

D. 考察と結論

今回新たに同定された NKp46^{high} NKG2A^{high} 亜分画は高い細胞傷害活性を有しており、本亜分画の頻度が ALT と関連することから、本亜分画は肝細胞障害と関連している可能性が示唆された。また、IFN 治療によって本亜分画は著明に増加することから、IFN 治療による HBV 排除に本亜分画が関連している可能性が示唆された。IFN 治療患者の集積をさらに行い、治療介入による本亜分画の変化と治療効果との関連を解析することで、HBV に対する IFN 治療効果に関わる新規因子の同定につながる可能性が考えられた。また NKp46 阻害実験の結果から、HBV に対する NK 細胞の活性化に NKp46 は重要な役割を果たしていることが示唆された。NKp46 シグナル下流の ITAM や標的細胞に発現している NKp46 ligand などを検討することで、新たな治療標的の開発につながる可能性が示唆された。

E. 研究発表

論文発表

I. Yamada R, Hiramatsu N, Oze T, Morishita N, Harada N, Yakushijin T, Iio S, Doi Y, Yamada A, Kaneko A, Hagiwara H, Mita E, Oshita M, Itoh T, Fukui H, Hijioka T, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, Kato M, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kasahara A, Hamasaki T, Hayashi N, Takehara T. (2014) Impact of alpha-fetoprotein on hepatocellular carcinoma development during entecavir treatment for chronic hepatitis B virus infection. J Gastroenterol, in press.

学会発表

・2014年5月30日：第50回日本肝臓学会総会（東京・ホテルニューオータニ）

シンポジウム 2 ウイルス排除と発癌抑止を目指した B 型肝炎治療戦略

「NK 細胞レセプター NKp46 及び NKG2A の発現頻度による NK 細胞亜分画と HBV 感染に関する基礎的検討」

吉岡鉄平、宮城琢也、竹原徹郎

・2014年11月10日：The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (Boston)

「Frequency and role of NKp46 and NKG2A expressing NK cells in patients with chronic hepatitis B.」

Tepei Yoshioka, Takuya Miyagi, Yoshinobu Yokoyama, Akira Nishio, Kaori Mukai, Satoshi Aono, Takatoshi Nawa, Ryotaro Sakamori, Hayato Hikita, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara.

・2014年11月20日：JSH Single topic conference (広島・ホテルグランヴィア)

「Frequency and role of NK cells expressing both NKp46 and NKG2A in patients with chronic hepatitis B.」

Tepei Yoshioka, Takuya Miyagi, Yoshinobu Yokoyama, Akira Nishio, Kaori Mukai, Satoshi Aono, Takatoshi Nawa, Ryotaro Sakamori, Hayato Hikita, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

HBV 感染治療用ベクターの開発と新規ベクターの供給

研究分担者 斎藤 泉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨： B型肝炎ウイルス（HBV）に対する治療用として、肝臓における発現効率の高い非増殖型アデノウイルスベクター(AdV)を用いて、インターフェロンと治療用遺伝子を同時発現する日本発のHBV治療用デュアルベクターを開発する。昨年度までに作製が完了していたHBVゲノム高度保存領域に設定した6種類のshRNAを発現するVA欠失AdVの評価を行うために、本年度はHBVプレゲノム高度発現AdVシステムを開発し、評価を行った。その結果、昨年度のプレコア発現AdVを用いた予備的な検討と大きな差は無かったものの、特に2種類のshRNAが強くHBV複製を抑制しており、これらのshRNAの有用性が確認された。また、本法で応用しているVA欠失AdVはベクターで唯一残存していたウイルス由来産物であるVA RNAの発現が無いベクターである。本年度の解析からベクターから発現していた僅かな量のVA RNAでも細胞の複数の遺伝子発現をかく乱していたことが明らかになり、VA欠失AdVの有用性が示された。

A. 研究目的

HBVに対する治療法として、ウイルスmRNAに対するsiRNAの応用が期待されるが、非増殖型アデノウイルスベクター（AdV）は肝臓への遺伝子導入効率、発現効率ともに優れており有用性の高いツールである。しかし従来のAdVにはウイルス由来の2種類のVA RNAが発現しており、治療用遺伝子として導入したshort-hairpin RNA (shRNA)と競合拮抗して抗ウイルス効果を減弱する例をHCVで見いだした。VA RNA欠失AdVの効率的作製は困難であったが、斎藤は新規作製法の開発に成功した。本研究では、この新規VA RNA欠失AdVにHBVに対するshRNAの候補を複数挿入し、最も有用性の高いshRNAを同定後、インターフェロン遺伝子を同時に発現するデュアルベクターを開発し、作用機序の異なる2つの治療用遺伝子に依る相加的效果を有したAdVを開発する。また、この新規ベクターを班員に供与し、研究の推進に貢献する。

B. 研究方法

shRNA搭載AdVのHBV複製抑制効果の検討は、HBVプレゲノムを高度に発現するAdVシステムにより行った。すなわちS非発現HBVプレゲノムをCMVプロモーターから高度に発現するAdVを肝細胞癌由来のHuH細胞に導入し、感染6日目に細胞から総核酸を

定法通りに抽出し、複製したHBVゲノムをSouthern法で確認するとともに定量PCRにより複製したHBVゲノム量を定量した。

また、AdVに残存していたVA RNA発現による細胞遺伝子発現量への影響は、VA欠失AdVとVAを発現している従来のAdVをA549細胞に導入後マイクロアレー解析により行った。VA RNAにより発現量が変動している可能性が示唆された細胞遺伝子について、VA欠失AdVと従来のAdVを用いてHuH細胞あるいはHeLa細胞で細胞遺伝子発現量を定量PCRにより測定した。

（倫理面への配慮）

本年度の研究に当たっては、既に報告されているHBVを用いており、特に倫理面に抵触する検討は行っていない。

C. 研究結果

昨年度は、比較的保存されているHBVゲノム領域に対して6種類のshRNAを設計しVA欠失AdVを作製したが、HBVゲノム複製を定量するシステムの開発中であったためshRNA設計領域のプレコア発現AdVのプレコアmRNA量の低下によりshRNAの効果を推定していた。

本年度は、CMVプロモーターから高度にS非発現HBVプレゲノムを発現するAdVを用いたHBVゲノム複製高感度検出法の開発に

成功した。従来応用されている HBV ゲノムの 1.24 倍長搭載プラスミドを用いる方法では、相同領域の組換えの結果偽 CCC 分子が生成し、定量の精度を低下することが明らかになったため、相同領域を最小限に留めた 1.03 倍長の HBV ゲノムを応用する事で相同組換えが起こらず、複製した HBV ゲノムのみの定量が可能となった。また、S を非発現型として作製したため、安全性も担保した。

この HBV プレゲノム高度発現システムを用いて shRNA の HBV ゲノム複製抑制効果を比較検討したところ、おおむねプレコア発現 AdV による結果と同様の傾向を示したが、その中でも 2 種類の shRNA が HBV ゲノム複製を強く抑制していたことが明らかになった。HCV に対する shRNA の解析から、複数の異なる領域に設計した shRNA を組み合わせることで相加的にウイルス複製を抑制可能となることが明らかになっているため、今後は AdV 導入量を下げて効果を上昇する目的で 2 種類あるいはそれ以上の shRNA をタンデムに連結した AdV の作製を行っていく。多重 shRNA 発現 AdV 作製には、shRNA プロモーター領域が相同であるため、ベクター作製時に相同組換えにより shRNA 発現単位が欠失する可能性があるが、これまでの多重連結ベクターの経験を活かした工夫を行い、効率的なベクター作製法の開発を進めている。

また、本研究に 응용している VA 欠失 AdV は、従来の AdV で残存していた VA RNA 領域を欠失しているが、ウイルス複製時の大量発現した VA RNA ではなく、ベクターから僅かに発現する VA RNA でも細胞遺伝子発現が影響を受けているかどうかについて詳細な解析を行った。その結果、ベクターから発現する VA RNA はウイルス複製時の数百分の 1 程度に留まっているにも関わらず、細胞増殖などに関連する複数の遺伝子発現が影響を受けていたことが明らかになった。そのうち特に影響が大きかった Hepatoma-derived growth factor (HDGF) 遺伝子は、VA RNA の発現が残存している従来の AdV 導入により発現が約半分に低下していた。これらのことから、本研究で 응용している VA 欠失 AdV は、HBV 関連細胞遺伝子の機能解析にも有用性が高いだけでなく、遺伝子治療用ベクターとしても安全性が高いことが示された。

また、本年度に開発に成功した HBV プレゲ

ノム高度発現システムは、抗 HBV 薬スクリーニングにも安全性、効率ともに有用性が高いシステムであり、班員への情報提供を行った。

E. 結論

本研究で開発している HBV に対する shRNA は、既報とは異なる新規のものであり、複数の shRNA の同時発現による相加的な抗ウイルス効果も期待できるため、AdV の作製に向けた技術開発を進めていく。

また、shRNA の抗 HBV ゲノム複製抑制効果を検討するために本年度に確立した HBV プレゲノム高度発現 AdV システムは、抗 HBV 薬スクリーニング法として有用性が高いだけでなく、本研究の目的の 1 つである班員へのベクター供給においてもニーズが高く、来年度以降も引き続き班員の要望に応えたベクターシステム開発を進めていく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Lystad A H, Ichimura Y, Takagi K, Yang Y, Pankiv S, Kanegae Y, Kageyama S, Suzuki M, Saito I, Mizushima T, Komatsu M, and Simonsen A. Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures. *EMBO Rep* 2014;15:557-565.
- 2 Kondo S, Yoshida K, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Adenovirus-encoding virus-associated RNAs suppress HDGF gene expression to support efficient viral replication. *PLoS One* 2014 9:e108627.
- 3 Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K and Matsuura Y. Amphipathic α -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog* 2014 10; e1004534.
- 4 Suzuki M, Kondo S, Pei Z, Maekawa A, Saito I, and Kanegae Y. Preferable sites and orientations of transgene inserted in the adenovirus vector genome: the E3 site may be unfavorable for transgene position. *Gene Ther* 2015:1-9.

2. 学会発表

- 1 Yoshioka T, Maekawa A, Suzuki M, Kondo S, Kanegae Y, and Saito I. Development of a novel adenovirus vector for cancer-specific and stable expression: mini-adenovirus vector (mini-AdV). The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
- 2 Maekawa A, Pei Z, Kondo S, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
- 3 Kondo S, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Dually safer adenovirus vector lacking virus-associated RNA genes with significantly low immune responses. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
- 4 Suzuki M, Kondo S, Saito I, and Kanegae Y. Best insertion sites and orientation for the single and double expression unit in the adenovirus vector genome. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
- 5 Suzuki M, Kondo S, Yamasaki M, Kanegae Y, Nomoto A, and Saito I. Development of new methods to detect the replication HBV genome in the cells infected with adenovirus vector

expressing pregenome RNA. 2014 International Meetin on Molecular Biology of Hepatitis B Virus, UCLA, Los Angeles, September 3-6

- 6 近藤小貴、鈴木まりこ、前川文、齋藤泉、鐘ヶ江裕美、近藤小貴、アデノウイルス感染初期における virus-associated RNA の役割、第 62 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、11 月 10-12 日、2014
- 7 鈴木まりこ、近藤小貴、山崎学、鐘ヶ江裕美、野本明男、齋藤泉、アデノウイルスベクターを用いた効率的な HBV ゲノム複製解析システムの開発：cocally closed circular DNA (CCC)の検出、第 62 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、11 月 10-12 日、2014
- 8 近藤小貴、鈴木まりこ、山崎学、鐘ヶ江裕美、野本明男、齋藤泉、アデノウイルスベクターを用いた定量的 HBV 複製 ccc 及び rc ゲノム検出法の開発、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、11 月 25-27 日、2014

H. 知的所有権の出願・登録状況

複数のユニットが多重に連結した DNA カセットおよび該カセットを含むベクターの製造方法
特願 2014-242914

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
柘植雅貴 茶山一彰	B型肝炎に対する 抗ウイルス療法	林紀夫 日比紀文 上西紀夫 下瀬川徹	Annual Review 2014 消化器	中外医学社		2014	104-111

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
Satoh S, (加藤)	Establishment of hepatitis C virus RNA-replicating cell lines possessing ribavirin-resistant phenotypes.	PLoS ONE	10(2)	e118313	2015
Okamoto M, (加藤)	IPS-1 is essential for type III interferon production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection.	Journal of Immunology	192 (6)	2770-2777	2014
Ueda Y, (加藤)	Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus <i>Cordyceps militaris</i> .	Biochemical and Biophysical Research Communications	447	341-345	2014
Dansako H, (加藤)	Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets.	Virology	462- 463	166-174	2014
Hara Y, (加藤)	Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin in the context of mitochondrial depolarization.	American Journal of Pathology	184 (11)	3026-3039	2014
Matsuda M, (加藤)	Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus.	Journal of General Virology	95 (12)	2658-2667	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, and <u>Matsuura Y.</u>	Amphipathic α -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles.	PLoS Pathog		doi: 10.1371/ journal. ppat. 1004534	2014
Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, and <u>Matsuura Y.</u>	Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus.	J Virol	88	5578-5594	2014
Matsumoto A, Yatsushashi H, Nagaoka S, Suzuki Y, Hosaka T, <u>Tsuge M.</u> , Chayama K, Kanda T, Yokosuka O, Nishiguchi S, Saito M, Miyase S, Kang JH, Shinkai N, Tanaka Y, Umemura T, Tanaka E.	Factors associated with the effect of interferon- α sequential therapy in order to discontinue nucleos(t)ide analogue treatment in patients with chronic hepatitis B.	Hepatol Res			in press
Akamatsu S, Hayes CN, <u>Tsuge M.</u> , Miki D, Akiyama R, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Chayama K.	Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection.	J Infect			in press
Fujino H., Kimura T., Aikata H., Miyaki D., Kawaoka T., Kan H., Fukuhara T., Kobayashi T., Naeshiro N., Honda Y., <u>Tsuge M.</u> , Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Hyogo H., Takahashi S., Yoshimatsu R., Yamagami T., Kenjo M., Nagata Y., Awai K. and Chayama K.	Role of 3-D conformal radiotherapy for major portal vein tumor thrombosis combined with hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma.	Hepatol Res			in press
Naeshiro N., Aikata H., Kakizawa H., Hyogo H., Kan H., Fujino H., Kobayashi T., Fukuhara T., Honda Y., Ohno A., Miyaki D., Kawaoka T., <u>Tsuge M.</u> , Hiraga N., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Takahashi S., Awai K. and Chayama K.	Long-term outcome of patients with gastric varices treated by balloon-occluded retrograde transvenous obliteration.	J Gastroenterol Hepatol	29(5)	1035-42	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kohno T., <u>Tsuge M.</u> , Murakami E., Hiraga N., Abe H., Miki D., Imamura M., Ochi H., Hayes C.N. and Chayama K.	Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA.	J Viral Hepat			in press
Huang Y.W., Takahashi S., <u>Tsuge M.</u> , Chen C.L., Wang T.C., Abe H., Hu J.T., Chen D.S., Yang S.S., Chayama K. and Kao J.H.	On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy.	Antivir Ther			in press
Naeshiro N., Aikata H., Hyogo H., Kan H., Fujino H., Kobayashi T., Fukuhara T., Honda Y., Nakahara T., Ohno A., Miyaki D., Murakami E., Kawaoka T., <u>Tsuge M.</u> , Hiraga N., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Ochi H. and Chayama K.	Efficacy and safety of the anticoagulant drug, danaparoid sodium, in the treatment of portal vein thrombosis in patients with liver cirrhosis.	Hepatol Res			in press
Honda Y., Takahashi S., Zhang Y., Ono A., Murakami E., Shi N., Kawaoka T., Miki D., <u>Tsuge M.</u> , Hiraga N., Abe H., Ochi H., Imamura M., Aikata H. and Chayama K.	The effects of bisphosphonate zoledronic acid in hepatocellular carcinoma, depending on mevalonate pathway.	J Gastroenterol Hepatol			in press
柘植雅貴、平賀伸彦、 茶山一彰	HBV 感染に伴うヒト肝 細胞内免疫応答の変化	消化器内科	58(2)	231-238	2014
柘植雅貴、茶山一彰	テノホビル治療 (naïve 例 と核酸アナログ治療抵抗 例に対する成績)	医学と薬学	71	1185-1190	2014
柘植雅貴、茶山一彰	差分解説・B 型慢性肝炎 診療における HBs 抗原測定	日本医事新報	4703	58	2014
<u>Watanabe T.</u> , Hamada-Tsutsumi S, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, Tanaka Y.	Post-Exposure Prophylactic Effect of HBV-active Antiretroviral Therapy Against Hepatitis B Virus Infection.	Antimicrob Agents Chemother.	59(2)	1292-8	2015
渡邊綱正, 田中靖人	B 型急性肝炎の遷延化 (GenotypeA を中心に)	肝胆膵	69(6)	831-836	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kitahara M, <u>Mizukoshi E</u> , Nakamoto Y, Mukaida N, Matsushima K, Kaneko S.	Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma.	Int Immunopharmacol.	21	346-353	2014
Terashima T, <u>Mizukoshi E</u> , Arai K, Yamashita T, Yoshida M, Ota H, Onishi I, Kayahara M, Ohtsubo K, Kagaya T, Honda M, Kaneko S.	P53, hTERT, WT-1, and VEGFR2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic adenocarcinoma.	Cancer Immunol Immunother.	63	479-489	2014
Nakagawa H, <u>Mizukoshi E</u> , Iida N, Terashima T, Kitahara M, Marukawa Y, Kitamura K, Nakamoto Y, Hiroishi K, Imawari M, Kaneko S.	In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation.	Cancer Immunol Immunother.	63	347-356	2014
Honda M, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, <u>Mizukoshi E</u> , Kaneko S.	Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin-28B genotypes.	Hepatology.	59	828-838	2014
Suzuki M, Kondo S, Pei Z, Maekawa A, <u>Saito I</u> , Kanegae Y.	Preferable sites and orientations of transgene insertions in the adenovirus vector genome: the E3 site may be unfavorable for transgene position	Gene Ther.		1-9	2015
Kondo S, Yoshida K, Suzuki M, <u>Saito I</u> , Kanegae Y.	Adenovirus-encoding virus-associated RNAs suppress HDGF gene expression to support efficient viral replication	PLoS One	9	e108627	2014
Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, <u>Saito I</u> , Wakita T, Koike K, Matsuura Y.	Amphipathic α -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles	PLoS Pathog	10	E1004534	2014

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
Lystad A H, Ichimura Y, Takagi K, Yang Y, Pankiv S, Kanegae Y, Kageyama S, Suzuki M, <u>Saito I</u> , Mizushima T, Komatsu M, Simonsen A.	Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures.	EMBO Rep	15	557-565	2014

4. B型肝炎に対する抗ウイルス療法

広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門消化器・代謝内科学 柘植雅貴
同 教授 茶山一彰

key words chronic hepatitis B, nucleot(s)ide analogue, interferon, seroclearance of HBs antigen, HBV DNA, normalization of ALT

動 向

2000年までのB型慢性肝疾患に対する抗ウイルス療法は、4週から12週程度の短期的なインターフェロン治療に限られ、その治療効果も乏しかったことから、肝炎を安定的にコントロールすることは困難であった。2000年11月に、B型肝炎疾患に対する抗ウイルス薬としてラミブジンが保険適用となったのに続いて、アデホビル、エンテカビルが保険適用となり、3種類の核酸アナログ製剤を単独または併用することで、B型慢性肝疾患に対する治療は劇的に向上し、病勢の安定的なコントロールを比較的容易に行うことが可能となった。その結果、核酸アナログ療法により、肝炎の長期的な鎮静化が得られるようになり、発癌抑制効果も期待できるようになっている。一方で、核酸アナログ治療は、完全なウイルス排除はほぼ不可能であり、長期的な投与が必須であることから、長期投与に伴う薬剤耐性ウイルスの出現や副作用出現、さらに核酸アナログ治療中止後の高い肝炎再燃率は、依然として大きな問題として残っている。現在、長期投与に伴う薬剤耐性ウイルスの出現や医療経済を鑑み、安全に核酸アナログ治療を中止するためのシステムの構築が検討される一方で、薬剤耐性ウイルスへの対策として、新規

核酸アナログ製剤テノホビルの保険適用に向けた準備も行われている。

2011年9月、B型慢性活動性肝炎に対する抗ウイルス療法として、ペグインターフェロン α 2aがHBe抗原の有無に関係なく使用可能となった。ペグインターフェロンは、従来のインターフェロンに比べ、治療中止後も抗ウイルス効果が持続し、一部の症例ではHBs抗原を低下・消失させることが、国外を中心に報告されてきている。そのため、国内外において、核酸アナログ治療とインターフェロン治療を組み合わせることで、より高率にHBs抗原の消失を誘導するための治療法の工夫が試みられている。

本稿では、核酸アナログならびにペグインターフェロンの抗ウイルス効果についてまとめるとともに、今後、保険適用が期待されるテノホビルの抗ウイルス効果について述べる。

A. B型慢性肝疾患に対する治療目標

B型慢性肝疾患治療の最終目標は、ALTの正常化、HBV DNAの陰性化とともにHBs抗原を消失させることにより、その後の病態の進展を抑制し、発癌を予防することにある。しかしながら、

自然経過においてHBs抗原の消失率を見てみると、2007年に台湾から報告されたコホート研究では、B型慢性肝疾患患者の自然経過におけるHBs抗原消失率は年率1.15%とされ¹⁾、本邦からの報告を見ても、HBs抗原消失率は年率1.65%とほぼ同等の結果であり²⁾、自然経過におけるHBs抗原の消失を期待することは困難であることがわかる。そのため、これまで、治療介入によるHBs抗原消失を期待し、10年以上に及ぶ核酸アナログ治療が行われてきたが、その上乘せ効果はほとんど認められなかった³⁾。これは、B型肝炎ウイルス(HBV)が肝細胞に感染後、核内にウイルスゲノムをcovalently closed circular DNA(cccDNA)やミニクロモソームと呼ばれる形態に変化させ、生体内の免疫排除機構や種々の治療から逃れていることが要因と考えられ⁴⁻⁶⁾、B型慢性肝疾患に対する治療目標を、HBe抗原の陰性化とALT正常化、HBV DNA低値持続とした治療が継続されてきた⁷⁾。しかし、近年、B型慢性肝疾患の治療の向上ならびにHBV関連マーカーの測定法の進歩により、核酸アナログ製剤やインターフェロンによる治療介入によりHBs抗原の減少・陰性化率が上昇することが報告されるようになり⁸⁻¹¹⁾、2013年に日本肝臓学会より示されたB型肝炎治療のガイドラインでは、HBs抗原消失を治療の長期目標とすることが記されている¹²⁾。

B. B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療

2000年11月以降、ラミブジン(ゼフィックス[®])、アデホビル(ヘプセラ[®])、エンテカビル(バラクルード[®])の3種類の核酸アナログ製剤が保険適用となり、副作用が少なく、良好な内服コンプライアンスが得られることから、B型慢性肝疾患に対する中心的な治療法として確立されている。

表1, 2に示すように、平成25年度に厚生労働省研究班「ウイルス性肝炎における最新の治療法の標準化を目指す研究に関する研究班」より示されたガイドラインにおいても、同治療法は、ほぼすべてのB型慢性肝疾患症例において治療選択肢の一つとして推奨されており、B型慢性肝疾患に対する治療において重要な役割を担っていることがわかる¹³⁾。核酸アナログは、HBVの複製過程において、DNA合成や逆転写反応といったウイルス遺伝子の合成過程を阻害し、HBVの増殖を強力に抑制することから、治療開始後より血中HBV DNAは速やかに減少し、約1年間の治療により70%以上の症例で血中HBV DNAは陰性化(<2.6 Log copies/mL)し、ALTも正常化することが報告されている¹⁴⁾。以前より、長期的なHBV DNA陰性化、ALT正常化により、肝組織の線維化改善や肝硬変例におけるアルブミン増加や腹水減少が期待できることが報告されてきたが、最近の報告では、長期的な核酸アナログ投与によりHBs抗原の消失が得られるといった報告も散見されるようになってきていることから^{2,3,15,16)}、HBs抗原の定期的なモニタリングも治療効果の判定や今後の治療効果予測をするうえで、重要である。

核酸アナログ治療は劇的な治療効果が得られる反面、長期間の治療継続により、いくつか課題も生じている。その一つは、以前から問題とされてきた薬剤耐性ウイルスの出現である。近年、第一選択として用いられているエンテカビルは、ラミブジンやアデホビルと比較し、薬剤耐性ウイルスの出現頻度は低下したものの、初回投与例において3年間の投与で3%程度の耐性ウイルス出現が報告されてきたが¹⁷⁾、最近の報告では、初回投与例における耐性出現率は4年間の投与で0.4%とより低率であることが示唆されており、96%の症例でHBV DNAの陰性化が得られる結果となっている¹⁸⁾。一方で、同報告では、既報の薬

表1 平成25年度 B型慢性肝炎の治療ガイドライン(35歳未満)

(熊田博光, ウイルス性肝炎における最新の治療法の標準化を目指す研究に関する研究班 平成24年度 総括・分担研究報告書 2013)¹³⁾

治療開始基準		治療戦略
HBV DNA 量	ALT 値	
HBe 抗原陽性 ¹⁾	≥ 4 Log copies/mL ≥ 31 IU/L	① PEG-IFN α 2a (48 週) または IFN 長期投与 (24 ~ 48 週) ²⁾ * HBV DNA が 7 Log copies/mL 以上の症例は, Entecavir の先行投与を考慮する ³⁾ . * 線維化進行例 (血小板 15 万未満 or F2 以上) には, 最初から Entecavir ② Entecavir ⁴⁾
HBe 抗原陰性	≥ 4 Log copies/mL ≥ 31 IU/L	① PEG-IFN α 2a (48 週) * HBV DNA が 7 Log copies/mL 以上の症例は, Entecavir の先行投与を考慮する ³⁾ . * 線維化進行例 (血小板 15 万未満 or F2 以上) には, 最初から Entecavir ② Entecavir ⁴⁾
肝硬変	≥ 2.1 Log copies/mL —	① Entecavir (代償性・非代償性) ⁴⁾ * HBV DNA が 2.1 Log copies/mL 以上の状態が持続する場合は, ALT が 31 IU/L 未満でも治療対象となる.

1) HBe 抗原陽性者は, 12 ~ 24 カ月間経過観察し自然経過で HBe 抗原のセロコンバージョンがみられなければ治療も考慮.

2) IFN 自己注射可能な症例は, QOL を考慮して在宅自己注射を推奨する.

3) 高ウイルス量 (7 log copies/mL 以上) の症例は, IFN の効果は限定的であるため, まず Entecavir を投与しウイルス量を十分に抑制した後に IFN に切り替えることも考慮する.

4) HIV 合併症例は, Entecavir の使用により HIV 耐性ウイルスが出現する可能性があるため, Entecavir は原則として使用すべきでない. 従って Entecavir 開始時にはインフォームドコンセントを取得したうえで HIV 抗体の測定を行うことが望ましい.

* IFN・sequential 治療については「B 型肝炎の核酸アナログ薬治療における drug free を目指したインターフェロン治療の有用性に関する研究」のガイドライン基準に準じる.

剤耐性ウイルスが認められない場合でも徐々に HBV DNA 量が増加し (viral breakthrough), 肝炎の急性増悪 (breakthrough hepatitis) が惹起されることが示されている¹⁸⁾. そのため, 治療により状態が安定していても, 定期的な HBV DNA 量のモニタリングを含めた注意深い経過観察が必要であり, 薬剤耐性ウイルス出現時には, 薬剤耐性変異を評価したうえで, 交叉耐性を考慮に入れた治療法の選択が重要と考えられる¹⁹⁾. 2 つ目の問題としては, アデホビルの長期投与に伴う腎機能障害や低リン血症の出現である. 現在のガイドラインでは, ラミブジンやエンテカビルを

投与し, 効果が不十分な症例や薬剤耐性ウイルスが出現した症例に対し, ラミブジン・アデホビルもしくはエンテカビル・アデホビルの併用療法を行うことが推奨されている. アデホビルを併用することにより, HBV DNA の陰性化または低下が得られ, 肝炎も鎮静化することから数年に及ぶ併用療法が施行されている症例も少なくないことから, アデホビル投与に伴う腎機能障害や低リン血症が注目されるようになった. 光井らの報告によると, 1 年以上アデホビルが投与された 59 例のうち 32.1% の症例で, 治療前に比べ, 血清クレアチニン値は平均 0.12mg/dL の上昇を認め, ク

表2 平成25年度 B型慢性肝炎の治療ガイドライン(35歳以上)

(熊田博光. ウイルス性肝炎における最新の治療法の標準化を目指す研究に関する研究班 平成24年度 総括・分担研究報告書 2013)¹³⁾

	治療開始基準		治療戦略
	HBV DNA 量	ALT 値	
HBe 抗原 陽性	≥ 4 Log copies/mL	≥ 31 IU/L	① Entecavir ¹⁾ ② Peg-IFN α 2 a (48 週) または IFN 長期投与 (24 ~ 48 週) * Genotype A, B では IFN の効果が期待できることから, 可能な限り IFN を第一選択にすることが望ましい.
HBe 抗原 陰性	≥ 4 Log copies/mL	≥ 31 IU/L	① Entecavir ¹⁾ ② Peg-IFN α 2 a (48 週) * Genotype A, B では IFN の効果が期待できることから, 可能な限り IFN を第一選択にすることが望ましい.
肝硬変	≥ 2.1 Log copies/mL	—	① Entecavir (代償性・非代償性) ¹⁾ * HBV DNA が 2.1 Log copies/mL の状態が持続する場合は, ALT が 31 IU/L 未満でも治療対象となる.

1) HIV 合併症例は, Entecavir の使用により HIV 耐性ウイルスが出現する可能性があるため, Entecavir は原則として使用すべきでない. 従って Entecavir 開始時にはインフォームドコンセントを取得したうえで HIV 抗体の測定を行うことが望ましい.

レアチニンクリアランスが 80 mL/min 以下となるような症例では, アデホビルの血中濃度 (トラフ値や Cmax) が高値であったとされている²⁰⁾. 最近の報告においても, 腎機能障害に伴うアデホビル投与量の調節が必要となる症例が 5.8% に見られることが報告されている²¹⁾. また, 低リン血症の合併に伴う骨融解や Fanconi 症候群の出現も大きな問題である. 本邦では, アデホビルを 5 年間投与することで低リン血症が 26.7% に出現するとされ²¹⁾, 国外においても, 低用量のアデホビル使用者における Fanconi 症候群や骨融解の出現例が報告されている²²⁾. 報告例が東アジア地域に集中していることから, 人種による副作用発現頻度の違いも示唆されており, 日常診療におけるカルシウムやリンのモニタリングのほか, 筋力低下や骨折・関節痛などの骨軟化症症状の出現に注意した経過観察が重要である.

C. B型慢性肝疾患に対するインターフェロン治療

これまでのインターフェロン治療は, HBe 抗原陽性の B 型慢性肝炎に対して, 24 週程度の短期間投与であったことから, 十分な治療効果が得られず, 治療終了 6 カ月後に HBe 抗原のセロコンバージョンし, ALT 正常, HBV DNA < 5 Log copies/mL が維持された症例は 20% 程度にとどまっていた²³⁾. しかしながら, 2011 年 9 月, HBe 抗原の有無に関係なく, B 型慢性活動性肝炎に対してペグインターフェロン α 2a の 1 年間投与が保険適用となって以降, B 型慢性肝疾患に対するインターフェロン治療の位置付けが変化してきている. 2009 年に報告されたヨーロッパの多施設共同 randomized control trial では, 治療終了 6 カ月後の ALT 正常化は 59%, HBV DNA < 400 copies/mL が持続した症例が 19% で認められ, 治療終了 3 年後も 18% の症例で HBV DNA < 400 copies/mL が持続した¹¹⁾. さらに, 治療終了 3

表3 核酸アナログ中止後の再燃リスクの評価

(「B型肝炎の核酸アナログ薬治療における治療中止基準の作成と治療中止を目指したインターフェロン治療の有用性に関する検討」平成21～23年度総合研究報告書, 2012, p.16-8)²⁸⁾

中止時 HBs 抗原量 (IU/mL)		スコア	中止時 HB コア関連抗原量 (U/mL)		スコア
1.9 Log (80) 未満		0	3.0 Log 未満		0
1.9 Log (80) 以上 2.9 Log (800) 未満		1	3.0 Log 以上 4.0 Log 未満		1
2.9 Log (800) 以上		2	4.0 Log 以上		2

再燃リスク	総スコア	予測成功率	評価
低リスク群	0	80～90%	中止を考慮してもよい群。 ただし、低リスク群でも肝炎再燃症例が存在するため、再燃に対する注意は必須である。
中リスク群	1～2	約50%	状況によって中止を考慮してもよい群。 この群では、中止の条件や方法を今後さらに検討する必要がある。
高リスク群	3～4	10～20%	治療の継続が推奨される群。 ただし、35歳未満では中止成功率が比較的高く、30～40%である。

年後のHBs抗原陰性化も43%で得られており、治療向上が期待できる結果であった。しかしながら、ヨーロッパと本邦では、HBV genotypeの分布が異なっていることを踏まえると、本邦での試験結果を重要視する必要がある。そこで、本邦で行われたPEG-IFN α 2aの第3相試験をみると、1年間の治療により24.4%のHBe抗原陰性化とともに、2例でHBs抗原の消失例が認められる結果となっており、従来のインターフェロンよりもより高い治療効果が期待できる。さらに、近年では、核酸アナログ（特にアデホビル）を併用することによる治療効果の向上²⁴⁻²⁶⁾やIL28B遺伝子多型による治療効果との関連²⁴⁾の報告も散見されるようになっており、治療工夫によるさらなる抗ウイルス効果の向上が期待される。

D. 核酸アナログ治療からDrug freeに向けた試み

核酸アナログ治療は、強力な抗ウイルス効果と速やかな肝炎の鎮静化が得られることから、広く用いられてきた一方で、長期的な加療に伴う薬剤耐性ウイルス出現のリスクの上昇や医療経済的な問題から、Drug freeに向けた試みも行われるよ

うになっている。2008年度以降に発表された「治療の標準化に関するガイドライン」では、35歳未満の若年症例では、IFN単独療法やsequential therapy (ETV + IFN連続療法)などを用いたDrug freeを目指した治療法も選択肢の一つとして明記されており、核酸アナログ投与中の症例に対していかに安全に核酸アナログ療法を中止し、Drug freeを達成するか重要な課題の一つとなっている。先述したように、核酸アナログ治療は、HBVの複製過程を阻害する治療法であることから、感染肝細胞の核内に存在するcccDNAやミニクロモソームを完全に排除することは困難であり、血中HBV DNAが陰性化したとしても肝臓からのHBVゲノムの完全消失は得られず、治療中止により肝炎は高率に再燃することとなる^{16,27)}。そのため、2009年度より「B型肝炎の核酸アナログ薬治療における中止基準の作成と治療中止を目指したIFN治療の有用性に関する研究」を目的とした厚生労働省研究班により、全国11施設126例の核酸アナログ中止例を集計したretrospectiveな検討が行われ、2011年度に中止後再燃をきたしにくい症例を判別するための指針が作成された^{28,29)}。その指針では、まず、肝予備能が良好で、肝炎が再燃した場合でも重症化し

にくく、核酸アナログ薬投与開始後2年以上経過しており、中止時のHBV DNA（リアルタイム法）が検出感度以下かつHBe抗原陰性であることを核酸アナログ治療の中止を考慮するための必要条件とし、この必要条件を満たした症例において、さらに中止時のHBs抗原量、HBコア関連抗原量を参考にスコアリングすることで、中止成功率を予測するシステムとなっている（表3）。このスコアリングシステムを用いることで、核酸アナログ中止後にALT < 30IU/LかつHBV DNA < 4.0 Log copies/mLを持続できる確率（中止成功率）を予測することが可能であり、スコア3～4点となるような症例を避けることで、比較的安全な核酸アナログの中止が見込まれることになる。ただし、この評価基準も完全なものとはいえないことから、安全かつ確実な核酸アナログ療法の中止を行うことは今後の大きな検討課題の一つである。

E. B型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の展望

2000年以降、3種類の核酸アナログ製剤が保険適用となったことにより、B型慢性肝疾患のコントロールは劇的に改善し、発癌予防効果も期待できるようになった^{14,30)}。一方、稀ではあるが、薬剤耐性変異が出現していないにもかかわらず、いずれの核酸アナログ製剤を投与しても十分な抗ウイルス効果が得られない症例やいずれにも薬剤耐性を獲得した多剤耐性ウイルス出現例が存在する^{31,32)}。本邦では、現在、このような症例への治療効果も期待し、新たな核酸アナログ製剤としてテノホビルの保険適用に向けた準備が進められている。テノホビルは、エンテカビルと同等の強力な抗ウイルス効果を示し^{33,34)}、ラミブジンやアデホビルによる治療において十分な抗ウイルス効果が得られなかった症例に対しても良好なHBV DNAの減少が期待されている反面^{33,35,36)}、

アデホビルに類似した薬剤であることから、副作用として腎機能障害やFanconi症候群の出現する可能性も示唆されており³⁷⁻⁴⁰⁾、アデホビル投与時と同様、注意深い経過観察も必要である。

今後、B型慢性肝疾患に対する抗ウイルス療法として4種類の核酸アナログ製剤とペグインターフェロンが使用可能となり、治療選択肢が増える一方で、治療の長期目標であるHBs抗原の消失に向けて、いかに効率よく、効果的な抗ウイルス療法を選択し、使用していくかが重要であり、また、HBVゲノムに由来するcccDNAやミニクロモソームをターゲットとした新たな治療法の開発もHBs抗原消失率や肝発癌抑制率の向上を目指すうえで重要な課題の一つである。

文献

- 1) Chu CM, Liaw YF. HBsAg seroclearance in asymptomatic carriers of high endemic areas: appreciably high rates during a long-term follow-up. *Hepatology*. 2007; 45: 1187-92.
- 2) Kobayashi M, Hosaka T, Suzuki F, et al. Seroclearance rate of hepatitis B surface antigen in 2,112 patients with chronic hepatitis in Japan during long-term follow-up. *J Gastroenterol*. 2013. In print.
- 3) Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, et al. Clearance of hepatitis B surface antigen during long-term nucleot(s)ide analog treatment in chronic hepatitis B: results from a nine-year longitudinal study. *J Gastroenterol*. 2013; 48: 930-41.
- 4) Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, et al. IFN-alpha inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *J Clin Invest*. 2012; 122: 529-37.
- 5) Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 19975-9.
- 6) Pollicino T, Belloni L, Raffa G, et al. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation

- status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology*. 2006; 130: 823-37.
- 7) Kumada H, Okanoue T, Onji M, et al. Guidelines for the treatment of chronic hepatitis and cirrhosis due to hepatitis B virus infection for the fiscal year 2008 in Japan. *Hepatol Res*. 2010; 40: 1-7.
 - 8) Idilman R, Cinar K, Seven G, et al. Hepatitis B surface antigen seroconversion is associated with favourable long-term clinical outcomes during lamivudine treatment in HBeAg-negative chronic hepatitis B patients. *J Viral Hepat*. 2012; 19: 220-6.
 - 9) Kittner JM, Sprinzl MF, Grambihler A, et al. Adding pegylated interferon to a current nucleos(t)ide therapy leads to HBsAg seroconversion in a subgroup of patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol*. 2012; 54: 93-5.
 - 10) Lampertico P, Viganò M, Cheroni C, et al. IL28B polymorphisms predict interferon-related hepatitis B surface antigen seroclearance in genotype D hepatitis B e antigen-negative patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2013; 57: 890-6.
 - 11) Marcellin P, Bonino F, Lau GK, et al. Sustained response of hepatitis B e antigen-negative patients 3 years after treatment with peginterferon alpha-2a. *Gastroenterology*. 2009; 136: 2169-79 e1-4.
 - 12) 朝比奈靖浩, 泉 並木, 桶谷 眞, 他. B型肝炎治療ガイドライン (第1.1版). 2013.
 - 13) 熊田博光. 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「ウイルス性肝炎における最新の治療法の標準化を目指す研究に関する研究班」平成24年度 総括・分担研究報告書 2013.
 - 14) Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, et al. Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2013; 58: 98-107.
 - 15) Chevaliez S, Hezode C, Bahrami S, et al. Long-term hepatitis B surface antigen (HBsAg) kinetics during nucleoside/nucleotide analogue therapy: Finite treatment duration unlikely. *J Hepatol*. 2013; 58: 676-83.
 - 16) Tseng TC, Kao JH. Clinical utility of quantitative HBsAg in natural history and nucleos(t)ide analogue treatment of chronic hepatitis B: new trick of old dog. *J Gastroenterol*. 2013; 48: 13-21.
 - 17) Yokosuka O, Takaguchi K, Fujioka S, et al. Long-term use of entecavir in nucleoside-naïve Japanese patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatol*. 2010; 52: 791-9.
 - 18) Ono A, Suzuki F, Kawamura Y, et al. Long-term continuous entecavir therapy in nucleos(t)ide-naïve chronic hepatitis B patients. *J Hepatol*. 2012; 57: 508-14.
 - 19) Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology*. 2009; 137: 1593-608 e1-2.
 - 20) Mitsui F, Tsuge M, Kimura T, et al. Importance of serum concentration of adefovir for Lamivudine-adefovur combination therapy in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 3205-11.
 - 21) Tanaka M, Suzuki F, Seko Y, et al. Renal dysfunction and hypophosphatemia during long-term lamivudine plus adefovir dipivoxil therapy in patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol*. 2013. In print.
 - 22) Wu C, Zhang H, Qian Y, et al. Hypophosphatemic osteomalacia and renal Fanconi syndrome induced by low-dose adefovir dipivoxil: a case report and literature review suggesting ethnic predisposition. *J Clin Pharm Ther*. 2013; 38: 321-6.
 - 23) Suzuki F, Arase Y, Suzuki Y, et al. Long-term efficacy of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection in Japan. *J Gastroenterol*. 2012; 47: 814-22.
 - 24) de Niet A, Takkenberg RB, Benayed R, et al. Genetic variation in IL28B and treatment outcome in HBeAg-positive and -negative chronic hepatitis B patients treated with Peg interferon alfa-2a and adefovir. *Scand J Gastroenterol*. 2012; 47: 475-81.
 - 25) Takkenberg B, Terpstra V, Zaaijer H, et al. Intrahepatic response markers in chronic hepatitis B patients treated with peginterferon alpha-2a and adefovir. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 26: 1527-35.
 - 26) Takkenberg RB, Jansen L, de Niet A, et al. Baseline hepatitis B surface antigen (HBsAg) as predictor of sustained HBsAg loss in chronic hepatitis B patients treated with peginterferon alfa-2a and adefovir. *Antivir Ther*. 2013. In print.

- 27) Pan X, Zhang K, Yang X, et al. Relapse rate and associated-factor of recurrence after stopping NUCs therapy with different prolonged consolidation therapy in HBeAg positive CHB patients. *PLoS One*. 2013; 8: e68568.
- 28) 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型肝炎の核酸アナログ薬治療における治療中止基準の作成と治療中止を目指したインターフェロン治療の有用性に関する検討」平成21～23年度総合研究報告書. 2012. p.16-8.
- 29) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, et al. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res*. 2012; 42: 139-49.
- 30) Zoutendijk R, Reijnders JG, Zoulim F, et al. Virological response to entecavir is associated with a better clinical outcome in chronic hepatitis B patients with cirrhosis. *Gut*. 2013; 62: 760-5.
- 31) Karatayli E, Karatayli SC, Cinar K, et al. Molecular characterization of a novel entecavir mutation pattern isolated from a multi-drug refractory patient with chronic hepatitis B infection. *J Clin Virol*. 2012; 53: 130-4.
- 32) Song ZL, Cui YJ, Zheng WP, et al. Diagnostic and therapeutic progress of multi-drug resistance with anti-HBV nucleos(t)ide analogues. *World J Gastroenterol*. 2012; 18: 7149-57.
- 33) Lavocat F, Deny P, Pichoud C, et al. Similar evolution of Hepatitis B virus quasispecies in patients with incomplete adefovir response receiving tenofovir/emtricitabine combination or tenofovir monotherapy. *J Hepatol*. 2013; 59: 684-95.
- 34) Seto WK, Liu K, Wong DK, et al. Patterns of hepatitis B surface antigen decline and HBV DNA suppression in Asian treatment-experienced chronic hepatitis B patients after three years of tenofovir treatment. *J Hepatol*. 2013; 59: 709-16.
- 35) Baran B, Soyer OM, Ormeci AC, et al. Efficacy of tenofovir in patients with Lamivudine failure is not different from that in nucleoside/nucleotide analogue-naïve patients with chronic hepatitis B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57: 1790-6.
- 36) Gordon SC, Krastev Z, Horban A, et al. Efficacy of tenofovir disoproxil fumarate at 240 weeks in patients with chronic hepatitis B with high baseline viral load. *Hepatology*. 2013; 58: 505-13.
- 37) Fernandez-Fernandez B, Montoya-Ferrer A, Sanz AB, et al. Tenofovir nephrotoxicity: 2011 update. *AIDS Res Treat*. 2011; 354908.
- 38) Gracey DM, Snelling P, McKenzie P, et al. Tenofovir-associated Fanconi Syndrome in patients with chronic hepatitis B mono-infection. *Antivir Ther*. 2013. In print.
- 39) Hall AM. Update on tenofovir toxicity in the kidney. *Pediatr Nephrol*. 2013; 28: 1011-23.
- 40) Mauss S, Berger F, Filmann N, et al. Effect of HBV polymerase inhibitors on renal function in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2011; 55: 1235-40.

RESEARCH ARTICLE

Establishment of Hepatitis C Virus RNA-Replicating Cell Lines Possessing Ribavirin-Resistant Phenotype

Shinya Satoh, Kyoko Mori, Youki Ueda, Hiroe Sejima, Hiromichi Dansako, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato*

Department of Tumor Virology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700-8558, Japan

* nkato@md.okayama-u.ac.jp



Abstract

Background

Ribavirin (RBV) is a potential partner of interferon-based therapy and recently approved therapy using direct acting antivirals for patients with chronic hepatitis C. However, the precise mechanisms underlying RBV action against hepatitis C virus (HCV) replication are not yet understood. To clarify this point, we attempted to develop RBV-resistant cells from RBV-sensitive HCV RNA-replicating cells.

Methodology/Principal Findings

By repetitive RBV (100 μ M) treatment (10 weeks) of 3.5-year-cultured OL8 cells, in which genome-length HCV RNA (O strain of genotype 1b) efficiently replicates, dozens of colonies that survived RBV treatment were obtained. These colonies were mixed together and further treated with high doses of RBV (up to 200 μ M). By such RBV treatment, we successfully established 12 RBV-survived genome-length HCV RNA-replicating cell lines. Among them, three representative cell lines were characterized. HCV RNA replication in these cells resisted RBV significantly more than that in the parental OL8 cells. Genetic analysis of HCV found several common and conserved amino acid substitutions in HCV proteins among the three RBV-resistant cell species. Furthermore, using cDNA microarray and quantitative RT-PCR analyses, we identified 5 host genes whose expression levels were commonly altered by more than four-fold among these RBV-resistant cells compared with the parental cells. Moreover, to determine whether viral or host factor contributes to RBV resistance, we developed newly HCV RNA-replicating cells by introducing total RNAs isolated from RBV-sensitive parental cells or RBV-resistant cells into the HCV RNA-cured-parental or -RBV-resistant cells using an electroporation method, and evaluated the degrees of RBV resistance of these developed cells. Consequently, we found that RBV-resistant phenotype was conferred mainly by host factor and partially by viral factor.

OPEN ACCESS

Citation: Satoh S, Mori K, Ueda Y, Sejima H, Dansako H, Ikeda M, et al. (2015) Establishment of Hepatitis C Virus RNA-Replicating Cell Lines Possessing Ribavirin-Resistant Phenotype. PLoS ONE 10(2): e0118313. doi:10.1371/journal.pone.0118313

Academic Editor: Bumsuk Hahn, University of Missouri-Columbia, UNITED STATES

Received: June 11, 2014

Accepted: January 12, 2015

Published: February 20, 2015

Copyright: © 2015 Satoh et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by a grant-in-aid for research on hepatitis from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan; and by a grant-in-aid for Scientific Research (B) (Grant no. 25293110) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS). Y.U. was supported by a Research Fellowship for Young Scientists from the Japan Society for the Promotion of Science. The funders had no role in study design, data collection and

analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusions/Significance

These newly established HCV RNA-replicating cell lines should become useful tools for further understanding the anti-HCV mechanisms of RBV.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection causes persistent hepatitis, leading often to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1, 2]. Since approximately 170 million people are estimated to be infected with HCV worldwide, this infection is a serious global health problem [3]. HCV is an enveloped virus with a positive single-stranded 9.6 kilobase (kb) RNA genome and belongs to the *Flaviviridae* family. HCV encodes a single open reading frame, producing a large polyprotein precursor of approximately 3000 amino acids (aa). This precursor polyprotein is processed by host and virus proteases into the following mature proteins: core, envelope 1 (E1), E2, p7, nonstructural protein 2 (NS2), NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B [4, 5].

Ribavirin (RBV) is a synthetic guanosine analog and shows efficacy in the treatment of viral diseases. RBV has been used in combination with pegylated-interferon (PEG-IFN) in the former standard therapy for patients with chronic hepatitis C. This treatment achieves greater than 50% sustained virological response (SVR), while monotherapy with IFN achieves only a 30% SVR [6]. Furthermore, by combining PEG-IFN and RBV with a direct-acting antiviral (DAA), such as telaprevir or boceprevir, more than 70% of treatment-naïve patients recently showed an SVR [7–9]. Very recently, many DAAs for HCV infection have been developed, and newer treatments using these DAAs, such as sofosbuvir, simeprevir, or sofosbuvir plus ledipasvir, were approved by the FDA [10].

To date, several mechanisms underlying RBV antiviral action against HCV have been proposed [11, 12]: the inhibition of NS5B RNA-dependent RNA polymerase activity, the induction of mutagenesis in the HCV genome leading to a so-called “error catastrophe”, the enhancement of the IFN-signaling pathway, the inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) leading to GTP depletion, and immunomodulation of the switching of the Th cell phenotype from type 2 to type 1. Although most of these mechanisms were proposed based on studies using HuH-7 (human hepatoma cell line)-derived cells, which are currently used as the only cell culture system for robust HCV replication, the effective concentrations (50–1000 μM) of RBV were much higher than the clinically achievable concentrations [11, 13, 14]. Indeed, the effective concentration of RBV in our HuH-7-derived cell assay system (OR6) [15], in which genome-length HCV RNA (O strain of genotype 1b) encoding renilla luciferase replicates efficiently, was more than 100 μM [16]. Under such a situation, we accidentally found that human hepatoma Li23-derived ORL8c cells, whose gene expression profile was distinct from that of HuH-7 cells, enabling efficient HCV RNA replication and persistent HCV production, had high sensitivity to RBV [16–18]. Therefore, using Li23-derived HCV RNA-replicating cells (ORL8 and ORL11), we demonstrated that RBV at clinically relevant concentrations causes the inhibition of IMPDHs activity, resulting in GTP depletion and the inhibition of HCV replication [16]. Furthermore, we recently demonstrated that adenosine kinase, which phosphorylates RBV to generate mono-phosphorylated RBV, which in turn inhibits IMPDHs, is an essential determinant of anti-HCV activity of RBV in cell culture [19].

Although we have found that adenosine kinase is a crucial factor for ORL8 cells to be sensitive to RBV as mentioned above, we thought that this finding was obtained by the comparison between specific monoclonal cell lines (OR6 and ORL8). Therefore, we hypothesized that there