

5) Miwa S, Nishida H, Tanzawa Y, Takata M, Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Kimura H, Igarashi K, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S, Tsuchiya H: TNF- α and Tumor Lysate Promote the Maturation of Dendritic Cells for Immunotherapy for Advanced Malignant Bone and Soft Tissue Tumors. PLoS One. 2012; 7: e52926.

6) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Kondo TH, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S: Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Hepatology 2012 (in press).

2. 学会発表

1) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: MicroRNA Dynamics in Precancerous Lesions in a Mouse Model of Chronic Hepatitis B. 第63回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting

(Boston, Massachusetts): Hepatology 56 (4, Suppl.) 315A; 一般; oral: Nov. 13, 2012.

2) Naito T, Nemoto T, Matsuda H, Ohtani M, Suto H Nakamoto Y: High Incidence of HBV Reactivation after R-CHOP and CHOP Regimens among Patients Treated with Six Immunosuppressive Chemotherapies. 第63回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): Hepatology 56 (4, Suppl.) 643A; 一般; poster: Nov. 11, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:

なし

2. 実用新案登録:

なし

3. その他:

なし

HCV 感染における PegIFN/RBV 治療応答性あるいは肝癌発症リスクと相関するウイルス側因子

研究分担者：堀田 博 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野

研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）による肝癌発症には宿主側因子とウイルス側因子の双方が関与していると考えられる。これまでに、ウイルス側因子としてコア蛋白 70 位及び 91 位のアミノ酸変異が報告されているが、他にも NS3 や NS5A の変異が関与する可能性も示唆されている。本研究では、C型慢性肝炎時より肝癌発症まで平均 7 年以上経過を迫えた 49 例の肝癌症例と、同時代に経過観察が可能でかつ肝癌を発症しなかった対照症例 100 例の血清サンプルを用いて、HCV コア蛋白、NS3 及び NS5A の特有のアミノ酸多様性、及び肝癌発症前後でのそれらのアミノ酸多様性の変化について検討した。その結果、単変量解析により、コア蛋白 70 位のアミノ酸変異（Core-Gln70）、NS3 の 1082 位及び 1112 位の変異（NS3-Tyr1082/Gln1112）、NS5A の IRRDR 変異数 6 以上（NS5A-IRRDR \geq 6）、NS5A の 2218 位の変異（NS5A-Asn2218）、及び宿主因子として α フェトプロテイン（AFP）高値、ALT 高値、AST 高値及び肝の線維化スコア高値が、肝癌発症相関因子として抽出された。多変量解析により、Core-Gln70、NS3-Tyr1082/Gln1112 及び AFP 高値がそれぞれ独立した肝癌発症相関因子として同定された。HCV コア蛋白 70 位及び NS3 の 1082/1112 位のアミノ酸は長期間にわたり変異がおこりにくいことから、Core-Gln70 及び NS3-Tyr1082/Gln1112 は肝癌発症リスクファクターとして予後診断の一助に用いることができると思われる。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は慢性肝炎、肝硬変、肝癌を引き起こす。インターフェロン（IFN）を基本とした治療によりウイルスを排除すると、肝炎や肝硬変の病態は生化学的、組織学的に改善し、肝癌のリスクも低下する¹⁾。IFN 治療応答性を規定する因子として、宿主側因子では男性、高齢、肝線維化の進展、IL28B の遺伝子変異²⁻⁴⁾などが関与し、ウイルス側因子としてコア蛋白 70 位と 91 位のアミノ酸変異及び NS5A の ISDR（IFN sensitivity determining region）や IRRDR（IFN/ribavirin resistance determining region）の変異数などが関与することが報告されている⁵⁻⁷⁾。

一方、肝癌発症においても、宿主側因子とウイルス側因子の双方が関与していると考えられる。最近、genome-wide association study（GWAS）により、宿

主側因子として MICA、DEPDC5 という 2 種類の遺伝子変異の重要性が報告された^{8,9)}。また、ウイルス側因子としては、コア蛋白、NS3、NS5A の重要性が培養細胞系やトランスジェニックマウス等を用いた動物実験系で報告されており¹⁰⁾、臨床的にもコア蛋白 70 位及び 91 位のアミノ酸変異の重要性が示唆されている¹¹⁾。

本研究では、C型慢性肝炎時から肝癌発症にいたるまで長期間にわたり経過観察可能であり、かつC型慢性肝炎初診時と肝癌発症時点でのペア血清がある症例 49 例の HCV のコア蛋白、NS3 及び NS5A のアミノ酸がどのように変化するのか、またどのように肝癌発生に関与するのかを、対照群として同時代に 10 年以上経過観察可能でかつ肝癌を発生しなかった症例 100 例の HCV と比較検討した¹²⁾。

B. 研究方法

1) 患者及び血清サンプル: 1988年から2003年の間に明石市立市民病院肝臓内科を受診し、初診時C型慢性肝炎と組織学的に診断され、その後肝癌発症するまで平均 6.5 ± 2.9 年間(3~15年)経過観察を行った肝癌症例(HCC群)49例。初診時と肝癌発症時の血清(pre-HCC及びpost-HCC血清)を解析に用いた。いずれもHCV抗体陽性、HCV RNA陽性で、HCVジェノタイプ1bであった。B型慢性肝炎及び自己免疫性肝炎の症例は除外した。全症例において、初診時から数カ月以内にIFN単独療法を行ったが、いずれもウイルス駆除に至らなかった。

対照群(non-HCC)として、1988年から2003年の間に明石市立市民病院肝臓内科を受診し、初診時に組織学的にC型慢性肝炎と診断され10年間以上(10~15年)の経過観察期間中に肝癌を発症せず、かつ、HCC群49例と平均年齢をマッチさせた100例を用いた。全例HCVジェノタイプ1bで、いずれも初診時から数カ月以内にIFN単独療法を行ったが、ウイルス駆除には至らなかった。

2) HCVコア蛋白、NS3及びNS5Aのアミノ酸残基の解析: 血清から市販のキット(QIAmp viral RNA kit, QIAGEN)を用いてHCV RNAを抽出し、RT-PCR法を用いてコア遺伝子領域を増幅した。増幅されたcDNAの塩基配列をdirect sequence法にて決定し、それに基づいてアミノ酸配列を推定した。コア蛋白においてはとくに70位及び91位のアミノ酸残基に着目して解析を行った。

同様に、HCV RNAのNS3遺伝子領域(とくにN末端120アミノ酸をコードする領域)及びNS5A遺伝子領域(とくにISDR及びIRRDRをコードする領域)を増幅し、NS3及びNS5Aのアミノ酸配列の解析を行った。NS3においてはとくに1082位及び1112位のアミノ酸残基に着目して解析を行った。ISDR及びIRRDRにおいてはコンセンサス配列と比較して変異数(6ヶ所以上または5ヶ所以下)に着目して解析を行った。

コア、NS3及びNS5A遺伝子領域の増幅に用いたプライマーは既報の通り(7, 12)。各HCV蛋白のアミノ

酸残基の番号はジェノタイプ1bのプロトタイプであるHCV-Jに従った。

3) 統計学的解析: Student t test, Fisher's exact probability test 及び Chi square test を用いた。累積発癌率はKaplan-Meier法により求めた。得られたデータはLog-rank testにて評価した。また、多変量解析を行い、オッズ比(OR)と95%信頼区間を求めた。全ての解析はSPSS version 16 software (SPSS Inc.)を用いて行い、 $P < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

(倫理面への配慮) 全ての患者から肝生検、血清保存、治療に対する同意書が得られており、本研究の実施にあたっては明石市立市民病院及び神戸大学大学院医学研究科の倫理委員会にて承認を得た。すべての実験操作はバイオセーフティー指針に準拠して行った。 C. 研究結果

1) HCC群と対照群(non-HCC)の臨床的特徴
初診時のHCC群及び対照群(non-HCC)の臨床的特徴を比較したところ、HCC群の方がALT値、AST値、組織学的grading値、staging値、及び α フェトブロテイン(AFP)値が有意に高かった。血中HCV力価はHCC群及び対照群の間で有意な差は認められなかった。

2) HCC群と対照群(non-HCC)におけるHCVコア蛋白70位及び91位のアミノ酸変異の比較検討
HCC群と対照群における初診時の血清中HCVのコア蛋白70位及び91位のアミノ酸を比較検討した。コア蛋白70位のアミノ酸残基がGlnである場合((Gln70)、また、91位がMetである場合(Met91)を変異型とした。

70位と91位のいずれもが野生型であるコア蛋白はHCC群の45%(22/49)及び対照群の63%(59/94)に見られ、両群間で有意な差を認めなかった。

一方、70位のアミノ酸変異のみに着目すると、変異型(Gln70)はHCC群の43%(21/49)及び対照群の14%(13/94)に見られ、両群間の違いは有意であった($p=0.0002$)。

91位の変異型(Met91)はHCC群と対照群の間で有意差は認められなかった。

また、HCC 群のなかで Gln70 変異型症例と Arg70 野生型症例の臨床的特徴を比較したが、両群間に有意差を認めなかった。

3) HCC 群と対照群 (non-HCC) における HCV NS3 の 1082 位及び 1112 位のアミノ酸変異の比較検討
HCC 群と対照群における初診時の血清中 HCV NS3 の 1082 位及び 1112 位のアミノ酸を比較検討した。NS3 の 1082 位のアミノ酸残基が Tyr であり、かつ、1112 位が Gln である場合 (Tyr1082/Gln1112) を発癌関連変異型とした。

発癌関連変異型の NS3-Tyr1082/Gln1112 は HCC 群の 63% (29/46) 及び対照群の 42% (39/93) に見られ、両群間の違いは有意であった ($p=0.029$)。

一方、NS3-Tyr1082/Gln1112 と肝線維化の程度の間には有意の相関は認められなかった。

4) HCC 群と対照群 (non-HCC) における HCV NS5A の IRRDR 及び ISDR のアミノ酸変異の比較検討
HCC 群と対照群における初診時の血清中 HCV NS5A の IRRDR 及び ISDR のアミノ酸変異を比較検討した。IRRDR のアミノ酸変異数が 6 以上 (IRRDR \geq 6 群) の NS5A は HCC 群の 53% (24/45) 及び対照群の 20% (15/74) に見られ、両群間の違いは有意であった ($p=0.0003$)。ISDR のアミノ酸変異数が 3 以上

(ISDR \geq 3 群) の NS5A も、対照群に比べて、HCC 群で多い傾向が見られた。とくに、ISDR 内の 2218 位のアミノ酸が Asn である症例 (Asn2218) は HCC 群の 24% (11/45) に認められる一方、対照群ではわずか 4% (3/74) に見られるのみであり、両群間の違いは有意であった ($p=0.002$)。

5) HCV コア蛋白、NS3 及び NS5A のアミノ酸変異に基づく累積発癌率

HCC 群において、初診時血清中の HCV コア蛋白の 70 位が変異型の患者 (Gln70 群) と変異していない患者 (non-Gln70 群) の累積発癌率を比較検討した。5 年後の累積発癌率は Gln70 群で 29%、non-Gln70 群で 5%であり、また 10 年後はそれぞれ 56%と 23%、15 年後では 63%と 26%であった。このように、累積発癌率は Gln70 群で有意に高かった ($p<0.0001$)。

同様に、初診時の NS3 の 1082 位と 1112 位が共に変異型の患者 (Tyr1082/Gln1112 群) とそうでない

患者 (non-Tyr1082/Gln1112 群) の累積発癌率を比較検討した。5 年後の累積発癌率は Tyr1082/Gln1112 群で 15%、non-Tyr1082/Gln1112 群で 7%であり、10 年後ではそれぞれ 37%と 24%、15 年後では 45%と 24%であった。このように、累積発癌率は Tyr1082/Gln1112 群で有意に高かった ($p=0.02$)。

non-Gln70 プラス non-Tyr1082/Gln1112 群の累積発癌率は、15 年後においても 13%であり、それ以外の患者群に比べて有意に低値であった。

また、NS5A の IRRDR の変異数について解析したところ、IRRDR \geq 6 群と変異数 5 以下の患者 (IRRDR \leq 5 群) では、5 年後の累積発癌率はそれぞれ 18%と 10%、10 年後では 59%と 22%、15 年後では 63%と 27%であった。このように、累積発癌率は IRRDR \geq 6 群で有意に高かった ($p=0.0002$)。

さらに、NS5A ISDR 内 2218 位のアミノ酸が Asn である患者 (Asn2218 群) そうでない患者 (non-Asn2218 群) について解析したところ、5 年後の累積発癌率はそれぞれ 31%と 9%、10 年後では 77%と 28%、15 年後では 77%と 33%であった。このように、累積発癌率は NS5A-Asn2218 群で有意に高かった ($p=0.0003$)。

6) 単変量解析及び多変量解析による肝癌発症と関連する因子の同定

単変量解析により、肝癌発症と有意の相関を示す因子として HCV の Core-Gln70、NS3-Tyr1082/Gln1112、NS5A-IRRDR \geq 6、NS5A-Asn2218、AFP 高値、ALT 高値、AST 高値及び肝の線維化スコアが抽出された。

多変量解析により、Core-Gln70 (OR=6.8; $p=0.001$)、NS3-Tyr1082/Gln1112 (OR=3.4; $p=0.03$) 及び AFP 高値 (OR=19.5; $p=0.0001$) が独立して肝癌発症と相関することが明らかになった。

7) 肝癌発症前後での HCV コア蛋白、NS3 及び NS5A のアミノ酸残基の置換

HCC 群において、初診時と肝癌発症後の血清中 HCV コア蛋白、NS3 及び NS5A のアミノ酸配列を比較検討した。

コア蛋白 70 位のアミノ酸残基については、45 例のうち 4 症例 (9%) のみに肝癌発症前後に置換が見られた。しかし、これらの置換は野生型から変異型

への置換に限定されるものではなく、肝癌発症と有意な相関は認められなかった。

NS3の1082位のアミノ酸は95%(41/43)の症例で、また、1112位は全例(43/43)で経過観察期間を通じて保存されており、肝癌発症前後でのアミノ酸の変化は認められなかった。

一方、NS5A-IRRDR \geq 6群は、初診時にはHCC症例の24%(9/38)であったが、肝癌発症後は47%(18/38)と有意に増加した(p=0.03)。

D. 考察

肝癌発症には宿主側因子とウイルス側因子が複雑に関連して作用していると考えられる。近年、宿主側因子としてMICA及びDEPDC5の遺伝子変異の重要性が報告された(8,9)。一方、ウイルス側因子としてHCVコア蛋白の70位と91位のアミノ酸変異の重要性が報告されている(11)。本研究でもコア蛋白70位のアミノ酸変異(Gln70)が肝癌発症に有意に相関していることが確認された。一方、91位のアミノ酸変異は肝癌発症と有意の相関は認められなかった。Core-Gln70はIFN治療抵抗性を規定する因子として報告されているが(5)、その分子機序は未だよくわかっておらず、同様に、Core-Gln70が肝癌発症と相関する分子機序もほとんどわかっていない。肝癌患者から得られたHCVコア蛋白は70位と91位のアミノ酸が変異型であることが多く、PKRと結合してそれを活性化することによりHCV感染を持続感染に導き、肝癌発症に寄与するのではないかという報告があるが(13)、未だ議論のあるところであり、今後の解明が待たれる。

HCV NS3については、Tyr1082/Gln1112変異が肝癌発症と有意に相関していることが本研究により明らかになった。また、NS5AのAsn2218変異やIRRDR \geq 6も肝癌発症と有意に相関していることがわかった。他に宿主因子としてAFP高値、ALT高値、AST高値及び肝の線維化スコア高値が、単変量解析により肝癌相関因子として抽出された。これらの因子を用いた多変量解析により、Core-Gln70、NS3-Tyr1082/Gln1112及びAFP高値が独立した肝癌発症相関因子として同定された。また、コア蛋白配

列とNS3配列を組み合わせた解析により、non-Gln70プラスnon-Tyr1082/Gln1112群の累積発癌率が最も低いことが明らかになった。さらに、初診時と肝癌発症時のHCVの比較から、コア蛋白の70位やNS3の1082/1112位のアミノ酸残基は安定して維持されており、長期間経過しても変異がおこりにくいことがわかった。このようにCore-Gln70やNS3-Tyr1082/Gln1112は肝癌発症のかなり以前から存在しているため、初診時から肝癌発症リスクファクターとして予後診断の一助に用いることができると考えられる。

NS5A-IRRDR \geq 6と肝癌発症との有意な相関が見られたことについては、NS5A-IRRDR \geq 6が肝癌発症の要因になっていると考えるよりは、IFN感受性に関与する分子機序と肝癌発症の分子機序はそれぞれ異なったものであると考えるほうが自然であろう。IFN治療によりHCVを排除し肝癌発症リスクを低下させることが重要である。

E. 結論

- 1) 単変量解析により、肝癌発症と相関する因子としてCore-Gln70、NS3-Tyr1082/Gln1112、NS5A-IRRDR \geq 6、NS5A-Asn2218、AFP高値、ALT高値、AST高値及び肝の線維化スコア高値が抽出された。
- 2) 多変量解析により、独立した肝癌発症相関因子としてCore-Gln70、NS3-Tyr1082/Gln1112、及びAFP高値が同定された。
- 3) Core-Gln70及びNS3-Tyr1082/Gln1112は、肝癌発症のリスクファクターとして予後診断に有用である可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, Arakawa Y, Ide T, Sata M, Inoue O, Yano M, Tanaka M, Fujiyama S, Nishiguchi S, Kuroki T, Imazeki F, Yokosuka O, Kinoyama S, Yamada G, Omata M. Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of chronic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. IHIT Study group.

Inhibition of hepatocarcinogenesis by interferon therapy. *Ann Intern Med*, 131:174-181, 1999.

- 2) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*, 41:1105-1109, 2009.
- 3) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 461:399-401, 2009.
- 4) Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nat Genet*, 41:1100-1104, 2009.
- 5) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: Amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol*, 46:403-410, 2007.
- 6) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med*, 334:77-81, 1996.
- 7) El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Sequence variation in the hepatitis C virus NS5A protein predicts clinical outcome of

pegylated interferon/ ribavirin combination therapy. *Hepatology*, 48:38-47, 2008.

- 8) Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Nakagawa H, Koike K, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 43: 455-458, 2011.
- 9) Miki D, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Yoshima T, Aikata H, Ikeda K, Kumada H, Toyota J, Morizono T, Tsunoda T, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers. *Nat Genet*, 43:797-800, 2011.
- 10) Banerjee A, Ray RB, Ray R. Oncogenic potential of hepatitis C virus proteins. *Viruses* 2:2108-2133, 2010.
- 11) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region are the important predictor of hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 46:1357-1364, 2007.
- 12) El-Shamy A, Shindo M, Shoji I, Deng L, Okuno T, Hotta H. Polymorphisms of the core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* (in press).
- 13) Delhem N, Sabile A, Gajardo R, Podevin P, Abadie A, Blaton MA, Kremsdorf D, Beretta L, Brechot C. Activation of the interferon-inducible protein kinase PKR by hepatocellular carcinoma derived-hepatitis C virus core protein. *Oncogene* 20:5836-5845, 2001.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1.El-Shamy A, Shoji I, El-Akel W, Bilasy SE, Deng L, El-Raziky M, Jiang DP, Esmat G, Hotta H. NS5A sequence heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4a predicts clinical outcome of

- pegylated-interferon/ribavirin therapy in Egyptian patients. *J Clin Microbiol*, 50(12): 3886-3892, 2012.
2. Yano Y, Seo Y, Miki A, Saito M, Kato H, Hamano K, Oya M, Ouchi S, Fujisawa T, Yamada H, Yamashita Y, Tani S, Hirohata S, Yoon S, Kitajima N, Kitagaki K, Kawara A, Nakashima T, Yu H, Maeda T, Azuma T, El-Shamy A, Hotta H, Hayashi Y. Mutations in non-structural 5A and rapid viral response to pegylated interferon- α -2b plus ribavirin therapy are associated with therapeutic efficacy in patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *Int J Mol Med*, 30(5): 1048-1052, 2012.
3. Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Kim KI, Ide YH, Deng L, Shoji I, Tanaka Y, Hasegawa Y, Ota M, Hotta H. Prediction of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C genotype 1b and high viral load. *J Gastroenterol*, 47(10): 1143-51, 2012.
4. El-Shamy A, Shoji I, Kim SR, Ide Y, Imoto S, Deng L, Yoon S, Fujisawa T, Tani S, Yano Y, Seo Y, Azuma T, Hotta H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy. *PLoS ONE*, 7(2): e30513, 2012.
5. Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Sianipar IR, Deng L, Hotta H. Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via down-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α . *J Virol*, 86(23): 12903-12911, 2012.
6. Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Horiguchi T, Sun X, Deng L, Shoji I, Hotta H, Sada K. HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinase Fyn in B cells. *PLoS ONE*, 7(10): e46634, 2012.
7. Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, Hotta H. A point mutation at ASN-534 that disrupts a conserved N-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis C virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization. *J Med Virol*, 84(2): 229-234, 2012.
8. Shoji I, Deng L, Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Front Microbiol*, 2: A278, 1-5, 2012.
9. El-Shamy A, Shindo M, Shoji I, Deng L, Okuno T, Hotta H. Polymorphisms of the core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, (in press)
10. Utsumi T, Yano Y, Lusida MI, Nasronudin, Amin M, Juniastuti, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Detection of highly prevalent hepatitis B virus co-infection with HIV in Indonesia. *Hepato Res*, (in press)
11. 進藤 道子, El-Shamy Ahmed, 奥野 忠雄, 堀田 博. C型慢性肝炎時から肝癌発生まで経過を追えたC型肝炎ウイルスジェノタイプ1bのコア蛋白アミノ酸多様性と肝癌発生との関連性. *肝臓*, 53(9): 541-548, 2012.
12. Shimizu YK, Hijikata M, Oshima M, Shimizu K, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H, Hotta H. Isolation of human monoclonal antibodies to the envelope E2 protein of hepatitis C virus and their characterization. *PLoS One*, 8(2): e55874, 2013.
2. 学会発表
1. Deng L, Chen M, Jiang DP, Shoji I, Hotta H. Up-regulation of MAPK phosphatase 3 is involved in HCV-induced suppression of FoxO1 phosphorylation. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
2. Jiang DP, Ratnoglik SL, Aoki C, Deng L, Shoji I, Hotta H. Development of therapeutic and preventive vaccines against Hepatitis C virus. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
3. Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. Identification and characterization of a novel NS5A-interacting protein, SMYD3. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

4. Matsui C, Shoji I, Deng L, Hotta H. HCV infection induces lysosomal degradation of hepatocyte nuclear factor 1 α via interaction with HCV NS5A protein. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
5. 西瀬 雄子, 斎藤 貴史, 富田 恭子, 佐藤 智佳子, 石井 里佳, 芳賀 弘明, 奥本 和夫, 渡辺 久剛, 今井 康陽, 堀田 博, 上野 義之, 河田 純男. C型肝炎ウイルス 1b の NS3 領域蛋白質 2 次構造を基にしたサブグループ分類と肝細胞癌発生の関連性に関する前向き研究(第 2 報). 第 48 回日本肝臓学会総会, ワークショップ, 2012. 金沢.
6. 金 守良, 井本 勉, 堀田 博, 金 啓二, 谷口 美幸, 小牧 孝充, 井出 良浩, 勝二 郁夫. 2 者併用療法における relapse 例と NVR 例の 3 者併用療法時 SVR 予測の試み. 第 48 回日本肝臓学会総会, ワークショップ, 2012. 金沢.
7. 金 守良, 井本 勉, 金 啓二, 谷口 美幸, 小牧 孝充, 井出 良浩, 勝二 郁夫, 堀田 博. PEG-IFN/RBV (2 者併用療法) の SVR 予測における IRRDR 変異数の検討. 第 48 回日本肝臓学会総会, 2012. 金沢.
8. 金 守良, 井本 勉, 堀田 博, 金 啓二, 谷口 美幸, 小牧 孝充, 井出 良浩, 勝二 郁夫. PEG-IFN/RBV (2 者併用療法) の治療効果に関係するウイルス因子とウイルス排除機序の検討. 第 48 回日本肝臓学会総会, 2012. 金沢.
9. Deng Lin, 金子 昌裕, 河本 真理, 姜 大鵬, 勝二 郁夫, 堀田 博. C 型肝炎ウイルス感染による転写因子 FoxO1 脱リン酸化の分子機序の解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012. 大阪
10. 瀬尾 靖, 矢野 嘉彦, 斎藤 雅也, 三木 章, 勝二 郁夫, 堀田 博, 東 健. プロテアーゼ阻害薬併用時代での PEG-IFN α -2a / Ribavirin 療法の位置付け. 第 16 回日本肝臓学会大会, 2012. 神戸.
11. 金 守良, El-Shamy Ahmed, 堀田 博. 2 型 C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/RBV 併用療法(併用療法)の治療効果に与えるウイルス因子、宿主因子の検討. 第 16 回日本肝臓学会大会, 2012. 神戸.
12. 陳 明, 甘 翔, DENG Lin, 勝二 郁夫, 堀田 博. C 型肝炎ウイルス NS5A 蛋白質の新規結合因子ヒストンメチル基転移酵素 SMYD3 の同定と機能解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012. 大阪
13. 松井 千絵子, 勝二 郁夫, DENG Lin, 堀田 博. C 型肝炎ウイルスによる GLUT2 遺伝子発現抑制の分子機構. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012. 大阪
14. 姜 大鵬, Ratnoglik Lulut Suratno, 青木 千恵, Deng Lin, 勝二 郁夫, 堀田 博. C 型肝炎ウイルスに対する予防および治療ワクチン開発に関する研究. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012. 大阪
15. 内海 孝子, 堀田 博. 神戸大学インドネシア拠点の紹介. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012. 大阪 (シンポジウム)
16. 中島 謙治, 竹内 健司, 千原 一泰, 堀口 朋子, 孫 雪東, Deng Lin, 勝二 郁夫, 堀田 博, 定 清直. C 型肝炎ウイルス NS5A 蛋白質の Src homology 2/3 ドメイン結合能と B 細胞での発現による Src ファミリーキナーゼ Fyn の活性化. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 福岡.
17. 勝二 郁夫, 松井 千絵子, 兼田 崇作, Imelda Rosalyn Sianipar, Deng Lin, 堀田 博. C 型肝炎ウイルス感染は HNF-1 α の発現を負に制御し GLUT2 遺伝子発現を抑制する. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 福岡.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

培養細胞系を用いた薬剤耐性肝炎ウイルスの解析

分担研究者 鈴木 哲朗 浜松医科大学医学部 教授

研究要旨 (1) NS2 阻害剤の探索と耐性ウイルス解析：HCV NS2 は前駆体タンパク質のプロセッシングだけでなく感染性粒子産生にも重要であることが明らかにされているが、阻害剤開発は必ずしも進んでいない。本研究では理化学研究所 松本博士らと共同で、HCV 粒子産生阻害活性を有する抗 NS2 化合物#42 を見出した。化合物#42 を HCV 持続感染細胞へ長期間添加することにより耐性ウイルスが出現すること、このときアミノ酸 981 番セリンのグリシンへの置換変異を見出した。(2) HCV プロテアーゼ活性を指標とした薬剤耐性評価技術の開発：C 型肝炎患者中 HCV のプロテアーゼ阻害剤に対する感受性を、実施の酵素活性を指標として評価するため、HCV 複製検体から RT-PCR/試験管内転写&翻訳によって HCV NS3 プロテアーゼを簡便に調製し NS5A/5B 切断活性を定量する技術の開発を行った（名古屋医療センター 杉浦博士との共同研究）。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) のライフサイクルに関する研究が進展し、HCV の遺伝子発現、蛋白プロセッシング、ゲノム複製、粒子形成などの分子メカニズムが明らかになりつつある。それに従い、HCV 蛋白を標的とした、あるいは複製調節を担う宿主因子を標的とした抗ウイルス薬が開発されるようになった。

ウイルス感染症の治療にあたっては、抗ウイルス剤に対する耐性ウイルスの出現、増殖がしばしば問題になる。C 型肝炎治療においても薬剤の長期間投与に伴う耐性ウイルスの出現が懸念されているものの、各治療薬に対する耐性 HCV の特徴は十分には明らかにされていない。

本研究では、新規 C 型肝炎治療薬として開発が進められている HCV タンパク質阻害剤、また今後、創薬化の可能性がある化合物に対する耐性 HCV を培養細胞による HCV 複製系または感染増殖系を用いて解析した。さらに、現在実用化されている抗 HCV 剤の主要な標的分子である NS3 プロテアーゼの酵素活性に基づいて HCV の薬剤耐性を評価する技術の開発を行った。本研究成果は、近い将来問題となることが

予想される薬剤耐性 HCV を克服するための治療法の開発に資すものと期待される。

B. 研究方法

HCV NS2 結合性化合物は理化学研究所 松本武久博士より供与された。

HCV JFH-1 株のゲノム cDNA プラスミド (pJFH1) から直鎖化 RNA を合成し、Huh-7 細胞への導入によって作製した感染性ウイルスを、naïve Huh-7 細胞へ感染させ持続感染細胞株 SL2 を作製した。SL2 細胞へ NS2 結合性化合物を種々の濃度で添加し、その抗 HCV 作用を細胞内外の HCV Core タンパク質測定 (ELISA 法) により評価した。HCV 遺伝子の解析は、薬剤処理 SL2 細胞から抽出した total RNA を RT-PCR によって cDNA 増幅し直接塩基配列を決定した。

HCV NS3 プロテアーゼを含む NS3 アミノ酸 (aa) 1-188 領域または NS3 全長遺伝子あるいは NS3/NS4A 遺伝子を RT-PCR で増幅し、in vitro 転写用ベクターに挿入した。NS3 単独または NS4A ペプチドとの融合タンパク質として in vitro 転写 & コムギ胚芽翻訳系で産生させた。基質とする

GST-NS5A/NS5B 切断部位ペプチド-ビオチンも同様に *in vitro* 転写/翻訳系で発現させた。

C. 研究結果

(1) NS2 阻害剤の探索と耐性ウイルス解析

HCV 産生阻害を指標として、NS2 結合性（結合が想定される）化合物群（理化学研究所所有）をスクリーニングし、2種類の抗 HCV 化合物#41 及び#42 を取得した。EC50 値はそれぞれ#41; 18.0 microM (#41), 5.1 microM (#42) であった。HCV 持続感染細胞 SL2 に#41 を 25 microM、#42 を 12.5 microM で長期間添加することにより耐性ウイルスの出現を検討した。その結果、#42 では、43 日間の添加培養により HCV レベルが化合物非添加細胞と同等まで回復した。#42 に対する耐性 HCV が出現した可能性が示唆されたので、この感染細胞中の HCV の遺伝子配列を決定したところ、種々の同義置換変異の他に NS2 内の aa 981 がセリンからグリシンへ置換する変異が見出された。

(2) HCV プロテアーゼ活性を指標とした薬剤耐性評価技術の開発

HCV NS3/4A プロテアーゼの発現は、1) NS4A aa21-32 ~ NS3 プロテアーゼ領域 (aa1-188)、2) NS4A aa21-32 ~ NS3 全長、3) NS3 全長 ~ NS4A を試みたが、発現タンパク質による NS5A/NS5B 切断をウェスタンブロット法で解析した所、1) ではほぼ完全切断であったのに対し、2) は約 70%、3) は 40% 程度の基質が切断されるにとどまった。そこで、本研究では、NS4A aa21-32 ~ NS3 aa1-188 領域を NS3/NS4A プロテアーゼとすることとした。一方、基質側は NS5A/NS5B 切断部位を含む 38 アミノ酸領域の N 末端側に GST を C 末端側にビオチンをそれぞれ融合させた形で *in vitro* で発現させた。この基質融合タンパクに対して Anti-GST 抗体結合アクセプタービーズ及びストレプトアビジン結合ドナービーズを混和し「アクセプタービーズ/GST-NS5A/NS5B-ビオチン/アビジン-ドナービーズ」を作製した。NS5A/NS5B が切断されない、すなわちドナービーズとアクセプタービーズが近接している場合、励起光照射によって発光シグナルが検出される (AlphaScreen) のに対し、NS5A/NS5B が切断されビーズ間の空間的距離が離れるとこのような発

光は起こらないと想定される。実際に、前述の NS4A-NS3 を反応させることによって発光シグナルが変化することを確認した。そこで、この HCV プロテアーゼ活性測定 AlphaScreen 系を利用してプロテアーゼ阻害剤耐性の検査法を確立するためのモデル実験として、HCV JFH-1 株の持続感染細胞系でプロテアーゼ阻害剤 BILN2061 に対する耐性変異として同定された V71A, K122R を導入した NS4A-NS3 変異体を調製し、HCV プロテアーゼ活性測定 AlphaScreen を構築した。BILN2061 を種々の濃度で添加し NS5A/NS5B 切断を阻害する IC50 を求めた所、野生型 NS3 の場合に比べ、V71A で 2.0 倍、K122R で 2.4 倍、ダブル変異で 3.7 倍 IC50 値が高くなることが示された。

D. 考察

(1) NS2 阻害剤の探索と耐性ウイルス解析

新規 C 型肝炎治療薬として開発される可能性があるものの、耐性ウイルス解析が進んでいない抗 HCV 化合物について、耐性ウイルス出現の可能性を HCV 感染増殖細胞系を用いて検討した。HCV NS2 はタンパク質プロセッシングまた構造タンパク質、非構造タンパク質との結合を介して感染性粒子産生にも重要であることが明らかとなっており、抗 HCV 薬開発の標的として有望であることは言うまでもない。しかしながら、NS2 阻害剤に対する耐性ウイルスについては全くと言ってよいほど情報がない。本研究では、NS2 結合性化合物群を *in silico* スクリーニングから選抜し、HCV 産生阻害効果を評価し最も強い抗 HCV 活性を示す化合物#42 を得た。さらに、この#42 を HCV 感染細胞へ長期間添加を継続することで耐性ウイルスが出現することを見出し、遺伝子解析の結果、NS2 内に 1 アミノ酸変異 (S981G) を同定した。この変異部位はプロテアーゼ活性中心、二量体形成部位から離れているが、粒子形成等に関与しているか今後明らかにしていきたい。いずれにせよ、本研究により薬剤抵抗性に関与する NS2 変異が初めて見出された。

(2) HCV プロテアーゼ活性を指標とした薬剤耐性評価技術の開発

C型肝炎治療における治療薬耐性検査は、今後、治療薬の選択肢がふえることが予想されることもあり、患者に対して適切な治療薬を選択する上で重要になると考えられる。しかしながら、治療薬標的分子であるHCVタンパク質の生物活性に基づいて耐性を評価できる検査法は確立されていない。本研究では、名古屋医療センターの杉浦博士らとの共同研究で、*in vitro* 転写／翻訳系とAlphaScreen技術を活用して、HCV NS3プロテアーゼ活性を指標とした阻害剤耐性検査法の開発に成功した。本法では、ベクターへのNS3遺伝子のクローニング、大腸菌での蛋白発現などを行わず簡便にHCV遺伝子からNS3プロテアーゼを取得することが可能である。今後、実際の患者検体について本法による耐性検査を行いHCV遺伝子情報との整合性、解離などを詳細に検討し、有用性を精査する予定である。

E. 結論

薬剤抵抗性に関与するNS2変異を初めて見出した。

HCV NS3プロテアーゼ活性を指標とした阻害剤耐性検査法の開発に成功した。

F. 研究発表

論文発表

- 1.Suzuki T. Morphogenesis of infectious hepatitis C virus particles. *Front. Microbiol.* 3: 38 (2012).
- 2.Ando T., Imamura H., Suzuki R., Aizaki H., Watanabe T., Wakita T, and Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating

hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathog.* 8: e1002561 (2012).

- 3.Suzuki R., Saito K., Kato T., Shirakura M., Akazawa D., Ishii K., Aizaki H., Kanegae Y., Matsuura Y., Saito I., Wakita T., and Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology*, 432: 29-38 (2012).
- 4.Fukazawa H, Suzuki T, Wakita T, Murakami Y. A cell-based, microplate colorimetric screen identifies 7,8-benzoflavone and green tea gallate catechins as inhibitors of the hepatitis C virus. *Biol Pharm Bull.* 35: 1320-1327 (2012).
- 5.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* 144: 56-58 (2013).
- 6.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.* 15: 45-55 (2013).

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

B型肝炎及びC型肝炎ウイルスの変異と治療効果との関係

分担研究者：鈴木文孝 国家公務員共済組合連合会虎の門病院 肝臓センター 部長

研究要旨

C型慢性肝炎症例（genotype 1b、高ウイルス量）に対する terapeutic (TVR) と PEG-IFN+RBV 併用療法が保険適応となり、治療が開始されている。3者併用療法にて sustained virological response (SVR) が得られなかった症例では TVR 耐性ウイルスの出現が認められるが、耐性ウイルスが投与開始前より存在するかどうか HCV の NS3 領域の遺伝子配列を次世代シーケンサーを用いて解析した。また B型慢性肝疾患に使用されている核酸アナログ製剤の長期投与では、多剤耐性ウイルスの出現が問題となっている。現在までの耐性ウイルスの頻度とその後の治療効果について検討した。C型肝炎；開始時の検討では、TVR耐性は1例で検出された (T54S 99.9%)。この症例は breakthrough 時 T54S (99.7%) 以外に R155K (96.0%) が新たに検出された。また残りの13例中投与中または投与終了後に TVR 耐性ウイルスが検出された症例は7例認めたが、いずれも治療後に出現した。B型肝炎；ラミブジン単独投与中の症例でポリメラーゼ領域の YMDD motif mutation が疑われた症例において YMDD motif 以外の rt 領域のアミノ酸変異を検討した。488例中13例(3%)に YMDD motif 以外でアデフォビルまたはエンテカビルに耐性であると報告されているアミノ酸変異を認めた。これら13例のうち11例でラミブジンとアデフォビルの併用療法を施行した。3年目での HBV DNA の陰性化は7例中4例であった。また開始時多剤耐性ウイルスを認めた症例を除いた393例中、併用療法開始後12例(3%)に両剤に対する耐性ウイルスが認められた。全例 genotype C、12例中11例で rtA181T/S/V の変異を認めた。そのうち2例で rtA181T+rtN236T が認められた。これらのうち5例で DNA 量の再上昇を認めた。28例の核酸アナログ（ラミブジン、アデホビル、エンテカビルのいずれかまたは併用療法）の不应例に対してラミブジンまたはエンテカビルとテノホビルの併用療法を行った。全例でウイルス量の低下が認められ、1年目の時点で8例中7例で HBV DNA 量が 2.6 未満に低下していた。

C型慢性肝炎に対する新規薬剤である TVR と PEG-IFN+RBV の3者併用療法24週間投与の治療効果は高いが、開始時の遺伝子解析では耐性ウイルスの出現や効果を予測できなかった。また B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤の長期投与では、多剤耐性ウイルスが出現する症例があり、テノホビルなどの新規治療薬の効果が期待される。

A. 研究目的

従来 C 型慢性肝炎の治療の主体は、Pegylated Interferon (PEG-IFN) と Ribavirin (RBV) の併用療法であったが、本邦で多い genotype 1b 型、高ウイルス量症例に対する 48 週間投与の完全著効 (SVR) 率は、40-50% であり、十分な治療効果を得ていなかった。最近新規治療薬であるプロテアーゼ阻

害剤の terapeutic (TVR) と PEG-IFN+RBV 併用療法が保険適応となり、治療が開始されている。しかし貧血や皮膚症状などの副作用が認められることや、IL28B の遺伝子型、HCV Core のアミノ酸置換の有無などから効果が低い症例も依然認められる。3者併用療法にて sustained virological response (SVR) が得られなかった症例では TVR 耐性ウイルスの出現

が認められるが、耐性ウイルスが投与開始前より存在するかどうか詳細は不明である。今回

PEG-IFN/RBV 併用療法の non responder で3者併用療法を施行した症例での耐性ウイルスの存在を次世代シーケンサーを用いて解析した。

B型慢性肝疾患の治療は、インターフェロン(IFN)と核酸アナログ製剤が中心である。35歳以上の症例ではIFN療法の効果が少ないため、核酸アナログ製剤による治療が主体となっている。核酸アナログ製剤は、抗ウイルス効果が高く、副作用も少ないため多くの症例で使用されている。しかし核酸アナログ製剤の長期使用では薬剤耐性ウイルスの出現が認められる。現在までに本邦で使用されている核酸アナログ製剤にはラミブジン、アデホビル、エンテカビルの3種類がある。このうちラミンジンの単独投与は高率に耐性ウイルスの変異を認めるが、ラミブジン単独投与中にアデホビルまたはエンテカビルに關係する耐性ウイルスが出現する症例がある。さらにラミブジン耐性ウイルスに対するアデホビル併用療法中に両剤への耐性ウイルスが出現する症例がある。このような多剤耐性ウイルス出現例の頻度とその後の治療経過について検討した。さらに多剤耐性ウイルスに対するテノホビルの治療効果についても検討した。

B. 研究方法

虎の門病院にてC型慢性肝炎 (genotype 1b型高ウイルス量症例) でPEG-IFN+RBV 併用療法にて non responder であり、TVR+PEG-IFN+RBV 3者併用24週間投与を施行した14例を対象とした。3者併用療法開始時と治療中及び投与終了後のTVR耐性ウイルスについて次世代シーケンサーを用いて解析した。B型肝炎症例においてラミブジン単独投与中に効果不十分であった症例においてアデホビルまたはエンテカビルの耐性に關係する変異ウイルスの出現を488例で検討した。またラミブジン耐性ウイルスに対してアデホビルを使用した406症例での多剤耐性ウイルス出現についても検討した。さらにラミブジン、アデホビル、エンテカビルを投与例の

refractoryの28例に対するテノホビルの治療効果を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、副作用、患者に関する個人情報守秘義務、患者の権利保護等について説明し同意を文章または口頭にて取得し研究を行った。

C. 研究結果

(1) TVR+PEG-IFN+RBV 3者併用療法症例でのTVR耐性ウイルスの検討

14例の成績はSVR4例、relapse5例、breakthrough4例、NVR(null response)1例であった。次世代シーケンサーにて治療開始時のTVR耐性変異(aaV36, aaT54, aaR155, aaA156)の検討を行った。プラスミドの検討からエラー率は、0.1%であったため0.2%以上を変異と判定した。開始時の検討では、TVR耐性は1例で検出された(T54S 99.9%)。この症例はbreakthrough時T54S(99.7%)以外にR155K(96.0%)が新たに検出された。また残りの13例中投与中または投与終了後にTVR耐性ウイルスが検出された症例は7例認めたが、いずれも治療後に出現した。

(2) ラミブジン単独投与中にアデホビルまたはエンテカビル耐性に關係する変異ウイルスの出現した症例

ラミブジン単独投与中の症例でポリメラーゼ領域のYMDD motif mutation出現が疑われた症例においてYMDD motif以外のrt領域のアミノ酸変異を検討した。488例中13例(3%)にYMDD motif以外でアデホビルまたはエンテカビルに耐性であると報告されているアミノ酸変異を認めた。その内訳は、rtA181Tが6例、rtA181T+rtM204Iが1例、rtA181Sが1例、rtL180M+rtS202G+rtM204Vが3例、rtL180M+rtM204V/I+rtM250Lが2例であった。これら13例のうち11例でラミブジンとアデホビルの併用療法を施行した。3年目でのHBV DNAの陰性化は7例中4例であった。

(3) ラミブジン耐性ウイルスに対するアデホビル併用療法における多剤耐性ウイルスの検討

開始時多剤耐性ウイルスを認めた症例を除いた393例中、併用療法開始後12例(3%)に両剤に対する耐性ウイルスが認められた。全例 genotype C、12例中11例で rtA181T/S/V の変異を認めた。そのうち2例で rtA181T+rtN236T が認められた。これらのうち5例で DNA 量の再上昇を認めた。4例で治療法の変更が行われ1例ではエンテカビル+アデホビル、3例ではテノホビルの投与が行われた。

(4) ラミブジン、アデホビル、エンテカビル不応例に対するテノホビルの治療効果

28例の核酸アナログ(ラミブジン、アデホビル、エンテカビルのいずれかまたは併用療法)の不応例に対してラミブジンまたはエンテカビルとテノホビルの併用療法を行った。全例でウイルス量の低下が認められ、1年目の時点で8例中7例で HBV DNA 量が 2.6 未満に低下していた。

D. 考察

従来治療の基本であった C 型慢性肝炎 (genotype 1b、高ウイルス量) に対する PEG-IFN と RBV 併用療法 48-72 週間投与の治療効果は 45-60% である。依然約半数の患者では SVR に至っていない。一方プロテアーゼ阻害剤である Telaprevir (TVR) と PEG-IFN+RBV の 3 者併用療法は、高い SVR 率を認めている。しかし TVR+PEG-IFN+RBV の 3 者併用療法には、貧血や皮膚障害などの副作用が認められる。また SVR に至らなかった症例では TVR 耐性ウイルスの出現が報告されている。このような治療不成功例での TVR 耐性ウイルスの存在を治療開始時および治療中、終了時で高感度の測定系である次世代シーケンサーを用いて検討した。治療不成功例 (non SVR 例) では、治療中または治療終了後に多くの症例で TVR 耐性ウイルスが検出されたが、治療開始時の検討では 1 例のみ認めただけであった。このことから、治療開始時の検討では次世代シーケンサーを用いても TVR 耐性ウイルス出現による治療効果の予測が難しいと考えられた。3 者併用療法では PEG-IFN+RBV の治療効果も大きな影響を認めるため、TVR 耐性ウイルスの存在のみでは、治療効果を規定できないものと考えられた。今後は、出現したこれらの耐性ウイルスの消

失時期についての検討が必要である。また第二世代のプロテアーゼ阻害剤やそのほかの Direct antiviral agents (DAAs) に対する効果との関係も今後の検討課題である。

B 型慢性肝疾患の治療は、核酸アナログ製剤の投与が主体となっているが、長期投与は耐性ウイルスの出現をもたらす。とくにラミブジンは、YMDD motif 以外の rt 領域にも種々の変異を起こす。今回の我々の検討では、頻度は少ないもののアデホビルまたはエンテカビル耐性と関係する変異が認められた。このような症例では、アデホビルまたはエンテカビルの効果が少ない。このような核酸アナログ製剤で多剤耐性ウイルスが認められた症例では新規の抗ウイルス剤 (テノホビルなど) の効果が期待される。

E. 結論

C 型慢性肝炎に対する新規薬剤である TVR と PEG-IFN + RBV 治療例において次世代シーケンサーを用いた TVR 耐性ウイルスの存在の検討を行った。治療開始時では 14 例中 1 例のみ TVR 耐性ウイルスが存在していた。また B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤の長期投与では、多剤耐性ウイルスが出現する症例があり、新規治療薬の効果が期待される。

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. Suzuki F, Suzuki Y, Sezaki H, Akuta N, Seko Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Arase Y, Ikeda K, Mineta R, Watahiki S, Kobayashi M, Nakayasu Y, Tsuda H, Aoki K, Yamada I, Kumada H. An exploratory study on telaprevir given every 8 hours at 500 mg or 750 mg with peginterferon alfa-2b and ribavirin in hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2012 in press
2. Tadokoro K, Kobayashi M, Suzuki F, Tanaka C, Yamaguchi T, Nagano M, Egashira T, Kumada H. Comparative quantitative analysis of hepatitis C

- mutations at amino acids 70 and 91 in the core region by the Q-Invader assay. *J Virol Methods*. 2012. in press
3. Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Clearance of hepatitis B surface antigen during long-term nucleot(s)ide analog treatment in chronic hepatitis B: results from a nine-year longitudinal study. *J Gastroenterol*. 2012. in press
4. Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Efficacy and Anticarcinogenic Activity of Ribavirin Combination Therapy for Hepatitis C Virus-Related Compensated Cirrhosis. *Intervirology*. 2013;56:37-45.
5. Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y, Kawamura Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Kobayashi T. Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies included hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2012. in press
6. Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Association of IL28B genotype and viral response of hepatitis C virus genotype 2 to interferon plus ribavirin combination therapy. *J Med Virol*. 2012;84:1593-9.
7. Seko Y, Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino Acid Substitutions in the Hepatitis C Virus Core Region and Lipid Metabolism Are Associated with Hepatocarcinogenesis in Nonresponders to Interferon plus Ribavirin Combination Therapy. *Intervirology*. 2012. in press
8. Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. The complicated relationships of amino acid substitution in HCV core region and IL28B genotype influencing hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2012;56:2134-41.
9. Arase Y, Suzuki Y, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, Kawamura Y, Kobayashi M, Imai N, Seko Y, Hosaka T, Matsumoto N, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Efficacy of reduction therapy of natural human β -interferon and ribavirin in elderly patients with chronic hepatitis C, genotype 2 and high virus load. *Hepatol Res*. 2012;42:750-6.
10. Takeyasu M, Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Long-term interferon monotherapy reduces the risk of HCV-associated hepatocellular carcinoma. *J Med Virol*. 2012;84:1199-207.
11. Ono A, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitou S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Kumada H. Long-term continuous entecavir therapy in nucleos(t)ide-naïve chronic hepatitis B patients. *J Hepatol*. 2012;57:508-14.
12. Suzuki F, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Seko Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Mineta R, Watahiki S, Miyakawa Y, Kumada H. Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. *J Clin Virol*. 2012;54:352-4.
13. Arase Y, Kawamura Y, Suzuki Y, Suzuki F, Akuta N, Matsumoto N, Seko Y, Sezaki H, Kobayashi M, Hosaka T, Hirakawa M, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Efficacy of reduction therapy of natural human β -interferon and ribavirin in elderly patients with chronic hepatitis C, genotype 1b and high viral load. *Hepatol Res*. 2012;42:949-57.
14. Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Determinants of response to triple therapy of telaprevir, peginterferon, and ribavirin in previous non-responders infected with HCV genotype 1. *J Med Virol*. 2012;84:1097-105.

15. 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, 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.
16. Mori N, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Saito S, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Determinants of the clinical outcome of patients with severe acute exacerbation of chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol.* 2012;47:1022-9.
17. Suzuki F, Arase Y, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Seko Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Long-term efficacy of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection in Japan. *J Gastroenterol.* 2012;47:814-22.
18. Yamada I, Suzuki F, Kamiya N, Aoki K, Sakurai Y, Kano M, Matsui H, Kumada H. Safety, pharmacokinetics and resistant variants of telaprevir alone for 12 weeks in hepatitis C virus genotype 1b infection. *J Viral Hepat.* 2012;19:e112-9.
19. Hanada K, Nakai K, Tanaka H, Suzuki F, Kumada H, Ohno Y, Ozawa S, Ogata H. Effect of nuclear receptor downregulation on hepatic expression of cytochrome P450 and transporters in chronic hepatitis C in association with fibrosis development. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012;27:301-6.
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, 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;55:231-41.
2. 学会発表
1. 鈴木文孝、茶山一彰、熊田博光。
シンポジウム 2：BMS の NS5A 阻害剤とプロテアーゼ阻害剤 2 剤経口薬併用の国内成績、
第 48 回日本肝臓学会総会、金沢、2012. 6. 7.
2. 鈴木文孝、保坂哲也、熊田博光。
シンポジウム 3：B 型肝炎のウイルス増殖に関する遺伝子変異の検討、
第 39 回日本肝臓学会東部会、東京、2012. 12. 7.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
今回の研究内容については特になし。

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

分担研究者：中川 美奈 東京医科歯科大学・消化器内科・助教

研究要旨

本研究は、C型慢性肝炎の治療抵抗性との関与が十分明らかにされていないインターロイキン6(IL-6)の治療抵抗機序の解明を目指し、これまでに以下の結果を得ている。1)臨床的に治療抵抗型であるHCVコア蛋白変異株ではウイルス複製は保たれているものの、粒子形成および分泌低下を認め、小胞体ストレス蛋白、IL-6発現誘導がみられ、IFNシグナル系の抑制因子であるSOCS3の発現亢進とIFN誘導遺伝子(ISG)発現低下をみた(J Virology 2011; 85)。2))IFN治療抵抗株であるJFH株ではIL-6およびその下流のSOCS3発現が亢進し、ISG抑制をみた(Virology. 2010; 407)。3)CHCに対してIFN治療を施行した臨床検体を用いた解析でもIL-6発現抑制効果を有するとされるエストロゲンの効果を受け難い男性においては治療抵抗症例でIL-6持続高値であることが確認された(Antiviral Therapy 2011; 16)。4)CHCを含む慢性肝疾患337例でIL-6値を含めた臨床背景と肝発癌の有無を検討すると、肝硬変、糖尿病および肝細胞癌症例では有意にIL-6高値であった。発癌に寄与する因子として同定された線維化、糖尿病の有無、男性など複数の因子にIL-6が関連していることが分かった。以上より多機能サイトカインであるIL-6は小胞体ストレスと密接に関与し、治療抵抗性に加え、肝線維化および肝発癌への関与も示唆された。

A. 研究目的

C型慢性肝炎(CHC)に対して、プロテアーゼ阻害剤であるテラプレビルとペグインターフェロン(PEG-IFN)・リバビリン(RBV)の3剤併用療法が認可され約7割の症例で治癒が期待されるが、PEG-IFN・RBV前治療無効例に代表されるIFN不応型の宿主・ウイルス遺伝子を有する症例は3剤併用にて依然難治である。我々はこれまで多機能サイトカインであるIL-6やERストレスが治療抵抗性に密接に関与していることを報告して来た(Virology2010, J.Virology2011)。IL-6は既報でも肝脂肪化や線維化・肝発癌への関与が示唆されており、慢性肝疾患の病態に深く関わっている可能性があるが、現在までのところ臨床応用に向けた有用性につき十分な報告はないことから、難治症例の同定や発癌への関与さらに治療標的に有用なバイオマーカーとなりうるか評価する必要がある。

B. 研究方法

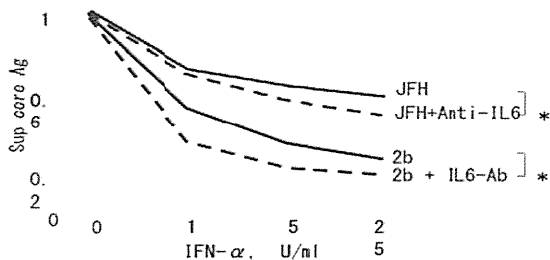
(1)HCV株培養系を用いたウイルス感染・増殖能・インターフェロン感受性、ERストレスタンパクの動態解析。(2)治療経過の判明しているコホート検体を用いた、治療感受性に影響する因子の解析。当研究は東京医科歯科大学組み換えDNA実験安全管理規定に準拠して行われる。また、ヒトの細胞および組織を用いた研究にあたっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」に準じて当該施設倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得た上で、人権及び利益の確保を行うよう配慮する。

C. 研究結果

1)臨床的に治療抵抗型であるHCVコア蛋白変異株ではウイルス複製は保たれているものの、粒子形成および分泌低下を認め、小胞体ストレス蛋白、IL-6発

現誘導がみられ、IFN シグナル系の抑制因子である SOCS3 の発現亢進と IFN 誘導遺伝子 (ISG) 発現低下をみた (J Virology 2011; 85)。

2) IFN 治療抵抗株である JFH 株では IL-6 とその下流の SOCS3 発現が亢進し、ISG 抑制をみた (Virology. 2010; 407)。さらに、IL-6 抗体添加により IFN 抵抗性が解除されることが確認された。



3) CHC に対して IFN 治療を施行した臨床検体を用いた解析でも IL-6 発現抑制効果を有するとされるエストロゲンの効果を受け難い男性においては治療抵抗症例で IL-6 持続高値であることが確認された (Antiviral Therapy 2011; 16)。

4) CHC を含む慢性肝疾患 337 例で IL-6 値を含めた臨床背景と肝発癌の有無を検討すると、肝硬変、糖尿病および肝細胞癌症例では有意に IL-6 高値であった。発癌に寄与する因子として同定された線維化、糖尿病の有無、男性など複数の因子に IL-6 が関連していることが分かった。

	No HCC (n=244)	HCC (n= 93)	p-value
Age (years)	57 (24-76)	71 (39-90)	<0.0001
Gender (Male% (M/ F))	57 (138/106)	69 (64/29)	0.047
Fibrosis (LC%)	9 (23/244)	46 (82/93)	<0.0001
DM (DM%)	7 (17/244)	41 (38/93)	<0.0001
WBC (x10 ³ /ul)	5.0 (2.3-9.7)	3.7 (1.5-10.4)	<0.0001
Hb (g/dl)	14.2 (8.8-17.3)	12.4 (6.7-17.5)	<0.0001
PLT (x10 ³ /μl)	16.3 (3.8-41.8)	10.3 (3.4-33.6)	<0.0001
ALT (IU/l)	55 (9-350)	32 (4-230)	<0.0001
IL-6 (pg/ml)	3.07 (0.6-150)	5.95 (1.5-184)	<0.0001

Mann-Whitney U-test
χ²-square or Fisher's exact probability test

Variables	odds ratio (95% CI)	p value
Age (years)	1.121 (1.060-1.184)	<0.0001
Fibrosis (LC%)	43.48 (0.007-0.072)	<0.0001
Gender (Male%)	5.952 (0.058-0.486)	0.001
DM (DM%)	3.215 (0.102-0.947)	0.040
ALT (IU/l)	1.012 (0.976-1.000)	0.047

D. 結論/考察

本研究の結果から、治療抵抗株では多機能サイトカインである IL-6 およびその下流の SOCS3 発現が亢進していること、持続高値となった IL-6 が IFN シグナル系やインスリンシグナル系を抑制することにより IFN 応答性の低下、インスリン抵抗性をはじめとした各種代謝異常がもたらされることが推測される。発癌への関与の検討では、IL-6 値を含めた臨床背景と肝発癌の有無を検討で肝硬変、糖尿病および肝細胞癌症例では有意に IL-6 高値であり、発癌に寄与す

る因子として同定された線維化、糖尿病の有無、男性など複数の因子に IL-6 が関連していることが分かった。IL-6 が直接肝発癌にも関与している可能性が示唆され、引き続き検討が必要と考えられる。患者の高齢化が問題となっている我が国においては、今後発癌対策が重要であり、発癌抑止のための宿主およびウイルス因子の検討は肝癌撲滅対策の主軸となりうる。IL-6 は肝脂肪化への関与も報告されており、CHC だけでなく脂肪肝も含めた慢性肝疾患における肝線維化進展や発癌抑止の標的因子になる可能性がある。

E. 研究発表

1. 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* in press.
2. 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; 57:46-58
3. Mina Nakagawa, Naoya Sakamoto, Takako Watanabe, Yuki Nishimura-Sakurai, Izumi Onozuka, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Sayuri Nitta, Kei Kiyohashi, Akiko Kusano-Kitazume, Miyako Murakawa, Kohei Yoshino, Yasuhiro Itsui, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Mamoru Watanabe, the Ochanomizu-Liver Conference Study Group. Association of ITPA gene variation and serum ribavirin concentration with a decline in blood cell concentrations during pegylated interferon-alpha plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology* Int. 2012, Epub
4. 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;56:602-608.
5. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyohashi 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 Agents Chemother*. 2012;56:1315-23
6. 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 are independent predictors of relapse after interferon therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. *Antivir Ther*. 2012;17:35-43.
7. Ueyama M, Nakagawa M (equal contribution), Sakamoto N, Watanabe M: Serum interleukin-6 levels can predict resistance to treatment of chronic hepatitis C infection with pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin. *Antiviral Therapy* 2011; 16: 1089-1091.
8. Sakamoto N, Nakagawa M (equal contribution), Watanabe M: Association of IL28B polymorphism with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy in patients with chronic genotype 2 hepatitis C. *J Medical Virol* 2011; 83:871-878.
9. Funaoka Y, Sakamoto N (equal contribution), Nakagawa M, 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.
10. Kurosaki M, Sakamoto N, Nakagawa M, Watanabe M: Pretreatment Prediction of Response to Pegylated-Interferon Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C using Genetic Polymorphism in IL28B and Viral Factors. *J Hepatol* 2011; 54:439-48.
11. Watanabe T, Sakamoto N (equal contribution), Nakagawa M, Watanabe M: Inhibitory effect of triterpenoid compound with or without interferon-alpha on Hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agent Chemother* 2011; 55: 2537-45.
12. Onozuka I, Sakamoto N, Nakagawa M, Watanabe M: Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 406: 134-140
13. Machi Yamamoto, Naoya Sakamoto, Tetsuya Nakamura, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Yuki Nishimura-Sakurai, Sei Kakinuma, Seishin Azuma, Takano Kato, Takaji Wakita and Mamoru Watanabe: Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatology Research* 2011;41:258-69.
14. Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Tamori A, Mina Nakagawa, Izumi N. Sequences in the interferon sensitivity-determining region and core region of hepatitis C virus impact pretreatment prediction of response to PEG-interferon plus ribavirin: data mining analysis. *J Med Virol*. 2011 Mar;83:445-52.
2. 学会発表
1. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守: 宿主遺伝子情報に基づいたC型慢性肝炎の最適な治療法の選択 WS3-4 第48回日本肝臓学会総会, 2012年6月7日、金沢
2. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守: 慢性肝疾患における肝細胞癌とIL-6の関連オープンワークショップ 18 第48回日本肝臓学会総会, 2012年6月7日、金沢
3. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守: 宿主遺伝子情報に基づいたC型慢性肝炎治療の効果・安全性の最適化 (シンポジウム6ゲノムワイド検索(GWAS)と消化器疾患) 第98回日本消化器病学会総会 2012年4月20日 東京.
4. 坂本直哉、中川美奈、渡辺守: IL-6を介したC型慢性肝炎のインターフェロン治療抵抗性機構 (シンポジウム3C型慢性肝炎の新たな治療展開) 第98回日本消化器病学会総会 2012年4月20日 東京.
5. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守: C型慢性肝炎のインターフェロン治療抵抗性機構におけるIL-6の関

与. (シンポジウム S2) 第 15 回日本肝臓学会大会
2011. 10. 20 福岡.

6. 坂本直哉、中川美奈、渡辺守: 高齢化社会の C 型慢性肝炎対策における宿主・ウイルス遺伝子情報に基づく個別化治療の重要性、第 47 回日本肝臓学会総会パネルディスカッション PD-6 (2011. 6. 3)、東京

7. 櫻井幸、中川美奈、坂本直哉、植山真由美、箆島裕子、東正新、柿沼晴、田中靖人、溝上雅史、渡辺守: C 型慢性肝炎の PEG-IFN α -2b/Ribavirin 併用療法における ITPA 遺伝子の臨床的意義、第 47 回日本肝臓学会総会プレナリーセッション 3 (2011. 6. 3)、東京

8. 須田剛生、坂本直哉、中川美奈、井津井康浩、幾世橋桂、新田沙由梨、北詰晶子、柿沼晴、東正新、今村道雄、茶山一彰、渡辺守: Genotype2b/JFH1 キメラウイルス長期培養系を用いた IFN 抵抗性株の解析、第 47 回日本肝臓学会総会プレナリーセッション 1 (2011. 6. 3)、東京

9. Sakamoto N, Nakagawa M, et al: ITPA gene variant protects against treatment-induced anemia and improves viral clearance by pegylated interferon-alfa and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #1016)

10. Suda G, Nakagawa M, et al: IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study

of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA.

(Poster #2040) 11. Kusano-Kitazume A, Nakagawa M, et al: A high-content screening assay using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus reveals candidates for small molecule inhibitors of viral entry. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #383)

12. Kurosaki M, Nakagawa M, et al: Mutations in the interferon sensitivity determining region of HCV, age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among early virological responders to peg-interferon plus ribavirin therapy. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #995)

13. Sayuri Nitta, Nakagawa M, et al: HCV-NS4B targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immune response. 18th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-8-2011, Seattle, WA.

14. Sakamoto N, Nakagawa M, et al: ITPA gene variant protects against treatment-induced anemia and improves viral clearance by pegylated interferon-alfa and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. 46th. Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Mar-30-2011, Berlin, Germany.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
特記すべきことなし