

201321018A

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

B型肝炎ウイルス構造解析による薬剤応答性の評価と新規治療薬開発に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 村上 善基

平成26(2014)年 5月

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

B型肝炎ウイルス構造解析による薬剤応答性の評価と新規治療薬開発に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 村上 善基

平成26（2014）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
B型肝炎ウイルス構造解析による薬剤応答性の評価と新規治療薬開発に関する研究 －村上善基－	-----	1
II. 分担研究報告		
1. インシリコスクリーニング方法によるB型肝炎ウイルス治療に貢献する 活性低分子化合物の開発に関する研究 ー梅山秀明ー	-----	7
2. B型肝炎における核酸アナログ投与の生命予後に与えるインパクト －熊田卓、豊田秀徳－	-----	14
3. HBVウイルス感染による肝線維化機序の解明 －河田則文－	-----	17
4. HBV 変異体の次世代シーケンシングによる同定 －田口善弘－	-----	22
5. 核酸アナログ治療における末梢血中HBV DNA量の推移と臨床背景に関する研究 －田守昭博－	-----	24
6. 構造生物学的手法等を用いたB型肝炎治療薬の開発に関する研究 －棚橋俊仁－	-----	27
7. B型慢性肝炎に対する核酸アナログ/PEG-IFN治療の現状と課題 －榎本大－	-----	31
8. B型肝炎における経過予測及びHBs抗原消失に関与するウイルス遺伝子 変異の探索 ー本多隆ー	-----	36
9. 抗ウイルス剤投与における薬剤応答性の評価 －矢野嘉彦－	-----	41
10. タンパク質とリガド結合情報を活用したインシリコスクリーニング －岩館満雄－	-----	45
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	49
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	51

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）

総括研究報告書

B型肝炎ウイルス構造解析による薬剤応答性の評価と新規治療薬開発に
関する研究

研究代表者 村上善基

大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学・准教授

研究要旨

本邦におけるB型肝炎ウイルス(HBV)感染者は1.5%程度と推定される。HBVに感染すると高率に慢性化し、年余の経過を経て慢性肝炎、肝硬変をへて肝細胞癌に至る。インターフェロン、核酸アナログ製剤でウイルスの複製はコントロールできるようになったが、宿主内のウイルスを排除することは困難であり、長期にわたる投薬が必要である。今回我々の研究班はHBVのウイルス構造解析によって薬剤耐性のメカニズムとウイルスの変異の関係を明らかにすること、*in silico screening*によってウイルスタンパク機能阻害薬候補を探索し、新規治療方法を確立することを目的としている。

A. 研究目的

本邦におけるHBV感染者は150万人程度と推定される。HBVに感染すると高率に慢性化し年余の経過を経て肝硬変、肝細胞癌に至る。抗HBV治療として核酸アナログは、一定の効果を発揮しているものの投薬中止にてHBVは高率に再燃し、また長期投薬にて薬剤耐性HBVが出現することが懸念される。そのためより効果的で安全な薬剤の開発は急務とされている。

ヒト感染性ウイルスは宿主の免疫応答から回避し持続感染するために遺伝子変異

を高頻度に起こす。このことは抗ウイルス剤への耐性獲得を容易にしていると考えられている。しかし、これまでの遺伝子解析法では、HBV遺伝子に、当初から薬剤耐性を示す自然耐性変異が潜在的に存在していたのか、あるいは感染後にHBV遺伝子がヒト体内で変異し耐性を獲得したのか、評価することは困難であった。次世代シーケンサー(NGS)は高速かつ大量塩基配列解読装置であり、短時間に膨大なウイルス遺伝子塩基配列情報を得ることが可能である。今回の研究では、

核酸アナログによる治療前後に、慢性 B 型肝炎患者から HBV 遺伝子を抽出し、NGS によりウイルスゲノムのウルトラディープシーケンスを行い、コピー数別に HBV 株各クローンのカタログ化を実施する。また HBV の DNA polymerase タンパクの構造解析を行い現在使用しているラミブジン、アデフォビル、エンテカビルの DNA polymerase の catalytic domain との相互作用の起こりやすさを in silico screening を用いて推定し、薬効の治療効果予測を行う。これらの情報を集積し HBV の株ごとの薬剤応答を幅広く臨床の場で利用できるようなデータベース化し公表する、この情報は慢性 B 型肝炎治療方法の標準化に有用であると考えられる。HBV に対する創薬の計画については、HBV は preS/S、preC/C、X、DNA polymerase と 4 種の ORF を持っている。それぞれのタンパクの機能を阻害する低分子化合物の探査に我々の開発した in silico screening を用いて行う。この方法は新規で低分子化合物を作成するのではなく既存の薬剤バンクや、低分子バンクと関心タンパクの相互作用を検討するもので、新規で薬剤を作成することがないために、創薬の費用と時間が大幅に軽減することが期待される。この方法を用いウイルスの生活環に関係する複数のポイントを阻害する薬剤の開発を試み、2 年以内に臨床第一相試験に移行を目指している。

B. 研究方法

ウイルスの持続感染系の樹立

免疫不全マウスにヒト肝細胞を生着した細胞 PXB 細胞（フェニックスバイオ社・広島）は HBV や HCV に感染するため、これを用いての HBV の安定感染系の樹立を試みた。細胞培養液は dHCGM (DMEM+10%FBS, EGF, insulin, ascorbic acid, DMSO など) を使用した (Yamasaki et al 2006 J Hepatol). 感染源は HBV に感染したヒト血清 (5.7×10^4 、 5.7×10^5 、 5.7×10^6 copies/ml) を用いた。ウイルスの感染には感染源と PEG8000 (4%) を dHCGM 培地とともに添加した。薬剤の評価を行う際はこのときに同時に薬剤を投与する。一日目に培地交換、二日目に培地交換、7 日目に測定用の培養上清を除去し、dHCGM 培地を添加し、以下 5 日毎に上清を採取した (図 1) (持続感染系の樹立は村上が行った)。

抗ウイルス薬候補の検索

HBV ゲノムにコードされている Small HBs、Middle HBs、Large HBs、HBe Ag、HBc Ag、HBx protein、DNA polymerase に対して in silico screening を用いて抗ウイルス活性を持つ低分子化合物の検索を行った。(探索は梅山、岩館、田口が行った)

(2) ウイルス変異解析

環状である全ウイルスゲノムを増幅するプライマー配列を HBV の複製開始地点である direct repeat を認識する P-1 と P-2

を設計し、HBV 全ゲノム配列の増幅を実施した(Gunther S et al. 1995 J Virol)。全ゲノム配列に由来する PCR 産物のウルトラディープシーケンスをイルミナ社 MiSeq を用いて実施し、適切なリード数と適切なデプスの評価を行った。さらに、全ゲノム配列をカバーするより適切なプライマー配列の設計を実施した。また、適切なコントロールサンプルの構築を実施した。(ウイルス変異解析は棚橋、矢野、田口、村上が行き、検体と臨床情報提供を熊田、豊田、河田、田守、榎本、本多が行った)

(倫理面への配慮)

既にこの解析に関する臨床研究[大阪市立大学大学院医学研究科倫理委員会より次世代シーケンサーを用いた抗ウイルス薬による HBV 株出現の予測]について検体採取機関と当施設の倫理申請を行い、承認を受けている(平成 26)。

C. 結果

ウイルスの持続感染系の樹立

ヒト肝細胞由来の PXB 細胞を用いて HBV の安定感染系を樹立した。HBV に感染したヒト血清(5.7×10^5 copies/ml)を PEG とともに細胞上清中に投与すると感染し、7 日目では細胞上清中に HBVDNA が 3×10^5 copies/ml 検出され、17 日目より上清に HBs 抗原が検出された。またこれらの細胞の上清を新規 PXB 細胞の上清に投与すると同様に HBVDNA と HBs 抗原が上

清中に検出できることを明らかにした。またこの細胞は細胞上清中にアルブミンを 90 日間程度放出することを確認しており、感染初期における薬剤応答、薬剤候補の細胞毒性実験には有用である。この細胞系を使いエンテカビルの抗ウイルス活性を確認したところ投与第 17 日の上清中のウイルス量は 1/100 程度に低下していた。しかしインターフェロン α で投与ではウイルス量の減少が同程度に期間では観察することができなかった。この系を使って低分子化合物のウイルス活性を検討する。

抗ウイルス薬候補の検索

HBV ゲノムにコードされている Small HBs、Middle HBs、Large HBs、HBe Ag、HBc Ag、HBx protein、DNA polymerase に対して in silico screening を用いて抗ウイルス活性を持つ低分子化合物の検索を行った。

その中で NTCP protein のモデリングの結果は 2 種の低分子化合物を得た。

HBcAg ; HBc Ag がコードしている protein に対して、モデルを創作した。

DNA polymerase 阻害剤は 4 種の低分子化合物を得たが、1 種は日本では入手不可能であったため、3 種類の化合物を上記の系で検討している。

さらに並列生物情報処理イニシアティブ (iPAB) のコンピュータで薬のための創るコンテストに参加している (<http://www.ipab.org/eventschedule/>)

contest)。標的タンパク質に対して阻害活性を持つと思われる化合物を iPAB が指定した化合物ライブラリーから予測し、化合物 ID を選ぶものである。iPAB はそれらの化合物をアッセイし、阻害物質のランキングを行うことになっている。標的にタンパクを HBV の ORF としてからら持っている膨大なライブラリー(220 万化合物)を使ったこのプロジェクトは薬剤探索には非常に有用である。

(2) ウイルス変異解析

標準的なB型肝炎ウイルス遺伝子配列 genotype C のAB246344を用いてウイルス変異のリファレンスとした。シーケンサーを検出するため、大腸菌で AB246344配列を人工合成しウルトラディープシーケンスを行ったところ、平均取得リード数は271万3千リード、ゲノムの各塩基部位に5万リード以上が得られており、変異解析の参照配列として条件は備えていると考えられた。

エンテカビルが投与予定、あるいは投与されているヒト患者5検体の血清から行ったウルトラディープシーケンスでは、平均取得リード数は254万5千リード、ウイルスゲノムの各塩基部位に6万リード以上が得られた。4検体のウルトラディープシーケンスにおいても、平均取得リード数は207万2千リード、ウイルスゲノムの各塩基部位に4万5千リード以上の配列情報が得られた。原理的に、4万クローン以上のHBV株の解析が可能であった。

プライマー配列であるP-1とP-2部位は取得リード数が減少するため、リード数の減少を補う目的で新たなプライマー配列 7Fと7Rを設計した。2つのPCR産物 (P-1とP-2および7Fと7R) によるマルチプレックスPCRライブラリーを構築し、ウルトラディープシーケンスを実施し、HBV遺伝子全長に一様なリード数の確保が可能であった。構築したマルチプレックスPCRライブラリーにより、エンテカビル投与前7検体、投与後1検体のウルトラディープシーケンスを現時点で実施している。

D. 考察

HBV の複製系として PXB 細胞は約 90 日程度 HBs 抗原、HBVDNA を上清中に放出し、アルブミンも検出できるため、抗ウイルス活性を持った低分子化合物の一次スクリーニングには有用であると考えられた。また現在抗ウイルス活性を持つ低分子化合物のスクリーニングを行っており、それが今年の6月に終了できると考えており、その後順次 *in vitro* で薬効の確認と細胞毒性について検討する予定である。ウイルス変異解析は現在治療中の検体の解析をスタートしており、今年度は情報の収集を行い、治療効果予測式を作成する。

E. 結論

タンパク構造解析より新規抗ウイルス薬候補を選別し、*in vitro* で薬効と細胞毒性を確認し、*in vivo* 実験に進む薬剤を選択

する。また次世代シーケンサーにて薬剤耐性株の出現を予測し、構造解析を用いて薬剤耐性獲得メカニズムを明らかにし、治療前に治療方法の選択可能なアルゴリズムを作成する。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. なし

学会発表

1. 田守昭博、川村悦史、萩原淳司、藤井英樹、打田佐和子、岩井秀司、森川浩安、榎本大、村上善基、河田則文 HBV再活性化における宿主因子とウイルス因子に関する検討 第50回日本肝臓学会総会 平成26年5月29日 東京都
2. 榎本大、飯田綾子、打田佐和子、藤井英樹、元山宏行、小塚立蔵、萩原淳司、川村悦史、岩井秀司、森川浩安、村上善基、田守昭博、河田則文 当院におけるウイルス性肝炎患者の拾い上げに対する院内連携の試み 第50回日本肝臓学会総会 平成26年5月30日 東京都
3. 村上善基、田守昭博、河田則文 HBVを標的としたdirect antiviral agent (DAA)開発方法の試み 第50回日本肝臓学会総会 平成26年5月29日 東京都
4. 村上善基、棚橋俊仁、田口善弘、豊田秀徳、熊田卓、榎本大、田守昭博、河田則文 次世代シーケンサーによる肝発癌に關与する miRNA の網羅的解析 第 100 回日本消化器病学会総会 平成 26 年 4 月 24 日 東京都
5. 上野綾子、田守明博、高田さゆり、小塚立蔵、元山宏行、川村悦史、萩原淳司、藤井英樹、小林佐和子、岩井秀司、森川浩安、榎本大、村上善基、河田則文 当院における急性 B 型肝炎の現状 第 40 回日本肝臓学会西部会 平成 25 年 12 月 6 日 岐阜市
6. 慢性 C 型肝炎治療効果予測方法の診断. 吉田香奈子、棚橋俊仁、伊丹沙織、松本佳也、村上善基、田守昭博、河田則文、岡田理菜、東健、田口善弘. 次世代シーケンサー第三回研究会 2013 年 9 月 4-5 日 (神戸国際会議場、神戸)

H.知的財産権の出願、登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

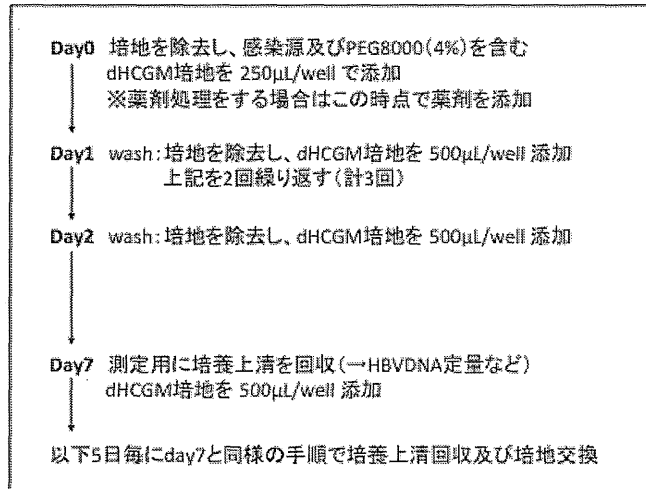
図 1

HBV 感染のプロトコール

PXB細胞への感染protocol

- ・プレート
Type I collagen coated plate
- ・PXB細胞播種密度
 2.1×10^5 cells/cm²
→24wellの場合 4.2×10^5 cells/well
- ・培地
dHCGM
(DMEM+10%FBS, EGF, insulin,
Ascorbic acid, DMSO, etc.
Yamasaki et al, 2006, J.Hepato)
- ・感染源
HBV感染患者血清
- ・感染時のHBV量
5~50 GEq/cells
→24wellの場合、
 $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ HBVDNA copies/well

<感染手順>



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

インシリコスクリーニング方法によるB型肝炎ウイルス治療に貢献する
活性低分子化合物の開発に関する研究

分担研究者 梅山秀明 北里大学・名誉教授

研究要旨

B型肝炎ウイルス（HBV）の感染者において、病態の差異が genotype や遺伝子の変異、また宿主の免疫応答などが関与していて、感染者治療がとても難しい難病ではあるが、標的タンパク質を数種類に絞りながら、短期間のうちに、B型肝炎ウイルス治療に貢献する活性化合物の提示を行い、共同研究者の実験を通して、毒性の少ない活性化合物を見出し、最終的には、多くの感染者の病状軽減を目指す。

A. 研究目的

横須賀、稲田（千葉医学 83 : 133-138, 2007）によると、B型肝炎ウイルス（HBV）の感染者は日本では120万から140万人である。HBVが原因となる肝疾患には急性肝炎、慢性肝炎や肝細胞癌がある。それらの病態の差異には、HBVの genotype や遺伝子の変異、また宿主の免疫応答などが関与していると考えられている。この研究分担者報告では、HBV関連の疾患に効果のある活性化合物を見つけたい。この新規化合物発見の前段階として、化合物の標的タンパク質の3次元構造をいくつか決定することが前提となる。

B. 研究方法

HBV DNAの比較的小さいゲノム上には、X

抗原遺伝子、C抗原遺伝子、P抗原遺伝子、S抗原遺伝子に対応する4つのOpen Reading Frame (ORF)が存在する。これらから7種類のウイルス蛋白が翻訳される。それらはSmall HBs、Middle HBs、Large HBs、HBe Ag、HBc Ag、HBx protein、DNA polymeraseである。BLAST : Basic Local Alignment Search Tool (NCBIからダウンロード)を使用して、上記標的タンパク質(query : 目的タンパク質)を対象にして、タンパク質の立体構造を集めたPDB databaseから、アミノ酸配列の類似性指標の大きいタンパク質を探す。このとき統計的有意性の補償を前提としている。このように抽出し、検索された参照タンパク質(subject)とのアミノ酸配列のアラインメントを参考にして、当該分担者らが作成し

たホモロジーモデリングプログラム FAMS を用いて、query の 3 次元立体構造をモデリングして、計算後に立体座標をファイルとして保存する。当該分担者が創った立体構造モデルは HBc Ag と DNA polymerase (AB246344 polymerase HBV genotype C) である。最初に、HBc Ag のタンパク質モデルを創作した。配列類似性割合が 89.2% である 4G93 (HUMAN HEPATITIS B VIRUS T = 4 CAPSID PROTEIN, ADYW STRAIN) を subject、即ち、参照タンパク質にして 3 次元モデルを創作した。次に、DNA polymerase (Reverse transcriptase) のタンパク質モデルも創作した。配列類似性が約 15% である 3C6T (HIV REVERSE TRANSCRIPTASE IN COMPLEX WITH INHIBITOR)、3KK2 (HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE-DNA COMPLEX WITH DATP BOUND IN THE NUCLEOTIDE BINDING SITE : REVERSE TRANSCRIPTASE P66 SUBUNIT)、3V4I (HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE WITH DNA AND AZTTP MOLECULE : HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE P66 SUBUNIT) を subject、即ち、参照タンパク質にして 3 次元モデルを創作した。さらに、宿主側において、HBV が侵入するときに、受容体として働く NTCP (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide) のタンパク質モデルも創作した。配列類似性が 21.5% である 3ZUX (A bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT) を subject、即ち、参照タンパク質にして 3 次元モデルを創作した。

(倫理面への配慮)

今のところ必要なし

(当該研究分担者がこの研究に関係して、所有する知的財産と引用文献)

ChooseLD : 知的財産

JP 特許番号第 4564097 号(2010 年 8 月 6 日登録)

インシリコスクリーニング装置、および、インスクリーニング方法

Chem Pharm Bull (Tokyo), 56(5), 742-744 (2008).

C. 結果

ここでは、理解しやすいように、最初に NTCP protein のモデリングの結果を説明する。Query タンパク質のアミノ酸配列は NCBI の

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

サイトの Protein データベースからダウンロードした。配列を次に示す。

>gi|2498046|sp|Q14973.1|NTCP_HUMAN

RecName: Full=Sodium/bile acid cotransporter; AltName: Full=Cell growth-inhibiting gene 29 protein; AltName: Full=Na(+)/bile acid cotransporter; AltName: Full=Na(+)/taurocholate transport protein; AltName: Full=Sodium/taurocholate cotransporting polypeptide; AltName: Full=Solute carrier family 10 member 1
 MEAHNASAPFNFTLPPNFGKRPTDLALSIVLVFMLFFI
 MSLGCTMEFSKIKAHLWPKGLAIALVAQYGIPLTA
 FVLGKVFRLKNIEALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMKG
 DMNLSIVMTTCSTFCALGMMPLLLYIYSRGIYDGLDKD

KVPYKGIVISLVLVLIPTIGIVLKSRRPQYMRVVIKQ
GMIIILLCSVAVTVLSAINVGKSIMFAMTPLLIIATSS
LMPFFIGFLLGYVLSALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLC
STILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLIIAIF
WCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALNGTYKGE
DCSPCTA

この配列に対して 3 次元モデルの創作し、
結果を下記に示す (図 1)。

TAUROCHOLIC ACID
(2-[(3beta, 5beta, 7alpha, 12alpha, 14beta,
17alpha)-3, 7, 12-trihydroxy-24-oxocholan-24-yl]amino)ethanesulfonic acid
2-[[[(4R)-4-[(3R, 5S, 7R, 8R, 9S, 10S, 12S, 13R, 14S, 17R)-10, 13-dimethyl-3, 7, 12-tris(oxidanyl)-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoyl]amino]ethanesulfonic acid)をドッキングした創作モデルである。

このモデルのどこかと hepatitis B virus が相互作用をして宿主細胞に侵入するので、
阻害する化合物の最初の発見の試みとして、
この図に示される TAUROCHOLIC ACID と競合するような低分子化合物を検討するのも一つの手段と考えられる。侵入のメカニズムは曖昧だが、一つの手がかりを見つけれ
れかもしれない。

次に、当該分担者は gene C (HBcAg ; HBc Ag)がコードしている protein に対して、
モデルを創作した。

このアミノ酸配列は以下に示す。日本に感染者が多い標準的タイプの C 型を取り扱った。

>gi|116812285|dbj|BAF36032.1| PreC/C
protein [Hepatitis B virus]:212aa from
GenBank: AB246344.1 Hepatitis B virus
DNA, complete genome, clone :
C_JPN22

MLFHLCLIIISCSCTVQASKLCLGWLWMDIDPYKEF
GASVELLSFLPSDFPNIRDLLDTASALYREALSPEH
CSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDPASRELV
VSYVNVNMGKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFG
VWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRRRGRSPRRRTP
SPRRRRSQSPRRRRSQSRESQC

創作した 3 次元モデルを下記に示す (図 2)。
ウイルスのコアタンパク質の集合促進化合物 (Assembly accelerator compound)
AT-130 が結合されている 3 次元構造である。

実験として登録された参照タンパク質の結晶ユニットには A 鎖 B 鎖 C 鎖 D 鎖があり、
Cyan color は B 鎖で、Green color は C 鎖
である。Assembly accelerator AT-130 が B
鎖 C 鎖の間に巧みに結合している。C 鎖に
結合した AT-130 には他の結晶格子内のタ
ンパク質が “B 鎖に対する C 鎖” のように
繰り返して結合してくるので、この二つの
AT-130 は同等の結合化合物と考えてよい。
しかし、

当該分担者は core protein の形成の阻害を
して、Hepatitis B virus の阻害剤を見つ
けることを目的にしている。むしろ、C
鎖に結合した AT-130 より大きい化合物を
探して、core protein の形成を阻害できれ
ば幸いと考えている。

Core protein に結合していない状態で NCBI

の化合物サイトからダウンロードした Assembly accelerator compound AT-130 の構造を下記に示す (図 3)。

Assembly accelerator compound AT-130 に似ているという下記に示す化合物 BAS 00392625 を B 鎖 C 鎖の間にドッキングを試みた。この時、当該分担者らが開発した ChooseLD プログラムを使用した。この化合物が阻害化合物として機能すれば、当該研究の目的と一致した現象となる (図 4)。

上記に述べた方法で、より大きな化合物を結合させるつもりだが、Core protein のウイルス殻の形成を阻害するかどうかは当該研究を進めてみないとわからない。しかし、新しい展開であることは確かである。

次に当該分担者は Viral DNA polymerase 阻害剤を探す試みを今年度に続いて来年度も続けるつもりである。AB246344 polymerase HBV genotype C: 290aa using HIV の配列をいかに示す。

```
>AB246344 polymerase HBV genotype C:
290aa using HIV alignment
NPHNTTESRLVVDVDFSRGSTHVSWPKFAVFNLSLT
NLLSSNLSWLSLDVSAAFYHIPLHPAAMPHELLVGSSGL
PRYVARLSSTSRNINHQHGTMQDLHDSCSRNLYVSLLL
LYKTFGRKLHLYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLAQFT
SAICSVVRRAPFHCLAFSYMDDIVLGAKSVQHLESFLT
SITNFLLSLGIHLNPNKTKRWGYSLNFMGYVIGSWGTL
PQEHIVLKLKQCFRKLVPVNRPIDWKVCQRIVGLLGF
PFTQCGYPALMPYACIQSKQAFT
```

当該分担者が創作した 3 次元モデルを次に示す。当該分担者は RNA base のタイプに

よって、基質の結合を阻害するタイプが変わるという仮説を作り、in-silico screening をするための鍵穴を 2 つ創作した。即ち、RNA base のタイプがプテリジン環とピリミジン環の場合を区別して in-silico screening を実行した。下記に使った鍵穴 (ピリミジン環の場合) サンプルを示す (図 5)。

さらに、HIV ではその存在が証明されている基質の反応を阻害するように induced-fit をおこした

HBV の 3 次元モデルを創作した。下記に示す (図 6)。いろいろな induced-fit サイトに入りそうな化合物を中央にドッキングしてある。当該分担者は、このように RNA dependent DNA polymerase を阻害する化合物を来年度も見つけるよう努力する。

さらに、Hepatitis B virus の RNA dependent DNA polymerase の RNaseH ドメインの 3 次元構造を創作することを試すが、相当困難で、HIV の RNA dependent DNA polymerase の RNaseH ドメインの阻害剤を in-silico screening して、その結果を Hepatitis B virus の細胞実験で試すことも、当該研究代表者と検討するつもりである。

D. 考察

当該研究分担者の研究はタンパク質の 3 次元構造の創作とそれらを利用した In-silico screening である。Hepatitis B virus が HIV に似ているところもあるが、多々違っているので、理論担当である当該分担者は当該研

究グループの代表者と当該研究グループのメンバーとよく議論して、この研究の成功、即ち、Hepatitis B virusに対する薬物の発見に向かいたい。

E. 結論

当該研究は2年目に入るが、当該研究分担者としては、来年度こそ、活性化化合物を、In-silico screeningで提案し、Hepatitis B virusの患者に役に立つ研究をするつもりである。

F. 健康危険情報

研究分担者は関係なし。

G. 研究発表

1. 論文発表なし

2. 学会発表なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

図1. NTCP タンパクの三次元モデル

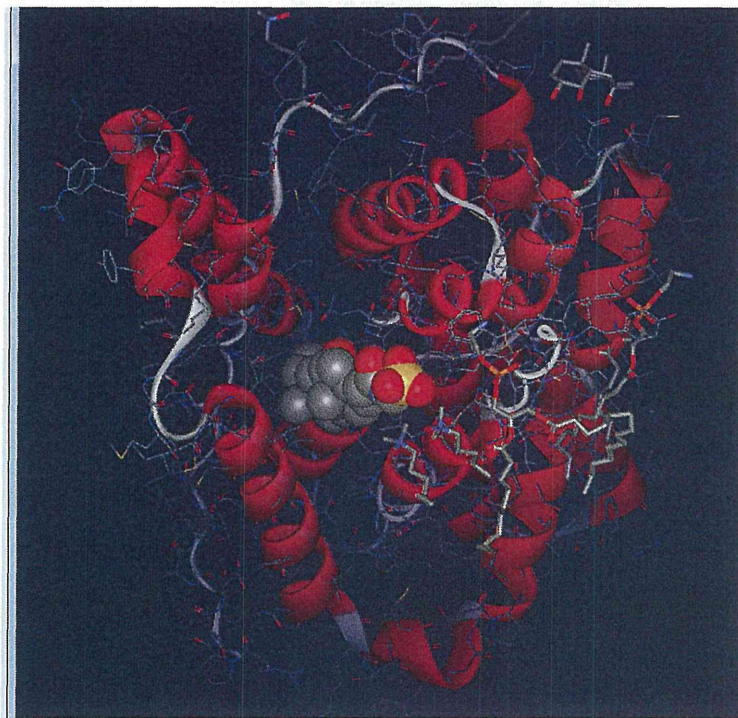


図2.HBV core タンパクの3次元モデル

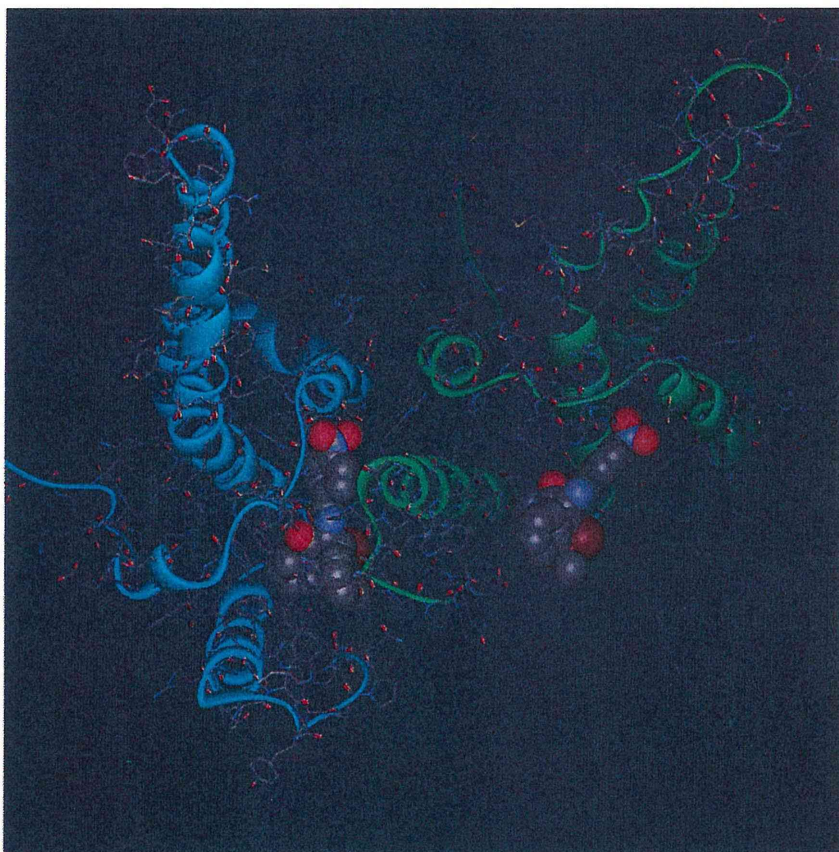


図3.Assembly accelerator compound (AT-130)の構造

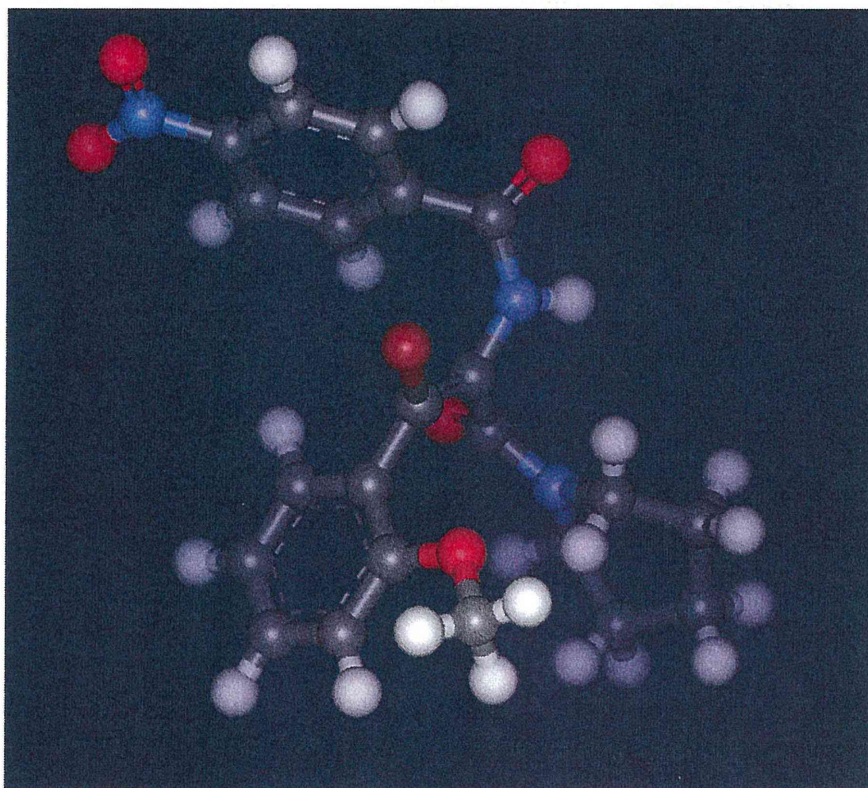


図 4. BAS 00392625 (AT-130 に類似しているタンパク) と core タンパクの B 鎖と C 鎖のドッキングモデル

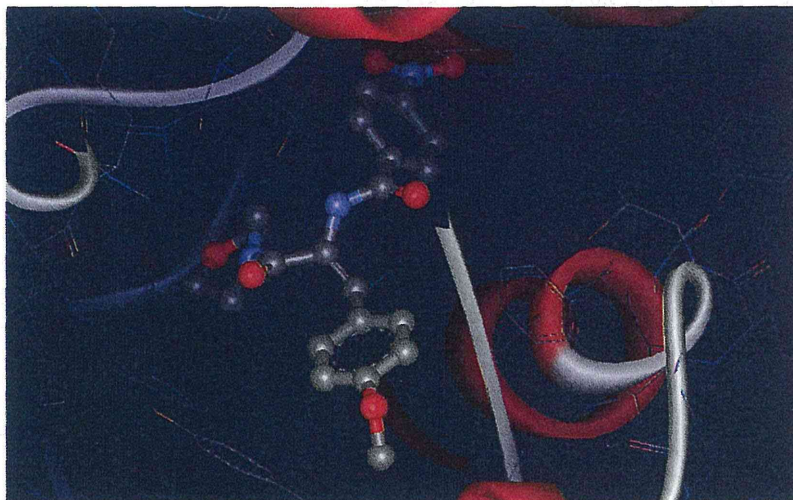


図 5. RNA base がプテリジン環の場合の基質とタンパクの鍵穴のモデル

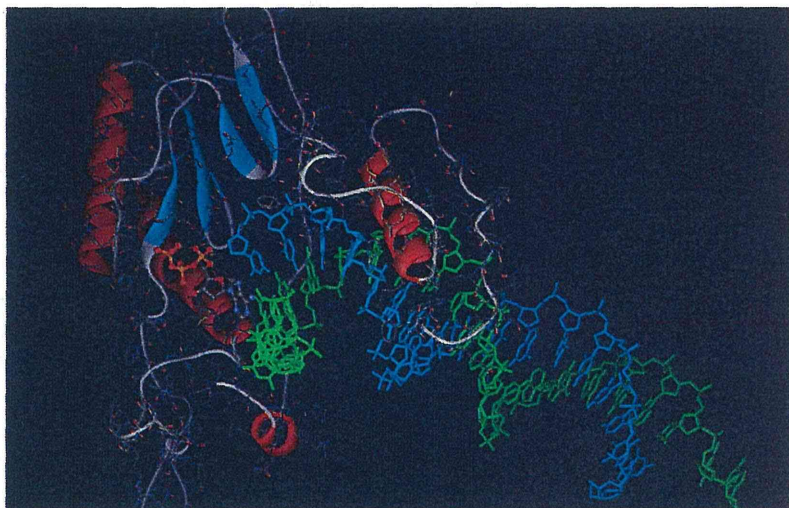
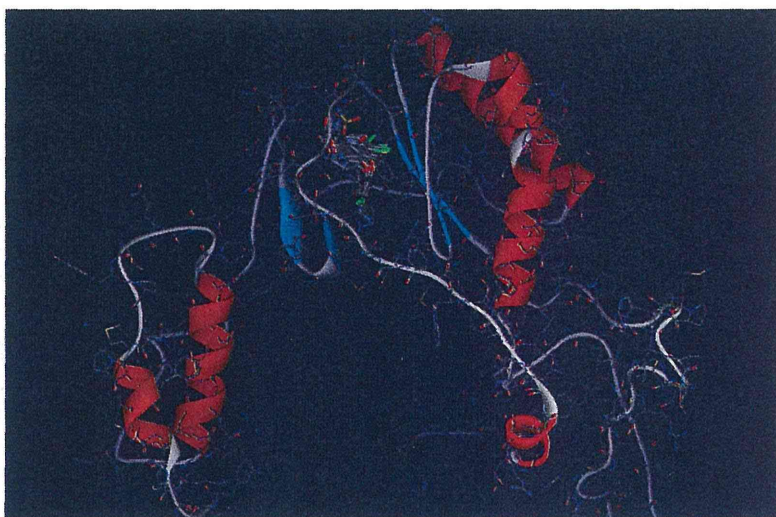


図 6. 基質の反応を阻害する induced-fit を起こした HBV モデル



B型肝炎における核酸アナログ投与の生命予後に与えるインパクト

分担協力者 熊田 卓 大垣市民病院 消化器内科 副院長

研究要旨:対象は大垣市民病院に1991年から2010年の間に受診したHBVキャリア2220例のうち①HBs抗原が3年以上陽性、②経過観察開始日から3年以上経過、③血液生化学検査は年2回以上施行、④NA群でNAは1年以上服用、⑤発癌例では経過観察開始後1年以降で診断（NA群ではNA服用開始後1年以降に発癌）を満たす919例を選択し、検討1ではNA投与群149例、非投与群732例で肝癌関連生存率、肝疾患関連生存率、全生存率について検討した。検討2では発癌に関与するとされている年齢、性別、HBVDNA量、HBe抗原の有無、血小板数、ALT値の6因子を傾向スコア法でマッチさせNA投与群149例と、NA非投与群149例が選択し同様に肝癌関連生存率、肝疾患関連生存率、全生存率について検討した。検討1の結果では肝癌関連生存率、肝疾患関連生存率、全生存率に差は認められなかった。これはNA非投与群に非活動性キャリアが多く含まれたためと考えられた。背景因子を合わせた検討2では、NA投与群とNA非投与群の5年、10年、15年の生存率はそれぞれ98.6%と98.6%、96.3%と88.0%、93.1%と74.9%で、NA投与群が有意に長期間生存していた（ $P=0.002$ ）。肝癌関連生存率と肝疾患関連生存率ともにNA投与群がNA非投与群に比し有意に長期間生存していた（ $P=0.022$ および 0.013 ）。死因についてみると全死亡数の減少を認めたものの、死亡原因に占める肝疾患関連死、肝癌関連死の比率には差を認めなかった。

共同研究者

豊田秀徳 大垣市民病院消化器内科 医長
多田俊史 大垣市民病院消化器内科 医長

A. 研究目的

B型肝炎に対して核酸アナログ（NA）が保険収載され10年以上が経過した。NAが使用可能となってからB型肝炎で非代償期の肝硬変となり不幸な転帰をとる症例は激減した。そして、NAの発癌抑制に関しても本邦から多くの報告が見られ（Matsumoto A, et al. Hepatol Research 2005, Kumada T, et al. J Hepatol, 2013, Hosaka T, et al. Hepatology, 2013）、その効果は確認されている。しかし、B型肝炎におけるNA投与の生命予後に対する効果を確認した論文は少ない。

本研究では、当院で長期間観察したB型肝炎キャリアの長期予後をNA介入例と非介入例で比較し、NA投与が生命予後に与えるインパクトについて検討した。

B. 研究方法

1) 対象1 (hospital based cohort study)

対象は大垣市民病院に1991年から2010年の間に受診したHBVキャリア2220例である。これらのうち①HBs抗原が3年以上陽性、②経過観察開始日から3年以上経過、③血液生化学検査は年2回以上施行、④NA群でNAは1年以上服用、⑤発癌例では経過観察開始後1年以降で診断（NA群ではNA服用開始後1年以降に発癌）を満たす症例は919例で、NA投与群149例、非投与群732例で肝癌関連生存率、肝疾患関連生存率、全生存率について検討した。

2) 対象2 (傾向スコア法)

NA群は1年以上服用

NA投与群187例とNA非投与群732例で、発癌に関与するとされている年齢、性別、HBVDNA量、HBe抗原の有無、血小板数、ALT値の6因子を傾向スコア法でマッチしたところNA投与群149例と、NA非投与群149例が選択された。これら2群を同様に肝癌関連生存率、肝疾患関連生存率、全生存率について検討した。

χ^2 乗検定もしくはFisherの直接確率計算法を使用した。生存率の算出はKaplan Meier法、差の検定にはlog rank検定を用いた。

C. 結果

1) 検討1

対象1の919例を使用して検討を行った

背景因子は表1に示すようにNA投与群は非投与群に比し高齢で、遺伝子型Cが多く、HBVDNA量もHBs抗原量もHBe抗原陽性率もALT値も有意に高値であった。一方、血小板は有意に低値であった

表1、患者背景（検討1）

	NA投与群 (n=187)	NA非投与群 (n=732)	P値
年齢	53 (27-81)	48 (0-84)	<0.001
性別 (男性/女性)	112/75	399/333	0.186
Genotype (A/B/C/他)	2/6/170/1	32/70/476/3	<0.001
HBV-DNA (log copies/ml)	6.7 (0.0-9.9)	3.7 (0.0-9.9)	<0.001
HBs抗原 (IU/ml)	3.5 (0.6-5.5)	3.3 (0.1-7.9)	<0.001
HBeAg (log copies/ml)	5.6 (2.9-7.0)	2.9 (2.9-7.0)	<0.001
HBe抗原 (陽性/陰性)	91/96	163/569	<0.001
プレコア (野生/変異)	39/127	110/416	0.481
コアプロモーター (野生/変異)	34/124	155/324	0.010
血小板 (/ μ l)	15.2 (3.2-38.8)	19.5 (3.7-55.1)	<0.001
ALT (IU/l)	69 (7-1058)	25 (5-3410)	<0.001
観察期間 (年)	10.9 (3.1-20.9)	10.8 (3.0-20.9)	0.828

図1は全体の生存曲線を示している。NA投与群とNA非投与群の5年、10年、15年の生存率はそれぞれ98.9%と99.3%、95.7%と93.9%、92.1%と88.9%で両群間に差は認めなかった

図2には肝癌関連したことで死亡した場合の生存率（肝癌関連生存率）と肝疾患に関連したことで死亡した場合の生存率（肝疾患関連生存率）を示した。1)の肝癌関連生存率と2)の肝疾患関連生存率はNA投与

群と NA 非投与群では差を認めなかった。

図1、全体の生存曲線(検討1)

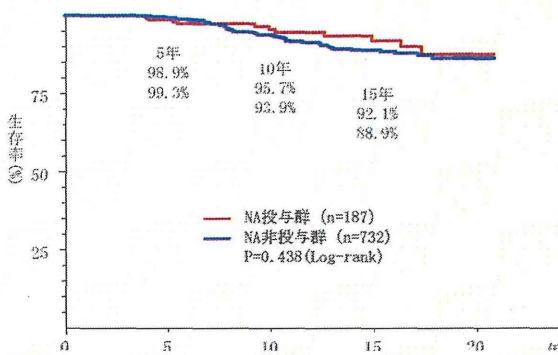
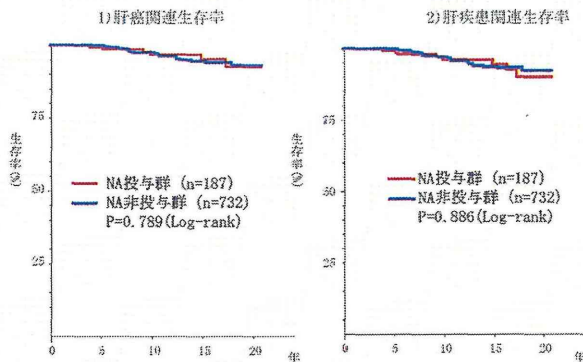


図2、肝癌関連生存率と肝疾患関連生存率(検討1)



経過観察中に NA 投与群で 11 例、NA 非投与例で 55 例死亡した。内訳をみると NA 投与群での死因は肝疾患関連死が 8 例 74.7% (うち肝癌関連死は 54.6%) であった。一方、NA 非投与群での死因の検討では肝疾患関連死が 29 例 52.7% (うち、肝癌関連死は 47.3%) であった。

2) 検討 2

検討 1 では NA 非投与群に非活動性キャリアが多く含まれ差が出なかったと考えられる、表 1 の背景因子の結果を見れば明らかである。このため発癌に関与するとされている年齢、性別、HBVDNA 量、HBe 抗原の有無、血小板数、ALT 値の 6 因子を傾向スコア法でマッチさせた。選択された NA 投与群 149 例と NA 非投与群 149 例の背景因子を表 2 に示す。NA 投与群で遺伝子型 C が多く、HBs 抗原量も多かったがそれ以外で差は認められなかった。

図 3 は全体の生存曲線を示している。NA 投与群と NA 非投与群の 5 年、10 年、15 年の生存率はそれぞれ 98.6%と 98.6%、96.3%と 88.0%、93.1%と 74.9%で、NA 投与群が有意に長期間生存していた (P=0.002)。

図 4 は肝癌関連生存率と肝疾患関連生存率を示した。肝癌関連生存率と肝疾患関連生存率ともに NA 投与群が NA 非投与群に比し有意に長期間生存していた (P=0.022 および 0.013)。

年齢、性別、NA 投与の有無、HBVDNA 量、HBe 抗原の有無、血小板、ALT の 7 因子を投入して、変数増加法で Cox 比例ハザードモデルで生存に関与する因子を検討すると、唯一 NA 投与の有無が選択され、NA 非投与群に対する NA 投与群のハザード比は 0.312

(0.142-0.686) であった。

表2、患者背景 (検討2)

	NA投与群 (n=149)	NA非投与群 (n=149)	P値
年齢	52 (27-81)	48 (6-77)	0.580
性別 (男性/女性)	87/62	92/57	0.554
Genotype (A/B/C/不明)	5/135/1/8	11/115/23/6	0.007
HBV-DNA (log copies/ml)	6.7 (0.6-9.7)	6.7 (0.6-9.9)	0.344
HBe抗原 (IU/ml)	3.5 (0.6-5.5)	3.4 (0.1-7.9)	0.033
HBeI3g (log copies/ml)	5.6 (2.9-7.6)	5.1 (2.9-7.0)	0.101
HBe抗原 (陽性/陰性)	71/78	74/75	0.728
プレコア (野生/変異)	0/34	0/23	0.105
コアプロモーター (野生/変異)	0/27	0/25	0.760
血小板 (/μl)	15.2 (3.2-38.8)	15.2 (3.7-47.6)	0.711
ALT (IU/l)	65 (7-1088)	53 (10-3410)	0.054
観察期間 (年)	11.5 (3.1-20.9)	11.7 (3.0-20.9)	0.499

図3、全体の生存曲線 (検討2)

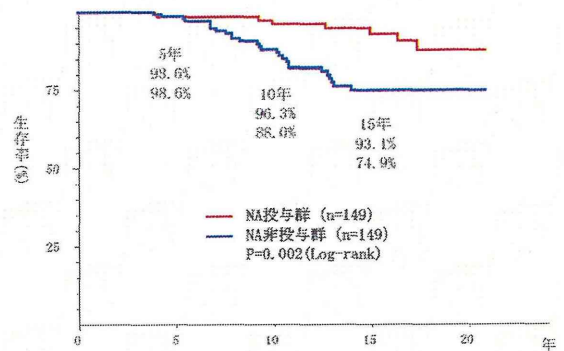
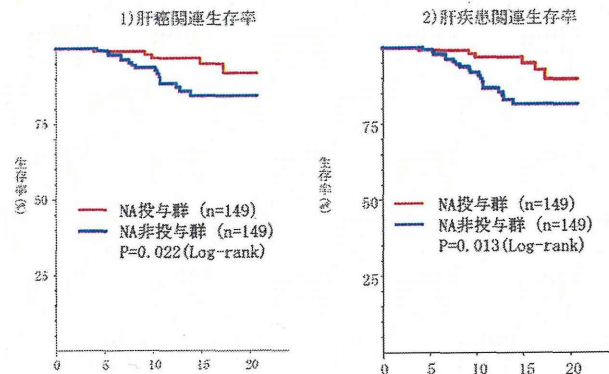


図4、肝癌関連生存率と肝疾患関連生存率(検討2)



死因についてみると、経過観察中に NA 投与群では 8 例死亡し、NA 非投与群では 27 例死亡した。比率は変わらないものの NA 非投与群での肝疾患関連死は 19 例 (うち肝癌関連死は 19 例) であり、NA 投与群の肝疾患関連死の 6 例 (うち肝癌関連死は 5 例) に比し多かった。

D、結論

今回の検討で背景因子を合わせて NA 投与群と NA 非投与群の生命予後を比較すると、明らかに NA 投与群の予後が良好であり、B 型肝炎における NA 投与の生命予後におけるインパクトが証明できた。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Murakami Y. Impact of hepatitis B virus integration into liver tissue on the efficacy of peginterferon and ribavirin therapy in hepatitis b virus-negative chronic hepatitis C patients. J Clin Gastroenterol. 2014 Jan; 48(1):73-9. doi: 10.1097/MCG.0b013e31829c409d. PubMed PMID: 23842217.
2. Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriyaama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Niinomi T, Yasuda S, Andou Y, Yamamoto K, Tanaka J. Effect of nucleos(t)ide analogue therapy on hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B patients: a propensity score analysis. J Hepatol. 2013 Mar; 58(3):427-33. doi: 10.1016/j.jhep.2012.10.025. Epub 2012 Oct 30. PubMed PMID: 23123221.

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

分担研究報告書（平成25年度）

研究分担者 河田則文 大阪市立大学 教授

分担研究課題：HBV ウイルス感染による肝線維化機序の解明

研究要旨：慢性肝疾患では肝線維化の進展が患者の予後を左右するため、肝線維化のさらなる分子メカニズム解析、診断法や治療法の確立が急務である。慢性肝疾患の診断法においては血清バイオマーカーのように非侵襲的に肝線維化を診断することが臨床的に重要な課題であり、近年、血中マイクロRNA (miRNA)のバイオマーカーとしての有用性が議論されている。今回の研究では、B型慢性肝炎の肝線維化マーカーとなりうるmiRNAを同定することを目的とする。一方、我々はサイトグロビン (cytoglobin, Cygb) の肝炎・線維化、発がんへの関与に注目しており、本分子のヒト肝組織での発現が線維化と関係する可能性を見出してきた。本研究では、ヒトB型慢性肝疾患組織におけるCygb発現に焦点を絞って解析する。

A. 研究目的

近年の抗肝炎ウイルス療法の急展開によりC型肝炎では高率にウイルス排除が得られるようになった。一方、B型肝炎では核酸アナログ製剤でウイルスを制御することは可能となったが、一旦感染したB型肝炎ウイルス (HBV) を肝細胞から駆除することは依然として困難であり、肝細胞内でのウイルス持続感染は肝臓における慢性的な壊死・炎症を惹起し、それに対する非実質細胞(肝星細胞、筋線維芽細胞など)による修復と実質細胞(肝細胞)の再生が、肝線維化と肝発癌に繋がると考えられている。従って、血清中のHBVをモニターするのみでなく、肝組織内の病態を把握できるマーカーが重要である。これまで肝線維化の評価は肝生検による病理診断で行われてきたが、侵襲的であり出血等の合併症の可能性もあるため反復検査は不可能である。近年、FibroScanのような組織硬度を測定する医療機器が開発されているが、高価であり全ての医療機関で導入されることは困難である。また、ヒアルロン酸やコラーゲン断片などのいわゆる血清中の線維化マーカー

も用いられているが、その正確性においてはまだ検討の余地が残されている。従ってB型肝炎においても血清バイオマーカーなど非侵襲的な方法で肝線維化を診断することは臨床的に重要な課題である。

一方、我々の研究グループではラット肝星細胞からサイトグロビン (cytoglobin, Cygb) というグロビン蛋白を見出した。即ち、Cygbはミログロビン (Mb)、ヘモグロビン (Hb)、ニューログロビン (Ngb) に次いで哺乳類4番目のグロビンであると判明した (J Mol Biol 2004;339:873; Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2006;62:671)。我々はCygbの生体内における役割を明らかにする目的でCygbノックアウトマウス (Cygb^{-/-}) を作製し、ジエチルニトロサミン (diethylnitrosamine, DEN) による肝癌発生モデルを作製した。その結果、Cygb^{-/-}は野生型に比較して増強した肝線維化反応を伴いながら易発がん性を呈すること、さらに、その過程に酸化ストレスの亢進状態が関与することを観察した (Am J Pathol 2011;179:1050)。即ち、Cygb欠損は、DEN処理