

C. 結果

検討1.

PC, BCP 遺伝子の検討

PCのG1896A変異はA群で50%, B群で63.6%, C群で75.0%とA,B,Cとなるにつれ変異率が増加していたが、各群に有意な差は認められなかった。PC変異 G1899AはA群で10%, B群で9.1%, C群で25.0%とA,B,Cとなり、C群になると変異率が増加していたが、各群に有意な差は認められなかった。一方BCP変異のA1762TはA群で100%, B群で90.9%, C群で63.6%とA,B,Cとなるにつれ変異率が低下している傾向がみられた。

全遺伝子解析の各領域における遺伝子変異割合

Envelope に 3 カ所、Core に 4 カ所、Polymease に 2 カ所 A 群<B 群<C 群の割合で増加する変異がみられた。そのなかで Core I97L の変異は A 群 30%、B 群 50%、C 群 90.9%と B、C 群になるに従い高率に認められた (P=0.0154)。

検討2.

A群n=28内HCC2例、B群n=18内HCC2例、C群n=15と症例数を追加してcore I97L変異を確認したところA群21%、B群50%、C群80%とB、C群になるにつれ変異率が上昇していた。C群15例中4例でS抗原が消失していた。

D. 考察

本研究で得られた HBeAg 陰性である genotype C の B 型慢性肝炎症例 (Plt 低下、HCC 合併例を除く) においてその後 HBVDNA 4.0 LogIU/mL 未満、ALT 30 IU/mL 未満で推移した症例には core I97L の変異が高率に認められていた。

I97L 変異は HBV の core 領域に自然経過中におこる最も頻度の高い変異であることが報告されている。Ehata らは I97L 変異を含む core84-101 の変異は CTL などの免疫応答による肝障害を反映したものと報告した (Ehata et al. JCI 1991.

89:332-338)。その中で HBeAb 陽性例の内 4 例全例では I97L が認められた。またその後の報告では core 84-99 の変異は劇症肝炎などの激しい肝障害と関連していることを明らかにした (Ehata et al. JCI 1993. 91:1206-1213)。

本症例では HBeAg が clearance された HBeAg 抗体陽性例を対象にしているが、Core I97L の変異は HBVDNA 5.0 LogIU/mL 以上、ALT 120 IU/mL 以上に上昇した症例では 30%と変異率は低率であり、一方 HBVDNA 4.0 LogIU/mL 未満、ALT 30 IU/mL 未満で推移した症例には core I97L の変異が高率に認められていた。Ehata らの論文では HBeAb が陽性であるものは 4 例全例で I97L 変異が陽性であった。この違いは以前の測定法では HBVDNA が低値まで測定できなかったため、HBVDNA 4.0 LogIU/mL 未満と低ウイルス量の症例が以前の報告では検討できていない可能性があると思われた。

一方、In vitro の解析では core 領域の I97 は HBVcapsid 粒子の構造や機能への感受性が高く重要な部位であり、I97L への変異により immature secretion が認められている (Bo Ning et al. J of Virology 2004;78:13653-13666)ことから、I97L 変異が認められる症例では HBVNDNA 量が低下してくることが推察できる。以上のことから肝硬変でない HBe 抗体陽性で HBVDNA が 4log copies/mL 未満になっている症例において、Core I97L 変異は B 型肝炎のその後の沈静化を予測するのに有用な可能性がある。

E.結論

Genotype C の B 型肝炎 HBe 抗体陽性例において、治療を選択するためにその後の経過を予測するには、HBVDNA、ALT の値に加えて Core I97L の変異測定が有用になる可能性が示唆された。

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

1. Takashi Honda, Yoshiaki Katano,
Satoshi Nakano, Yoji Ishizu, Teiji
Kuzuya, Kazuhiko Hayashi, Masatoshi

Ishigami, Hidemi Goto. Effect of combination therapy peginterferon alfa-2b and ribavirin on prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C and normal aminotransferase levels DDW2013 May 18, 2013 Orlando

2. 本多 隆、片野義明、後藤秀実。HBe 抗体陽性 B 型肝炎における経過予測に必要なウイルス遺伝子変異の検討。第 49 回日本肝臓学会総会 平成 25 年 6 月 7 日 東京都
3. 本多 隆、片野義明、後藤秀実。高齢者 C 型肝炎に対する PegIFN・Ribavirin・Telaprevir3 剤併用療法の治療効果。JDDW2013 平成 25 年 10 月 7 日 東京都
4. 本多 隆、石上雅敏、新家卓郎、今井則博、阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵一、中野 聡、石津洋二、葛谷貞二、林 和彦、中野 功、石川哲也、片野義明、後藤秀実。C 型肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン 併用療法著効後における発癌例の検討。第 40 回日本肝臓学会西部会 平成 25 年 12 月 6 日 岐阜市

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

抗ウイルス剤投与における薬剤応答性の評価

分担研究者 矢野嘉彦 神戸大学・微生物感染症学講座 講師

研究要旨

B型肝炎ウイルス(HBV)は、慢性肝炎から肝硬変、肝癌を引き起こす発癌ウイルスである。近年さまざまな核酸アナログ製剤をはじめ、抗ウイルス剤が開発され、治療効果が認められているが、ウイルス側の変異による耐性化の問題はいまだ認められる。本研究では、抗ウイルス剤投与下での HBV ゲノムの多種性(quasispecies)を検討することから薬剤応答性および耐性獲得のメカニズムを評価し、新規治療薬開発へつなげていくことを目的としている。神戸大学ではこれまでのインドネシアとの連携共同研究から、検体採取と解析を進めている。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)は、慢性肝炎から肝硬変、肝癌を引き起こす発癌ウイルスである。近年さまざまな核酸アナログ製剤をはじめ、抗ウイルス剤が開発され、治療効果が認められているが、ウイルス側の変異による耐性化の問題はいまだ認められる。本研究では、抗ウイルス剤投与下での HBV ゲノムの quasispecies を検討することから薬剤応答性および耐性獲得のメカニズムを評価し、新規治療薬開発へつなげていくことを目的としている。

B. 研究方法

B型肝炎ウイルスキャリアのインドネシア人

12名の血液検体を使用した。うち治療歴のないインドネシア人7名と抗ウイルス剤(テルビジン)投与中のインドネシア人5名より血液を採取し、B型肝炎患者血清よりHBV-DNAを抽出した。B型肝炎ウイルスの既知の薬剤耐性領域であるポリメラーゼ領域(AA119-306)をPCR direct sequencingにより配列を確認した。同時にIllumina MiSeq Sequencerにより塩基配列を決定した。その結果をGenomics Workbench ver 6.0.1を用いてウイルス quasispecies の検討を行なった。

また本研究では、神戸大学倫理委員会No.1036「インドネシア・ジョクジャカルタにおける肝炎ウイルスの解析」、およびガジャマ

ダ大学の院内倫理委員会の承認を受けており、また両国の血液運搬に関しても大学間でのMTA(material transfer agreement)を交わすなど、倫理面には配慮した上で所定の手続きを経ている。

C. 結果

12 検体の取得リード数は 584,849 ~ 2,159,560(平均1,123,670)、平均カバレッジは 6,411~38,391(平均 17,595)であった。0.5%以上のマイナークローンを有意とすると、既知の薬剤耐性変異とされている領域には、I169L/M $2.81 \pm 0.73\%$, V173A/L/E $2.04 \pm 0.38\%$, L180F/S $1.25 \pm 0.46\%$, T184P/A/S $3.83 \pm 2.06\%$, M204I/L/V $3.00 \pm 1.16\%$, N236S/T/I $2.22 \pm 0.85\%$, M250I $0.75 \pm 0.19\%$ と変異が検出された。このうちテルビブジン使用中の患者において、I169M/L および M204L/I のマイナークローンの変異比率が未治療患者に比べて有意に低かった ($p < 0.05$)。

D. 考察

抗ウイルス剤治療時の薬剤耐性領域の問題については詳細に検討されている。今回の検討でも、既知の薬剤耐性領域の変異が治療前および治療中患者からも検出され、これらの変異が薬剤によって誘導されているというより治療前から存在していることが改めて示された。治療時に誘導される変異については、まだ症例が少なく、検討できた領域

が短いため、今後のさらなる検討を要する段階と思われる。

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

抗ウイルス剤による薬剤応答については、まだ症例を増やし今後の検討を要すると考えられる。

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

タンパク質とリガンド結合情報を活用したインシリコスクリーニング

分担研究者 岩館満雄 中央大学理工学部生命学科准教授

研究要旨

本研究ではタンパク質-リガンド結合情報を活用したインシリコスクリーニング法、また ChEMBL のようなアッセイ実験情報を活用することで、活性値の値を予測する手法を示している。今後 PDB 等のタンパク質立体構造データベースにおいて、タンパク質-リガンド結合情報はますます増加していくと考えられる。さらに、ChEMBL データベースに代表されるアッセイ実験情報も同様に増加していくと考えられる。今後の IT 創薬において、これらの情報を利用することは重要であると考えられ、本研究のような実験情報に基づくインシリコスクリーニング法は有効であると考えられる。

A. 研究目的

基質や薬物などのリガンドが酵素や受容体などのターゲットタンパク質へ結合する関係は、鍵と鍵穴の関係として知られている。近年、バーチャルスクリーニングというコンピュータ上で鍵と鍵穴の関係を選別する技術が多く用いられている。バーチャルスクリーニングには、二つの方法がある。一つはターゲットタンパク質のモデル構造を構築し、リガンド結合サイトなどの、薬剤を結合させたい部位に対して、化合物候補全てをドッキングするようなタンパク質立体構造に基づく方法(SBDD)がある。もう一つは化

合物の特徴抽出からターゲットタンパク質との相互作用認識に必要な薬物分子の3次元空間的配置のようなファーマコホア情報を引き出す方法(LBDD)がある。しかし、これらの手法から得られる結果は線形性を失っており、正確な活性値の予測などが不可能である。さらに、タンパク質立体構造データベース Protein Data Bank(PDB)に存在するタンパク質-リガンド結合情報が増加しており、これらの情報を活用することが出来ていない。さらに ChEMBL のような、創薬研究にとって有用な Structure Activity Relationship(SAR)情報のデータベースの

公開が進んでいる。現在 ChEMBL には 121 万を超える化合物とそれらを用いた 64 万件のアッセイ実験による 1 千万件以上の活性情報が登録されている。しかし、現在行われているバーチャルスクリーニングでは、これらの情報が活用されていない。

本研究では、立体構造既知のタンパク質-リガンド複合体構造、また ChEMBL のような実験情報を利用した新たなインシリコスクリーニングの手法の構築を目的としている。

B. 研究方法

HIV-1 のタンパク質-リガンドペアを元にしたクラスタリング

タンパク質立体構造データベースとして 2013 年 6 月 1 日時点の PDB を使用した。20 残基以上のタンパク質を対象に、配列相同性 95%以上、長さカバー率 90%以上を双方向に要求し、クラスタリングを実行する。作成されたクラスター内において、あるタンパク質をクエリーとした時に、そのタンパク質の持つリガンドを中心とした半径 10 Å以内に存在する残基を切り取り、クラスター内すべてのタンパク質から対応する立体構造部分を同様に切り取る。切り出した構造に対して、総当たりで側鎖まで含めた全原子を対象に RMSD を計算、距離マップを作製した。この距離マップを元に、k-means によるクラスタリングを実行する。図 1 に、クラスタリングの結果の一例を示す。

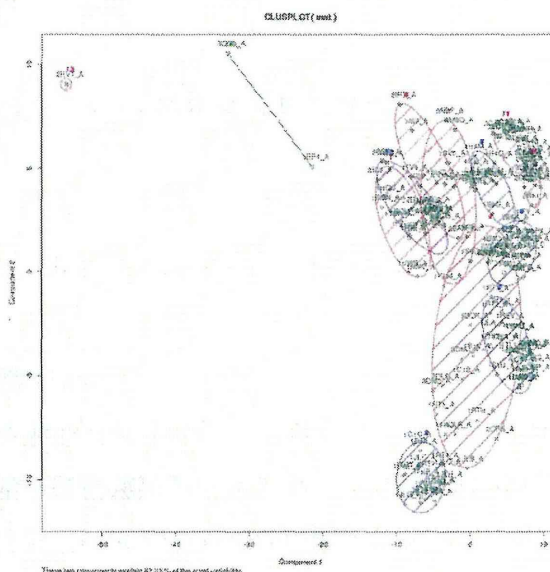


図 1. HIV-1 のタンパク質-リガンドペアを元にしたクラスタリング

クラスタリングの結果作成されたクエリータンパク質の属するクラスターから、ターゲットタンパク質となる代表タンパク質と、クラスター内の各タンパク質の持つリガンド群を得ることが出来る。これらは後述のドッキングシミュレーションに利用される。また、コンフォメーションの異なるタンパク質をクエリーとして同様の処理を行うことで、タイプの異なるターゲットタンパク質とリガンド結合情報を得ることが出来る。これらの情報を元に、chooseLD 法によるターゲット化合物とのドッキングシミュレーションを行う。chooseLD 法は、タンパク質-リガンド結合情報を元に、ターゲットタンパク質とターゲット化合物のドッキングシミュレーションを行う手法である。

ターゲット化合物のデータベースとして、アッセイ実験の情報が掲載されている ChEMBL を利用した。ChEMBL から取得した化合物をターゲット化合物として、クラスタリングによって得たターゲットタンパク質、リガンド結合情報を元に、ドッキングシミュレーションを行った。本研究ではターゲットタンパク質として HIV-1 逆転写酵素と Heat Shock Protein alpha を用いている。例として、以下に HIV-1 逆転写酵素に関する結果を記載する。

C 結果 インシリコスクリーニングにおけるスコアと実験値との相関関係

chooseLD を実行した結果、ターゲット化合物ごとに FPAscore と呼ばれるスコアが算出される。この値が高いほど医薬品としての効能が高いことを示す。この FPAscore と ChEMBL に記載されている活性値を比較する。また、ChEMBL 化合物ごとに様々なアッセイ実験が行われているため、アッセイ実験別に FPAscore と活性値の比較を行った。アッセイ実験は ASSAY ID により分類されている。例として、以下に HIV-1 の ASSAY ID:196180 における FPAscore と活性値(Ki)の結果をグラフで示す。

図2の横軸は FPAscore、縦軸は活性値(Ki)を示している。Ki は酵素と阻害物質の結合反応の平行定数であり、値が低いほど阻害剤としての効果が高いことを示す。図2の結果における相関係数は-0.5522556、

p-value は 0.04058 を示しており、有意な逆相関関係が見られた。

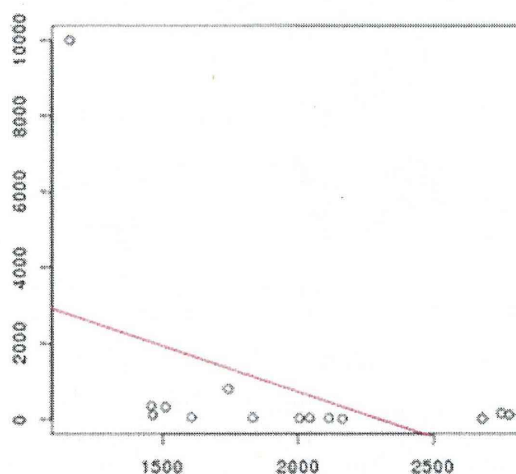
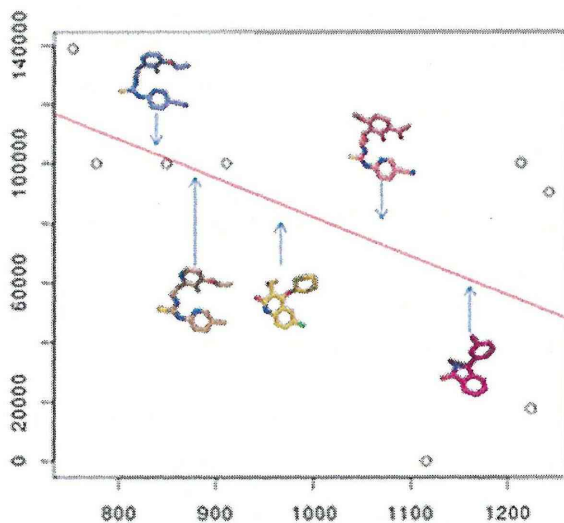


図2. ASSAY ID: 196180 における FPAscore と活性値 (Ki)

同様の処理を HIV-1 逆転写酵素、Heat Shock Protein 90-alpha の全ターゲットタンパク質—リガンド結合情報を用いて、ChEMBL からそれぞれのタンパク質に薬剤効果のある化合物に対してインシリコスクリーニングを実行した。

HIV-1 逆転写酵素のターゲットタンパク質—リガンド結合情報は 13、ChEMBL の活性情報から IC50, EC50, Ki を用いて、それぞれのアッセイデータ数が 3786, 589, 234 件となった。同様に Heat Shock Protein 90-alpha のターゲットタンパク質—リガンド結合情報は 17、IC50, EC50, Ki のアッセイデータ数が 295, 91, 36 件となった。これら全てに対してインシリコスクリーニングを実行することで、各ターゲットタンパク質—リガンド結合情報と ASSAY ID ごとに、図2のような FPAscore



と活性値の相関結果を得ることが出来る。この内、有意に負の相関関係が成立しているものを抽出する。これらのデータから FPAscore と活性情報の線形関係を得ることが出来る。つまり、適切な実験条件や化合物を用いたインシリコスクリーニングを行うことができ、ターゲット化合物の活性値の予測をすることが出来る。

D 考察

今回の例では HIV についての研究であるが、これは収録されているデータが豊富である点からである。HBV への適用の可能性については、未知数である。

E. 結論

タンパク質ーリガンド結合情報を活用したインシリコスクリーニング法、また ChEMBL のようなアッセイ実験情報を活用することで、活性値の値を予測する手法を示した。

我々はこの手法を Experiment Based Drug Design(EBDD)と名付けた。今後 PDB などのタンパク質立体構造データベースにおいて、タンパク質ーリガンド結合情報はますます増加していくと考えられる。さらに、ChEMBL のようなアッセイ実験情報データベースも同様に増加していくに従い IT 創薬において、本研究のような実験情報に基づくインシリコスクリーニング法の有効生が高まっていくと考えられる。

F.健康危険情報

特記事項なし。

G.研究発表

論文発表

4. 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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

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
Tamori A, Hino M, Hagihara A, Kawamura E, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N.	A prospective long-term study of hepatitis B virus reactivation in patients with hematological malignancy.	J Gastroenterol and Hepatol	in press		2014
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.	48	73-73	2014
Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriya 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	58	427-433	2013
Motoyama H, Komiyama 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.	Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver.	Lab Invest	94	192-207	2013

Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Ponsuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuurara K, Tanaka Y, Kurosaki M, Ashahina Y, Izumi N, Kang JH, Higee S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mitata 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.	New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia.	PLoS One.	10	e86449	2014
Tamori A, Kawada N.	HLA class II associated with outcomes of hepatitis B and C infections.	World J Gastroenterol.	19	5395-3401	2013
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
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

1

2
3
4
5 **A prospective long-term study of hepatitis B virus reactivation in patients with**
6 **hematologic malignancy**
7
8

9
10
11 Akihiro Tamori,^{1*} Masayuki Hino,² Etsushi Kawamura,¹ Hideki Fujii,¹ Sawako
12 Uchida-Kobayashi,¹ Hiroyasu Morikawa,¹ Hirohisa Nakamae,² Masaru Enomoto,¹
13 Yoshiki Murakami,¹ and Norifumi Kawada¹
14
15

16
17
18 ¹Department of Hepatology, ²Department of Hematology, Osaka City University
19 Graduate School of Medicine, Osaka, 545-8585, Japan.
20
21

22
23
24
25 *Correspondence to: Akihiro Tamori, MD & PhD, Department of Hepatology, Osaka
26 City University Graduate School of Medicine, 1-4-3, Asahi-machi, Abenoku, Osaka
27 545-8585, Japan.
28
29

30
31 Tel: +81-6-6645-3811

32
33 Fax: +81-6-6646-1433

34
35 e-mail: atamori@med.osaka-cu.ac.jp
36
37
38
39

40
41 **Electronic word count for the abstract:** 246 words

42
43 **Electronic word count for the main text:** 2831 words

44
45 **Number of figures and tables:** 2 figures and 4 tables

46
47 **Running head:** Prospective study for HB reactivation
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2

Abstract

Background & Aims: To elucidate the clinical characteristics of hepatitis B virus reactivation (HBV-R), we performed a prospective long-term study of patients with hematologic malignancy, including both HBV carriers and those with resolved HBV infection.

Patients and methods: 21 patients with hematopoietic stem-cell transplants (HSCT) and 36 patients given rituximab-based chemotherapy were enrolled. Entecavir was administered prophylactically to 8 patients with HBV surface antigen (HBsAg). HBV DNA was measured every month in 49 patients with resolved HBV infection, and preemptive therapy was given to 8 patients with HBV-R.

Results: HBV-R developed in 5 (26%) of 19 patients with HSCT and 3 (10%) of 30 patients given rituximab-based chemotherapy. HBV-R occurred a median of 3 months (range: 2-10) after the end of rituximab-based chemotherapy and 22 months (range: 9-36) after HSCT. HBV-R did not develop in patients with an anti-HBs titer exceeding 200 mIU/ml at baseline. Mutations in the 'a' determinant region with amino acid replacement were detected in 4 of the 8 patients with HBV-R. Preemptive therapy prevented severe hepatitis related to HBV-R. Entecavir treatment was stopped in 4 patients with HBV-R. Since the withdrawal of entecavir, HBV DNA has not been detected in 2 patients persistently positive for antibodies against HBsAg (anti-HBs). No patient had fatal hepatitis.

Conclusions: Proper management of patients with HBsAg or resolved HBV infection prevented fatal hepatitis related to HBV-R in patients who received immunosuppressive or cytotoxic therapy. Entecavir could be safely discontinued in patients with HBV-R who had acquired anti-HBs.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Keywords: anti-HBs, HBV DNA, HBV reactivation, prospective study.

List of abbreviations: HBV-R, hepatitis B virus reactivation; HSCT, hematopoietic stem-cell transplants; HBsAg, HBV surface antigen; anti-HBs, antibodies against HBsAg; anti-HBc, antibodies against hepatitis B virus core antigen; real-time PCR, real-time polymerase chain reaction; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ALT, alanine aminotransferase.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

4

Introduction

Hepatitis B virus (HBV), a circled DNA virus with approximately 3000 bases, causes liver disease in humans, including acute hepatitis, chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma [1, 2]. HBV viral loads in serum are regulated by both viral replication and host immunity. It is well known that HBV reactivation (HBV-R) occurs in patients who receive immunosuppressive or cytotoxic therapy and in patients after transplantation, particular in those who receive allogeneic or autologous hematopoietic stem-cell transplants [3-7]. HBV-R is generally defined as a consecutive more than 1-log increase in the serum HBV DNA level in patients with previously inactive or resolved HBV infection [8, 9]. In patients with HBV-R, hepatitis flare can occur, leading to hepatic failure [10]. *De novo* hepatitis is defined as a hepatitis flare caused by HBV-R in patients negative for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg).

Screening and prophylaxis for HBV-R in patients who receive cytotoxic therapy have been recommended by several groups of hepatologists [11-13]. However, it remains unclear how long such patients should be observed. A meta-analysis has suggested that prophylactic treatment with lamivudine, a nucleoside analogue with very potent anti-HBV replication activity, might reduce the risk of HBV-R and HBV-associated morbidity and mortality [14]. As compared with entecavir, prolonged treatment with lamivudine has a higher risk of viral breakthrough owing to the emergence of viral variants with reduced sensitivity to the drug, resulting from mutations in the YMDD locus of the HBV polymerase gene. Entecavir is speculated to be more suitable for patients with HBV-R who require more than 1 year of treatment. Recently, retrospective studies have shown that entecavir is more effective than lamivudine as prophylactic therapy for HBV-R [15, 16].

5

To our knowledge, there were few prospective long-term studies have evaluated outcomes after prophylactic therapy in patients with HBsAg or preemptive therapy in patients without HBsAg. In particular, the endpoint of the nucleoside analogue therapy remains uncertain in patients with HBV-R. We performed this prospective study to elucidate the prevalence of HBV-R on regular screening and the characteristics of patients with HBV-R. We also evaluated the effectiveness of entecavir for HBV-R and assessed the risk of HBV reappearance after the end of entecavir treatment.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

6

Patients and Methods

Enrolled patients and management

In 2007 we organized a project team to perform a prospective study of HBV-R in patients with hematologic malignancy in Osaka City University Hospital. Before the start of rituximab-based chemotherapy or hematopoietic stem-cell transplantation (HSCT), HBsAg, antibodies against hepatitis B virus core antigen (anti-HBc), and antibodies against HBsAg (anti-HBs) in sera of the patients were tested by chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA; Fujirebio Inc., Tokyo Japan). Patients positive for one or more HBV serum-marker were enrolled in the study. After enrollment, HBV DNA was measured by a real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)-based method (COBAS *TaqMan PCR*, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) [17]. The quantified range of the real-time PCR assay was between 2.1 and 8.8 log copies/ml. Patients with hepatitis C virus, alcoholic liver disease, primary biliary cirrhosis, or autoimmune liver disease were excluded. HBV DNA was regularly measured every month, from the start of chemotherapy or the time of HSCT to 1 year after the end of therapy. After monthly screening, HBV DNA was measured once every 3 months. In patients in whom HBV DNA was detected, HBV genotype was identified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region (Institute of Immunology, Tokyo, Japan), as described elsewhere [18]. Prophylactic or preemptive treatment against HBV-R-associated hepatitis was given to patients with a serum HBV DNA level exceeding 2.1 log copies/ml; such patients received 0.5 mg entecavir per day. Treatment with entecavir was discontinued after more than 6 months had elapsed from the disappearance of both HBsAg and HBV DNA in serum. In the present study, HBV-R

7

was defined as more than a 1-log increase in the serum HBV DNA level as compared with the value at enrollment or as a serum HBV DNA level higher than 2.1 log copies/ml.

Fifty-seven patients (23 women and 34 men) were enrolled from November 2007 through January 2013. The mean age was 60 years (range, 23-82). Eight patients were positive for both HBsAg and anti-HBc, 43 were positive for both anti-HBs and anti-HBc, and 6 were positive for only anti-HBc (Table 1). No patient had a history of HBV vaccination. The mean follow-up was 16 months (range, 4-63). Seven patients died within less than 1 year because of progression of hematologic malignancy or infection without HBV.

Sequencing of HBV DNA

In patients with HBV-R, the nucleotide sequences of HBV polymerase coding area were determined by the direct sequencing method after nested PCR amplification [19].

Briefly, HBV DNA was extracted from 200 µl of serum and was amplified as 2 overlapping fragments, A (nucleotide [nt] 271–1,941) and B (nt 1,679–335), with the use of an Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

To amplify fragment A, primers HBMF1 (5'-YCCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3') and 1972R (5'-AAAGAATTCAGAAGGCAAAAAGA-3') were used for the first-round PCR, and primers HBMF2 (5'-GTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTC-3') and n1941R (5'-CAGAAGCTCCAAATCTTTATA-3') were used for the second-round PCR. To amplify fragment B, primers 1653F (5'-CATAAGAGGACTCTTGGACT-3') and HBMR2 (5'-AAGCCAXACARTGGGGGAAAGC-3') were used for the first-round PCR, and primers 1679F (5'-AATGTCAACGACCGACCTTG-3') and 335R (5'-TGAYTGGAGRTTKGGGACT-3') were used for the second-round PCR. Each PCR