

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻	ページ	出版年
Kondo M, Moriishi K, Wada H, Noda T, Marubashi S, Wakasa K, <u>Matsuura Y</u> , Doki Y, Mori M, and Nagano H.	Upregulation of nuclear PA28 γ expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma.	Exp. Ther. Med.	3	379-385	2012
Hayes CN, et al.	Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle.	PLoS One.	7(10)	e47490	2012
Okazaki A, et al.	Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse.	Hepatology	56(2)	555-66	2012.
Kani S, Tanaka Y, Matsuura K, Watanabe T, Yatsushashi H, Orito E, Inose K, Motojuku N, Wakimoto Y, Mizokami M.	Development of new IL28B genotyping method using Invader Plus assay.	Microbiol Immunol.	56(5)	318-23	2012
Sandalova E, Laccabue D, Boni C, Watanabe T, Tan A, Zong ZH, Ferrari C, Bertoletti A.	Increased Levels of Arginase in Patients With Acute Hepatitis B Suppress Antiviral T Cells.	Gastroenterology	143	78-87	2012
Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, and Mizokami M.	Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene.	GUT.	in press		2012
Watanabe T, and Tanaka Y.	Reactivation of hepatitis viruses following immunomodulating systemic chemotherapy.	Hepatol Res.	43(2)	113-21	2013
KOHGA, K., TATSUMI, T., TSUNEMATSU, H., AONO, S., SHIMIZU, S., KODAMA, T., HIKITA, H., YAMAMOTO, M., OZE, T., AKETA, H., HOSUI, A., MIYAGI, T., ISHIDA, H., HIRAMATSU, N., KANTO, T., HAYASHI, N. & <u>TAKEHARA, T.</u>	Interleukin-1 β enhances the production of soluble MICA in human hepatocellular carcinoma.	Cancer Immunol Immunother,	61(9)	1425-32	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻	ページ	出版年
NAWA, T., ISHIDA, H., TATSUMI, T., LI, W., SHIMIZU, S., KODAMA, T., HIKITA, H., HOSUI, A., MIYAGI, T., KANTO, T., HIRAMATSU, N., HAYASHI, N. &TAKEHARA, T.	Interferon- α suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via the protein kinase C pathway.	Virology	432(2)	452-9	2012
SHIMIZU, S., TAKEHARA, T., HIKITA, H., KODAMA, T., TSUNEMATSU, H., MIYAGI, T., HOSUI, A., ISHIDA, H., TATSUMI, T., HIRAMATSU, T. K., FUJITA, N., YOSHIMORI, T. & HAYASHI, N.	Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma.	Int J Cancer	131(3)	548-57	2012
HIKITA, H., KODAMA, T., SHIMIZU, S., LI, W., SHIGEKAWA, M., TANAKA, S., HOSUI, A., MIYAGI, T., TATSUMI, T., KANTO, T., HIRAMATSU, N., MORII, E., HAYASHI, N. &TAKEHARA, T.	Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: A causal link between apoptosis and carcinogenesis.	J Hepatol	57(1)	92-100	2012
Maekawa A, Pei Z, Suzuki M, Fukuda H, Ono Y, Kondo S, Saito I, Kanegae Y.	Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery.	Scientific Report	3	1136	2013
Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T.	Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection.	Virology	432	29-38	2012
Pei Z, Kondo S, Kanegae Y, Saito, I.	Copy number of adenoviral vector genome transduced into target cells can be measured using quantitative PCR: Application to vector titration.	Biochem Biophys Res Commun	417	945-950	2012

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた 抗HBV薬剤感受性評価と臨床への応用

柘植雅貴* 今村道雄* 茶山一彰*

索引用語：B型肝炎，ヒト肝細胞キメラマウス，核酸アナログ，薬剤耐性，ポリメラーゼ領域

はじめに

核酸アナログ製剤は、インターフェロン治療に比べ、副作用が少なく、服薬に対するコンプライアンスも良好であることから、B型慢性肝疾患に対する治療薬として広く使用されるようになった。現在、B型慢性肝炎に対する核酸アナログ製剤として、ラミブジン(ゼフィックス®)、アデホビル(ヘプセラ®)、エンテカビル(バラクルード®)という3種類が保険適応となっており、さらに海外では、これらの薬剤に加え、テノホビル¹⁾やクレブジン^{2,3)}、テルビブジン⁴⁾といった薬剤も承認され使用されている。いずれの薬剤もB型肝炎ウイルス(HBV)の増殖過程において、ウイルスポリメラーゼに取り込まれ、chain terminatorとしてマイナス鎖合成時の逆転写反応やプラス鎖合成時の伸長反応を阻害することで、強力な抗ウイルス効果を発揮し、肝

炎の鎮静化を得ることができる。しかしながら、強力な抗ウイルス効果の反面、核酸アナログ治療によって、HBV感染肝細胞からHBVを完全に排除することは極めて困難であり、数年におよぶ長期間の核酸アナログの使用は不可欠といえる。そのため、核酸アナログ長期投与例では、HBVポリメラーゼ遺伝子RT領域のアミノ酸変異が生じ、薬剤耐性を獲得したHBVが増殖することによってviral breakthroughやbreakthrough hepatitisを発症するような症例が一部に認められ、薬剤耐性HBVへの対策の確立は大きな課題である^{5~8)}。

当研究室では、*in vitro*および*in vivo*におけるHBV複製・感染モデルを確立し、ポリメラーゼ領域の変異に伴うHBVに対する各種核酸アナログ製剤の抗ウイルス効果を評価し、報告してきた^{6,7,9)}。

本稿では、その*in vitro*および*in vivo*の薬

Masataka TSUGE *et al* : Evaluation of anti-viral effects on HBV infection with nucleotide analogues using human hepatocyte chimeric mouse model

*広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門消化器・代謝内科学

[〒734-8551 広島県広島市南区霞 1-2-3]

Plasmid	Transfection	HBsAg	HBeAg	HBV DNA (LGE/ml)
pTRE-HB-wt	Transient	3.9±1.5	105±7	8.3±0.4

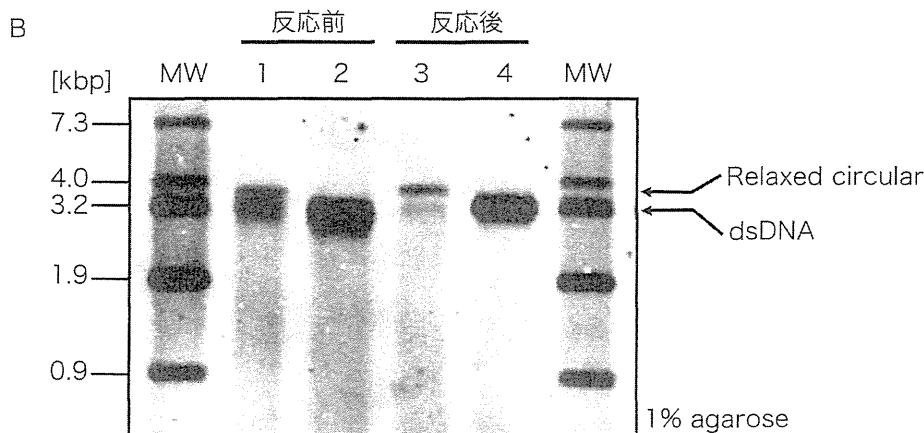


図1 HBV発現プラスミドの構築とHBV粒子の作製

- A: HBV発現プラスミドを、HepG2細胞にリン酸カルシウム法を用いて transient transfection し、培養上清中に分泌されるHBVマーカーを検査。その結果、高力価のHBV DNAが培養上清中へ放出されていることが確認された。
- B: 内在性ポリメラーゼ反応を用いて、産生されたHBV粒子の自己複製能を検査。その結果、反応により、relaxed circularのバンドが増加したことから、産生されたHBV粒子が自己複製能を保持していることが確認された(レーン3)。

効評価系を紹介するとともに、同評価系と臨床との関連性について述べる。

2 HBV発現プラスミドの構築

HBVゲノムの全長が組み込まれた発現プラスミドを構築するため、HBVキャリア血清から、DNAを抽出し、Polymerase chain reaction (PCR)にてHBVゲノムを増幅した後、1.4倍長のHBVゲノムをpTRE2hyg vectorに組み込んだHBV発現プラスミド(野生株)を作製した⁹⁾。作製したHBV発現プラスミドが完全なHBV粒子を発現するかを検討するため、まず、HepG2細胞にリン酸カルシウム法を用いてtransient transfectionを行い、培養上清中に分泌されるHBV関連蛋白およびHBV DNA量について検討した。その結果、図1Aに示すように、培養上清中に

は、HBs抗原、HBe抗原がともに発現し、8 Log copies/ml以上の高いHBV DNA量が検出された。そこで、細胞株から産生されたHBV粒子が自己複製の機能を保持しているか否かを確認するため、内在性のポリメラーゼ反応を行った。反応前は、約3.5 kb付近と3.2 kb付近にrelaxed circular, dsDNAと思われるバンドが確認され(レーン1)、反応後(レーン3)では、レーン1に比べ、relaxed circularのバンドが増加していることが確認された(図1B)。また、レーン2, 4では、制限酵素処理Sma Iにより、relaxed circularが切断され、dsDNAのみとなった。以上の結果から、クローニングによって作製されたHBV発現プラスミドにより、HepG2細胞内で産生された自己複製能を保持するHBV粒子が、培養上清中に多量に放出されているも

野生株 --LA-----S-M-----N-----
 rtL180M/rtM204V株 --MA-----S-V-----N-----
 rtA181T/rtN236T株 --LT-----S-M-----T-----
 rtL180M/rtS202G/rtM204V株 --MA-----G-V-----N-----

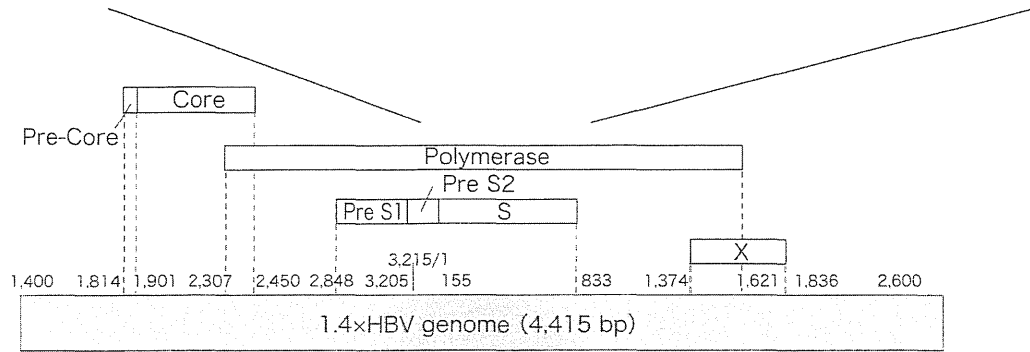


図2 本検討に使用した薬剤耐性HBV発現プラスミド

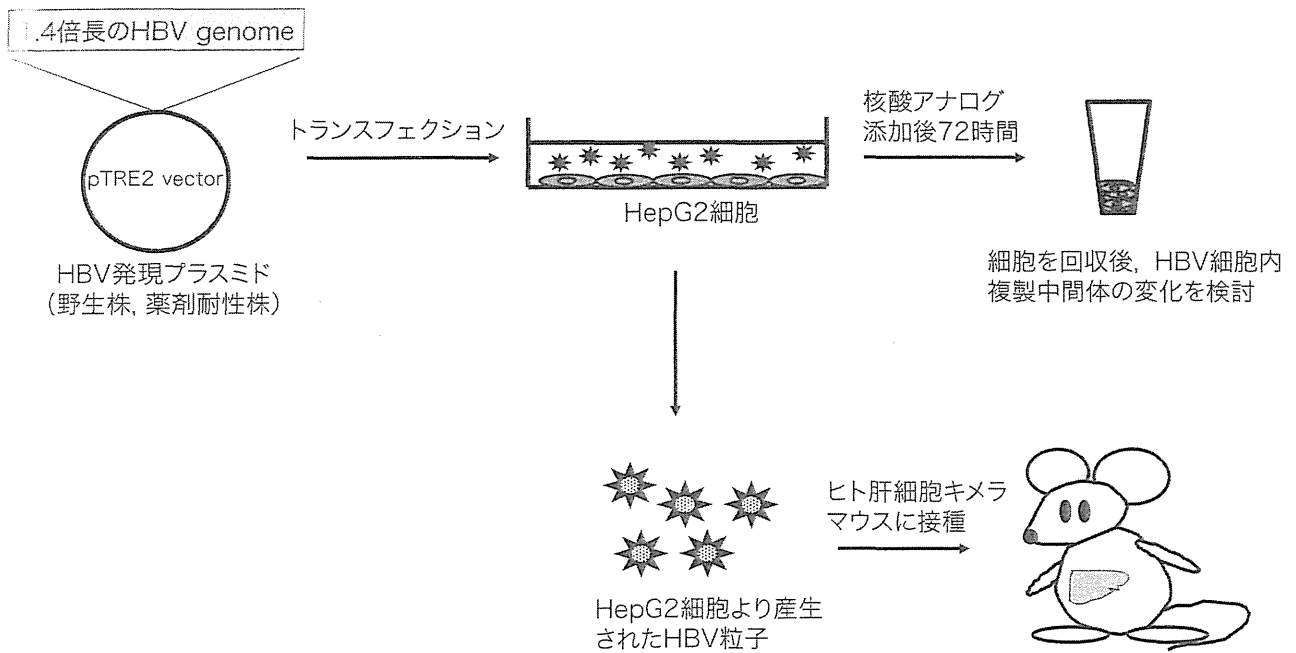
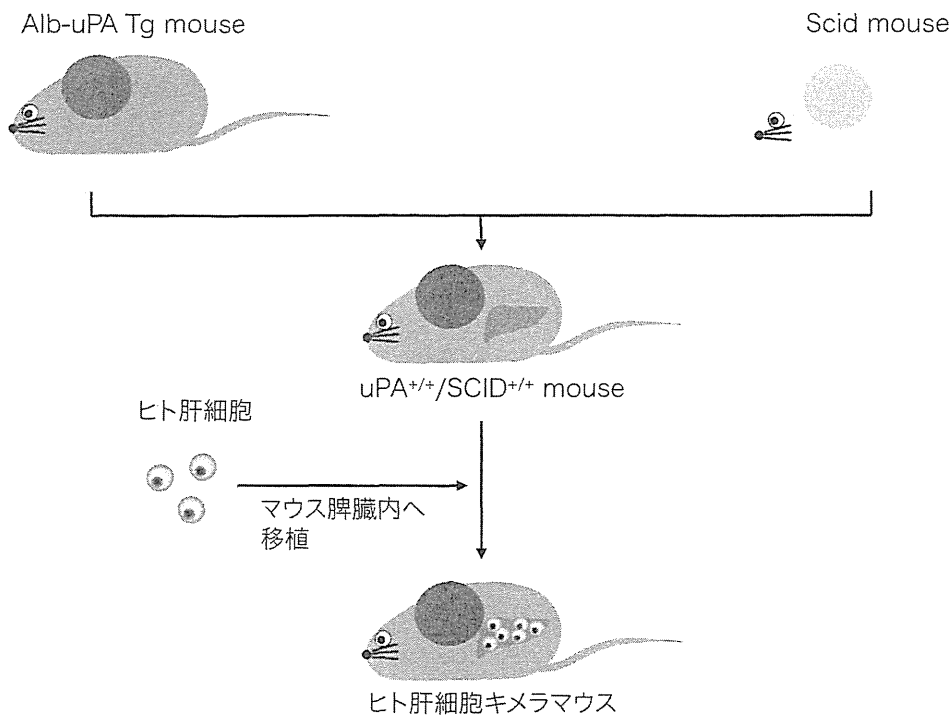


図3 本研究の流れ

HBV感染患者血清をもとに作製したHBV発現プラスミドをHepG2細胞にトランスフェクション. 24時間後より, 培養上清中に核酸アナログを添加し, 72時間後に細胞を回収. 細胞内のHBV複製中間体を定量し, 抗ウイルス効果を検討(*in vitro*). また, HBV発現プラスミドをトランスフェクションしたHepG2細胞から産生されたHBV粒子を回収し, ヒト肝細胞キメラマウスの尾静脈より接種. HBV感染が成立後, マウスに核酸アナログを経口投与し, マウス血清中のHBV DNAの変化を解析し, 核酸アナログの抗ウイルス効果を検討(*in vivo*).



Tateno C, et al : *Am J Pathol* 165 : 901-912, 2004

図4 ヒト肝細胞キメラマウスの構築

Alb-uPAトランスジェニックマウスとSCIDマウスを交配させ、uPA^{+/+}/SCID^{+/+}マウスを作製。同マウスに対し、経脾的にヒト肝細胞を移植。ヒト肝細胞は、マウス肝臓内で生着し、ヒト肝細胞キメラマウスが作製される。

のと考えられた。

3

*In vitro*におけるHBV薬剤耐性株に対する核酸アナログの抗ウイルス効果の評価

B型慢性肝炎症例に対して核酸アナログ製剤を長期間使用すると、HBV polymerase 遺伝子のRT領域で生じたアミノ酸変異に伴い、HBVは薬剤耐性を獲得する。RT領域にあるYMDD motif (RT領域203～206番アミノ酸)の変異はラミブジン耐性変異として良く知られているが^{10,11)}、そのほかにもそれぞれの核酸アナログに対する耐性変異について多数報告がなされている^{5~7,12)}。そこで、さまざまな薬剤耐性変異について解析するため、HBV発現プラスミド(野生株)に対し、プラスミドのRT領域に各種薬剤に対する耐性変異を加え、図2に示すような3種類の

薬剤耐性HBV発現プラスミドを作製した。作製したHBV薬剤耐性株は、それぞれラミブジン耐性変異をもつrtL180M/rtM204V変異株、ラミブジン/アデホビル耐性をもつrtA181T/rtN236T変異株、ラミブジン/エンテカビル耐性変異をもつrtL180M/rtS202G/rtM204V変異株である。

これらのプラスミドをHepG2細胞にリポフェクション法を用いてtransient transfectionを行い、12～24時間後より培養上清中に核酸アナログを添加した。薬剤添加後72時間経過した後に細胞を回収し、細胞内のHBV複製中間体量を測定することによって、*in vitro*におけるHBVクローンの核酸アナログの感受性を評価した(図3)。

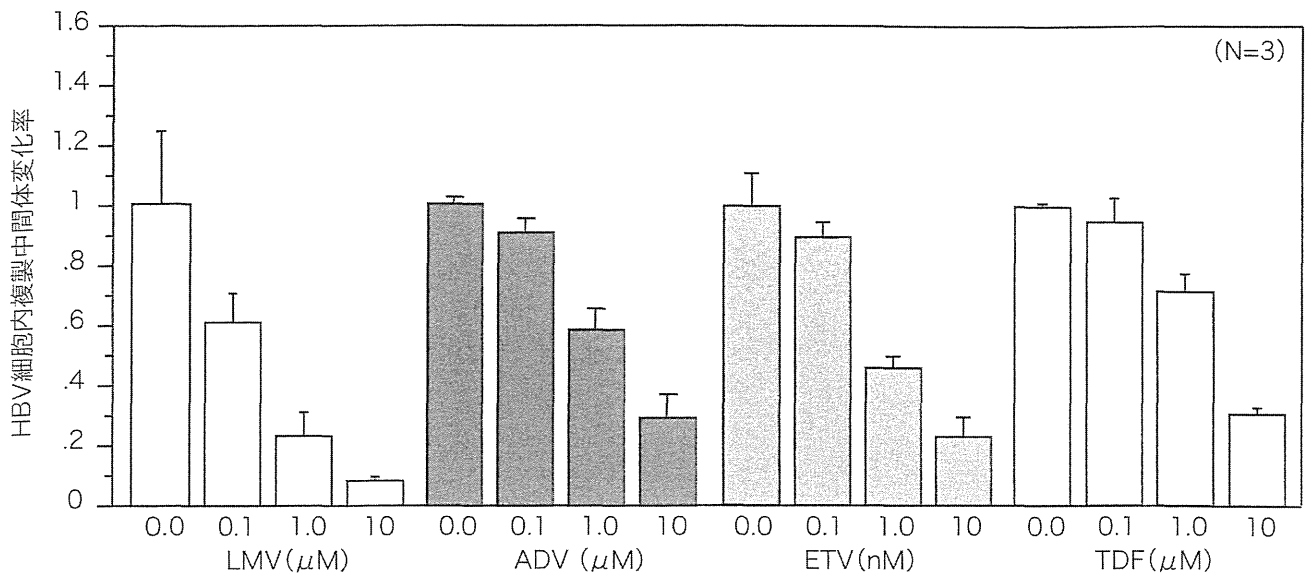


図5 *In vitro*におけるHBV野生株の各種核酸アナログ感受性の検討
HBV野生株は、いずれの核酸アナログに対しても良好な感受性を示した。

4 ヒト肝細胞キメラマウスを用いた *in vivo*における薬効評価系の構築

HBVは、ヒトやチンパンジーといった特定の動物のみに感染し、マウスやラットといった小動物には感染しないことが知られている。そのため、*in vivo*におけるHBV研究の多くは、チンパンジーを用いて行われてきた。しかしながら、チンパンジーはワシントン条約で保護されており、飼育費用は高額で飼育施設の確保も困難であるなどの問題があり、十分な研究の発展には至らなかった。近年、ヒト肝細胞をマウスに移植することによって、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞へと置換されたヒト肝細胞キメラマウスが開発された^{13,14)}。本学でも、2004年、吉里らの研究により、uPA-SCIDマウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスの作製が可能となった¹⁵⁾。

uPA-SCIDマウスは、アルブミン(Alb)プロモーター下にurokinase-type plasminogen activator (uPA)を遺伝子導入したAlb-uPA Tgマウスと重症免疫不全を呈するsevere combined immune deficient (SCID)マウスの

交配により作製されたマウスであり、生後uPAが肝細胞内で高発現することによりマウスの肝細胞は広範な壊死に陥り、肝不全を呈する。このuPA-SCIDマウスにヒト肝細胞を経脾的に移植することで、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスが作製される(図4)。

本研究では、このようにして作製されたヒト肝細胞キメラマウス(フェニックスバイオ社)の尾静脈より、HBV粒子を含む培養上清を接種し、HBV持続感染キメラマウスを作製する。マウス血中のHBV DNA量がプラトーとなった後に、核酸アナログを経口的に投与し、マウス血中HBV DNA量の変化をreal time PCRにて観察することで、*in vivo*における各種核酸アナログの抗ウイルス効果について検討した(図3)。

5 野生株およびラミブジン耐性株に対する核酸アナログ感受性の検討

はじめに、HBV野生株を用いて、*in vitro*での検討を行った。野生株のHBV発現プラスミドをHepG2細胞にtransfectionし、各種

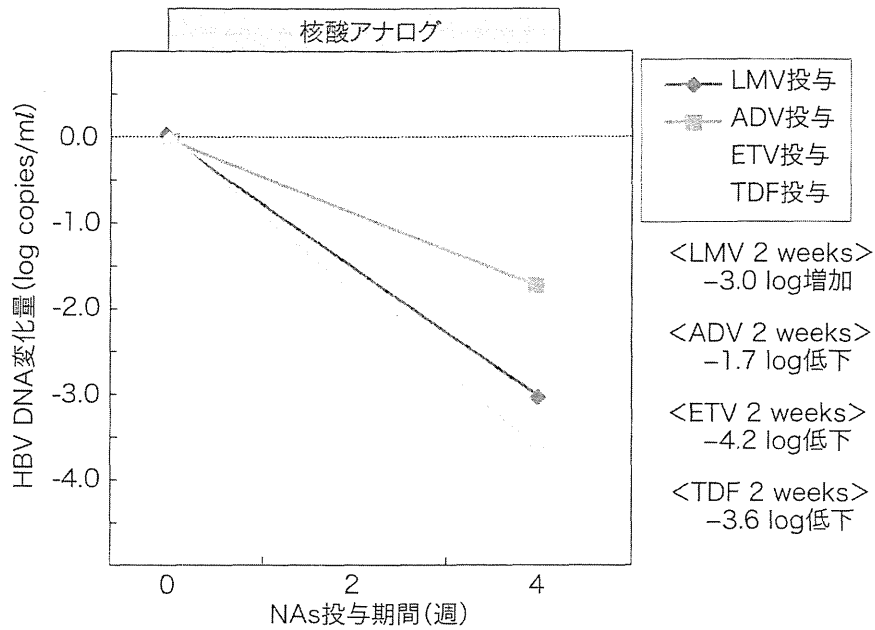


図6 野生株に対する核酸アナログの抗ウイルス効果
野生株に対する各種核酸アナログの抗ウイルス効果はいずれも良好であった。

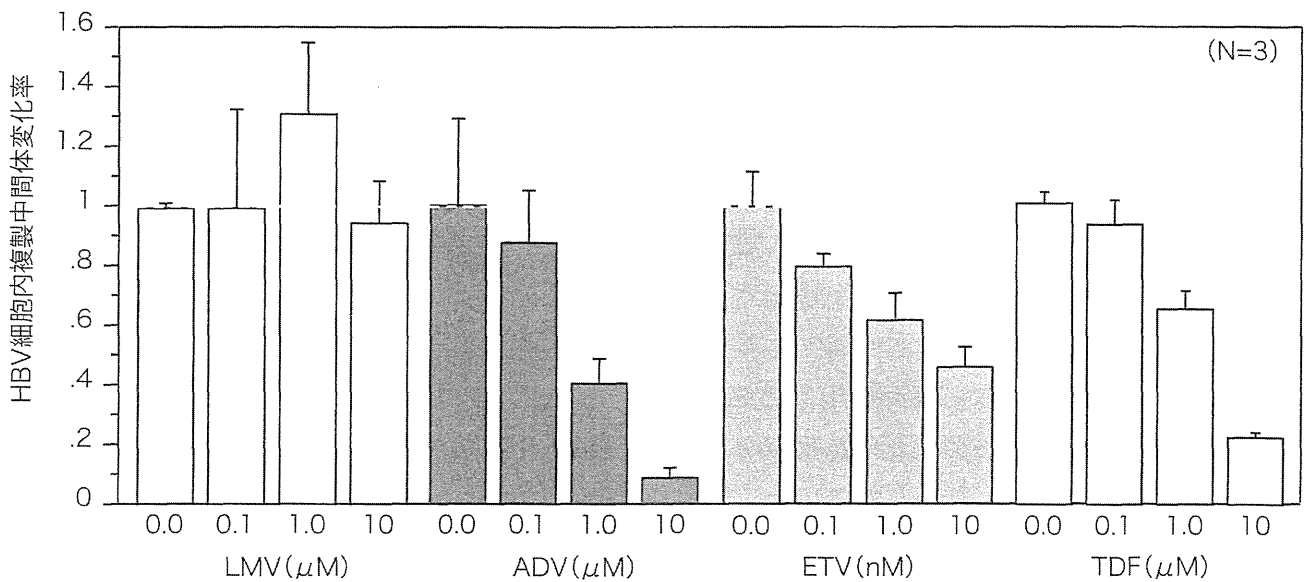


図7 *In vitro*におけるrtL180M/rtM204V耐性株の各種核酸アナログ感受性の検討
強いラミブジン抵抗性を示した一方で、そのほかの核酸アナログ添加では濃度依存的にHBV複製中間体量は減少した。*In vitro*におけるrtL180M/rtM204V耐性株の各種核酸アナログ感受性の検討。

核酸アナログ製剤による抗ウイルス効果について検討を行った。その結果、図5に示すように、HBV野生株は、いずれの核酸アナログにおいても薬剤の用量依存的に細胞内のHBV複製中間体量の減少が確認された。また、同様の検討を、ヒト肝細胞キメラマウ

スを用いて行ったところ、いずれの薬剤に対しても良好な抗ウイルス効果が確認され、4週間投与によるHBV DNAの減少量は、ラミブジンで-3.0 Log copies/ml、アデホビルで-1.7 Log copies/ml、エンテカビルで-4.2 Log copies/ml、テノホビルで-3.6 Log copies/ml

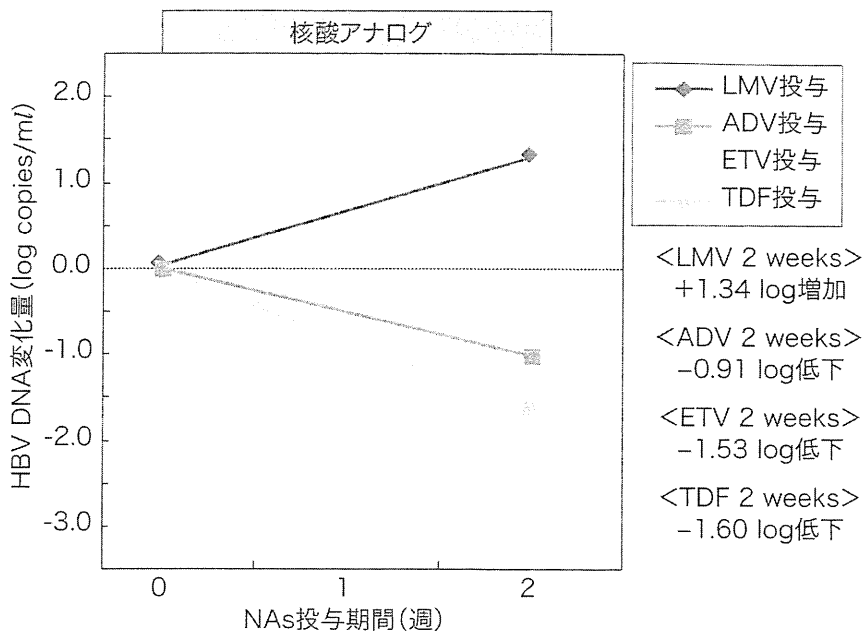


図8 rtL180M/rtM204V株のヒト肝細胞キメラマウスへの感染と核酸アナログ投与によるマウス血中HBV DNAの変化
rtL180M/rtM204V株に対して、ラミブジンによる抗ウイルス効果は確認できなかったが、そのほかの核酸アナログについては、抗ウイルス効果が確認された。

だった(図6)。

一方、ラミブジン耐性株であるrtL180M/rtM204V変異株を用いた検討では、*in vitro*, *in vivo*いずれにおいてもラミブジンによる抗ウイルス効果は認められなかった(図7, 図8)。しかしながら、ラミブジン以外の核酸アナログ製剤では、良好な抗ウイルス効果が確認され、*in vivo*の検討において、核酸アナログの2週間投与により、マウス血中のHBV DNAは、アデホビルで-0.9 Log copies/ml, エンテカビルで-1.5 Log copies/ml, テノホビルで-1.6 Log copies/ml低下した。これらの結果から、同耐性株がアデホビル, エンテカビル, テノホビルに対する感受性は保持していることが示され、現在の臨床的なデータを良好に反映しているものと考えられた。

6 多剤耐性株に対する核酸アナログ感受性の検討

B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療

が開始されて10年以上が経過した現在、治療の長期化に伴い、複数の核酸アナログに対して耐性を示すような多剤耐性株の出現が問題となっている。臨床現場において、ラミブジンに耐性を示す症例には、ラミブジンとアデホビルの併用療法が行われているが、これら両薬剤に対して耐性を示す多剤耐性株が出現した症例の報告がある^{8,12,16}。また、近年では、耐性株出現の頻度が非常に低いエンテカビルが第一選択となっているが、同薬剤の長期投与例やラミブジンからの切替例の中には、ラミブジンにもエンテカビルにも耐性を示すrtL180M/rtS202G/rtM204V株の出現がしばしば散見される^{17,18}。現在、このような複数の核酸アナログ製剤に対して耐性を示すような症例への対策のひとつとしてテノホビル投与の治療が進行中である。そこで、これら多剤耐性株を作製し、*in vitro*, *in vivo*におけるテノホビルの感受性について検討を行った。ラミブジン/アデホビル耐性

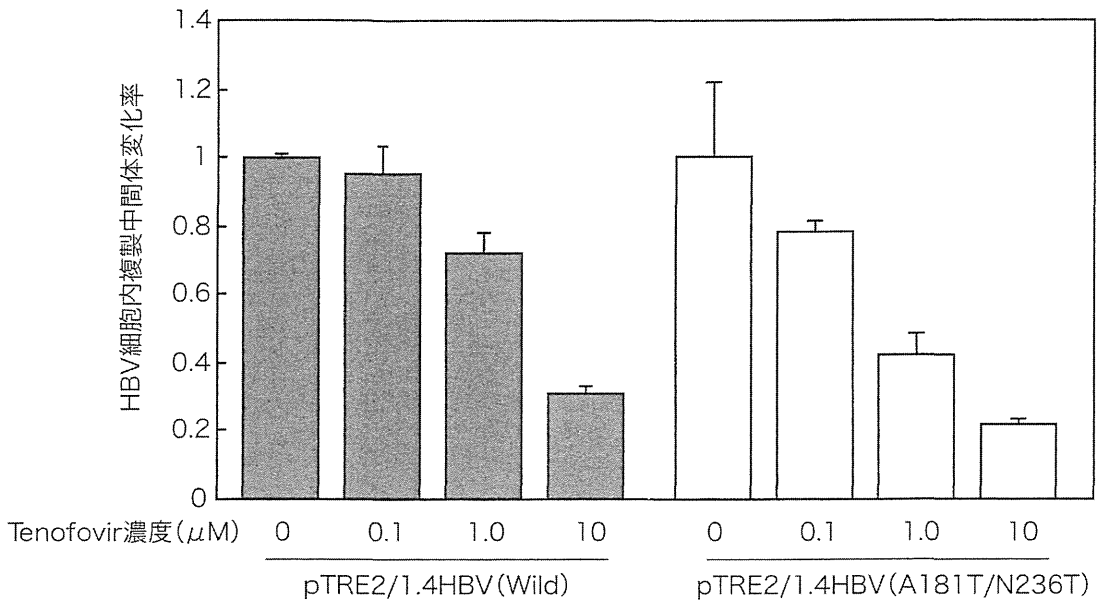


図9 LMV/ADV耐性株(rtA181T/N236T株)に対するTDFの抗ウイルス効果(*in vitro*)
 rtA181T/N236T株の細胞内複製中間体量は、TDFの濃度依存的に減少し、その減少の程度は野生株とほぼ同等だった。

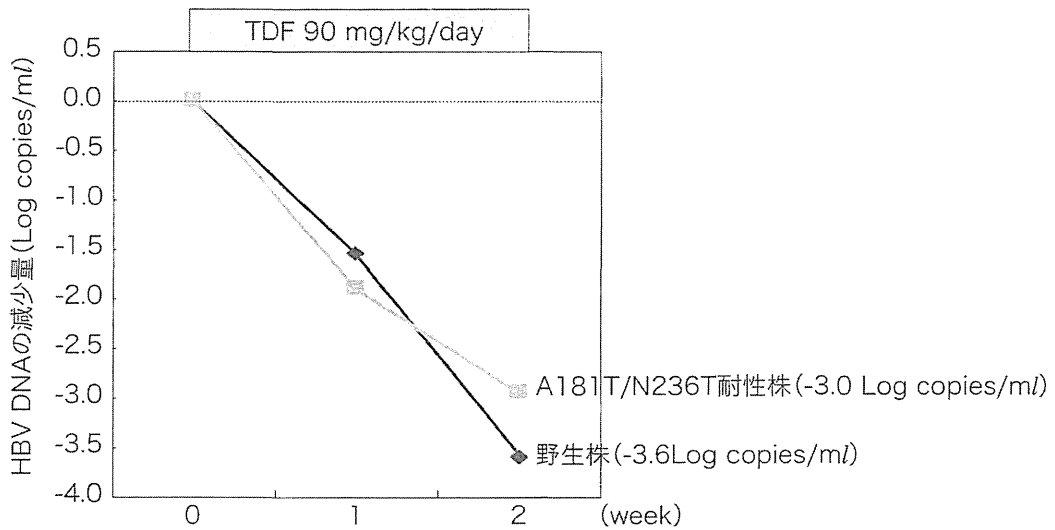


図10 A181T/N236T株と野生株のテノホビル感受性の比較
 いずれの株もテノホビル投与により、速やかにマウス血中のHBV DNAは低下。その低下率もほぼ同等であった。

株(rtA181T/rtN236T株)を用いた*in vitro*の検討では、テノホビルの濃度依存的にHBV細胞内複製中間体の減少が認められ、その減少率も野生株とほぼ同程度であることが確認された(図9)。さらに、同耐性株について*in vivo*にて検討を行ったところ、2週間のテノホビル投与により-3.0 Log copies/mlの

低下が認められ、野生株と比較したうえでもほぼ同程度の感受性と考えられた(-3.0 Log copies/ml vs -3.6 Log copies/ml, 図10)。また、ラミブジン/エンテカビル耐性株であるrtL180M/rtS202G/rtM204V株による検討でも、*in vitro*において、野生株と同程度の抗ウイルス効果を認めた(図11)。以上の結果

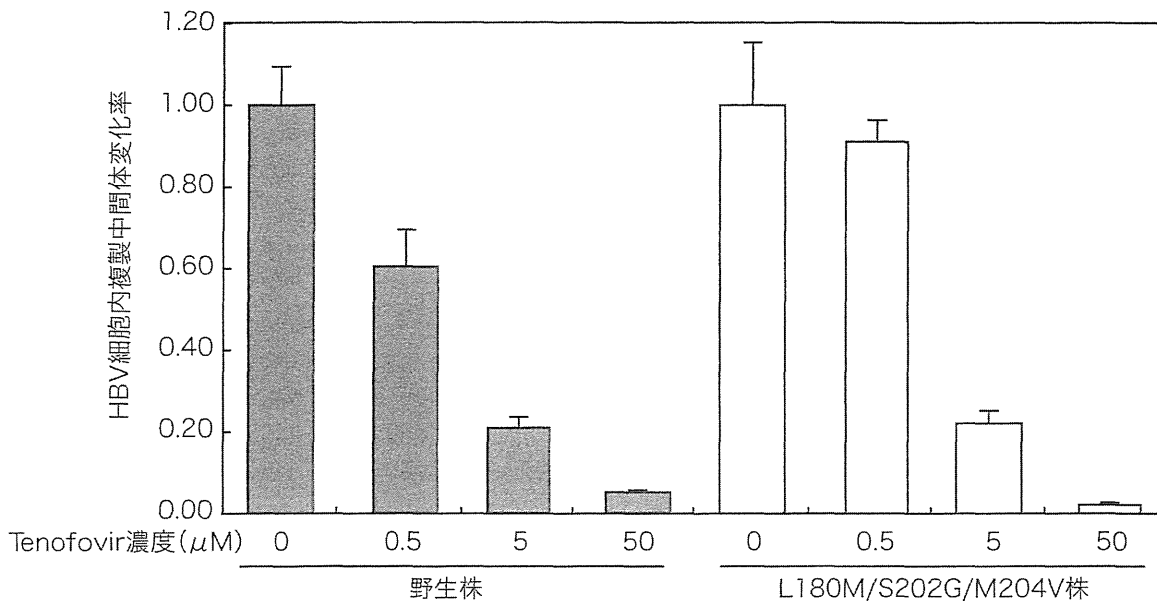


図11 LMV/ETV耐性株に対するTDFの抗ウイルス効果の検討(*in vitro*)

rt L180M/S202G/M204V株の細胞内複製中間体量は、TDFの濃度依存的に減少し、TDF 5 μM以上では野生株とほぼ同等だった。

から、ラミブジン/アデホビル耐性株、ラミブジン/エンテカビル耐性株といった多剤耐性株に対してテノホビルが有効である可能性が示された。

7 *In vitro, in vivo*のHBV感染・複製モデルを用いた薬効評価と臨床への応用

これまで述べてきたように、当研究室で構築した*in vitro, in vivo*のHBV感染・複製モデルは、臨床現場における各種核酸アナログ製剤の抗ウイルス効果を非常によく反映している薬効評価系と考えられる。これまで、当研究室では、この評価系を用いて新たな薬剤耐性変異の同定や核酸アナログ治療効果不良例におけるHBVの薬剤感受性を評価してきた^{6,7)}。現在、HBVに対して強力な抗ウイルス効果を示す新たな核酸アナログ製剤として、テノホビルの治験が進行中であるが、本稿で示したように、テノホビルは、ラミブジン/アデホビル耐性株やラミブ

ジン/エンテカビル耐性株といった多剤耐性株に対しても有効である可能性が高い。海外での使用報告によると、テノホビル初回治療例における耐性株の出現率は非常に低いと考えられることから、保険適応となれば、エンテカビルと同様、広く使用されることが予想される^{19~21)}。しかしながら、海外ではすでにテノホビル耐性変異株の報告もされており^{22,23)}、今後、本邦でも使用例の増加とともに、テノホビル単剤の耐性のみならず、核酸アナログ3剤、4剤に対して耐性を示す多剤耐性株の出現が懸念される。B型慢性肝炎治療において核酸アナログ製剤は欠かせない治療薬となった現在、耐性株に対する治療法の構築だけでなく、耐性株出現を回避できるような治療法の工夫も重要な課題と考えられる。

文 献

1) van Bömmel F, Wünsche T, Mauss S et al : Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology* 40 : 1421-1425, 2004

- 2) Yoo BC, Kim JH, Kim TH et al : Clevudine is highly efficacious in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B with durable off-therapy viral suppression. *Hepatology* 46 : 1041–1048, 2007
- 3) Yoo BC, Kim JH, Chung YH et al : Twenty-four-week clevudine therapy showed potent and sustained antiviral activity in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 45 : 1172–1178, 2007
- 4) Lai CL, Gane E, Liaw YF et al : Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 357 : 2576–2588, 2007
- 5) Lok AS, Zoulim F, Locarnini S et al : Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 46 : 254–265, 2007
- 6) Yatsuji H, Hiraga N, Mori N et al : Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. *J Med Virol* 79 : 1811–1817, 2007
- 7) Yatsuji H, Noguchi C, Hiraga N et al : Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif. *Antimicrob Agents Chemother* 50 : 3867–3874, 2006
- 8) Zoulim F, Locarnini S : Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 137 : 1593–1608, 2009
- 9) Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H et al : Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 42 : 1046–1054, 2005
- 10) Das K, Xiong X, Yang H et al : Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and emtricitabine (FTC) . *J Virol* 75 : 4771–4779, 2001
- 11) Jardi R, Buti M, Rodriguez-Frias F et al : Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants. *J Virol Methods* 83 : 181–187, 1999
- 12) Yatsuji H, Suzuki F, Sezaki H et al : Low risk of adefovir resistance in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir plus lamivudine combination therapy: two-year follow-up. *J Hepatol* 48 : 923–931, 2008
- 13) Brown JJ, Parashar B, Moshage H et al : A long-term hepatitis B viremia model generated by transplanting nontumorigenic immortalized human hepatocytes in Rag-2-deficient mice. *Hepatology* 31 : 173–181, 2000
- 14) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF et al : Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7 : 927–933, 2001
- 15) Tateno C, Yoshizane Y, Saito N et al : Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 165 : 901–912, 2004
- 16) Perrillo R, Hann HW, Mutimer D et al : Adefovir dipivoxil added to ongoing lamivudine in chronic hepatitis B with YMDD mutant hepatitis B virus. *Gastroenterology* 126 : 81–90, 2004
- 17) Tenney DJ, Levine SM, Rose RE et al : Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 48 : 3498–3507, 2004
- 18) Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ et al : Two-year assessment of entecavir resistance in Lamivudine-refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance substitutions present. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:902-11.
- 19) Murray KF, Szenborn L, Wysocki J et al : Randomized, placebo-controlled trial of tenofovir disoproxil fumarate in adolescents with chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2012
- 20) Pan CQ, Hu KQ, Yu AS et al : Response to tenofovir monotherapy in chronic hepatitis B patients with prior suboptimal response to entecavir. *J Viral Hepat* 19 : 213–219, 2012
- 21) Singal AK, Fontana RJ : Meta-analysis: oral anti-viral agents in adults with decompensated hepatitis B virus cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 35 : 674–689, 2012
- 22) Delaney WE 4th, Ray AS, Yang H et al : Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 50 : 2471–2477, 2006
- 23) Sheldon J, Camino N, Rodés B et al : Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antivir Ther* 10 : 727–734, 2005

特集II B型肝炎の抗ウイルス療法の進歩と耐性

HBV RT領域変異株におけるテノホビルの抗ウイルス効果の検討*

柘植 雅貴**
平賀 伸彦**
茶山 一彰**

Key Words : hepatitis B virus (HBV), human hepatocyte chimeric mouse, nucleotide analogue, drug resistant, tenofovir

はじめに

2000年以降, B型慢性肝炎に対する治療薬としてラミブジン(ゼフィックス®, LMV), アデフォビル(ヘプセラ, ADV), エンテカビル(バラクルード®, ETV)といった核酸アナログ製剤が保険適応となり, B型慢性肝炎治療の中心的薬剤となっている. 核酸アナログ製剤は, B型肝炎ウイルス(HBV)の増殖過程において, ウイルスポリメラーゼに取り込まれ, chain terminatorとしてマイナス鎖合成時の逆転写反応やプラス鎖合成時の伸長反応を阻害することで, 強力な抗ウイルス効果を発揮する. しかしながら, 強力な抗ウイルス効果の反面, 核酸アナログ治療による感染肝細胞からHBV完全排除はきわめて困難であり, 多くの症例で, 数年に及ぶ核酸アナログ治療が行われているのが現状である. その結果, 一部の症例では, HBVポリメラーゼ遺伝子RT領域のアミノ酸変異が生じ, 薬剤耐性を獲得したHBVが増殖することによってviral breakthroughやbreakthrough hepatitisを発症しており, 薬剤耐性HBVに対する治療法の確立が大きな課題となっている^{1)~4)}.

当研究室では, *in vitro*および*in vivo*におけるHBV複製・感染モデルを確立し, ポリメラーゼ領域の変異に伴うHBVに対する各種核酸アナログ製剤の抗ウイルス効果を評価し, 報告してきた²⁾³⁾⁵⁾. 本稿では, その*in vitro*および*in vivo*の薬効評価系を用いて, ポリメラーゼ領域の変異株に対するテノホビル(TDF)の抗ウイルス効果を評価したので報告する.

In vitro HBV複製系を用いた薬効評価系の構築

B型慢性肝炎症例に対して核酸アナログ製剤を長期間使用すると, HBVポリメラーゼ遺伝子のRT領域で生じたアミノ酸変異に伴い, HBVは薬剤耐性を獲得する. 特にRT領域にあるYMDD motif(RT領域203~206番アミノ酸)のメチオニン(M)がバリン(V)やイソロイシン(I)へと変異すると, 高度なLMV耐性を獲得する⁶⁾⁷⁾. そこで, さまざまな薬剤耐性変異について解析するため, HBV感染患者の血清からHBVゲノムを抽出し, 1.4倍長のHBVゲノムをベクターに挿入したHBV発現プラスミド(野生株)を作製した. さらに, これらのプラスミドのRT領域にHBVの薬剤耐性変異を加え, 薬剤耐性HBV発現プラスミドを作製した. 作製したHBVクローンは, 図1に示すように, 野生株に加え, LMV耐性変異であるrtL180M/rtM204V変異を加えたrtL180M/rtM204V株, LMV/ADV耐性

* Anti-viral effects of tenofovir for HBV mutants.

** Masataka TSUGE, M.D., Ph.D., Nobuhiko HIRAGA, M.D., Ph.D. & Kazuaki CHAYAMA, M.D., Ph.D.: 広島大学病院消化器・代謝内科(〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3); Department of Medicine and Molecular Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima 734-8551, JAPAN

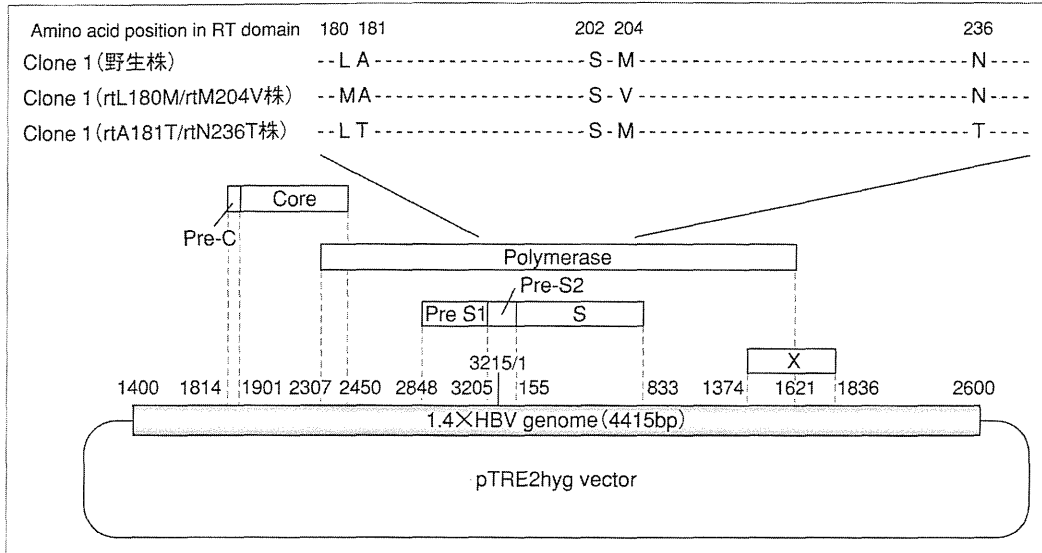


図1 本検討に使用したHBV発現プラスミドの構造と薬剤耐性変異導入部位

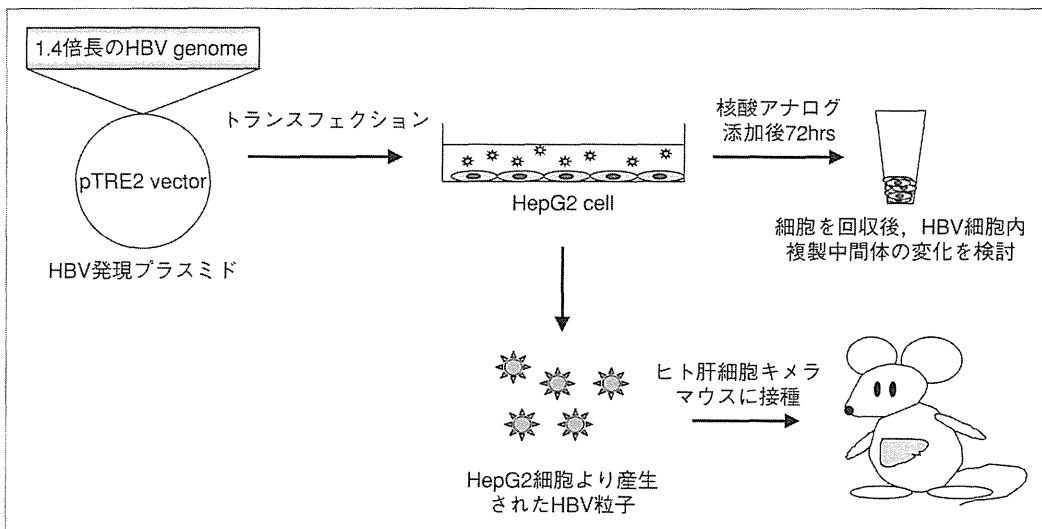


図2 本研究の流れ

HBV感染患者血清をもとに作製したHBV発現プラスミドをHepG2細胞にトランスフェクション。24時間後より、培養上清中に核酸アナログを添加し、72時間後に細胞を回収。細胞内のHBV複製中間体を定量し、抗ウイルス効果を検討 (*in vitro*)。また、HBV発現プラスミドをトランスフェクションしたHepG2細胞から産生されたHBV粒子を回収し、ヒト肝細胞キメラマウスの尾静脈より接種。HBV感染が成立後、マウスに核酸アナログを経口投与し、マウス血清中のHBV DNAの変化を解析し、核酸アナログの抗ウイルス効果を検討 (*in vivo*)。

rtA181T/rtN236T変異を加えたrtA181T/rtN236T株の3種類である。これらのプラスミドをHepG2細胞にトランスフェクションし、その後、培養上清中に核酸アナログを添加。72時間後に細胞を回収し、細胞内複製中間体量を測定することによっ

て、*in vitro*でのHBVクローンの核酸アナログの感受性を評価した(図2)。

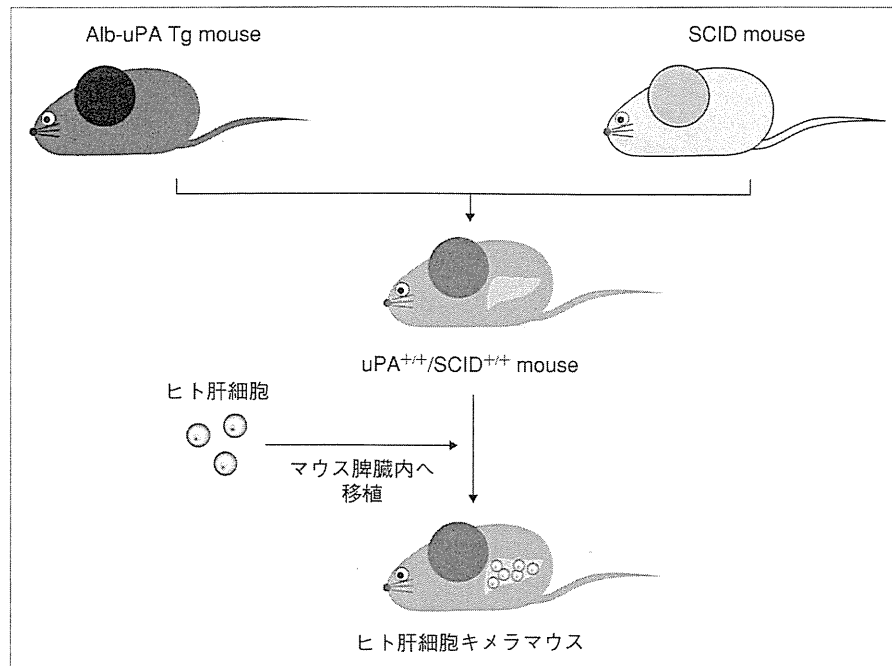


図3 ヒト肝細胞キメラマウスの構築

Alb-uPAトランスジェニックマウスとSCIDマウスを交配させ、uPA^{+/+}/SCID^{+/+}マウスを作製。同マウスに対し、経脾的にヒト肝細胞を移植。ヒト肝細胞は、マウス肝臓内で生着し、ヒト肝細胞キメラマウスが作製される。(文献¹⁰⁾より引用改変)

In vivo HBV感染・複製モデルを用いた薬効評価系の構築

HBVは、マウスやラットといった小動物には感染せず、ヒトやチンパンジーといった特定の動物のみに感染する。そのため、*in vivo*におけるHBV研究は、チンパンジーを用いて行われてきたが、チンパンジーはワシントン条約で保護されていること、飼育費用は高額で、飼育施設の確保も困難であることから、十分な研究ができなかった。近年、ヒト肝細胞をマウスに移植することによって、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞へと置換されたヒト肝細胞キメラマウスが開発され⁸⁾⁹⁾、本学でも、吉里らの研究により、uPA-SCIDマウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスの作製が可能となった¹⁰⁾。uPA-SCIDマウスは、アルブミン(Alb)プロモーター下にurokinase-type plasminogen activator(uPA)を遺伝子導入したAlb-uPA Tgマウスと重症免疫不全を呈するsevere combined immune deficient(SCID)マウスを交配

させ、作製されたマウスであり、生後uPAが肝細胞内で高発現することによりマウスの肝細胞は壊死に陥り、肝不全を呈する。このuPA-SCIDマウスに、ヒト肝細胞を経脾的に移植することにより、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスが作製される(図3)。

本マウスの尾静脈よりHBV感染患者血清を接種すると、接種後2週目よりマウス血清中のHBV DNAは検出可能となり、その後徐々に上昇し、8~10log copies/ml程度に達し、24週間以上感染は持続する(図4)。このHBV持続感染マウスにLMVを経口投与すると、マウス血清中のHBV DNAは速やかに低下することから、HBVが持続感染したヒト肝細胞キメラマウスを用いて薬効評価が可能であることが示された⁵⁾。

野生株に対するTDFの抗ウイルス効果の検討

はじめに、各種核酸アナログの抗ウイルス効果を比較するため、HBV野生株であるClone 1(野

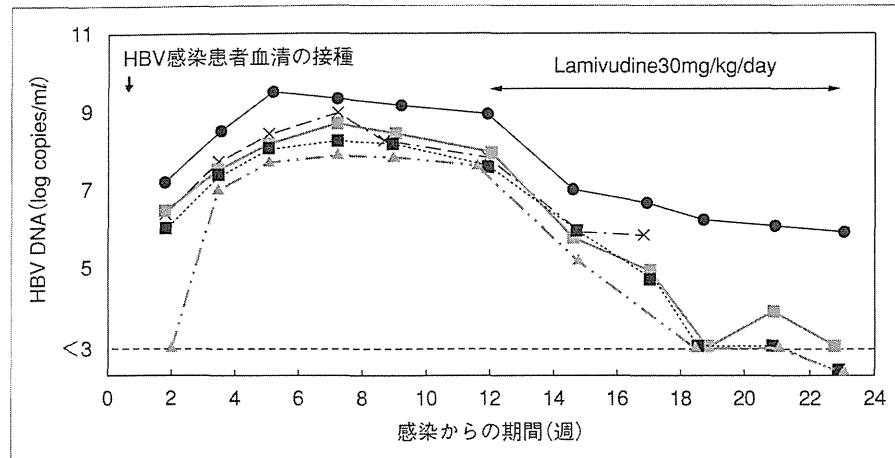


図4 HBV持続感染キメラマウスの作製とLMVによる抗ウイルス効果

ヒト肝細胞キメラマウスにHBV感染患者血清を接種。マウス血清中のHBV DNAは徐々に上昇し、8~10log copies/mlに達した。このマウスに対し、感染12週目よりLMVを経口投与したところ、マウス血清HBV DNAは減少し、LMVの抗ウイルス効果が確認された。(文献⁵⁾より引用改変)

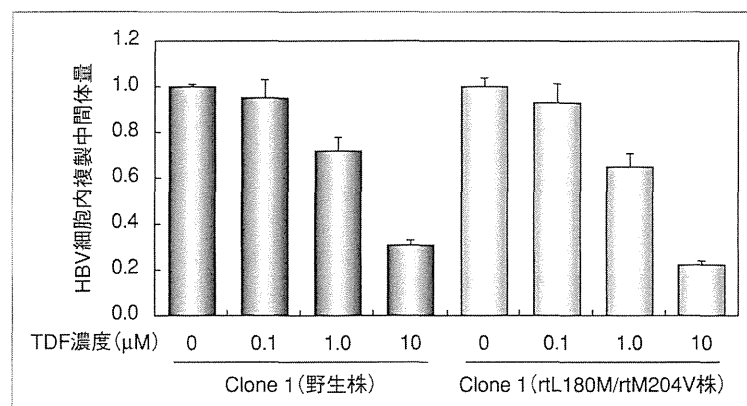


図5 *In vitro*におけるTDFの抗ウイルス効果の検討(野生株 vs. LMV耐性株)

*In vitro*のHBV複製モデルを用いて、TDF濃度の変化に伴うHBV細胞内複製中間体量の変化について検討。いずれのクローンにおいても複製中間体はTDFの濃度依存的に低下し、その低下の程度は、野生株、LMV耐性株いずれにおいてもほぼ同程度であった。

生株)を用いて、*in vitro*での検討を行った。野生株のHBV発現プラスミドをHepG2細胞にトランスフェクションし、24時間後より培養上清中に核酸アナログを添加し、添加72時間後の細胞内の複製中間体量の変化をreal time PCR法を用いて検討した。その結果、図5に示すように、TDFの濃度依存的にHBV細胞内複製中間体量は減少することが確認された。そこで、*in vitro*における結果を確認するため、培養上清より産生させたHBV粒子(野生株)をヒト肝細胞キメラマウス

に接種し、*in vivo*での抗ウイルス効果についても検討した。使用した3頭いずれにおいても、マウス血中のHBV DNA量はTDF投与により速やかに低下し、4週間で平均3.6logの低下を認めた。その他3種類の核酸アナログ製剤を使用した場合と比較すると、LMV投与では4週間で3.0log、ADVでは1.7log、ETVでは4.2logの低下であったことから、TDFの抗ウイルス効果はほぼ同等であるものと考えられた(図6)。これらの結果から、TDFは核酸アナログ初回投与例において、

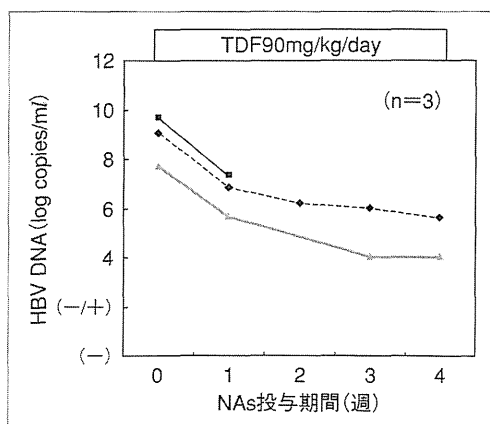


図6 *In vivo*における野生株に対するTDFの抗ウイルス効果の検討

野生株の感染したヒト肝細胞キメラマウスに対してTDF投与し、マウス血清HBV DNAの変化を検討。HBV DNAはTDF投与により、速やかに低下し、4週間で平均3.6log copies/mlの低下を認めた。

臨床的にも有効である可能性が示された。

LMV耐性株に対する TDFの抗ウイルス効果の検討

B型慢性肝炎症例に対し、LMV長期投与を行うと、投与1年で約20%、2年で30~40%の患者に耐性ウイルスが出現し、これらの耐性ウイルス出現に伴うbreak through hepatitisを起こすことが知られている。本検討では、このLMV耐性変異として頻度が高いrtL180M/rtM204V株を作製し、*in vitro*および*in vivo*の検討を行った。rtL180M/rtM204V株のプラスミドをHepG2細胞にトランスフェクションし、TDFによる抗ウイルス効果を検討したところ、野生株と同様、TDFの濃度依存的な抗ウイルス効果が確認された。そこで、野生株とのTDF感受性を比較すると、各濃度におけるHBV細胞内複製中間体の変化率はほぼ同程度であり、LMV耐性株に対して、野生株とほぼ同等の抗ウイルス効果が期待できるものと考えられた(図5)。そこで、野生株同様、*in vitro*において作製したLMV耐性HBV粒子をヒト肝細胞キメラマウスの尾静脈より接種し、LMV耐性HBV持続感染マウスを作製し、LMVおよびTDFの経口投与を行った。その結果、2週間のTDF投与により、マウス血中のHBV DNA量は1.6logの低下を認めたが、LMV投与ではまった

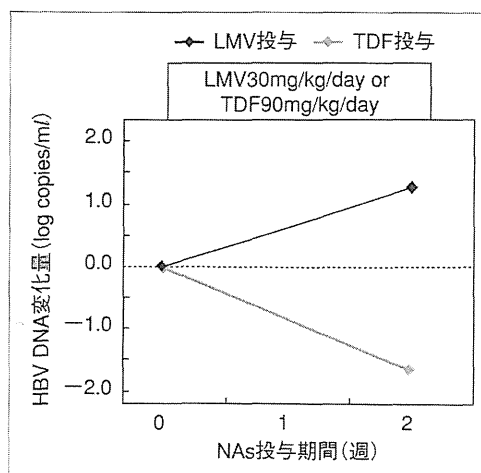


図7 *In vivo*におけるLMV耐性株に対するTDFの抗ウイルス効果の検討

LMV耐性変異をもつrtL180M/rtM204V株を感染させたヒト肝細胞キメラマウスに対してTDF投与し、マウス血清HBV DNAの変化を検討。HBV DNAはTDF投与により、2週間で1.6log copies/mlの低下を認めた。

くHBV DNAの低下は認められなかった(図7)。

LMV/ADV耐性株を用いた 抗ウイルス効果の検討

現在、B型慢性肝炎患者において、前述の如く、LMV耐性を認めた症例に対してはLMVとADVの併用療法が行われている。本邦では、ADVはLMV耐性症例に対する対応策として開発されたことから、現在もLMV耐性例に対してLMVとの併用療法が行われていることが多い。同治療法は、ADV単独投与に比べ、耐性獲得の頻度が低いとされているものの、長期投与例では、LMV単独投与例と同様に、LMV、ADVのいずれにも耐性を示す多剤耐性変異株が出現することがわかってきた¹¹⁾¹²⁾。そこで、LMV/ADV両剤耐性株として知られるrtA181T/rtN236T株を作製し、同様の検討を行った。LMV/ADV耐性株をトランスフェクションしたHepG2細胞に対し、TDFを添加したところ、TDFの濃度依存的にHBV細胞内複製中間体の減少が確認でき、その減少率は野生株とほぼ同程度であった(図8)。そこで、同ウイルスクローンを用いて同様の検討を*in vivo*において施行した。その結果、TDF投与にて2週間で3.0logの低下を認め、野生株と比較

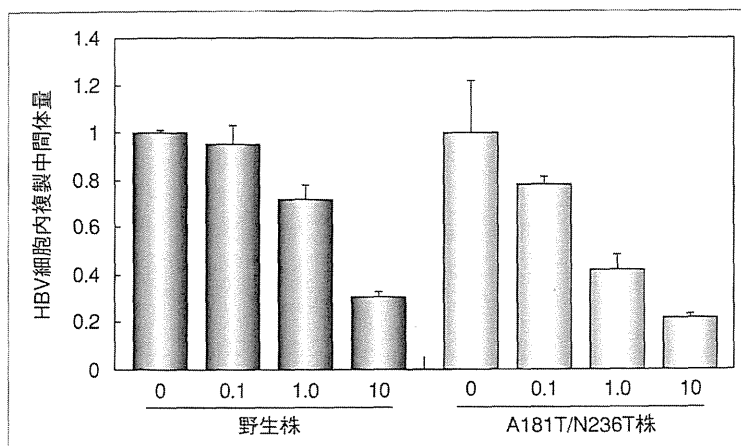


図8 *In vitro*におけるTDFの抗ウイルス効果の検討(野生株 vs. LMV/ADV耐性株)
In vitro HBV複製モデルを用いて、TDFによる野生株およびLMV/ADV耐性株への抗ウイルス効果について検討。いずれのクローンにおいても複製中間体はTDFの濃度依存的に低下し、その低下の程度は、ほぼ同程度であった。

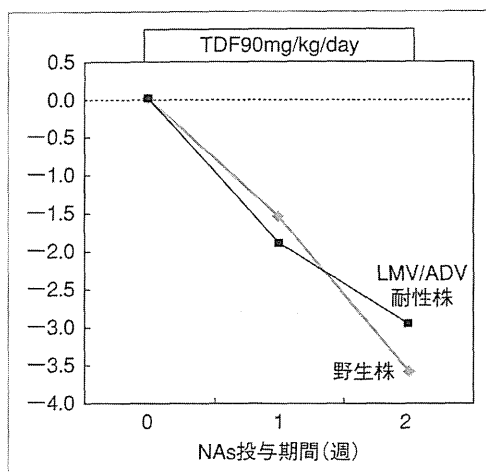


図9 *In vivo*における野生株とLMV/ADV耐性株(A181T/N236T株)のTDF感受性の比較
 野生株およびLMV/ADV耐性株の感染したヒト肝細胞キメラマウスに対してTDF投与。マウス血清HBV DNAの変化を検討したところ、いずれのHBVクローンにおいても速やかなHBV DNAの低下が確認され、その低下量も野生株で-3.6log, LMV/ADV耐性株で-3.0logと同等の低下が認められた。

してもほぼ同程度の感受性であることが示された(図9)。

今後の展望

現在、B型慢性肝炎に対する新たな治療薬と

して、TDFの治療が進行中である。TDFは、海外での使用報告からみると、HBVに対する抗ウイルス効果は非常に強力であり、また耐性株の出現率も低いと考えられる。2000年以降、B型慢性肝炎治療において核酸アナログ製剤は欠かせない治療薬となってきており、各種核酸アナログ製剤を用いることによって、多剤耐性を獲得したHBVの増加が懸念されている。本研究では、野生株に加え、LMV耐性株、LMV/ADV耐性株に対するTDFの抗ウイルス効果について検討を行った。しかしながら、本研究に用いた耐性ウイルスは、これまで報告されている耐性ウイルスのごく一部にすぎず、その他の耐性変異についてもTDFが良好な抗ウイルス効果を示すか否かを検討していく必要がある。今後、TDFが臨床で使用可能となることが予測されることから、TDFに対して耐性を示す変異株についても検討を追加し、核酸アナログを用いた新たな治療戦略を構築していくことが重要であると考えられた。

文献

- 1) Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007; 46: 254.

- 2) Yatsuji H, Hiraga N, Mori N, et al. Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. *J Med Virol* 2007 ; 79 : 1811.
- 3) Yatsuji H, Noguchi C, Hiraga N, et al. Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 ; 50 : 3867.
- 4) Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009 ; 137 : 1593.
- 5) Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 2005 ; 42 : 1046.
- 6) Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998 ; 27 : 1670.
- 7) Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, et al. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996 ; 24 : 714.
- 8) Brown JJ, Parashar B, Moshage H, et al. A long-term hepatitis B viremia model generated by transplanting nontumorigenic immortalized human hepatocytes in Rag-2-deficient mice. *Hepatology* 2000 ; 31 : 173.
- 9) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001 ; 7 : 927.
- 10) Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, et al. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 2004 ; 165 : 901.
- 11) Perrillo R, Hann HW, Mutimer D, et al. Adefovir dipivoxil added to ongoing lamivudine in chronic hepatitis B with YMDD mutant hepatitis B virus. *Gastroenterology* 2004 ; 126 : 81.
- 12) Yatsuji H, Suzuki F, Sezaki H, et al. Low risk of adefovir resistance in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir plus lamivudine combination therapy : two-year follow-up. *J Hepatol* 2008 ; 48 : 923.

* * *

I. B型肝炎

5. B型肝炎の抗ウイルス療法

3) 核酸アナログ

(ラミブジン/アデホビル/エンテカビル/テノホビル)

はじめに

B型慢性肝炎に対する治療の最終目標は、B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus : HBV)の完全排除(HBs抗原の陰性化)ですが、完全排除に至る症例は年率1%以下と稀です。そのため、HBe抗原を陰性化し、ALT(GPT)正常かつHBV DNA低値の状態を保つ(臨床的治癒)ことが重要となります。2000年11月、核酸アナログ製剤であるラミブジン(ゼフィックス®)が登場し、B型慢性肝炎の治療成績は劇的に向上しました。現在では、アデホビル(ヘプセラ®)、エンテカビル(バラクルード®)も保険適用となり、B型慢性肝炎治療の中心となっています。本稿では、核酸アナログ製剤の作用機序、治療効果、治療中の注意点を中心に解説します。

1980年代後半 インターフェロン治療(3~12カ月)



2000年11月 ラミブジン(ゼフィックス®)の保険適用

2004年10月 アデホビル(ヘプセラ®)の保険適用
(ラミブジンとの併用のみ)

2006年 7月 エンテカビル(バラクルード®)の保険適用

2008年 9月 アデホビル単独投与の保険適用

B型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の変遷
(筆者作成)