

C. 研究結果

(1) B 型慢性肝疾患患者血清ならびに組織において肝線維化に関係する miRNA の同定とその機能解析

現在マイクロアレイを用いてデータを取得した状態で、マイクロアレイ解析結果は統計解析支援環境の R を用い、肝線維化の状態に応じて発現が変化している miRNA は複数個得られるが、その中からもっとも肝線維化の程度と相関している miRNA として miR-29 family を同定した。また miR-29a/b/c の標的遺伝子同定には miRTarBase

(<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>) を用いておこなった。

肝組織中の miRNA の中で肝線維化に関係しているものとしてスクリーニングを行い、肝星細胞株 (LX-2) に該当する miR-29a を過剰発現し、標的遺伝子候補として Collagen 1 α 1 (Col1A1), platelet derived growth factor C (PDGFC) の発現が低下することを確認した。

(2) ヒト B 型慢性肝疾患組織における Cygb の発現解析

Cygb は抗酸化作用を持つグロビンであるためその多寡が慢性炎症や組織線維化に寄与する可能性がある。当研究室ではヒトの Cygb に反応するモノクローン抗体を既に 2 種類作製した。これを用いて免疫組織学的に Cygb 発現を解析する。

C 型慢性肝疾患組織を用いた検討より、Cygb は特に F4 組織で発現が低下すること (Lab Invest 2014) やヒト肝癌組織では Cygb mRNA 発現が有意に低下することを観察した (論文執筆中)。

(3) 肝線維化が進行した CCL4 マウス、TAA マウスに miR-29a を尾静脈より投与したところ肝線維化が改善する事が分かった。Cygb と miR-29a の発現は両者間に相関は見られなかった (論文執筆中)。

D. 考察

miRNA が発癌に関与している事はほぼコンセンサスになっており、miRNA の発現異常に伴って miRNA が発現している癌遺伝子または癌抑制遺伝子の発現がカスケード式に変化する事など新たな知見が明らかになっている。これに対し、B 型慢性肝疾患の肝線維化機構における miRNA の意義を検討した研究の報告はほとんどない。我々は C 型慢性肝疾患において miR-221 と miR-222 は、ヒトの C 型慢性肝炎において肝線維化の進行につれて発現上昇すること、I 型コラーゲンや平滑筋アクチンの mRNA 発現と良好な相関を示すこと、2 種類の肝線維化動物モデルでも肝線維化の進行につれて発現上昇すること、培養肝星細胞の活性化に伴って発現上昇することなどを見出した (Gut 2012)。本研究では B 型慢性肝疾患において肝線維化の進展に関与する miRNA を同定し、臨床応用可能な肝線維化マーカーの開発を目指す。予想される結果として、i) miRNA を用いて非侵襲的に肝線維化を診断することが出来れば、反復して検査することが可能となり、治療による肝線維化改善効果を判定することが出来る。ii) また日常臨床上の利用のみならず、検診などにおいてのスクリーニング目的でも利用可能かもしれない。iii) 肝線維化は発癌の前段階と考えられるため、当該 miRNA は腫瘍マーカーとしても利用可能かもしれない。iv) 肝線維化の分子機構を解明することは、究極的には抗線

維化治療の開発に繋がる可能性がある。

一方、Cygb の発がんへの寄与に関して多様な臓器で報告されている。例えば、肺がんにおける Cygb の関与に関しては、プロモーター領域のメチル化やヘテロ接合体の欠損による Cygb 発現低下は non-small cell lung cancer (NSCLC) において報告された。即ち、54%の肺癌においては近接する非腫瘍部に比して明らかに低レベルの Cygb mRNA 発現が観察され ($p < 0.001$)、プロモーター領域のメチル化の程度と Cygb 発現が逆相関することが示された。また、Cygb mRNA 発現の低下と腫瘍の分化度とに相関が見られ低分化型でより低発現であることが示された (Fisher's exact, $P = 0.033$)。同様の知見は head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) や乳癌でも観察された。

Cygb が腫瘍抑制的であるとする、その効果はグロビンとしてのスカベンジャー効果からがん誘発性物質に由来する酸化ストレスやニトロソ化ストレスを低減し細胞を DNA、蛋白質、さらには膜レベルで保護することが推測される。一方、Cygb が発現低下することで、局所炎症や微小環境に変化が生じて、その結果として組織の線維化が生じ無秩序な上皮-間葉相互作用を惹起する可能性もある。従って、本分子の発現動態を慢性 B 型肝炎で特定することは臨床的意義がある。

E. 結論

B型慢性肝疾患における miRNA ならびに Cygb 発現動態を検討し、最終的には病態を反映するバイオマーカー開発に繋げる。

F. 研究発表

論文発表

1. Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis. Hai H, Tamori A, Kawada N. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 6236-43.
2. Noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. Enomoto M, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. *World J Gastroenterol*. 20: 12031-8 (2014).

G. 知的所得権の取得状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

血液疾患患者からのHBV再活性化に対する処置と予後に 関する研究

分担研究者 田守 昭博 大阪市立大学准教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)感染既往のある血液疾患例ではHBV再活性化の頻度が高く、原疾患治療中にはHBVモニタリングが義務付けられている。今回、我々が継続しているHBV再活性化前向き試験から再活性化例の特徴と核酸アナログ介入の効果と安全性について評価し、さらに介入後の予後について核酸アナログ中止基準についても検討した。結果:HBV再活性化は悪性リンパ腫に対するリツキシマブ併用治療30例中3例、造血幹細胞移植19例中5例に発生した。また原疾患治療前に血清HBs抗体価200 mIU/ml以上の症例からはHBV再活性化は発生しなかった。再活性化例への核酸アナログ介入は有効であり、肝不全を伴う肝炎は発症しなかった。特に定期モニタリング遵守例からはALTの上昇はなかった。介入した核酸アナログを中止した4例中2例にて再度のHBV増加があった。

A. 研究背景と目的

免疫抑制・化学療法中にHBs抗原陰性(HBV感染既往)例からHBVの増加が起こることが知られている。HBV再活性化が問題視されるのは、一旦肝炎が発症すると高率に重症肝障害へ進展し、肝不全による死亡例が多いためである。そこでHBV再活性化に対するガイドラインが作成・周知されてきたがその病態は十分に解明された訳ではない。我々は7年前からHBV感染既往例を登録し前向きに追跡している。多施設からの報告と同様、HBV再活性化のリスクが高い病態は悪性リンパ腫例へのリツキシマブ併用化学療法と造血幹細胞移植である。今回、HBV再活性化に関与している因子を明らかにするため血液疾患治療中に発症したHBV再活性化例を対象にHBV因子と宿主因子別による特徴を解析した。

B. 研究方法

対象は、大阪市立大学病院において2007年12月から2013年までにHBV再活性化前向き研究に登録されたHBV感染既往例の内、悪性リンパ腫に対するリツキシマブ併用治療30例と造血幹細胞移植19例である。肝臓学会のガイドラインに沿ってHBV DNAをreal time PCR法にて毎月測定し、2.1 log以上に増加した際にエンテカビル(核酸アナログ)投与を開始した。

C. 研究結果

リツキシマブ併用治療3例(10%)と造血幹細胞移植5例(26%)にHBV再活性化を認めた。再活性化の時期は、リツキシマブ併用治療例では中央値3ヶ月(2-10)と1年以内であった。一方、造血幹細胞移植例では22ヶ月(9-36)と1年以降であった。治療前の血清HBs抗体価はHBV再活性化のなかった症例では全例200 mIU/ml以上を示した。再活性化が起こった時

には1例を除き、全例にてHBs抗体は検出されなかった。造血幹細胞移植例では前HBs抗体価が低い症例ほどHBV再活性化の頻度が高いことが示唆された。

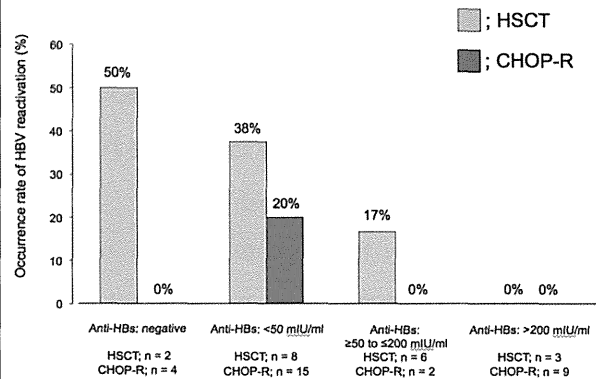


図1. HBs抗体価とHBV再活性化頻度

次にHBV再活性化におけるウイルス側の要因を検討するためにDirect sequence法にて再活性化したHBV DNA塩基配列を解析した。特にHBs抗原の決定基である'a' determinant域に注目した。

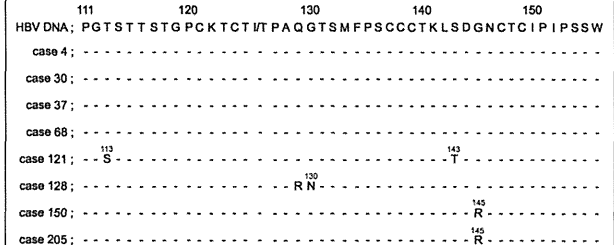


図2. 再活性化した8例のHBV塩基配列(HBsAg決定基)

8例中4例にHBs抗原決定基にアミノ酸置換を伴う塩基配列の変化を認めた。

最後に再活性化例においてエンテカビルをいつまで投薬すべきかについて検討した。HBs抗原陰性かつHBV DNAが検出されない状態が6ヶ月以上継続した原疾患治療例に限って患者同意を得た後にエンテカビル投与を中止した。

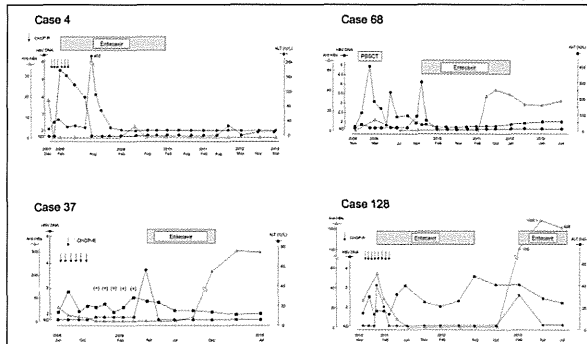


図3.エンテカビルを中止したHBV再活性化4例
上記の臨床経過に示される様にHBs抗体が陽性化していた2例ではエンテカビル中止後もHBV DNAの増加はなかった。一方、HBs抗体陰性のままエンテカビル中止した2例ではHBVの再上昇を認めた。

D. 考察

血液疾患（悪性リンパ腫へのリツキシマブ治療や造血幹細胞移植）ではHBV既往感染例に対する再活性化ガイドラインは良好に機能しており、HBV再活性化の頻度から鑑みても遵守すべき治療指針であると考えられた。その病態には患者の免疫力(特にHBs抗体量)の低下と感染例したHBV塩基配列が関与していることが推測された。本研究は少数例の検討であり病態解明と再活性化へのさらなる予防策開発のためには継続した解析が必要である。

E. 結論

HBV再活性化モニタリングを遵守された症例では適切な核酸アナログ介入が実施され、その予後は良好であった。またHBs抗体の獲得により、核酸アナログ中止の可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Discovering novel direct acting antiviral agents for HBV using in silico screening. Murakami Y, Hayakawa M, Yano Y, Tanahashi T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Iwadate M, Umeyama H. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 456:20-8.
2. Noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. Enomoto M, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 12031-8.
3. Successful Treatment of Hepatitis B Virus-associated Membranous Nephropathy with Entecavir and Immunosuppressive Agents. Ochi A, Ishimura E, Ichii M, Ohno Y, Nakatani S, Kobayashi I, Shima H, Tsuda A, Shidara K, Mori K, Tamori A, Inaba M. *Nephrology (Carlton)*. 2014; 19:595-6.
4. Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis. Hai H, Tamori A, Kawada N. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 6236-43.

5. A prospective long-term study of hepatitis B virus reactivation in patients with hematologic malignancy. Tamori A, Hino M, Kawamura E, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29: 1715-21.

2. 学会発表

1. Prospective study of hepatitis B virus reactivation in rheumatoid arthritis patients on immunosuppressive therapy: Evaluation of both HBsAg-positive and -negative cohorts. Tamori A, Goto H, Tada M, Inui K, Kawamura E, Hagihara A, Uchida K-S, Morikawa H, Morikawa H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. 2014. 65th American Association for the study of liver diseases (Boston)
 2. Clinical characteristics of hepatitis B virus reactivation in a prospective long-term study for patients with hematologic malignancy. Tamori A, Hino M, Kawamura E, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. 2014. 49th European Association for the study of the liver diseases (London)
 - 3.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究経費）

分担研究報告書

構造生物学的手法等を用いた B型肝炎治療薬の開発に関する研究

分担研究者 棚橋 俊仁 神戸薬科大学医療薬学研究室 准教授

研究要旨

ヒト B型肝炎ウイルス（HBV）は、宿主の免疫応答から回避し、宿主内で感染を持続させるため、その遺伝子に高頻度に変異をきたす。このウイルスゲノム上の遺伝子変異により、HBV は抗ウイルス剤への耐性を示す。しかし、従来の遺伝子解析法では、ウイルス遺伝子に当初から薬剤への耐性を示す自然耐性変異が存在していたのか、あるいは治療後にウイルス遺伝子に変異し耐性を獲得したのか、評価することは困難であった。核酸アナログ製剤による慢性 B型肝炎の治療前後に採取したヒト患者血清から、HBV ゲノムを抽出し、次世代シーケンサーにより全ウイルスゲノムのウルトラディープシーケンスを行い、薬剤応答別に HBV 遺伝子の全塩基配列をカタログ化する。

A. 研究目的

ヒト B型肝炎ウイルス（HBV）感染者の血液中に、塩基配列が異なる複数クローンの HBV 株の存在が報告されており、単一宿主内での HBV 株の遺伝的不均一性が示されている。この HBV 株の遺伝的不均一性の度合いが、抗ウイルス治療の効果に関連することが示されている。しかし、従来の遺伝子解析法では、HBV 遺伝子に、当初から薬剤耐性を示す自然耐性変異が潜在的に存在していたのか、あるいは感染後に HBV 遺伝子がヒト体内で変異し耐性を獲得したのか、評価することは困難であった。

次世代シーケンサー（NGS）は高速かつ大量塩基配列解読装置であり、短時間に膨大なウイルス遺伝子塩基配列情報を得ることが可能である。予備検討では、2万クローンに至る HBV 株の解析が可能であった。今回の研究では、核酸アナログ製剤による治療前後に、慢性 B型肝炎患者から HBV 遺伝子を抽出し、NGSによりウイルスゲノムのウルトラディープシーケンスを行い、クローン数別に HBV 株のカタログ化を実施する。

このウイルス塩基カタログ情報は、核酸アナログ製剤などの抗ウイルス剤を投与する際に、合理的な事前予測として役立つ

ち、不適切な抗ウイルス剤の投与に伴う耐性ウイルスの出現を抑制し、不要な医療費の削減効果をも期待出来るため、厚生労働行政上、有益をもたらす。

B. 研究方法

1. HBV ゲノム逆転写酵素配列 (694 bp) の PCR・ウルトラディープシーケンス
予備検討として、HBV ゲノムのコア領域で逆転写酵素をコードしている 694 bp 配列を PCR 法で部分的に増幅し、イルミナ社 MiSeq を用いて、4 ウイルス検体のウルトラディープシーケンスを実施した。平均取得リード数は、72 万 6 千リードあり、すべての検体でウイルスゲノムの各塩基部位に 2 万リード以上の配列情報が得られた。原理的には、2 万クローンに至る HBV 株の解析が可能、と考えられた。

2. HBV ゲノム全配列 (3215 bp) の PCR・ウルトラディープシーケンス
環状である全ウイルスゲノムを増幅するプライマー配列 P-1 と P-2 を設計し、HBV 全ゲノム配列の増幅を実施した。全ゲノム配列に由来する PCR 産物のウルトラディープシーケンスを実施し、適切なリード数と適切なデプスの評価を行った。さらに、全ゲノム配列をカバーするより適切なプライマー配列として、W-1、W-2、W-3 の設計を実施した。また、適切なコントロール配列を有する検体の構築を実施した。

3. PCR 法を必要としないダイレクト・ウルトラディープシーケンス

ウイルスゲノムの増幅を必要とせず、感染者血清から HBV ゲノムを直接採取し、ダイレクト・ウルトラディープシーケンス法の確立を試みた。この方法の確立により、PCR 法による増幅効率の不均一に起因する実験誤差が回避可能となり、また多数検体処理も実施し得る。

C. 結果

1. プール検体数の検討

エンテカビルが投与予定、あるいは投与されているヒト患者血清から、HBVゲノムを抽出した。環状である全ウイルスゲノムを増幅するプライマー配列P-1とP-2を設計し、PCR法でHBV遺伝子全長を増幅した。まず、2検体でPCR・ウルトラディープシーケンスを実施した。平均取得リード数は826万4千リードあり、ウイルスゲノムの各塩基部位に14万リード以上の配列情報が得られた。2検体では、過剰な情報量となり、また多検体での運用では非効率となるため、解析検体数を増加させることとした。

5検体のPCR・ウルトラディープシーケンスでは、平均取得リード数は254万5千リード、ウイルスゲノムの各塩基部位に6万リード以上が得られた。4検体のディープシーケンスにおいても、平均取得リード数は207万2千リード、ウイルスゲノムの各塩基部位に4万5千リード以上の配列情報が得られた。原理的に、4万クロー

ン以上のHBV株の解析が可能であり、4検体をプールしたディープシーケンスの実施が、運用上適切であると考えられた。

2. マルチプレックスPCRライブラリーの構築

プライマー配列であるP-1とP-2部位は取得リード数が減少するため、リード数の減少を補う目的で新たなプライマー配列W-1、W-2、W-3を設計した。3種類のPCR産物によるマルチプレックスPCRライブラリーを構築し、PCR・ウルトラディープシーケンスを実施し、HBV遺伝子全長に一樣なリード数の確保が可能であった。

構築したマルチプレックスPCRライブラリーにより、エンテカビル投与前23検体、投与後7検体のPCR・ウルトラディープシーケンスを実施済みである。

3. コントロールゲノムAB246344の構築

日本における標準的なB型肝炎ウイルス遺伝子配列として、AB246344（ジェノタイプC）が挙げられる（Hepatology 2006）。ゲノム変異解析の参照配列として用い、さらにシーケンスエラーを検出するため、大腸菌でAB246344配列を人工合成した。コントロールゲノムAB246344のウルトラディープシーケンスでは、平均取得リード数は271万3千リード、ゲノムの各塩基部位に5万リード以上が得られており、変異解析の参照配列として有用と

考えられる。

4. PCR法を必要としないダイレクト・ウルトラディープシーケンス

HBVゲノムはウイルスカプシドに包まれている。4検体を用いて、カプシド酵素処理の影響を検討した。カプシドの酵素処理が未実施であると、ウイルスゲノムの各塩基部位では、1千リード程度のカバレッジであり、ディープシーケンスは不可能であった。カプシド酵素処理に伴い、ウイルスゲノムの各塩基部位で1万リード以上のカバレッジが得られ、ダイレクト・ウルトラディープシーケンスによる解析が可能であった。但し、 10^6 コピー以下のウイルス量検体では、取得リードが少なく、解析不可能であった。

D. 考察

ヒト体内においてHBVは、多様な変異体の集合として存在しており、抗ウイルス剤への耐性を示す自然耐性変異体の検出は、HBVゲノムの臨床的意義の解明へつながる。我々は、核酸アナログによる治療前後に、慢性B型肝炎患者からHBV遺伝子を抽出し、NGSによるウルトラディープシーケンスで、4万クローンに至るHBV株を、薬剤応答別にカタログ化し得ることを明らかにした。さらに、核酸アナログ製剤の投与前から潜在的に微量に存在する薬剤抵抗性ウイルスを検出し得る可能性を示した。今後は、解析検体を

増加させ、HBV 株各クローンの塩基カタログ化をより多数例で推進させる。エンテカビル投与前後のヒト患者血清から HBV 遺伝子を抽出し、PCR 法で HBV 遺伝子全長を増幅させている。エンテカビル投与後は、ウイルス量が減少するため、PCR 法での検出結果に影響を及ぼす。我々の検討では、 10^6 コピー以下のウイルス量では、シングル PCR 法で、HBV 遺伝子全長の増幅が困難である点を見出している。この点を克服するため、PCR 法を必要としないダイレクト・ウルトラディープシーケンスの確立を試みた。カプシドの酵素処理に伴い、ウイルスゲノムの各塩基部位で十分なリード数が得られ、ダイレクト・ウルトラディープシーケンスによる解析が可能と考えられた。但し、血清ウイルス量が 10^6 コピー以下の低値な検体は、取得リードが少なく、解析が不十分である。今後は、PCR あるいはダイレクト・ウルトラディープシーケンスにより、血清ウイルス量が 10^6 コピー以下の検体の HBV 遺伝子全長をどのようにして検出するのか、検討課題としている。

E. 結論

NGS によるウルトラディープシーケンスで、これまでになく膨大な塩基情報を、より高速で、より感受性高く同定し得ることが可能となりつつある。今回の PCR およびダイレクト・ウルトラディープシーケンスで、1 万クローン以上の遺伝子

多様性のある HBV 株を、エンテカビルの治療効果別にカタログ化することが可能である。この薬剤応答性のウイルス塩基配列情報を基盤とし、ウイルス蛋白の立体構造解析へと繋げ、抗ウイルス剤との親和性を検討する。これら統合的な解析により、将来の慢性 B 型肝炎の治療の更なる改善が期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

Widasari DI, Yano Y, Heriyanto DS, Utsumi T, Yamani LN, Rinonce HT, Wasityastuti W, Lusida MI, Soetjipto, Okada R, Murakami Y, **Tanahashi T**, Azuma T, Hayashi Y. A Deep-Sequencing Method Detects Drug-Resistant Mutations in the Hepatitis B Virus in Indonesians. *Intervirology*. 2014 Oct 31;57(6):384-392.

Iwamoto A, **Tanahashi T**, Okada R, Yoshida Y, Kikuchi K, Keida Y, Murakami Y, Yang L, Yamamoto K, Nishiumi S, Yoshida M, Azuma T. Whole-genome sequencing of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* characterizes unidentified variants of multidrug resistant efflux pump genes. *Gut Pathog*. 2014 Jun 26;6:27.

Horibe S, Matsuda A, **Tanahashi T**, Inoue J,

Kawauchi S, Mizuno S, Ueno M, Takahashi K, Maeda Y, Maegouchi T, Murakami Y, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dys-regulation of cell cycle associated proteins. *Life Sci*. 2015 Jan 24. [Epub ahead of print]

学会発表

次世代シーケンサーを用いたヘリコバクターピロリ菌癌性蛋白 CagA に特徴的な変異の検出. 岩本彰、棚橋俊仁、岡田理菜、小川浩史、張菁芸、吉田優、東健. 第9回日本ゲノム微生物学会年会 2015年3月6-7日(神戸大学百年記念館、神戸)

次世代シーケンサーを用いた本邦におけるヘリコバクターピロリ菌 cagA 遺伝子の全ゲノム解析. 岩本彰、棚橋俊仁、楊林、山本幸司、東健. 第20回日本ヘリコバクター学会学術集会 2014年6月29日(東京ステーションコンファレンス、東京)

次世代シーケンサーによる肝発癌に關与する miRNA の網羅的解析. 村上善基、棚橋俊仁、田口善弘、豊田秀徳、熊田卓、榎本大、田守昭博、河田則文. 第100回日本消化器病学会総会 2014年4月24日(東京国際フォーラム、東京)

H. 知的財産権の出願、登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化等研究事業

B型慢性肝炎に対する核酸アナログ/PEG-IFN治療の現状と課題

研究分担者：榎本大 大阪市立大学大学院 医学研究科 肝胆臓病態内科学 准教授

研究要旨

エンテカビル(ETV)を開始し12ヶ月以上観察しえたB型慢性肝疾患150例(核酸アナログ未治療121例/ラミブジンからの切り替え29例)を対象とした。未治療例では12ヶ月のHBV DNA $<2.1 \log_{10}$ コピー/mLへの低下は82%、HBeAg陽性例では12ヶ月の陰性化率は21%であった。難治要因として、治療前高ウイルス量のみがETVによりHBV DNAまたはHBeAg陰性化が得られない独立因子であった。抗ウイルス効果不良例において高感度PCR-Invader法でも潜在する薬剤耐性株を検出することは出来なかった。

A. 研究目的

B型慢性肝炎・肝硬変に対する現行の抗ウイルス薬としてインターフェロン(IFN)と核酸アナログがあるが、核酸アナログは経口薬で副作用が少なく効果も確実であるため汎用されている。核酸アナログはB型肝炎ウイルス(HBV)複製過程の逆転写を阻害し、またchain terminatorとしてDNA鎖伸長を停止させることによりウイルスの増殖を強力に抑制する。ところが肝細胞の核内に存在し複製中間体としてはたらく閉環状完全二重鎖DNA(cccDNA)には作用しないためウイルスを排除することは出来ず、長期の治療に伴い薬剤耐性が問題となる。現在、第一選択薬として位置づけられているエンテカビル(ETV)やテノホビルの5年の耐性出現率は0~1.2%と非常に低

率ではあるが、治療早期の抗ウイルス効果が不良の難治例では将来の耐性出現が懸念される。

今回我々は、1)難治例の頻度を明らかにし、その臨床的特徴について解析した。また、2)HBV DNAが陰性化しない症例では、breakthroughを来す前から耐性ウイルスが潜在するかについても解析した。

B. 研究方法

対象

対象は、i) ETVを導入し12ヶ月以上観察しえた核酸アナログ未治療のB型慢性肝疾患121例(49±13歳、男性69%、HBeAg陽性43%、HBV DNA中央値 $6.7 \log_{10}$ コピー/mL、genotype C 92%、慢性肝炎/肝硬変/肝癌 75/10/36)。ii) ラミブジンからETVに切り替え12ヶ月以上観察

しえた 29 例(50±12 歳、男性 79%、HBeAg 陽性 45%、HBV DNA 中央値 4.4 log₁₀ コピー/mL、genotype C 95%)であった。

治療効果について、6 ヶ月、12 ヶ月の HBV-DNA < 2.1 log₁₀ コピー/mL への低下をそれぞれ VR₆、VR₁₂、HBeAg 陽性例においては 6 ヶ月、12 ヶ月の HBeAg 陰性化を SR₆、SR₁₂ と定義した。

HBV 薬剤耐性変異の検出には Line probe 法 (INNO-LiPA HBV DR Ver. 2Plus) と PCR Invader 法 (BML) を用いた。

(倫理面への配慮)

この臨床研究はヘルシンキ宣言を遵守し、GCP に基づいて実施している。被検者の個人情報については、個人情報保護法に基づいて適切に取り扱う。

C. 結果

ETV の抗ウイルス効果に寄与する因子の検討

核酸アナログ未治療の HBeAg 陽性 52 例に対する成績は VR₆ 17 例(33%)、VR₁₂ 35 例(67%)、SR₆ 10 例(19%)、SR₁₂ 11(21%)であった。HBeAg 陰性 69 例に対する成績は VR₆ 53 例(77%)、VR₁₂ 64 例(93%)であった。

核酸アナログ未治療全 121 例において VR₁₂ に寄与する独立因子として、HBeAg 陰性であることが抽出された(表 1)。また HBeAg 陽性 69 例において SR₁₂ を得られた症例は、治療前 HBV DNA が有意に低いことが示された($P = 0.026$, 表 2)。

表 1 VR₁₂ に寄与する因子 (多変量解析)

Factors	Category	HR (95%CI)	P
HBeAg	positive	1	0.048
	negative	3.57 (1.01-12.98)	
HBsAg (Log IU/L)	≥ 3.5	1	0.091
	< 3.5	2.58 (0.86-7.74)	
HBV-DNA (Log copies)	≥ 6.7	1	0.33
	< 6.7	2.00 (0.49-8.12)	

表 2 SR₁₂ に寄与する因子 (単変量解析)

	Serological responders (n = 10)	Serological non-responders (n = 38)	P value
Age (years)	42 ± 10	42 ± 11	N.S.
Sex (%Male)	7 (70%)	26 (68%)	N.S.
ALT (IU/L)	418 ± 486	200 ± 236	N.S.
Platelet (x10 ⁴ /mm ³)	17.8 ± 4.7	18.2 ± 7.4	N.S.
HBsAg (Log ₁₀ IU/L)	3.31 ± 0.73	3.77 ± 0.65	N.S.
HBeAg (C.O.I)	24.7 (7.7-1261)	1554 (118.4-1600<)	0.077
HBV-DNA (Log ₁₀ copies/mL)	7.3 ± 0.8	8.2 ± 1.1	0.026
Precore (wild/mixed/mutant)	6/2/1	20/18/0	N.S.
Core Promotor (wild/mixed/mutant)	2/1/6	8/3/26	N.S.
Genotype (A/B/C/D)	0/0/10/0	1/2/34	N.S.
Grade (A1/A2/A3)	2/5/2	15/9/3	N.S.
Stage (F1/F2/F3/F4)	3/5/1	13/8/6/1	N.S.
HCC (%)	1 (10%)	4 (11%)	N.S.

N.S., not significant

ETV 効果不良例における耐性ウイルスの存在について

直近の検査で HBV DNA $\geq 2.1 \log_{10}$ コピー/mL であった核酸アナログ未治療 7 例とラミブジンからの切り替え 5 例に対して耐性ウイルスの検出を試みた(表 3)。

ウイルスの検出に関して、HBV DNA $< 3.0 \log_{10}$ コピー/mL の検体では、Line probe 法、Invader 法ともに感度以下であった。HBV DNA $3.0 \sim 4.0 \log_{10}$ コピー/mL の 6 検体では、Line probe 法で 33%、Invader 法で 100%に、HBV DNA > 4.0

\log_{10} コピー/mL の 2 検体では Line probe 法、Invader 法とも 100%にウイルスの検出が可能であった。

耐性ウイルスに関しては、Line probe 法では 5%、Invader 法では 2%以上を占めれば検出可能であった。核酸アナログ未治療では最長 49 ヶ月の ETV 投与で、いずれの方法でも耐性変異は検出されなかった。ラミブジンからの切り替え例では 4 例で耐性変異が検出された。

表 3 直近の検査で HBV DNA $\geq 2.1 \log_{10}$ コピー/mL であった症例における耐性変異

Age (years)	Sex	NUC	Duration of ttt (mos)	HBV-DNA (Log copies)	Line probe	Invader	Direct sequence
57	M	Experienced	15	5.6	L180L/M A181A/T T184T/ILFM M204M/V N236N/T	L180M A181T T184 I/M M204V N236T M250L	A181T N236T
49	M	Experienced	42	4.7	L180M T184T/SCGA M204V	L180M T184A S202G M204V/I M250L/V	L180M T184A M204V
47	M	Experienced	16	3.3	wild	M204I	wild
29	M	Experienced	42	2.2	(-)	(-)	M204I
43	M	Experienced	37	2.2	(-)	(-)	(-)
72	F	Naïve	26	4.0	(-)	wild	(-)
43	M	Naïve	35	3.7	(-)	wild	(-)
66	M	Naïve	20	3.4	(-)	wild	(-)
67	F	Naïve	19	3.4	(-)	wild	(-)
57	M	Naïve	16	3.1	wild	wild	wild
48	M	Naïve	38	2.9	(-)	(-)	(-)
51	M	Naïve	18	2.5	(-)	(-)	(-)

D. 考察

我が国における肝癌による死亡は年間30,000人以上と推定され、悪性新生物による死亡では肺癌、胃癌、大腸癌に次いで第4位となっている。その成因としてはC型肝炎ウイルス(HCV)が最も多く約70%を占めているが、HCVに対しては直接作用型抗ウイルス経口薬を2剤併用することにより、IFNフリーでも高率にウイルスの排除が得られるようになった。一方、成因の約15%を占めるHBVに対しては核酸アナログ単剤ではウイルスの排除は困難で、単独または核酸アナログとの併用で使用可能な新規治療薬の開発が急務である。そこで核酸アナログ治療の難治要因や耐性機序を解明することは引き続き重要な研究課題である。

第一世代の核酸アナログ薬であるラミブジンではポリメラーゼ遺伝子の逆転写酵素ドメインの204番のアミノ酸置換(いわゆるYMDD変異)により年率十数%、アデフォビルでは236番または181番のアミノ酸置換により年率数%の割合で薬物耐性が出現することが知られている。これに対してETVは、204番に加えて169番、184番、202番、250番のいずれかの置換が加わらなければ耐性にならない所謂genetic barrierの高い薬剤であり、実際、5年の耐性出現率は1.2%と報告されている。テノホビル耐性に関しては194番置換が関連するという報告もあるが、実際の6年耐性出現率は0%であり、コンセンサスは得られていない。

Keeffeらは'Roadmap concept'として、核酸アナログ投与24週でHBV DNAの陰性化が得られない難治例では、将来の耐性化が懸念されるため、治療方針の変更を検討することを勧めている(*Clin Gastroenterol Hepatol* 2008)。我々の検討では治療前高ウイルス量のみが、ETVによりHBV DNAまたはHBeAgの陰性化が得られない難治要因であった。

治療前に高ウイルス量であることが、陰性化が得られにくい要因であることは至極当然であるが、同時に治療前から耐性ウイルスが潜在している可能性も考えられる。現在、commercialに使用可能なHBV耐性変異検出キットとしてLine probe法、PCR Invader法が挙げられる。既報のごとく、Line probe法では5%以上(Degertekin B et al. *J Hepatol* 2009)、Invader法では2%以上(Tadokoro K et al. *J Virol Methods* 2011)耐性ウイルスが占めれば検出可能であった。未治療例では高感度のInvader法を用いても、治療前から潜在する耐性ウイルスを検出することは出来なかった。我々は更に次世代シーケンサーを用いて、より高感度に(未知のものも含め)耐性ウイルスの検出を試みている(詳細は他項)。

E. 結論

- 1) 治療前高ウイルス量はETVによりHBV DNAまたはHBeAg陰性化が得られない難治要因であった。

- 2) PCR Invader 法は、Line probe 法より高感度で、HBV DNA $\geq 3.0 \log_{10}$ copies/mL かつ耐性ウイルスが 2%以上を占めれば検出可能であった。
- 3) 核酸アナログ未治療例では PCR-Invader のような高感度法でも潜在する薬剤耐性ウイルスは検出されなかった。

F.健康危険情報

特記事項なし。

G.研究発表

論文発表

1. Enomoto M, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. Noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol.* 20: 12031-8 (2014).

学会発表

2. Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Uchida-Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Murakami Y, Jomura H, Shiomi S, Kawada N. Long-term outcome of sequential therapy with lamivudine followed by interferon in nucleoside-naive, hepatitis B e antigen-positive patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection. 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL) April 12, 2014, London

3. 榎本大, 西口修平, 河田則文。HBsAg 陽性 B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ/IFN sequential 治療後の長期経過：特に HBsAg, HBcrAg の変化について。第 100 回日本消化器病学会総会 ワークショップ 8「B 型肝炎抗ウイルス療法の進歩と課題」平成 26 年 4 月 26 日 東京都

4. 榎本大, 齋藤正紀、榎本平之、西口修平、津田泰宏、樋口和秀、打田佐和子、森川浩安、村上善基、田守昭博、河田則文。B 型肝炎に対するエンテカビル/IFN sequential 療法：特に PEG-IFN と従来型 IFN の比較について。第 18 回日本肝臓学会大会 平成 26 年 10 月 23 日 神戸市

H.知的財産権の出願、登録状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

厚生労働省難治性疾患対策研究事業
肝炎等克服緊急対策研究事業に関する調査研究班

B型肝炎における経過予測及びHBs抗原消失に
関与するウイルス遺伝子変異の探索

分担研究者 本多 隆 名古屋大学医学部附属病院 助教

研究要旨

B型肝炎症例では自然経過でHBs抗原が消失する予後の良い症例と肝炎が持続して肝硬変、肝癌に至る症例がある。B型慢性肝炎に対する標準的治療には核酸アナログ治療やインターフェロン治療がある。しかしながらB型肝炎に対する核酸アナログ治療やインターフェロン治療を考慮する際、HBe抗体陽性となった症例において、その後ウイルス量が低下して肝炎が沈静化し自然経過で予後の良い、治療介入の必要ない症例と肝炎が持続し肝硬変に進むリスクがあり治療が必要な症例を見極めることが重要になる。昨年度は肝炎の鎮静化にI97L変異が関与する可能性を報告した。本年度の検討ではI97Lの変異はHBeAb陽性例でHBeAb陰性例と比較して高率にみられた。変異がみられる症例ではその後の経過でHBVDNA、ALTの低下が見られ、一部の症例でHBsAgが陰性化した。

A. 研究目的

B型肝炎のキャリアは世界で約4億人、日本でも約150万人がキャリアであると推計されている。世界でB型肝炎に関連する肝硬変、肝不全、肝癌により年間約100万人が死亡しており世界的にも治療の向上が望まれる疾患である。B型肝炎に対する治療法には核酸アナログ治療やインターフェロン治療があるが、治療を考慮する際HBe抗体陽性となった症例において、その後ウイルス量が低下して肝

炎が沈静化し自然経過で予後の良い、治療介入の必要ない症例と肝炎が持続し肝硬変に進むリスクがあり治療が必要な症例を見極めることが重要になる。

またHBeAg陰性例においてPreCore(PC)領域のG1896Aの変異によりstop codon(TAG)が形成されHBeAgの産生が停止することやBasal Core Promoter(BCP)のA1762T/G1764Aの変異でPreC mRNAの転写効率が低下しHBeAg産生が減少することが報告されている。しかし、PC変

異やBCPの変異によりその後の経過を予測することは難しく、自然経過で変動するALT値やHBVDNA変動の時間的推移を勘案し適切な治療開始時を決定することが勧められている。現在日本の厚生省のガイドラインでB型慢性肝炎HBe抗原陰性例ではHBVDNAが4 Log copies/mL以上かつALTが31IU/L以上で治療の介入をすすめている。しかし、retrospectiveに症例の経過をみると中にはその後、結果的に自然経過で治療が必要なかった症例もあり肝炎が沈静化するかどうか判断するための指標が望まれる。昨年度はHBeAb陽性例の少数例で検討を行った。本年度の研究ではHBe抗体陰性症例および陽性症例において、B型慢性肝炎症例においてcoreI97変異がその後の経過に及ぼす影響を検討することを目標とした。

B. 研究方法

2年以上経過観察ができた慢性B型肝炎患者(genotype C)の対象例のうち観察開始時に血清保存がおこなわれている症例でcoreI97変異が測定された82症例を対象とした。HBVDNA5.0 Log copies/mL以上かつALT31IU/mL以上で推移したものの或いは、肝障害の持続があり核酸アナログ製剤を使用した症例を経過不良例とし、それ以外を経過観察可能例とした。またその後の経過観察後にHBsAgが消失したかどうかも検討した。Core領域のダイレクトシーケンスを行い確認した。

患者背景

HBeAb陰性例は21例、HBeAb陽性例は61例であり、平均年齢、性別の割合、 γ GTP、T.Bil、Alb、血小板、観察期間に有意な差は見られなかったが、ALTはHBeAb陰性例で52.0 (27.0-92.0) IU/LとHBeAb陽性例の25.0 (17.0-41.5) IU/Lと比較して有意に高値であった。またHBsAg値はそれぞれ、3235 (1932-31809) IU/mL、1730 (476-4520) IU/mLとHBeAb陰性例で有意に高値であり、HBVDNAは8.5 (7.7-9.1) Log copies/mL、4.5 (3.5-5.6) Log copies/mLとHBeAb陰性例で有意に高値であった。

HBeAb陽性例においてI97wildとI97L変異ありの背景を比較すると、I97L変異のある症例で年齢が43 (35-49)歳でありI97wildの49 (41-62)歳と比較して有意に若年であった($P=0.046$)。しかし、他の性別、ALT、 γ GTP、T.Bil、Alb、血小板値、HBsAg、HBVDNA、観察期間に関して有意な差はみられなかった。

(倫理面への配慮)

既にこの解析に関する臨床研究は名古屋大学医学部附属病院の倫理委員会より承認されている。

この中でB型肝炎患者からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮している。また、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供資料や個人情報を

適正に管理保存している。

C. 結果

HBsAg 陰性例、HBsAg 陽性例の I97L 変異の割合

HBsAg 陰性例において I97L 変異は 14.3% (3/21)、HBsAg 陽性例においては 50.8% (31/61) 見られ、HBsAg 陽性例で有意に高率に存在していた ($P=0.002$)。

HBsAg 陽性の有無、I97L 変異の有無によるその後の経過

HBsAg 陰性例では I97wild の症例で 1 例のみが経過観察可能例であったが、I97L 変異例も含めて他の 20 例は経過観察不良例であった。一方、HBsAg 陽性例では I97wild の症例は 36.0% (9/25) が経過観察可能例であったのに対して I97L 変異がある症例では 67.7% (21/31) で経過観察可能例であり、有意に I97L 変異がある症例で経過観察可能例が高率であった ($P=0.018$)。

HBsAg 陽性例で I97L 変異がある症例では HBVDNA は 4 Log copies/mL から徐々に低下し 3 Log copies/mL 程度まで低下したが、I97Lwild の症例では 5~6 Log copies/mL で推移した。ALT 値も I97L 変異がある症例では経過とともに 30IU/L 未満で推移し肝炎の鎮静化がみられたのに対して、I97wild の症例では時々 ALT の上昇がみられ、30IU/L 以上で推移した。

HBsAg 陽性の有無、I97L 変異の有無によ

る HBsAg 消失の有無

HBsAg 陰性例では I97L 変異の有無にかかわらず HBsAg の消失は見られなかった。一方、HBsAg 陽性例では I97wild の症例では HBsAg の消失はみられなかったが、I97L 変異のある症例の 8 例 25.8% で HBsAg が消失していた ($P=0.006$)。

D. 考察

本研究では I97L の変異は HBsAg 陽性例で HBsAg 陰性例と比較して高率にみられた。変異がみられる症例ではその後の経過で HBVDNA、ALT の低下が見られ、一部の症例で HBsAg が陰性化した。

I97L 変異は HBV の core 領域に自然経過中におこる最も頻度の高い変異であることが報告されている。Ehata らは I97L 変異を含む core84-101 の変異は CTL などの免疫応答による肝障害を反映したものと報告した (Ehata et al. JCI 1991. 89:332-338)。その中で HBsAg 陽性例の内 4 例全例では I97L が認められた。またその後の報告では core 84-99 の変異は劇症肝炎などの激しい肝障害と関連していることを明らかにした (Ehata et al. JCI 1993. 91:1206-1213)。

Ehata らの論文では HBsAg が陽性であるものは 4 例全例で I97L 変異が陽性であった。この違いは以前の測定法では HBVDNA が低値まで測定できなかったため、HBVDNA 4.0 LogIU/mL 未満と低ウイルス量の症例が以前の報告では検討できていない可能性があると思われた。

一方、In vitro の解析で core 領域の I97 は HBVcapsid 粒子の構造や機能への感受性が高く重要な部位であり、I97L への変異により immature secretion が認められている (Bo Ning et al. J of Virology 2004;78:13653-1366)ことから、I97L 変異が認められる症例では HBVNDNA 量が低下してくることが推察できる。今回の検討において HBeAb 陰性例で I97L 変異の頻度は低く HBeAb 陽性例では頻度が高く、更にその後 HBsAg が消失した症例もみられたことから、肝硬変でない HBe 抗体陽性で、Core I97L 変異は B 型肝炎のその後の沈静化を予測するのに有用な可能性がある。

E. 結論

B 型慢性肝炎において、治療を選択するためにその後の経過を予測するには HBVDNA、ALT の値に加えて core I97L の変異測定が有用になる可能性がある。

F.健康危険情報

特記事項なし。

G.研究発表

論文発表

1. Ishigami M, Honda T, Ishizu Y, Onishi Y, Kamei H, Hayashi K et al. Frequent incidence of escape mutants after successful hepatitis B vaccine response and stopping of nucleos(t)ide analogues

in liver transplant recipients. Liver Transpl. 2014;20:1211-1220

2. Imai N, Ishigami M, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K et al. Transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: A review of techniques. World J Hepatol. 2014;27:844-850
3. Tachi Y, Hirai T, Miyata A, Ohara K, Iida T, Ishizu Y, Honda T, et al. Progressive fibrosis significantly correlates with hepatocellular carcinoma in patients with a sustained virological response. Hepatology Research 2015;30:178-183
4. Hayashi K, Katano Y, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Ishigami M et al. Association of interleukin 28B polymorphism and mutations in the NS5A region of hepatitis C virus genotype 2 with interferon responsiveness J Gastroenterol Hepatol 2015;30:178-183
5. Honda T, Ishigami M, Hayashi H, Ishizu Y, Kuzuya T, Hayashi K et al. Effect of Peginterferon alfa-2b and Ribavirin on Hepatocellular Carcinoma Prevention in Older Patients with Chronic Hepatitis C. J Gastroenterol Hepatol 2015;30:321-328
6. Honda T, Ishigami M, Luo F, Ishizu Y, Kuzuya T, Hayashi K et al. Hepatitis B e antigen and hepatitis B surface antigen seroclearance with emergence of lamivudine-associated mutation and core mutation after elevation of CD4 in a

- patient with hepatitis B and HIV.
Internal Medicine 2015;54:585-590
7. Ishizu Y, Ishigami M, Suzuki N, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K et al. Endoscopic treatment of esophageal varices on hemophilic patients with liver cirrhosis. Gastrointest Endosc 2015;81:1059-1060
 8. Yamada K, Ishigami M, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K, Goto H. Association between responses to interferon therapy and genetic variation in interferon -28B and the core region of hepatitis C virus genotype 3a. J Med Virol. In Press.
 9. Ando T, Kojima K, Isoda H, Eguchi Y, Honda T, Ishigami M, Kimura S. Reactivation of resolved infection with the hepatitis B virus immune escape mutant G145R during dasatinib treatment for chronic myeloid leukemia. Int J Hematol. In Press.
 10. 本多 隆、石上雅敏、新家卓郎、今井則博、阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵一、石津洋二、葛谷貞二、林 和彦、石川哲也、中野 功、片野義明、後藤秀実. C型慢性肝炎難治例における Peg-IFN/RBV 併用療法の治療効果と発癌抑制効果. 消化器科 2014;58:337-341
- 学会発表
1. Honda T, Ishigami M, Luo F, Ishizu Y, Kuzuya T, Hayashi K, Shimomura Y, Goto H Oral supplementation of BCAA alleviates hepatic steatosis and liver injury associated with NASH 63th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD). Nov. 9, 2014 Boston
 2. 本多 隆、石上雅敏、新家卓郎、今井則博、阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵一、中野 聡、石津洋二、葛谷貞二、林 和彦、石川哲也、中野 功、後藤秀実. HBe 抗体陽性 B 型慢性肝炎における経過予測に必要なウイルス遺伝子変異の検討。分岐鎖アミノ酸による NASH マウスモデルにおける肝脂肪抑制効果. 第 100 回日本消化器病学会総会 平成 26 年 4 月 26 日 東京都
 3. 本多 隆、石上雅敏、新家卓郎、今井則博、阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵一、中野 聡、石津洋二、葛谷貞二、林 和彦、中野 功、石川哲也、片野義明、後藤秀実. C 型慢性肝炎難治例における PegIFN・Ribavirin・Telaprevir3 剤併用療法の治療効果. 第 50 回日本肝臓学会総会 平成 26 年 5 月 29 日 東京都
 4. 本多 隆、石上雅敏、加藤幸一郎、新家卓郎、今井則博、阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵一、石津洋二、葛谷貞二、林 和彦、中野 功、石川哲也、後藤秀実. 高齢者 C 型慢性肝炎における PegIFN・Ribavirin・Simeprevir3 剤併用療法の治療効果.

- JDDW-Japan2014 平成 26 年 10 月 8 日
5. 本多 隆、石上雅敏、後藤秀実. B 型
肝炎における経過予測及び HBs 抗原
消失に関するウイルス遺伝子変異.
第 40 回日本肝臓学会東部会 平成 26
年 11 月 27 日 東京都
- H.知的財産権の出願、登録状況**
- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし