

下の肝臓において炎症・酸化ストレス・線維化反応を有意に増強させていた。以上のようなこれまでの研究を背景としてヒトの慢性肝障害におけるCygb発現を臨床サンプルで精査して、Cygbのヒト慢性肝障害への寄与、特に、B型慢性肝炎での発現変動を解析する。

B. 研究方法

I. 平成25年度

1) 患者への研究参加の説明と同意の取得

対象は肝生検を受けるB型慢性肝炎患者。本研究は臨床検体(肝組織、血液)を対象としたものであり、所属大学である大阪市立大学医学部倫理委員会へは本研究の内容を報告し審査の上、承認を得た。

2) 臨床検体の採取と保存

・肝組織の保存：15G Tru-cut 針を用いて肝生検を行い、病理組織学的に肝臓の壊死・炎症と線維化診断に必要な量が十二分に採取された場合の余剰の肝組織の一部を本研究に用いる。得られた肝組織はRNAlater (Ambion Inc.) に速やかに浸透し2時間室温で静置した後、一旦-30℃で保存する。その後、mirVana miRNA isolation kit (Applied Biosystems)を用いてtotal RNAを抽出し-80℃で保存する。

・血清の保存：肝生検の前後あるいは抗ウイルス治療を行う際に経時的に血清を採取し-80℃で保存する。

3) データファイルの作成と管理

・臨床背景(年齢、性別、血液生化学所見、ウイルス学的検査、病理学的検査)のデータファイルを作成し、外部メディアの連結していないPCにて保存する。個人情報と臨床情報と連結可能匿名化を行い厳重に管理する。

4) マイクロアレイを用いたmiRNA発現の網羅的解析

これまでのC型肝炎における研究で、軽度肝線維化例と肝線維化進展例のmiRNA発現の網羅的解析結果を比較したところ、miR-199、200、221、222をはじめ数種類のmiRNAが肝線維化マーカーの候補としてあがった。今回の研究ではB型肝炎の肝線維化進展メカニズムがC型肝炎と異なると想定し、肝組織および血清においても同様にmiRNAの発現プロファイルの網羅的解析を行う。

5) リアルタイムPCRを用いたmiRNA発現の定量的解析

マイクロアレイ解析の結果、肝線維化に関与していると想定されるmiRNAの血中での変化を、リアルタイムPCRを用いて定量的に解析する。ここで用いるTaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems)ではmiRNAに特異的なプライマーを用いた逆転写と、その後のTaqManプローブを用いたリアルタイムPCRにより、前駆体ではなく成熟miRNAのみを特異的に定量することが可能である。

6) ヒト肝組織におけるCygbの発現

生検で得られたヒト肝組織を用いて、免疫染色でCygb発現を検討する。

(a)ヒトの慢性肝炎、肝硬変、肝がん組織におけるCygb陽性細胞の存在様式についての検討

ヒト肝組織の実質部、グリソン鞘や線維性隔壁部、がん部(C型とB型、非B非C型由来、がんも高分化型、低分化型など分化度を病理医とともに診断)をCRBP-1、Cygb、SMA、FBLN2に対する抗体を用いて染色し、Cygb陽性細胞の存在様式を明確化する。多重の蛍光抗体法を用いてその細胞の分類を行う。

(b) 肝癌の腫瘍部とその周囲の非腫瘍部における筋線維芽細胞の挙動とそれらが発現する分子(特に TGF- β や VEGF などの増殖因子)とその受容体、さらには、細胞シグナルの活性化との関係を詳細に検討し、Cygb 発現細胞の存在様式を明らかにする。

C. 研究結果

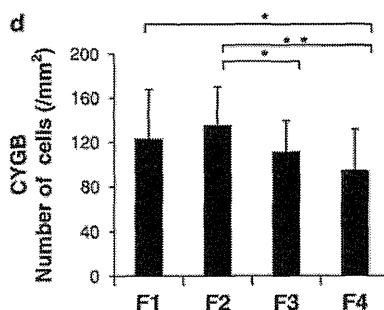
(1) B 型慢性肝疾患患者血清ならびに組織における miRNA 発現

- 患者への研究参加と同意の取得に関しては順調に進んでいる。同意の得られる患者においては肝生検を施行し、病理組織検査に用いる以外の組織検体の一部を miRNA 解析用に別途保存している。また、組織は病理学的に F0~F4 に分類してデータ収集している。同時に、抗ウイルス療法治療前後の血清を保存収集している。
- 血清中 miRNA の網羅的解析に向けた準備状況: Agilent 社の miRNA Array 解析に向けて患者血清から RNA 分画を採取収集している。また、近年エクソソーム中の miRNA が安定でよりよいバイオマーカーになりうる可能性が示唆されており、エクソソーム分画においても解析を行う予定である。
- さらに、当研究室では次世代シーケンサーも導入したので、これを用いた解析を行い、miRNA Array を用いた結果との相互関係について解析する予定である。
- C 型慢性肝炎において線維化との関連が強く示唆された miR-199, 200, 221/222 に関して、B 型慢性肝疾患との関連性を検討する。

(2) ヒト B 型慢性肝疾患組織における Cygb の

発現解析

Cygb は抗酸化作用を持つグロビンであるためその多寡が慢性炎症や組織線維化に寄与する可能性がある。当研究室ではヒトの Cygb に反応するモノクローン抗体を既に 2 種類作製した。これを用いて免疫組織学的に Cygb 発現を解析する。



上図の様に C 型慢性肝疾患組織を用いた検討より、Cygb は特に F4 組織で発現が低下すること (Lab Invest 2014) やヒト肝癌組織では Cygb mRNA 発現が有意に低下することを観察した (論文執筆中)。これらの検討を B 型慢性肝疾患に拡大する。

D. 考察

癌研究の分野においては、ある種の miRNA が癌抑制遺伝子を制御することによって発癌に関与するなど、新たな知見が明らかになっている。これに対し、B 型慢性肝疾患の肝線維化機構における miRNA の意義を検討した研究の報告はほとんどない。我々は C 型慢性肝疾患において肝線維化とともに発現増加する新しいバイオマーカーの候補として miR-221 と miR-222 を見出した (Ogawa, Enomoto M, et al. Gut 2012)。すなわち miR-221 と miR-222 は、ヒトの C 型慢性肝炎において肝線維化の進行につれて発現上昇すること、I 型コラーゲンや

平滑筋アクチンの mRNA 発現と良好な相関を示すこと、2種類の肝線維化動物モデルでも肝線維化の進行につれて発現上昇すること、培養肝星細胞の活性化に伴って発現上昇することなどを見出した。本研究ではB型慢性肝疾患において肝線維化の進展に関与する miRNA を同定し、臨床応用可能な肝線維化マーカーの開発を目指す。予想される結果として、i)miRNA を用いて非侵襲的に肝線維化を診断することが出来れば、反復して検査することが可能となり、治療による肝線維化改善効果を判定することが出来る。ii) また日常臨床上の利用のみならず、検診などにおけるスクリーニング目的でも利用可能かもしれない。iii)肝線維化は発癌の前段階と考えられるため、当該 miRNA は腫瘍マーカーとしても利用可能かもしれない。iv)肝線維化の分子機構を解明することは、究極的には抗線維化治療の開発に繋がる可能性がある。

一方、Cygb の発がんへの寄与に関して多様な臓器で報告されている。例えば、肺がんにおける Cygb の関与に関しては、プロモーター領域のメチル化やヘテロ接合体の欠損による Cygb 発現低下は non-small cell lung cancer (NSCLC)において報告された。即ち、54%の肺癌においては近接する非腫瘍部に比して明らかに低レベルの Cygb mRNA 発現が観察され ($p < 0.001$)、プロモーター領域のメチル化の程度と Cygb 発現が逆相関することが示された。また、Cygb mRNA 発現の低下と腫瘍の分化度とに相関が見られ低分化型でより低発現であることが示された (Fisher's exact, $P = 0.033$)。同様の知見は head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)や乳癌でも観察された。

Cygb が腫瘍抑制的であるとすると、その効果はグロビンとしてのスカベンジャー効果からがん誘発性物質に由来する酸化ストレスやニトロ化ストレスを低減し細胞を DNA、蛋白質、さらには膜レベルで保護することが推測される。一方、Cygb が発現低下することで、局所炎症や微小環境に変化が生じて、その結果として組織の線維化が生じ無秩序な上皮-間葉相互作用を惹起する可能性もある。従って、本分子の発現動態を慢性 B 型肝炎で特定することは臨床的意義がある。

E. 結論

B型慢性肝疾患におけるmiRNAならびにCygb発現動態を検討し、最終的には病態を反映するバイオマーカー開発に繋げる。

F. 研究発表

論文発表

1. Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver. Motoyama H, Komiya T, Thuy le TT, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Iwai S, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Murakami Y, Yoshizato K, Kawada N. *Lab Invest.* 2014;94:192-207.
2. Combination therapy with a nucleos(t)ide analogue and interferon for chronic hepatitis B: simultaneous or sequential. Enomoto M, Tamori A, Nishiguchi S, Kawada N. *J Gastroenterol.* 2013;48:999-1005.

3. A prospective long-term study of hepatitis B virus reactivation in patients with hematologic malignancy. Tamori A, Hino M, Kawamura E, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. J Gastroenterol Hepatol. 2014, in press.

学会発表

1. Accelerated liver cancer development in Cytoglobin-deficient mice treated with chemicals/diet via the priming of stellate cells and activation of local fibrosis, inflammation, and oxidative stress. Le TT, Matsumoto Y, Hai H, Yoshizato K, Kawada N. AASLD-The Liver Meeting 2013, November 2-5, Washington DC, USA

G. 知的所得権の取得状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

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

HBV 変異体の次世代シーケンシングによる同定

分担研究者 田口善弘 中央大学・物理学科 教授

研究要旨

B型肝炎ウイルス(HBV)は他のウイルスと同じように高頻度で変異体を生成する。その結果、容易に薬物耐性を獲得することが憂慮される。次世代シーケンスを用いて得られたHBVゲノムのショートリードデータから変異体を特定する技術の確立を目指す。

A. 研究目的

患者から分離した HBV ウィルスのゲノムを MiSeq でシーケンシングして得られたショートリードデータを用いて HBV ウィルスゲノムの変異を検出する方法論を確立する。

B. 研究方法

患者から分離した HBV ゲノムから他の分担者が作成した MiSeq によるショートリードデータを受け取る。データは患者単位で単一の fastq ファイルとして提供される。提供された fastq ファイルをリファレンスゲノムに bowtie を用いて貼り付ける (図 1)。

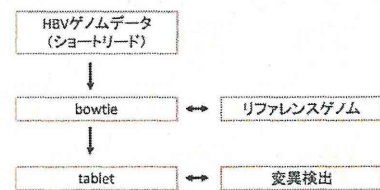


図1 解析のデータフロー図

C. 結果

他の研究者から提供されたショートリードをリファレンスゲノムに張り付けた結果、十分な数のリードをリファレンスゲノムに張り付けることがbowtieにはあることが確認された。また張り付けたリード (アセンブリ) をtabletで可視化することで少なくともマジョリティのHBVゲノムの変異は検出可能であることを確認した (図2)。

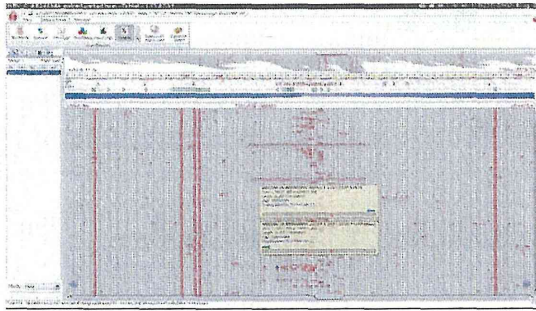


図2 ゲノムブラウザtabletで可視化されたリファレンスゲノムに対する患者から分離されたHBVゲノムアッセムブリに於ける変異検出例のスナップショット (赤)。

D. 考察

当初の想定ではマイノリティのHBVゲノム変異も検出することができるという想定であったが、実際にHBVゲノムから得られたショートリードデータをリファレンスゲノムに張り付けた結果、マジョリティ変異以外のゲノム変異はシーケンシング時に不可避免的に導入されるノイズと区別が難しいことがわかった。

E. 結論

MiSeqを用いたHBVゲノムのシーケンシングはリファレンスゲノムに対するマジ

ョリティの変異を検出するだけの精度があることが確認された。しかし、マイノリティの変異を検出するのはシーケンシングの精度的に困難であることがわかった。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

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

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）
分担研究報告書

核酸アナログ治療における末梢血 HBVDNA 量の推移と臨床背景に
関する研究

分担研究者 田守昭博

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

B 型慢性肝炎例において核酸アナログであるエンテカビル治療は、安全でかつ安定した抗 HBV 効果を示すことが報告されている。しかし、全ての患者において同一の抗 HBV 効果を得ることができる訳ではない。そこで今回、核酸アナログ初回治療例 60 症例を対象としてエンテカビル投与後の HBV DNA 量の推移と患者臨床背景を比較検討した。その結果、薬剤内服コンプライアンスが不良であった 4 例の内、2 例においてエンテカビルに対する薬剤耐性が出現した。一方、コンプライアンスが良好でありながら HBV DNA 量が十分に低下しない症例には薬剤耐性を認めなかった。エンテカビルを 0.5 mg から 1 mg へ増量することで良好な抗 HBV 効果を獲得した。

A. 研究背景と目的

B 型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療にはインターフェロンか核酸アナログのいずれかが用いられる。核酸アナログの適応は肝線維化進展例および 40 歳以上の患者であるが、内服薬でかつ副作用が少ないことから、若年齢症例を含めて多くの患者に使用されている。一方、薬剤中止にて肝炎が再燃する率が高く、長期治療では薬剤耐性となった B 型肝炎ウイルス (HBV) の出現が知られている。現在、我が国において使用可能な核酸アナログ製剤の中でエンテカビルが最も薬剤耐性の出現頻度が低率で副作用も少ないことから第一選択薬とされている。今回の検討では、核酸アナログ初回治療例におけるエンテカビルの治療効果と抗ウイルス効果不良例への対策について臨床経過を解析

した。

B. 研究方法

対象は、エンテカビルが保険承認された 2006 年 9 月から 2012 年 9 月までに大阪市立大学病院においてエンテカビル治療を開始した 60 例である。内訳は男性 40 例、女性 20 例であり年齢の中央値 47 歳 (24 歳-68 歳)。HBV 遺伝子型は A-type 4, B-type 1, C-type 48, D-type 1 であった。バラクルード 0.5 mg 投与した。治療開始前の HBV DNA 量は $4.2 \text{ Log} - 9.1 \text{ Log}$ であり中央値は 6.9 Log であった。

(図 1)。

C. 研究結果

エンテカビル治療開始後、定期検査に来院し追跡可能であった症例は50例である。HBV DNA量が定量値未満(2.1 Log/ml)へ低下した経時的な推移は、6ヶ月;14%(7/50), 1年;33%(16/49), 2年;75%(33/44), 3年;79%(23/29), 4年;86%(18/21), 5年;94%(17/18)であった。エンテカビル内服のコンプライアンスが不良であった4例ではHBV DNAは2.1 Log/ml 未満へ低下することはなく、内2例においてエンテカビル耐性を検出した。一方、内服コンプライアンス良好でありながらHBV DNAが1年を経ても3 Log/ml 未満へ低下しなかった4例では薬剤耐性変異は検出されなかった。そこで4例に対して2年目以降、エンテカビルを1 mgへ増量して治療を継続した。増量後HBV DNA量の低下を認めた。

D. 考察

エンテカビルの標準投与量は1日1回0.5 mgでありほとんどの症例ではこの量にて十分な抗HBV効果を発揮している。しかし今回の解析では、初回核酸アナログ治療例においても0.5 mgでは治療効果が不十分であり、1 mgに増量することでその効果を発揮できる症例が存在することが明らかとなった。このような症例は、治療前のHBV DNA量が非常に多くかつHBe抗原陽性例であった。一方、ウイルス側要因では既報にあるエンテカビル耐性(図2)は検出していない。すなわちラミブジン変異に加えてT184A/F/G/L, S202G/I, M250Vの変異はなかった。しかし、これら耐性変異以外にも薬剤用量に依存したウイルス変異部位が存在する可能性がある。Direct Sequencingでは検出されず埋もれているHBVクローンの中には核酸アナログへの反応性も多様である可能性がある。今後は、次世代シーケンサを用いて多様なHBVクローンの存在を明らかにする必要がある。

E. 結論

既報の耐性変異以外にもバラクルードの抗HBV効果が不良となる症例が存在した

。その場合にはバラクルードの投与量を通常の倍量にすることにより治療効果の改善を認めた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. A prospective long-term study of hepatitis B virus reactivation in patients with hematologic malignancy. Tamori A, Hino M, Kawamura E, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. *J Gastroenterol Hepatol* in press

2. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia.

Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. *PLoS One*. 2014 Feb 10;9(2):e86449.

3. HLA class II associated with outcomes of hepatitis B and C infections. Tamori A, Kawada N. *World J Gastroenterol*. 2013 Sep 7;19(33):5395-401.

2. 学会発表

1. 前向き登録例の長期経過からみたHBV再活性化対策の現状。田守昭博他、肝臓 2013;54:Supp Page A446

2. B型慢性肝炎に対するPEG-IFNの早期抗ウイルス効果: Sequential療法も含めて。榎本大、田守昭博、河田則文。肝臓 2013;52:Supp. Page A484

3. 全数調査から見た輸血後B型肝炎ウイルス陽転例の解析-HBV再活性化の可能性-。田守昭博他、肝臓 2013;54:Supp Page A43

4.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特になし。

図1 エンテカビル治療中のHBV DNA量の推移

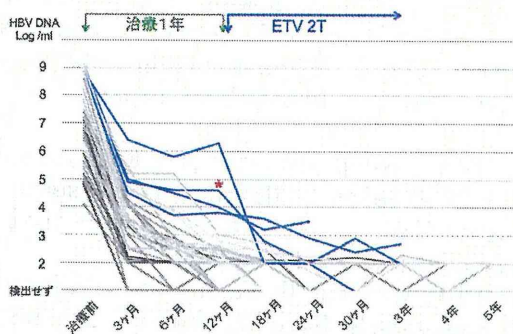
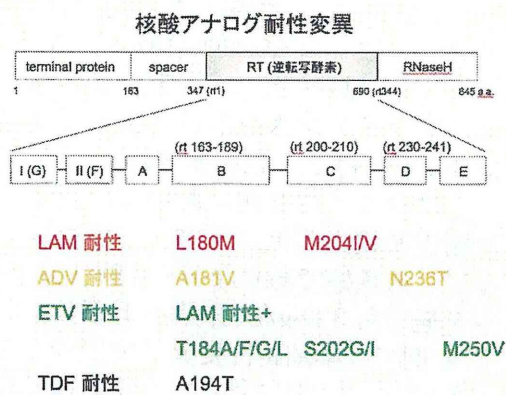


図2 HBVの核酸アナログ耐性変異



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

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

分担研究者 棚橋 俊仁 神戸薬科大学医療薬学研究室 准教授

研究要旨

ヒト B 型肝炎ウイルス（HBV）は、宿主の免疫応答から回避し、宿主内で感染を持続させるため、その遺伝子に高頻度に変異をきたす。このウイルスゲノム上の遺伝子変異により、HBV は抗ウイルス剤への耐性を示す。しかし、従来の遺伝子解析法では、ウイルス遺伝子に当初から薬剤への耐性を示す自然耐性変異が存在していたのか、あるいは治療後にウイルス遺伝子に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。慢性 B 型肝炎の治療前後に採取したヒト患者血清から、HBV 遺伝子を抽出し、次世代シーケンサーにより全ウイルスゲノムのウルトラディープシーケンスを行い、薬剤応答別に HBV 遺伝子の全塩基配列をカタログ化する。

A. 研究目的

ヒト B 型肝炎ウイルス（HBV）感染者の血液中に、塩基配列が異なる複数クローンの HBV 株の存在が報告されており、単一宿主内での HBV 株の遺伝的不均一性が示されている。この HBV 株の遺伝的不均一性の度合いが、抗ウイルス治療の効果に関連することが示されている。しかし、従来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。予備検討では、2 万クローンに至る HBV 株の解析が可能であった。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。このウイルス塩基カタログ情報は、抗ウイルス剤を投与する際の事前予測に役立つ、抗ウイルス剤の不適切な投与に伴う

耐性ウイルスの出現を抑制し、不要な医療費の削減効果をも期待出来るため、厚生労働行政上、有益をもたらす。

B. 研究方法

1. HBV ゲノム逆転写酵素配列 (694 bp)

のウルトラディープシーケンス

予備検討として、HBV ゲノムのコア領域で逆転写酵素をコードしている 694 bp 配列を部分的に PCR 法で増幅し、イルミナ社 MiSeq を用いて、4 ウイルス検体のウルトラディープシーケンスを実施した。平均取得リード数は、72 万 6 千リードあり、すべてのサンプルでウイルスゲノムの各塩基部位に 2 万リード以上の配列情報が得られた。原理的には、2 万クローンに至る HBV 株の解析が可能、と考えられた。

2. HBV ゲノム全配列 (3215 bp) のウルトラディープシーケンス

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 P-1 と P-2 を設計し、HBV 全ゲノム配列の増幅を実施した。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。

(倫理面への配慮)

C. 結果

1. プールサンプル数の検討

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血清から、HBV ゲノムを抽出した。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 P-1 と P-2 を設計し、PCR 法で HBV 遺伝子全長を増幅した。まず、2 検体でウルトラディープシーケンスを実施した。平均取得リード数は 826 万 4 千リードあり、ウイルスゲノムの各塩基部位に 14 万リード以上の配列情報が得られた。2 サンプルでは、過剰な情報量となり、また多検体での運用では非効率となるため、解析検体数を増加させることとした。

5 検体の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り、4 検体をプールしたディープシーケンスの実施が、運用上適切であると考えられた。

2. マルチプレックス PCR ライブラリーの構築

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。

3. コントロールゲノムAB246344の構築

日本における標準的なB型肝炎ウイルス遺伝子配列として、AB246344が挙げられる。ゲノム変異解析の参照配列として用い、さらにシーケンスエラーを検出するため、大腸菌でAB246344配列を人工合成した。コントロールゲノムAB246344のウルトラディープシーケンスでは、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有用と考えられる。

D. 考察

ヒト体内においてHBVは、多様な変異体の集合として存在しており、抗ウイルス剤への耐性を示す自然耐性変異体の検出は、HBVゲノムの臨床的意義の解明へつながる。我々は、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によるウルトラディ

ープシーケンスで、4万クローンに至るHBV株を、薬剤応答別にカタログ化し得ることを明らかにした。さらに、核酸アナログの投与前から潜在的に微量に存在する薬剤抵抗性ウイルスを検出し得る可能性を示した。今後は、解析検体を増加させ、HBV株各クローンの塩基カタログをより多数例で推進させる。

エンテカビル投与前後のヒト患者血清からHBV遺伝子を抽出し、PCR法でHBV遺伝子全長を増幅させている。エンテカビル投与後は、ウイルス量が減少するため、PCR法での検出結果に影響を及ぼす。我々の検討では、 10^6 コピー以下のウイルス量では、シングルPCR法で、HBV遺伝子全長の増幅が困難である点を見出している。血清ウイルス量が 10^6 コピー以下の検体に対して、PCR法でHBV遺伝子全長をどの様にして検出するのか、今後の検討課題としている。

E. 結論

NGSによるウルトラディープシーケンスで、これまでになく膨大な塩基情報を、より高速で、より感受性高く同定し得ることが可能となりつつある。今回のウルトラディープシーケンスで、4万クローンに至るHBV株を、エンテカビルの治療効果別にカタログ化することを可能としている。このウイルス塩基配列情報を基盤とし、ウイルス蛋白の立体構造解析へと繋げ、抗ウイルス剤との親和性を検討

する。これら統合的な解析により、将来の慢性 B 型肝炎の治療の更なる改善が期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

該当なし

学会発表

次世代シーケンサーによる B 型肝炎ウイルス薬剤耐性領域の変異解析. 矢野嘉彦、岡田理菜、棚橋俊仁、Dewiyani Widasari、東健. 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)

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)

次世代シーケンサーを用いたクラリスロマイシン耐性ヘリコバクターピロリ菌の全ゲノム解析. 岡田理菜、棚橋俊仁、岩本彰、吉田幸生、菊池馨、慶田喜秀、吉田優、東健. 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

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

B型肝炎に対する核酸アナログ/PEG-IFN治療の現状と課題

研究分担者：榎本大 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

B型肝炎に対してエンテカビル(ETV)/IFN sequential 療法を行った 37 例（従来型 IFN 使用 24 例、PEG-IFN 使用 13 例）における抗ウイルス効果について検討した。ETV から PEG-IFN への切り替えによって HBs 抗原低下が得られ、かつその低下率は従来型 IFN を用いた時より有意に大きかった。ETV から PEG-IFN への切り替えによって HBV DNA は若干上昇するが、投与中の HBV DNA は従来型 IFN を用いた時より低値に抑えられていた。PEG-IFN 終了後の長期経過は今後の検討課題であるが、少数例ながら HBs 抗原の陰性化が得られたことは注目に値する。

A. 研究目的

B 型肝炎疾患に対して、本邦では 4 種類の核酸アナログとインターフェロン (IFN) が使用可能である。核酸アナログは、強力な抗ウイルス効果を有し、経口薬であるためコンプライアンスが良く、自覚的な副作用もほとんど認めず、短期的には医療経済的にも優れる。ところが、中止後には高率に再燃が起るため投与は長期に及び、長期投与による耐性が問題となる。一方、IFN は免疫調整薬であるため効果は不確実であるが、効果が得られた場合は投与終了後も持続することが多い。

核酸アナログの中止を目的に IFN に切り替えるいわゆる sequential 治療が試みられているが、一般的に本邦での成績は芳しくない。これは本邦では B 型肝炎

疾患の約 85% を genotype C が占め、genotype A または B に比較して IFN 反応性が不良であることが一因として挙げられる。一方、我々は特に若年の B 型肝炎において、核酸アナログ短期投与でも HBe 抗原陰性化が得られた症例では、IFN sequential 療法の効果が良好であることを報告してきた。最近、B 型肝炎に対して PEG-IFN α 2a の 48 週投与が承認され、成績の向上が期待されている。また治療目標として ALT、HBe 抗原、HBV DNA に加え、HBs 抗原の低下が重要視されるようになった。

そこで B 型肝炎に対するエンテカビル(ETV)/IFN sequential 療法の有用性について、特に従来型 IFN を用いた症例と PEG-IFN を用いた症例との比較を行っ

た。治療効果の判定については ALT 正常化、HBe 抗原陰性化、HBV DNA 低下に加え、HBs 抗原低下についても評価した。

B. 研究方法

対象

対象は当院ならびに関連施設において 2006 年以降に IFN sequential 療法を受けた B 型慢性肝炎 37 例である。

治療プロトコール

- 1) Non-PEG 群：2010 年以前の 24 例には ETV(バラクルード®、ブリストル・マイヤーズ)0.5 mg を約 48 週間投与した後、4 週間、従来型 IFN(オーアイエフ®、大塚製薬)500 万単位週 3 回を併用して中止し、その後 IFN を 20 週間単独投与した。
- 2) PEG 群：2010 年以降の 13 例には ETV を約 48 週間投与した後、4 週間 PEG-IFN α 2a (ペガシス®、中外製薬)90~180 μ g 週 1 回を併用して中止し、その後 PEG-IFN を 44 週間単独投与した。

治療効果判定

治療効果については、投与終了 24 週の ALT 正常化、HBe 抗原陰性化、HBV DNA < 10⁴ コピー/mL をもって著効とした。

(倫理面への配慮)

この臨床研究はヘルシンキ宣言を遵守し、GCP に基づいて実施している。被検者

の個人情報については、個人情報保護法に基づいて適切に取り扱う。また既に当施設の倫理申請を行い、承認を受けている(受付番号 1092、2186)。

C. 結果

従来型 IFN を用いた sequential 療法による抗ウイルス効果

Non-PEG 群(39 \pm 7 歳、男性 23/24、ALT 257 \pm 203 IU/L、genotype C 23/24、HBs 抗原 3.7 \pm 0.7 Log IU/mL、HBe 抗原陽性 24/24、HBV DNA 7.6 \pm 0.8 Log コピー/mL、F3/F4 17%)における IFN 開始時、IFN 終了時、終了後 6 ヶ月の HBs 抗原の変化(Log)は平均+0.08、-0.21、-0.19、HBe 抗原陰性化は 29%、33%、29%、HBV DNA の変化(Log)は平均-5.5、-4.4、-1.5、HBV DNA < 10⁴ コピー/mL は 100%、71%、21%であった。

PEG-IFN を用いた sequential 療法による抗ウイルス効果

PEG 群(36 \pm 6 歳、男性 8/13、ALT 297 \pm 346 IU/L、genotype C 12/13、HBs 抗原 3.4 \pm 0.6 Log IU/mL、HBe 抗原陽性 10/13、HBV DNA 7.5 \pm 1.5 Log コピー/mL、F3/F4 0%)における PEG-IFN 開始時、開始後 6 ヶ月、PEG-IFN 終了時の HBs 抗原の変化(Log)は平均-0.01、-0.60、-0.90、HBe 抗原陰性化は 20%、60%、57%、HBV DNA の変化(Log)は平均-5.2、-4.5、-4.6、HBV DNA < 10⁴ コピー/mL は 100%、77%、75%であった。PEG 群における IFN

開始後 6 ヶ月の HBs 抗原の低下は、Non-PEG 群に比較して有意に大きかった ($P < 0.05$)。

従来型 IFN と PEG-IFN の抗ウイルス効果の比較

投与終了 6 ヶ月後の効果判定において、Non-PEG 群の 5/24 (21%) に著効が得られた。PEG 群の効果判定可能例における著効は 1/4 (25%) であったが、1 例 (39 歳、男性、治療前 ALT 63 IU/L、HBs 抗原 902 IU/mL、HBe 抗原陰性、HBV DNA 5.0 Log コピー/mL、A1F1) では、PEG-IFN 24 週目に HBs 抗原陰性化が得られ、その後も著効を持続している。

D. 考察

フランスの Serfaty らは、ラミブジン/IFN sequential 治療のプロトコールを考案し報告した (*Hepatology* 2001; 34: 573-7)。彼らはラミブジンを 20 週投与した後、4 週間 IFN を併用して中止し、その後 IFN を 24 週単独投与した。これにはラミブジンにより HBV DNA 量を低下させることにより IFN の効果を増強させる目的と、IFN によりラミブジン中止後の再燃を防ぐ狙いがあると思われる。対象は B 型慢性肝疾患 14 例 (全例 IFN 投与歴あり、HBe 抗原陽性 11 例、肝硬変 5 例) であった。治療終了 24 週の時点で、57% に ALT 正常化、57% に HBV DNA 陰性化 (DNA プローブ法)、45% に HBe 抗原のセロコンバージョン、21% に HBs 抗原のセロコンバージョン

を認め、注目を集めた。しかし、症例数が少ないこと、比較試験でないこと、IFN 反応性の良い genotype A が半数近くを占めることが問題として残された。

我々も 2002 年以來、Serfaty らのグループに準じたプロトコールで HBe 抗原陽性例に対してラミブジン/IFN sequential 治療を行い、2007 年にその成績を報告した (*J Interferon Cytokine Res* 2007; 27: 201-7)。ラミブジンを約 24 週間投与した後、4 週間 IFN を併用して中止し、その後 IFN を 20 週間単独投与したところ、治療終了 24 週後に ALT 正常化かつ HBe 抗原陰性化かつ HBV DNA $< 10^4$ コピー/mL を満たした著効例は、24 例中 7 例 (29%) であった。

2006 年 9 月以降は、エンテカビルを約 48 週間投与した後、4 週間 IFN を併用して中止し、その後 IFN を 20 週間単独投与するプロトコールに変更した。エンテカビルの投与期間をラミブジンより長期に設定した理由は、1) ラミブジンは 6 ヶ月以上投与すると耐性変異の出現が危惧されたが、エンテカビルは少なくとも 1 年以内は耐性が生じないことが分かっていたからと、2) ラミブジン/IFN sequential 治療ではラミブジン投与中の HBe 抗原、HBV DNA の低下が良好な症例ほど治療効果が良かったからである。

更に 2011 年 9 月には B 型慢性肝炎に対して HBe 抗原陽性、陰性に関わらず PEG-IFN α 2a の 48 週投与が承認された。それ以降はエンテカビルを約 48 週間投与した

後、4週間 PEG-IFN を併用して中止し、その後 PEG-IFN を 44 週間単独投与するプロトコールに変更した。そこで今回は特に従来型 IFN を用いた症例と PEG-IFN を用いた症例との比較を行った。

核酸アナログは HBV 複製過程の逆転写を阻害し、またチェーンターミネーターとして DNA 鎖伸長を停止させることによりウイルスの増殖を強力に抑制するが、肝細胞の核内に存在し複製中間体として働く閉環状完全二重鎖 DNA (cccDNA) には直接作用しない。そのため核酸アナログ治療の中止により、HBV は再び増殖し肝炎は高率に再燃する。最近、肝内の cccDNA 量と相関する血清マーカーとして HBs 抗原、HBcr 抗原が注目されている。HBcr 抗原はプレコア/コア領域から翻訳される HB コア抗原、HBe 抗原、p22cr 抗原などの総称であり、そのアッセイ系は本邦で開発された。

核酸アナログ/IFN sequential 治療には、大きく 2 つの目的が考えられる。まず、1) 核酸アナログの中止を目的とするものが挙げられる。核酸アナログで HBe 抗原が陰性化した(または陰性)症例では、厚労省研究班の治療ガイドラインに準拠して sequential 治療を考慮する。ところが核酸アナログを導入した症例は、35 歳以上の IFN 反応性の不良例や肝線維化進行例が多くを占め、実際には HBV DNA の持続的陰性化を目指し核酸アナログを継続することが多い。一方、核酸アナログで HBe 抗原陰性化が得られなくても、IFN

により著効が得られるものも存在し、若年で核酸アナログを導入した症例では sequential 治療を考慮して良いと考える。

2) IFN の効果増強を目的とするものが挙げられる。35 歳未満で過去の IFN 単独療法に反応しなかった症例や、35 歳以上でも IFN 投与歴のない症例には sequential 治療を考慮して良いと考える。

E. 結論

- 1) ETV から PEG-IFN への切り替えによって HBs 抗原低下が得られ、かつその低下率は従来型 IFN を用いた時より有意に大きかった。
- 2) ETV から PEG-IFN への切り替えによって HBV DNA は若干上昇するが、投与中の HBV DNA は従来型 IFN を用いた時より低値に抑えられている。
- 3) PEG-IFN 終了後の長期経過は今後の検討課題であるが、少数例ながら HBs 抗原の陰性化が得られたことは注目される。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

- 1 Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Kobayashi S, Sakaguchi H, Shiomi S, Kim SR, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Kawada N. Entecavir and interferon- α sequential therapy in

Japanese patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. J Gastroenterol. 48: 397-404 (2013).

- 2 Enomoto M, Tamori A, Nishiguchi S, Kawada N. Combination therapy with a nucleos(t)ide analogue and interferon for chronic hepatitis B: simultaneous or sequential. J Gastroenterol. 48: 999-1005 (2013).

学会発表

1. 小塚立蔵, 榎本大, 川村悦史, 萩原淳司, 藤井英樹, 村上善基, 打田佐和子, 岩井秀司, 森川浩安, 田守昭博, 河田則文。B 型慢性肝疾患における核酸アナログ中止後の再燃リスクを規定する因子の検討。第 49 回日本肝臓学会総会 平成 25 年 6 月 6 日 東京都
2. 榎本大, 田守昭博, 河田則文。B 型

慢性肝炎に対する PEG-IFN の早期抗ウイルス効果：Sequential 療法も含めて。第 17 回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション 2「B 型肝炎治療の最前線」 平成 25 年 10 月 10 日 東京都

3. 田守昭博, 榎本大, 河田則文。前向き登録例の長期経過からみた HBV 再活性化対策の現状。第 17 回日本肝臓学会大会 シンポジウム 1「B 型肝炎ウイルス再活性化の予防・治療の現状と課題」 平成 25 年 10 月 10 日 東京都

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
2. その他
なし

厚生労働省難治性疾患対策研究事業
肝炎等克服緊急対策研究事業に関する調査研究班

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

分担研究者 本多 隆 名古屋大学医学部附属病院 助教

研究要旨

B型肝炎症例では自然経過でHBs抗原が消失する予後の良い症例と肝炎が持続して肝硬変、肝癌に至る症例がある。B型慢性肝炎に対する標準的治療には核酸アナログ治療やインターフェロン治療がある。しかしながらB型肝炎に対する核酸アナログ治療やインターフェロン治療を考慮する際、HBe抗体陽性となった症例において、その後ウイルス量が低下して肝炎が沈静化し自然経過で予後の良い、治療介入の必要ない症例と肝炎が持続し肝硬変に進むリスクがあり治療が必要な症例を見極めることが重要になる。HBe抗体陽性の少数例での検討では肝炎が沈静化して治療が必要ない経過となった症例の観察開始時にHBVDNAのCoreのI97Lの変異が高率に認められた。またHBs抗原消失症例でも同様な変異がみられた。

A. 研究目的

B型肝炎のキャリアは世界で約4億人、日本でも約150万人がキャリアであると推計されている。世界でB型肝炎に関連する肝硬変、肝不全、肝癌により年間約100万人が死亡しており世界的にも治療の向上が望まれる疾患である。B型肝炎に対する治療法には核酸アナログ治療やインターフェロン治療があるが、治療を考慮する際HBe抗体陽性となった症例において、その後ウイルス量が低下して肝炎が沈静化し自然経過で予後の良い、治療介入の必要ない症例と肝炎が持続し肝

硬変に進むリスクがあり治療が必要な症例を見極めることが重要になる。

またHBeAg陰性例においてPreCore(PC)領域のG1896Aの変異によりstop codon(TAG)が形成されHBeAgの産生が停止することやBasal Core Promoter(BCP)のA1762T/G1764Aの変異でPreC mRNAの転写効率が低下しHBeAg産生が減少することが報告されている。しかし、PC変異やBCPの変異によりその後の経過を予測することは難しく、自然経過で変動するALT値やHBVDNA変動の時間的推移を勘案し適切な治療開始時を決定するこ

とが勧められている。現在日本の厚生省のガイドラインでB型慢性肝炎 HBe 抗原陰性例では HBVDNA が 4 Logcopies/mL 以上かつ ALT が 31IU/L 以上で治療の介入をすすめている。しかし、retrospective に症例の経過をみると中にはその後、結果的に自然経過で治療が必要なかった症例もあり肝炎が沈静化するかどうか判断するための指標が望まれる。そこで本研究では HBe 抗体陽性症例において、その後の経過と観察開始時の HBVDNA 全塩基配列を比較検討し肝炎が沈静化するウイルス変異を同定することを目標とした。

B. 研究方法

検討 1. 全塩基配列による比較検討。

2 年以上の経過観察ができた慢性 B 型肝炎患者の対象例のうち観察開始時に血清保存がおこなわれている症例を対象とした。(A 群 n=10) 経過中 HBVDNA 5.0 LogIU/mL 以上、ALT 120 IU/mL 以上に上昇した症例。(B 群 n=12) HBVDNA 5.0 LogIU/mL 未満、ALT 60 IU/mL 未満で推移した症例。(C 群 n=13) HBVDNA 4.0 LogIU/mL 未満、ALT 30 IU/mL 未満で推移した症例 (その後 HBsAg が消失した症例も含む) genotype C の合計 35 症例において経過観察開始時の保存血清を用いて、PCR を用いてダイレクトシーケンス法により HBVDNA の全塩基配列を決定し比較検討した。

BCP、PC 領域の変異を各群で比較検討した。また Envelope, Core, X, Polymeras

e 領域においてアミノ酸毎に各群における変異の割合が A 群<B 群<C 群となる変異を抽出し、各群における変異の割合を比較検討した。

検討 2 症例数を増加させ Core での変異の検討。

検討 1 で同定された coreI97L 変異を A, B, C 群に分けて症例数を増加させて Core 領域のダイレクトシーケンスを行い確認した。

患者背景

A 群、B 群、C 群の患者背景は HBVDNA が各群 6.2±1.6, 4.2±0.3, 3.5±0.9 copies/ml であり A 群と比較して B 群、C 群では有意に低値であった。また ALT 値は各群 105.8±1.6, 24.8±10.2, 18.8±6.4 IU/L であり A 群と比較して B 群、C 群では有意に低値であった。性別、年齢、T.Bil 値、Alb 値、血小板値、HBsAg 値において各群間に有意な差を認めなかった。

(倫理面への配慮)

既にこの解析に関する臨床研究は名古屋大学医学部附属病院の倫理委員会より承認されている。

この中で B 型肝炎患者からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮している。また、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供資料や個人情報も適正に管理保存している。