

学学長の承認を得て行った。

C. 研究結果

抗 HBV 活性を示す化合物を海洋動物抽出物ライブラリーを、コアプロモーター活性を抑制する活性を指標にスクリーニングを行った。252 画分を探索した結果、ヒットした 4 画分のうち 2 画分の主成分が Polybrominated diphenyl ether (PBDE) であった。PBDE およびその誘導体 3 化合物のウイルス粒子産生に対する影響を、HepG2. 2. 15 細胞を使って解析した。PBDE と一つの誘導体はウイルス産生を抑制したが (EC₅₀ が数 μM)、ともに毒性 CC₅₀ が 10-20 μM を示した。さらに、海洋生物からの精製化合物表品 21 化合物をスクリーニングし、3 化合物がヒットした。低毒性で、抗 HBV 活性が高かったのが、metachromin A であり、HepG2. 2. 15 細胞のウイルス DNA 放出を指標に抗 HBV 活性を測定したところ、EC₅₀ が 0. 8 μM で、SI 値が 19. 6 であった。また、漢方由来の化合物の Berberine も HepG2. 2. 15 細胞に対して抗 HBV 活性を示したが、EC₅₀ が 9 μM を示した。また、Simvastatin は HBV 初期感染を抑制することが示され、EC₅₀ が 5 μM であった。preS1 ペプチドの結合を Simvastatin は阻止できなかったことから、ウイルス接着以降の過程で、Simvastatin は抗 HBV 活性を示すものとして考えられた。

D. 考察

今回、抗 HBV コアプロモーター活性やウイルス産生に対して阻害活性を示す化合物を同定し、今後 metachromin A などの誘導体や類縁化合物に対して抗 HBV 活性を検討する。また、他、海洋生物抽出物以外の天然物に対しても抗 HBV 活性の有無についても検討する計画である。また、コアプロモーターアッセイ系を B 型肝炎創薬実用化等研究事業の他班に提供し、その細胞系による低化合物ライブラリーを用いた抗 HBV 剤探索にも協力しており、本研究から波及した成果も今後期待できる。

E. 結論

本研究によって、抗 HBV 活性を示す化合物が同定され、今後、さらに検討を加えることで有効な化合物を単離同定できる可能性が示された。本研究成果は、新規 B 型肝炎治療法開発および診断法開発に繋がるものと今後も期待できる。

G. 研究発表

1 論文発表

- ① Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K: Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus. *J. Virol.*, 88: 13352-13366, 2014
- ② Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tani H, Roy SR, Tanaka J, Tsubuki M, Akimitsu N: PBDE: Structure-Activity Studies for the Inhibition of Hepatitis C Virus NS3 Helicase. *Molecules*, 19: 4006-4020, 2014
- ③ Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H: EFdA, a Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 Ex Vivo Infection of Langerhans Cells within Epithelium. *J. Invest. Dermatol.*, 134: 1158-1161, 2014
- ④ Furuta A, Salam KA, Hermawan I, Akimitsu N, Tanaka J, Tani H, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Peng PW, Suzuki Y, Yamamoto N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N: Identification and biochemical characterization of halisulfate 3 and suvanine as novel inhibitors of hepatitis C virus NS3 helicase from a marine sponge. *Mar. Drugs*, 12: 462-476, 2014
- ⑤ Allen SJ, Mott KR, Matsuura Y, Moriishi K, Kousoulas KG, Ghiasi H: Binding of HSV-1 Glycoprotein K (gK) to Signal Peptide Peptidase (SPP) Is Required for Virus Infectivity. *PLOS one*, 9: e85360, 2014

2. 学会発表

- ① Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, and Moriishi K, Infection of equine hepacivirus in a closed colony of Japanese native horse, The 21st International meeting on Hepatitis C virus and related viruses. 2014.9.7-11,

- Banff, Canada.
- ② Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, and Moriishi K, Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, 2014, 9. 3-6. Los Angeles, USA.
- ③ 山下篤哉、藤本雄介、田中智久、葛西宏威、児玉栄一、渡士幸一、脇田隆字、前川伸哉、榎本信幸、田中 淳一、森石恆司、海洋生物抽出物ライブラリーソースからのB型肝炎ウイルス転写活性抑制化合物の探索、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～12日、横浜
- ④ 安本順、葛西宏威、土橋香織、渡士幸一、脇田隆字、田中智久、山下篤哉、森石恆司、HBV感染による細胞内脂肪滴形成への影響、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～12日、横浜
- ⑤ 田中智久、陳文家、乙黒光姫、葛西宏威、山下篤哉、森石恆司、日本在来馬におけるウマへパシウイルス感染第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～12日、横浜
- ⑥ 土橋香織、葛西宏威、田中智久、陳文家、渡士幸一、脇田隆字、山下篤哉、梁明秀、岡本徹、松浦善治、森石恆司、トリプシン・EDTAによるNTCP依存HBV感染の増強、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～12日、横浜
- ⑦ 天野稜大、山下篤哉、葛西宏威、田中智久、坂本直哉、前川伸哉、榎本信幸、津吹政可、森石恆司 Tyrphostin 類縁化合物のC型肝炎ウイルス複製阻害活性の検討、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～12日、横浜
- ⑧ Moriishi K, Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection, The 2nd Japan-Italy Liver Workshop: "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: Molecular Basis and Clinical Links" 2014.11.18-19. Hiroshima

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし

■ 平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金 (B 型肝炎創薬実用化等研究事業)
 B 型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究
 研究分担報告書

HBV の *in vitro* 感染・増殖系の確立と 抗ウイルス薬スクリーニング系への応用

研究分担者 田川 陽一 東京工業大学 大学院生命理工学研究科 准教授

研究要旨：内皮細胞の管腔ネットワークとヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞系譜細胞との共培養による肝組織モデル (*in vitro* Liver model: IVL^{hES/iPS}) による HBV の感染を検討し、班内分担者と連携して各段階における薬剤スクリーニング系の確立を目的とした。さらに、星細胞株を導入し、この IVL を長期安定かつ肝機能を高めることを検討した。

A. 研究目的

初代培養肝細胞やヒト肝癌由来細胞株等では HBV の感染は成立できないことが知られているが、ヒト肝細胞を移植できるマウスに導入したキメラマウスでは HBV の感染が可能である。しかし、ヒト肝細胞キメラマウスは高価であり大規模な薬剤スクリーニング等には適さない。また、今日、医薬品開発といえども動物実験代替法の必要性が訴えられており、*in vivo* を反映した *in vitro* 感染・増殖モデルの開発が望まれる。一般的な肝細胞株は幼若(腫瘍)細胞であり、また、肝臓から調製された初代肝細胞は培養中に肝機能が低下してしまうことから、成熟肝細胞としての特異的細胞内システムを有していないということになる。このような細胞環境はこれらのシステムを利用して増殖する HBV にとっては望ましくない。実際の肝臓は実質細胞である肝細胞と非実質細胞である類洞内皮細胞や星細胞等からなり、特異的な組織構造を形成している。また、肝臓中の肝細胞は立体的であり、肝細胞—肝細胞、肝細胞—類洞内皮細胞(直接の結合はない)、肝細胞—微小胆管という3つの細胞極性を有しているが、様々な細胞内小器官の配置・構成や酵素活性は細胞極性に依存していると考えられる。特に、HBV のレセプターと同定されたナトリウム・胆汁酸共輸送体(NTCP)は肝細胞の類洞側細胞表面に発現していることが知られている。

我々は、ヒト初代培養肝細胞と内皮細胞等、または、ヒト ES/iPS 細胞由来分化細胞を用いて細胞極性を再構築した高機能肝組織モデル (*in vitro* Liver model: IVL^{hPH} または IVL^{hES/iPS}) の構築に成功している。そこで、IVL^{hES/iPS} を用いて cccDNA の安定形成系または効率よい *in vitro* HBV 感染・増殖系を確立することを目的とする。さらには、この系を用いて、cccDNA の選択的不活化やワクチン開発を試みる。

B. 研究方法

Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)ゲル上に形成した血管内皮細胞の管腔ネットワークにヒトES/iPS細胞から分化誘導した肝細胞系譜細胞を播種して肝組織様構造 (IVL^{ES/hiPS}) を構築した。その IVL^{ES/hiPS} にHBV感染性粒子を添加し、培養期間中の細胞からプレゲノムRNAをRT-PCR法により定量し、培地中からは放出されたHBV粒子を回収しゲノムDNAを定量した。

さらに、IVLに星細胞を導入して、肝組織構造の安定化について検討するため、星細胞株TWNT4およびLX2を内皮細胞ネットワーク構築後に播種し、その後、初代培養肝細胞を播種した。星細胞共培養の効果については、尿素合成能とアセトアミノフェンの感受性を指標に解析を行った。

(倫理面の配慮)

東工大ではヒトES細胞専用実験室を有し、田川のヒトES細胞を用いた肝組織分化誘導研究はすでに文部科学大臣より承認を得ており、東工大のヒトES細胞倫理規則および文部科学省のヒトES細胞使用指針に遵守し実験をおこなった。また、その他の研究では、細胞株や市販されている内皮細胞株等を用いたため、人権擁護、不利益等は発生していない。

C. 研究結果

ヒトiPS細胞を用いてアクチビンAを特定濃度で一定期間処理した後、安定的なIVL^{iPS}を構築した。IVL^{iPS}は2週間以上培養が可能となり、その培養期間中に肝特異的遺伝子発現や尿素合成能などの肝特異的代謝機能が上昇することを確認した。さらに、HBVのレセプターとして唯一知られているNTCPの遺伝子発現が肝癌細胞株ではほとんどなかったが、IVL^{hiPS}においては非常に強く2週間程上昇が観られた。IVL^{hiPS}にHBVを感染させたところ、細胞内でHBVの増殖およびHBV粒子の細胞外へ放出などHBVが感染可能であることが再確認できたとともに、少なくとも数日間はその現象が効率的に観察され、機能的なモデル構築に成功した。

さらに、この*in vitro*感染システムが長期間可能になるように、IVLの構造安定性を試みた。星細胞株TWNT4またはLX2を導入したところ、内皮細胞ネットワークへ向かって遊走が認められ、その後マウス初代培養肝細胞を播種したところ、さらにネットワークへ遊走が観察された。構造的には長期間の安定が確認されたが、用いた星細胞株は増殖性が高く、一面が星細胞でおおわれることになったため、改良が望まれた。また、星細胞を導入したIVLでは、尿素産生の有意な促進は認められなかったが、アセトアミノフェンによる感受性は有意に上昇することが確かめられた。

D. 考察

このIVL^{ES/iPS}では、実際の肝臓の組織と類似した肝細胞特異的な極性シグナルを構築することができたため、類洞側の肝細胞表面に局在しているNTCPの発現が誘導でき、特に2週間以上の発現が維持されていることから、HBVの感染・増殖が可能となったと考えられる。また、HBV感染後にNTCPの発現が低下していく現象は大変に興味深い。

用いた星細胞株は、増殖性が高く、遺伝子発現解析により、活性化されていることが確認できた。つまり、個体における肝の線維化状態に近いと思われ、肝細胞の極性は乱れていることが考えられ、NTCPの発現などに影響を及ぼしている可能性が示唆された。従って、星細胞株の活性化を抑制したIVL構築を検討する必要がある。

E. 結論

IVL^{ES/iPS}では、その他の細胞株などの*in vitro*系に比較して、有意に効率の良い*in vitro* HBV感染・増殖系の確立に成功したため、現在、特許出願中であり、論文も作成中である。

しかしながら、来年度から抗HBV阻害薬における試験に応用を目指すには、さらに高効率の感染・増殖システムへ改良する必要があると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

①Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, Suzuki T, **Tagawa Y.** An *in vitro* liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication. *J Biosci Bioeng.* (2014) 118:107-111, doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.016.

②今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, **田川 陽一**: 霊長類 ES/iPS 細胞の凍結保存・輸送・解凍、《最新》動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術、*細胞技術情報協会*, P504~508、2014 年

2. 学会発表

①**田川陽一**: ES 細胞から *in vitro* 器官形成モデル、そして、最小ほ乳類 *in vitro* 生命システム、日本組織培養学会第 87 回大会、東京(星陵会館)2014 年(シンポジウム)

②玉井美保、藤山陽一、**田川陽一**: *In vitro* liver model derived from murine ES/iPS cells for animal use alternative: 動物実験代替を目指した *in vitro* 肝組織モデル、日本組織培養学会第 87 回大会、東京(星陵会館)、2014 年(口頭&ポスター)

③今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, **田川 陽一**: A xeno-free slow-freezing cryopreservation medium for primate ES/iPS cells 霊長類 ES/iPS 細胞用緩慢法凍結保存液の開発、日本組織培養学会第 87 回大会、東京(星陵会館)、2014 年(ポスター)

④玉井美保、酒井宏司、宮川眞一、**田川陽一**: マウス門脈結紮による肝再生モデルにおける IL-6 依存性、第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、北海道(北海道大学)2014 年(ポスター)

⑤守矢 恒司、玉井美保、豊田 優、**田川 陽一**: アセトアミノフェン誘導肝障害の *in vivo* および *in vitro* モデルによる解析、第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、北海道(北海道大学)2014 年(ポスター)

⑥苅谷智行、玉井美保、相川博明、**田川陽一**: ES 細胞および TS 細胞を用いたマウス胚盤胞 *in vitro* モデルにおける TLR 応答、第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、北海道(北海道大学)2014 年(ポスター)

⑦玉井美保、**田川陽一**: マウス ES/iPS 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデルにおける肝代謝能、第 21 回肝細胞研究会、東京(東京医科歯科大学)、2014 年(ポスター)

⑧守矢 恒司、玉井美保、豊田 優、**田川 陽一**: 概日リズムを考慮したアセトアミノフェン誘導肝障害 *in vivo* モデルにおける急性期タンパク質による保護作用、第 21 回肝細胞研究会、東京(東京医科歯科大)、2014 年(ポスター)

⑨**田川陽一**、玉井美保、藤山陽一: 最小哺乳類 *in vitro* システムの戦略と応用、第 66 回日本生物工学会大会 シンポジウム(試験管から個体までの人工生命体研究の現状と将来)、北海道(札幌コンベンションセンター)、2014 年(シンポジウム)

⑩玉井美保、藤山陽一、**田川陽一**: 流体デバイスを用いたマウス ES 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデル、第 66 回日本生物工学会大会、北海道(札幌コンベンションセンター)、2014 年(ポスター)

⑪竹下裕治、張本乾一、玉井美保、南隆之、荻博次、長岡紀幸、松川昭博、吉田靖弘、**田川 陽一**: QCM-D による様々な細胞種の接着と伸展の観察、第 66 回日本生物工学会大会、北海道(札幌コンベンションセンター)2014 年(ポスター)

⑫ **Yoh-ichi TAGAWA**, Miho Tamai, Sungho Ahn, Kenji Nakashima, Masahiko Ito, and Tetsuro Suzuki: Human iPS cell-derived *in vitro* model for Hepatitis B virus infection and proliferation, 2014 World Stem Cell Summit, San Antonio (Marriott Rivercenter) 2014 年 (poster)

⑬ Miho TAMAI, Yoichi Fujiyama, **Yoh-ichi TAGAWA**: High- and multi-functional *in vitro* liver model derived from mouse ES/iPS cells on micro-fluidic device, 2014 World Stem Cell Summit, San Antonio (Marriott Rivercenter) 2014 年 (poster)

⑭ 玉井美保、藤山陽一、田川陽一: マウス ES/iPS 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデルの肝細胞極性、第9回「長野ミーティング: 生物資源の有効利用を目指して」、長野(ラフォーレ倶楽部白馬八方) 2015 年(口頭)

⑮ 田川陽一、玉井美保、守矢恒司、藤山陽一: 人工哺乳類システム、第9回「長野ミーティング: 生物資源の有効利用を目指して」、長野(ラフォーレ倶楽部白馬八方) 2015 年(口頭)

⑯ 守矢恒司、玉井美保、豊田優、小松銀河、田川陽一: アセトアミノフェン誘導肝障害 *in vivo* モデルにおける概日リズムの影響、第9回「長野ミーティング: 生物資源の有効利用を目指して」、長野(ラフォーレ倶楽部白馬八方) 2015 年(口頭)

⑰ 田川陽一、玉井美保、藤山陽一: 最小哺乳類 *in vitro* モデルの構築と応用-ES/iPS 細胞を用いた試み-、第14回分子予防環境医学研究会、大阪(大阪市立大学) 2015 年(特別講演)

⑱ 田川陽一、玉井美保、藤山陽一: 再生医科学研究オーバービュー -ES 細胞から分化細胞、組織、そして、生命システム シンポジウム「細胞を創る」研究会 7.0, 東京、2014 年(シンポジウム)

⑲ 田川陽一: B 型肝炎感染・増殖 *in vitro* システム、イノベーションジャパン 2014, 東京(ビックサイト)、2014 年(ポスター)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許出願および取得

①名称: 細胞培養デバイス、細胞培養システム、及び細胞培養方法、発明者: 藤山陽一、田川陽一、権利者: 株式会社島津製作所、東京工業大学、種類: 特許、特許第5686310

②名称: 肝炎組織体、肝炎ウイルスの感染方法、肝炎組織体の製造方法、肝炎ウイルスの増殖方法、肝炎ワクチンの製造方法、スクリーニング方法、およびキット発明者: 田川陽一、玉井美保、アンソンホ、鈴木哲朗、伊藤昌彦、中島謙治 権利者: 東工大、浜松医科大学 種類: 特許 番号: 特願2014-52754 出願年月日: 2014年03月14日 国内外の別: 国内

■ 平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金 (B 型肝炎創薬実用化等研究事業)
B 型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究
研究分担報告書

B 型肝炎ウイルスの持続感染に関与する宿主因子の同定

研究分担者 福原 崇介 大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野

研究要旨：

B 型肝炎の根治を目指す治療法の確立には HBV の持続感染を可能にする新たな宿主因子の同定が必要である。本研究では、定量的なプロテオミクス法である SILAC 法および質量解析を用いて、HBV 感染に関与する分子をスクリーニングした。SILAC 法では HBV 感染に伴い核内で有意に発現が減少する分子で、HBV の感染性に関与する分子として LRPPRC を同定した。また、質量分析によりコア蛋白と相互作用する分子として SRPK1 を同定した。shRNA によるノックダウンにより HBV の Pregenomic RNA の核外移行に LRPPRC が関与していることが明らかになった。現在、CRISPR/Cas9 法を用いて、LRPPRC のノックアウト HepG2 細胞の樹立を試みている。また、CRISPR/Cas9 系によって SRPK1 ノックアウト HepG2 および HepG2.2.15 細胞を樹立した。SRPK1 は HBV ゲノムのコア粒子への取り込みを抑制する抑制因子であることが判明した。

A. 研究目的

B 型肝炎に対する現行の治療は HBV の逆転写酵素を標的としているため、核内に存在する cccDNA には効果がないことから根治は難しい。従って、HBV 感染を根治するには新たな宿主因子の同定と、それを標的とした創薬が重要である。本研究では質量分析や定量的なプロテオミクス法である SILAC 法を用いて、HBV 感染によって核内で変動する分子を同定し、その中から HBV の持続感染や病原性に関与する宿主因子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

宿主因子の探索として、核または膜画分を精製した後に、SILAC 法を用いて HBV 感染によって核内で有意に発現が変化している蛋白質を網羅的にスクリーニングした。遺伝子発現の確認としては、Taqman-array および定量 PCR を行った。また、OSF タグを付加したコア蛋白質と結合する蛋白質を質量分析により網羅的に探索した。SILAC 法および質量分析により同定された分子のうち、スコ

アの高い分子を標的とした shRNA を作製し、HBV の感染性に関与する分子をスクリーニングした。HBV の感染性の評価としては、HBV ゲノムが Integrate されている HepG2.2.15 および HBV の受容体である NTCP を安定的に発現する HepG2/NTCP C4 細胞に対する感染の系を用いた。HBV 感染性粒子はテトラサイクリンを除去した HepAD38 細胞の上清より得て、PEG により濃縮したものをを用いた。感染後、10 日後に HBc の発現を Western Blotting にて、rcDNA 量をリアルタイム PCR 法により評価した。CRISPR/Cas9 系を用いて同定された分子を欠損させた HepG2 および HepG2.2.15 細胞を樹立し、HBV の感染性やウイルスゲノムの複製効率を検討した。

C. 研究結果

SILAC 法により核内で発現上昇した因子を 9 種類、減少した因子を 32 種類同定した。また、膜画分でも変動した因子を 40 種類同定した。2 次スクリーニングとして HepG2.2.15、T23 および YE12 細胞を用いて、

HBV 感染による遺伝子発現変動を検討し、それぞれの細胞で同じ発現パターンを示す因子として 20 種類の宿主因子を同定した。それらの因子を標的とした shRNA を作製し、ノックダウン HepG2.2.15 細胞を樹立した。20 種類の宿主因子のうち、LRPPRC をノックダウンした細胞では、細胞内および上清中のコア関連 HBV-DNA 量が有意に低下していた。LRPPRC は特定の mRNA に結合し、核から細胞質への輸送に関与することが知られているため、HBV の pregenomic RNA の輸送への関与を検討した。HepG2.2.15 および 1.28 倍長の HBV-DNA を導入した細胞において、LRPPRC の発現抑制によって、核内の pregenomic RNA の量は増加し、細胞質内で減少することが明らかとなった。以上の成績より、LRPPRC は pregenomic RNA の輸送を介し、HBV の感染性を正に制御していることが示唆された。現在、CRISPR/Cas9 系を用いて LRPPRC ノックアウト HepG2 細胞を樹立している。

質量分析により同定されたコア蛋白質と結合する分子のうち、スコアの高い 12 分子に対する shRNA を作製し、ノックダウン HepG2/NTCP 細胞を樹立した。1.28 倍長のプラスミドを導入した系や、HBV の感染の系により、HBV を負に制御する因子として SRPK1 が同定された。SRPK1 のノックアウト HepG2 細胞を樹立したところ、HBV の高い複製効率が確認された。

D. 考察

本研究により、HBV の感染性に関与する宿主因子が同定された。LRPPRC は HBV の Pregenomic RNA が核外に輸送されるのに重要な因子であることがこれまでの結果から示唆される。今後は、ノックアウト細胞による解析に加え、LRPPRC の発現に影響する薬剤や分子を同定する。また、HBV 感染における SRPK1 の役割もさらに明らかにし、LRPPRC と同様に、発現や活性に影響する分

子を同定する。

E. 結論

プロテオミクス法により、HBV 感染に関与する分子として LRPPRC および SRPK1 を同定することができた。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

1. [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 Pathogens* 2014; DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534

2. 学会発表

1. [Takasuke Fukuhara](#), Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
2. Chikako Ono, [Takasuke Fukuhara](#), Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
3. Chikako Ono, [Takasuke Fukuhara](#), Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
4. [Takasuke Fukuhara](#), Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic α -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

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
朝比奈靖浩	HBs抗原消失をめざした肝炎治療	小俣政男	肝疾患 Review 2014 - 2015	日本メディカルセンター	東京	2014	133-137
今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, 田川 陽一	霊長類ES/iPS細胞の凍結保存・輸送・解凍		《最新》動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術	㈱技術情報協会	東京	2014	504~508

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
Sekine S, Ito K, Watanabe H, Nakano T, <u>Moriya K</u> , Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Miyoshi H, Fujinaga H, Shinzawa S, <u>Koike K</u> , Horie T.	Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein	Toxicol Appl Pharmacol	282	237-243	2014
Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, <u>Moriya K</u> , <u>Koike K</u> , Wakita T, Kato T.	Acute hepatitis B of genotype H resulting in persistent infection.	World J Gastroenterol.	20(11)	3044-9.	2014
Nguyen T, Xu J, Chikuma S, Hiai H, Kinoshita K, <u>Moriya K</u> , <u>Koike K</u> , Marcuzzi GP, Pfister H, Honjo T, Kobayashi M.	Activation-induced cytidine deaminase is dispensable for virus-mediated liver and skin tumor development in mouse models.	Int Immunol.	26(7)	397-406	2014
Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, <u>Moriya K</u> , Tsutsumi T, <u>Koike K</u> , Akatsuka T.	Effect of the infectious dose and the presence of hepatitis C virus core gene on mouse intrahepatic CD8 T cells.	Hepatol Res	44	E240-E252	2014
Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, <u>Moriya K</u> , Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H.	High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential.	Int J Cancer	134	2189-98	2014

Suzuki M, Kondo S, Pei Z, Maekawa A, <u>Saito I</u> , 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.		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
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
Shibata C, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, <u>Koike K</u> .	Diagnostic and therapeutic application of noncoding RNAs for hepatocellular carcinoma.	World J Hepatol.	7(1)	1-6	2015
Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, <u>Koike K</u> .	The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects.	J Gastroenterol.	49(2)	173-84	2014
Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, <u>Koike K</u> .	Specific delivery of microRNA 93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA.	Oncotarget	5(14)	5581-90	2014
Shibata C, Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Goto K, Muroyama R, Kato N, Yoshikawa T, Takata A, <u>Koike K</u> .	The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels.	Virology	462-463	42-8	2014
Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shina S, Yoshida H, Omata M, <u>Koike K</u> .	Impact of PNPLA3 Polymorphisms on the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection.	Hepatol Res.	44(10)	E137-44	2014
Watanabe Y, Yamamoto H, Oikawa R, Toyota M, Yamamoto M, <u>Kokudo N</u> , Tanaka S, Arii S, Yotsuyanagi H, <u>Koike K</u> , Itoh F.	DNA methylation at hepatitis B viral integrants is associated with methylation at flanking human genomic sequences.	Genome Res	2015 Feb 4. pii: gr.175240.114. [Epub ahead of print]	2015 Feb 4. pii: gr.175240.114. [Epub ahead of print]	2015

Kokudo T, Hasegawa K, Yamamoto S, Shindoh J, Takemura N, Aoki T, Sakamoto Y, Makuuchi M, Sugawara Y, <u>Kokudo N.</u>	Surgical treatment of hepatocellular carcinoma associated with hepatic vein thrombosis.	J Hepatol	61	583-8.	2014
Lim C, Mise Y, Sakamoto Y, Yamamoto S, Shindoh J, Ishizawa T, Aoki T, Hasegawa K, Sugawara Y, Makuuchi M, <u>Kokudo N.</u>	Above 5cm, size does not matter anymore in patients with hepatocellular carcinoma.	World J Surg	38	2910-8.	2014
Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, <u>Suzuki T.</u>	Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- α in Infectious Virus Production.	J Virol	88	7541-7555	2014
Saito K, Shirasago Y, <u>Suzuki T.</u> , Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M.	Targeting Cellular Squalene Synthase, an Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus.	J Virol	89	2220-2232	2015
Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, <u>Suzuki T.</u> , Wakita T.	Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus.	J Gen Virol	95	2658-2667	2014
Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, <u>Suzuki T.</u> , Wakita T, Takeda N, Li TC.	Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses	J Virol Method	207	38-44	2014
Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, <u>Suzuki T.</u> , Lee J, Park EY.	Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection.	Biosens Bioelectron.	58	33-39	2014
Kotake, Y., Naemura, M., Kitagawa, K., Niida, H., Tsunoda, T., Shirasawa, S. <u>Kitagawa, M.</u>	Oncogenic Ras regulates the expression of multiple lncRNAs.	Cytotechnology			in press

Kitagawa,K., Shibata, K.,Matsumoto,A.,Matsumoto,M.,Ohhata,T., Nakayama,KI., Niida, H. and <u>Kitagawa, M</u>	Fbw7 targets GATA3 through CDK2-dependent proteolysis and contributes to regulation of T-cell development.	Mol. Cell. Biol	34	2732-2744	2014
Fukasawa,H.,Furuya, R.,Yasuda,H.,Fujigaki Y.,Yamamoto,T.,Hishida, A. <u>Kitagawa, M.</u>	Anti-cancer agent-induced nephrotoxicity.	Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry	14	921-927	2014
Harada, M., Kotake, Y.,Ohhata,T., Kitagawa,K.,Niida,H. Matsuura,S.,Funai,K.Sugimura,H.,Suda,T. and <u>Kitagawa, M.</u>	YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers.	Genes Cells	19	504-516	2014
MurakawaM*, <u>Asahina Y*</u> , Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kitazume-Kusano A, WatanabeT,Kawai-Kitabatake F, Otani S, Taniguchi M, Goto F, Nishimura-Sakurai N, Itsui Y, Azuma S, KakinumaS,Watanabe M. *MM and YA contributed equally to this work	Impaired induction of IL28B and expression of IFNλ4 associated with non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C.	J Gastroenterol Hepatol	in press		2015
Tsuchiya K*, <u>Asahina Y*</u> ,MatsudaS, Muraoka M, Nakata T, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, HosokawaT, Nishimura T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H,ItakuraJ, TakahashiY, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N. *These authors contributed equally to this study.	Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for advanced hepatocellular carcinoma.	Cancer	120	229-273	2014
Tsuchiya K, <u>Asahina Y</u> , Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N	Risk factors for exceeding the Milan criteria after successful radiofrequency ablation in patients with early stage hepatocellular carcinoma.	Liver Transpl	20	291-297	2014

Yasui Y, Kudo A, Kurosaki M, Matsuda S, Muraoka M, Tamak Ni, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Matsunaga K, Nakanishi H, Tsuchiya K, Itakura J, Takahashi Y, Tanaka S, <u>Asahina Y</u> , Enomoto N, Arii S, Izumi N	Reduced organic anion transporter expression is a risk factor for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients: A propensity score matching study.	Oncology	86	53-62	2014
Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Yoshimichi C, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terasita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuizka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, <u>Asahina Y</u> , Sakamoto N	Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions.	Hepatol Res	in press		2014
Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, <u>Asahina Y</u> , Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M	New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia.	PLoS One	9	e86449	2014
Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Itakura J, Anami K, <u>Asahina Y</u> , Enomoto N, Higuchi T, Izumi N	Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: evaluation by near infrared spectroscopy.	Hepatol Res	44	319-326	2014

Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T, <u>Asahina Y</u> , Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T, Araki T, Enomoto N	Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoteric acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging.	Hepatol Res	44	1339-1346	2014
Tamaki N, Kurosaki M, Matsuda S, Nakata T, Muraoka M, Suzuki Y, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Matsunaga K, Taki K, <u>Asahina Y</u> , Izumi N	Prospective comparison of real-time tissue elastography and serum fibrosis markers for the estimation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients.	Hepatol Res	44	720-727	2014
Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama- Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, <u>Moriishi K</u>	Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus.	J. Virol.	88	13352-13366	2014
Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Yamashita A, <u>Moriishi K</u> , Nakakoshi M, Tani H, Roy SR, Tanaka J, Tsubuki M, Akimitsu N	PBDE: Structure- Activity Studies for the Inhibition of Hepatitis C Virus NS3 Helicase	Molecules,	19	4006-4020	2014
Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, <u>Moriishi K</u> , Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H	EFdA, a Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 Ex Vivo Infection of Langerhans Cells within Epithelium	J. Invest. Dermatol	134	1158-1161	2014
Furuta A, Salam KA, Hermawan I, Akimitsu N, Tanaka J, Tani H, Yamashita A, <u>Moriishi K</u> , Nakakoshi M, Tsubuki M, Peng PW, Suzuki Y, Yamamoto N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N	Identification and biochemical characterization of halisulfate 3 and suvanine as novel inhibitors of hepatitis C virus NS3 helicase from a marine sponge.	Mar. Drugs	12	462-476	2014

肝疾患 2014 - 2015 Review

監修 小俣 政男

編集 椎名秀一朗
坂本 直哉
丸澤 宏之

■肝炎の基礎

HBV培養系と薬剤探索
IFN- λ 産生樹状細胞
DAA治療マウスモデル
分泌型microRNA

■肝炎の臨床

DAA治療の新展開
Simeprevir
Daclatasvir + Asunaprevir併用療法
チェーンターミネーター:Sofosbuvir
HCV駆除後の肝発癌
de novo B型肝炎

■肝癌の診断・治療

診断・治療のバイオマーカー
エビデンスに基づく肝癌画像診断
腹腔鏡下肝切除術
ラジオ波治療機器の新展開
メタボ肝癌
多様化する放射線治療
分子標的薬開発の将来展望
ゲノムからみた肝癌

■その他—肝病態理解のために

PBCの発症関連遺伝子
IgG4関連胆管炎
肝炎と肝脂肪化
肥満と肝癌
iPS細胞と肝再生
ヒト化肝臓マウス
肝癌の癌幹細胞



日本メディカルセンター

第2部 トピックス

2. 肝炎の臨床

6 HBs 抗原消失を目指した肝炎治療

朝比奈靖浩

point

- ◆ HBV 持続感染者における抗ウイルス療法の長期目標は HBs 抗原の消失である。
- ◆ ペグインターフェロンによる HBs 抗原陰性化率は、治療終了後 24 週時点では 2.3~4.0%、治療終了後 3 年では 8.7~12% であり、HBe 抗原消失や HBV DNA 陰性化が得られた治療反応例で高率である。
- ◆ 核酸アナログ治療は HBV DNA 抑制作用は強力であるが、HBs 抗原消失率は年率 0.33% 程度である。
- ◆ 抗ウイルス療法中の HBs 抗原量のモニターは、治療効果予測に有用である。

はじめに

B 型肝炎ウイルス (HBV) 持続感染者に対する抗ウイルス療法の治療目標は、肝炎の活動性と肝線維化進展の抑制による慢性肝不全の回避並びに肝細胞癌の抑止で、それらにより生命予後と QOL を改善することである。この目標を達成するためにもっとも有用な指標は HBs 抗原であり、日本肝臓学会のガイドラインでも HBV 持続感染者における抗ウイルス療法の長期目標は HBs 抗原の消失に設定されている。

HBs 抗原は HBV のエンベロープに存在する抗原であり、血中には Dane 粒子のほかに中空粒子、小型球形粒子、管状粒子として存在し、いずれも肝細胞内の Covalently Closed Circular DNA (cccDNA) から産生される (図 2-2-19)。したがって、HBs 抗原量は肝内 cccDNA 量を反映し

ている。台湾で行われた前向き研究では HBV DNA とともに HBs 抗原が高値なほど肝細胞癌の発症率が増加することが示され、とくに HBe 抗原陰性かつ低ウイルス量の症例では肝細胞癌の発症は HBs 抗原量に相関する¹⁾。また、アラスカの前向き研究では HBs 抗原消失後の肝細胞癌の発症率は 0.0368/年であり、HBs 抗原が持続陽性例の 0.1957/年に比し、有意に肝細胞癌の発症率が低下していると報告している²⁾。このように、HBV の自然経過において肝内 cccDNA 量を反映する HBs 抗原量は発癌リスクと密接に関連しているため、B 型慢性肝炎の抗ウイルス治療においても治療の長期目標は HBs 抗原の消失におくべきと考えられる。

I. ペグインターフェロン治療

HBV 持続感染者に対する治療は、大きく分け

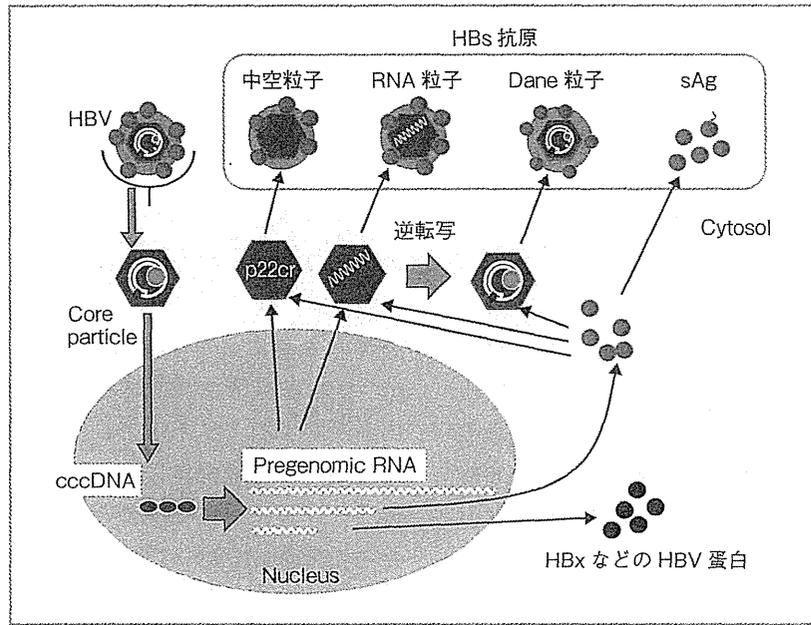


図 2-2-19 HBV の複製と HBs 抗原

てインターフェロン (IFN) 治療と核酸アナログ治療があり、それぞれ特性が異なる。治療の短期目標である ALT 持続正常化率や HBV DNA 抑制率は核酸アナログのほうが良好であるが、長期目標である HBs 抗原陰性化率は HBe 抗原陽性例^{3),4)}・陰性例^{5)~8)}ともに、ペグインターフェロン (Peg-IFN) のほうが良好である (表 2-2-4)。IFN は、HBV DNA 増殖抑制作用とともに抗ウイルス作用、免疫賦活作用を有しており、治療期間は一定期間に限定され、治療反応例では投与終了後も Drug free で治療効果が持続するという利点がある。

1. HBe 抗原陽性例における Peg-IFN の効果

海外において HBe 抗原陽性例 814 例を対象とし、Peg-IFN α -2a 48 週投与群、Peg-IFN α -2a + ラミブジン 48 週併用群、ラミブジン単独 48 週投与群の 3 群比較試験が行われた³⁾。それによると、治療終了後 24 週時点における HBe 抗原セロコンバージョン率は、32%、27%、19%と Peg-IFN α -2a 群で高く、HBs 抗原のセロコンバージョンを 3%に認めた。さらに Peg-IFN α -2b で治療した HBe 抗原陽性 B 型慢性肝炎 172 例の平

表 2-2-4 ペグインターフェロン治療における HBs 抗原消失率

	HBe 抗原陽性例	HBe 抗原陰性例
治療終了後 24 週	2.3~3.0%	2.8~4.0%
治療終了後 3~5 年	11%	8.7~12%

均 3 年間に及ぶ長期経過観察では、全体の 11%、治療終了後 26 週で HBe 抗原陰性となった症例の 30% で HBs 抗原が消失し、14 年では 64%と高率であった⁴⁾。

2. HBe 抗原陰性例における Peg-IFN の効果

HBe 抗原陰性例に対する Peg-IFN 治療では、43~44%の症例で HBV DNA が低下し、25~28%の症例で HBV DNA 4.0 log copies/ml 未満が持続する⁵⁾。しかし、治療終了後の HBV DNA の陰性化維持は高くなく、治療終了 24 週時点では 19%⁶⁾、長期経過でも 18~21%にとどまる^{5),7)}。一方、HBs 抗原陰性化率は、治療終了後 24 週時点では 2.8~4.0%、治療終了後 3 年では 8.7~12%^{5),7)}であり、とくに治療反応例の HBV DNA 陰性化例に限定すれば 3 年で 44%⁵⁾、治療

終了時の HBs 抗原量が 10 IU/ml 未満の症例に限れば 52% と高率である。

Peg-IFN α -2a の長期投与の効果を検討したイタリアの Genotype D 128 例の検討では、Peg-IFN α -2a を 96 週間投与した症例において、ウイルス学的治療効果 (HBV DNA < 2,000 IU/ml) の達成率は 29% であり、48 週治療の 12% に比し有意に高率であった。HBs 抗原消失率も 96 週・48 週それぞれ 6%、0% と、96 週間投与群で良好であった⁹⁾。したがって、HBe 抗原陰性の B 型慢性肝炎に対する Peg-IFN α -2a 治療では、投与期間を延長するとより高い効果が期待できる可能性があるが、わが国では 48 週を超える投与に対する保険適用はない。

II. 核酸アナログ治療

核酸アナログ製剤は HBV 自身がコードする逆転写酵素を特異的に阻害し、HBV DNA の合成を強力に抑制する薬剤である。したがって、本治療で血中 HBV DNA 量は速やかに低下し、ALT 値も改善する。しかし、Peg-IFN 治療と比較して HBs 抗原量の低下が少ないことが指摘されている (表 2-2-5)。

エンテカビル治療では、HBV DNA の陰性化は治療開始 48 週時点で 90%⁸⁾、長期経過では 100% ときわめて高率であり³⁾、治療前因子にかかわらず確実に HBV DNA 陰性化を達成できる。しかし、HBs 抗原の陰性化率は Peg-IFN よりも低率であり、治療開始 48 週時点で 1.7%、3~5 年の治療で 0.6~5.1% である。長期継続治療では、たとえばラミブジンを中心とした核酸アナログ治療では 9 年で 6.9%、アデホビルでは 3.8 年で 5% に HBs 抗原が陰性化したとの報告があ

表 2-2-5 エンテカビル治療における HBs 抗原消失率

	HBe 抗原陽性例	HBe 抗原陰性例
治療開始後 1 年	1.7%	0%
治療開始後 2~5 年	0.6~5.1%	0%

る¹⁰⁾。テノホビルについても同様に、7 年間の欧州における追跡調査では、HBs 抗原の消失は 266 例の HBe 抗原陰性例の 26 例 (10%) に認められた¹¹⁾。

ラミブジンまたはエンテカビルで初回治療を行った 5,409 例の B 型慢性肝疾患を平均 6 年間観察した最近の研究では、110 例が HBs 抗原消失を達成し、消失率は年率 0.33% であった¹²⁾。核酸アナログによる HBs 抗原消失は概ね持続的で、HBs 抗原消失が達成されると発癌率や生存率が改善する。本研究では HBs 抗原消失例からの発癌は肝硬変例の 2 例のみと報告されているが¹²⁾、反対に HBs 抗原が消失しても肝硬変などからの発癌は完全には抑えられないことを認識する必要がある。HBs 抗原消失が得られやすい症例は Baseline の ALT 高値例であり、一方、HBe 抗原陽性例、HBV DNA 高値例、肝硬変例では HBs 抗原消失が達成されにくい¹²⁾。最近では血清 IP-10 値がエンテカビルによる HBs 抗原減量と関連していたとの報告がある¹³⁾。

III. 核酸アナログと Peg-IFN の併用治療

核酸アナログ中止後の治療効果の持続や HBs 抗原陰性化を目指して、核酸アナログから IFN へ治療を切り替えてから核酸アナログ投与を終了するいわゆる Sequential 療法が試みられている。Ning らは、HBe 抗原陽性例に対してエンテカビルを 4 年間投与し、HBV DNA < 3.0 log copies/ml、HBe 抗原 < 100 PEIU/ml となった 102 例の非肝硬変症例に対して、Peg-IFN α -2a を 8 週間併用後、Peg-IFN 単独に切り替えて 40 週間投与を行う Sequential 療法群と、エンテカビル継続投与群との無作為化比較試験を行い、治療中の HBs 抗原陰性化が Sequential 療法群で高率 (27%, 4/15) であったと報告した。また HBe 抗原陰性例で核酸アナログ投与により HBV DNA が完全に抑制されている症例に対し Peg-IFN を最大 96 週間 Add-on したところ 10 例中 6 例で HBs 抗原の消失が認められ、核酸アナログの中

136 第2部 トピックス ● 2. 肝炎の臨床

止が可能であったとの報告や¹⁴⁾、Genotype D 以外の B 型慢性肝炎においてエンテカビルから Peg-IFN への Sequential therapy を施行したところ HBs のセロコンバージョンは 20% (Peg-IFN 単独では 0%) であったとの報告もあり¹⁵⁾、とくに Genotype A で成績が良かった。

IV. 抗ウイルス療法の治療効果予測と HBs 抗原

1. インターフェロン治療

近年可能となった HBs 抗原量の高感度測定を用いることにより、治療中の HBs 抗原の低下量や低下率が治療効果を予測するうえで有用であることが指摘されている。Peg-IFN α ±ラミブジンで 52 週間治療した HBe 抗原陽性 202 例の欧州における検討では、HBe 抗原の消失かつ HBV DNA < 10,000 copies/ml が達成された症例において、治療開始 12 週時点における HBs 抗原量の低下が、治療終了から平均 3 年後の HBs 抗原消失に有意に関連していた¹⁶⁾。他の報告でも Peg-IFN α 治療において治療開始 12 週時点で HBs 抗原量が 1,500 IU/ml 未満に低下した症例では HBe 抗原の消失率が高く^{17), 18)}、その後の HBs 抗原の消失が期待できる。また、Peg-IFN α ±ラミブジンで 32~48 週間治療した 92 例についての香港における検討でも、治療開始 12 週時点での HBs 抗原量が 1,500 IU/ml 未満、24 週時点で 300 IU/ml 未満に低下した症例では治療後 1 年における著効率が高く、とくに 24 週時点で HBs 抗原量が 1 log IU/ml 以上減少し 300 IU/ml 以下となった症例では著効率が高かった¹⁹⁾。

また HBe 抗原陰性例でも、Peg-IFN α 48 週投与終了後 24 週における HBV DNA 未検出を著効と定義した場合、著効例では治療終了時の HBs 抗原量が 2.1 ± 1.2 log IU/ml と低下しており、治療 12 週および 24 週時点の HBs 抗原減少量がそ

れぞれ 0.5 log IU/ml, 1.0 log IU/ml 以上であれば高率に著効が得られると報告されている²⁰⁾。さらに Brunetto らの検討では、治療中の HBs 抗原の低下量が 1.1 log IU/ml 以上、かつ 48 週時点における HBs 抗原が 1.0 log IU/ml 以下の症例では、治療終了後 3 年時点での HBs 抗原消失率が有意に高く²¹⁾、12 週時点における HBs 抗原の 10% 以上の減少が治療 1 年後の著効率や、5 年後の HBs 抗原消失に関連していたとの報告もある。

2. 核酸アナログ

エンテカビル治療中に HBs 抗原量が 1 log IU/ml 以上低下した症例では治療後 1 年後の HBe 抗原消失率が有意に高く⁷⁾、最近の研究では治療開始後 1 年間における HBs 抗原の低下率が 1 log IU/ml 以上の症例では 3 年以内の HBs 抗原の消失が認められ、反対に 1 log IU/ml 未満の症例では HBs 抗原の消失例はなかったと報告されている。したがって、核酸アナログ治療においても、HBs 抗原をモニターすることは最終治療効果を予測し治療計画を立案するうえで重要である。

おわりに

HBV 増殖が比較的低レベルに抑制されていても HBs 抗原量が多い状態、すなわち cccDNA からの転写・翻訳活性が高い状態では発癌リスクが少なからずある。B 型慢性肝炎の最終治療目標を達成するためには、HBs 抗原の陰性化を指標とした治療が必要であるが、現在の治療法では未だ十分満足できるものではない。最近クロマチン修飾酵素に作用する薬剤により cccDNA を標的として HBV の複製・翻訳を阻害する新規治療法の開発も進んでおり²²⁾、今後 HBs 抗原の消失、すなわち cccDNA の完全排除を目指した新規クラス治療法の開発が期待される。

文 献

1) Tseng TC, Liu CJ, Yang HC, et al : High levels of hepatitis B surface antigen increase risk of hepato-

cellular carcinoma in patients with low HBV load. Gastroenterology 2012 ; 142 : 1140-1149