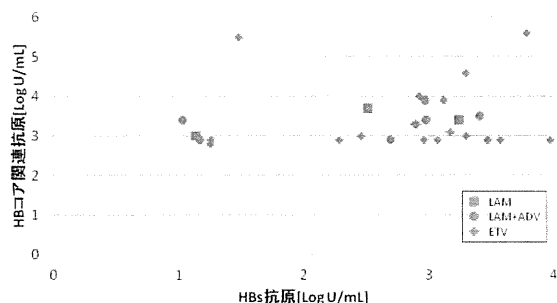


図4

核酸アナログ中止を検討した場合のHBs抗原・HBコア関連抗原の関係



D. 考察

今回、我々は当科における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。

病院ベースの検討ではあるが、2013年に当科通院歴のあるHBVキャリアの年齢分布のピークは50-60歳台にあり、10-20歳台の割合は低率であった。10-20歳台の割合が低率であった理由としては1986年より実施されているHBV母子感染防止事業の効果が考えられる。しかし、一方で30歳以上ではHBVキャリアがみられる状況である。一般に、ASCの状態では自覚症状に乏しいため、潜在しているHBVキャリアや通院を中断しているHBVキャリアがまだいると考えられる。

本邦におけるB型慢性肝炎患者のHBV Genotypeの地理的分布で、東北地方はGenotype Bが他の地域に比べ多いとされている(J Clin Microbiol 2009; 47: 1476-1483)が当科における慢性肝疾患のHBV Genotypeの割合はGenotype Cが71.7%と最も多く、次いでGenotype Bが多かった。Genotype Cが多かった理由としては、抗ウイルス療法などの治療が必要な病態の方が多かったためと考えられる。また、Genotype Aも5.8%認められ、平均年齢44歳と比較的若年であった。

核酸アナログ製剤の投与により、HBV DNAの

陰性化が得られるが、LAMは高率に耐性変異が出現するため、LAM投与中にbreakthrough hepatitisが出現した場合、ADVの追加投与が必要となる。今回の検討でLAM+ADVの経過は良好であった。また、ETV投与後の経過も良好であった。今回、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も同時に検討したが、HBs抗原・HBコア関連抗原ともに核酸アナログ製剤投与後徐々に低下していた。HBs抗原・HBコア関連抗原を用いて核酸アナログ製剤中止の可能性について検討したが、中止可能と考えらえる症例は少数例であった。

E. 結論

- ・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。
- ・当科における慢性肝疾患の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、中止可能と考えらえる症例は少なかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

論文発表

- 1) Oketani M, Ido A, Nakayama N, Takikawa Y, Naiki T, Yamagishi Y, Ichida T, Mochida S, Onishi S, Tsubouchi H. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis and late-onset hepatic failure in Japan: Summary of the annual nationwide survey between 2004 and 2009. *Hepatol Res.* 2013; 43(2): 97-105.
- 2) 鈴木一幸, 滝川康裕, 遠藤龍人, 宮坂昭生, 宮本康弘, 小野寺美緒, 小山富子, 岡本宏明, 伊藤

清頭, 溝上雅史. B型急性肝炎および慢性肝疾患におけるHBVゲノタイプAの頻度と感染経路の検討. 犬山シンポジウム 29回 2013; p23-28

2.学会発表

- 1) 小野寺美緒, 滝川康裕, 柿坂啓介, 片岡晃二郎, 宮本康弘, 黒田英克, 宮坂昭生, 鈴木一幸. 急性肝障害の昏睡発現阻止治療に関する検討. 第110回日本内科学会総会, 東京, 2013年4月.
- 2) 小野寺美緒, 滝川康裕, 柿坂啓介, 片岡晃二郎, 宮本康弘, 黒田英克, 宮坂昭生, 鈴木一幸. 急性肝不全の昏睡発現率とN-アセチルシステインの昏睡発現阻止に関する検討. 第49回肝臓学会総会, 東京, 2013年6月7日.
- 3) 吉田雄一, 宮坂昭生, 遠藤龍人, 滝川康裕, 鈴木一幸. B型慢性肝疾患患者での核酸アナログ製剤投与中止により肝炎再燃リスクの検討. 第110回日本消化器病学会, 東京, 2013年10月9日.
- 4) 小野寺美緒, 滝川康裕, 鈴木一幸. 急性肝障害の昏睡発現予知におけるProthrombin index slopeの有用性の検討. 第17回肝臓学会大会, 東京, 2013年10月9日.
- 5) 遠藤啓, 及川寛太, 滝川康裕. 急性肝炎における酸化ストレス度の意義. 第17回肝臓学会大会, 東京, 2013年10月9日.

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

3. 有効・安全性評価に関する研究

HBV 候補薬の有効性と毒性の評価

研究分担者 相崎英樹 国立感染症研究所 室長
研究協力者 明里宏文 京都大学霊長類研究所 教授

研究要旨

HBV を完全に排除可能な薬剤の開発を目指す本研究班の中で、我々はスクリーニンググループへの感染後期を解析するための細胞 Hep2.2.15、TetOFFHBV 細胞、および感染初期を解析するため、新規 HBV の受容体として報告された NTCP を恒常的に発現する細胞株 HepG2-NTCP 細胞を供与すると共に、HBV 関連アッセイ系の技術供与を行った。さらに、候補薬の有効性評価のためのヒト肝キメラマウスおよび毒性評価のためのマーマセットの準備ができた。

A.研究目的

現行の B 型肝炎治療薬は HBV を完全に排除することはできないため、一生服用し続ける必要があり、副作用、抵抗性ウイルス出現、免疫低下による B 型肝炎の再活性化などの問題がある。本研究班では HBV を完全に排除可能な薬剤の開発を目指す。

本年度は、スクリーニング班に細胞等を提供すると共に技術指導を行う。スクリーニングで見出された候補薬物について、感染研相崎は細胞系で有効性の評価を行う。明里協力研究員は小動物、大動物を用いるための準備実験に入る。

B.研究方法

(1) 感染細胞系の提供と技術供与

感染後期を解析するための細胞株として研究班に Hep2.2.15、TetOFFHBV 培養細胞を提供する。感染初期を解析するため HepG2-NTCP 細胞を提供する。

(2) 感染モデルマウスの系の提供と技術提供

HBV 感染増殖可能なヒト肝キメラマウスの技術の提供を行った。

(3) 毒性の評価のための大動物系の準備

候補薬物の毒性の評価のための大動物のアッセイのため準備を行う。本年度はまず大動物に HBV 感受性があるか評価する。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は国立感染症研究所内のバイオリスク管理委員会、組換え DNA 実験委員会等の承認を受けて行った。

C.研究結果

(1) 感染細胞系の提供と技術供与

感染後期を解析するための細胞株として研究班スクリーニンググループに Hep2.2.5、TetOFFHBV 培養細胞を提供すると共にその培養方法を教えた。さらに、感染初期を解析するため、新規 HBV の受容体として報告された NTCP を恒常的に発現する細胞株 HepG2-NTCP 細胞を供与すると共に、HBV 関連アッセイ系の技術供与を行った。DMSO 存在下で HBV を感染させることで感染効率を数%から 60-70%まで上げた効率の良い培養系を提供した。これまで感染初期の解析に使われて来た HepaRG 細胞や初代肝細胞に比べて、differential する手間がかからず、安価であり、これによりスクリーニンググループが見出した候補薬物の有効性の評価が可能になった。

(2) 感染モデルマウスの系の提供と技術供与

研究班臨床グループへ HBV 感染増殖可能なヒト肝キメラマウスの作成技術の提供を行った。

(3) 毒性の評価のための大動物系の準備

2 頭のマーマセットを麻酔下で開腹し、

genotype A-D HBV 感染者由来血清 (>10-e5 copies/ml) を、肝臓及び腹腔に接種した。現在血中ウイルス量について経過観察を行っている。

D. 考察

昨年度、HBV のレセプターとして NTCP が報告され、多くの研究室でその確認実験が行われてきた。本研究グループでも HBV が NTCP 発現させることで HepG2 細胞が HBV 感受性になることを確認できた。さらに、DMSO 存在下で HBV を感染させることで感染効率を 60-70%まで増加させることを確認でき、本細胞は研究班班員に配布されている。本細胞株は候補薬物の有効性評価に十分な感染効率を有しているものと考えられた。さらに、より効率の良い HBV 感染感受性細胞株をクローニングするための蛍光ウイルス・細胞系の構築を行っている。上記の系により、感染感受性細胞と非感受性細胞を分別し、感染感受性細胞はスクリーニンググループが見出した候補薬物の有効性評価に提供できる。

E. 結論

感染後期を解析するための細胞株として研究班に Hep2.2.15、TetOFFHBV 培養細胞を提供した。感染初期を解析するため HepG2-NTCP を提供した。感染初期を解析するため、新規 HBV の受容体として報告された NTCP を恒常的に発現する細胞株 HepG2-NTCP 細胞を供与すると共に、HBV 関連アッセイ系の技術供与を行った。ヒト肝キメラマウスおよびマーモセットの準備ができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly1 HH, Fukasawa M, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koizumi O, Kusuhara H, Wakita T. Evaluation and Identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443:808-13.
- 2) Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi S, Matsumoto T, Matsuura T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamaguchi T, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Imoto M, Kojima S. HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor. *Sci Rep.* 2013;22:3243.
- 3) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;440:515-20.
- 4) Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T. Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. *J Gen Virol.* 2014;95:60-65.
- 5) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- α Trigger Restriction of Hepatitis B Virus Infection via a Cytidine Deaminase Activation-induced Cytidine Deaminase (AID). *J Biol Chem.* 2013;288:31715-27.
- 6) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog.* 2013;9:e1003589.

- 7) Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. PLoS One. 2013;18:8(7):e68992.
- 8) Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. Gastroenterology. 2013;145:447-55.
- 9) 相崎英樹、HCV感染と代謝異常(脂質・エネルギー)、医学のあゆみ、医歯薬出版株式会社、東京、2013;245:666-667.

2.学会発表

- 1) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Suzuki R, Aizaki H, Koiwai H, Kusuhara H, Wakita T : Mechanistic analysis on hepatitis B virus entry in an NTCP-overexpressing cell line. 2013 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. 2013.10.20-23, Shanghai, China.
- 2) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Wakita T. A Retinoid Derivative Inhibits Hepatitis B Virus Entry Mediated by NTCP. International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. 2013.10.20-23. Shanghai, China.
- 3) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Kitamura K, Muramatsu M, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, 2013.10.20-23. Shanghai, China.
- 4) Fujimoto A, Aizaki H, Matsuda M, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Dynamics of the cellular metabolome during hepatitis C virus infection: Regulation of the lipoprotein metabolisms by hepatic lipase, 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Melbourne, Australia, 2013.10.6-10.
- 5) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Takemoto K, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T, Identification of a natural product inhibiting the transcriptional activity of liver X receptor and reducing the production of infectious HCV, 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Melbourne, Australia, 2013.10.6-10.
- 6) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Takemoto K, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T, Analysis of bioactivity of fungal-derived natural products based on a virus infection system, The 2nd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity, Yokohama, 2013.10.28-29.
- 7) Suzuki R, Konishi E, Ishikawa T, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T. Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with a DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. Keystone Symposia, Positive Strand RNA Viruses, Boston, U.S.A. 2013.4.28-5.3
- 8) Aizaki H, Dynamic metabolomics change in HCV-infected cells, The 2013 Italy-Japan Liver Workshop "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links", Italy 2013.10.20-21.
- 9) Aizaki H, Watanabe N, Aoyagi H, Hmwe SS, Watashi K, Suzuki R, Kojima S, Matsuura T, Wake K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T, Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules, International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid, Osaka, 2013.9.23-25.
- 10) Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Yaguchi S, Matsumoto M, Shirouzu M, Yokoyama S, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Kojima S. HCV NS3 protease plus TNF- α promotes liver fibrosis via stimulating expression and activation of TGF- β type I receptor, 第 20 回肝細胞研究会, Osaka,

2013.9.26-27.

11) Aoyagi H, Aizaki H, Matsumoto Y, Matsuda M, Hmwe SS, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Matsuura T, Suzuki T, Wake K, Miyamura T, Wakita T. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro, The 12th Awaji international forum on infection and immunity, 2013.9.10-13.

12) 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. 12th Human Proteome Organization World Congress 2013. 9.14-18. Yokohama.

13) Aoyagi H, Aizaki H, Matsumoto Y, Matsuda M, Hmwe SS, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Matsuura T, Suzuki T, Wake K, Miyamura T, Wakita T. Regulation of Hepatitis C virus (HCV) release by phospholipase A2 and autophagy -Antiviral Activity of Glycyrrhizin against HCV, 日本分子生物学会第 36 回年会, 2013 年 12 月 3-6 日, 神戸.

14) 鈴木亮介、石川知弘、小西英二、嵯峨涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字. プラスミドトランスフェクションによるトランスパッケージング型 1 回感染性フラビウイルス産生系の確立. 日本分子生物学会第 36 回年会, 2013 年 12 月 3-6 日, 神戸.

15) 松田麻未、斎藤憲司、鈴木亮介、佐藤充、鐘ヶ江裕美、渡士幸一、相崎英樹、千葉文、斎藤泉、脇田隆字、鈴木哲朗. 細胞内発現抗体 (イントラボディ) による C 型肝炎ウイルスの増殖抑制. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸.

16) 鈴木亮介、小西英二、石川知弘、嵯峨涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字. 日本脳炎ウイルスレプリコンを用いたトランスパッケージング型 1 回感染性フラビウイルス粒子産生系の開発. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸.

17) 青柳東代, 相崎英樹, 藤本陽, 松本喜弘, 松田麻未, Su Su Hmwe, 渡邊則幸, 渡士幸一, 鈴木亮介, 市野瀬志津子, 松浦知和, 鈴木哲朗, 和氣健二郎, 宮村達男, 脇田隆字. Phospholipase A2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス

(HCV)分泌過程の制御 —グリチルリチンによる抗 HCV 作用—、日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸.

18) 藤本陽, 相崎英樹, 松田麻未, 渡邊則幸, 渡士幸一, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 宮村達男, 脇田隆字, C 型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の脂質代謝変化と Hepatic Lipase 発現制御、日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸.

19) 内田奈々子、渡士幸一、中嶋 翔、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、千葉 文、脇田隆字, C 型肝炎ウイルス分泌過程は phospholipase D が関わる膜輸送により制御される, 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸.

20) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、脇田隆字、B 型肝炎ウイルス侵入阻害剤の同定およびその NTCP を介した感染阻害機構の解明、日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸.

21) 岩本将士、渡士幸一、九十田千子、Hussein Hassan Aly、鈴木亮介、相崎英樹、小祝 修、楠原洋之、脇田隆字: ヒト NTCP 安定発現細胞株における B 型肝炎ウイルス侵入機構の解析. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸.

22) 渡邊則幸, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆字: エンベロープペプチドを用いた HCV 感染に重要なアミノ酸領域の探索, 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸.

23) 後藤耕司, 相崎英樹, 渡邊則幸, 渡士幸一, 鈴木亮介, 山越智、四柳宏、森屋恭爾、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字, C 型肝炎ウイルス NS5A 結合タンパク質 ELAVL1 のウイルス複製・翻訳スイッチング機構の解析, 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸.

24) 渡士幸一, Guoxin Liang, 岩本将士, 丸澤宏之、喜多村晃一、村松正道、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、IL-1/TNF α によるシチジンデアミナーゼ AID 誘導を介した B 型肝炎ウイルス感染排除機構、日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸.

25) 中嶋翔、渡士幸一、紙透伸治、竹本健二、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆字、Liver X Receptor 転写活性および感染性 C 型肝炎ウイルス粒子産生を阻害する天然有機化合物の同定、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10-12

日，神戸．

26) 井戸田一朗、加藤康幸、青柳東代、相崎英樹、
脇田隆宇，当院で経験した、HIV 陽性者における
急性 C 型肝炎の集団発生について，第 27 回日本
エイズ学会，2013 年 11 月 20-22 日，熊本．

27) 相崎英樹、オートファジイにかかる治療戦略
2014、2013 年 2 月 15 日，東京．

G.知的所有権の出願・取得状況

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

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
新規B型肝炎治療薬候補化学物質の安全性・毒性評価に資する研究
～候補化学物質（CMR46）の毒性評価～

研究分担者 種村健太郎 東北大学 准教授
研究協力者 水上 拓郎 国立感染症研究所 室長

研究要旨

新規B型肝炎治療薬の候補化学物質についての安全性評価に資することを目的とし、開発の早期段階で、候補化学物質についての潜在的毒性強度を評価する。平成25年度は、関連候補化学物質：CMR46を用いた。用量0、100、300、1000MG/KGにてゾンデを用いて単回強制胃内投与を行った結果、投与2時間後に高用量投与群にわずかな体温低下が認められたが、異常行動様式は認められなかった。投与から5昼夜にかけての、ケージ内行動量測定装置による一般行動様式解析の結果、中および高用量投与群の夜間（本来のマウスの活動時間帯）行動量に上昇傾向が認められた。投与7日後において、体重変化は正常であり、主要臓器の肉眼病理解剖、血液・生化学検査に異常所見は認められない。

A.研究目的

創薬時における候補化学物質が新薬となる確率は非常に低い。その一つの理由として、効能が期待される候補化学物質に強い毒性が認められることが多くの場面で認められるという安全性担保の問題がある。そこで、本研究では新規B型肝炎治療薬の候補化学物質についての安全性評価に資することを目的とし、開発の早期段階で、候補化学物質についての潜在的毒性強度を評価することで、開発速度の加速に貢献することで、実用化への時間短縮をサポートする。その際、スループット性に配慮しつつ、一般毒性のみならず、生殖発生毒性や次世代毒性についても包括することを旨とする。

B.研究方法

平成25年度は、関連候補化学物質：CMR46を検討した。生後8週齢のC57BL/6雄マウスを、体重測定後、用量0、100、300、1000MG/KGにてゾンデを用いて単回強制胃内投与を行った（各投与群でN=4、溶媒はコーンオイルで、投与物質は懸濁状態であった。）投与2時間後に一般状態

観察を行うとともに、サーモグラフィによる熱画像診断を行った。その後、ケージ内行動量測定装置にて5昼夜の一般行動様式を観察し、投与7日後に採血、解剖し、血液・生化学検査（血中GOT、血中GPT、血中クレアチンフォスフォキナーゼ活性、血中乳酸脱水素酵素活性、血中コリンエステラーゼ活性、血中ブドウ糖、血中尿素窒素、血中総コレステロール、血中中性脂肪）、および主要臓器の一般状態を観察した。

（倫理面への配慮）

いずれの動物実験についても関連法規を遵守するとともに、所属機関の内規に従い、3Rの原則に基づき適切に行った。

C.研究結果

- ① CMR46投与2時間後に行ったサーモグラフィによる熱画像診断の結果、高用量投与群にわずかな体温低下が認められたが、異常行動様式は認められなかった。
- ② CMR46投与から5昼夜にかけての、ケージ内行動量測定装置による一般行動様式解析の

結果、中および高用量投与群の夜間（本来のマウスの活動時間帯）行動量に上昇傾向が認められた。一方で、社会性行動には変化は認められなかった。

- ③ CMR46 投与 7 日後において、体重変化も正常であり、解剖に関しても主要臓器に異常所見は認められない。
- ④ CMR46 投与 7 日後において、血液・生化学検査（血中 GOT、血中 GPT、血中クレアチンフォスフォキナーゼ活性、血中乳酸脱水素酵素活性、血中コリンエステラーゼ活性、血中ブドウ糖、血中尿素窒素、血中総コレステロール、血中中性脂肪）結果は正常の範囲であった。

D. 考察

CMR の単回投与による影響に関して、現時点では毒性と判断される影響は確認されなかった。行動様式への影響として夜間における行動量の増加が認められたが、多動傾向にあるのか、馴化不良によるものかについては不明であり、今後、慢性投与の場合は情動認知行動影響を含めた中枢影響について検討する必要がある。

熱画像診断、およびケージ内行動様式解析は、初期毒性スクリーニングに、その迅速性が非常に有用であることが示唆された。今後、異常誘発化学物質を用いて、毒性基準点を設定することで、本研究計画の前進に貢献が期待できる。

E. 結論

CMR の単回投与について、現時点では毒性と判断される影響は見いだされなかった。今後、溶

媒の変更を含めた投与方法の変更を検討する必要が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

2. 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

PET 分子イメージングによる薬効評価・薬物動態研究

研究分担者 渡辺 恭良 独立行政法人理化学研究所 センター長

共同研究者

金山洋介 独立行政法人理化学研究所 研究員

Hume William Ewan 独立行政法人理化学研究所 副チームリーダー

張周恩 独立行政法人理化学研究所 研究員

佐古健生 独立行政法人理化学研究所 リサーチアソシエイト

崔翼龍 独立行政法人理化学研究所 ユニットリーダー

研究要旨

本事業で創出する B 型肝炎治療薬剤候補物質に対する *in vivo* 薬効評価法として、PET イメージングによる非侵襲的な肝組織残存 B 型肝炎ウイルス (HBV) 検出・定量法の開発を進めている。本年度は B 型肝炎治療薬として現在使用される逆転写酵素 (RT) 阻害核酸アナログ製剤 entecavir の ¹⁸F 標識化の検討を進めるとともに、¹¹C 標識化 telbivudine を使用した HBV 感染マウスの PET 撮像を試みた。

A. 研究目的

本研究班にて開発されつつある B 型肝炎の新規治療薬候補物質の *in vivo* での有効性を評価するためには、血液中に存在する抗原タンパク質や HBV 量だけではなく、肝組織中に存在する HBV 量を経時的に評価することが重要である。そこで我々は現在 B 型肝炎治療に使用されている逆転写酵素 (RT) 阻害薬に着目し、核酸アナログ製剤の PET プローブにより非侵襲的な肝臓内残存 HBV 検出 PET イメージング法の開発を進めている。とくにプローブ候補として有効と考えられるのは HBV 特異的かつ高 RT 阻害活性を有する核酸アナログ製剤 entecavir であり、この ¹⁸F 標識化に関する検討を昨年度末より開始した。しかしながら標識前駆体合成に時間を要しており、PET での評価は次年度の見込みである。

そこで、本年度は entecavir と比較して約 500 倍阻害活性が劣るものの、別個にプローブ化法を確立していた ¹¹C 標識 telbivudine (L-thymidine, LdT) を用い、生体内の HBV を検出可能か検証するとともに、昨年度作製した PET 撮像用アイソレーションボックスを用いた HBV 感染モデルマウス撮像における実験条件の最適化を目的とし PET イメージング実験を試みた。

B. 研究方法

HBV 感染モデルマウスは株式会社フェニックスバイオに作成委託した。ヒト肝細胞キメラマウスである PXB マウス® に HBV ウイルスを感染させ、8 週と 10 週後に血中 HBV DNA 量を測定し持続感染が確認されたマウスを HBV 感染群、非感染の PXB マウスを対照群とし、また HBV 量の変化に伴うプローブ集積の変化を検討するため HBV 感染マウスにインターフェロン投与による治療を行い IFN 投与群とした (各群 2 匹)。HBV 感染群、対照群では 2-3 日おきに各 3 回、IFN 投与群ではインターフェロン (PEG-Interferon α -2a) 90mg/kg を 3 日おきに投与し、投与前、投与開始後 3、7、14 日の 4 回撮像を行うこととした。

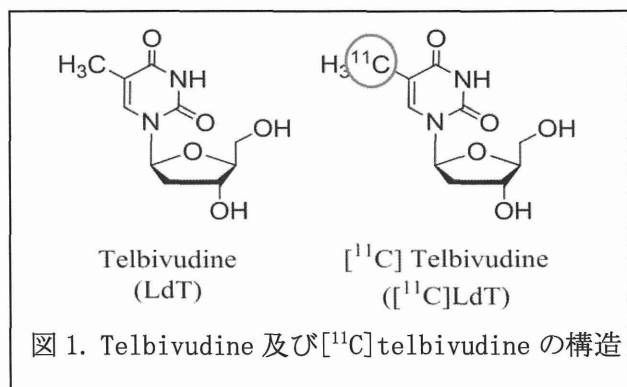
約 2 週間の実験期間中、マウスは HBV 飛散と日見感染防止のためフィルター蓋付ケージに個別に入れ、陰圧ケージラックにて滅菌水と滅菌餌を用いて飼育した。PET 撮像に際しては、まず飼育室の安全キャビネット内にてマウスをイソフルレンガスで麻酔後、尾静脈にカテーテルを留置し PET 撮像用アイソレーションボックス内の体温調節パッド上に保定し、直腸検温プローブを挿

入後、カテーテルの一端をボックス横の専用穴から外に出して密閉した。ボックス表面及び外側のカテーテルは安全キャビネットから運び出す前に次亜塩素酸溶液にて消毒した。撮像室への運搬中もアイソレーションボックスに装備したガス流入口より麻酔を維持した。撮像用ベッドにボックスを配置後、 $[^{11}\text{C}]\text{LdT}$ をカテーテルから投与すると同時に 90 分間の PET 撮像を開始した。

撮像終了後は再度飼育室に運搬し、安全キャビネット内にてマウスをボックスから取り出し、ケージに戻し飼育した。各個体最終の撮像後は安全キャビネット内で解剖に供した。撮像データは画像再構成後、心腔、腎臓、膀胱、肝臓、腸管、肩部筋肉に関心領域を設定して各部位の時間放射能曲線を得た。解剖では血液、心臓、肺、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、腸、大腿筋を採取し、組織放射能分布を測定した。また血液は一部血清採取チューブに分取し、血清 AST 及び HBV DNA 量測定を行った。

(倫理面への配慮)

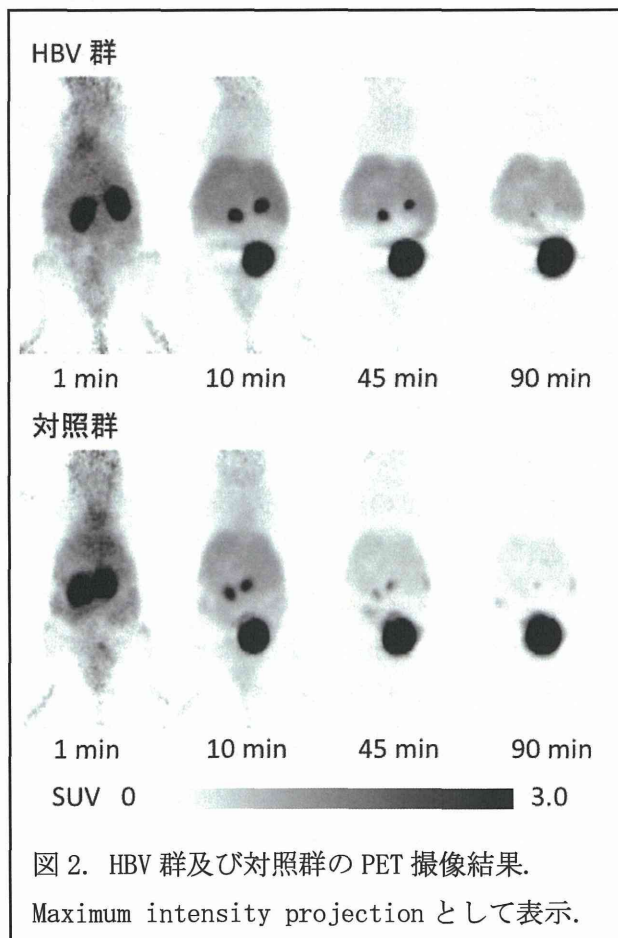
本研究に関わる動物実験は関係法規及び理化学研究所動物実験実施規定、遺伝子組換え実験実施安全管理規定、微生物等取扱規定に基づき実験審査委員会の承認を得て執り行った。また、感染性 HBV ウイルス取扱い上の安全性確保のため HBV に関する所内説明会を実施すると共に実験担当者及び希望者へのワクチン接種を実施した。



C. 研究結果

HBV 群及び対照群の PET 画像を図 2 に示す。 $[^{11}\text{C}]\text{LdT}$ は大部分が投与後 90 分間に尿排泄さ

れるが一部肝臓に集積し、腸内集積が観察できたことから胆汁排泄されると思われる。画像解析によって得られた時間放射能曲線の結果から、肝臓集積は経時的に減少した。一方、一部の撮像結果では非常に高い腎集積と尿排泄の異常が確認された。同一個体であってもこれら異常集積が見られる場合と見られない場合があり、尿排泄に異常がある撮像では肝臓の集積も増加する傾向が見られた。IFN 群のインターフェロン治療の進行に伴う集積の変化に関してはこれら個々の撮像における集積異常の影響があり経時変化を捉えることはできず、また全体として HBV 群と集積に有意差は見られなかった。対照群においても集積異常は確認されたが、問題ない撮像においては HBV 感染マウスの 2 群に比べ肝臓集積が若干低く、クリアランスも早い様子が確認できた。



体内放射能分布の結果では各群 2 匹の間で集積に差があり、各群間の集積に明確な差は見られなかった。また解剖前の撮像で尿排泄に異常が認め

られたマウスにおいては腎集積が異常に高い結果となった。

血清 AST の測定結果では、HBV 群は対照群に比べやや高い値を示し、さらに IFN 群は HBV 群の 1.5 倍程度高値を示した。また血中 HBV DNA 量は HBV 群で約 10 万 copies/μl、IFN 群では約 300 copies/μl であり、対照群では検出されなかった。

D. 考察

今回使用したヒト肝細胞キメラモデルの PXB マウスでは元の scid マウスに比べ肝臓の体積が 2 倍程度に肥大し、かつ肝臓中の末梢血流速度が 1/2 程度に減少しているとの報告がある (Tateno et al., *Lab. Invest.* **93**, pp:54-71, 2013)。このことから PXB マウスでは元々肝臓からのクリアランスが低下していることが推察される。また、肝細胞の置換率が一様ではないため、肝臓からのクリアランス速度には個体差が大きいと推察される。また、PET 撮像で散見された尿排泄異常に関しては、今回使用した PXB マウスでは腎組織に糸球体等の異常は見られず、腎での高集積が腎皮質より腎盂に見られたことから、肥大した肝臓によって押し下げられた腎、尿管、膀胱と体温調節のために挿入した直腸検温プローブの先端が物理的に干渉し、尿排泄を阻害したことが原因の可能性が高いと考えられる。

また、血清 AST の結果から HBV 感染モデルでは肝炎によってさらに非特異的集積が生じていることが予想される。血中 HBV DNA 量において明確に差があるにも関わらず HBV 群と IFN 群の肝集積に差が見られなかった理由としては、対照群に関しては若干低い肝集積だったことから、こうした炎症によるプローブの非特異的集積の影響が RT への特異的結合による集積を上回った可能性がある。

一方、今回使用したプローブである [¹¹C] LdT の標識部位は図 1 に示す様に元のメチル基を ¹¹C メチルに置換したもので、標識体の RT 阻害活性は元の telbivudine と相違ないと考えて良く、IC₅₀

では entecavir の約 500 倍劣る (Langley et al. *J. Virol.* **81**(8) pp:3992-4001, 2007)。このことから、そもそもプローブの特異的集積量が低いことも HBV 群と IFN 群の肝集積に差が見られなかった大きな原因と考えられる。

本研究において得られた知見から、HBV 検出イメージングの成功のために以下の改善点が考えられる。①個体差に対処するための匹数の増加、②撮像時の人為的エラー解消のため体温の体外測定、③肝非特異的集積を十分に低減するための撮像タイミングの遅延、④プローブの特異的集積の向上。この内、③、④に関しては ¹⁸F 標識化 entecavir の合成により達成可能である。今回使用した ¹¹C は物理学的半減期が 20.4 分に対して ¹⁸F では 110 分であり、投与後十分にクリアランスのための時間を置くことができると考えられる。

E. 結論

本研究においては HBV 検出の観点では肝集積に各群間の明確な差異を観察できず、RT 結合による特異的集積が明確な結果は得られなかったものの、HBV 感染モデルマウスを用いた実験条件の最適化に関して重要な知見を得ることができた。これら知見を ¹⁸F 標識化 entecavir に適用することで、HBV 検出・定量イメージング法が確立できると考えている。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

該当なし。

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

該当なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

別紙

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
相崎英樹	HCV感染と代謝異常（脂質・エネルギー）	医歯薬出版株式会社	医学のあゆみ		東京	2013	245; 666-667

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi S, Matsumoto T, Matsuura T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamaguchi T, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Imoto M, Kojima S.	HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor.	Sci Rep.	22	3243	2013
Qin X-Y, Wei F, Tanokura M, Ishibashi N, Shimizu M, Moriwaki H, Kojima S.	The effect of acyclic retinoid on the metabolomic profiles of hepatocytes and hepatocellular carcinoma cells.	PloS One	8(12)	e82860	2013
Itoh M, Tatsukawa H, Lee E-S, Yamanishi K, Kojima S, Hitomi K.	Variations both TG1 and TG2 isozyme-specific in situ activities and protein expressions during mouse embryonic development	Journal of Histochem. Cytochem.	61(11)	793-801	2013

Miura A, Kambe Y, Inoue K, Tatsukawa H, Kurihara T, Griffin M, Kojima S, Miyata A.	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type1 receptor (PAC1) gene is suppressed by transglutaminase2 activation	J. Biochem.	288(40)	32720-32730	2013
Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, Hida H, Nishimura S, Yoshida M, Isagawa T, Morioka MS, Kakeya H, Manabe I, Okamura H.	RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock.	Cell	155	793-806	2013
Ohno Y, Hattri A, Toshiki T, Kakeya H.	Association of epigenetic alterations in the human C7orf24 gene with the aberrant gene expression in malignant cells	J. Biochem.	154(4)	355-362	2013
Sakata K, Eda S, Lee E-S, Hara M, Imoto M, Kojima, S.	Neovessel formation promotes liver fibrosis via providing latent transforming growth factor- β	Biochem. Biophys. Res. Commun.	443(3)	950-956	2014
Nagatsuma K, Hano H, Murakami K, Shindo D, Matsumoto Y, Mitobe J, Tanaka K, Saito M, Maehashi H, Owada M, Ikegami M, Tubota A, Ohkusa T, Aizawa Y, Takagi I, Tajiri H, Matsuura T.	Hepatic stellate cells that co-express LRAT and CRBP-1 partially contribute to portal fibrogenesis in patients with human viral hepatitis.	Liver International	34 (2)	243-252	2014

Masuda A, Dohmae N,	Examination of an absolute quantity of less than a hundred nanograms of proteins by amino acid analysis.	Analytical and Bioanalytical Chemistry	405(25)	8073-8081	2013
Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T.	Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	440	515-20	2013
Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T.	Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2.	PLoS Pathog.	9	e1003589	2013
Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T.	Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- α Trigger Restriction of Hepatitis B Virus Infection via a Cytidine Deaminase Activation-induced Cytidine Deaminase (AID).	J Biol Chem.	288	31715-27	2013
Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H.	Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro.	PLoS One.	18	e68992	2013

Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T.	Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice.	Gastroenterol ogy.	145	447-55	2013
Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T.	Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon.	J. Gen. Virol.	95	60-65	2014
Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly1 HH, Fukasawa M, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T	Evaluation and Identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	443	808-13	2014

研究成果の刊行物・別刷

おける関与が示された⁸⁾。MathisらのグループはT細胞を教育する胸腺髄質上皮において末梢抗原の転写を起し、負の選択にかかわるAuto-Immune REgulator蛋白がTRIM28と分子会合することを示している⁹⁾。これらのことからTRIM28は自己反応性T細胞の分化や選択にも関係する可能性がある。またTRIMが分子内に共通にもつRING motifはE3Ubiquitin-ligase活性を有し、いくつかのTRIM分子はRING motifを介して自然免疫系の制御を行う¹⁰⁾。TRIM28が免疫系のさまざまな局面において調節機能を有することは明らかであり、この全体像を解明するための研究が進められていくと考えている。

- 1) Abrink, M. et al.: Conserved interaction between distinct Kruppel-associated box domains and the transcriptional intermediary factor 1 beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 1422-1426, 2001.
- 2) Iyengar, S. and Farnham, P. J.: KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome. *J. Biol. Chem.*, **286**: 26267-26276, 2011.
- 3) Chang, C. W. et al.: Phosphorylation at Ser473 regulates heterochromatin protein 1 binding and corepressor function of TIF1beta/KAP1. *BMC Mol. Biol.*, **9**: 61, 2008.
- 4) Chikuma, S. et al.: TRIM28 prevents autoinflammatory T cell development *in vivo*. *Nat. Immunol.*, **13**: 596-603, 2012.
- 5) Schultz, D. C. et al.: Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev.*, **15**: 428-443, 2001.
- 6) Schultz, D. C. et al.: SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev.*

16: 919-932, 2002.

- 7) Korn, T. et al.: IL-17 and Th17 Cells. *Ann. Rev. Immunol.*, **27**: 485-517, 2009.
- 8) Zhou, X. F. et al.: TRIM28 mediates chromatin modifications at the TCR α enhancer and regulates the development of T and natural killer T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**: 20083-20088, 2012.
- 9) Abramson, J. et al.: Aire's part-

ners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell*, **140**: 123-135, 2010.

- 10) Jefferies, C. et al.: Antiviral TRIMs: friend or foe in autoimmune and autoinflammatory disease? *Nat. Rev. Immunol.*, **11**: 617-625, 2011.

竹馬俊介/Shunsuke CHIKUMA
京都大学医学研究科免疫ゲノム医学講座

消化器内科学

HCV感染と代謝異常(脂質・エネルギー)

HCV and metabolism disorders

C型肝炎ウイルス(HCV)感染が慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の原因となるだけでなく、インスリン抵抗性や脂肪肝などの糖質や脂質の代謝異常も引き起こしていることが明らかになってきている。抗ウイルス療法によりウイルスを駆除すると脂肪化が改善すること、遺伝子型3型のウイルスで脂肪化が顕著なことなどから、これらの代謝異常はウイルス感染による炎症よりもウイルスそのものの宿主細胞への直接作用が深くかかわっているものと考えられている。本稿では代謝物質の網羅的解析結果(メタボロミクス)を踏まえて、とくにHCV感染が宿主代謝に与える影響について述べてい

HCV感染が宿主脂質代謝に与える影響

これまで細胞の働きを理解しようとするとき、DNA配列の網羅的解析(ゲノミクス)や蛋白質の網羅的解析(プロテオミクス)が行われてきた。しかし、実際の細胞内ではホメオスタシスによりゲノムレベルでの変動が表現型に一致しないことも多い。その点で、代謝産物は表現型にもっとも近いため表現型での変化が観察しやすいという特徴があり、メタボロミクスが注目されている。Roeらは、J6/

JFHウイルスをHuh-7.5細胞に感染させ3日後にメタボローム解析を行ったところ、アミノ酸合成、RNA核酸合成、ペントースリン酸経路の亢進を認めた¹⁾。脂質代謝に関してはHCV感染に伴い、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、コレステロール、脂肪酸などが増加していた。グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、コレステロールはいずれも生体膜の主要脂質成分として知られており、生活環の多くのステップで細胞の小胞体、Golgi体、細胞膜といった生体膜脂質を利用しているHCVにとって好都合な状況となっていると考えられる。とくにスフィンゴ脂質、コレステロールは脂質ラフトの構成成分であることから、HCVの感染、複製、粒子形成にも役立っているものと考えられる^{2,3)}。HCVによる肝細胞の脂肪化の機序は、HCVコア遺伝子トランスジェニックマウスを用いた研究などで明らかになっている⁴⁾。HCVコア蛋白は脂質合成系の転写因子sterol regulatory element binding protein-1の増加を介して脂肪酸合成酵素の活性を上げて脂肪酸合成を亢進させている。一方、ミトコンドリアに局在化したコア蛋白は脂肪酸のベータ酸化を抑制し、脂肪酸の消費を低