

- hepatitis C clinical trials. *Clinical Investigation*. 2013;3:1083-93.
- 4) Shimada N, Toyoda H, **Tsubota A**, Ide T, Takaguchi K, Kato K, Kondoh M, Matsuyama K, Kumada T, Sata M. Baseline factors and very early viral response (week 1) for predicting sustained virological response in telaprevir-based triple combination therapy for Japanese genotype 1b chronic hepatitis C patients: a multicenter study. *J Gastroenterol*. 2013. [Epub ahead of print].
- 5) Shimada N, **Tsubota A**, Atsukawa M, Abe H, Ika M, Kato K, Sato Y, Kondo C, Sakamoto C, Tanaka Y, Aizawa Y. α -Fetoprotein is a surrogate marker for predicting treatment failure in telaprevir-based triple combination therapy for genotype 1b chronic hepatitis C Japanese patients with the IL28B minor genotype. *J Med Virol*. 2014;86:461-72.
- 6) **Tsubota A**, Shimada N, Atsukawa M, Abe H, Kato K, Ika M, Matsudaira H, Nagatsuma K, **Matsuura T**, Aizawa Y. Impact of IL28B polymorphisms on 24-week telaprevir-based combination therapy for Asian chronic hepatitis C patients with hepatitis C virus genotype 1b. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29:144-50.
- 7) Aizawa Y, Shimada N, Abe H, Seki N, Aida Y, Ishiguro H, Ika M, Kato K, **Tsubota A**. Serum lipoprotein profiles and response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic HCV genotype 1b infection. *Hepat Mon*. 2013;13:e8988.
- 8) Yoshizawa K, Abe H, Aida Y, Ishiguro H, Ika M, Shimada N, **Tsubota A**, Aizawa Y. Serum apolipoprotein B-100 concentration predicts the virological response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients infected with chronic hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol*. 2013;85: 1180-90.
- 9) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsunami H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M; Japanese AHB Study Group (Appendix; **Tsubota A**). Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology*. 2014;59:89-97.
- 10) Nagatsuma K, Hano H, Murakami K, Shindo D, Matsumoto Y, Mitobe J, Tanaka K, Saito M, Maehashi H, Owada M, Ikegami M, **Tsubota A**, Ohkusa T, Aizawa Y, Takagi I, Tajiri H, **Matsuura T**. Hepatic stellate cells that coexpress LRAT and CRBP-1 partially contribute to portal fibrogenesis in patients with human viral hepatitis. *Liver Int*. 2014;34:243-52.
- 11) Abe H, Aida Y, Ishiguro H, Yoshizawa K, Seki N, Miyazaki T, Itagaki M, Sutoh S, Ika M, Kato K, Shimada N, **Tsubota A**, Aizawa Y. New proposal for response-guided peg-interferon-plus-ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C virus genotype 2 infection. *J Med Virol*. 2013;85:1523-33.

12) Kanda T, Kato K, **Tsubota A**, Takada N, Nishino T, Mikami S, Miyamura T, Maruoka D, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Platelet count and sustained virological response in hepatitis C treatment. World J Hepatol. 2013;5:182-8.

13) Kanda T, Nakamoto S, Nishino T, Takada N, **Tsubota A**, Kato K, Miyamura T, Maruoka D, Wu S, Tanaka T, Arai M, Mikami S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 2 who failed previous interferon therapy. Int J Med Sci. 2013;10:43-9.

14) Itokawa N, Atsukawa M, **Tsubota A**, Kondo C, Hashimoto S, Fukuda T, Matsushita Y, Kidokoro H, Kobayashi T, Narahara Y, Nakatsuka K, Kanazawa H, Iwakiri K, Sakamoto C. Lead-in treatment with interferon- β /ribavirin may modify the early hepatitis C virus dynamics in pegylated interferon alpha-2b/ribavirin combination for chronic hepatitis C patients with the IL28B minor genotype. J Gastroenterol Hepatol. 2013;28:443-9.

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- ①特許取得 なし
- ②実用新案登録 なし
- ③その他 なし

2.学会発表

当該研究内容に関して該当する発表なし

協力研究者 鈴木 哲朗 浜松医科大学 教授
協力研究者 清水 弘樹 産業技術総合研究所 主任研究員

研究要旨

現行とは異なる作用機序の HBV 感染症治療法の開発に資する創薬標的の探索また阻害剤評価系の構築を行う。本年度は、核酸アナログ製剤に抵抗性または治療後に再燃を認めた B 型肝炎患者の血清 5 検体について HBV ゲノム配列を決定し、うち 1 検体に核酸アナログ製剤耐性に重要な 2 変異を認めた。この HBV-J6 株のゲノム 1.25 倍長を有する発現プラスミドを作製し、HuH-7 細胞で HBs 抗原、HBc 抗原の発現を確認した。

A.研究目的

現在、HBV 感染症の対する治療薬として核酸アナログ製剤、インターフェロンなどが使われているが、ウイルス DNA の完全排除は困難なこと、薬剤耐性ウイルスの出現などの問題があり、根治療法は確立されていない。現行の治療薬とは作用機序の異なる新規治療薬の開発が待望されている。そのために、新たな創薬標的の探索また阻害剤評価系の構築が重要である。

本年度は、核酸アナログ製剤治療に耐性を示した B 型肝炎患者の血清検体から HBV ゲノム DNA をクローニングし HBV 発現系の構築を行った。

B.研究方法

B 型肝炎患者血清検体は松浦知和教授より供与された。各血清から QIAamp DNA Mini キットによって DNA 抽出を行った。HBV ゲノム全域に亘ってデザインした 24 種類のシークエンスプライマー (1F~12F, 1R~12R) を組み合わせて全長 HBV 遺伝子の塩基配列を決定した。HBV ゲノム 1.25 倍長を有する発現プラスミド (HBV-J6 複製プラスミド; pUC-HB-J6) は、2 kb HindIII-XbaI 断片、1.2 kb XbaI-BamHI 断片、0.8 kb BamHI-EcoRI 断片を pUC19 に組み込

んで作製した。HBV 発現プラスミドは、

Lipofectamine LTX を利用して HuH-7 細胞へ導入した。ウイルス抗原の発現はウエスタンブロット法で検出した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施した。提供試料、個人情報厳格に管理、保存した。

C.研究結果と D.考察

核酸アナログ製剤に抵抗性または治療後に再燃を認めた B 型肝炎患者 5 名から採取された血清検体 (J1, J5, J6, J7, J8) 中の HBV ゲノム配列を決定した。J1, J6-J8 は遺伝子型 C、J5 は遺伝子型 A であった。HBV ポリメラーゼのアミノ酸配列を基に核酸アナログ製剤 (ラミブジン、エンテカビル、アデフォビル、テルビブジン) に対する感受性を検索したところ、J6 はラミブジン、テルビブジンに対して耐性、エンテカビ

ル、アデフォビルに中度耐性を示す 2 変異 (L526M, M550V) を有することがわかった。また、J6 検体には、PreC 領域にナンセンス変異が認められた。J6 以外の 5 検体には、ポリメラーゼの薬剤耐性変異また PreC のナンセンス変異は検出されなかった。

HBV-J6 ゲノム複製プラスミドを作製し HuH-7 細胞の一過性発現系で HBs 抗原、HBc 抗原の産生を確認した。

HBV 阻害剤のスクリーニング、薬効評価のため、HBV-J6 持続複製細胞株の樹立を行う。細胞株作製用として Episomal 型発現ベクターである pEBMulti プラスミドを用いることとした。これは、EBV の EBNA1, oriP 遺伝子を有し、プラスミドは宿主細胞ゲノムには組み込まれず、細胞分裂と同調して複製し、娘細胞へ分配される。HuH-7 細胞での薬剤選択条件を検討し、ピューロマイシン 6 ug/mL 存在下培養でプラスミド複製細胞が選択可能であることを確認した。HBV-J6 ゲノムを pEBMulti ヘサブクロン化し持続複製細胞株の樹立を進める。

E. 結論

核酸アナログ製剤治療耐性の B 型肝炎患者検体から HBV ゲノム DNA をクローニングし HBV 発現系を構築した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, Suzuki T, Tagawa Y. An in vitro liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication. *J Biosci. Bioeng* (in press).

2. 学会発表

中島謙治、伊藤昌彦、李媛、孫鎖鋒、鈴木哲朗. B型肝炎ウイルス (HBV) プレゲノム RNA 核外移行機序の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月.

H. 知的所得権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

B型肝炎創薬へ向けてのトランスクリプトーム解析による 病態解明と標的同定に関する研究

研究分担者 鈴木治和 独立行政法人理化学研究所 グループディレクター
研究協力者 グォン テ ジュン 独立行政法人理化学研究所 訪問研究員

研究要旨

HBV 産生株である Hep2.2.15 細胞とその親株 HepG2 細胞から、無処置サンプルおよび核酸アナログ体であるラミブジン、アデフォビル、テノフォビル処置してウイルス DNA の産生を抑えたサンプルを作成し、マイクロアレイおよび deepCAGE により詳細な発現解析したが、核酸アナログ体添加で発現変動が著明な遺伝子を見出すことはできなかった。

A.研究目的

本研究では、近年、発展を遂げてきた次世代シーケンサーを駆使した大規模トランスクリプトーム解析法を代表とする高度なトランスクリプトーム解析を用いて、HBV の多様な病態の分子レベルでの解明と、疾患治療のための新たな標的の同定を目指すことを目的とする。B型慢性肝炎は患者間あるいは個人内での臨床経過には、幅広い多様性がある。自然経過での肝炎沈静化から進行性の肝硬変・肝発癌への進展、あるいは突発的/肝炎沈静化状態からの肝炎重症化・劇症化や肝発癌など臨床像が突然激しく変化し、その経過も多様である。これらの臨床症状の多様性は、HBV サブタイプの多様性のみならず、宿主ファクターの多様性が関与すると考えられる。また、B型慢性肝疾患に対する治療は、核酸アナログ体の出現により格段の進歩を遂げ、HBV により引き起こされる諸症状を抑えることは可能であるが、HBV の完全駆除は困難である。B型慢性肝疾患を完治させるためには、再感染サイクルを完全に断ち切り、非感染肝細胞との置き換わりを待つことにより完全排除するか、核内や宿主ゲノム上の HBV DNA 遺伝子を恒久的に不活性化する必要があり、核酸アナログ体に加えて新たな治療薬の標的の同定が望まれる。

B.研究方法

HBV 感染培養細胞である Hep2.2.15 細胞、およびその親細胞であるヒト肝ガン細胞の HepG2 細胞を用いて、無処置サンプルおよび核酸アナログ体であるラミブジン、アデフォビル、テノフォビル処置してウイルスの産生を抑えたサンプルを独立に各3サンプル調製した。処置後、細胞のトータル RNA を miRNAeasy キット(キアゲン)を用いて高純度に精製し、我々が持つ独創的な解析技術である deepCAGE 法およびマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。deepCAGE 法は、キャップがついている mRNA を次世代シーケンサーにより、プロモーターレベルで大規模解析する技術であり、転写物の転写開始点およびその直上流のプロモーター活性(発現量)を解析することができる。deepCAGE 法で得られた CAGE タグシーケンスはコンピューターによりゲノム上にマップした後にクラスタリングにより、転写開始点とプロモーター活性を同定し、統計解析を行った。マイクロアレイデータについてもノーマライズデータを作成した後、統計解析を行った。

(倫理面への配慮)

培養細胞モデルを用いた研究は、倫理面での配慮は必要としない。HBV 患者血液を用いる研究

は、試料採取機関(埼玉医科大学、慈恵医科大学)および解析機関である理化学研究所にて倫理委員会の承認済みである。

C. 研究結果

1. マイクロアレイ解析の結果

核酸アナログ体の添加によって発現が有意に上昇する遺伝子、有意に減少する遺伝子の抽出を試みた。また、Hep2.2.15細胞とHepG2細胞間の発現相違も調べた(表1および2)。その結果、HepG2とHep2.2.15両細胞間には発現量が異なる遺伝子が多く存在すること、核酸アナログ体の添加によって発現が変動する遺伝子は極わずかであることがわかった。核酸アナログ体の中では、ラミブジン投与によって遺伝子の発現変異する遺伝子が上昇115個、下降123個同定されたが、他の2つの核酸アナログ体では発現変動する遺伝子はほとんどなかった。また、HBVが感染していないHepG2細胞では、核酸アナログ体を添加しても有意に発現変動する遺伝子は無かった。

処置>Hep2.2.15無処置

	All	HBV	Non-HBV	Sup. by HBV
HBV-Free	1311	-	-	-
Adefovir	1	1	0	0
Lamivudine	115	71	0	44
Tenofovir	15	11	0	5*

処置<Hep2.2.15無処置

	All	HBV	Non-HBV	Sup. by HBV
HBV-Free	1195	-	-	-
Adefovir	0	0	0	0
Lamivudine	123	80	0	43
Tenofovir	20	10	0	10

表1および2 マイクロアレイ解析により発現変動が確認された遺伝子数 “HBV-free”はHep2.2.15細胞の結果を親細胞であるHepG2の結果との比較を表す。表1(上)は核酸アナログ体を投与したとき発現が有意に上昇する遺伝子数を、表2(下)は有意に減少する遺伝子数を示した(all)。HepG2細胞をHep2.2.15細胞からHBVを完全除去した細胞と見立てて、核酸アナログ体による変動がHep2.2.15に対してHepG2と逆方向にある遺伝子数を“HBV”のカラムに、同じ方向である遺伝子数を“Sup. By HBV”(Suppressed by HBV)に示した。“Non-HBV”は

HepG2細胞に核酸アナログ体を投与したときと発現変動が同じ遺伝子の数を示した(HepG2に核酸アナログを加えても発現変動はほとんど起こらなかったため、値はすべて0を示した。)

2. DeepCAGE解析の結果

マイクロアレイ同様に、核酸アナログ体の添加によって発現が有意に上昇、あるいは減少する転写物の抽出を試みたが、ほとんど観察されないという結果となった(表3および4)。このことから、deepCAGEでもマイクロアレイの結果とほぼ同様の結果が得られたと判定した。なお、HepG2とHep2.2.15細胞間の相違は検出されており、マイクロアレイの結果と共通の遺伝子も有意に検出できている。

処置>Hep2.2.15無処置

	CAGE	BeadArray	Common
HBV-Free	1442	1311	514
Adefovir	0	0	0
Lamivudine	1	115	0
Tenofovir	0	0	0

処置<Hep2.2.15無処置

	CAGE	BeadArray	Common
HBV-Free	1314	1195	502
Adefovir	1	0	0
Lamivudine	4	123	1
Tenofovir	0	0	0

表3および4 DeepCAGEにより発現変動が確認された遺伝子数 “HBV-free”は表1,2と同じ意味を表す。表3

(上)は核酸アナログ体を投与したとき発現が有意に上昇する遺伝子数を、表2(下)は有意に減少する遺伝子数を示した(“CAGE”欄)。比較のためマイクロアレイの結果も載せた(“BeadArray”)。2つの測定プラットフォーム間で共通に見られる遺伝子数は“Common”に示した。

3. HepG2とHep2.2.15の相違解析

核酸アナログ体投与による宿主転写物の発現変動がわずかであるため、HepG2とHep2.2.15の遺伝子発現の相違を対象として、GO(語彙)解析を行った。その結果、Hep2.2.15>HepG2となる遺伝子では、viral transfection cycleやviral transfectionといった語彙が有意に抽出されてきており、少なくともHepG2やHep2.2.15

から得られたデータは信頼性の高いものであるとの示唆が得られた（表5および6）。

HepG2 > Hep2.2.15	
Term	Type
Xenobiotic metabolic process	BP
Small molecule metabolic process	BP
Hormone metabolic process	BP
Oxidoreductase activity	MF
Substrate-specific transporter activity	MF
Cofactor binding	MF
Mitochondrion	CC
Organelle Envelope	CC
Mitochondrion	CC
HepG2 < Hep2.2.15	
Term	Type
Viral infectious cycle	BP
Viral transcription	BP
Translational initiation/elongation/termination	BP
Endopeptidase receptor activity	MF
Structural constituent of ribosome	MF
Sequence-specific DNA binding TF activity	MF
Cytosolic ribosome	CC
Extracellular region	CC
Sodium:potassium-exchanging ATPase complex	CC

表5および6 HepG2とHep2.2.15細胞間で発現量が異なる遺伝子に有意な語彙 表5（上）はHepG2で発現が高い遺伝子での有意な語彙を、表6（下）はHep2.2.15で発現が高い遺伝子での有意な語彙を現す。語彙のタイプは、BP: 生物学的プロセス、MF: 分子機能、CC: 細胞コンポーネント。

4. 臨床サンプルのトランスクリプトーム解析

倫理関連の手続きを終了し、また、何に注目して解析するかを関係者で話し合いをした。まずは小数のサンプルであるが、解析を行う準備を進めている。

D. 考察

マイクロアレイ解析の場合、ラミブジン投与では有意に変動する遺伝子が少し見られたが、他の核酸

アナログ体では変動はほとんど見られなかった。この原因は、これらの薬物が off 効果をほとんど待たない、特異性の非常に高い薬物であることを示しているのであるが、その他の原因としては薬物の HBV に対する影響の相違を反映しているのかも知れない。すなわち、ラミブジン投与では HBV の DNA 量の著明な減少が、臨床での最大投与量の 10 分の 1 でも明瞭に観察されたのに対し、他の核酸アナログ体では最大投与量の 10 分の 1 では HBV の DNA 量の減少が明瞭でなかった（図 1, 2, 3）。

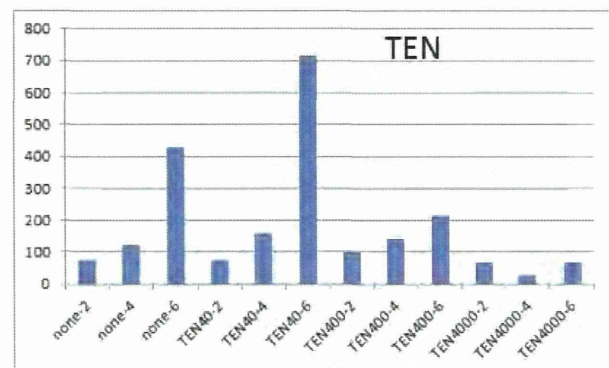
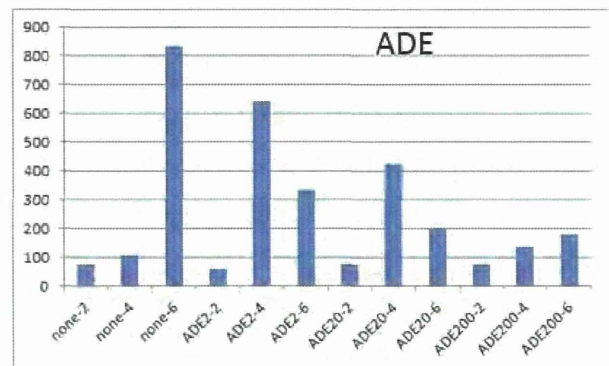
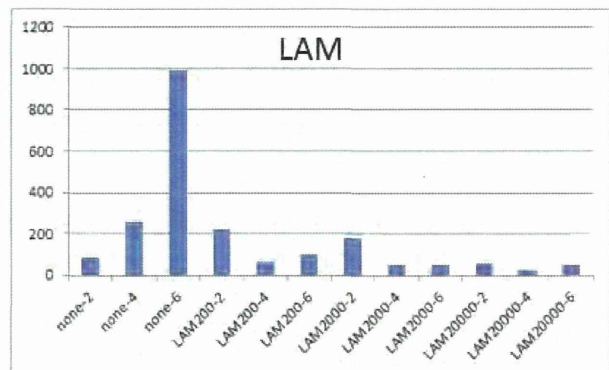


図 1, 2, 3 核酸アナログ体添加による Hep2.2.15 細胞での HBV 由来 DNA 量の変化 DNA 量は特異的プライマーを用いた PCR 法により測定した。図 1, 2, 3 はそれぞれラミブジン、アデフォビル、テノフォビルの結果を表す。None は無処置を表し、臨床で使われる最大濃度の 1/10, 1/1, 10 倍を用いた。薬物名と濃度表示の後の -2, -4, -6 はそれぞれ、2, 4, 6 日目の結果を表す。無処置では日数

を経るごとに HBV DNA 量が増加する。核酸アナログ体はこの増殖を抑制する。

また、ラミブジン投与で変動する遺伝子数について、マイクロアレイと deepCAGE の結果にやや相違があったが、HepG2 と Hep2.2.15 細胞間の発現相違が両手法間で再現良く検出されていることを考慮すると、マイクロアレイで検出されたラミブジンによる発現変動は閾値ぎりぎりの変動であり、deepCAGE ではうまく捕らえることができなかったものと考察した。総じて、核酸アナログ体投与による遺伝子（転写物）の発現変動は量的にも質的にもわずかであることから、現状得られているデータを更に解析しても新しいことが得られる可能性は低いと判断した。

一方、HepG2 および Hep2.2.15 細胞の基礎データは信頼すべきデータが取れていると判断された。現在スタートさせている国立感染症研究所の渡士先生との共同研究（1）HBV DNA 産生量に差がある Hep38 サブクローンのトランスクリプトーム解析、2）NCTP を強発現させた HepG2 サブクローンで、NCTP の発現量は違いが無いが、HBV の感染が成立するサブクローンと成立しないサブクローンのトランスクリプトーム解析、3）HepaRG 細胞の未分化（HBV 感染しない）と分化（HBV 感染する）のトランスクリプトーム解析において比較解析の際に活用することを考えている。更には、慈恵医大・坪田先生が作成するヒト肝臓細胞を移植したヒト化マウスによる HBV 感染サンプルを用いたトランスクリプトーム解析でも活用が期待される。

E. 結論

HepG2 および Hep2.2.15 細胞を用いたモデルで、核酸アナログ体添加により発現変動する宿主遺伝子はほとんど見つからなかった。一方、HepG2 細胞 Hep2.2.15 細胞のしっかりとした基礎データは取ることができた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

8. 論文発表 該当なし

9. 学会発表

A. T. Kwon, A. Tsubota, S. Kojima, T. Matsuura and H. Suzuki. Transcriptomic Analysis of Hepatitis B Virus Infection Using HepG2 Cell Line-Based Models. 日本分子生物学会 2013 年年会、12 月 3-6 日（神戸）

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

①特許取得 該当なし

②実用新案登録 該当なし

③その他 該当なし

網羅的比較定量プロテオミクスを用いた新規標的分子の探索

研究分担者 金井好克 国立大学法人大阪大学 教授
研究協力者 永森收志 国立大学法人大阪大学 准教授

研究要旨

本研究は、抗 B 型肝炎ウイルス（HBV）薬開発のために HBV の感染・増殖機構における新規標的分子の探索を網羅的比較定量プロテオミクス技術によって行うことを目的とする。定量型質量分析計によるタンパク質の同定定量を行い、感染許容細胞・非許容細胞、感染細胞・非感染細胞あるいは感染動物・非感染動物などを比較し、これらの試料において発現量が異なるタンパク質を特定することで、新規標的分子候補を絞り込む。本年度は前年度までに確立した密度勾配超遠心法による細胞膜、細胞内膜画分の分離プロトコルおよび網羅的比較定量プロテオミクス技術を用いて、ヒト肝細胞癌由来細胞株 FLC-4 において単層培養時と三次元培養時の発現変動解析を、すべての膜画分について行った。その結果、4600 種類以上のタンパク質の同定・比較定量に成功した。さらに HBV エントリーに重要な役割を持つと報告された SLC10A1(NTCP)には、そのタンパク質発現量を定量できる抗体がないが、本年度の研究において質量分析計を用いた定量系の構築に成功した。

A.研究目的

本研究は抗 B 型肝炎ウイルス（HBV）薬開発のために、HBV の感染・増殖機構における新規標的分子の探索を網羅的比較定量プロテオミクス技術によって行うことを目的とした。さらに大規模スクリーニング研究によって見いだされるヒット化合物の作用機序を明らかにするために、シグナルの網羅的解析を可能とする比較定量プロテオミクス解析系の構築を進めた。新規標的分子の探索のためには、他の研究グループと協力し、感染許容細胞・非許容細胞、感染細胞・非感染細胞および感染動物・非感染動物などを用いる。ヒット化合物の作用機序解明についてもスクリーニング班のみではなく、他の研究グループとも密に連携を取り、オミクス解析による情報を統合し、作用機序の全貌解明を目指している。

B.研究方法

感染許容細胞・非許容細胞、感染細胞・非感染細胞あるいは感染動物・非感染動物を比較した網羅的比較定量プロテオミクス技術の確立のため、ヒト肝細胞癌由来 FLC4 細胞を用いて検討した。膜タンパク質の網羅的プロテオミクス法(金井、永森他 特願 2012-37919)に従い、シャーレで単層培

養した FLC4 細胞と三次元培養装置ラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)で培養した FLC4 細胞から、細胞膜に富んだ膜画分を密度勾配遠心法により調整し、さらにペプチド化した。得られたペプチドに対して、質量分析計 Thermo Q Exactive (ベンチップ型四重極 Orbitrap)にナノ LC Michrom Bioresources Advance UHPLC を接続した nano LC-MS/MS システムを用いてショットガンプロテオーム解析を行った。タンパク質配列解析は、解析ソフトウェア Thermo Proteome Discoverer をプラットフォームとし、解析アルゴリズム Matrix Science Mascot によって UniProt データベースを用いて行った。比較定量には、網羅性に優れるペプチドのプレカーサーイオンを利用した non-label semi quantitate method を使用した。同定、比較定量したタンパク質については、Ingenuity Pathway Analysis を用いてネットワーク解析を行った。

また、非感染動物・感染動物サンプルや臨床サンプルを用いた解析を行うため、マウスより摘出した肝臓から粗膜画分を調整し、これを用いて肝プロテオミクス解析系を確立した。さらに、PBX マウスから得られたヒト肝初代培養細胞をもちいた網羅的比較定量プロテオミクス解析を行った。

HBV エントリーに重要な役割を持つと報告された SLC10A1 (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide; NTCP) は、そのタンパク質発現量を定量することが可能な抗体がない。そこで、質量分析計を用いて NTCP を同定・定量する系の構築を試みた。密度勾配超遠心法より粗膜画分を分画し、質量分析を行った。(倫理面への配慮)

実験動物を使用する実験計画は、動物福祉の観点から適切な配慮を行うため、動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年法律第 105 号)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年環境省告示第 88 号)、動物の殺処分方法に関する指針 (平成 19 年環境省告示第 105 号)、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年文部科学省告示第 71 号) 等に基づいて実施した。またすべての動物実験は大阪大学動物実験委員会による承認を経て、「大阪大学動物実験規程」にしたがって行った。ヒト臨床サンプルを使用する実験は、本年度は含まれていない。

C. 研究結果

密度勾配超遠心法による細胞膜、細胞内膜画分の分離プロトコルおよび網羅的比較定量プロテオミクス技術を用いて、ヒト肝細胞癌由来細胞株 FLC-4 においてシャーレでの単層培養時とリアクターによる三次元培養時の発現変動解析を、すべての膜画分について行った。その結果、4600 種類以上のタンパク質の同定・比較定量に成功した。ヒト肝初代培養細胞については細胞膜画分を質量分析し、2000 種類以上のタンパク質の比較定量が可能になった。

質量分析計を用いて SLC10A1(NTCP)を同定・定量するため、FLC-4 細胞、HuH-7 細胞、HepG2 細胞、その他 10 種類以上の細胞株の粗膜画分を解析したが、NTCP が検出されなかった。いくつかの細胞株については、粗膜画分を前述の密度勾配超遠心法による分離プロトコルで分画しても NTCP が検出されなかった。そこで NTCP 安定発現細胞 (HepG2-NTCP-C4 および HuH-7-myc-NTCP) を用いて質量分析を行ったが、粗膜画分からは NTCP が検出されなかった。密度勾配超遠心法より粗膜画分を分画すること

によって、これらの細胞株から NTCP を検出することに成功した。さらに分離プロトコルは解析のスループットをあげるため、分画数を減らし簡易化した方法を開発した。また、絶対定量系構築のため、NTCP 特異的ペプチドの固有の質量と部分質量の組み合わせを設定した。

加えて、前述の NTCP 安定発現細胞を用いた NTCP の [³H]-taurocholic acid (TCA) 輸送機能解析系を構築した。

D. 考察

網羅的比較定量プロテオミクスにより、4600 種類以上のタンパク質の比較定量が可能になったことで、感染・増殖機構における新規標的分子の探索に十分な解析が行えるようになった。また、すでに感染に重要だとされている SLC10A1(NTCP)の定量・機能解析系を構築したことにより、NTCP の感染における詳細な役割を解析することが可能になった。

E. 結論

抗 B 型肝炎ウイルス (HBV) 薬開発のために、HBV の感染・増殖機構における新規標的分子の探索、および大規模スクリーニングによりヒットした化合物の作用機序の解明に用いる網羅的発現変動プロテオミクス技術を確立した。

SLC10A1(NTCP)定量系の確立は HBV のエントリーの詳細を解析する上で、NTCP の蛋白質としての発現量、細胞膜へのトランスロケーションを解析するためのツールとして本法は有用である。同時に確立した NTCP の輸送機能解析法とともに、今後、スクリーニングで見出された HBV エントリー阻害剤の阻害機序の解明に利用する。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

10. 論文発表

1. Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusahara H, Mizokami M, Wakita T.

- Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP. *Hepatology* 2013 Dec 21. doi: 10.1002/hep.26982. [Epub ahead of print]
2. Matsuo H, Ichida K, Takada T, Nakayama A, Nakashima H, Nakamura T, Kawamura Y, Takada Y, Yamamoto K, Inoue H, Oikawa Y, Naito M, Hishida A, Wakai K, Okada C, Shimizu S, Sakiyama M, Chiba T, Ogata H, Niwa K, Hosoyamada M, Mori A, Hamajima N, Suzuki H, Kanai Y, Sakurai Y, Hosoya T, Shimizu T, Shinomiya N. Common dysfunctional variants in ABCG2 are a major cause of early-onset gout. *Sci Rep.* 2013 3:2014
3. Kaira K, Sunose Y, Ohshima Y, Ishioka NS, Arakawa K, Ogawa T, Sunaga N, Shimizu K, Tominaga H, Oriuchi N, Itoh H, Nagamori S, Kanai Y, Yamaguchi A, Segawa A, Ide M, Mori M, Oyama T, Takeyoshi I. Clinical significance of L-type Amino Acid Transporter 1 Expression as a Prognostic marker and Potential of New Targeting Therapy in Biliary Tract Cancer. *BMC Cancer* 2013; 13(1):482
4. Oda A., Yamagata K., Nakagomi S., Uejima H., Wiriyasermkul P., Ohgaki R., Nagamori S., Kanai Y., Tanaka H. Nicotine induces dendritic spine remodeling in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 2013 Oct 1. doi: 10.1111/jnc.12470. [Epub ahead of print]
5. Matsuzaki S., Enomoto T., Serada S., Yoshino K., Nagamori S., Morimoto A., Yohoyama T., Kimura T., Ueda Y., Fujita M., Fujimoto M., Kanai Y., Kimura T., Naka T. Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by copper transporter ATP7A *Int. J. Cancer* 2013 Oct 8. doi: 10.1002/ijc.28526. [Epub ahead of print]
6. Mizuta I, Takafuji K, Ando Y, Satake W, Kanagawa M, Kobayashi K, Nagamori S, Shinohara T, Ito C, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Kanai Y, Murayama S, Nakagawa M, Toda T. YY1 binds to α -synuclein 3'-flanking region SNP and stimulates antisense noncoding RNA expression. *J Hum Genet.* 2013 Sep 12. doi: 10.1038/jhg.2013.90. [Epub ahead of print]
7. Ohshima Y, Hanaoka H, Tominaga H, Kanai Y, Kaira K, Yamaguchi A, Nagamori S, Oriuchi N, Tsushima Y, Endo K, Ishioka NS. Biological evaluation of 3- ^{18}F fluoro- α -methyl-D-tyrosine (D- ^{18}F)FAMT) as a novel amino acid tracer for positron emission tomography. *Ann Nucl Med* 2013; 27:314-24

2.学会発表

1. Nagamori S, Aizaki H, Matsumoto Y, Isozumi N, Wiriyasermkul P, Matsuura T, Kanai Y. Comprehensive and Comparative Proteomics Reveals Alterations of Metabolomics between Monolayer and Three-Dimensional Cell Cultures. HUPO 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013 年 9 月 14-18 日
2. Yoshikatsu Kanai, The role of heterodimeric transporters in cancer cell growth. 37th World Congress of the International Union of Physiological Sciences, Birmingham, UK, 2014 年 7 月 21-26 日
3. Yoshikatsu Kanai, Amino acid transporters and diseases, 第 86 回 日本生化学会大会, 横浜, 2014 年 9 月 11-13 日

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

①特許取得

出願中 名称: 多数回膜貫通膜タンパク質の比較変動解析を可能とする網羅的プロテオミクス技術、出願番号: 特願 2012-37919、出願日: 平成 24 年 2 月 23 日、出願人: 大阪大学、発明者: 金井好克・永森收志他

②実用新案登録

該当無し

③その他

該当無し

B型肝炎創薬に向けた網羅的翻訳後修飾探索研究

研究分担者 堂前 直 独立行政法人理化学研究所 前任技師

研究協力者 坂西 由希子独立行政法人理化学研究所 研究支援パートタイマー

研究要旨

エピゲノム変化をB型肝炎治療創薬のターゲットにするために、タンパク質網羅的翻訳後修飾解析法を開発した。これを用いて、HBV産生細胞のHep2.2.15とその野生型細胞のHepG2をそれぞれ薬剤処理・未処理で比較した。HepG2とくらべ、Hep2.2.15のメチル化は亢進しており大きなエピゲノムの変化がみられた。特定のタンパク質のアセチル化部位・メチル化部位を解析したところ、興味あるタンパク質の修飾が、核酸アナログ剤の処理により変動していた。

A.研究目的

B型肝炎創薬のターゲットをエピゲノム変化に求めるため、新たにタンパク質の網羅的翻訳後修飾解析法を開発を試みた。従来は、リン酸化のように特定のカラムで修飾ペプチドのみを回収し、それを同定していたが、この方法だと修飾ペプチドの増減が分かったとしても、それは、タンパク質の発現の上昇なのか、修飾レベルの増加なのかを調べることができない。我々は、まず全ての消化ペプチドを同定し、その中から修飾ペプチドをピックアップする方法を考案した。修飾・非修飾ペプチドの比較から、タンパク質の発現増なのか、修飾レベルの増加なのかははっきり区別できる。この方法を用いて、B型肝炎治療創薬のターゲットを探索することを目的に研究を行った。

B.研究方法

HBV産生細胞のHep2.2.15とその野生型細胞のHepG2を核酸アナログ剤処理した細胞を慈恵医大の松浦先生より頂いた。昨年度、電気泳動を行い12分画したゲルを消化した。消化物は本課題で設置したナノLC-MS/MS装置Q-Exactive（ThermoFisherScientific社製）で分析しproteome discoverer（同じくThermo）を用いてMASCOT program（matrixscience社）によるデータベース検索を行い同定し、同定されたイオンのピーク面積から定量を行いデータ解析した。翻訳後修飾を含むペプチドをピックアップして解析した。

(倫理面への配慮)

本課題では、すでに学術的価値の定まった細胞のみを利用することにより、倫理的面での配慮に該当しなかった。

C.研究結果

昨年に引き続きHBVをトランスフェクションしたHep2.2.15細胞とその野生型HepG2細胞をそれぞれ、薬剤未処理、3種の抗ウイルス剤（ラミブジン、アデフォビル、テノフォビル）処理の細胞（合わせて8種類）の電気泳動ゲルを12等分して分析した。それぞれ若干異なるが、一断片の分析でおおよそ50,000回のMS/MS解析を行い、10,000程度のペプチドを同定し、類似のタンパク質をグルーピングして1,500タンパク質グループに由来することが判明した。これを1条件の細胞に付き、12回、全体で96回分析を行った。1から12番目のゲル片の分析結果を表1にまとめた。おおよそどの条件の細胞でも6-7万のペプチドが見つかり、6-7千のタンパク質グループに由来していた。この96回の分析全体では12万種類のペプチドを同定できた。この中で、リジンのアセチル化ペプチドは700個程度と少なかったが、リジンのメチル化ペプチドは2100個、アルギニンのメチル化ペプチドは1400個同定できた。

表 1 網羅的な翻訳後修飾解析のためのプロテオミクス解析のまとめ

Run	proteinG	peptides
Hep2.2.15_1-12	6,796	67,067
Hep2.2.15L_1-12	6,466	58,051
Hep2.2.15A_1-12	6,583	64,350
Hep2.2.15T_1-12	6,714	62,620
HepG2_1-12	6,902	67,684
HepG2L_1-12	6,921	67,880
HepG2A_1-12	6,951	68,979
HepG2T_1-12	6,767	62,010
Total	8,199	122,829

アルギニンメチル化ペプチドの量を野生型の HepG2 に 2 種の薬剤処理したものを用いてプロットしたところ、(図 1) 高い相関が見られ、安定して定量分析が来ていることを示している。また、ウイルス産生細胞の Hep2.2.15 と野生型細胞の HepG2 を比較すると、メチル化ペプチドの量の相関が低くなり、一部減少するペプチドもあるが、多くのペプチドピークは増えていることがわかった。

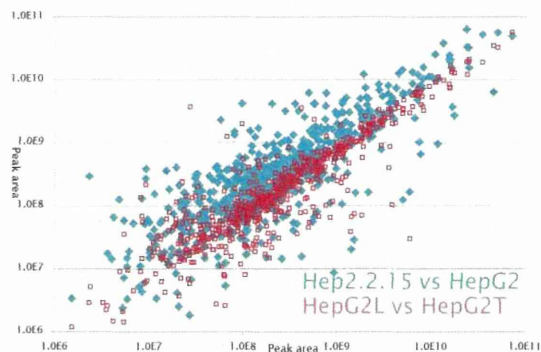


図 1 Arg メチル化ペプチドの定量的比較
赤は HepG2 細胞の 2 種類の核酸アナログ処理細胞を比較したもので、高い相関が見られた。青は HepG2 細胞と Hep2.2.15 細胞を比較したもので、ウイルスがトランスフェクションされ、メチル化が 10 倍程度亢進した。

ウイルスがトランスフェクションされるとメチル化レベルが亢進することが分かった。アセチルでは、データ点が少なく明瞭な結果は出なかった。

修飾ペプチドの量を比較しても実際には、修飾レベルが増えたのか、あるいは、タンパク質の発現が増えたのかはつきり結論付けられない。そこで、変動が大きなペプチドをいくつか分析した。

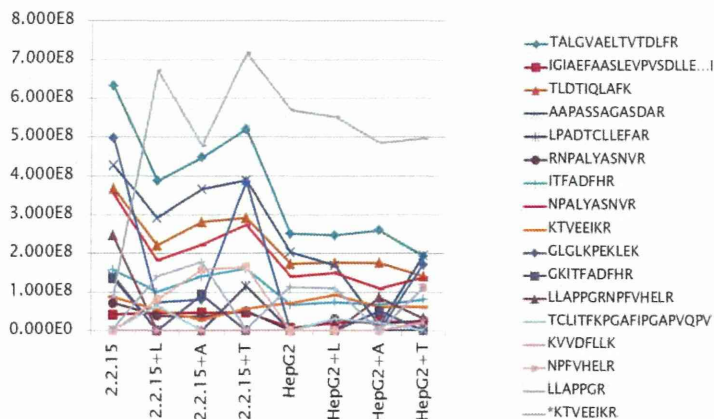


図 2 通常およびアセチル化ペプチドの量の比較
LPAT1 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 1) のアセチル化ペプチド *KTVEEIKR とその他の LPAT1 ペプチドの量の比較を行った結果、薬剤未処理の Hep2.2.15 細胞ではこの部位のアセチル化が少ないが、核酸アナログ剤処理でアセチル化が増えていることがわかった。さらに HepG2 ではアセチル化ペプチドレベルは薬剤処理・未処理と関係なく、一定であるが、LPAT1 の発現が少なく HepG2 が最もアセチル化レベルが高いことが分かった。

LPAT1 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 1) のアセチル化ペプチド(図 2) や HN RNPA1 (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) のメチル化ペプチドでは HepG2 では薬剤処理の影響を受けない。一方、Hep2.2.15 細胞では未処理で修飾が少なかったが、核酸アナログ剤処理で修飾レベルが HepG2 に近くなるまで回復した。このようなタンパク質が今後創薬のターゲットになると考えられる。

また、細胞内のメチル化レベルを検証するために昨年度より開発したアミノ酸分析法をまとめて本年度論文を発表することが出来た。

D. 考察

膨大な網羅的解析データには、まだまだ、情報が隠れていると考えられるが、データ解析する技術が追いついていない。今後は統計処理も含めて

さらに解析を進める必要があると思われる。これらの修飾の増減は、創薬のターゲットになりうる反面、LPAT1のアセチル化のように未報告の部位であると、その意味付けが難しい。修飾特異的な抗体の作成などから、その意味を捜す研究が必要だと思われる。網羅的翻訳後修飾解析 (モディフィコミクス) を創薬のターゲット探索に用いた例はなく、今後の展開に期待される。さらに進んで、HBV感染・非感染ばかりでなく、慢性化・劇症化などのマーカーや創薬のターゲットを探索できる可能性も持つ。今回の実験からHBVトランスフェクション細胞の核酸アナログ剤による特異的な修飾の変化を検出できた。これを利用して新規な治療薬の効果を調べることも可能になるかもしれない。

E. 結論

既存のターゲットモディフィコミクス (標的特異的網羅的修飾解析法) からノンターゲットモディフィコミクスを開発することで、それぞれの細胞の状態での修飾の増減を見ることが出来るようになった。この系を利用して特にHBVトランスフェクション細胞であるHep2.2.15とその野生株細胞であるHepG2との比較から、HBVトランスフェクションによりメチル化が亢進していることが分かった。また、いくつかの修飾ペプチドの中で、LPAT1のアセチル化ペプチドの解析から、HepG2では核酸アナログ処理によりアセチル化レベルが変化しないがHep2.2.15では核酸アナログ処理・未処理でアセチル化レベルが増減することが分かった。

F.健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

11. 論文発表

- (1) Masuda, A. and Dohmae, N.:
Examination of an absolute quantity of less than a hundred nanograms of proteins by amino acid analysis. *Anal Bioanal Chem* **405**, 8073-8081 (2013) (査読有)

2. 学会発表

- (1) 益田 晶子、堂前 直、超高感度アミノ酸分析法と2次元HPLCによる翻訳後修飾の定量解析、新アミノ酸分析研究会、第3回学術講演会、東京、2013年12月2日
- (2) 益田 晶子、堂前 直、アミノ酸分析法によるヒドロキシシリジンの定量、第86回日本生化学会大会、横浜、2013年9月11日～13日
- (3) Naoshi Dohmae, "A Challenge to the Non-target Quantitative Modificome in Human Cell" The First meeting on RIKEN EPIGENETICS in Yokohama Feb 17th, 2014.

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- ①特許取得 該当なし
- ②実用新案登録 該当なし
- ③その他 該当なし

B型肝炎制圧のための創薬研究に向けた臨床検体収集とトランスクリプトーム解析

研究分担者 名越澄子 埼玉医科大学総合医療センター 教授

研究協力者 滝川康裕 岩手医科大学 教授

寺井崇二 山口大学 准教授

清水雅仁 岐阜大学 講師

研究要旨

B型肝炎ウイルス（HBV）を完全に排除、または HBs 抗原を陰性化させることを目的とした創薬に向け、HBV 感染症例 107 例の血液検体と臨床データを収集した。抗ウイルス療法未施行の genotype C・HBV-DNA 量 7.0 Log copy/ml 以上の男性 HBV キャリアにおいて、HBs 抗原量の高値群と低値群のトランスクリプトーム解析を施行中である。

A.研究目的

C型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法は、平成25年末に第2世代のプロテアーゼ阻害薬シメプレビルが保険適用となり、同薬とリバビリン、ペグインターフェロンの3剤併用療法を中心に、多くの患者でC型肝炎ウイルスを完全に排除することが可能となった。しかし、DNAウイルスであるB型肝炎ウイルス（hepatitis B virus: HBV）は、インターフェロンや核酸アナログ製剤により排除することは不可能であり、現時点の最終目標は発癌リスクに関わるとされるHBs抗原の陰性化である。

HBVが肝細胞に感染すると核内に covalently closed circular DNA (cccDNA)として留まるが、HBVのエンベロープに存在するHBs抗原は、このcccDNAから産生され、血中ではHBV-DNAを含むDane粒子のほかに中空粒子、小型球形粒子、管状粒子として存在する。このため、血中HBV-DNA量はHBVの複製に関連するが、HBs抗原量はcccDNAの転写活性を反映するとされている。核酸アナログ製剤は強力的にHBVの複製を抑制することからHBV-DNA量は著減するが、核内のcccDNAは排除できず、血中のHBs抗原が陰性化することはまれである。

また、B型肝炎の自然経過においてもまれにHBs抗原が陰性化するが、そのような症例ではHBs抗原量の年次低下率が非陰性化症例よりも高く、HBs抗原量も低いことが報告されている。

そこで、HBVを完全に排除、あるいはHBs抗原を陰性化させることを目的とした創薬に向け、トランスクリプトーム解析を行う横浜理化学研

究所（鈴木班）、モディフィコーム解析を行う和光理化学研究所（堂前班）、膜プロテオーム解析担当大阪大学（金井班）のオミックス3班と松浦班による解析に使用する目的で、特徴あるB型肝炎患者（HBVキャリア）の血液検体を収集し、トランスクリプトーム解析を開始した。

B.研究方法

（1）参加施設

埼玉医科大学総合医療センター（名越）、東京慈恵会医科大学（本院：松浦、柏病院：坪田）、岩手医科大学（滝川）、山口大学（寺井）、岐阜大学（清水）、東京大学（池田）

（2）症例の選択基準

- 1) インターフェロン、核酸アナログ製剤による抗ウイルス療法を行っていないHBVキャリア
- 2) 抗ウイルス療法をすでに開始しているが、特徴ある臨床所見を有するHBVキャリア（家族内発生でありながら臨床経過が異なる症例、若齢で肝硬変あるいは肝細胞癌を発症した症例など）

（3）症例登録・検体採取・保存

選択基準に従い患者を登録し、血液検体を各施設で採取し、①患者抽出DNA、②トランスクリプトーム解析用EDTA-2Na RNAlator 添加血液、③血漿、④血清、⑤LAP-D測定用ケン酸ナトリウム添加血液を埼玉医科大学総合医療センター研究室にて保存する。

（4）測定項目・臨床データ

1) HBV関連検査

HBs抗原量、HBcr抗原量、HBV-DNA量、HBe抗原・抗体、HBc抗体、genotype

2) 一般血液検査

AST、ALT、TBil、プロトロンビン時間

3) 肝線維化活性化マーカー TGF-β-LAP-D

4) トランスクリプトーム解析

5) HBV-DNA シークエンス解析

6) 臨床データ

調査票により各施設から収集し、データベース作成・管理は埼玉医科大学総合医療センター消化器・肝臓内科で行う

(倫理面への配慮)

血液検体の採取にあたっては、登録患者に対して不利益、危険性およびその対処について十分に説明し、インフォームドコンセントを書面で得て行う。血液検体は各施設で連結可能匿名化し、対応表は各施設の個人情報管理者が管理する。

C.研究結果

(1) 登録症例

登録症例は、107例（男性64例、女性43例）、平均年齢49.1±14.6歳（男性47.0±14.7歳、女性52.4±13.9歳）。内訳は、抗ウイルス療法を行っていないHBVキャリアが69例、治療歴があるHBVキャリアが28例、HBV急性肝炎8例、HBV再活性化2例であった。また、HBVキャリアのgenotypeは、Ae：4例、Ba：1例、Bj：9例、判定不能B：1例、C：68例、判定不能：2例、測定中：5例であった。

(2) genotype CのHBVキャリア症例

抗ウイルス療法の施行歴のないgenotype CのHBVキャリアについて、男女別にHBs抗原量とHBV-DNA量を比較した(図)。

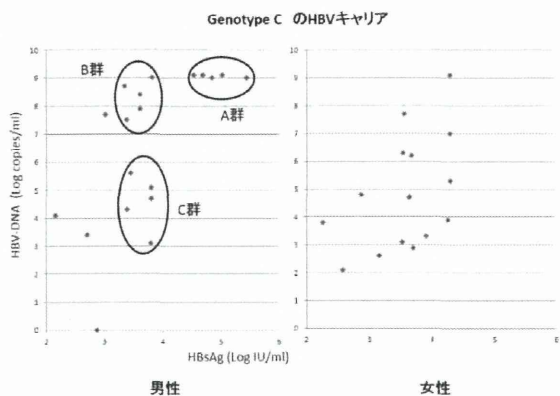
男性19例と女性15例とを比較すると、HBs抗原量が20,000 IU/ml以上の症例は、男性に5例(A群)みられたが、女性には認められなかった。A群は37.8±9.4歳で、全例HBe抗原陽性であった。また、男性ではHBs抗原量が1,000~7,000 IU/mlの症例が、HBV-DNA量7.0 Log copy/ml以上(B群)と6.0 Log copy/ml未満(C群)の2群に分かれた。B群は平均年齢30.2±6.8歳で全例HBe抗原陽性であるのに対して、C群は43.4±12.6歳で全例HBe抗体陽性であった。

A群とB群は、ともにHBe抗原陽性でHBV-DNA量7.0 Log copy/ml以上であるが、HBs抗原量に差がみられることから、cccDNAの転写活性の抑制に寄与する宿主因子を検索する目的で、両群の検体のトランスクリプトーム解析を施行中である。

次に、HBe抗原のセロコンバージョン後の症例の性別と年齢を検討した。男性8例(42%)、女性11例(73%)と女性に多く、男性は30歳代が3例、40歳代1例、50歳代1例、60歳代3例で、女性は30歳代1例、40歳代4例、60歳以上6例であった。60歳以上の女性のHBs抗原量とHBV-DNA量を表に示す。

HBe抗原セロコンバージョン後の高齢女性

症例	年齢(歳)	HBs抗原量 (IU/ml)	HBV-DNA量 (Log copy/ml)	ALT (U/l)
1	63	4,690	6.2	42
2	65	8,170	3.3	26
3	66	3,370	3.1	22
4	67	5,090	2.9	24
5	69	1,450	2.6	22
6	77	385	<2.1	22



症例1は、HBs抗原量が他の症例と同等にもかかわらずHBV-DNA量が高値であり、ALT値は軽度上昇しており、特異な症例と考えられた。

D.考察

トランスクリプトーム解析で、HBVキャリアの病態に関わる宿主因子を探索するためには、ターゲット以外の条件をでき得る限り統一する必要がある。そのため、最も数の多いgenotype Cの男性症例に限り、年齢が近く、HBV-DNA量がほぼ同等でHBs抗原量に明らかな差がある2群

厚生労働科学研究費補助金 (B 型肝炎創薬実用化等研究事業)
分担研究報告書

を選択し、解析に供与した。今後、候補となる宿主因子が認められた場合は、同じ条件の症例を中心に検体収集を進める予定である。

さらに、オミックス班と松浦班による新規治療標的の同定を目的とした HBV 感染(または発現)細胞と非感染(非発現)細胞間の比較オミックス(松浦とオミックス班)および感染動物と非感染動物の比較オミックス(坪田とオミックス班)の解析結果をもとに、オミックス解析に用いる血液検体を選定していく。

自然経過において、HBe 抗原陰性症例では、一般に HBs 抗原と HBV-DNA 量が高値の場合に肝炎が再燃する可能性が高いとされている。表に示した症例 1 は、肝炎の活動性は軽度であるが、他の症例と比較すると HBs 抗原量と HBV-DNA 量との間に乖離があると考えられるので、今後同様の症例を収集し、トランスクリプトーム解析を行う必要がある。

また、HBs 抗原が 2 Log IU/ml または 200 IU/ml 未満の場合、あるいは HBs 抗原低下率が年率 0.3 ~0.5 Log IU/ml の場合に、自然経過で HBs 抗原が消失する可能性が高いといわれている。表の症例 6 は、HBs 抗原が 385 IU/ml と低値であり、今後の HBs 抗原の低下率を観察する必要がある。

E. 結論

今年度は、6 大学 7 施設で 107 症例の登録と血液検体および臨床データの収集を行い、10 検体のトランスクリプトーム解析を施行中である。

次年度は、今年度と同様に登録症例を増やし、HBs 抗原量と HBV-DNA 量に乖離のある症例を中心にトランスクリプトーム解析をさらに進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

① 特許取得

なし

② 実用新案登録

なし

③ その他

なし

B 型肝炎創薬へ向けてのトランスクリプトーム解析による病態解析と標的同定
B 型慢性肝疾患の臨床的特徴と核酸アナログ治療への反応性に関する研究

研究協力者 滝川康裕 岩手医科大学 教授
研究協力者 宮坂昭生 岩手医科大学 特任講師

研究要旨 : B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) キャリアの臨床経過は幅広く多様性があり、B 型慢性肝疾患の治療薬である、核酸アナログ製剤は HBV の増殖を効果的に抑制することはできるが、排除する作用はなく、インターフェロンも増殖能の強い高ウイルス量の HBV を排除するには効果が弱いため、現時点では DNA ウイルスである HBV を完全に駆除することは困難である。そのため、HBV を完全排除する新たな薬剤が望まれている。今回、当科における B 型慢性肝疾患患者の臨床的背景と抗ウイルス療法、特に核酸アナログ製剤の状況について検討を行った。当科における慢性肝疾患の年齢分布は 50 - 60 歳台にピークがあり、10 - 20 歳台の割合は低率であった。また、HBV Genotype の割合は Genotype C、B、A の順で多かった。核酸アナログ製剤の投与により HBs 抗原、HB コア関連抗原の低下や HBV DNA の陰性化が得られるが、中止可能と考えられる症例は少なかった。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) キャリアの臨床経過は、自然経過での肝炎沈静化、進行性の肝硬変・肝発癌への進展、突発的な肝炎重症化・劇症化や肝発癌と臨床像が突然激しく変化し、その経過も多様である。一方、B 型慢性肝疾患の治療薬である、核酸アナログ製剤の出現により格段の進歩を遂げたが、HBV の増殖を抑制することはできるが、排除する作用はない。また、インターフェロンも増殖能の強い高ウイルス量の HBV を排除するには効果が弱いため、現時点では DNA ウイルスである HBV を完全に駆除することは困難である。そのため、HBV の増殖を抑制するだけでなく、完全排除する新たな薬剤あるいは中和抗体 (HBs 抗体) を獲得するための薬剤が望まれている。創薬に向け、HBV の更なる病態解明が必要となる。そこで、当科における B 型慢性肝疾患患者の臨床的背景と抗ウイルス療法について検討を行った。

B. 研究方法

2013 年 1 月から 2013 年 12 月まで当科に通院歴のある B 型慢性肝疾患患者 286 例 (平均年齢 55 歳、男性 148 例、女性 138 例) を対象とし、(1)

臨床的背景、(2) 抗ウイルス療法について検討を行った。ただし、急性肝炎症例、免疫抑制・化学療法中のもの、HBs 抗原陰性・HBV DNA 陰性化したものは除外して解析を行った。また、無症候性キャリア (ASC)、慢性肝炎 (CH)、肝硬変 (LC) については血液検査所見、画像検査、組織検査から判断した。

(倫理面への配慮)

「B 型肝炎創薬へ向けてのトランスクリプトーム解析による病態解析と標的的同定 - 多施設共同研究」については平成 24 年 11 月 1 日に岩手医科大学医学部倫理委員会およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に係わる倫理委員会の承認 (承認番号 H24-142, HG H24-13) を受け、参加患者へは文章による説明を行い、同意書を得ている。

C. 研究結果

(1) 臨床的背景

① 年齢分布 : 10 歳代 1 例 (0.4%)、20 歳代 7 例 (2.4%)、30 歳代 34 例 (11.9%)、40 歳代 50 例 (17.4%)、50 歳代 74 例 (25.8%)、60 歳代 75 例 (26.5%)、70 歳代 37 例 (13.2%)、80 歳代 7 例 (2.4%) であり、50 - 60 歳代にピークがあった。

② 病態 : 無症候性キャリア (ASC) は 179 例で、HBe

抗原陽性 8 例、HBe 抗原陰性 171 例、慢性肝炎 (CH) は 85 例で HBe 抗原陽性 25 例、HBe 抗原陰性 60 例、肝硬変 (LC) は 22 例で HBe 抗原陽性 8 例、HBe 抗原陰性 13 例あった。2013 年に発癌した例は 6 例であった。

③遺伝子型 (Genotype): 判定可能であった 223 例のうち Genotype A は 13 例 (5.8%)、Genotype B は 49 例 (22.0%)、Genotype C は 160 例 (71.7%)、Genotype D は 1 例 (0.5%) であった (図 1、表 1)。Genotype A の平均年齢は 44 歳と比較的若年であった。

図1. HBV Genotypeの割合

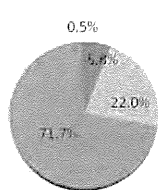


表1. HBV Genotypeと臨床像

	Genotype		
	A	B	C
平均年齢[歳]	44 ± 5	62 ± 11	52 ± 13
ASC	11例	38例	83例
CH	1例	9例	64例
LC	1例	2例	13例
HBe抗原陽性率	7.8%	8.2%	21.9%

(2)抗ウイルス療法

①抗ウイルス効果: 2013 年 12 月の時点で核酸アナログ製剤が投与されたのは 98 例であった。その内訳はラミブジン (LAM) 8 例、アデフォビル (ADV) 1 例、LAM+ADV 13 例、エンテカビル (ETV) 53 例、ETV+ADV 3 例であった。2013 年以前より CH および LC に対して核酸アナログ製剤が投与され、解析可能であった LAM 6 例、LAM+ADV 10 例、ETV 32 例について抗ウイルス効果を検討した (図 2)。HBV DNA の陰性化は ETV ですみやかに認められ、LAM+ADV では徐々に得られていたが、LAM 投与では肝機能障害はないが、陰性化の得られない症例も認められた。

②HBs 抗原・HB コア関連抗原の推移: 核酸アナログ製剤投与後の HBs 抗原・HB コア関連抗原の推移を LAM 6 例、LAM+ADV 10 例、ETV 32 例

で検討した (図 3)。HBs 抗原・HB コア関連抗原ともに核酸アナログ製剤投与後 2 年、4 年、6 年と徐々に低下していた。

③核酸アナログ製剤投与中止の可能性の検討: 2013 年の時点で核酸アナログ製剤投与後 2 年経過した LAM 6 例、LAM+ADV 12 例、ETV 30 例についての「核酸アナログ薬中止に伴うリスク回避のための指針 2012」(肝臓. 2012; 53(4): 237 - 242)の基準に従い、核酸アナログ製剤中止の可能性について検討した (図 4)。HBV DNA 陰性化/HBe 抗原陰性の症例は LAM 3 例、LAM+ADV 6 例、ETV 19 例であった。この中で、高リスク群 11 例、中リスク群 14 例で、低リスク群は 3 例と全体の 6%であった。

図2. 核酸アナログ製剤投与後のHBV DNA陰性化率

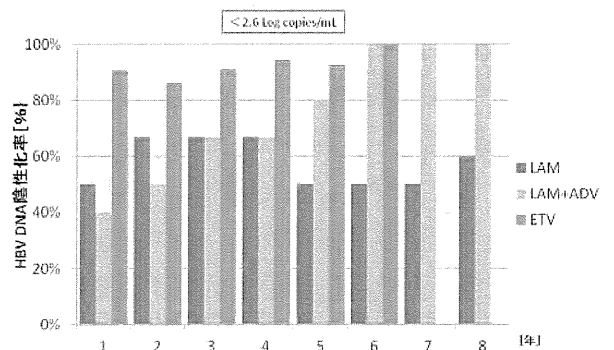


図3. 核酸アナログ製剤投与中のHBs抗原・HBコア関連抗原の推移

