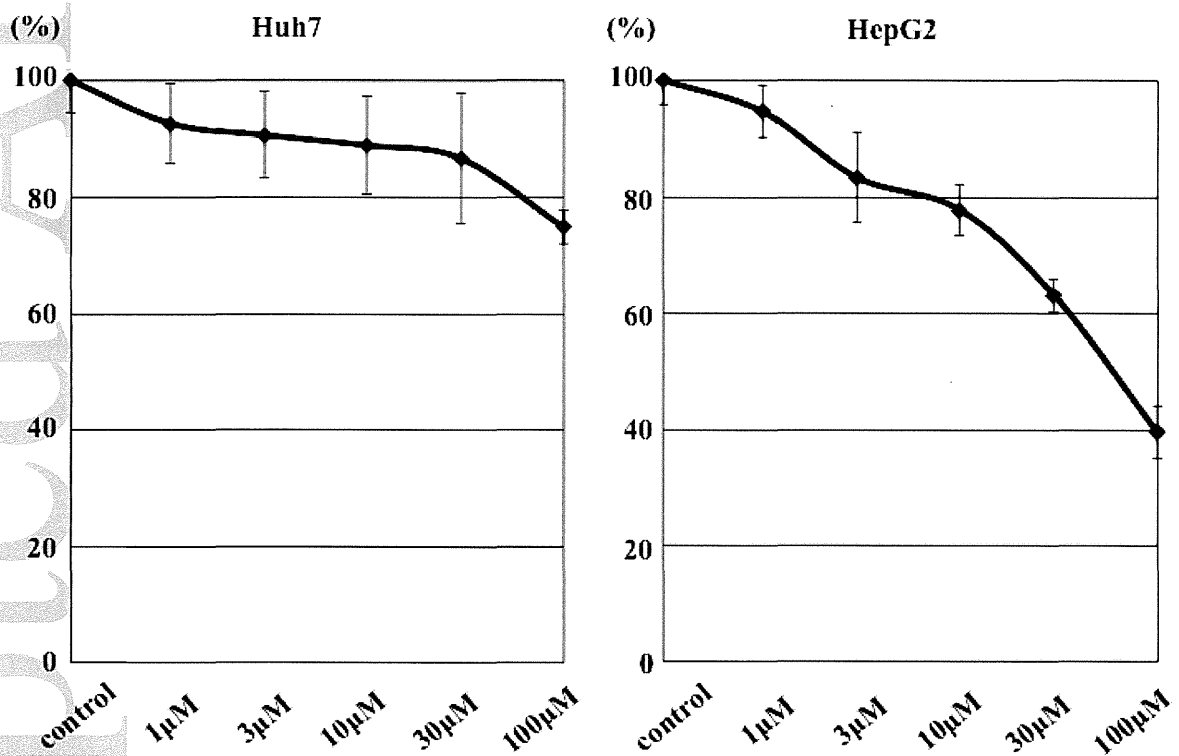


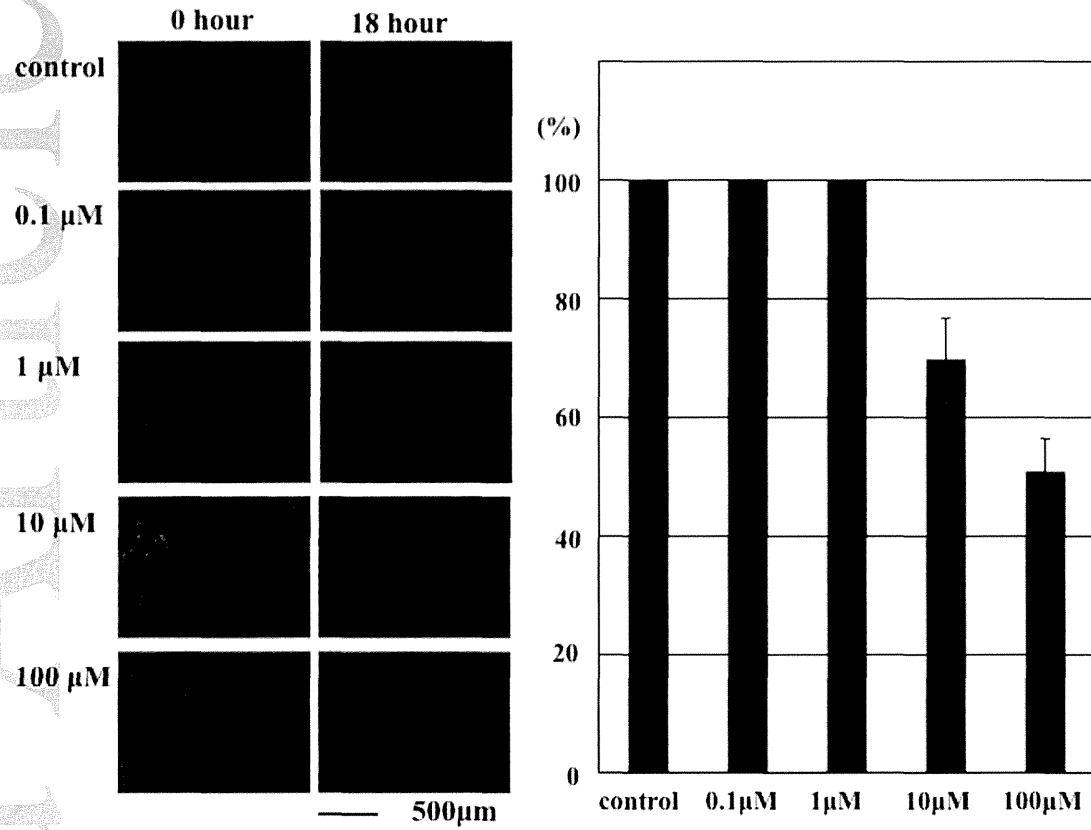
was counted after 12, 24, 36, and 48 hours in the presence or absence of ZOL. Cell viability at each concentration of ZOL is indicated as percentage compared to that of hepatoma cells without ZOL. Data are mean \pm SEM of 6 experiments.

Fig1. Effect of zoledronic acid (ZOL) on proliferation



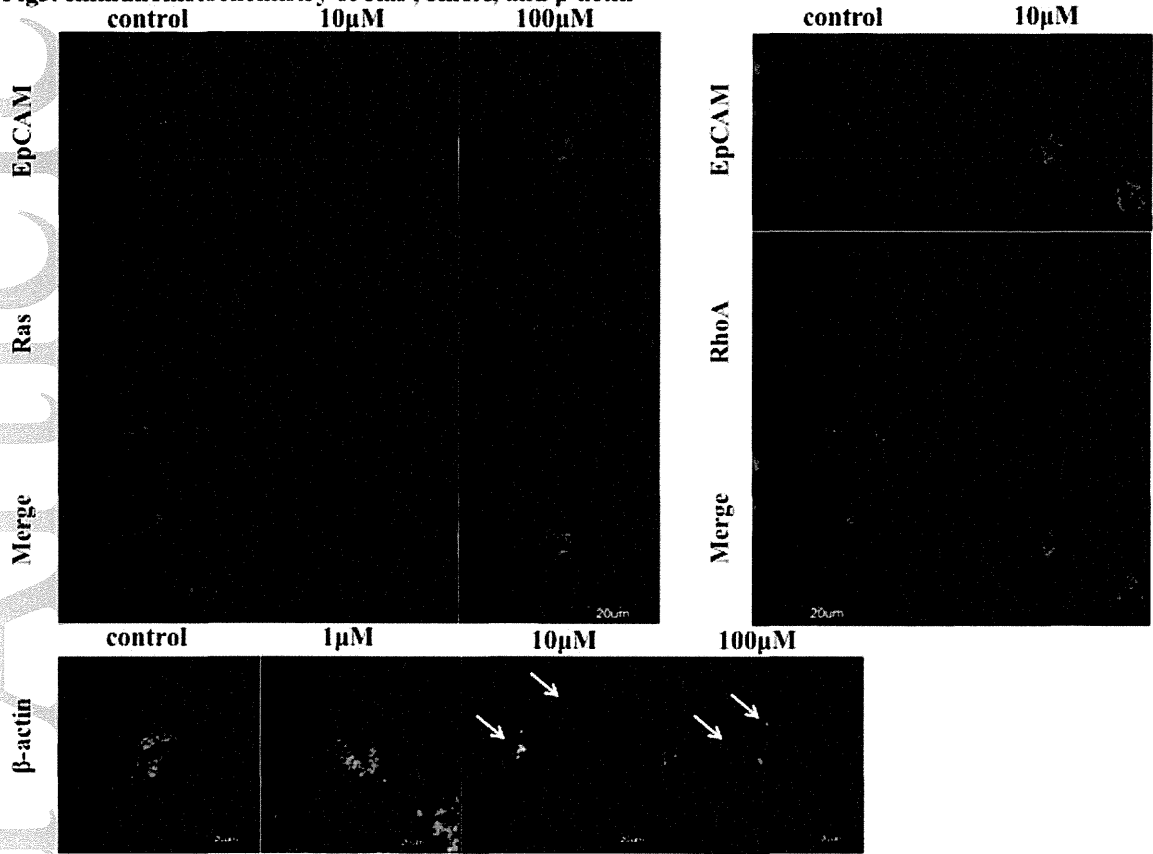
JGH_12715_F1

Fig2. Scratch assay



JGH_12715_F2

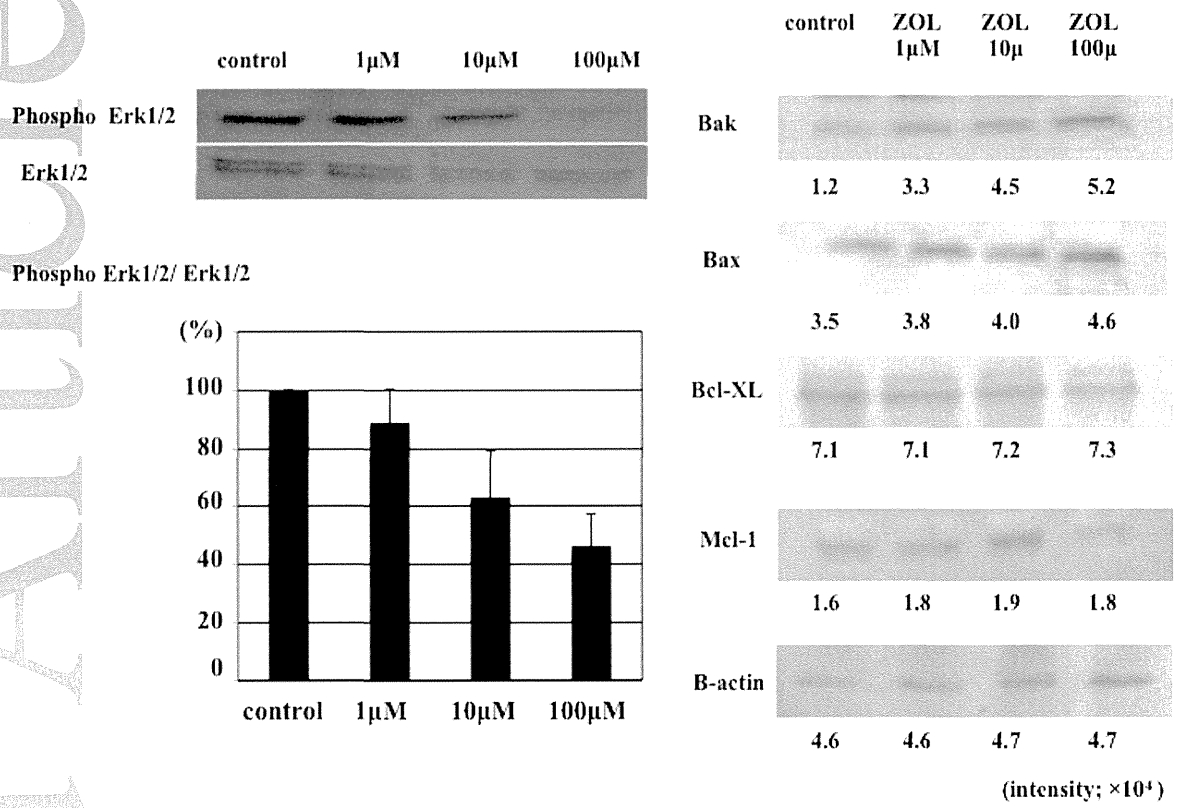
Fig3. Immunohistochemistry of Ras , RhoA, and β -actin



505

JGH_12715_F3

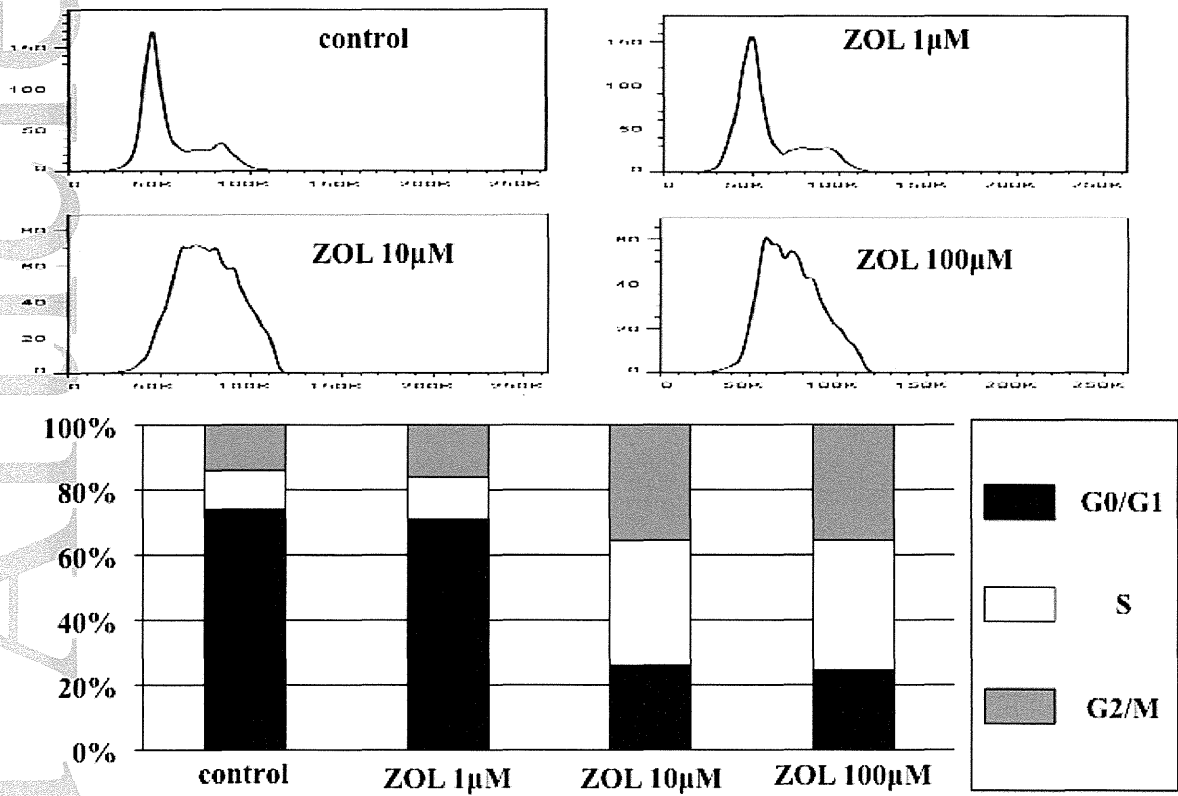
Fig4a. Immunoblotting



JGH_12715_F4a

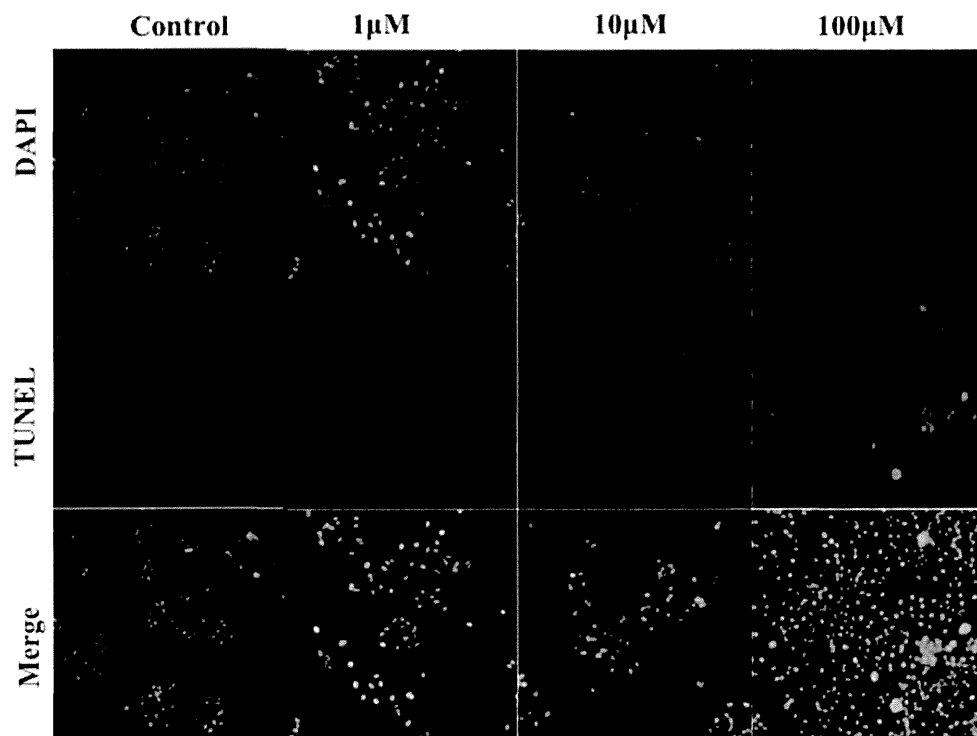
510

Figure 4b. Flowcytometry



JGH_12715_F4b

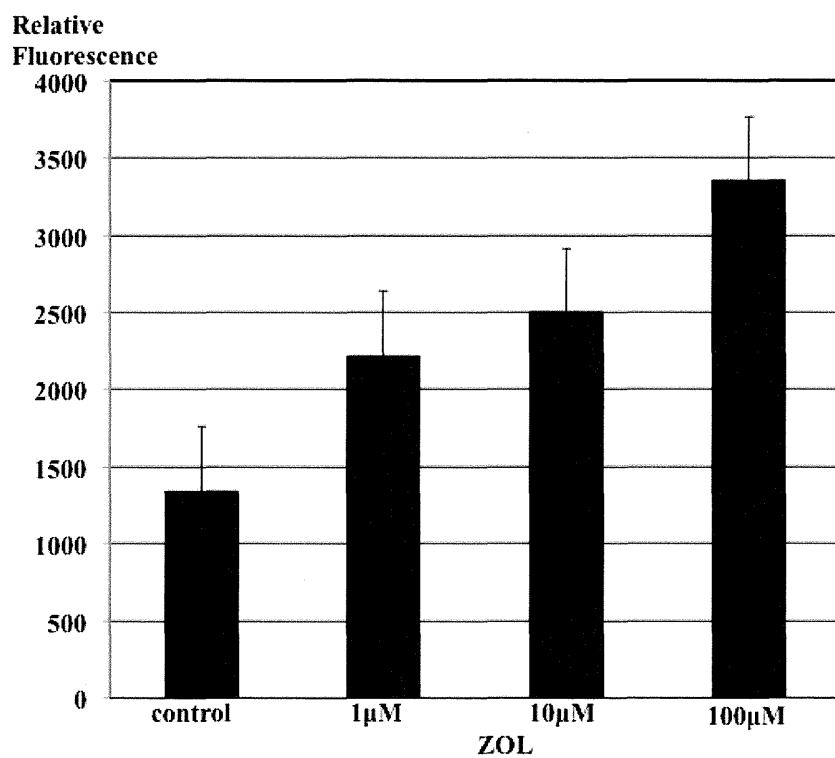
Figure 5a. TUNEL assay (Huh7)



515

JGH_12715_F5a

Fig5b. Caspase3 Assay



JGH_12715_F5b

GASTROENTEROLOGY 消化器内科®

Vol.58 No.2

Feb./2014

特集Ⅰ 機能性消化管障害の病態と治療

- 機能性消化管障害の病態研究の最前線 黒川病院・内科 本郷道夫, ほか
 過敏性腸症候群における局所脳活動と神経内分泌反応 東北大学・行動医学 鹿野理子, ほか
 過敏性腸症候群における脳腸ペプチドの遺伝子多型 岩手医科大学・消化器内科 鳥谷洋右, ほか
 大腸鏡・CT colonographyからみた過敏性腸症候群の病態と治療選択 久里浜医療センター・内科 水上 健
 シネMRIによる機能性消化管障害の病態 横浜市立大学・消化器内科 大久保秀則, ほか
 機能性消化管障害発現における幼少期被虐待歴の関与 兵庫医科大学・消化管内科 大島忠之, ほか
 機能性消化管障害と*H. pylori*感染 金沢医科大学・消化器内科 有沢富康, ほか
 機能性消化管障害における睡眠障害と臨床症状および胃排出能の相関関係 日本医科大学・消化器内科 山脇博士, ほか
 機能性消化管障害の治療効果評価基準 東京慈恵会医科大学・外科 中田浩二, ほか
 機能性ディスペプシアと胃食道逆流症における上部消化管酸環境の差異 川崎医科大学・検査診断学 眞部紀明, ほか
 腸管炎症による機能性消化管運動障害病態への関与 島根大学・第二内科 多田育賢, ほか
*H. pylori*感染症と胃運動異常 富山大学・第三内科 三原 弘
 ストレス関連ペプチドと機能性胃腸症 埼玉医科大学総合医療センター・消化器・肝臓内科 屋嘉比康治

特集Ⅱ B型肝炎の概念の変遷とその臨床的意義

- B型肝炎の概念の変遷とその臨床的意義 国立国際医療研究センター・肝炎・免疫研究センター 杉山真也, ほか
 住民検診によるT地区におけるHBs抗原消失についての検討 長崎大学・消化器内科 田浦直太, ほか
 本邦におけるHBe抗体陽性無症候性キャリアの実態 千葉大学・消化器内科 新井誠人, ほか
 B型肝炎ウイルスジェノタイプB高感染地域における感染実態の変遷と 核酸アナログ治療例におけるジェノタイプの臨床的意義 山形大学・消化器内科 渡辺久剛, ほか
 高感度HBV RNA定量系によるB型慢性肝炎核酸アナログ治療例の病態解析 信州大学・消化器内科 松本晶博
 B型肝炎の病態を規定する可能性がある新たなウイルス要因 埼玉医科大学・消化器内科・肝臓内科 内田義人, ほか
 HBV感染に伴うヒト肝細胞内免疫応答の変化 広島大学・消化器・代謝内科 柘植雅貴, ほか
 HCV抗体陽性肝細胞癌におけるHBV DNAの意義 国立国際医療研究センター・肝炎・免疫センター 武藤 純, ほか
 B型慢性肝炎へのIL28B遺伝子多型の影響 山梨大学・第一内科 井上泰輔, ほか
 B型慢性肝炎治療におけるHBs抗原陰性化 虎の門病院・肝臓センター 鈴木文孝
 B型慢性肝炎に対するインターフェロン治療の意義 武蔵野赤十字病院・消化器科 村岡 優, ほか
 核酸アナログ治療中における治療効果と肝発癌に關与する因子 名古屋第二赤十字病院・消化器内科 折戸悦朗, ほか
 B型肝炎の劇症化予防対策 山口大学・消化器病態内科 内田耕一, ほか

科学評論社

特集II

B型肝炎の概念の変遷とその臨床的意義

HBV感染に伴うヒト肝細胞内
免疫応答の変化*

柘 植 雅 貴**
平 賀 伸 彦**
茶 山 一 彰**

Key Words : human hepatocyte chimeric mice, hepatitis B virus (HBV), microarray analysis, interferon response

はじめに

B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus ; HBV) や C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus ; HCV) は、種選択性が高く、ヒトやチンパンジーといった限定された動物にのみ感染することが知られている。そのため、モデル動物を用いた肝炎ウイルス研究では、チンパンジーを使用した研究が行われてきたが、ワシントン条約による厳格な制限と高額な飼育費用、限定された飼育施設の必要性から、多数のチンパンジーを飼育することは困難であり、*in vivo*における肝炎ウイルス感染・複製メカニズムの研究は困難とされてきた。

2001年になり、マウス肝臓内にヒト肝細胞を有するヒト肝細胞キメラマウスが作製され、HCVがこのマウスに感染することが報告された¹⁾。その後、当研究室も本学理学部との共同研究により、severe combined immune deficient (SCID) マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスの作製に成功し²⁾、HBVやHCVが持続感染すること、インターフェロンや核酸アナログ製剤などの薬効評価に有用であることを報告してきた^{3)~7)}。本稿で

は、このヒト肝細胞キメラマウスを用いてHBV感染が及ぼすヒト肝細胞内の遺伝子発現への影響に関する研究を紹介する。

臨床検体を使用した
マイクロアレイの特徴

近年、臨床検体を用いたマイクロアレイ解析に関する報告は多数報告されているが、その多くは正常肝組織と慢性肝障害・肝硬変・肝癌の肝組織との比較であり、肝障害の程度はさまざまであるものの、肝炎を伴った肝組織を使用した解析といえる^{8)~11)}。たとえば、図1に示すように、移植時に採取されたドナーの肝組織(正常)とHBV関連急性肝不全症例の肝組織を検討した場合、肝組織内の多数の遺伝子が発現制御されていることが確認できる⁹⁾。そこで、肝不全組織において発現変化の大きかった遺伝子をみると、上位には、免疫応答に関与する遺伝子が多く抽出されており、HBVのヒト肝細胞への直接的な影響ではなく、宿主の免疫応答により発現制御された遺伝子が上位を占めている可能性が考えられた。また、免疫応答や肝障害の程度には個人差があることから、個人差により重要な遺伝子の発現変化が観察できない可能性もあり、臨床検体を使用する場合には、これらの問題に配慮し解析することが重要と考えられる。

* Effects of HBV infection on the interferon response in immunodeficient human hepatocyte chimeric mice.

** Masataka TSUGE, M.D., Ph.D., Nobuhiko HIRAGA, M.D., Ph.D. & Kazuaki CHAYAMA, M.D., Ph.D.: 広島大学大学院医歯薬保健学研究院消化器・代謝内科学[〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3]; Department of Gastroenterology and Metabolism, Applied Life Science, Institute of Biomedical and Health Science, Hiroshima University, Hiroshima 734-8551, JAPAN

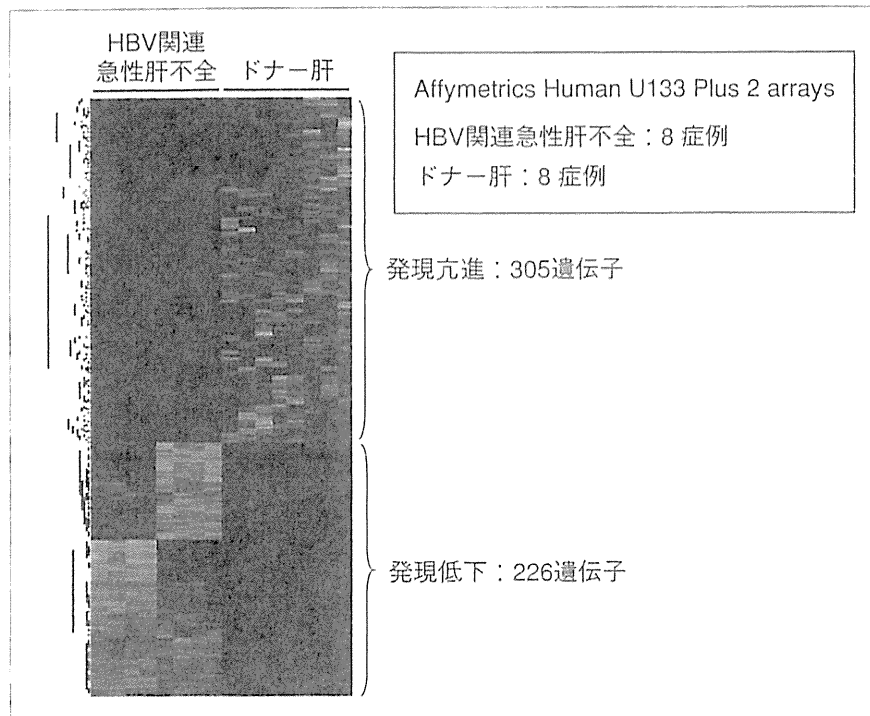


図1 GEO (Gene Expression Omnibus) を用いたHBV関連急性肝不全症例における肝臓内の遺伝子発現変化
Farci PらによるcDNAマイクロアレイ遺伝子発現プロファイルをもとに解析。
(文献⁹⁾より引用改変)

HBV持続感染マウスの作製と cDNAマイクロアレイ解析

前述したように、臨床検体を用いたマイクロアレイ解析では宿主内の免疫応答の影響を排除することは困難であることから、本研究では、ヒト肝細胞キメラマウス(PXBマウス、フェニックス・バイオ社)を利用してcDNAマイクロアレイ解析を行った。PXBマウスは、マウス肝臓内がヒト肝細胞に高度に置換されているマウスであり、SCIDマウス由来であることから、マウスは高度な免疫不全状態となっている。また、マウス肝臓内に生着させるヒト肝細胞は同一個体から得られた細胞を使用できることから、個体差も最小限に抑えることができると考えられ、HBVの直接的な肝細胞への影響を解析することが可能と考えられる。

本研究の概略を図2に示す。ヒト肝細胞キメラマウスをHBV感染やインターフェロン投与の有無により、4群(A群はHBV非感染/インターフェロン非投与のコントロール、B群はHBV非感染/インターフェロン投与群、C群はHBV感染/インターフェロン非投与群、D群はHBV感染/インターフェ

ロン投与群)に群別した。なお、インターフェロン接種は、インターフェロン α 7,000 IU/g体重で行い、接種6時間後にマウスをsacrificeした。また、C、D群のマウスは、HBV患者血清接種8週間後(マウス血中HBV DNA量がプラトーに達する時期)にそのままsacrifice(C群)、または、インターフェロン接種6時間後にsacrificeとした(D群)。各種マウス作製後、マウス肝にあるヒト肝細胞を採取。採取したヒト肝細胞を用いて、cDNAマイクロアレイ解析(Agilent社Whole Human Genome 4 \times 44K)を行った。また、遺伝子発現プロファイルの解析はGeneSpring GX software (version 10.0.2; Tomy Digital Biology)を用いて行った。

HBV感染が及ぼす ヒト肝細胞内遺伝子発現の変化

まず、A群とC群、つまり、HBV感染の有無によるヒト肝細胞内の遺伝子発現変化について検討したところ、HBV感染に伴い159遺伝子の発現は亢進し、214遺伝子の発現は低下した(図3)。これら発現変化の大きかった上位遺伝子を解析したところ、発現が亢進した遺伝子群には、

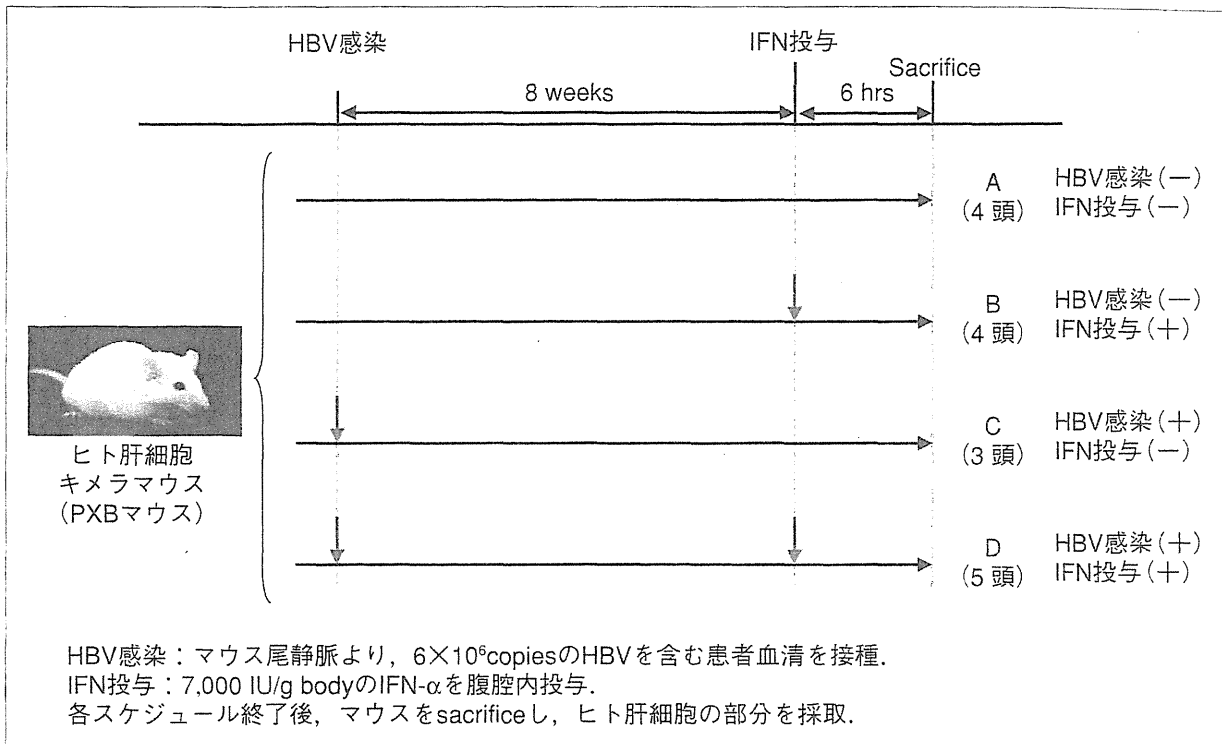


図2 ヒト肝細胞回収までの概略

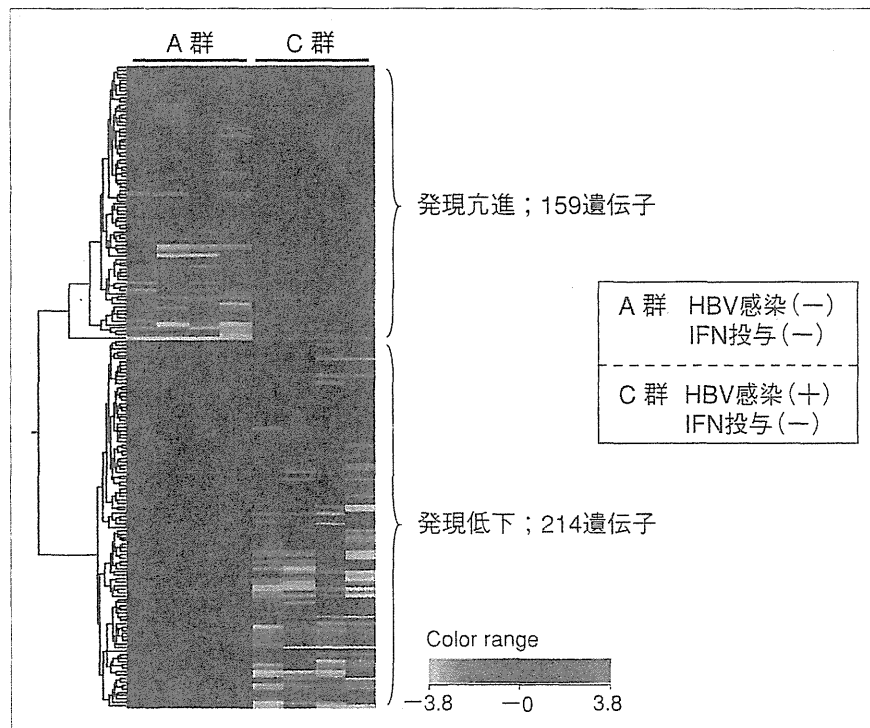


図3 HBV感染によって発現が変化した遺伝子のクラスター解析

*GDF15*や*GDNF*といったoncogenicな機能を持つ遺伝子が含まれ(表1), 発現が低下した遺伝子群には転写やDNA修復に関与する遺伝子が含まれていた(表2). そこで, HBV感染により有意な発

現変化が認められた遺伝子群がどのような細胞内メカニズムに関与するか検討するため, Gene Ontology Consortiumの情報を基にGeneSpring GX softwareを用いて解析を行った. その結果, cell

表1 HBV感染により、3倍以上発現が亢進した上位20遺伝子

Gene symbol	Genbank accession	Fold change	Functions
S100P	NM_005980	529.27	肝癌の早期発育に関与.
BI910665	BI910665	74.25	unknown
UNC5B	NM_170744	67.57	大腸癌, 胃癌, 乳癌, 腎癌などさまざまな癌腫で発現が低下. Apoptosisに関与.
FMOD	NM_002023	41.13	B-cell chronic lymphocytic leukemia (BCLL) や mantle cell lymphoma (MCL) で発現亢進.
KLHDC7B	NM_138433	40.82	unknown
GDF15	NM_004864	33.59	前立腺癌で, 恒常的に発現. 発現レベルと体重減少が関連.
GDNF	ENST00000381827	24.13	Parkinson病と関連. 神経細胞のsurvivalや分化に関与.
KCNMB3	NM_171828	15.01	機能不明. 細胞内での発現は低い.
TACSTD2	NM_002353	14.21	膀胱癌, 肺癌で発現亢進.
COL16A1	NM_001856	13.51	細胞間接着に関与.
CDKN2B	NM_078487	12.53	cyclin-dependent protein kinase活性を制御し, 細胞増殖に関与. さまざまな腫瘍で異常あり.
FUT1	NM_000148	12.26	血液型と関連.
FAM134B	NM_019000	9.49	Golgi装置のマーカー. 細胞増殖に関与.
TNFRSF10C	NM_003841	8.90	正常細胞のapoptosisに関与.
C6orf128	NM_145316	8.67	unknown
BC043411	BC043411	8.35	unknown
LRRC25	NM_145256	7.93	蛋白-蛋白の結合に関与.
ASNS	NM_001673	7.84	アスパラギンの合成に関与.
RASD1	NM_016084	7.72	RASのsuperfamilyで, 体内時計の制御.
LAMP3	NM_014398	7.66	細胞増殖に関与. 食道癌, 胃癌, 大腸癌などで発現亢進.

表2 HBV感染により、3倍以上発現が低下した上位20遺伝子

Gene symbol	Genbank accession	Fold change	Functions
PBK	NM_018492	81.93	細胞増殖に関与. 乳癌で発現亢進.
RRM2	NM_001034	65.28	細胞分裂時に発現.
NCAPG	NM_022346	63.07	細胞分裂時の脱リン酸化.
CCNB2	NM_004701	57.05	細胞周期のコントロール.
TOP2A	NM_001067	53.38	DNAトポイソメラーゼ
DLG7	NM_014750	45.56	unknown
CENPM	NM_001002876	40.63	Mitosisを促進.
BIRC5	NM_001012271	39.01	細胞周期のregulator.
UHRF1	NM_013282	37.51	DNAのメチル化, DNA修復に関与.
C13orf3	BC013418	37.20	unknown
E2F2	NM_004091	31.43	転写調節に関与.
KIF4A	NM_012310	30.58	細胞分裂時の微小管の移動に関与.
NUF2	NM_145697	29.93	細胞周期, 細胞分裂に関与.
EXO1	NM_003686	29.29	DNA修復に関与.
C15orf42	NM_152259	29.16	unknown
DTL	NM_016448	26.85	DNAの複製に関与.
CDCA7	NM_031942	26.84	転写調節に関与.
MCM10	NM_182751	26.05	DNA複製に関与.
DKFZp762E1312	NM_018410	25.11	unknown
FAM64A	NM_019013	24.22	unknown

cycle, cell division, DNA repair等に関与する遺伝子群が多く含まれていることが確認された(表3). 以上の結果から, HBVは, ヒト肝細胞

に感染することにより, oncogenicな機能を持つ遺伝子の活性化に加え, 転写調節, DNA修復の障害をもたらすことにより, 肝発癌に強く影響

表3 HBV感染により、発現が変化した遺伝子のGO analysis

GO Term of biological process	P value
cell cycle	0
mitotic cell cycle	1.44E-40
cell division	2.76E-26
DNA replication	3.64E-10
cell cycle checkpoint	4.24E-10
chromosome segregation	2.78E-09
spindle organization and biogenesis	2.85E-09
response to DNA damage stimulus	1.24E-08
organelle organization and biogenesis	5.72E-08
cytoskeleton organization and biogenesis	3.00E-07
microtubule-based process	5.24E-07
DNA repair	3.38E-06
regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	5.76E-06
chromosome localization	3.60E-05
establishment of chromosome localization	3.60E-05

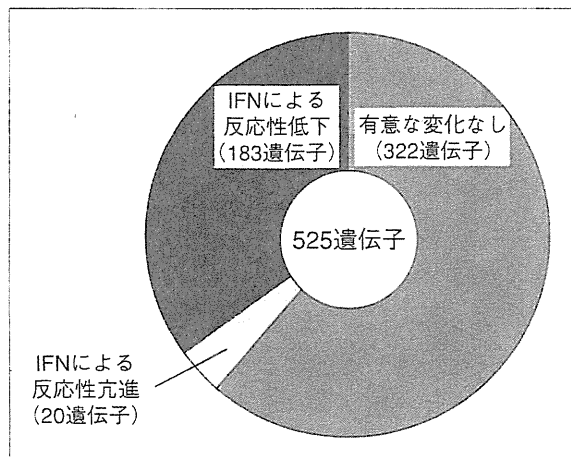


図4 HBV非感染時にIFN投与で発現が3倍以上亢進した525遺伝子のHBV感染時におけるIFN応答
HBV非感染時に、IFNが接種された場合、525遺伝子の発現が誘導されたが、HBV感染に伴い、その35%は、IFNによる誘導が低下した。

している可能性が示唆された¹²⁾。

HBV感染による肝細胞内の インターフェロン応答の変化

臨床において、B型慢性肝炎に対するインターフェロン治療が行われているが、メタ解析の結果を見ても、その抗ウイルス効果は十分とはいえない^{13)~15)}。これは、HBVがインターフェロン治療に対する抵抗性を獲得している可能性が考えられているが、その抵抗性のメカニズムに関してはいまだに不明な点が多い。そこで、HBV感染に伴うヒト肝細胞内のインターフェロン反

応性の変化を検討することとした。まず、HBV非感染時におけるインターフェロン反応を解析するため、A群(HBV非感染、未処置マウス)とB群(HBV非感染、インターフェロン投与マウス)における遺伝子発現プロファイルと比較した。その結果、インターフェロン投与により、525の遺伝子の発現誘導と、160の遺伝子の発現抑制が観察された。インターフェロン投与において、発現誘導を受ける遺伝子が強く抗ウイルス効果に参与していると考えられたことから、発現誘導を受けた525の遺伝子に着目し、HBV感染に伴うインターフェロン反応性の変化を検討することとした。

HBV感染時のインターフェロン応答(C群とD群の遺伝子発現の変化)について、同様の検討を行ったところ、HBV非感染時に発現誘導を受けた525遺伝子のうち183遺伝子(34.9%)において、HBV感染に伴うインターフェロン反応性の有意な低下が観察された(図4)。インターフェロン反応性の変化が大きかった上位遺伝子をみると、転写因子が多数含まれており、転写制御により、インターフェロン反応性を低下させている可能性が示唆された(表4)。

そこで、これら183遺伝子がどのような細胞内メカニズムに参与しているかを検討するため、Ingenuity Pathway Analysis software (version 8.6; Ingenuity Systems)を使用し、パスウェイ解析を行った。その結果、インターフェロンシ

表4 HBV感染に伴いIFN応答が低下した上位遺伝子

遺伝子名	Genbank ID	機能	Fold change		P value*
			HBV感染(-)	HBV感染(+)	
ENST00000322831		Unknown	4.52	-1.45	4.1E-07
AA593970	AA593970	EST	9.70	1.61	5.6E-07
THC2533996		Unknown	3.74	-2.50	7.0E-07
LOC388532		Unknown	3.11	-2.48	1.6E-06
ZNF267	NM_003414	転写制御因子	7.66	1.79	2.3E-06
ZNF217	NM_006526	転写制御因子	3.69	1.03	3.6E-06
CRSP3	NM_015979	転写制御因子	7.50	-1.02	4.1E-06
MGC39372	BC025340	Hypothetical protein	30.92	7.03	5.7E-06
BF972140	BF972140	EST	16.91	4.71	5.8E-06
LOC731599	XR_015536	Hypothetical protein	3.17	-4.18	8.6E-06
LOC645676	AK126559	Hypothetical protein	3.76	1.35	9.1E-06
THC2650457		Unknown	78.07	6.28	1.3E-05
ZNF24	NM_006965	転写制御因子	3.69	1.36	1.6E-05
CCDC68	NM_025214	Unknown	5.88	-2.83	1.9E-05
FLJ21272	AK024925	Hypothetical protein	14.70	2.49	3.2E-05
PLEKHF1	NM_024310	Unknown	6.65	1.84	4.7E-05
AK026418	AK026418	Unknown	9.50	2.58	5.0E-05
hCG_1790262	XM_001133847	Unknown	3.13	-2.94	6.3E-05
CEBPD	NM_005195	転写制御因子	8.16	1.56	7.0E-05
FLJ20273	NM_019027	RNA結合	3.37	1.11	7.1E-05

* P values were analyzed by T test

(文献¹²⁾より引用)

グナルに関与する遺伝子群が有意に関与していることが観察されたほか、ウイルスやバクテリアの認識機構やJak/Statシグナルに関与する遺伝子群が影響を受けていることが示された(表5)。

以上の結果から、HBVはヒト肝細胞に感染すると、細胞内の免疫応答を抑制することにより、生体からのウイルス排除機構から回避している可能性が示唆された¹²⁾。

核酸アナログによる インターフェロン反応性の改善

近年、B型慢性肝疾患に対する抗ウイルス療法として、核酸アナログ療法が行われている。核酸アナログ製剤は、HBVの複製機構において、ウイルスゲノムの合成および逆転写反応を阻害することにより、HBVの増殖を強力に抑え、肝炎の鎮静化をもたらすとともに、肝組織の改善や肝発癌抑制が期待できる薬剤であり¹⁶⁾、現在のB型慢性肝疾患治療の中心を担っている。特に、エンテカビルは、長期服薬による薬剤耐性ウイルスの出現頻度が非常に低いことから、本邦における核酸アナログ療法の第1選択薬となっている¹⁷⁾。

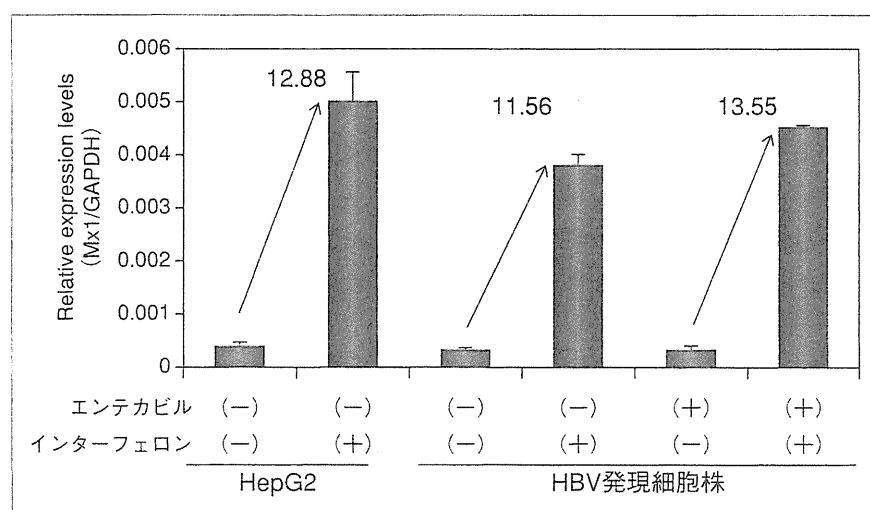
上述したように核酸アナログ製剤は、強力に

ウイルスの増殖を抑制することから、HBV感染細胞に核酸アナログを投与し、ウイルスの増殖を抑制することにより、ヒト肝細胞のインターフェロン反応性が改善するのではないかと考えた。そこで、HBV発現プラスミドをヒト肝癌細胞株(HepG2細胞)にトランスフェクションし、恒常的にHBVを発現する細胞株を樹立し、*in vitro*におけるインターフェロン反応性の変化について検討した。細胞内のインターフェロン反応性に関しては、代表的なインターフェロン誘導遺伝子であるMxAのmRNA発現をreal time PCRで検討した。その結果、HepG2細胞へのインターフェロン添加では、非添加時に比べ、MxAのmRNA発現は12.88倍亢進したのに対し、HBV発現細胞株では、インターフェロン添加によるMxA発現変化は11.56倍にとどまった。さらに、興味深いことに、HBV発現細胞株にあらかじめエンテカビル添加し、HBV増殖を抑制した細胞では、インターフェロン添加によるMxA発現は13.55倍とHBVを発現しないHepG2細胞と同等まで回復した(図5)。

以上の結果から、HBV増殖により、肝細胞内のインターフェロン反応性は低下し、核酸アナログによるHBV増殖制御によりその反応性は改

表5 HBV感染に伴いIFN応答が低下した遺伝子が関与するcanonical pathway

Canonical Pathways	P value	Associated genes
Interferon Signaling	1.0E-08	IFIT3, SOCS1, IFIT1, MX1, IFNGR1, JAK2, STAT1, TAP1, IRF1
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	1.2E-08	IL12A, OAS2, OAS3 (includes EG : 4940), IFIH1, PIK3R3, TLR4, NOD2, TICAM1, DDX58, CASP1, NOD1, TLR3, RIPK2
Type I Diabetes Mellitus Signaling	2.0E-04	SOCS1, IL12A, RIPK1, GAD1, SOCS6, SOCS2, IFNGR1, JAK2, STAT1, IRF1
Prolactin Signaling	2.7E-04	PIK3R3, SOCS1, SOCS6, SOCS2, NMI, JAK2, STAT1, IRF1
TREM1 Signaling	3.5E-04	TLR4, NOD2, ICAM1, CASP1, JAK2, TLR3, CASP5
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	3.9E-04	PIK3R3, TLR4, RND3, PPP2R2A, PPM1J, RHOA, IFNGR1, MAP3K8, IRF8, JAK2, STAT1, IRF1
Pathogenesis of Multiple Sclerosis	1.1E-03	CXCL10, CXCL9, CXCL11
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors	2.6E-03	IFIH1, RIPK1, DDX58, STAT1, IFIT2, ISG15
Dendritic Cell Maturation	2.6E-03	B2M, PIK3R3, TLR4, ICAM1, IL12A, IL1RN, IRF8, JAK2, TLR3, STAT1
IL-12 Signaling and Production in Macrophages	3.6E-03	PIK3R3, TLR4, IL12A, IFNGR1, MAP3K8, IRF8, STAT1, IRF1
Sphingosine-1-phosphate Signaling	3.6E-03	PIK3R3, S1PR2, RND3, CASP1, RHOA, CASP4, CASP7, CASP5
JAK/Stat Signaling	4.0E-03	PIK3R3, SOCS1, SOCS6, SOCS2, JAK2, STAT1
Growth Hormone Signaling	4.7E-03	PIK3R3, SOCS1, SOCS6, SOCS2, JAK2, STAT1
Retinoic acid Mediated Apoptosis Signaling	8.5E-03	TNFRSF10B, PARP8, TNFSF10, TIPARP, IRF1

(文献¹²⁾より引用)図5 *In vitro*におけるMxA発現誘導の変化

善する可能性が示された。

まとめ

本稿では、HBV持続感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HBVのヒト肝細胞への直接的な影響についての研究を示した。これまで、手術や肝生検から得られた肝組織を用いたマイクロ

アレイ解析が多数行われてきたが、多くの臨床検体は肝炎を合併しているために肝組織内にリンパ球をはじめとした免疫細胞浸潤が生じており、免疫応答の影響を回避した遺伝子発現プロファイルを獲得することは困難であった。そのため、肝組織内の各遺伝子発現変化が直接的なHBV感染に伴うものか、免疫応答に伴うものか

を判断する必要があった。本研究で使用したヒト肝細胞キメラマウスは、SCIDマウス由来であり、T細胞、B細胞系の免疫応答が欠如していることから、肝細胞にHBVが感染しても免疫応答が起こらず、肝組織への免疫細胞浸潤もほとんどみられない。つまり、本研究で得られる肝組織から得られた遺伝子発現変化は、HBVの直接的な肝細胞への影響を反映しているものと考えられ、HBVがヒト肝細胞に及ぼす分子病態メカニズムの解明に有用と考えられる。

近年、次世代シーケンサー技術が目覚ましく発展しており、マイクロアレイよりもはるかに膨大な遺伝子発現情報を得ることが可能になった。現在のところ、コスト面など解消すべき問題点はあるものの、次世代シーケンサー技術により、より詳細なHBVの肝細胞に及ぼす分子機構の解明が期待できる。

文 献

- 1) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001 ; 7 : 927.
- 2) Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, et al. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 2004 ; 165 : 901.
- 3) Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett* 2007 ; 581 : 1983.
- 4) Kimura T, Imamura M, Hiraga N, et al. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol* 2008 ; 89 : 2108.
- 5) Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 2005 ; 42 : 1046.
- 6) Yatsuji H, Hiraga N, Mori N, et al. Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. *J Med Virol* 2007 ; 79 : 1811.
- 7) Yatsuji H, Noguchi C, Hiraga N, et al. Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 ; 50 : 3867.
- 8) Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001 ; 75 : 7059.
- 9) Farci P, Diaz G, Chen Z, et al. B cell gene signature with massive intrahepatic production of antibodies to hepatitis B core antigen in hepatitis B virus-associated acute liver failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 8766.
- 10) Honda M, Yamashita T, Ueda T, et al. Different signaling pathways in the livers of patients with chronic hepatitis B or chronic hepatitis C. *Hepatology* 2006 ; 44 : 1122.
- 11) Okabe H, Satoh S, Kato T, et al. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray : identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 2129.
- 12) Tsuge M, Takahashi S, Hiraga N, et al. Effects of hepatitis B virus infection on the interferon response in immunodeficient human hepatocyte chimeric mice. *J Infect Dis* 2011 ; 204 : 224.
- 13) Hsu HY, Tsai HY, Wu TC, et al. Interferon-alpha treatment in children and young adults with chronic hepatitis B : a long-term follow-up study in Taiwan. *Liver Int* 2008 ; 28 : 1288.
- 14) Lin SM, Tai DI, Chien RN, et al. Comparison of long-term effects of lymphoblastoid interferon alpha and recombinant interferon alpha-2a therapy in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2004 ; 11 : 349.
- 15) Sung JJ, Tsoi KK, Wong VW, et al. Meta-analysis : treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2008 ; 28 : 1067.
- 16) 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.
- 17) 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.

医学と薬学 ^{Vol. 71} 7

Jul.
2014

Japanese Journal of Medicine and Pharmaceutical Science
Jpn J Med Pharm Sci

特集

B型肝炎の最新治療

序 熊田博光 虎の門病院肝臓センター

B型肝炎の疫学 田中純子 広島大学

インターフェロン療法の治療成績と今後の位置づけ
鈴木文孝 虎の門病院肝臓センター

核酸アナログ製剤による治療

ラミブジン、アデホビル治療の成績と多剤耐性ウイルス
髭修平^他 札幌厚生病院

エンテカビル治療 中本晋吾^他 千葉大学

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)
柘植雅貴^他 広島大学

核酸アナログ製剤の継続と中止

田中榮司 信州大学

再活性化 (de novo肝炎) の病態と対策

持田智 埼玉医科大学

インターフェロン療法, 核酸アナログ製剤による発癌抑制効果

保坂哲也 虎の門病院肝臓センター

自然科学社

特集◎ B型肝炎の最新治療

核酸アナログ製剤による治療 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)

柘植雅貴・茶山一彰

広島大学大学院消化器・代謝内科学

Key words : B型慢性肝疾患, 核酸アナログ, テノホビル, 薬剤耐性

はじめに

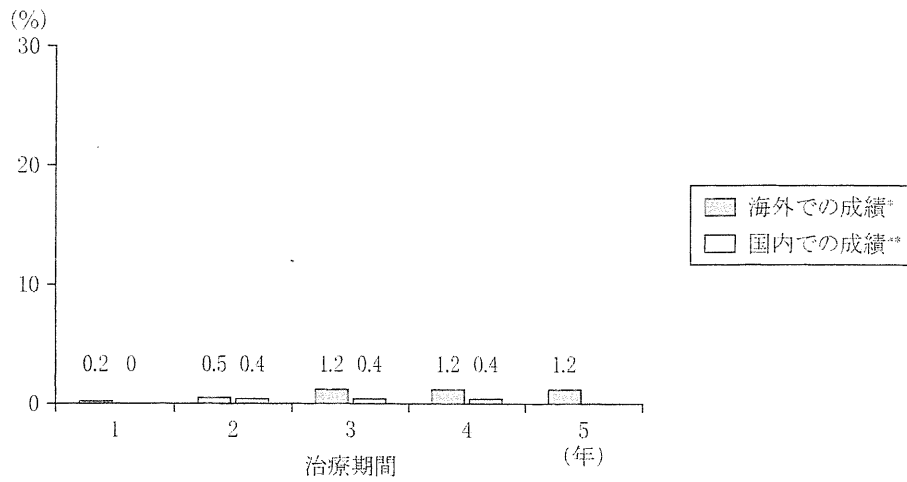
2000年11月、核酸アナログ製剤であるラミブジン（ゼフィックス[®]）が登場して以降、アデホビル（ヘプセラ[®]）、エンテカビル（バラクルード[®]）が保険適応となり、B型慢性肝疾患に対する治療は劇的に進歩した。しかしながら、核酸アナログ製剤治療は、ウイルス増殖抑制が治療の中心であることから、核内に侵入したB型肝炎ウイルス（HBV）ゲノムの排除は困難であり、長期治療が必須となる。核酸アナログ治療により、長期的なウイルス陰性化と肝炎鎮静化が得られた症例では、肝組織の改善とともに、肝発癌率の低下が期待できる^{1)~4)}。一方、長期的な核酸アナログ治療の問題点のひとつとして、薬剤耐性ウイルスの出現が挙げられる。核酸アナログ治療の中心的薬剤であるエンテカビルは、ラミブジンやアデホビルに比して、耐性ウイルス出現の頻度は比較的低いとされているものの、4年間の治療で0.4~1.2%程度のエンテカビル耐性ウイルス出現が報告され（図1）⁵⁾⁶⁾、さらに近年では、ラミブジン、アデホビル、エンテカビルいずれの薬剤にも耐性を

示す多剤耐性ウイルスの存在も報告されるようになってきていることから⁷⁾、多剤耐性ウイルスに対する対策の構築が急務となっている。

このような背景から、薬剤耐性ウイルスの出現が少なく、多剤耐性ウイルスに対しても抗ウイルス効果を示す薬剤としてテノホビルジソプロキシルフマル酸塩（テノホビル：テノゼット[®]）の治験が進められ、本邦でも、2014年3月24日、B型慢性肝疾患に対するウイルス増殖抑制薬として保険承認された。海外では、2013年11月の時点ですでに113の国または地域で承認されていることから、本稿では、テノホビルによる抗ウイルス効果・副作用について、本邦での治験ならびに海外での治療成績をもとに示す。

I テノホビルの作用機序

図2にHBVのライフサイクルを示す。HBVは、肝細胞に感染すると、核内にcccDNA（covalently closed circular DNA）を形成する。HBV増殖の過程において、このcccDNAを鋳型としてプレゲノムRNAやウイルス蛋白の

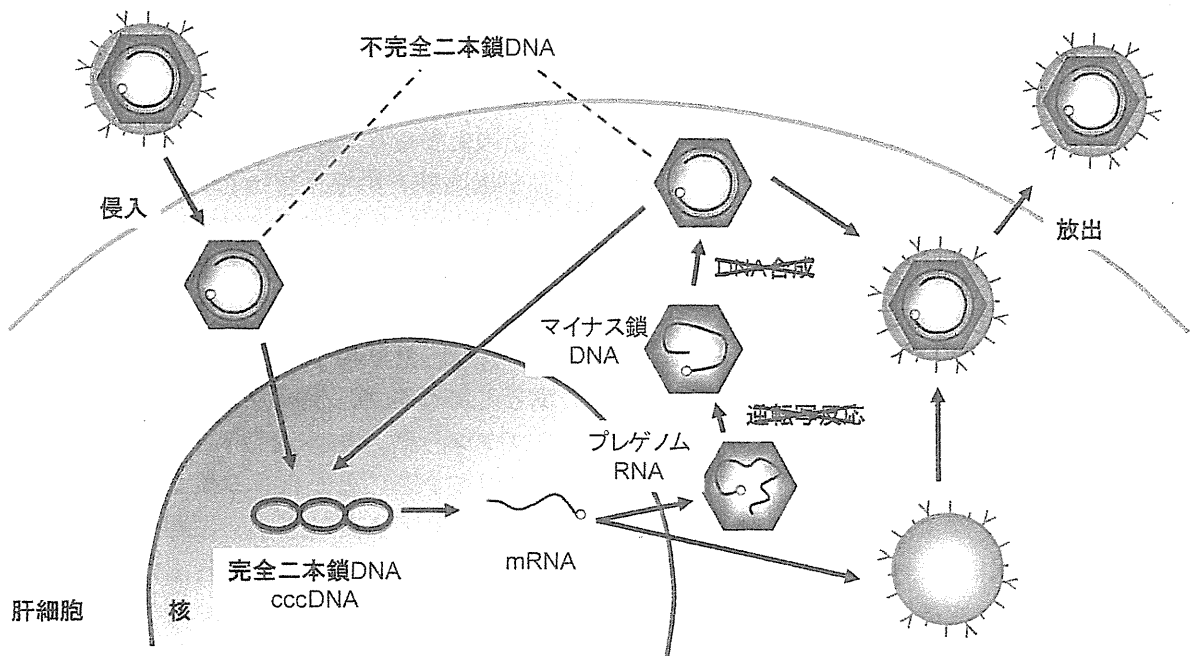


核酸アナログ初回投与例におけるエンテカビル耐性出現率は、国内外の成績ともに低率であり、4年間の投与で0.4～1.2%程度である。

* : Tenney DJ et al : Hepatology 49, 1503-1514, 2009.

** : Ono A et al : J Hepatology 57 (3), 508-514, 2012.

図1 エンテカビル耐性株出現率

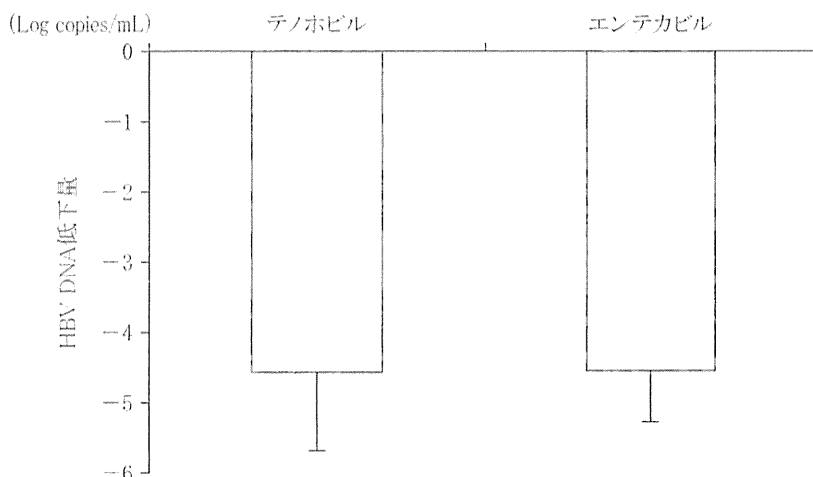


テノホビルは、HBV 粒子形成において必須とされる逆転写反応ならびに DNA 合成を阻害し、ウイルス増殖を抑制する。

図2 B型肝炎ウイルスのライフサイクルとテノホビルの作用点

mRNA が転写され、プレゲノム RNA は、ウイルス粒子形成の過程で、逆転写・伸長反応を経て、不完全二重鎖のウイルスゲノム DNA とな

り、HBV 粒子内に取り込まれ、細胞外に放出される。テノホビルは、アデノシンーリン酸の非環状ヌクレオシド・ホスホン酸ジエステル誘



テノホビル投与群とエンテカビル投与群において、24週間治療によるHBV DNA低下量に有意な差は認められなかった。(承認時評価資料)

図3 24週間治療によるHBV DNA低下量

導体つまりアデノシンの核酸アナログであり、HBVの粒子形成に必須とされる逆転写反応・DNA合成を拮抗阻害することで、ウイルスの増殖を抑制する。しかしながら、これまでの核酸アナログ製剤と同様、感染細胞の核内に存在するcccDNAへの直接的な作用はないことから、治療を中止すると、HBVの再増殖することが予測され、長期的な投与が必須といえる。

II テノホビルの国内臨床試験成績

前述したように、本邦では、保険承認されたばかりの薬剤であることから、本項では、本邦での治療成績として、国内臨床試験成績を示す。国内第Ⅲ相臨床試験(LOC115409)では、B型慢性肝疾患核酸アナログ未治療109例(naïve例)に対して、テノホビル300mg/日とエンテカビル0.5mg/日の経口投与による48週間の比較試験が行われた(24週までは盲検下、24~48週は非盲検下)。テノホビル24週間投与におけるHBV DNA低下量は、-4.57 Log copies/mLであり、エンテカビル投与群の-4.56 Log copies/mLと同等だった(図3)。48週間のテノホビル治療においても、その効

果は持続しており、HBV DNA低下量は-4.86 Log copies/mL、HBV DNA陰性化率は77%(84例/109例)、ALT正常化は75%(62例/83例)で認められ、テノホビル耐性ウイルスの出現も認められなかった。

一方、既存の核酸アナログ治療(ラミブジン・アデホビル併用、エンテカビル、エンテカビル・アデホビル併用)効果不良例34例を対象としたテノホビルの臨床試験も施行された(LOC115412)。同試験では、ラミブジン・アデホビル併用効果不良例(13例)に対しては、ラミブジン・テノホビル併用療法、エンテカビル単独(10例)もしくはエンテカビル・アデホビル併用効果不良例(11例)に対しては、エンテカビル・テノホビル併用療法に変更し、抗ウイルス効果が検討された。その結果、治療48週目のHBV DNA低下量は、前治療がラミブジン・アデホビル併用例では-2.88 Log copies/mL、エンテカビル単独では-4.33 Log copies/mL、エンテカビル・アデホビル併用例は-2.66 Log copies/mLであり、いずれの治療法においても、テノホビル切替による抗ウイルス効果が確認された。

以上の日本人を対象とした臨床試験におい