

かりとなる可能性が考えられる。

- 3) HCV 排除後、lncRNA-H の発現が低下する患者と低下しない患者が存在した。今後 HCV 排除後の lncRNA-H の発現量の変化と、HCV 排除後の肝発癌との関連に関する検討を行う。すなわち lncRNA-H は HCV 排除後の肝発癌に関するバイオマーカーとなり得る可能性が考えられ、その観点から今後も症例数を増やして検討を行う。
- 4) 肝内、および血清の lncRNA-H の発現量は、インターフェロン療法難治性である IL28B minor 群において、感受性である major 群より高値であった。lncRNA-H は、インターフェロン治療抵抗性に関与している可能性が示唆された。また IL28B ゲノタイプ同様にインターフェロン療法の治療効果予測に有用である可能性が示唆された。

E. 結論

In vivo においても in vitro と同様に HCV 感染による lncRNA-H の発現誘導を認めた。

また IL28B ゲノタイプマイナー患者の肝内、血清中 lncRNA-H 発現量はメジャー患者に比べて有意に高値であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

論文発表

- 1) Selitsky SR, Baran-Gale J, Honda M, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, Shirasaki T, **Shimakami T**, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM, Sethupathy P.

Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. *Sci Rep.* 2015 Jan 8;5:7675.

- 2) Shirasaki T, Honda M, **Shimakami T**, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway. *Hepatology.* 2014 Nov;60(5):1519-30.
- 3) Yamane D, McGivern DR, Wauthier E, Yi M, Madden VJ, Welsch C, Antes I, Wen Y, Chugh PE, McGee CE, Widman DG, Misumi I, Bandyopadhyay S, Kim S, **Shimakami T**, Oikawa T, Whitmire JK, Heise MT, Dittmer DP, Kao CC, Pitson SM, Merrill AH Jr, Reid LM, and Lemon SM. Regulation of the hepatitis C virus RNA replicase by endogenous lipid peroxidation. *Nature Medicine.* 2014 Aug;20(8):927-35.
- 4) Li Y, Masaki T, **Shimakami T**, Lemon SM. hnRNP L and NF90 Interact with Hepatitis C Virus 5'-Terminal Untranslated RNA and Promote Efficient Replication. *J Virol.* 2014 Jul 1;88(13):7199-7209.
- 5) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. *Sci Rep.* 2014 Apr 15;4:4688.

- 6) Honda M, Shirasaki T, **Shimakami T**, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. *Hepatology*. 2014 Mar;59(3):828-38.
- 7) Spaniel C, Honda M, Selitsky SR, Yamane D, **Shimakami T**, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM. microRNA-122 abundance in hepatocellular carcinoma and non-tumor liver tissue from Japanese patients with persistent HCV versus HBV infection. *PLoS One*. 2013 Oct 9;8(10):e76867
- 8) Shirasaki T, Honda M, **Shimakami T**, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *J Virol*. 2013 May;87(9):5270-86.
- 9) Welsch C, **Shimakami T**, Hartmann C, Yang Y, Domingues FS, Lengauer T, Zeuzem S, Lemon SM. Peptidomimetic escape mechanisms arise via genetic diversity in the ligand-binding site of the hepatitis C virus NS3/4A serine protease. *Gastroenterology*. 2012. 142(3):654-63
- 10) Welsch C, Schweizer S, **Shimakami T**, Domingues FS, Kim S, Lemon SM, Antes I. Ketoamide resistance and hepatitis C virus fitness in val55 variants of the NS3 serine protease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012. 56(4):1907-15.
- 11) **Shimakami T**, Yamane D, Welsch C, Hensley L, Jangra RK, Lemon SM. Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus. *J Virol*. 2012. 86(13):7372-83.
- 12) **Shimakami T**, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, Lemon SM. Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. 109(3):941-6.
- 書籍発表
- 1) **島上哲朗**、酒井明人、金子周一 C型肝炎、肝硬変患者、キャリアのフォローアップ戦略とエビデンス 日本臨床 2015年1月 73巻増刊号1、788-92
- 2) **島上哲朗**、山根太典、Lemon S miR-122-Ago2複合体によるC型肝炎ウイルスRNAの安定化、2012年、実験医学、30:1444-8
2. 学会発表
- 国内学会
- 1) **島上哲朗**、本多政夫、金子周一 IL28B Genotype, ISGs発現量, 前治療反応を用いたテラプレビル併用抗HCV療法における治療効果予測と至適治療期間に関する検討 第50回日本肝臓学会総会 シンポジウム1-8 (2014年5月東京)
- 2) **島上哲朗**、本多政夫、金子周一 前治療無効例に対するテラプレビル併用3剤併用療法48週間延長投与に関する検討 第

100回日本消化器病学会総会 シンポジウム6-9 (2014年4月東京)

- 3) 島上哲朗、本多政夫、金子周一. プロテアーゼ阻害剤耐性C型肝炎ウイルスのRNA複製能・感染性粒子産生能に関する検討、第48回日本肝臓学会総会、2012年6月

国際学会

- 1) Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Liu F, Funaki M, Murai K, Shiimoto T, Murakami S, and Kaneko S. Regulation of Hepatitis C Virus Infection by Long Non-Coding RNAs. The Liver Meeting 2014(65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease)(2014年11月ボストン)Poster 1776
- 2) Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Liu F, Funaki M, Murai K, Shiimoto T, Murakami S, and Kaneko S. Regulation of Hepatitis C Virus Infection by Long Non-Coding RNAs. 21st International Symposium on Hepatitis C Viruses (2014年9月バンフ) Poster P3.66
- 3) Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Murakami S, and Kaneko S. ACYCLIC RETINOID, PERETINOIN, INHIBITS HEPATITIS C VIRUS REPLICATION AND INFECTIOUS VIRUS RELEASE IN CELL CULTURE. The 49th Meeting of the European Association for the Study of the Liver (2014年4月ロンドン) Poster 1701
- 4) Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Funaki M, Takabatake R, Lemon SM, and Kaneko S. Acyclic Retinoid, Peretinoin,

Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Cell Culture, The 64rd AASLD2013, Poster, 2013年11月(ワシントン)

- 5) Shimakami T, Yamane D, Honda M, Kaneko S, and Lemon SM. miR-122 stabilizes Hepatitis C Virus RNA by an Ago2-dependent mechanism, The 10th single topic conference, Poster, 2012年11月 (東京)
- 6) Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Funaki M, Takabatake R, Lemon SM, and Kaneko S. Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Acyclic Retinoid, The 63rd AASLD2012, Poster, 2012年11月(サンフランシスコ)

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）]

分担研究報告書

C型肝炎ウイルス感染特異的な長鎖ノンコーディングRNAの探索

研究分担者：白崎 尚芳 金沢大学医薬保健研究域保健学系 助教

研究要旨：現在C型慢性肝炎に対する標準治療は、従来のペグインターフェロンとリバビリン併用療法に加え、プロテアーゼ阻害剤を加えた3剤併用療法となり、HCV排除率は70-80%にまで向上した。しかし、今後プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスによるbreakthrough肝炎、またインターフェロンの副作用などによる治療困難例への対策が必要となる。そのため既存治療とは異なる作用機序の新規抗HCV療法の開発が急務と考えられる。さらに抗HCV療法の中心薬であるインターフェロン治療効果予測因子の検索、またインターフェロン治療抵抗性機序の解明が急務と考えられる。

近年、200塩基以上のlong non-coding RNA (lncRNA)が、様々な疾患・病態において重要な役割を果たしていることが報告されている。短鎖non-coding RNA (ncRNA)である肝特異的microRNA、microRNA-122(miR-122)によるHCV複製制御機構はC型肝炎ウイルス（以下HCV）の培養細胞系において明らかとなった（Shimakami et al, PNAS, 2012）。その後miR-122に対するアンチセンス療法の有用性は、HCV感染チンパンジー、およびC型肝炎患者に対して施行されたPhase2a臨床試験においても明らかとなった。

今回の検討では、HCV複製を制御しうるlncRNAを同定し、その機能的役割を解明することを目的とした。次世代シーケンス法を用いて、HCV感染培養細胞由来RNAを網羅的に解析し、HCV感染特異的に発現が変化するlncRNAを探索した。その結果HCV感染特異的に発現誘導されるlncRNA (lncRNA-H)を同定した。lncRNA-Hに対するsiRNAを作成し、HCV感染培養細胞に導入することで、lncRNA-Hノックダウン細胞を作成した。lncRNA-Hノックダウン細胞では、HCV複製及び感染性粒子産生能が顕著に抑制された。このHCV抑制効果はHCVの種々のゲノタイプにおいても同様であった。更に、lncRNA-Hノックアウト細胞を作成しHCV複製を検討した結果、lncRNA-Hノックアウト細胞ではHCV複製はほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。HCV感染におけるlncRNA-Hの発現誘導は転写因子c-Junを介していることを示唆する結果を得た。以上の結果から、lncRNA-Hは、HCV複製により発現誘導するlncRNAであり、このlncRNA-Hの発現を抑制させることでHCV複製を顕著に抑制させることが出来たことから、HCV感染に対する新しい標的となり得る可能性があることが示唆される。

A. 研究目的

- 1) HCV 感染特異的に発現が増減する lncRNA を探索する。さらにそれらの lncRNA の中から HCV 複製および感染を制御する lncRNA を同定する。
- 2) 同定した lncRNA による HCV 複製制御機構を解明する。
- 3) HCV 感染による lncRNA の発現誘導機序を解明する。

B. 研究方法

- 1-1) 細胞培養感染クローンである、遺伝子型 I a H77S 株と II a JFH1 株のキメラである HJ3-5 株をヒト肝癌細胞株 (Huh7.5) に感染させ経時的に細胞全 RNA を回収した。感染 24 時間後に NS5A 阻害剤を投入し、その 48 時間後に同様に RNA を回収した。さらにコントロールとして、HCV 感染なしの細胞から RNA を回収した。
- 1-2) これらの RNA のうち polyA 有する RNA のみ選択的に増幅し、次世代シーケンサー (illumina HiSeq2000) を用いて解析を行った。
- 1-3) 上記により発現が認められた RNA のうち既存の遺伝子データベースと照合を行い lncRNA のみ抽出した。その中から HCV 感染特異的に発現誘導される lncRNA を 26 個同定した。
- 1-4) 上記の lncRNA 26 個に対する siRNA を 2-3 個作成し、HCV 感染培養細胞に導入し、HCV 複製における役割を検討した。
- 2-1) 細胞培養感染クローンである、遺伝子型 IIa JFH1 株のキメラ (HJ3-5

株) をヒト肝癌細胞株 (Huh7.5 及び FT3-7) に種々の MOI (0.01, 0.1, 1) で感染させ、感染 24、36、48、72、96 時間後に細胞全 RNA を回収した。qRT-PCR 法にて HCV RNA 及び lncRNA-H の発現量を測定した。

- 2-2) lncRNA-H に対する siRNA を 3 種類作成した。HCV 持続複製細胞に siRNA を導入し、HCV 複製に与える影響を検討した。siRNA 導入後、継時的に全 RNA 及び培養上清を回収し qRT-PCR 法にて HCV RNA 及び lncRNA-H の発現量を、Gaussia Luciferase 法により HCV 複製を測定した。
- 2-3) 上記の結果から、最も強く lncRNA-H の発現を抑制する siRNA (si-lncRNA-H-3) に対する濃度依存実験を行った。
- 2-4) 細胞培養感染クローンであるゲノタイプ Ia 型 H77S 株、Ib 型 N 株に対しても同様の実験を行い、HCV ゲノタイプの違いにおける lncRNA-H の HCV 複製に与える影響を検討した。
- 2-5) siRNA を用いて lncRNA-H ノックダウン細胞を作成し、その細胞に HCV 感染クローンである、遺伝子型 IIa JFH1 株のキメラ (HJ3-5 株) 感染させた。その後、培養上清を Huh7.5 細胞に処置し 72 時間後、96 時間後の HCV-core 蛋白質陽性細胞を算出し、感染性粒子産生能を評価した。
- 2-6) lncRNA-H の HCV 複製制御機序をより詳細に解明するため恒常的 lncRNA-H ノックアウト細胞を作成した。ノックアウト細胞は Zinc Finger

Nuclease システムを用いて lncRNA-H 特異的な遺伝子切断を行った。細胞はブラストサイジン耐性株を選択的に培養することによりクローン化した。lncRNA-H ノックアウト細胞に HCV 感染クローンである HJ3-5Gluc2A 株を感染させ経時的に HCV 複製をモニターした。

3-1) Huh7.5 細胞に c-Jun の発現プラスミドを導入し c-Jun 過剰発現細胞を作成した。上記の細胞に HCV を感染させ lncRNA-H の発現を検討した。更に抗 HCV 薬であるシメプレビルを処置し、HCV 複製を抑制させたときの lncRNA-H の発現を検討した。

(倫理面への配慮)

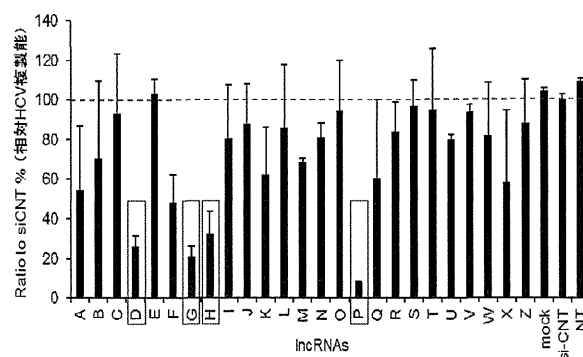
本研究では感染性粒子を産生しうる HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。

またヒトゲノム・遺伝子解析研究が必要になった場合にはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、インフォームドコンセントを得た症例の試料のみを用いて研究を行う。

C. 研究結果

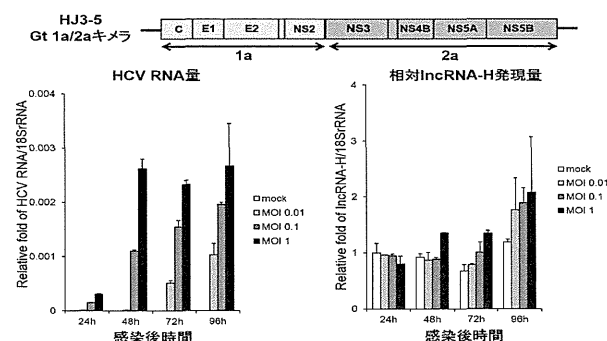
1) 次世代シーケンス法による解析から HCV 感染特異的に発現が増加している lncRNA 候補 26 個 (A~Z) を抽出した。次に各々の lncRNA に対する siRNA を 2~3 個作成し、HCV 複製培養細胞に遺伝子導入することで lncRNA の発現を抑制し、HCV 複製に与える影響を検討した結果、lncRNA-D, G, H, P の発現抑制により HCV 複製の著明な抑制を認めた(図 1)。その中で既に lncRNA として GeneBank に登録されている lncRNA-H に着目してその後の解析を行った。

図 1 lncRNA-A-Z における HCV 複製制御



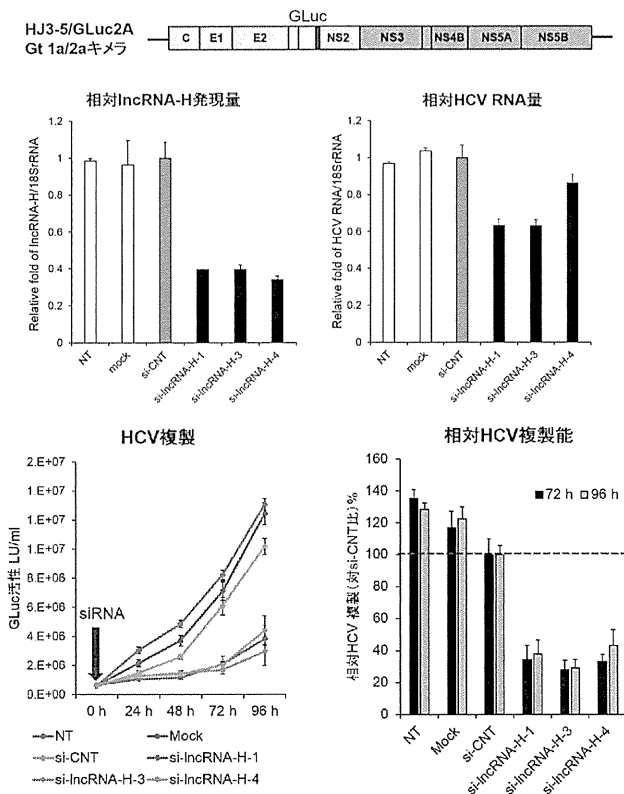
2-1) HCV 感染により lncRNA-H の発現は感染ウイルス量及び時間依存的に増加した。感染 96 時間後では 24 時間後に比べおよそ 2 倍の lncRNA-H の発現増加を認めた(図 2)。

図 2 HCV 感染による lncRNA-H の発現誘導



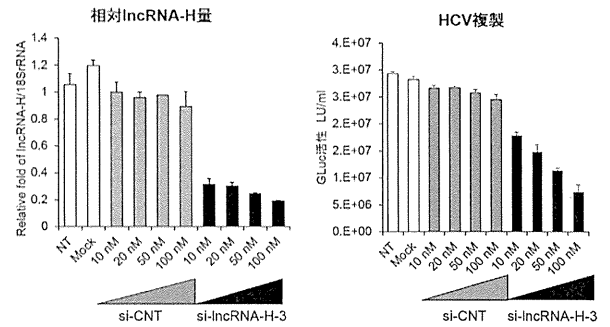
2-2) lncRNA-H に対する siRNA を 3 種類作成した。lncRNA-H の発現を抑制し、HCV 感染に与える影響を検討した。その結果、3 種類の siRNA 全てで lncRNA-H の発現抑制を認めた。lncRNA-H の発現抑制下では HCV の複製は有意に抑制された。si-lncRNA-H-3 に最も強い抑制効果が認められた (図 3)。

図 3 lncRNA-H の発現抑制による HCV 複製抑制

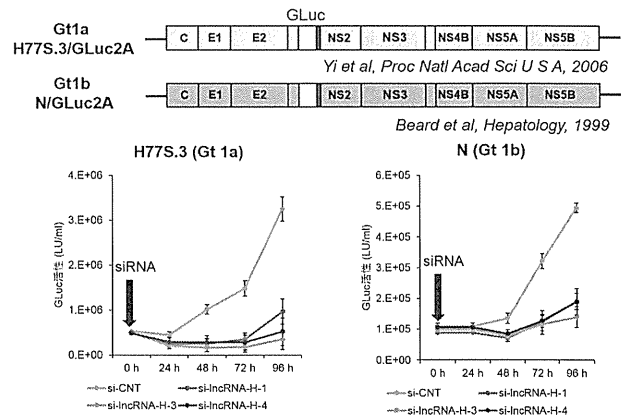


2-3) 最も強く lncRNA-H の発現を抑制する siRNA (si-lncRNA-H-3) を種々の容量 (10nM~100nM) で処置し HCV 複製を測定した結果、siRNA 用量依存的に HCV 複製を抑制した。100nM 処置により HCV 複製を 5 分の 1 まで抑制することが出来た (図 4)。

図 4 lncRNA-H の発現抑制による HCV 複製抑制

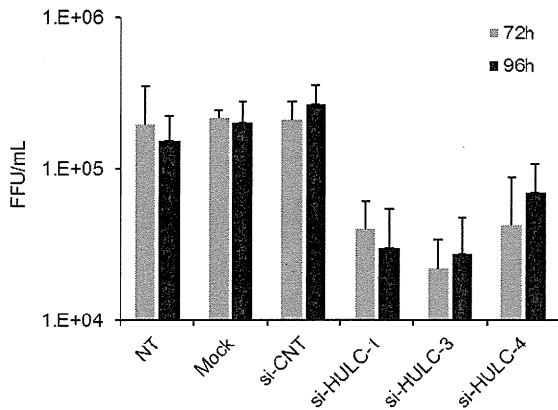


2-4) 異なる HCV ゲノタイプである感染クローン Ia H77S 株、Ib N 株に対しても lncRNA-H の発現を抑制することで、HCV 複製を有意に抑制した (図 5)。図 5 lncRNA-H による Gt1a, 1b HCV に対する複製抑制



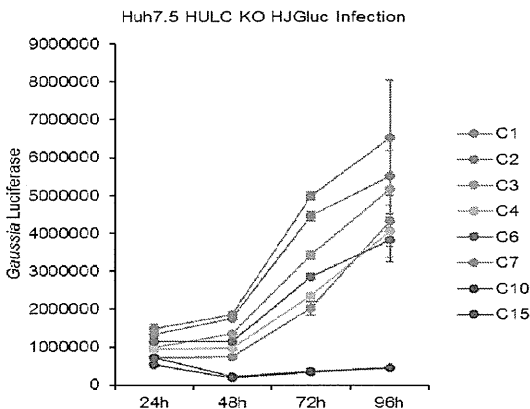
2-5) lncRNA-H ノックダウン細胞では HCV の感染性粒子産生能が顕著に減少した。lncRNA-H は HCV 複製のみならず感染性粒子産生能にも影響を与える lncRNA である (図 6)。

図 6 lncRNA-H の発現抑制の感染性粒子産生に与える影響



2-6) Huh7.5 細胞の lncRNA-H 恒常的ノックアウト細胞を作成しクローン化した (Huh7.5-lncRNA-H KO C-10, C15)。この細胞では、HCV 複製は顕著に抑制された (図 7)。

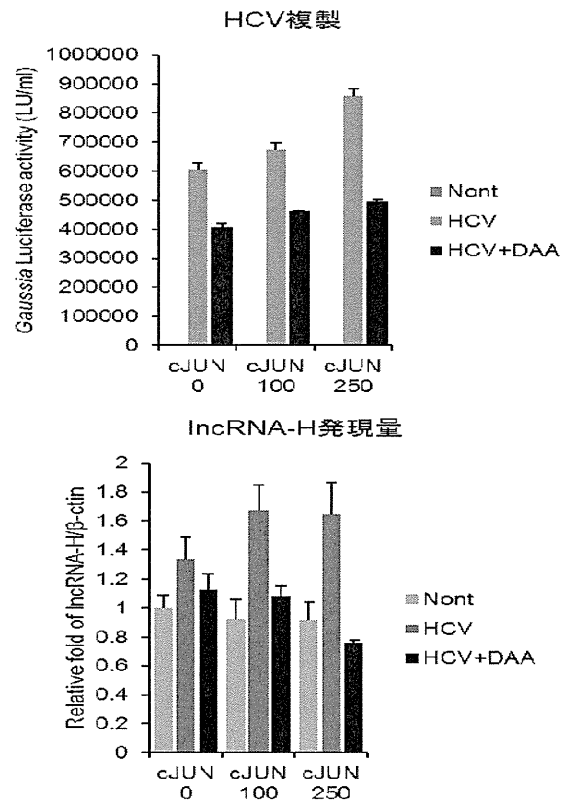
図 7 lncRNA-H ノックアウト細胞における HCV 複製



3) lncRNA-H のプロモータ領域の解析から c-Jun (AP1) 結合領域が存在することをみいだした。そのため c-Jun に着目し、HCV 感染による lncRNA-H 発現抑制機序の解明を行った。c-Jun の過剰発現により用量依存性の HCV 複製の増強を認めた。また HCV 感染なしの細胞では c-Jun の過剰発現を行っても lncRNA-H の発現誘導は認めなかったが、HCV 感染を伴った場合は著明な lncRNA-H の誘導

を認めた (図 8)。

図 8 c-Jun を介した lncRNA-H の発現誘導



D. 考察

本研究は HCV 感染特異的 lncRNA を同定しその機能的役割を解明することを目的とした。次世代シーケンサーを用いた検討から、HCV 感染特異的に発現誘導される lncRNA を 26 個同定し、siRNA を用いた検討から HCV 複製を制御しうる lncRNA を 4 個同定した。それら lncRNA の中で本研究は lncRNA-H に着目した。lncRNA-H は、HCV 複製により発現誘導する lncRNA でありその発現誘導は c-Jun を介していることが示唆された。lncRNA-H ノックアウト細胞における HCV 複製の顕著な抑制やノックダウン細胞における感染性粒子産生能の著明な抑制効果から、lncRNA-H は HCV 複製に必須な lncRNA であることが強く示唆さ

れる。よって新規治療標的の候補となる可能性が十分に考えられる。

E. 結論

HCV 感染特異的に発現誘導される lncRNA を同定した。更にその lncRNA は HCV 感染を制御し、HCV の生活環に必須な lncRNA である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway. *Hepatology*. 2014 Nov;60(5):1519-30
- 2) Shimakami T, Honda M, **Shirasaki T**, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. The Acyclic Retinoid Peretinoin Inhibits Hepatitis C Virus Replication and Infectious Virus Release in Vitro. *Scientific Reports*. 2014 Apr15;4:4688
- 3) Honda M, **Shirasaki T**, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. *Hepatology*. 2014 Mar;59(3):828-838

- 4) Takayama H, Misu H, Iwama H, Chikamoto K, Saito Y, Murao K, Teraguchi A, Lan F, Kikuchi A, Saito R, Tajima N, **Shirasaki T**, Matsugo S, Miyamoto K, Kaneko S, Takamura T. Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P Gene via an AMP-activated Kinase (AMPK)/FoxO3a Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2014 Jan;289(1):335-345.
- 5) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *Journal of Virology*. 2013 May;87(9):5270-5286.
- 6) Okada H, Honda M, Jean S. Campbell, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, **Shirasaki T**, Takabatake R, Nakamura M, Sunakozaka H, Tanaka T, Nelson Fausto, Kaneko S. Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. *Cancer Research*. 2012 Sep;72(17):4459-71

2. 学会発表

国内学会

- 1) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Murakami S, Kaneko S. A secretory protein specifically induced by IL28B regulates interferon response. 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月

2) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Okada H, Murakami S, Kaneko S. Gene expression profile of primary hepatocyte and differential innate antiviral response of IFN- α and IL28B. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月

3) **白崎尚芳**, 本多政夫, 金子周一. 慢性C型肝炎におけるIFN治療抵抗性とTGF- β シグナル 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2012年6月

国際学会

1) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Misu H, Takamura T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. LECT2 Specifically Induced by IL28B Regulates Interferon Response and HCV Replication. 65th AASLD 2014, 2014年11月

2) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Misu H, Takamura T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. LECT2 Specifically Induced by IL28B Regulates Interferon Response and HCV Replication. HCV meeting 2014, 2014年10月

3) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway. The 64th AASLD 2013, 2013年11月

4) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S.

Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway. HCV meeting 2013, 2013年10月

5) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Okada H, Lemon S, Murakami S, Kaneko S. Gene expression profile of primary hepatocyte and differential innate antiviral response of IFN- α and IL28B. The 63rd AASLD 2012, 2012年11月

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
島上哲朗、 酒井明人、 金子周一	C型肝炎、肝硬変患者 、キャリアのフォロー アップ戦略とエビ デンス	工藤正俊	日本臨牀増刊号 最新肝臓病学	日本臨牀社	大阪	2015年	73巻増刊 号 1,788-92
島上哲朗、 山根大典、 Stanley Lemon	miR-122-Ago2複合体 によるC型肝炎ウイ ルスRNAの安定化	一戸敦子	実験医学	羊土社	東京	2012年	1444-8

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
Selitsky SR, Baran-Gale J, Honda M, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, Shirasaki T , Shimakami T , Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM, Sethupathy P	Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C	Scientific Reports	5	7675	2015
Shirasaki T , Honda M, Shimakami T , Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S	Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway	Hepatology	60	1519-30	2014
Yamane D, McGivern DR, Wauthier E, Yi M, Madden VJ, Welsch C, Antes I, Wen Y, Chugh PE, McGee CE, Widman DG, Misumi I, Bandyopadhyay S, Kim S, Shimakami T , Oikawa T, Whitmire JK, Heise MT, Dittmer DP, Kao CC, Pitson SM, Merrill AH Jr, Reid LM, and Lemon SM	Regulation of the hepatitis C virus RNA replicase by endogenous lipid peroxidation	Nature Medicine	20	927-35	2014
Li Y, Masaki T, Shimakami T , Lemon SM.	hnRNP L and NF90 Interact with Hepatitis C Virus 5'-Terminal Untranslated RNA and Promote Efficient Replication	Journal of Virology	88	7199-209	2014
Shimakami T , Honda M, Shirasaki T , Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S	The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro	Scientific Reports	4	4688	2014

Honda M, Shirasaki T , Shimakami T , Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Kaneko S	Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes	Hepatology	59	828-38	2014
Takayama H, Misu H, Iwama H, Chikamoto K, Saito Y, Murao K, Teraguchi A, Lan F, Kikuchi A, Saito R, Tajima N, Shirasaki T , Matsugo S, Miyamoto K, Kaneko S, Takamura T.	Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P Gene via an AMP-activated Kinase (AMPK)/FoxO3a Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes.	The Journal Of Biological Chemistry	289	335-45	2014
Spaniel C, Honda M, Selitsky SR, Yamane D, Shimakami T , Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM	microRNA-122 abundance in hepatocellular carcinoma and non-tumor liver tissue from Japanese patients with persistent HCV versus HBV infection	PLoS One	8	e76867	2013
Shirasaki T , Honda M, Shimakami T , Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S	MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells	Journal of Virology	87	5270	2013
Welsch C, Shimakami T , Hartmann C, Yang Y, Domingues FS, Lengauer T, Zeuzem S, Lemon SM.	Peptidomimetic escape mechanisms arise via genetic diversity in the ligand-binding site of the hepatitis C virus NS3/4A serine protease	Gastroenterology	142	654-63	2012
Welsch C, Schweizer S, Shimakami T , Domingues FS, Kim S, Lemon SM, Antes I	Ketoamide resistance and hepatitis C virus fitness in val55 variants of the NS3 serine protease	Antimicrobial Agents Chemotherapy	56	1907-15	2012
Shimakami T , Yamane D, Welsch C, Hensley L, Jangra RK, Lemon SM	Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus	Journal of Virology	86	7372-83	2012
Shimakami T , Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, Lemon SM.	Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex	Proc Natl Acad Sci U S A	109	941-6	2012
Okada H, Honda M, Jean S. Campbell, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, Shirasaki T , Takabatake R, Nakamura M, Sunakozaka H, Tanaka T, Nelson Fausto, Kaneko S	Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development	Cancer Research	72	4459-71	2012

IV. 研究成果の刊行物・別刷

日本臨牀 73 卷 増刊号 1 (2015 年 1 月 20 日発行) 別刷

最新肝癌学

—基礎と臨床の最新研究動向—

XV 特 論

C 型肝炎・肝硬変患者，キャリアのフォローアップ
戦略とエビデンス

島上哲朗 酒井明人 金子周一

C型肝炎・肝硬変患者，キャリアのフォローアップ戦略とエビデンス

Strategy and evidence for the follow-up for the patients with HCV-related liver diseases

島上 哲朗¹

酒井 明人²

金子 周一¹

Key words : C型肝炎ウイルス, C型慢性肝炎, C型肝硬変, 肝癌.

はじめに

C型慢性肝疾患患者のフォローアップの目的は主に2点と考えられる。1点目は、患者個々の年齢や肝線維化を考慮した発癌リスク、合併症、社会的背景、年々進歩する抗ウイルス薬の承認状況などを総合的に判断して適切な時期に適切な抗ウイルス療法を導入することである。2点目は、C型慢性肝疾患患者は肝癌の高リスク群であり、肝癌の早期発見を念頭に置いたサーベイランスである。また今後、C型慢性肝疾患に対する複数の経口抗ウイルス薬の登場によりウイルス排除率は90%以上となることが予測され、ウイルス排除後のフォローアップの方法も議論されるべきである。

本稿では、抗ウイルス療法導入を念頭に置いたC型慢性肝疾患患者のフォローアップ、肝発癌を念頭に置いたフォローアップ、また石川県で行っているC型慢性肝疾患患者のフォローアップシステム、およびウイルス排除後のフォローアップに関する戦略とエビデンスを概説する。

1 抗ウイルス療法導入を念頭に置いたC型慢性肝疾患患者のフォローアップ

1) 抗ウイルス療法導入時期の再検討

近年、C型慢性肝炎の治療は大きく変化しつつある。従来の標準的治療法であったペグインターフェロンとリバビリン併用療法における我が国での蔓延型である遺伝子型1型のC型肝炎ウイルス(HCV)のウイルス排除率(SVR)は約50%にとどまっていた。しかしながら、HCVの複製に必須なウイルスタンパクの機能を直接抑制するdirect-acting antiviral agents(DAAs)の登場によりSVRは劇的に改善しつつある。テラプレビルやシメプレビルなどのプロテアーゼ阻害薬を従来のペグインターフェロンとリバビリン療法に加えた3剤併用療法により、約70-80%のSVRが得られるようになった。さらに今後早期に経口DAAs製剤のみによる、インターフェロン製剤を利用しない複数の治療レジメが我が国においても保険承認が得られる予定であり、SVRは90%以上にまで改善することが予想される。

従来の標準治療であったインターフェロン製剤をベースとした治療法は、超高齢者、うつ病

¹Tetsuro Shimakami, ²Akito Sakai, ¹Shuichi Kaneko: ¹Department of Gastroenterology, Kanazawa University Hospital 金沢大学附属病院 消化器内科 ²Department of Internal Medicine, Toyama Prefectural Central Hospital 富山県立中央病院 内科

などの重度の精神神経疾患、間質性肺炎の合併を認めた症例には禁忌であった。またインターフェロン製剤による治療を以前に施行されたが、SVRを得られず、肝庇護療法および肝発癌サーベイランスを目的に定期通院している症例も多く存在する。さらにインターフェロン製剤に対する副作用を危惧するため、あるいは職場や家庭環境からインターフェロン製剤投与のための定期通院が困難なため、インターフェロン治療を受けられない症例も散見される。今後、C型慢性肝炎治療に対する標準治療となりうるインターフェロン製剤を利用しないDAA製剤による経口の抗ウイルス療法は、このような多くのインターフェロン治療困難例や無効例に対する良い適応と考えられる。

2013年のC型肝炎治療ガイドライン第2版(日本肝臓学会)でも、遺伝子型1型のC型慢性肝炎患者の治療に関して、高齢者や線維化進行例に対してはプロテアーゼ阻害薬を併用したペグインターフェロンとリバビリンによる3剤併用療法を推奨しているが、非高齢者で線維化軽度例では、待機可能としている。そのため現在通院中のC型慢性肝炎患者に関して、血小板数、各種線維化マーカー、フィブロスキャン、可能であれば肝生検を行い、現時点における肝線維化の程度を正確に評価して、個々の患者における抗ウイルス療法導入の時期を検討すべきと考えられる。

2) ALT正常例への対応

まずC型、B型慢性肝炎患者におけるALTの基準値に関して留意する必要がある。ALTの基準値上限を40IU/Lとしている施設が散見されるが、ウイルス性肝炎患者におけるALTの基準値上限は30IU/Lであり、31-40IU/Lは異常値であることを認識すべきである。実際ALT値が比較的低く、血小板数が正常でも肝生検をしてみると比較的進行した症例も存在する。当科での検討であるが、肝生検時ALT50IU/L以下、血小板17万以上であった44症例の肝生検では、40%以上がF2以上の慢性肝炎であった¹⁾。したがって、ALTが基準値症例の中にも線維化進行例が存在することを念頭に置くべきで、

‘問題ない’や‘通院の必要なし’との説明は不適切と考えられる。2013年のC型肝炎治療ガイドライン第2版では、血小板数を肝線維化の指標とし、ALT値と血小板数により治療適応を決定することを提案している。すなわちALT30IU/L以内の症例でも、血小板数15万/ μ L未満であれば抗ウイルス療法の対象とすることを推奨し、一方、ALT30IU/L以内かつ血小板数15万/ μ L以上の症例については、すぐに抗ウイルス療法を施行せずに経過観察することを推奨している。しかしながらC型慢性肝炎においては、経過中にALTが上昇する可能性もあるため、2-4カ月に1回の頻度で定期的に採血を行い、ALTが異常値を呈した時点で抗ウイルス療法を考慮すべきと考えられる。

3) 抗ウイルス療法が困難なALT高値例への対応

様々な理由で抗ウイルス療法が不可能な症例に関しては、肝炎を沈静化し肝組織の線維化進展を抑えることを目的とした肝庇護療法が必要である。肝庇護療法の実際として、ウルソデオキシコール酸、強力ネオミノファーゲンシー、瀉血療法、さらにこれらの治療の組み合わせが挙げられる。肝庇護療法中の患者に関しても2-4カ月に1回の頻度で定期的に採血を行い肝機能のチェックを行うべきと考えられる。

2 肝発癌を念頭に置いたC型慢性肝炎患者のフォローアップ

HCVの持続感染は、B型肝炎ウイルス(HBV)感染と並んで最も重要な肝発癌リスクの一つである。C型肝炎を背景とした肝発癌の特徴は、そのほとんどが肝硬変を背景に発癌を認める点であり、F4すなわち肝硬変からの年間肝発癌率は8%とされている。しかしながら非肝硬変からも発癌することが知られており、F1でも0.5%、F2で1.5%、F3で5%と報告されている。さらにHCV、HBV持続感染に加えて肝発癌の危険因子として、男性、高齢、アルコール摂取、喫煙、肥満、糖尿病なども挙げられており、これらの因子を含めて患者個々における肝

発癌リスクを総合的に判断して、肝臓サーベイランスの頻度を決定すべきと考えられる。

2013年度肝臓診療ガイドラインでは、B型慢性肝炎、C型慢性肝炎患者を高危険群、B型肝炎硬変、C型肝炎硬変患者を超高危険群に分類し、それぞれの群に対するサーベイランスアルゴリズムを提唱している²⁾。すなわち、高危険群に対しては6カ月ごとの超音波検査、および腫瘍マーカー(AFP、PIVKA-II、AFP-L3)の測定を、また超高危険群に対しては、3-4カ月ごとの超音波検査、腫瘍マーカー(AFP、PIVKA-II、AFP-L3)の測定、オプションとして6-12カ月ごとのCT・MRI検査を推奨している。

3 HCV排除後の肝発癌を念頭に置いたフォローアップ

今後経口DAA製剤の導入によりSVRは90%を超えることが予想され、従来以上にHCV排除後の患者が存在するようになる。これまでの多くの検討からHCV排除により肝発癌のリスクが低下することは明らかにされているが、HCV排除後も少数例ながら肝発癌症例が存在することが報告されている。HCV排除後の発癌症例の特徴として、HCV排除時に既に肝線維化が高度であること、血小板数が低値であること、AFPが高値であること、などが報告されている³⁻⁵⁾。しかしながら、HCV排除後のフォローアップの期間、方法などに関する検討はなされていないため、現時点ではHCV排除後においても、肝発癌を念頭に置いた定期的なフォローアップは必須と考えられる。同時に、今後増加するHCV排除後の症例を蓄積して、肝発癌を念頭に置いたHCV排除後症例のフォローアップに関するエビデンスを蓄積する必要があると考えられる。

4 肝炎診療における専門医との連携

上述してきたように、HCV感染が判明した患者は、2-4カ月に1回の肝機能検査のための採血、さらに肝線維化の程度に応じた肝画像検

査、および腫瘍マーカー測定のための採血が必要である。さらにC型慢性肝炎治療の劇的な進歩を受けて、日本肝臓学会および厚生労働省研究班から発表されるC型慢性肝炎に対するガイドラインは近年頻繁に改訂されている。消化器病学会専門医や、肝臓病学会専門医が最新のガイドラインを熟知することは当然と思われるが、専門外のかかりつけ医がこれらのガイドラインを熟知することは困難と考えられる。平成19年厚生労働省は‘都道府県における肝炎検査後肝疾患診療体制に関するガイドライン：<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou09/03.html>’を発表し、肝炎ウイルス検査陽性者の診療におけるかかりつけ医と専門医療機関との連携の必要性を述べている。

石川県では、行政および医師会の協力のもと、肝炎ウイルス検診陽性者が、年1回石川県が選定した専門医療機関を受診し、肝臓専門医の診察、肝画像検査を受けることを目的とした‘石川県肝炎診療連携’を平成22年度より開始した。石川県肝炎診療連携の概要は、平成14年から行政が肝炎ウイルス検診陽性者に対して行っていた毎年の受診勧奨、受診状況調査などのフォローアップを、肝疾患診療連携拠点病院(石川県の場合、金沢大学附属病院)が中心となってい、肝炎ウイルス検診陽性者に対して直接、フォローアップを行っていくシステムある(図1)。個人情報保護のため市町の有する氏名、住所などの個人情報を拠点病院に移管できないことが問題となったが、この連携に参加し個人情報を拠点病院に移管することに関する同意書を、市町を介してすべての肝炎ウイルス検診陽性者に発送した。その結果、同意を得られた個人に関しては、拠点病院も個人情報を有するため拠点病院が直接肝炎ウイルス検診陽性者にアクセスすることが可能となった。

さらに連携参加同意者には、年1回石川県が選定した石川県肝疾患専門医療機関の受診を勧めるリーフレットと、専門医療機関での診察内容を記載する調査票を送付している。調査票には、専門医療機関で施行した画像検査の結果と、今後の望ましい検査方針・治療方針を記載する

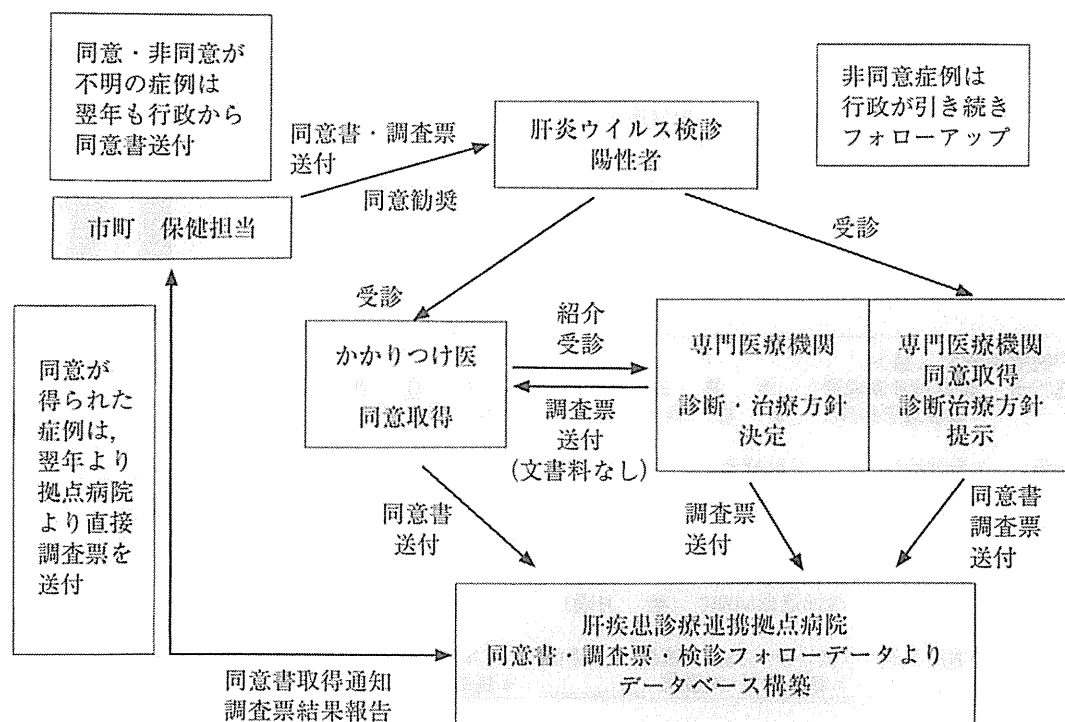


図1 石川県肝炎診療連携

こととなっている(図2)。そのため連携参加者は、年に1回の画像検査を受けることができると同時に、その時点で適切な治療方針を聞くことができる。もし同意者がかかりつけ医を受診した場合は、調査票を紹介状の代わりとして、専門医療機関を受診することとした。専門医療機関における診察結果は、複写式の調査票に記載され、かかりつけ医と拠点病院に送付される。かかりつけ医には専門医療機関での診察結果が調査票を介してフィードバックされ、拠点病院では調査票を用いて受診状況や治療内容などをデータベース化している。また連携参加に同意を得られなかったり、意思表示のなかったりした陽性者に関しては、従来どおり行政側でフォローアップを続けている。平成25年度末時点で2,840人の肝炎ウイルス検診陽性者のうち、参加同意者は1,166人(41%)、残りの1,674人のうち、参加非同意者が368人(13%)、意思表示のない参加未同意者が1,306人(46%)である。この意思表示のない1,306人に対しては、連携参加を呼びかけるリーフレットとともに同意書を送付し続けている。肝炎ウイルス検査陽性にもかかわらず自己判断で通院を中止したが、こ

の連携に入ったことでかかりつけ医を介して専門医療機関を受診し、肝臓癌を発見できた事例や、この連携に入ったことで専門医療機関を受診し、専門医の指導によりインターフェロン治療まで結びついた事例も多く存在する。この連携への参加により、肝炎ウイルス検診陽性者は、受診忘れなどによるフォローアップからの脱落を予防できるだけでなく、年に1回専門医療機関の受診を介して、肝画像検査を受け、専門医から最新の治療情報を得られるため、極めて有用なシステムと考えられる。

おわりに

C型慢性肝疾患患者においては、肝線維化の程度を正しく評価し、高度線維化例においては早期の抗ウイルス療法の導入を図ることが重要であり、逆にALTが正常値で軽度線維化例に関しては、経過観察も可能と考えられる。同時に、個々の症例において肝発癌リスクを総合的に判断して、画像検査および腫瘍マーカー測定による肝癌サーベイランスの頻度を決定すべきである。今後、経口DAA製剤の登場によりSVRは90%以上となることが予測されるが、SVR後

石川県肝炎診療連携 専門医療機関受診調査票	
氏名: _____ 性: _____ 生年月日: _____ 生 住所: _____	紹介医療機関名: _____ 紹介医名: _____
石川県肝炎診療連携で診断・画像検査・治療方針について御高診をお願いします。 HCV抗体陽性 _____ HBs抗原陽性 _____ ALT値(_____ IU/L) 血小板値(_____ / μ L)	
コメント	
<専門医療機関記入欄> 検査施行日: 腹部超音波検査(年 月 日) 腹部造影CT(年 月 日) 腹部造影MRI(年 月 日) 肝生検 (年 月 日)	
診断結果: 1.慢性肝炎 2.肝硬変 3.肝がん 4.無症候性キャリア 5.その他(_____)	
今後の望ましい検査方針: 腹部超音波検査(年 月頃) 腹部造影CT(年 月頃) 腹部造影MRI(年 月頃)	
今後の望ましい治療方針: 1.インターフェロン療法 2.経口抗ウイルス薬 3.他の注射・内服薬・ _____ 4.経過観察	
コメント	
専門医療機関名: _____ 担当医名: _____	
紹介医(かかりつけ医)保存用 <紹介医への返書>	

かかりつけ医

上段記載後, 専門医受診勧奨

↓ ↑

肝疾患専門医療機関

下段記載後,
かかりつけ医, 拠点病院へ送付

↓

拠点病院

図2 石川県肝炎診療連携調査票とその取り扱い

も肝発痛が認められることも念頭に置いてウイルス排除後も経過観察を行う必要がある。また近年C型慢性肝疾患に対する治療戦略は、めまぐるしく変化しており、C型慢性肝疾患患者が、

少なくとも年に1回は肝臓病・消化器病専門医の診察を受け、最新の治療情報を得られるような連携システムの構築も重要と考えられる。

文 献

- 1) 酒井明人, 金子周一: ウイルス性慢性肝炎の自然経過とチェックポイント. 診断と治療 96(3): 429-434, 2008.
- 2) 日本肝臓学会(編): 第2章 診断およびサーベイランス. 科学的根拠に基づく肝臓診療ガイドライン 2013年版, p27-72, 金原出版, 2013.
- 3) Asahina Y, et al: α -fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. Hepatology 58(4): 1253-1262, 2013.
- 4) Dohmen K, et al: The incidence and risk factors for the development of hepatocellular carcinoma after peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Hepatogastroenterology 60(128): 2034-2038, 2013.
- 5) Chang KC, et al: Clinical-guide risk prediction of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients after interferon-based therapy. Br J Cancer 109(9): 2481-2488, 2013.