

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

本研究では、C型肝炎ウイルス genotype 1b (HCV-1b)、HCV-2a、HCV-2b 及び HCV-4a について、慢性肝炎患者に対するペグインターフェロン (Peg-IFN) /リバビリン (RBV) 治療応答性を規定するウイルス側因子として、HCV 非構造蛋白 NS5A の IFN/RBV resistance determining region (IRRDR) のアミノ酸配列多様性、コア蛋白 70 位のアミノ酸変異及び宿主側因子として、IFN- λ 3 をコードする IL28B の遺伝子多型 (SNP) の重要性について検討した。また、HCV による肝癌発症におけるウイルス側因子について、コア蛋白、NS3、NS5A の重要性についても検討した。その結果、Peg-IFN/RBV 治療においてウイルス排除・治癒の指標となる sustained virological response (SVR) を規定するウイルス側因子として、HCV-1b では IRRDR の変異が 6 ヶ所以上あること (IRRDR \geq 6)、HCV-2a 及び HCV-4a においては 4 ヶ所以上あること (IRRDR[2a] \geq 4 及び IRRDR[4a] \geq 4) が同定された。HCV-1b 感染においては IL28B SNP の重要性も確認された。また、IL28B SNP が IFN/RBV 治療抵抗性になりやすい minor genotype の場合でも、IRRDR \geq 6 の場合は SVR になる可能性が十分あることもわかった。HCV-1b においては IL28B SNP と IRRDR \geq 6 を組み合わせれば、より正確に Peg-IFN/RBV 治療応答性を予測できると思われる。

一方、肝癌発症との相関について、C型慢性肝炎時より肝癌発症まで平均7年以上経過を追えた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-IRRDR \geq 6、及び NS5A の 2218 位の変異 (NS5A-Asn2218)、並びに宿主因子として 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も明らかになり、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考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) による慢性肝炎の治療にペグインターフェロン (Peg-IFN) とリバビリン (RBV) の併用療法が用いられており、HCV genotype 1b (HCV-1b) 高ウイルス血症の症例の約半数で、また HCV-2a、-2b では約 80%の症例で、持続的なウイルス排除 (SVR) が得られるようになってきた。しかし、

残りの症例では SVR が望めない (Non-SVR) 状況である。

我々はこれまでに、HCV-1b 慢性肝炎症例の Peg-IFN /RBV 治療応答性と相関するウイルス側の重要な因子として、HCV 非構造タンパク質 NS5A の特定領域 (IRRDR; IFN/RBV resistance-determining region) のアミノ酸配列の多様性を報告してきた^{1,2)}。また、

NS5A の中央部の ISDR の多様性 3) や、コア蛋白質の 70 位のアミノ酸変異が Peg-IFN/RBV 治療応答性と相関することも報告されている 2, 4)。さらに、HCV-1b 慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 治療抵抗性を規定する宿主側因子として、IL28B 遺伝子の single nucleotide polymorphism (SNP) の重要性もよく知られている 5-7)。

本研究の目的の一つは、HCV-1b、HCV-2a、HCV-2b、HCV-4a の慢性肝炎患者症例について、Peg-IFN/RBV 治療応答性を規定するウイルス側因子 (とくに NS5A の IRRDR や ISDR の変異数、コア蛋白質 70 位及び 91 位の変異)、並びに宿主側因子 (IL28B SNP 等) の関与の有無について検討することである。

また、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)。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)。

そこで、本研究のもう一つの目的として、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症に関与するのかを、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 Peg-IFN/RBV 治療応答性の判定：

HCV-1b、HCV-2a、HCV-2b 及び HCV-4a 感染慢性肝炎の治療のため、48 週間 (HCV-1b) あるいは 24 週間 (HCV-2a、HCV-2b 及び HCV-4a) の Peg-IFN/RBV 併用療法を受け、その後 24 週間の経過観察により治療効果を判定できた患者を対象とした。併用療法後 24

週間の経過観察でウイルスが排除されて陰性の者 (SVR) とそうでない者 (Non-SVR)、及び Non-SVR の中でもいったんウイルス血症が消失したがやがて再び陽性になった者 (Relapse) と、治療期間中～経過観察期間中常にウイルス血症陽性の者 (Null-response) に分類した。また、治療開始後 4 週間でウイルス消失が見られた rapid virological response (RVR) と Non-RVR、あるいは 12 週間でウイルス消失が見られた early virological response (EVR) と Non-EVR に分類した。

2) 患者及び肝癌発症に関する経過観察：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 遺伝子及び蛋白アミノ酸配列の解析：治療開始前の患者血清について、既報の方法に準じて RT-PCR 法により HCV の NS5A (とくに HCV-1b で見出された ISDR 及び IRRDR に相当する領域とその周辺領域)、NS3 並びにコア遺伝子領域を増幅し、その塩基配列と推定アミノ酸配列を求め、コンセンサス配列と比較して変異の有無を調べた。

3) IL28B SNP の解析：治療開始前の患者血清に混入残存する DNA を抽出し、IL28B 遺伝子領域を PCR 法により増幅して、SNP (rs8099917) 5) を同定した。IL28B SNP が T/T である症例を IL28B-Major とし、

IL28B SNP が T/G または G/G である症例を IL28B-Minor に分類した。(名古屋市立大学・田中靖人教授との共同研究)

4) 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) HCV-1b 慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 治療応答性に及ぼすウイルス側因子 (とくに IRRDR 多様性) と宿主側因子 (とくに IL28B SNP) の影響:

HCV-1b 感染慢性肝炎患者においては、SVR は 43% (29/68)、Non-SVR は 57% (39/68) であった。

Null-response は 25% (17/68)、Relapse は 32% (22/68) であった。また、RVR は 12% (28/68)、EVR は 53% (36/68)、ETR は 69% (47/68) であった。

多変量解析により、SVR と関連する因子は IRRDR の変異が 6 つ以上 ($IRRDR \geq 6$)、及び血中ヘモグロビン値であった。Null-response と関連する因子は IL28B SNP が T/G または G/G (IL28B-Minor)、及び血小板数であり、Relapse と関連する因子は $IRRDR \geq 6$ であった。また、RVR と関連する因子は $ISDR \geq 2$ で、EVR と関連する因子は IL28B-Major であった。

これらの因子を組み合わせて多変量解析を行うと、SVR と最も相関が強いのは IL28B -Major かつ $IRRDR \geq 6$ であり、Relapse と最も相関が強いのは IL28B-Major かつ $IRRDR \leq 5$ であった。また、Null-response と最も相関が強いのは IL28B-Minor かつ $IRRDR \leq 5$ であった。IL28B-Minor であっても $IRRDR \geq 6$ の場合には SVR になる症例が多く見られた。

2) HCV-2a 慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 治療応答性に及ぼす因子の同定:

HCV-2a 感染慢性肝炎患者においては、RVR は 75% (46/61)、Non-RVR は 25% (15/61)、また、SVR は

84% (49/58)、Non-SVR は 16% (9/58) であった。Null-response はなく、全症例が EVR 及び ETR (48 週間の Peg-IFN/RBV 投与終了時にウイルス血症が陰性) になり、Non-SVR はすべて Peg-IFN/RBV 投与終了後経過観察中の Relapse であった。

SVR と関連する因子として、単変量解析により、年齢 (55 歳以下) とウイルスの IRRDR の変異が 4 ヶ所以上あること ($IRRDR[2a] \geq 4$) 及び ISDR とその C 末端周辺領域を合わせた領域の変異が 1 ヶ所以上あること ($ISDR/+C[2a] \geq 1$) が抽出された。そして、多変量解析により、SVR と関連する因子として $IRRDR[2a] \geq 4$ のみが同定された。

一方、RVR と関連する宿主因子として、単変量解析により $IRRDR[2a] \geq 4$ 、年齢、性別、ALT 値、HCV コア抗原量が抽出された。多変量解析により $IRRDR[2a] \geq 4$ のみが RVR と関連する因子として同定された。

コア蛋白質変異と SVR の相関について解析したが、HCV-1b で重要なアミノ酸と考えられている 70 位及び 91 位は、解析した HCV-2a 症例のすべてにおいてそれぞれ Arg 及び Leu であり、SVR/Non-SVR との相関は認められなかった。なお、70 位の Arg 及び 91 位の Leu はいずれも Peg-IFN/RBV 感受性と関連することが報告されているアミノ酸残基である。一方、統計学的有意差は認められないものの、SVR では 48 位の Ala が Thr に置換していることが多い傾向が見られた。

IL28B SNP 解析では、これまでに解析し得た HCV-2a 症例数が少なく統計学的に有意差は見られなかったが、SVR に比べて Non-SVR で IL28B-Minor が多い傾向が見られた (6% vs. 25%)。

3) HCV-2b 慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 治療応答性に及ぼす因子の同定:

HCV-2b 感染慢性肝炎患者においては、RVR は 67% (34/51)、Non-RVR は 33% (17/51)、また、SVR は 72% (34/47)、Non-SVR は 28% (13/47) であった。

Null-response はなく、全症例が EVR になり、Non-SVR は 1 例が Peg-IFN/RBV 投与中、残りはすべて投与終了後経過観察中の Relapse であった。

SVR と関連する因子として、単変量解析及び多変量解析により、いずれも \cdot -GTP 値のみが抽出された。HCV-2b の SVR に関しては、ウイルス側因子は抽出されなかった。

一方、RVR と関連する因子として、単変量解析により IRRDR のアミノ末端領域の一部に変異が 3 ヶ所以上あること (IRRDR/N[2b]≥3) 及び年齢が抽出された。多変量解析により IRRDR /N[2b]≥3 のみが RVR と関連する因子として同定された。

コア蛋白については、解析した HCV-2b の全症例で、70 位及び 91 位はそれぞれ Arg 及び Leu であり、SVR /Non-SVR との相関は認められなかった。また、HCV-2a の場合と異なり、SVR の 2 症例を除いてコア 48 位はすべて Ala であり、Thr が SVR に多い傾向は認められなかった。

IL28B SNP 解析では、これまでに解析し得た HCV-2b 症例数が少なく統計学的に有意差は見られなかったが、SVR に比べて Non-SVR で IL28B-Minor が多い傾向が認められた (0% vs. 14%)。

4) HCV-4a 慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 治療応答性に及ぼすウイルス側因子の同定：

HCV-4a 感染慢性肝炎患者においては、SVR は 57% (24/42)、Non-SVR は 43% (18/42) であった。SVR と関連する因子として、単変量解析により、ウイルスの IRRDR の変異が 4 ヶ所以上あること (IRRDR[4a]≥4) が同定された。

5) 肝癌患者 (HCC) 群と対照群 (non-HCC) の臨床的特徴

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

6) 肝癌患者 (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

肝癌患者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) は肝癌患者群の 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) は肝癌患者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。

7) 肝癌患者 (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

肝癌患者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 は肝癌患者群の 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。

8) 肝癌患者 (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

肝癌患者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≥6 群) の NS5A は肝癌患者群の 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≥3 群) の NS5A も、対照群に比べて、肝癌

患者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) は肝癌患者群の 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 ($p=0.002$)。

9) 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

肝癌患者群において、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 ($p=0.0003$)。

10) 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関連することが明らかになった。

11) 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

肝癌患者群において、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

HCV-1b 感染慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 治療応答性と相関する因子としてウイルス NS5A (IRRDR1, 2)、ISDR3)) の変異数、コア蛋白質 70 位のアミノ酸変異 2, 4)、及び宿主因子 IL28B SNP5-7) が知られている。本研究では、単変量解析及び多変量解析によりそれらの関連の有無を調べるとともに、各因子を組み合わせることによって、より正確な予測が可能か否かについて検討した。

HCV-1b 感染においては、IL28B-Major かつ IRRDR \geq 6 の場合は SVR に、IL28B-Major かつ IRRDR \leq 5 の場合は Relapse に、また、IL28B-Minor かつ IRRDR \leq 5 の場合は Null response になりやすいことが明らか

になった13)。一方、IL28B-Minor であっても IRRDR \geq 6 の場合には SVR になる症例が多く見られた。

HCV-2a 感染においては、HCV-1b の場合と同様に、IRRDR[2a] \geq 4 の場合にウイルスを排除して SVR になりやすいことがわかった14)。

HCV-2b 感染においては、SVR と有意な相関を示すウイルス側因子は見出されなかったが、早期ウイルス排除である RVR と IRRDR/N [2b] \geq 3 が有意の相関を示した。これらのことは、HCV-2a や-2b 感染においても、IRRDR 領域が Peg-IFN/RBV 応答性に関与している可能性を示唆しているものと思われる。

また、HCV-2a や HCV-2b 感染における IL28B SNP の意義については、解析し得た症例数が少なく、統計学的に有意差は見られなかったが、Non-SVR に IL28B-Minor が多い傾向が見られた。HCV-1b の場合ほど強い相関ではないかもしれないが、IL28B-Minor が Non-SVR の予測因子として用いられる可能性がある。今後、症例数を増やして更に検討する必要があると思われる。将来的には、HCV-2a や-2b 感染においても、IRRDR 変異と IL28B SNP を併用して Peg-IFN/RBV 応答性を予測し、IRRDR 変異が少なく且つ IL28B-Minor の症例には当初から24週間以上の延長投与を推奨することも考えられる。

HCV-4a 感染においても、IRRDR[4a] \geq 4 と SVR の有意の相関が示された15)。これらの成績は IRRDR の重要性が genotype を越えて普遍的なものであることを示しているものと思われる。

一方、肝癌発症についても、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)。ウイルス側因子としては、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4)、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、肝癌発症に寄与しているのではないかという推論がなされているが16)、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12)。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ので、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) HCV-1b感染慢性肝炎患者においては、Peg-IFN/RBV治療に際して、IL28B-MajorかつIRRDR \geq 6の場合はSVRに、IL28B-MajorかつIRRDR \leq 5の場合はRelapseに、また、IL28B-MinorかつIRRDR \leq 5の場合

は Null response になりやすい。一方、IL28B-Minor であっても IRRDR \geq 6 の場合には SVR が十分に期待できる。

HCV-2a 感染においては、IRRDR[2a] \geq 4 の場合は SVR になりやすいが、HCV-2b 感染では SVR と有意な相関を示す因子は見出されなかった。また、HCV-4a 感染においても、IRRDR[4a] \geq 4 の場合は SVR になりやすい。

2) 以上の結果より、HCV-1b、HCV-2a、HCV-4a 感染においても、IRRDR 多様性の解析は Peg-IFN/RBV 治療応答性の予測に有用であることが示唆された。とくに HCV-1b 感染においては、IRRDR と IL28B SNP の情報を組み合わせることにより、さらに正確に Peg-IFN/RBV 治療応答性を予測することができると考えられた。HCV-2a、HCV-2b、HCV-4a における IL28B SNP の意義については今後さらに検討する必要がある。

3) HCV-1b 感染による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、単変量解析により抽出された。

4) 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。

5) 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) El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Sequence variation in the hepatitis C virus NS5A protein predicts clinical outcome of pegylated interferon/ ribavirin combination therapy. *Hepatology*, 48:38-47, 2008.

2) El-Shamy A, Kim S-R, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, Hotta H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Intervirology*, 55:1-11, 2012.

3) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med*, 334:77-81, 1996.

4) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: Amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol*, 46:403-410, 2007.

5) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*, 41:1105-1109, 2009.

6) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 461:399-401, 2009.

7) Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nat Genet*, 41:1100-1104, 2009.

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) 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*, 47:1143-51, 2012.
- 14) 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:e30513, 2012.
- 15) 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*, 50:3886-3892, 2012.
- 16) 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.Sasase N, Kim SR, Kudo M, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hayashi Y, Shoji I, El-Shamy A, Hotta H Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 53(1):49-54, 2010.
- 2.Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 82(8): 1364–1370, 2010.
- 3.Kim SR, Imoto S, Kudo M, Nakajima T, Ando K, Mita K, Fukuda K, Hong HS, Lee YH, Nakashima K, Shoji I, Nagano-Fujii M, Hotta H, Hayashi Y. Autoimmune thrombocytopenic purpura during pegylated interferon alpha treatment for chronic hepatitis C. *Intern Med*, 49(12): 1119-1122. 2010.
- 4.Kim SR, Imoto S, Kudo M, Mita K, Taniguchi M, Kim KI, Sasase N, Shoji I, Nagano-Fujii M, El-Shamy A, Hotta H, Nagai T, Nagata Y, Hayashi Y. Double-filtration plasmapheresis plus IFN for HCV-1b patients with non-sustained virological response to previous combination therapy: early viral dynamics. *Intervirology*, 53(1):44-48, 2010.
- 5.Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang D-P, Ide Y-H, Hotta H. 17β-Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*. 54(11): 684–690, 2010.
- 6.Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *J Cell Biochem*. 111(3): 676–685, 2010.

- 7.El-Shamy A, Shoji I, Saito T, Watanabe H, Ide YH, Deng L, Kawata S, Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/ribavirin combination therapy. *Microbiol Immunol*, 55(6): 418-426, 2011.
- 8.Kim SR, Saito J, Imoto S, Komaki T, Nagata Y, Nakajima T, Ando K, Fukuda K, Otono Y, Kim KI, Ohtani A, Sugimoto K, Hasegawa Y, Fujinami A, Ohta M, Hotta H, Maekawa Y, Hayashi Y, Kudo M. Correlation between insulin resistance and outcome of pegylated interferon and ribavirin therapy, hepatic steatosis, hepatic fibrosis in chronic hepatitis C-1b and high viral load. *Digestion*, 84 Suppl 1: 5-9. 2011.
- 9.Kim SR, Saito J, Imoto S, Komaki T, Nagata Y, Kim KI, Sasase N, Kimura N, Sasatani K, Konishi E, Hasegawa Y, Fujinami A, Ohta M, El-Shamy A, Tanaka Y, Sugano M, Sakashita M, Nakamura A, Tsuchida S, Makino T, Kawada T, Nakajima T, Morikawa T, Muramatsu A, Kasugai H, Hotta H, Kudo M. Double-filtration plasmapheresis plus interferon- β for HCV-1b patients with non-sustained virological response to previous combination therapy. *Digestion*, 84 Suppl 1: 10-16. 2011.
- 10.Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Hotta H, Sada K. Inhibition of hepatitis C virus replication through AMP-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *Microbiol Immunol*, 55(11): 774-782, 2011.
- 11.Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, Ide YH, Hotta H. Hepatitis C virus infection promotes Hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *J Virol*, 85(17): 8556-8568, 2011.
- 12.勝二郁夫, El-ShamyAhmed, 堀田博. NS5A-IRRDR 変異数. *医学のあゆみ*, 239 (12-13): 1208-1211, 2011.
- 13.勝二郁夫, El-ShamyAhmed, 堀田博. C型肝炎ウイルス NS5A 領域の ISDR・IRRDR とインターフェロン治療効果予測. *肝胆膵*, 63(6): 1063-1069, 2011.
- 14.El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, Hotta H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated Interferon/Ribavirin combination therapy. *Intervirolgy*, 55(1): 1-11, 2012.
- 15.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.
- 16.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.
- 17.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.
- 18.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.
- 19.Kamada K, Shoji I, Deng L, Aoki C, Ratnoglik SL, Wakita T, Hotta H. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. *Microbes Infect*, 14(1): 69-78. 2012.
- 20.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.

21. 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.

22. Shoji I, Deng L, Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Front Microbiol*, 2: A278, 1-5, 2012.

23. 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.

24. 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)

25. 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. *Hepatol Res*, (in press)

26. 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.

27. 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. Hotta H, El-Shamy A, Kim SR, Imoto S, Aoki C, Ide Y, Shoji I. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV

genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 2010, Vienna.

2. El-Shamy A, Kim SR, Ide Y, Deng L, Shoji I, Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, 2010. Yokohama.

3. 堀田博, El-Shamy Ahmed, 金守良, 井本勉, 金啓二, 谷口美幸, 井出良浩, 勝二郁夫. 慢性C型肝炎に対するPEG-IFN/RBV治療効果に及ぼすウイルス側因子のさらなる検討 HCV-2a及びHCV-2bのNS5A多様性は治療効果と相関する. 第46回日本肝臓学会総会, 2010. 山形.

4. 金守良, 井本勉, 堀田博, 三田敬二, 前川陽子, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 井出良弘. 1b型高ウイルスC型慢性肝炎のPEG-IFN+リバビリン併用療法(併用療法)無効例に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)+IFN- β 4週間連続投与の試み. 第46回日本肝臓学会総会, 2010. 山形.

5. El-Shamy Ahmed, 金守良, 井出良浩, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. HCV genotype 2a および 2b の NS5A 多様性はペグインターフェロン/リバビリン併用療法の治療効果と相関する. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010. 徳島.

6. 矢野嘉彦, 堀田博, 東健. C型肝炎に対する新たな治療戦略 慢性C型肝炎1型高ウイルス例におけるNS5A領域変異と治療効果の関係. 第14回日本肝臓学会大会, 2010. 横浜.

7. 瀬尾靖, 三木章, 矢野嘉彦, 勝二郁夫, 堀田博, 東健. C型肝炎に対するPEG-IFN α -2a/RBV併用療法の早期治療効果に関する因子の検討. 第14回日本肝臓学会大会, 2010. 横浜.

8. 井本勉, 金守良, 堀田博, 三田敬二, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 井出良浩, 前川陽子. C型肝炎1b型高ウイルス量併用療法無効患者に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)+IFN β 2~4週連続投与後PEG-IFN α -2a+RBV併用療法の早期ウイル

- スダイナミックスによる EVR 予測. 第 14 回日本肝臓学会大会, 2010. 横浜.
- 9.井本勉, 金守良, 堀田博. 1b 型高ウイルス量 C 型慢性肝炎の PEG-IFN+Rivabirin 併用療法(併用療法)無効例に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)+IFN-β4 週間連続投与後 PEG-IFN α-2a+Rivabirin の試み. 第 14 回日本肝臓学会大会, 2010. 横浜.
- 10.進藤道子, El-Shamy Ahmed, 森川輝久, 原野雄一, 中島知明, 勝二郁夫, 奥野忠雄, 堀田博. C 型慢性肝炎から肝癌発生まで経時的観察が可能であった症例におけるウイルス遺伝子多様性の解析. 第 14 回日本肝臓学会大会, 2010. 横浜.
- 11.El-Shamy A, Shoji I, Saito T, Ide Y-H, Deng L, Kawata S, Hotta H. Polymorphisms of serine protease -domain of NS3 and Core protein of hepatitis C virus genotype 1b associate with hepatocellular carcinoma development. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 14, 2011. Sapporo, Japan.
- 12.金守良, 井本勉, 堀田博, 土田忍, 外山博近, 田中基文, 前川陽子, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 井出良浩. 併用療法無効患者に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)の EVR に関するウイルスダイナミックス、宿主因子(IL28B)とウイルス因子の検討. 第 47 回日本肝臓学会総会, 2011. 東京.
- 13.進藤道子, El-ShamyAhmed, 勝二郁夫, 奥野忠雄, 堀田博. 肝癌発生前後における C 型肝炎ウイルス遺伝子(IRRDR、ISDR とコア蛋白)多様性の経時的変化の検討.第 47 回日本肝臓学会総会, 2011. 東京.
- 14.金守良, EL-ShamyAhmed, 堀田博. ウイルス変異(とくに IRRDR)と宿主因子(とくに IL28B)からみた 1b 高ウイルス量 C 型慢性肝炎に対する治療戦略治療応答との関係を中心に. 第 47 回日本肝臓学会総会, 2011. 東京.
- 15.金守良, 井本勉, 堀田博, 谷口美幸, 金啓二, El Shamy Ahmed, 勝二郁夫, 林祥剛, 土田忍, 外山博近, 田中基文, 前川陽子. C 型慢性肝炎に対する PEG-IFNα-2b+Ribavirin(併用療法)におけるインスリン抵抗性と治療効果、肝組織所見、BMI との関連. 第 15 回日本肝臓学会大会, 2011. 福岡.
- 16.瀬尾靖, 三木章, 矢野嘉彦, 斎藤雅也, 勝二郁夫, 堀田博, 東健. C 型慢性肝炎に対する PEG-IFNα-2a/RBV 併用療法の EVR・SVR に関する因子の検討. 第 15 回日本肝臓学会大会, 2011. 福岡.
- 17.金守良, 堀田博, El ShamyA. C 型慢性肝炎に対する PEG-IFNα-2b/Ribavirin 併用療法における IRRDR 変異の臨床的意義. 第 15 回日本肝臓学会大会, 2011. 福岡.
- 18.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.
- 19.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.
- 20.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.
- 21.Matsui C, Shoji I, Deng L, Hotta H. HCV infection induces lysosomal degradation of hepatocyte nuclear factor 1α via interaction with HCV NS5A protein. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
- 22.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.
- 23.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.

24. 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.

25. 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.

26. 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

27. 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.

28. 金 守良, El-Shamy A, 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.

29. 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

30. 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

31. 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

32. 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)

33. 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.

34. 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

1. 特許取得・出願

1. 堀田博. 特願 2010-206800. 「C 型肝炎ウイルス株の評価方法及びその利用」 平成 22 年 9 月 15 日

培養細胞系を用いた薬剤耐性肝炎ウイルスの解析

分担研究者 鈴木 哲朗 浜松医科大学医学部 教授

研究要旨 新規 C 型肝炎治療薬として開発される可能性があるものの、耐性ウイルス解析が進んでいない抗 HCV 化合物について、耐性ウイルス出現の可能性を HCV 感染増殖細胞系を用いて検討した。また、新たな薬剤耐性評価技術の開発を行った。(1) NS4A アンタゴニスト、MTP 阻害剤：HCV NS4A アンタゴニストで NS3-4A プロテアーゼ活性を阻害する ACH806 また MTP 阻害剤で HCV 粒子産生を抑制する BMS-201038 について、それぞれ長期間添加による耐性ウイルス出現の可能性を検討した。しかしながら、本実験条件下では耐性 HCV は観察されなかった。(1) NS2 阻害剤：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、創薬化の可能性のある化合物に対する耐性 HCV を培養細胞による HCV 複製系または感染増殖系を用いて解析した。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 遺伝子型 2a JFH-1 株のゲノム cDNA プラスミド (pJFH1) を基に、直鎖化合成 RNA の 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を作製した (SL2 細胞)。

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。

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) NS4A アンタゴニスト、MTP 阻害剤に対する耐性 HCV 出現の検討

NS4A アンタゴニスト ACH806 に対する耐性 HCV が出現するかどうかを検討した。終濃度 1 microM になるように ACH806 を SL2 細胞へ添加し 2 ヶ月間培養を行った。3~4 日毎の細胞継代時に培養上清の HCV Core 蛋白を測定し、培地交換の際 ACH806 を同濃度で添加した。ACH806 添加細胞では実験開始後約 1 ヶ月まで HCV レベルが低下し、開始時の約 100 分の 1 に至ったが、その後 HCV レベルの低下は見られなかった。このとき、細胞中の HCV 遺伝子配列 (NS3~NS4A 領域) を解析したがコントロールの薬剤非添加細胞中の HCV 遺伝子との違いは認められなかった。つぎに、リポ蛋白の合成に関与する microsomal TG transfer protein (MTP) の働きを阻害する BMS-201038 について同様に耐性ウイルス解析を行った。終濃度 1 microM で BMS-201038 を SL2 細胞に加え 3 ヶ月間、培養を行った。BMS-201038 添加細胞では、培養開始後からウイルスレベルは漸減し、培養 64 日以降では上清中の HCV は検出限界以下まで低下した。耐性ウイルスの出現は観察されなかった。

(2) 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。(3) 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 切断をウエ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) NS4A アンタゴニスト、MTP 阻害剤に対する耐性 HCV 出現の検討

ACH806 は、米国ベンチャー企業が開発した NS4A アンタゴニストで、NS3-4A プロテアーゼの活性を抑え、HCV 複製を阻害する。サブゲノムレプリコンを用いた実験から、ACH806 耐性レプリコン RNA の出現が報告されている。今回、HCV JFH-1 株の感染細胞系で同薬剤の抗 HCV 作用が示された。本実験系での EC50 は 500 nM 程度と推定された。これまで報告されている耐性レプリコンは遺伝子型 1b 由来であることから、遺伝子型 2a の HCV に対しては耐性ウイルスが出現しにくい可能性も考えられる。

MTP は、カイロミクロンに中性脂肪を運搬する蛋白でカイロミクロン、VLDL(超低密度リポ蛋白)の産生に重要な蛋白である。最近の研究から HCV の産生に VLDL の産生、分泌系が関与することが知られ、実際に MTP 阻害剤による HCV 粒子産生阻害作用が報告されている。本研究では、それが確認されただけでなく、MTP 阻害剤の一種、BMS-201038 を長期間処理することによって、ウイルス産生をほぼ完全に消失させることが可能であることが初めて示された。抗ウイルス剤の開発研究においては、ウイルス蛋白を標的とする薬剤より、宿主因子を標的とする薬剤の方が耐性ウイルスが出現しにくい、という考え方がある。今回の BMS-201038 の成績はそれを裏付ける結果といえるかもしれない。

(2) 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。いづれにせよ、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。

(3) 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. Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T:

- Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res* 85: 520–524, 2010.
2. Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T: Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol* 84: 5824–5835, 2010.
3. Braconi C, Valeri N, Gasparini P, Huang N, Taccioli C, Nuovo G, Suzuki T, Croce CM, Patel T. Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes. *Clin Cancer Res* 16: 957–966, 2010.
4. Tanaka Y, Mori Y, Tani H, Abe T, Moriishi K, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Suzuki T, Tatsumi M, Matsuura Y. Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus. *Microbiol Immunol.* 54:206–220, 2010.
5. Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun.* 395: 565–571, 2010.
6. Ito M, Murakami K, Suzuki T, Mochida K, Suzuki M, Ikebuchi K, Yamaguchi K, Mizuochi T. Enhanced expression of lymphomagenesis-related genes in peripheral blood B cells of chronic hepatitis C patients. *Clin Immunol* 135: 459–465, 2010.
7. Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T. RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLOS Pathog.* 6: e1000885, 2010.
8. Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *J Cell Biochem.* 111: 676–685, 2010.
9. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology.* 52: 411–420, 2010.
10. Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of the viral particles. *J Biol Chem* 286: 37264–37273, 2011.
11. Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 92: 2082–2087, 2011.
12. Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, Wakita T. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine* 29: 4821–4828, 2011.
13. Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In Vivo adaptation of hepatitis C virus for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology* 54: 425–433, 2011.
14. Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S. Malnutrition Impairs Interferon Signaling Through mTOR and FoxO Pathways in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 141: 128–140, 2011.

15. Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J Hepatol.* 54: 432-438, 2011.
16. Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi K, Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One.* 6: e15967, 2011.
17. Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, Suzuki T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *Biochem Biophys Res Commun.* 407 : 135-140, 2011.
18. Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology* 410: 38-47, 2011.
19. Suzuki T. Morphogenesis of infectious hepatitis C virus particles. *Front. Microbiol.* 3: 38, 2012.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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。

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 NS3-4A protease inhibitor である Telaprevir (TVR) と Pegylated Interferon (PEG-IFN) と Ribavirin (RBV) 併用療法の治療効果予測因子を検討した。NS5A 阻害剤 (BMS790052) と PEG-IFN+RBV 併用療法と NS5A 阻害剤とプロテアーゼ阻害剤 (BMS650032) 併用療法について検討した。また B型慢性肝疾患に使用されている核酸アナログ製剤の長期投与では、多剤耐性ウイルスの出現が問題となっている。C型肝炎；TVR+PEG-IFN+RBV（24週間）治療の SVR 率は、naïve 例 76%、前治療再燃例 90%、前治療無効例 27%であった。効果に関係する因子として、IL28B の遺伝子多型 (SNP) と HCV Core aa70 番の置換が重要であった。また投与初期の Hb 値低下に関しては、ITPA gene の SNP が関係した。さらに前回治療無効群における TVR+PEG-IFN+RBV の 3 者併用療法施行例で 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。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 例認められたが、いずれも治療後に出現していた。NS5A 阻害剤と PEG-IFN+RBV 併用療法では、Naïve 例 9 例、前治療無効例 8 例に対して治療が行われた。NS5A 阻害剤の投与量は 1 日 60mg 群と 10mg 群の 2 群比較にて行われた。naïve 例では、9 例中 6 例が SVR となった。前治療無効例では、8 例中 2 例が SVR となった。NS5A 阻害剤とプロテアーゼ阻害剤併用 24 週間投与前治療 null responder 群 11 例では、1 例が Bil 上昇で中止（最終的には SVR）、1 例が治療効果不十分にて SOC 併用に移行したが、残りの 9 症例は SVR となった。標準治療 (SOC) 不適格例、不耐用例 12 例では、7 例が SVR となった。B型肝炎；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。ラミブジン単独投与中の症例で rtM204 の変異が疑われた症例において rtM204V/I 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 rtM204V/I 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。その後ラミブジンとアデホビルの併用療法を施行した症例の 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。12 例中 11 例で rtA181T/S/V の変異を認め、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。C型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。また NS5A 阻害剤と PEG-IFN+RBV 併用療法、NS5A 阻害剤とプロテアーゼ阻害剤併用 24 週間投与でも高い効果が得られた。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。現在新規治療薬であるプロテアーゼ阻害剤のteraplevir (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。このTVRの成績と効果に関するウイルス側因子、生体側因子について検討した。さらに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。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。また副作用が少なく、より効果が高い新規治療薬の出現が期待されている。新規治療薬であるNS5A阻害剤、プロテアーゼ阻害剤の効果について検討した。

B型慢性肝疾患の治療は、インターフェロン(IFN)と核酸アナログ製剤が中心である。35歳以上の症例ではIFN療法の効果が少ないため、核酸アナログ製剤による治療が主体となっている。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関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TVRとPEG-IFN+RBV併用療法12週間投与(T12PR12)を施行した20例と24週間投与(T12PR24)を施行した61例において効果とウイルス側因子、生体側因子について検討した。さらに前治療無効例において3者併用療法を施行した症例の治療効果と耐性ウイルスについて検討した。さらに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。またC型慢性肝炎(genotype 1型高ウイルス量症例)症例に対してNS5A阻害剤(BMS790052)とPEG-IFN+RBV併用療法24週間投与(一部症例で48週間投与)を施行した17例とBMS790052とプロテアーゼ阻害剤(BMS650032)併用24週間投与を施行した23例を対象とした。治療効果と効果に関するウイルス学的因子、生体側因子を検討した。

B型肝炎症例においてラミブジン単独投与中に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関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) TelaprevirとPEG-IFN+RBV3者併用療法の成績と治療効果に関する因子
T12PR12の治療のSVR率は、naïve例70%、IFN単独無効例33%、PEG+RBVのNVR(non-responder;null)は0%であった。一方T12PR24の治療のSVR率は、naïve例76%、前治療再燃例90%、前治療無効例27%であった。効果に関する因子として多変量解析では、IL28Bの遺伝子多型(SNP;rs8099917がmajor home)とHCV Core aa70番の置換(wild type)が抽出され

た。また投与中のHb値に関しては、ITPA geneのSNP (rs1127354)がmajor homoの症例で治療開始2週目、4週目で有意に低下していた。4週目にHb値が11g/dL未満に低下することに関係する因子は、性別(女性)、BMI(23以下)、ITPA gene(CC genotype)、年齢(50歳以上)であった。

次に、前回治療無効群におけるTVR+PEG-IFN+RBVの3者併用療法施行15例についてウイルス学的検討を行った。この群は、前治療無効例であるためウイルス学的にはHCV core aa70はmutantが多く

(57%)、IL28Bはminor alleleを持つ症例が93%であった。3者併用療法でのSVRは4例、relapserが9例、NVRが2例であった。SVR群の特徴は、男性が多く、HCV Core aa70は全例wild type、IL28B geneは1例がTT(major homo)、3例がTG、ITPA geneは全例CC、PEG-IFNとTelaprevirのadherenceは全例100%であった。一方RBVのadherenceは51-93%であった。

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

前治療無効例において治療開始時のNS3領域の遺伝子配列(direct sequence)を検討すると、relapser例の1例でT54Sの変異を認めた。さらに投与中のNS3領域の遺伝子変異について検討したところ、relapser 9例中7例、NVR 2例中2例でTVR耐性ウイルスが検出された。検出された耐性ウイルスのタイプは、V36A, T54S/A, A156S/T, T54S+R155K, T54S+A156S, V36M+R155Kであった。検出時期は治療開始後8-32週(終了後8週)であった。この前治療無効例14例で、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。

(3) NS5A阻害剤(BMS790052)とPEG-IFN+RBV併用療法

Naïve例9例、PEG-IFN/RBVのnon-responder 8例に対して治療が行われた。NS5A阻害剤(BMS790052)の投与量は1日60mg群と10mg群の2群比較にて行われた。naïve例では、9例中6例がSVRとなった。このうち60mg群では4例全例がSVRとなった。開始時のNS5A領域の遺伝子配列を検討(PCR-direct sequence法)するとBMS790052に対する耐性変異は検出されなかった。non-responder例では、8例中2例がSVRとなった。SVRの2例はいずれもIL28B TTでCore aa70がmutantであった。治療開始時BMS790052に対する耐性変異が認められた1例は、relapseした。

(4) NS5A阻害剤(BMS790052)とプロテアーゼ阻害剤(BMS650032)併用24週間投与

前治療null responderの11例と、標準治療(SOC)不適格例、不耐用例12例で行われた。前治療null responder群では、1例がBil上昇で中止(最終的にはSVR)、1例が4週目にウイルスが陰性化しなかったためにSOC併用に移行したが、残りの9症例はSVRとなった。IL28BやCoreのaa70番に関しては、治療効果と関係なかった。標準治療(SOC)不適格例、不耐用例12例では、7例がSVRとなった。治療開始時BMS790052に対する耐性変異が認められた3例は、relapseまたは投与中にvirological breakthroughをおこした。

(5) 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関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