難である。我々は、リバビリン単独投与を 2 剤併用療法に先行して行い IPTA 遺伝子多型を含む宿主要因と貧血発症との関連を検討し、血球系の変動に関連する造血ホルモン動態との関連を解析した。IPTA 遺伝子多型はリバビリン単独投与期間中の貧血と関連し、IPTA-CA/AA 型の症例ではリバビリンによるヘモグロビン減少は全く出現しなかった。リバビリン単独投与期間中に認められる血小板増多の機序としてリバビリンによる貧血により惹起される内因性 erythropoietin 分泌が関与している可能性が示唆された。本成果に基づき、赤血球、血小板値の変化に加え、治療に伴う顆粒球系の変化に関連する宿主、ウイルス因子を探索し、より安全な抗ウイルス療法の確立を目指す。

A. 研究目的

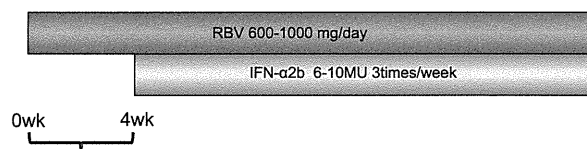
C 型慢性肝炎の標準治療であるペグインターフェロン・リバビリン併用療法は、依然として著効率が 50%にとどまり治療困難例が存在する。インターフェロン・リバビリン薬剤抵抗性にはウイルス因子および遺伝子多型を含む宿主因子が密接に関連する。リバビリン併用療法中に起こる貧血は、インターフェロン単独投与と比較しより血小板減少が軽微になるとの報告されており、その機序としてエリスロポエチン、トロンボポエチンなどの造血ホルモンが増加していたことから、リバビリンによる血小板への何らかの関与を示唆する報告もある。しかし両者の併用投与が標準治療であるためリバビリン単独の血球系の変動と IPTA 遺伝子多型の関連についての解析は困難である。

今回我々は 4 週間のリバビリン単独期間中の血球系の変動、IPTA 遺伝子多型、造血ホルモンであるエリスロポエチン、トロンボポエチンとの関連性について検討した

B. 研究方法

本研究期間内に我々は、リバビリン単独投与を 2 剤併用療法に先行して行い IPTA 遺伝子多型を含む宿主要因と貧血発症との関連を検討し、血球系の変動に関連する造血ホルモン動態との関連を解析した。

PEG-IFN、Ribavirin併用療法に先行したRibavirin単独投与

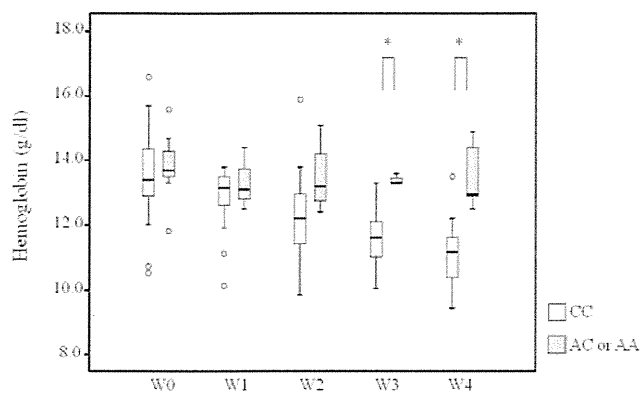


(倫理面の配慮)

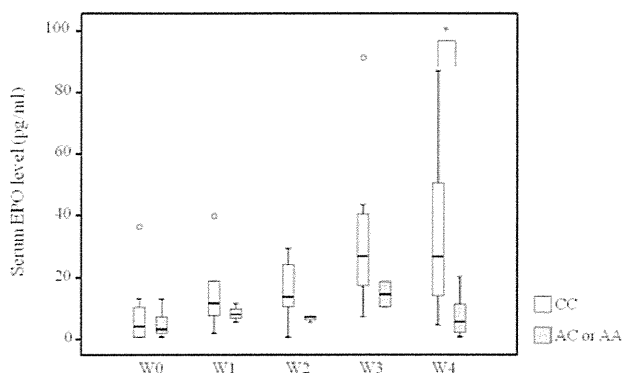
本研究本臨床試験は、北海道大学病院倫理委員会の審査を通過しており、全症例において書面によるインフォームド・コンセントを取得している。

C. 研究結果

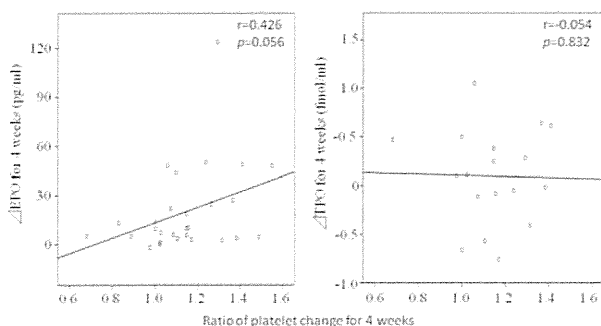
リバビリン単独投与開始 2 週目、4 週目における、IPTA CC アレルの患者のヘモグロビン値は AC/AA アレルの患者と比較し、有意に低値を示した。また IPTA CC アレルの患者の網状赤血球は開始時 9.7% [6.1-40.4%] から 4 週目には 31.0% [15.8-70.0%] と有意に上昇していたのに対し (p=0.001)、IPTA AC/AA アレルの患者では開始時 8.8% [8.0-16.9%] であり、4 週目に 11.3% [9.0-20.5%] と有意な変化は認めなかった。



ITPA-CC の患者の血清 EPO 値は 4 週間で 3.4pg/ml [0.0-35.8pg/ml] から 26.1 pg/ml [3.1-154.2pg/ml] まで有意に上昇していた($p=0.005$)。一方 ITPA -AC/AA の患者では、開始時 2.4pg/ml [0.0-12.2 pg/ml]であり、4 週目に 4.7 pg/ml [0.0-17.3pg/ml]と変化を認めなかった。



4 週間の血小板値とエリスロポエチン変化量は有意ではなかったが、 $r=0.426$, $p=0.056$ と相関する傾向が認められた。4 週間の血小板変化率とトロンボポエチン濃度には特に有意な相関関係は認めなかった。ヘモグロビン値と血小板数、またヘモグロビン値とトロンボポエチン増加量はそれぞれ有意な相関は認めなかった。



E. 結論

ITPA 遺伝子多型はリバビリン単独投与期間中の貧血と関連し、ITPA-CA/AA 型の症例ではリバビリンによるヘモグロビン減少は全く出現しなかった。リバビリン単独投与期間中に認められる血小板増多

の機序としてリバビリンによる貧血により惹起される内因性 erythropoietin 分泌が関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Jing-Tang Huang, Ching-Ping Tseng, Mei-Huei Liao, Shao-Chun Lu, Wei-Zhou Yeh, Naoya Sakamoto, Chuan-Mu Chen, and Ju-Chien Cheng: Hepatitis C virus replication is modulated by the interaction of non-structural protein NS5B and fatty acid synthase. *Journal of Virology* 2013; *in press*.
- Sakamoto N: NX-PVKA assay, a conventional but refined prognostic biomarker for Hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2013; *in press*.
- Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fijiki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, and Watanabe M. Wnt5a Signaling Mediates Biliary Differentiation of Fetal Hepatic Stem/Progenitor Cells. *Hepatology* 2013; *in press*.
- Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N: A model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2013; *in press*.
- Oze T, Hiramatsu N, Mita E, Akuta N, Sakamoto N, Itoh Y, Izumi N, Nomura H, Hayashi N, Takehara T: A multi-center survey of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. *Hepatol Res* 2013; *in press*.
- Haba S, Yamao K, Bhatia V, Mizuno N, Hara K, Hijioka S, Imaoka H, Niwa Y, Tajika M, Kondo S, Tanaka T, Shimizu Y, Yatabe Y, Hosoda W, Kawakami H, Sakamoto N: Diagnostic ability and factors affecting accuracy of endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for pancreatic solid lesions: Japanese large single center experience. *J Gastroenterol* 2013; *Epub ahead of print*.
- Kohjima M, Enjoji M, Yoshimoto T, Yada R, Fujino T, Aoyagi Y, Fukushima N, Fukuizumi K, Harada N, Yada M, Kato M, Kotoh K, Nakashima M, Sakamoto N, Tanaka Y, Nakamura M. Add-on therapy of pitavastatin and eicosapentaenoic acid improves outcome of peginterferon plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2013; 85(2):250-260.

8. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M: Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 2013; 57(1):46-58.
9. Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S: Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2012;42(10):958-965.
10. Yamashita A, Abdus K, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Thuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K: Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Marine Drugs* 2012; 10(4):744-761.
11. Kobayashi T, Hige S, Terashita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Nakanishi M, Ogawa K, Chuma M, Sakamoto N, Asaka M: Anemia and thrombocytosis induced by ribavirin monotherapy in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2012; 47(11):1228-1237.
12. Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K: Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Haliclona* (*Reniera*) sp. *Plos One* 2012;7(11):e48685.
13. Katsurada T, Kobayashi W, Tomaru U, Baba T, Furukawa S, Ishizu A, Takeda K, Sakamoto N, Asaka M, Takeda H, Kasahara M: Decrease of peripheral and intestinal NKG2A-positive T cells in patients with ulcerative colitis. *PLoS One* 2012;7(9):e44113.
14. Li YJ, Wu HH, Weng CH, Chen YC, Hung CC, Yang CW, Wang YL, Sakamoto N, Tian YC: Cyclophilin A and nuclear factor of activated T cells are essential in cyclosporin A-mediated suppression of polyomavirus BK replication. *Am J Transplantation* 2012; 12:2348-2362.
15. Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Onozuka I, Azuma S, Kakinuma S, Nitta S, Kiyohashi K, Kusano-Kitazume A, Murakawa M, Yoshino K, Itsui Y, Tanaka Y, Mizokami M, Watanabe M, Ochanomizu Liver Conference Study Group: Association of ITPA gene variant and serum ribavirin concentration with blood cells decline in pegylated interferon-alfa plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 2012; *Epub ahead of print*.
16. Sakurai F, Furukawa N, Higuchi M, Okamoto S, Ono K, Yoshida T, Kondoh M, Yagi K, Sakamoto N, Katayama K, Mizuguchi H: Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a. *Virus Research* 2012; 165(2):214-218.
17. Cheng J-C, Yeh YJ, Tseng CP, Hsu SD, Chang YL, Sakamoto N, Huang HD: Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(15):2621-2633.
18. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Izumi N: Data mining model using simple and readily available factors could identify patients at high risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2012;56(3):602-608.
19. Nichols DB, Fournet G, Gurukumar KR, Basu A, Lee JC, Sakamoto N, Kozielski F, Musmuca I, Joseph B, Ragno R, Kaushik-Basu N: Inhibition of hepatitis C virus NS5B polymerase by S-trityl-L-cysteine derivatives. *Eur J Med Chem* 2012; 49:191-199.
20. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N (equal contribution), Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M: Identification of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agent Chemother* 2012; 56(3):1315-1323.
21. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Yatsushashi H, Izumi N: Age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among early virological responders to peg-interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. *Antivir Ther* 2012; 17:35-43.
22. 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* 2012; 55(1):20-29.

- | | |
|---|---|
| <p>23. 新田沙由梨, 坂本直哉: NCV-NS4B 蛋白と IFN 発現計シグナル分子との分子間相互作用の解析. 消化器と免疫 2011; 48: 174-177.</p> <p>24. 坂本直哉: C 型肝炎治療の EBM: テラプレビル. 肝胆膵 2012; 64(3): 319-325.</p> <p>25. 中川美奈, 坂本直哉: C 型肝炎治療における治療効果予測と副査用対策. 消化器の臨床 2012; 15 (3): 278-284.</p> <p>26. 坂本直哉: インターロイキン 28-29 (IL-28・IL-29) -インターフェロンλ. 臨床免疫・アレルギー科特集: サイトカインのすべて 2012; 57 (Suppl. 21):184-187.</p> <p>27. 中川美奈, 坂本直哉: HCV 治療抵抗性関連遺伝</p> | <p>子の同定と治療展開. G. I. Research 2012; 20 (3): 17-21.</p> <p>2. 学会発表
なし</p> <p>G. 知的所有権の出願・取得状況</p> <p>1.特許取得
なし</p> <p>2.実用新案登録
なし</p> <p>3.その他
なし</p> |
|---|---|

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

-次世代シーケンサーによる DAA 耐性ウイルスの検討-

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

DAA 未治療の C 型肝炎患者において Direct-acting antiviral agent (DAA) に対する耐性 HCV の存在を次世代シーケンサーにて解析し、Telaprevir/PEG-IFN/RBV 療法の治療効果との関連を検討した。さらにヒト肝細胞キメラマウスを用いて変異型 HCV に対する DAA の治療効果を検討した。治療前、16 例中 4 例に 0.1-11% の telaprevir 耐性変異が検出された。しかしいずれの症例も治療後速やかな血中 HCV 陰性化が得られ、breakthrough は生じておらず、治療前の変異型 HCV の解析では治療効果予測は困難であった。Telaprevir あるいは NS5A 阻害剤耐性型 HCV 感染マウス、に telaprevir+NS5A 阻害剤を併用投与すると両薬剤に対する二重耐性型 HCV が出現し breakthrough が生じ、さらに NS5B 阻害剤の投与により、三重耐性型 HCV が出現した。これらの結果から DAA 製剤を sequential に使用すると、多剤耐性型 HCV が出現するため、注意が必要であることが示された。

A. 研究目的

Direct-acting antiviral agent (DAA) 未治療の C 型肝炎患者において耐性型 HCV の存在を次世代シーケンサーにて解析し、Telaprevir/PEG-IFN/RBV 療法の治療効果との関連を検討する。さらにヒト肝細胞キメラマウスを用いて変異型 HCV に対する DAA の治療効果を検討する。

B. 研究方法

C 型慢性肝炎患者 16 例において血清から HCV を抽出し、NS3 領域の aa36, aa54, aa155, aa156 を次世代シーケンサー（イルミナ Genome analyzer II）を用いて解析し、telaprevir 耐性変異の有無とその後に行った Telaprevir/PEG-IFN/RBV 療法との関連を検討した。Plasmid おを用いた検討により、変異型 HCV は 0.1% 以上検出されたものを有意とした。またヒト肝細胞キメラマウスを用いて、野生型あるいは変異型 HCV 全長クローンから合成した HCV RNA を肝臓内に注入、感染後、DAA 製剤を投与し治療効果および耐性ウイルスの出現を検討した。

C. 結果

Telaprevir/PEG-IFN/RBV を施行した 16 例中 4 例 (25%) に治療前、Telaprevir 耐性変異が検出された (0.35% の V36I 変異、11% の V36I 変異、1.6% の V36I 変異、0.1% の A156V 変異)。しかし 4 例とも Telaprevir/PEG-IFN/RBV 4 週目には血中 HCV は陰性化し、治療中、陰性が継続した。前治療無効例の 1 例 (1.6% の V36I) で治療終了後、HCV の再燃を認めたものの、他 3 例は SVR となった。Telaprevir 耐性である NS3 V36A 変異クローンを感染させたマウスに対し、telaprevir+NS5A 阻害剤を併用投与したところ、血中 HCV RNA は低下するものの陰性化は得られず、NS3 変異に加え NS5A 阻害剤耐性変異である NS5A Y93H 変異が出現した。NS5A 阻害剤耐性である NS5A L31V 変異あるいは L31V+Y93H 変異型クローン感染マウスに対し、telaprevir+NS5A 阻害剤を併用投与したところ NS5A の変異に加え NS3 V36A 変異が出現し二重耐性型となり breakthrough が生じた。このマウスにさらに NS5B 阻害剤を併用投

与したところ、一旦は血中HCV RNAは陰性化した
が、耐性変異である P495S 変異が出現、三重耐性型とな
り breakthrough が生じた。

D. 考察

PEG-IFN/RBV が有効な症例であれば、治療前の耐性
ウイルスは Telaprevir/PEG-IFN/RBV によって排除
可能であり、治療前の deep sequence による耐性ウ
イルスの有無の検討では、治療効果を予測するこ
とは困難と思われた。またマウスを用いた検討により、
DAA 製剤を sequential に使用すると、多剤耐性変異
型 HCV が出現するため、注意が必要であることが示
された。

E. 結論

次世代シーケンサーによる deep sequence は、DAA
製剤の耐性変異株の存在、または治療による
dynamics の解析に有用である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shi N, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Zhang Y,
Kosaka K, Okazaki A, Murakami E, Tsuge M, Abe H,
Aikata H, Takahashi S, Ochi H, Tateno-Mukaidani
C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee
F, Gao M, Chayama K. Combination therapies with
NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different
genotypes of hepatitis C virus in human
hepatocyte chimeric mice. Gut. 2013, in press

2. 学会発表

1) Michio Imamura, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes,
Nobuhiko Hiraga, Tomokazu Kawaoka, Masataka
Tsuge, Yoshiiku Kawakami, Hiroshi Aikata,
Shoichi Takahashi, Kazuaki Chayama. Deep
sequencing analysis of hepatitis C virus
quasipieces in patients treated with telaprevir
in combination with peginterferon and ribavirin.
The 10th JSH Single Topic Conference, Tokyo.
November 21, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

制御性Tリンパ球（Treg）とともに免疫反応を抑制する作用が注目されている骨髄由来抑制細胞（MDSC）について、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CD14(+)HLA-DR(-/low) MDSCは、非がん患者に比較して増加しており、肝がんの病期（stages I-II / III-IV）と相関することが示された。また、RFA治療後にMDSCの低下した症例では再発（二次発がん）までの期間が延長する傾向があった。これより、肝がん患者において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。また同時に、免疫反応はウイルスの排除にも深く関わっている。これまで慢性肝炎から発がんに至る病態について、肝細胞障害とウイルスの持続感染が維持されていることから、免疫反応は抑制状態にあり制御性Tリンパ球（regulatory T cell ; Treg）が関与していることを検討してきた。さらに最近になって、制御性Tリンパ球を含めた免疫の抑制状態には骨髄由来抑制細胞（MDSC）が関わるということが注目されるようになった。そこで、C型慢性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MDSCの頻度、機能解析、臨床経過における推移について細胞免疫学的に検討した。

B. 研究方法

C型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）からセルソーターを用いてCD14(+)HLA-DR(-/low)MDSC分画を分離した。これらの細胞分画の頻度を定

量するとともに、共培養による増殖抑制能を検討した。また、同様にラジオ波治療（RFA）の経過におけるMDSCの推移を検討するとともに、治療後の長期予後について解析した。

また同時に、CD4(+)CD25(high)CD127(-/low)制御性Tリンパ球分画を定量することによってMDSC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) 患者からセルソーターによって分離したCD14(+)HLA-DR(-/low)MDSC分画の割合 [MDSC ratio: MDSC / CD14(+)] は、健常対照者(n=13) 9.4、慢性肝炎(n=26) 10.1、肝がん stages I-II(n=77) 17.0、stages III-IV(n=46) 22.3であった。肝がん患者での有意な増加を認めるとともに、肝がん病期の進展に伴って有意に増加していた (P = 0.018)。

2) 慢性肝炎患者および健常対照者における肝炎の活動性 (Healthy / A1 / A2)、線維化 (Healthy / F1 / F2 / F3) と、MDSC ratio には相関を認めなかった。

3) RFA 治療を施行した症例における推移の検討では、MDSC ratio : 治療前 18.0 → 治療後 15.5 と低下する傾向がみられた。

4) MDSC ratio の違いによる RFA 治療の予後の検討では、MDSC ratio が 2.2 以上の患者群に比べて、2.2 未満の患者群で有意に無再発生存期間が延長する傾向があった (Kaplan-Meier 解析 ; $P = 0.018$, log-rank test)。

5) MDSC と制御性 T リンパ球との相関について、両者とも肝がん患者で有意に増加しているものの、個々の患者における両割合には相関を認めなかった。

D. 考察

MDSC は骨髄幹細胞から産生されると顆粒球性分画 (granulocytic) と単球性分画 (monocytic) に分かれて末梢で機能すると考えられている。なかでも、単球性 MDSC はリンパ節における抗原非特異的な免疫抑制機能に加えて腫瘍局所においてもその作用を発揮していることが示唆されている。そこで、本年度の研究では C 型慢性肝疾患患者の末梢血から得られた単球性 MDSC に注目した。

先ずセルソーターによって分取された MDSC の機能について検証したところ、共培養した PBMC の増殖反応を抑制することが分かった。このような抑制作用は IL-10 などの液性因子を介することが示唆されており、今後、液性因子に対する中和抗体を用いた検討が必要である。

肝がん患者において MDSC の割合が有意に増加していた。腎がんなど他の悪性腫瘍においても MDSC が増加すると報告されているものの、その詳細な機序は明らかとなっていない。本研究において肝がんの進展と相関していたことは、進行した症例ではがん免疫の抗腫瘍作用が低下している可能性がある。さらに、肝がんの根治的局所治療後の無再発期間について、MDSC の割合が高値を示す症例で短縮す

る傾向があったことは、がん免疫が抑制されていたことを示唆するものと考えられる。

肝がんの根治的局所治療ともなると MDSC が低下したことは、がん組織の存在が MDSC の増加に関与していることを示唆している。がん微小環境についてのさらなる検討によって MDSC に与える影響を解明することが求められる。

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、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. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuda H, Ito Y, Suto H, Yamakawa A, Satomi S, Ohtani M, Yamazaki Y, Kusaka Y, Shimabukuro Y, Kikuchi K, Keida Y, Azuma T, Nakamoto Y: Clinical relevance and sequence analysis of the *Helicobacter pylori* dupA region from two areas in Japan with different gastric cancer risks. *Immuno-Gastroenterology* 2012; 1: 127-135.
- 2) Marukawa Y, Nakamoto Y, Kakinoki K, Tsuchiyama T, Iida N, Kagaya T, Sakai Y, Naito M, Mukaida N, Kaneko S: Membrane-bound form of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy in a model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2012; 19: 312-319.
- 3) Shugo H, Ooshio T, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Muraguchi T, Tamase A, Uema N, Yamashita T, Nakamoto Y, Suda T, Kaneko S, Hirao A: Nucleostemin in Injury-Induced Liver Regeneration. *Stem Cells Dev.* 2012; 21: 3044-3054.
- 4) Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, Honda M, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y: Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. *Hepatol. Res.* 2012; 42: 523-542.