

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業(B型肝炎創薬実用化等研究事業)
分担研究報告書

次世代シーケンサーによるS領域の多様性の評価

分担研究者 矢野嘉彦 神戸大学・微生物感染症学講座 講師

研究要旨

HBs 抗原の親水性領域である MHR 領域の多様性は宿主免疫から回避し、ウイルスの持続感染に関与している。本研究では MHR 領域の多様性を次世代シーケンサーにより解析し、ウイルスの多様性と臨床病態の関連について検討を行った。30 名のインドネシア人患者(11 名の慢性肝炎、19 名の肝硬変肝癌患者)を対象とした。HBs 抗原の titer については、慢性肝炎群よりも有意に肝硬変肝癌群で低かった。MHR 領域のアミノ酸変異の多様性について、全アミノ酸に対して 20%以上の変異を認める major population、5~20%の変異を認める intermediate population、1~5%の変異を認める minor population に分類された。その結果、MHR 領域において major および intermediate population が認められた領域は P120Q/T, T123A, P127T, Q129Q/H, M133L/T, G145R であり、MHR 領域の変異の頻度は、慢性肝炎群よりも有意に肝硬変肝癌群で高い結果であった。MHR 領域のアミノ酸変異の多様性は、病態の進行や HBs 抗原の力価の低下にも関連していることが示唆された。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルスの高い変異率については、ポリメラーゼの修復機構の破綻やウイルス増幅効率の増強にも影響し、ウイルスの多様化、いわゆる Quasispecies をもたらす。これまで多くの研究において、ウイルス多様性が病態の進行や治療効果とも関連するとの結果が示されてきている。

HBV ゲノムの S 領域については HBs 抗原産生に関与している。HBs 抗原は宿主免疫における主要な target であるが、特に HBs 抗原の親水性基である MHR 領域(aa 100-169)については HBs 抗体により認識される多くの B cell epitope が存在している。MHR 領域はそ

の多様性が報告されており、その多様性によって宿主の免疫機構から回避し持続感染をきたすことが知られている。

次世代シーケンサーでは、従来のサンガーシーケンセス法とは違い、一度に多くの微量クローン(minor variants)を検出することができるため、臨床病態との関連を検討するには有用である。本研究ではこれまで検討されたことの無いインドネシア人の B 型肝炎ウイルスを用い、次世代シーケンサーを用いて S 領域、特に MHR 領域の多様性について検討し、臨床病態との関連について検討を行った。

B. 研究方法

インドネシアジャワ島スラバヤ市の病院より採取された30名のB型肝炎ウイルス持続感染者(慢性肝炎11例、肝硬変肝癌19例)を対象としている。QIAamp DNA Blood Mini Kits (QIAGEN社)を用いて患者血液よりDNAを抽出し、特異的プライマー: HB8F (nt1824-1843; TTCACCTCTGCCTAATCATC)、HB6R (nt1803-1784; AACAGACCAATTTATGCCTA)、HB2F (nt414-433; TGCTGCTATGCCTCATCTTC)、HB3R (nt1107-1084; AGTTGGCGAGAAAGTGAAAGCCTG)によりMHR領域を含む693bpのS領域を増幅した。Nextera Sample Prep Kit(イルミナ社)を用いてPCR産物を調整した後、MiSeqシーケンサー(イルミナ社)を用いてシーケンスを行った。

ウイルスの多様性を比較検討した。

統計学的にはSPSS22(IBM社)を用い、2群間比較にはt検定またはMann-Whitney U検定を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究はインドネシア国ハジ病院、スワンジ病院および神戸大学の倫理委員会の承認を受け、各患者からの説明と同意のもとに行われている。

C. 結果

30例の遺伝子型を検討すると、遺伝子型B3が29例、遺伝子型B7が1例であった。各検体の平均カバレッジは22,745~39,128と比較的良好であった。

次世代シーケンスによって得られたMHR領域のアミノ酸変異の多様性について、全アミ

ノ酸に対して20%以上の変異を認める変異の多い領域(major population)、5~20%の変異を認める中間領域(intermediate population)、1~5%の変異を認める変異の少ない領域(minor population)に分類した。

この結果、全MHR領域におけるmajorまたはintermediate populationについては、慢性肝炎群よりも肝硬変肝癌群の方が有意に多くのアミノ酸領域で認められた($p<0.05$)。特に抗原決定基a領域のアミノ酸変異については、肝硬変肝癌群で有意にmajor populationの頻度が高かった($p<0.05$)。

MHR領域にmajor populationを認めた例は30例中25例(83%)であり、抗原決定基aにもT126I, P127T, Q129H/R, G130R, M133L/T, G145Rといった変異を認めた。

D. 考察

今回の検討はすべてインドネシア東ジャワ州スラバヤ市で採取されたB型肝炎ウイルスを用いている。遺伝子型についても30例中29例が遺伝子型B3、サブタイプadwであり、インドネシアにもっとも認められるタイプであった。これまでの検討では、サブタイプadwはワクチンエスケープ変異に関連があるとするシンガポールからの報告や、若年肝癌におけるS領域の多様性との関連があるとの台湾からの報告がある。今回の検討でも、肝硬変肝癌患者のHBs抗原価は有意に低く、MHR領域の多様性によりHBs抗原の抗原性の変化をきたし、HBs抗体からの免疫機構からの回避に繋がったことが示唆された。

今回の次世代シーケンスの結果では、MHR領域の変異は肝硬変肝癌患者により高頻度に認められたが、これまでもより病態の進行した肝炎患者においてMHR領域の変異頻

度が高いことはいくつかの文献で報告されている。この要因としては、当初から存在した変異ウイルスが持続感染の後に肝癌へ進展させる可能性と、ウイルスの複製過程で出現した変異ウイルスが持続感染や肝癌への病態進展に関わっている可能性がある。MHR 領域変異が病態の進行における役割については、引き続き詳細に検討する必要がある。

今回の検討では、major および intermediate population として存在する MHR 領域の変異は、病態の進行に関連していた。実際に認められた変異は、P120Q/T, T123A, P127T, Q129Q/H, M133L/T, G145R であった。とくに P120Q/T, P127T, Q129Q/H, M133T, G145R については肝硬変肝癌群にのみ認められた。M133T や G145R については、宿主免疫からの回避に関連するとともに、肝癌発生にも関与しているとする報告もある。また同時に MHR 領域の変異の中には、HBs 抗原粒子の分泌や外被の分泌にも関わっている変異があるとされる。肝細胞内に HBs 抗原や外被蛋白が蓄積することにより小胞体ストレスが低下することから、炎症の促進や病態の進行に関わっていることが推測された。

E. 結論

インドネシアにおける B 型肝炎の検討からは、肝硬変肝癌例においては慢性肝炎例に比べて HBs 抗原価は低く、MHR 領域のアミノ酸変異の頻度は高い結果であった。MHR 領域のアミノ酸変異の多様性は、病態の進行や HBs 抗原の力価の低下にも関連していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

論文発表

1. Yano Y, Azuma T, Hayashi Y. Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics. *World J Hepatol.* 2015 Mar 27;7(3):583-92. doi: 10.4254/wjh.v7.i3.583. Review. PMID: 25848482
2. Utsumi T, Wahyuni RM, Lusida MI, Yano Y, Priambada NP, Amin M, Purwono PB, Istimagfiroh A, Soetjipto, Brulé A, Hotta H, Hayashi Y. Full genome characterization and phylogenetic analysis of hepatitis B virus in gibbons and a caretaker in Central Kalimantan, Indonesia. *Arch Virol.* 2015 Mar;160(3):685-92. doi: 10.1007/s00705-014-2323-9. Epub 2015 Jan 7. PMID: 25559671
3. Murakami Y, Hayakawa M, Yano Y, Tanahashi T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Iwadate M, Umeyama H. Discovering novel direct acting antiviral agents for HBV using in silico screening. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jan 2;456(1):20-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.024. Epub 2014 Nov 15.
4. 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;57(6):384-92. doi: 10.1159/000366420. Epub 2014 Oct 31. PMID: 25382636
5. Utsumi T, Yano Y, Amin M, Lusida MI, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Acute hepatitis due to hepatitis A virus subgenotype IA as an imported infectious disease from Indonesia. *Kobe J Med Sci*. 2014 Oct 1;60(2):E43-7. PMID: 25339259
 6. Juniastuti, Wibowo BP, Wibawa ID, Utsumi T, Mustika S, Amin M, Wahyuni RM, Kurniawan H, Hendrayana A, Setiawan PB, Yamani LN, Soetjipto, Yano Y, Hotta H, Hayashi Y, Lusida MI. Interleukin-28B polymorphisms and response of chronic hepatitis C patients from Indonesia to pegylated interferon/ribavirin treatment. *J Clin Microbiol*. 2014 Jun;52(6):2193-5. doi: 10.1128/JCM.00768-14. Epub 2014 Apr 2.
 7. Utsumi T, Yano Y, Hotta H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus. *World J Med Genet*. 2014 May 27; 4(2) 19-26.
 8. Bai F, Yano Y, Kim SR, Seo Y, Miki A, Saito M, Hirano H, Momose K, Minami A, Hatazawa Y, Hayakumo T, Widasari DI, Rinonce HT, Sugano M, Tani S, Yoon S, Imoto S, Azuma T, Hotta H, Hayashi Y. Mutational diversity of NS5A and NS3 during triple therapy (telaprevir, pegylated-interferon- α 2b and ribavirin) for genotype 1b chronic hepatitis C: The Kobe Hepatitis Therapeutic Group. *Int J Mol Med*. 2014 Jun;33(6):1652-6. doi: 10.3892/ijmm.2014.1706. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24647743
 9. Juniastuti, Utsumi T, Nasronudin, Alimsardjono L, Amin M, Adianti M, Yano Y, Soetjipto, Hayashi Y, Hotta H, Lusida MI. High rate of seronegative HCV infection in HIV-positive patients. *Biomed Rep*. 2014 Jan;2(1):79-84. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24649073
 10. Juniastuti, Utsumi T, Aksono EB, Yano Y, Soetjipto, Hayashi Y, Hotta H, Rantam FA, Kusumobroto HO, Lusida MI. Predominance of precore mutations and clinical significance of basal core promoter mutations in chronic hepatitis B virus infection in Indonesia. *Biomed Rep*. 2013 Jul;1(4):522-528. Epub 2013 May 15. PMID: 24648979
- 学会発表
1. Takako Utsumi, Rury M. Wahyuni, Maria I. Lusida, Yoshihiko Yano, Nur P.

- Priambada, Mochamad Amin, Priyo B. Purwono, Anittaqwa Istimagfiroh, Soetjipto, Aurélien Brulé, Hak Hotta, Yoshitake Hayashi. Full genome characterization and phylogenetic analysis of hepatitis B virus in gibbon and its caretaker in Indonesia. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 横浜
2. Mochamad Amin, Adrian Hadikusumo, Juniastuti, Rury M. Wahyuni, Anittaqwa Istimagfiroh, Takako Utsumi, Yoshihiko Yano, Soetjipto, Yoshitake Hayashi, Hak Hotta, Maria I. Lusida. Serologic and genotype analysis of hepatitis B virus among mothers with HBsAg positive and their family. The 7th international seminar of Indonesian society for microbiology 2014 年 10 月 Padang
 3. Rury M. Wahyuni, Takako Utsumi, Yoshihiko Yano, Ignatia S. Murti, Hanggoro T. Rinonce, Mochamad Amin, Laura N. Yamani, Anittaqwa Istimagfiroh, Priyo B. Purwono, Juniastuti, Soetjipto, Maria I. Lusida, Yoshitake Hayashi. Analysis of genotype and gene mutation of hepatitis B virus related to advanced liver diseases in East Kalimantan, Indonesia. 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2014 年 9 月 奈良
 4. Laura N. Yamani, Yoshihiko Yano, Takako Utsumi, Soetjipto, Maria I. Lusida, Juniastuti, Hadi Wandono, Doddy Widjanarko, Ari Triantanoe, Widya Wasityastuti, Ryou Gyokukou, Rina Okada, Toshihito Tanahashi, Yoshitake Hayashi. Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) quasispecies in Indonesian HBV patients by deep sequencing analysis. 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2014 年 9 月 奈良
 5. 矢野 嘉彦、斉藤 雅也、平野 仁崇、百瀬 健次、畑沢 友里、川野 佑輝、廣畑 成也、尹 聖哲、瀬尾 靖、東 健. B 型慢性肝炎患者に対する PEG-IFN α -2a 療法の治療効果と HBsAg 量推移の検討 第 18 回日本肝臓学会大会 2014 年 10 月 神戸

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型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書

タンパク質構造およびリガンド結合情報と疎水性相互作用を考慮した
インシリコスクリーニング

分担研究者 岩館満雄
中央大学大学院工学部生命科学科・准教授

研究要旨

これまで、リガンド情報を加味したタンパク質立体構造によるインシリコスクリーニングのプログラム ChooseLD を開発、利用してきた。さらなる高精度かを目指しこれまで直接は考慮してこなかった疎水性相互作用をプログラムに導入した。結果、精度の向上が見られた。今後は計算時間の削減を見直す必要がある。

A. 研究目的

インシリコスクリーニングにおけるターゲットタンパク質の立体構造に関しては、PDB に登録されている場合は実験構造を用い、登録されていなければホモロジーモデリングで予測を行う。近年 PDB に登録されるタンパク質-リガンド複合体構造も増加しており、一つのタンパク質ファミリーで複数の登録されているケースも多く、適切にデータを参照することでより高精度予測への寄与が期待される。本研究で用いているインシリコスクリーニングプログラム ChooseLD は、この PDB に登録された構造中の相互作用情報を参照してドッキングを行う。ドッキング毎に算出されるスコアは実験構造中のリガンドとの幾何的な位置の一致性に関する関数が大きく影響しており、疎水性相互

作用に代表される物理化学的相互作用に関して直接は考慮していない状況であった。そこで本研究ではスコアの中に疎水性相互作用に関する評価関数を導入することによって精度の向上を試みた。

B. 研究方法

方法全体を一言で表せば「従来の ChooseLD 法のプログラムに疎水性相互作用関数を付加する。」になる。具体的には梅山・赤羽らの研究で考案された疎水性相互作用評価関数 Hc (hydrophobic correlation) Index を導入する。Hc Index の定義は以下の通り (図 1)。

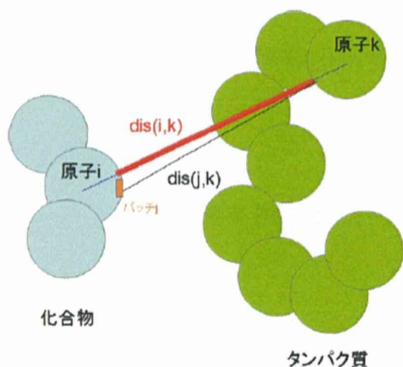


図 1 タンパク質とその近傍にある任意の化合物の疎水性を想定した場合

式 1

$$Hc = \sum_j f_j \times Hf_j \times S_j$$

式 2

$$Hf_j = \sum_k f_k \times e^{-0.1312 \times dis(j,k)^2}$$

式 1 で j は医薬品候補化合物の座標における原子半径から計算される球面を 180 分割した断片（以降パッチと呼ぶ）である。 f_j はから取得する。表 1 はタンパク質に存在する置換基の f 値を表しており、任意の化合物候補に拡張するために、Crippen の方法で定められる分配係数 $\log P$ で代用することとした。Crippen の方法では $\log P$ を求めたい原子の隣接原子のパターンが、あらかじめ用意された SMART 形式のパターンの中でどれに一致するかを判断し、一致したパターンの $\log P$ を一原子ごとの f 値として採用した。この採用を裏付けるために図 2 に縦軸は f 値、横軸は $\log P$ で表した散布図を示す。

負の相関が示されており、疎水性相互作用関数 Hc Index の計算に導入可能と判断した。

Group	$f(\text{cal}/(\text{mol} \cdot \text{Å}^2))$
Guanidinium	19.30
-SH	-24.10
-S-	0.71
Imidazolium	1.27
Indolyl	-12.56
$-\text{NH}_3^+$	45.28
$-\text{C}_6\text{H}_5$	-12.88
$-\text{CONH}_2$	11.30
$-\text{COO}^-$	18.63
$-\text{OH}(\text{aliphatic})$	11.26
$-\text{OH}(\text{aromatic})$	15.78
Hydrocarbon	-20.87
Back-bone amide	29.34

表 1 f 値の一覧 (梅山・赤羽の論文より)

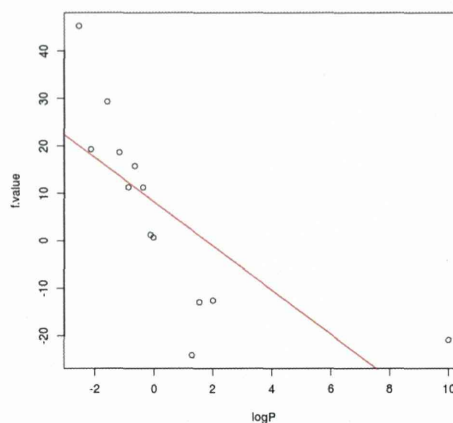


図 2 縦軸は f 値、横軸は $\log P$

C. 研究結果

2014 年 3 月頃に行われた IPAB コンテストの標的蛋白質 Human c-Yes kinase のリン酸化活性を阻害する化合物を ChEMBL から探索を行った。ChEMBL で得られた IC50 値の存在する同じアッセイ中で 3 個以上の化合物が収録されている 5 アッセイの

57個の化合物候補×1000個の予測構造から得られる FPAScore と Hc index のデータセットと IC50 とのスピアマンの順位相関係数を k の値を変えながら求めた。本研究ではもともとの ChooseLD のスコアである FPAScore の値に係数 k を乗じた数を新たなスコアとして採用した。

式 3

$$\text{TOTAL_SCORE} = \text{FPAScore} + k \times \text{Hc index}$$

(k は係数)

概ね Hc Index の比重が高くなるほど負の相関を改善の方向に導く結果となった。

D. 考察

本法は顕著な相関係数の改善は見られ有効な方法として十分な検討の価値があると考えられる。しかしながら、問題は計算時間にあり従来型の ChooseLD の二桁ほど多い計算時間を要する点が課題である。また、ターゲットとしてまだ一つのタンパク質のみ試したのみであり、より広範囲での試行を要すると考えられる。現在、計算時間短縮を模索中。

E. 結論

疎水性相互作用を ChooseLD に導入した。導入効果は相関係数の改善の方向性が見られた。問題は計算時間にありソースコードを見直し短縮後に、多くのターゲットタンパク質での試行を要する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 未発表
2. 学会発表 未発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 未取得
2. 実用新案登録 未登録
3. その他

表2 式3におけるk値を変化させたときのChEMBL Assay ID毎のIC50との相関係数

		Assay ID				
		217596	217598	473236	974313	974314
k	1000	-0.4	-0.314	-0.1	-0.367	0.091
	100	-0.4	-0.314	-0.1	-0.367	0.091
	10	-0.4	-0.314	-0.1	-0.367	0.091
	1	-0.3	-0.346	-0.1	-0.367	0.091
	0.1	-0.3	-0.046	0.233	-0.317	0.212
	0.01	-0.1	0.032	0.1	-0.067	0.309
	0.001	-0.1	0.025	0.1	0.083	0.345
	0	-0.1	0.025	0.1	0.083	0.345

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
	なし						

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
Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Kozuka R, Hayashi T, Kohmoto M, Jomura H, Morikawa H, Murakami Y, Shiomi S, Kawada N.	Long-term Outcome of Sequential Therapy with Lamivudine Followed by Interferon in Nucleoside-naïve, Hepatitis B e-antigen-positive Patients with Chronic Hepatitis B Virus Genotype C Infection.	Journal of Interferon and Cytokine Research	in press		2015
Murakami Y, Hayakawa M, Yano Y, Tanahashi T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Iwadate M, Umemiya H.	Discovering novel direct acting antiviral agents for HBV using in silico screening	Biochemical and Biophysical Research Communications.	456	20-28	2015
Tamori A, Hino M, Hagihara A, Kawamura E, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Iwaisaka S, Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N.	A prospective long-term study of hepatitis B virus reactivation in patients with hematologic malignancy.	Journal of Gastroenterology and Hepatology	29	1715-1721	2014
Toyoda H, Kumada T, Tada T, Kaneoka Y, Maeda A.	A laboratory marker, FIB-4 index, as a predictor for long-term outcomes of hepatocellular carcinoma patients after curative hepatic resection.	Surgery.	157(4)	699-707	2015
2. Takada K, Toyoda H, Tada T, Ito T, Hasegawa R, Gotoh T, Ichihara H, Sone Y, Kumada T.	Accurate and rapid identification of feeding arteries with multidetector-row angiography-assisted computed tomography for transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma.	J Gastroenterol.	In press		2015

Tada T, Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Kitabatake S, Yama T.	Impact of the BTR and CAA granule therapy in patients with HCC: a pilot study.	J Gastroenterol Hepatol	In press		2015
Johnson PJ, Berhane S, Kagebayashi C, Satomura S, Teng M, Reeves HL, O'Beirne J, Fox R, Skowronska A, Palmer D, Yeo W, Mo F, Lai P, Iñarrairaegui M, Chan SL, Sangro B, Miksad R, Tada T, Kumada T, Toyoda H.	Assessment of liver function in patients with hepatocellular carcinoma: a new evidence-based approach—the ALBI grade	J Clin Oncol	33(6)	550-558	2015
Toyoda H, Kumada T, Tada T, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Kitabatake S, Ito T.	Risk Factors of HCC Development in Non-cirrhotic Patients with Sustained Virologic Response for Chronic HCV Infection.	J Gastroenterol Hepatol	In press		2015
Ito T, Kumada T, Toyoda H, Tada T.	FIB-4 index for assessing the prognosis of hepatocellular carcinoma in patients with Child-Pugh class A liver function.	J Cancer Res Clin Oncol	In press		2015
Nagasawa T, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda E, Matsuura J, Toyoda H, Kaneoka Y, Kumada T, Kozawa O.	Heat shock protein 20 (HSPB6) regulates TNF- α -induced intracellular signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells.	Arch Biochem Biophys	565	1-8	2015
Toyoda H, Kumada T, Tada T, Sone Y, Maeda A, Kaneoka Y.	Non-hypervascular hypointense nodules on Gd-EOTB-DTPA-enhanced MRI as a predictor of outcomes for early-stage HCC.	Hepatol Int	9(1)	84-92	2015

Tada T, Kumada T, Toyoda H, Ito T, Sone Y, Okuda S, Ogawa S, Igura T, Imai Y.	Diagnostic accuracy for macroscopic classification of nodular hepatocellular carcinoma: comparison of gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced magnetic resonance imaging and angiography-assisted computed tomography.	J Gastroenterol.	50(1)	85-94	2015
Tada T, Kumada T, Toyoda H, Kuriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Kitabatake S, Ito T.	Long-term prognosis of patients with hepatitis B infection: causes of death and utility of nucleos(t)ide analogue therapy.	J Gastroenterol.	In press		2014
Tada T, Kumada T, Toyoda H, Ito T, Sone Y, Kaneoka Y, Maeda A, Okuda S, Otake K, Takahashi K.	Utility of contrast-enhanced ultrasound with perflubutane for diagnosing the macroscopic type of small nodular hepatocellular carcinomas.	Eur Radiol.	24(9)	2157-66	2014
Toyoda H, Kumada T, Tada T.	Postinterferon α -fetoprotein elevation and risk of hepatocellular carcinoma development after sustained virological response: cause or results?	Hepatology.	60(2)	762-763	2014
Toyoda H, Kumada T, Tada T, Ito T, Maeda A, Kaneoka Y, Kagebayashi C, Satomura S.	Changes in highly sensitive alpha-fetoprotein for the prediction of the outcome in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy.	Cancer Med.	3 (3)	643-651	2014
Fox R, Berhane S, Teng M, Cox T, Tada T, Toyoda H, Kumada T, Kagebayashi C, Satomura S, Johnson PJ.	Biomarker-based prognosis in hepatocellular carcinoma: validation and extension of the BALAD model.	Br J Cancer.	110(8)	2090-2098.	2014
Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kuriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tanaka J, Kagebayashi C, Satomura S.	High-sensitivity Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein assay predicts early detection of hepatocellular carcinoma.	J Gastroenterol.	49(3)	555-563.	2014

Toyoda H, <u>Kumada T</u> , Tada T, Murakami Y.	Impact of hepatitis B virus integration into liver tissue on the efficacy of peginterferon and ribavirin therapy in hepatitis B virus-negative chronic hepatitis C patients.	J Clin Gastroenterol.	48(1)	73-79	2014
Hai H, Tamori A, <u>Kawada N</u> .	Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis.	World J Gastroenterol.	20	6236-6243.	2014
Enomoto M, Morikawa H, Tamori A, <u>Kawada N</u> .	Noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B.	World J Gastroenterol.	20	12031-12038	2014
Ochi A, Ishimura E, Ichii M, Ohno Y, Nakatani S, Kobayashi I, Shima H, Tsuda A, Shidara K, Mori K, <u>Tamori A</u> , Inaba M.	Successful Treatment of Hepatitis B Virus-associated Membranous Nephropathy with Entecavir and Immunosuppressive Agents.	Nephrology (Carlton).	19	595-6.	2014
Widasari DI, Yanono Y, Heriyanto DS, Utsumi T, Yamani LN, Rinonce HT, Wasityastuti W, Lusidami MI, Soetjipto, Okada R, Murakami Y, <u>Tanahashi T</u> , Azuma T, Hayashi Y.	A Deep-Sequencing Method Detects Drug-Resistant Mutations in the Hepatitis B Virus in Indonesians.	Intervirology.	57(6)	384-392.	2014
Iwamoto A, <u>Tanahashi T</u> , 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.	6	27	2014

Horibe S, Matsuda A, <u>Tanahashi T</u> , Inoue J, Kawachi S, Mizuno S, Ueno M, <u>Takahashi K</u> , Maeda Y, Maegouchi T, Murakami Y, Yumoto R, Nagai J, Takano M.	Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins.	Life Sci.	In press		2015
Ishigami M, <u>Honda T</u> , 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.	20	1211-1220	2014
Imai N, Ishigami M, Ishizu Y, Kuzuya T, <u>Honda T</u> , Hayashi K et al.	Transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: A review of techniques.	World J Hepatol.	27	844-850	2014
Tachi Y, Hirai T, Miyata A, Ohara K, Iida T, Ishizu Y, <u>Honda T</u> , et al.	Progressive fibrosis significantly correlates with hepatocellular carcinoma in patients with a sustained virological response.	Hepatology Research	30	178-183	2015
Hayashi K, Katano Y, Ishizu Y, Kuzuya T, <u>Honda T</u> , 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	30	178-183	2015
<u>Honda T</u> , 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	30	321-328	2015
<u>Honda T</u> , 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	54	585-590	2015

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 Int Endosc.	81	1059-1060	2015
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		2015
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.		2015
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	58	337-341	2014
Yano Y, Azuma T, Hayashi Y.	Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics.	World J Hepatol.	7(3)	583-592.	2015
Utsumi T, Wahyuni RM, Lusida MI, Yano Y, Priambada NP, Amin M, Purwono PB, Istimagfiroh A, Soetjipto, Burulé A, Hotta H, Hayashi Y.	Full genome characterization and phylogenetic analysis of hepatitis B virus in gibbons and a caretaker in Central Kalimantan, Indonesia.	Arch Virol.	160(3):	685-92.	2015
Utsumi T, Yano Y, Amin M, Lusida MI, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y.	Acute hepatitis due to hepatitis A virus subtype IA as an imported infectious disease from Indonesia.	Kobe J Med Sci.	60(2)	E43-47	2014

Juniastuti, Wibowo BP, Wibawa ID, Utsumi T, Mustika S, Amin M, Wahyuni RM, Kurniawan H, Hendrayana A, Setiawan PB, Yamani LN, Soetjipto, Yano Y, Hotta H, Hayashi Y, Lusida MI.	Interleukin-28B polymorphisms and response of chronic hepatitis C patients from Indonesia to pegylated interferon/ribavirin treatment.	J Clin Microbiol.	52(6)	2193-2195	2014
Utsumi T, Yano Y, Hotta H.	Molecular epidemiology of hepatitis B virus	World J Med Genet.	4(2)	19-26	2014
Bai F, Yano Y, Kim SR, Seo Y, Miki A, Saito M, Hirano H, Morose K, Minami A, Hatazawa Y, Hayakumo T, Widasari DI, Rinonce HT, Sugano M, Tani S, Yoon S, Imoto S, Azuma T, Hotta H, Hayashi Y.	Mutational diversity of NS5A and NS3 during triple therapy (telaprevir, pegylated-interferon- α 2b and ribavirin) for genotype 1b chronic hepatitis C: The Kobe Hepatitis Therapeutic Group.	Int J Mol Med.	33(6)	1652-1656.	2014
Juniastuti, Utsumi T, Nasronudin, Alimsardjono L, Amin M, Adianti M, Yano Y, Soetjipto, Hayashi Y, Hotta H, Lusida MI.	High rate of seronegative HCV infection in HIV-positive patients.	Biomed Rep.	2(1)	79-84	2014
Juniastuti, Utsumi T, Aksonob EB, Yano Y, Soetjipto, Hayashi Y, Hotta H, Riantam FA, Kusumobroto HO, Lusida MI.	Predominance of precore mutations and clinical significance of basal core promoter mutations in chronic hepatitis B virus infection in Indonesia.	Biomed Rep.	1(4)	522-528	2013

Mary Ann Liebert, Inc.

**Journal of
Interferon & Cytokine Research**

**Long-term Outcome of Sequential Therapy with Lamivudine
Followed by Interferon in Nucleoside-naïve, Hepatitis B e-
antigen-positive Patients with Chronic Hepatitis B Virus
Genotype C Infection**

Journal:	<i>Journal of Interferon and Cytokine Research</i>
Manuscript ID:	JICR-2014-0234.R1
Manuscript Type:	Full Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Enomoto, Masaru; Osaka City University Medical School, Department of Hepatology Nishiguchi, Shuhei; Hyogo College of Medicine, Department of Internal Medicine Tamori, Akihiro; Osaka City University Medical School, Department of Hepatology Kozuka, Ritsuzo; Osaka City University Medical School, Department of Hepatology Hayashi, Takehiro; Osaka City University Medical School, Department of Hepatology Kohmoto, Madoka; Osaka City University Medical School, Department of Hepatology Jomura, Hisato; Wakakoukai Clinic, Department of Internal Medicine Morikawa, Hiroyasu; Osaka City University Medical School, Department of Hepatology Murakami, Yoshiki; Osaka City University Medical School, Department of Hepatology Shiomi, Susumu; Osaka City University Medical School, Department of Nuclear Medicine Kawada, Norifumi; Osaka City University Medical School, Department of Hepatology
Keywords:	IFNs and cytokines; Infectious disease, Antiviral actions, Immunomodulations by IFNs

SCHOLARONE™
Manuscripts

LONG-TERM OUTCOME OF SEQUENTIAL LAMIVUDINE AND IFN THERAPY

Long-term Outcome of Sequential Therapy with Lamivudine Followed by Interferon-β in Nucleoside-naïve, Hepatitis B e-antigen-positive Patients with Chronic Hepatitis B Virus Genotype C Infection

Masaru Enomoto,¹ Shuhei Nishiguchi,² Akihiro Tamori,¹ Ritsuzo Kozuka,¹ Takehiro Hayashi,¹ Madoka Toyama Kohmoto,¹ Hisato Jomura,³ Hiroyasu Morikawa,¹ Yoshiki Murakami,¹ Susumu Shiomi,⁴ Norifumi Kawada¹

¹Department of Hepatology and ⁴Department of Nuclear Medicine, Osaka City University Medical School, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan; ²Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Japan; and ³Department of Internal Medicine, Wakakoukai Clinic, Osaka, Japan

Address correspondence to: Dr. Masaru Enomoto, Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University Medical School, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan.
E-mail: enomoto-m@med.osaka-cu.ac.jp

LONG-TERM OUTCOME OF SEQUENTIAL LAMIVUDINE AND IFN THERAPY

Abstract

It is unclear whether the combination of a nucleos(t)ide analogue and interferon (IFN) is superior to monotherapy for treating chronic hepatitis B. Here, we report the long-term outcomes of sequential therapy using lamivudine followed by IFN- β . This study included 24 hepatitis B e-antigen (HBeAg)-positive patients with chronic hepatitis B virus (HBV) genotype C infection who were treated with lamivudine alone for 16–32 weeks, then with both IFN- β and lamivudine for 4 weeks, and lastly with IFN- β alone for 20 weeks. All patients were followed up for 7.1 ± 2.8 years post-treatment. The rate of response, defined as transaminase normalization, HBeAg loss, and HBV DNA $<10^4$ copies/ml, was 5/24 (21%) at 24 weeks post-treatment. The patients with short-term responses were younger than those with no response ($P=0.039$). More short-term responders had undetectable HBV DNA at the start of IFN- β compared with the non-responders ($P=0.0059$). Subsequently, four of the five short-term responders remained free of the need for further drug treatment for 4.2 ± 3.5 years post-treatment; more short-term responders remained drug-free than did non-responders ($P=0.035$). At the last visit, there was a larger decrease in hepatitis B surface antigen (HBsAg) from baseline in patients subsequently given IFN compared with patients given nucleos(t)ide analogues only ($P=0.10$); this was also true for hepatitis B core related antigen (HBcrAg) ($P=0.12$). In conclusion, the rate of response to sequential therapy was limited in HBeAg-positive patients with chronic HBV genotype C infection at 24 weeks post-treatment. In the majority of the short-term responders, however, the response was sustainable in the long-term. In non-responders, repeated IFN treatment may suppress HBsAg and HBcrAg levels subsequently.

LONG-TERM OUTCOME OF SEQUENTIAL LAMIVUDINE AND IFN THERAPY

Introduction

Hepatitis B virus (HBV) infection remains an important public health issue and a leading cause of liver-related morbidity worldwide, accounting for 1 million deaths annually [1,2]. HBV has been classified into 10 genotypes (A–J) based on sequence divergence. In Japan and other countries in East Asia, genotype C is the most prevalent type of HBV. This genotype is associated with a low incidence of spontaneous seroconversion from hepatitis B e-antigen (HBeAg) to anti-HBe, an increased risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma, and a low likelihood of a favorable response to antiviral therapy [3,4].

The currently available antiviral treatments for chronic hepatitis B can be divided into two classes of therapeutic agents: nucleos(t)ide analogues and interferon (IFN). The direct, potent antiviral effects of nucleos(t)ide analogues induce an on-treatment response in most patients, but post-treatment relapse is common. Long-term use of nucleos(t)ide analogues, particularly the first-generation agent lamivudine, can lead to drug-resistance. In contrast, IFN has both antiviral and immunomodulatory actions. IFN-induced remission of chronic hepatitis B is stable but seldom achieved. Whether a combination of lamivudine and IFN confers an additional benefit for treating chronic hepatitis B remains unclear [5,6].

Serfaty *et al.* [7] reported that sequential therapy initiated with lamivudine followed by IFN- α was effective in patients with chronic hepatitis B. A pilot study in France found that a sustained virological and biochemical response was achieved in 8 of the 14 (57%) patients who received lamivudine alone for 20 weeks, followed by both lamivudine and IFN- α for 4 weeks, and lastly IFN- α alone for 24 weeks. Some groups have tested similar protocols of sequential therapy, with conflicting results [8–24], which may have been caused, at least in part, by differences in the HBV genotypes