

臓器不全合併症例に対する治療法の確立

-臓器移植後の新規抗 HCV 療法に適した免疫抑制プロトコルの導入-

担当責任者者 大段 秀樹 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨 臓器移植後の HCV 抗体陽性は移植臓器の機能廃絶と移植後死亡の独立した危険因子であるため、積極的に抗ウイルス療法を行う必要がある。近年、インターフェロンとは異なる作用機序による抗ウイルス治療として DAAs(direct-acting antivirals)が開発され、DAA のみを併用した治療法に期待が寄せられている。本研究では、C 型肝炎合併移植患者に対してダクラタスビル+アスナプレビル併用した際の、免疫抑制薬を含めた薬物動態の解析を行うとともに、リンパ球混合試験で抗ドナー免疫応答を解析し、有効性・安全性の評価を行う。まず広島大学病院消化器外科・移植外科関連施設に対して HCV 感染透析患者および腎臓および肝臓移植患者の現状について調査を行い、治療対象患者の抽出を行った。そして新規抗 HCV 療法に適した免疫抑制プロトコルおよび検査スケジュールを作成し、臨床研究申請を行った。今後症例登録を行い順次解析を行う。

A. 研究目的

肝臓および腎臓移植後の HCV 抗体陽性は移植臓器の機能廃絶と移植後死亡の独立した危険因子であるため、積極的に抗ウイルス療法を行う必要がある。しかし移植患者に対するインターフェロン治療は拒絶反応を誘発する危険性があり、また腎臓移植後のみならず肝臓移植患者においても腎機能障害を合併する患者が多く、リバビリンが十分投与できないため、SVRは低率である。近年、インターフェロンとは異なる作用機序による抗ウイルス治療として DAAs (direct-acting antivirals)が開発され、DA

ている。現在まで移植患者における DAA の使用報告は散見されるが、薬物動態と免疫抑制剤薬へ及ぼす影響については評価されていない。

本研究では、C 型肝炎合併移植患者に対してダクラタスビル+アスナプレビル併用した際の、免疫抑制薬を含めた薬物動態の解析を行うとともに、リンパ球混合試験で抗ドナー免疫応答を解析し、有効性・安全性の評価を行う。

B. 研究方法

広島大学病院消化器外科・移植外科関連

施設に対してHCV感染透析患者および腎臓および肝臓移植患者の現状について調査を行い、治療対象患者の抽出を行った。

また当施設で過去に施行した肝臓移植症例において、リンパ球混合試験を用いた抗ドナー免疫応答の解析をHCV症例と非HCV症例で比較検討した。

(倫理面への配慮)

試験責任医師または試験分担医師は、被験者が試験に参加する前に、説明文書を用いて十分説明し、試験への参加について自由意思による同意を本人から文書として得る。

(1)人権への配慮 (プライバシーの保護)

- 1) 研究実施に関わる生データ類および同意書等を取り扱う際は、被験者の秘密保護に十分配慮すること。
- 2) 病院外に提出する症例報告書等では、被験者識別コード等を用いて行うこと。
- 3) 研究の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含まないようにすること。
- 4) 研究の目的以外に、研究で得られた被験者のデータを使用しないこと。

(2)安全性・不利益への配慮

透析および移植患者における本治療の有効性および安全性が十分に確立されていないこと、採血量および回数が増えること。本研究中に有害事象が発生した場合は、速

やかに適切な診察と処置を行うこと。

C. 研究結果

肝臓移植症例において、HCV症例と非HCV症例の抗ドナー免疫応答の解析をリンパ球混合試験で行い比較検討した。その結果、HCV症例であっても非HCV症例と同等の抗ドナー免疫応答を有しており、免疫抑制薬の減量は拒絶反応を誘発する恐れがあるため、通常免疫抑制プロトコールで管理する必要が解明された。またカルシニューリン阻害薬であるシクロスポリンはDA Aとの併用は禁忌であるため、導入前にタクロリムスに変更する必要がある。

以上のことを背景に、新規抗HCV療法に適した免疫抑制プロトコールおよび検査スケジュールを作成し、当院臨床研究倫理審査委員会へ臨床研究申請を行い、承認された(第臨-530号、UMIN000016558)。

D. 考察

ウイルス性肝炎では肝臓内の抗原提示細胞である樹状細胞の機能低下が報告されており、免疫抑制薬の減量が可能であることが推察されていた。しかし本研究の解析結果により、HCV症例における免疫抑制薬の減量は拒絶反応を誘発する恐れがあるため、非HCV症例と同様に厳重に管理する必要があることが解明された。

E. 結論

新規抗HCV療法に適した免疫抑制プロトコールを作成した。今後症例登録を行い順次解析を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morimoto H, Ishiyama K, Ishifuro M, Ohira M, Ide K, Tanaka Y, Tahara H, Teraoka Y, Yamashita M, Abe T, Hashimoto S, Hirata F, Tanimine N, Saeki Y, Shimizu S, Sakai H, Yano T, Tashiro H, Ohdan H. Clinical efficacy of simultaneous splenectomy in liver transplant recipients with hepatitis C virus. *Transplant Proc.* 2014; 46(3):770-773.
- 2) Sakai H, Ishiyama K, Tanaka Y, Ide K, Ohira M, Tahara H, Abe T, Hirata F, Morimoto H, Hashimoto S, Tanimine N, Saeki Y, Shimizu S, Yano T, Kobayashi T, Tashiro H, Ohdan H. Potential benefit of mixed lymphocyte reaction assay-based immune monitoring after living donor liver transplantation for recipients with autoimmune hepatitis. *Transplant Proc.* 2014; 46(3):785-789.

- 3) Morimoto H, Ide K, Tanaka Y, Ishiyama K, Ohira M, Tahara H, Teraoka Y, Yamashita M, Abe T, Hashimoto S, Hirata F, Tanimine N, Saeki Y, Shimizu S, Sakai H, Yano T, Tashiro H, Ohdan H. Bile CXC motif chemokine 10 levels correlate with anti-donor cytotoxic T cell responses after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2014; 46(3):790-793.

2. 学会発表

- 1) 大平真裕, 河岡友和, 矢野琢也, 谷峰直樹, 清水誠一, 石山宏平, 田中友加, 田代裕尊, 今村道夫, 茶山一彰, 大段秀樹. C型肝炎・肝細胞癌に対する肝移植症例の長期生存を目指した取り組み. 第50回日本移植学会総会. 2014.9.10-12. 東京.
- 2) 谷峰直樹, 田中友加, 朴金連, 安部智之, 石山宏平, 井手健太郎, 小林剛, 大平真裕, 田原裕之, 清水誠一, 佐伯吉弘, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝移植後HCV再感染における肝臓内NK細胞機能の解析. 第50回日本移植学会総会. 2014.9.10-12. 東京.
- 3) 田中友加, 谷峰直樹, 大段秀樹. HLAミスマッチ肝移植後のT細胞応答とHCV複製抑制効果. 第23回日本組織適合性学会大会. 2014.9.13-15. 長崎.

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

異なる遺伝子型のHCVの感染増殖に関わる宿主因子の解析

（宿主因子を標的とする新規薬剤の開発）

担当責任者：脇田隆宇 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長

研究要旨 異なる遺伝子型のHCVの感染増殖に関わる宿主因子を解析することにより、HCVに共通して必要な宿主因子機能を同定する。現在臨床で使用および開発中の抗HCV薬は主としてウイルスRNA複製過程を標的としている。そこで、HCVのライフサイクルに関わる宿主因子を標的とした抗ウイルス薬を開発することにより、よ

研究協力者氏名

渡士幸一 国立感染症研究所
ウイルス第二部主任研究官

ット化合物についてその作用機序を解析した。

（倫理面への配慮）

A. 研究目的

異なる遺伝子型のHCVの感染増殖に関わる宿主因子を解析することにより、HCVに共通して必要な宿主因子機能を同定する。現在臨床で使用および開発中の抗HCV薬は主としてウイルスRNA複製過程を標的としている。そこで、HCVのライフサイクルに関わる宿主因子を標的とした抗ウイルス薬を開発することにより、より効果的で、副作用の少ない治療法開発を目指す。

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。

B. 研究方法

J6/JFH1株の合成全長RNAをHuh7.5.1細胞にトランスフェクションし上清中のウイルスの感染性を阻害する化合物をスクリーニングした。作用機序が既知の約100種類の化合物を含むライブラリーを使用した。ヒット化合物をHCVレプリコン、HC Vppを用いてさらに選抜した。最終的なヒ

C. 研究結果

一次スクリーニングで17種類のヒット化合物が感染性HCV産生を阻害した。これ

らのヒット化合物をHCVppとHCVレプリコンにより二次スクリーニングした。その結果、HCVppの感染を阻害した化合物が1種類、HCVレプリコンの複製を阻害した化合物が4種類あった。残りの12種類の化合物は一次スクリーニングで感染性HCV産生を阻害したが、HCVppおよびHCVレプリコンを阻害しなかった。したがって、これらの化合物は初期感染過程およびRNAゲノムの翻訳、複製過程は阻害せず、ウイルス粒子形成または分泌過程を阻害することが推測された。12種類の化合物の中で、脂質代謝に関与する化合物Aに注目して解析をすすめた。化合物Aはドーパミン受容体の拮抗作用とPLD阻害活性を有する。そこで他の阻害剤により確認したところ、PLD阻害活性が感染性HCV産生阻害に重要であることが明らかとなった。PLD阻害剤はHCV粒子の分泌を阻害し、HCV感染の拡大を阻止することができた。

D. 考察

HCVのライフサイクル全体をアッセイできる実験系を用いて化合物をスクリーニングして、さらにHCVppやレプリコンなどの実験を駆使し、ウイルスの粒子形成、分泌過程を阻害する化合物を同定できた。このスクリーニング系を使用することにより、HCVのライフサイクルの様々な過程を標的とする化合物をスクリーニングでし、関係する宿主因子の同定につながることを期待できる。PLDは形質膜とゴルジ装置に存在しており、膜輸送やベジクル形成に関与することが知られている。今後はPLDによるHCV粒子の分泌過程への関与の分子機構を

解明していく。また、現在の抗HCV薬がほとんどウイルスゲノムの複製過程に対して作用する。そこで、それ以外の過程を標的とした抗HCV薬を開発することにより、より効果が高く、副作用の少ない治療法を開発につなげる。

E. 結論

- ・化合物スクリーニングにより感染性ウイルス粒子産生阻害活性のある化合物を同定した。
- ・PLDがウイルス粒子分泌に関与することを明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. J Gen Virol. 2014 Dec;95(Pt 12):2658-67. PubMed PMID: 25096815.
2. Kim S, Date T, Yokokawa H, Kono T, Aizaki H, Maurel P, Gondeau C, Wakita T. Development of hepatitis C virus genotype 3a cell culture system. Hepatology. 2014 Dec;60(6):1838-50. PubMed PMID:24797787.
3. Daito T, Watashi K, Sluder A, Ohashi H, Nakajima S, Borroto-Esoda K, Fujita T, Wakita T. Cyclophilin Inhibitors Reduce

Phosphorylation of RNA-dependent Protein Kinase to Restore Expression of IFN-stimulated Genes in HCV-infected Cells. Gastroenterology. 2014 Aug;147(2):463-72.

4. 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, Suzuki T. Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- α in Infectious Virus Production. J Virol. 2014 Jul;88(13):7541-55.

2. 学会発表

- 1) Wakita T. Cell culture models of hepatitis C virus. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 2) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Takemoto K, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Regulation of hepatitis C virus replication by liver X receptor is disrupted by a fungi-derived neoechinulin B. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 3) 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, Suzuki T. Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I- α in infectious virus production. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014

- 4) Wakita T, Kong L, Aizaki H. Regulation of viral lifecycle in hepatitis C virus infection. Dynamic interplay between viruses and their hosts, Yokohama, Nov, 2014
- 5) 青柳東代、相崎英樹、藤本陽、松本喜弘、松田麻未、Su Su Hmwe、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和氣健二郎、脇田隆字。グリチルリチンによる抗 HCV 作用 - phospholipase A2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス (HCV) 分泌過程に与える影響 -。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
- 6) 大橋啓史、渡士幸一、中嶋翔、金ソレイ、鈴木亮介、相崎英樹、紙透伸治、菅原二三男、脇田隆字。C 型肝炎ウイルス粒子の構築を阻害する flutamide の作用機序の解析。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
- 7) 脇田隆字、相崎英樹、渡士幸一。C 型肝炎ウイルス生活環全体を標的とした新規作用を有する抗ウイルス剤の

探索。第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月

- 8) 中嶋翔、渡士幸一、紙透伸治、竹本健二、Jesus Izaguirre-Carbonell、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆字。天然有機化合物 Neoechinulin B を利用した liver X receptor による C 型肝炎ウイルス産生制御機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 9) Lingbao Kong、青柳春代、松田麻未、藤本陽、渡士幸一、鈴木亮介、山越智、堂前直、鈴木健裕、鈴木哲朗、脇田隆字、相崎英樹。Prolactin regulatory element binding protein is involved in hepatitis C virus replication by interacting with NS4B. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

透析患者の C 型慢性肝疾患に対するダクラタスビル+アスナプレビル併用の薬物動態と有効性および安全性の検討－ Pilot Study －

（臓器不全合併症例に対する治療法の確立）

担当責任者 正木崇生 広島大学病院 腎臓内科 教授

川上由育 広島大学病院 消化器・代謝内科 講師

研究要旨：近年、インターフェロンとは異なる作用機序による抗ウイルス治療として DAAs(direct-acting antivirals)が開発され、DAA のみを併用した IFN free の治療法が主体となってきている。日本においては、海外に先駆けて IFN free となる経口 DAA 剤であるダクラタスビル+アスナプレビルが認可された。日本人での透析患者における検討はなされておらず、さらに両剤併用での薬物動態の検討は海外においても実施されていない。そこで今回透析患者の C 型慢性肝疾患患者を対象として、ダクラタスビル+アスナプレビル併用した場合の薬物動態と有効性および安全性を評価することとした。本研究は多施設共同研究として実施する。現在当院での倫理委員会の承認が得られ、他施設も審査中である。倫理委員会にて承認が得られた施設（4 施設）より随時試験を開始している。進捗状況としては、1 例実施、4 例予定されている。

A. 研究目的

透析患者の Genotype1 型かつ高ウイルス量の C 型慢性肝疾患に対しては、リバビリンが禁忌となっている（リバビリンは透析できないため血中濃度が上昇するため）ことから PEG-IFN 単独治療が主体である。しかしながら、Genotype1 型かつ高ウイルス量の C 型慢性肝疾患に対するウイルス排除（SVR）は PEG-IFN 単独では低率であることから治療を断念することが多かった。

近年、インターフェロンとは異なる作用機序による抗ウイルス治療として DAAs(direct-acting antivirals)が開発され、DAA のみを併用した IFN

free の治療法が主体となってきている。日本においては、海外に先駆けて IFN free となる経口 DAA 剤であるダクラタスビル+アスナプレビル認可された。ダクラタスビル+アスナプレビルは前治療歴なしの場合 SVR87.4%、前治療無効の場合でも SVR80.5%と有効性に優れ、主な副作用は鼻炎と肝酵素上昇で中止率は 6%と低率で非常に忍容性に優れている。両剤ともに肝代謝のため肝予備能低下例（肝硬変の child 分類 B と C）は禁忌であるが、腎障害については禁忌となっていない。また海外のデータではあるが透析患者における各薬剤の薬物動態の検討はなされており、ダクラタスビル

の AUC は正常腎機能患者に比べ 26.9% 高く、アスナプレビルの AUC は正常腎機能患者に比べ 10.1% 低いことがわかっている。しかしながら、日本人での透析患者における検討はなされておらず、さらに両剤併用での薬物動態の検討は海外においても実施されていない。そこで今回透析患者の C 型慢性肝疾患患者を対象として、ダクラタスビル+アスナプレビル併用した場合の薬物動態と有効性および安全性を評価することを研究目的とした。

B. 研究方法

中央登録方式による多施設共同、オープンラベル、単群、パイロット研究として実施。

登録方法は、

① ダクラタスビル+アスナプレビル併用療法開始前に、本研究の選択基準に合致しかつ除外基準のいずれにも抵触しない患者であるかを確認する。

② 本研究への参加について同意の有無を確認後 Fax にて登録を行う。

PK (Pharmacokinetics) : 治療開始 1 週時に実施。

PK は投与前、1、2、3、4、5or6 時間に測定する (6 ポイント、合計 30ml 採血)。

有効性としては早期の HCV ウイルス動態および SVR 率を、安全性としては有害事象や完遂率などを検討する。さらに PK と有効性 / 安全性の検討、正常腎機能患者と PK の比較を行う。

(倫理面への配慮)

透析患者における本治療の有効性および安全性が十分に確立されていないこと、1 週目の採血量および回数が増えること (ただし採血は 1 回 (5or6 時間) を除きその他のポイントにおいては透析ルートより行うため痛みは伴わない) が倫理的に問題となる。この点については、説明文書にて十分説明し参加の意思を確認する。また、本研究は『臨床研究に関する倫理指針』を遵守して実施するため主施設 (広島大学) において倫理審査を受け承認を得た後、参加施設においても倫理審査を受ける。試験は事前登録 (UMIN-CTR) 後より実施する。

C. 研究結果

現在当院での倫理委員会の承認が得られ、他施設も審査中である。倫理委員会にて承認が得られた施設 (4 施設 / 10 施設中) より随時試験を開始している。進捗状況としては、1 例実施、4 例予定。

D. 考察

試験途中。予想 (仮説) としてはダクラタスビル+アスナプレビルとも肝代謝なので透析患者でも正常腎機能患者と同様な効果が得られるのではないかと考える。

E. 結論

実施中の 1 例は 4 週以内にウイルス陰性化

し、有害事象もなく経過中である。倫理委員会にて承認が得られた施設より随時実施していく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kumada H, Chayama K, Kawakami Y, et al: Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection. Hepatology. 2014 Jun;59(6):2083-91.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

Kawakami Y, Chayama K, Kumada H, et al: Effect of demographic and baseline disease characteristics on the efficacy and safety of daclatasvir in combination with asunaprevir in Japanese patients with HCV genotype 1b infection. APASL. Brisbane 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

薬剤の効果に関連する宿主因子の検討

（宿主因子を標的とする新規薬剤の開発）

担当責任者 三木大樹 独立行政法人理化学研究所統合生命医科学研究センター
研究員

研究要旨

C型慢性肝炎に対する治療効果は、新規抗ウイルス薬の登場により劇的に改善されつつあるが、多剤耐性ウイルスの存在によって完治に至らない難治例がある。また、同様に治療困難な症例として、非代償性肝硬変、肝移植後、腎不全、透析中、腎移植後など臓器不全を合併した症例があげられ、今後はこれらへ個別に最適化された対応が求められる。

本研究では、耐性ウイルス出現の可能性の少ない宿主因子をターゲットとした治療薬の開発を目指して、HCVの感染増殖に必須な宿主因子を探索する。また、種々の治療困難症例において安全かつ効果的な治療を遂行できるよう、それらに関連する宿主因子も探索を行う。

種々の治療困難症例を含む大規模なC型慢性肝炎集団について、ゲノムワイドなSNPジェノタイピングを実施した。得られたデータについては、すでにQuality controlを終えており、複数の関連解析を進めている。同時に、ウイルス変異についても検討しており、ヒトゲノムとの相互関係について解析を進めている。

A. 研究目的

C型肝炎の治療はIFN/RBV併用のテラプレビル、シメプレビル、バニプレビル、経口剤のみ投与のアスナプレビル+ダクタスビル併用療法の認可により格段に改善されることが予測されるものの、多剤耐性ウイルスの存在により、これら全ての治療薬を使用しても完治に至らない難治例がある。また、同様に治療困難な症例として、非代償性肝硬変、肝移植後、腎不全、透析中、腎移植後など臓器不全

を合併した症例があげられ、これらへの対策が今後より一層重要性を増している。

本研究では、耐性ウイルス出現の可能性の少ない宿主因子をターゲットとした治療薬の開発を目指して、HCVの感染増殖・慢性感染状態の維持に関連する宿主因子を探索する。また、種々の治療困難症例において安全かつ効果的な治療を遂行できるよう、それらに関連する宿主因子も探索を行う。

例えば、ゲノタイプ1型・高ウイルス

量症例に対する IFN 併用治療時に有用であった *IL28B* 遺伝子多型や HCV コア 70 番のアミノ酸変異などと同様に、臓器不全を含めた治療困難例や新規治療法施行症例に最適化されたマーカーとして複数の宿主およびウイルスの遺伝子多型情報を利用できるようになれば、治療方針の決定に役立つ予測モデルを構築できる可能性が見込まれる。個々人の遺伝子多型情報を含めて最適化された予測モデルを用いて、より効果が高く、より副作用発現の可能性が低い治療方針を選択することができるようになれば、発現した副作用への対応等も含め、本来必要の無い余分な治療を減らすことができる。

B. 研究方法

本研究が主な目的とするところの宿主因子の探索においては、これまでも分担者らが実績のある、網羅的ヒトゲノム解析を行う。具体的には、ヒトゲノム全体を網羅するように配置された Illumina 社製の BeadChip という DNA チップを用いて、一度に一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) の遺伝子型を決定 (genotyping) する。そこから得られた膨大なデータに対して、Quality control を行い、信頼性の高い、解析に耐えうるデータのみを抽出する。その後、解析目的とする表現型について、統計学的手法を用いた関連解析を行う。得られた結果については、独立した患者集団を用いて PCR-based Invader アッセイにより、再現性を確認する。また、ヒトゲノムのみならず、ウイルスゲノムについても耐性変異を中心にゲノム多

様性の評価を行い、宿主における表現型との関連やヒトゲノム多様性との相互関係についても、検討を行う。なお、解析にあたっては正確かつハイスループットな測定系の開発にも努めると同時に、今後得られるであろう有用なヒトおよびウイルスのゲノム情報については臨床現場での測定を視野に簡易化も進める。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて、インフォームド・コンセントが得られた検体を用いて実施した。所属研究機関の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

約 2000 例の C 型慢性肝炎症例について、以前よりも高密度のゲノムワイド SNP タイピングを実施した。タイピングデータの Quality control を終え、SNP 数は 95 万から 62 万に絞り込まれた。

慢性感染、また、IFN 併用から IFN フリーのレジメンまで含めた治療症例においては、臓器不全合併症例を含む難治例に絞った治療効果、あるいは治療不応をもたらすウイルスの薬剤耐性 (ウイルスゲノムと宿主ゲノムの相互作用)、治療不耐をもたらす各種副作用、などに関連する宿主の遺伝的要因について、現在、解析中である。

D. 考察

ゲノムワイド関連解析の手法を用いて、新たに検出されてきた種々の phenotype

(治療効果、副作用、ウイルスの薬剤耐性変異など)に関連する宿主の遺伝的要因については、その妥当性を検証するために、独立したコホートを用いた再現性の確認実験を行う予定である。

また、関連解析においては、単一の SNP と phenotype との関連解析にとどまらず、複数の SNP あるいは宿主とウイルス側の遺伝子多型・変異などによってもたらされる phenotype への影響についても、解析手法を拡張する必要があると考えられる。さらに、遺伝子多型と、当該遺伝子を含む遺伝子パスウェイやネットワーク上の遺伝子の発現量との関わりについても、マイクロアレイやPCR、*in silico*解析などを検討したい。

E. 結論

種々の治療困難症例を含む大規模なC型慢性肝炎集団について、ゲノムワイドなSNPジェノタイピングを実施した。得られたデータについては、すでにQuality controlを終えており、複数の関連解析を進めている。同時に、ウイルス変異についても検討しており、ヒトゲノムとの相互関係について解析を進めている。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanimine N, Tanaka Y, Kobayashi T, Tashiro H, Miki D, Imamura M, Aikata H, Tanaka J, Chayama K, Ohdan H. Quantitative Effect of Natural Killer-Cell Licensing on Hepatocellular Carcinoma Recurrence

after Curative Hepatectomy. *Cancer Immunol Res. in press.*

2) Kosaka K, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Yoshimi S, Murakami E, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Chayama K. Emergence of resistant variants detected by ultra-deep sequencing after asunaprevir and daclatasvir combination therapy in patients infected with hepatitis C virus genotype 1. *J Viral Hepat. in press.*

3) Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Chayama K; Hiroshima Liver Study Group. Ribavirin dose reduction during telaprevir/ribavirin/peg-interferon therapy overcomes the effect of the ITPA gene polymorphism. *J Viral Hepat. in press.*

4) Ochi H, Miki D, Hayes CN, Abe H, Hayashida Y, Kubo M, Chayama K. IFNL4/IL-28B haplotype structure and its impact on susceptibility to hepatitis C virus and treatment response in the Japanese population. *J Gen Virol. 95(Pt 6):1297-306. 2014.*

5) Murakami E, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Honda Y, Ono A, Kosaka K, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Chayama K. Ultradeep sequencing study of chronic hepatitis

C virus genotype 1 infection in patients treated with daclatasvir, peginterferon, and ribavirin.

Antimicrob Agents Chemother.

58(4):2105-12. 2014.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1) D. Miki, H. Ochi, A. Takahashi, C. Hayes, Y. Urabe, H. Abe, A. Ono, S. Akamatsu, T. Nakahara, N. Seki, E. Murakami, Y. Zhang, T. Uchida, Y. Honda, S. Yoshimi, T. Kobayashi, K. Masaki, H. Kan, T. Kawaoka, M. Tsuge, N. Hiraga, M. Imamura, Y. Kawakami, H. Aikata, S. Takahashi, N. Akuta, F. Suzuki, K. Ikeda, H. Kumada, Y. Karino, J. Toyota, T. Tsunoda, M. Kubo, N. Kamatani, Y. Nakamura, K. Chayama. A single amino acid substitution in HLA-DQB1 as well as an IFNL4 variant strongly affect susceptibility to chronic hepatitis C. *The Liver Meeting 2014*. Boston, USA. 2014/11/11

2) D. Miki, H. Abe, C. Hayes, H. Ochi, T. Kawaoka, S. Akamatsu, A. Ono, T. Nakahara, N. Seki, E. Murakami, Y. Zhang, T. Uchida, Y. Honda, K. Masaki, H. Kan, M. Tsuge, N. Hiraga, M. Imamura, Y. Kawakami, H. Aikata, M. Kubo, K. Chayama. The IL28B SNP has a stronger regulatory effect on the expression of OAS1 than a nearby SNP located downstream of OAS1 in chronic HCV patients. *The Liver Meeting 2014*. Boston, USA. 2014/11/11

3) D. Miki, H. Ochi, C. Hayes, H. Abe, T.

Kawaoka, A. Ono, S. Akamatsu, T. Nakahara, N. Seki, E. Murakami, Y. Zhang, T. Uchida, Y. Honda, K. Masaki, H. Kan, M. Tsuge, N. Hiraga, M. Imamura, Y. Kawakami, H.

Aikata, M. Kubo, K. Chayama. Two microRNA polymorphisms are associated with hepatitis B virus-related but not hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in the Japanese population. *The Liver Meeting 2014*. Boston, USA. 2014/11/9

4) D. Miki, H. Ochi, C. Hayes, A. Ono, S. Akamatsu, Y. Urabe, K. Masaki, H. Abe, T. Kawaoka, T. Nakahara, N. Seki, E. Murakami, Y. Zhang, T. Uchida, Y. Honda, H. Kan, M. Tsuge, N. Hiraga, M. Imamura, Y. Kawakami, H. Aikata, M. Kubo, K. Chayama. Germline variants of highly point-mutated genes in hepatocellular carcinoma do not have strong effects on HCV-related hepatocarcinogenesis. *The Liver Meeting 2014*. Boston, USA. 2014/11/9

5) H. Ochi, D. Miki, C. Hayes, H. Abe, M. Kubo, K. Chayama. IFNL4/IL-28B haplotype structure and predictability of their variations for spontaneous and treatment-induced clearance of HCV infection in the Japanese population. *The Liver Meeting 2014*. Boston, USA. 2014/11/9

6) M. Tsuge, N. Hiraga, E. Murakami, M. Imamura, H. Abe, D. Miki, H. Ochi, C. Hayes, K. Chayama. Nucleotide analogue improves interferon responsiveness in

HBV-infected human hepatocytes. *The Liver Meeting 2014*. Boston, USA.

2014/11/11

7) H. Abe, C. Hayes, N. Hiraga, M. Imamura, M. Tsuge, D. Miki, H. Aikata, H. Ochi, Y. Ishida, C. Tateno, K. Yoshizato, K. Chayama. Pretreatment induction of ISGs in the presence of IFNL4 in hepatocytes but not in white blood cells is related with poor induction of ISGs following IFN- α therapy. *The Liver Meeting 2014*. Boston, USA. 2014/11/11

8) C. Hayes, H. Abe, S. Akamatsu, N. Hiraga, M. Imamura, M. Tsuge, D. Miki, H. Aikata, H. Ochi, Y. Ishida, C. Tateno, K. Chayama. Hepatitis B virus infection efficiency and immune response decreases with cell density in primary cultured hepatocytes. *The Liver Meeting 2014*. Boston, USA. 2014/11/11

9) 三木大樹、相方浩、大野敦司、ト部祐司、柘植雅貴、川上由育、久保充明、中村祐輔、茶山一彰。わが国における miR-146a および miR-196a2 の遺伝子多型と肝炎ウイルス関連肝発癌リスク。第 73 回日本癌学会学術総会。横浜。2014/9/26

10) 三木大樹、越智秀典、ヘイズ・ネルソン、阿部弘美、大野敦司、中原隆志、村上英介、河岡友和、柘植雅貴、平賀伸彦、今村道雄、川上由育、相方浩、高橋祥一、茶山一彰。HCV 慢性化における HLA-DQB1 の重要性:ゲノムワイド

関連解析。第 50 回日本肝臓学会総会。東京。2014/5/30

11) 阿部弘美、三木大樹、平賀伸彦、今村道雄、柘植雅貴、小林知樹、河岡友和、川上由育、相方浩、越智秀典、茶山一彰。HCV 感染における IFNL4 の多型の違いによる IFN- λ s の発現量とインターフェロン投与前後のインターフェロン誘導遺伝子の発現量の関係。第 50 回日本肝臓学会総会。東京。2014/5/30

12) 狩野吉康、山口将功、木村睦海、荒川智宏、中島知明、桑田靖昭、小関至、佐藤隆啓、大村卓味、髭修平、豊田成司、三木大樹、越智秀典、茶山一彰。HCV 関連肝疾患における IFNL3 (IL28B)、IFNL4 遺伝子型乖離例の頻度と抗ウイルス療法の効果の検討。第 50 回日本肝臓学会総会。東京。2014/5/30

13) 村上英介、柘植雅貴、藤野初枝、菅宏美、福原崇之、小林知樹、本田洋士、中原隆志、苗代典昭、大野敦司、宮木大輔、三木大樹、河岡友和、平賀伸彦、平松憲、今村道雄、兵庫秀幸、川上由育、相方浩、茶山一彰。当院における HBs 抗原陰性化例の解析。第 50 回日本肝臓学会総会。東京。2014/5/29

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

薬剤耐性のウイルスに対する既存の薬剤による有効な治療法の開発

研究分担者 平賀 伸彦 広島大学病院消化器・代謝内科 特任助教

研究要旨 DAA に対する薬剤耐性ウイルスの混在比による DAA の治療効果を検討した。薬剤耐性ウイルスの存在する C 型慢性肝炎患者の血清を 4 匹のヒト肝細胞キメラマウスに感染させ、ダクラタスビルとアスナプレビルの併用投与を 4 週間行った。4 匹中 2 匹は中止後 4 週以内にウイルス再燃を認めたが、残り 2 匹は中止後 9 週まで血中のウイルスは陰性化を持続し肝臓内の HCV RNA を検出せずウイルス排除を達成した。DAA 投与前の薬剤耐性ウイルスの混在比を次世代シーケンサーにて解析したところ、ウイルス陰性化を達成した薬剤耐性ウイルスの割合は 10%以下であった。これ

A. 研究目的

近年C型肝炎の治療としてウイルス蛋白を直接阻害するDirect acting antivirals (DAAs) を組み合わせたIFNフリーの治療によってウイルス排除が可能となった。一方IFNフリーの治療では、DAAに対する薬剤耐性変異の存在がDAAsの治療効果を予測する因子となることが報告された。最近、遺伝子工学の発展に伴い微量な薬剤耐性ウイルスも検出可能となり薬剤耐性ウイルスの混在比を検討することが可能となった。薬剤耐性ウイルスの混在比によるDAAの抗ウイルス効果を検討するため、薬剤耐性ウイルスの割合が異なるHCV感染マウスを作製しDAA投与を行った。

B. 研究方法

HCVのNS3領域に薬剤耐性ウイルスD168Vが検出される血清を4匹のヒト肝細胞キメラマウスへ接種し、HCV感染マウスを作製した。HCV感染のマウス血中HCV RNA

がプラトーに達した後、ダクラタスビル (NS5A阻害剤) とアスナプレビル (NS3阻害剤) を併用投与し、抗ウイルス効果について検討した。薬剤耐性ウイルスの混在比については、次世代シーケンサー (Ion Torrent) を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

過去に保存された血清を用いる為、対象者に対して予測される身体的な危険・不利益はないと考えられる。個人情報が出ることがないように十分配慮する。

C. 研究結果

薬剤耐性ウイルスが感染したマウスに対し、ダクラタスビルとアスナプレビルの併用投与を4週間行った。投与開始1週間後には $2.8 \pm 0.5 \log \text{ IU/mL}$ のウイルス量の減少を認め、薬剤投与中にHCVの再燃は認めず、投与終了直前にはHCV陰性化した。薬剤投与終了4週間以内に4匹中2匹でマウス血中

にHCV RNAが定量可能となったが、残り2匹では中止後9週目までウイルス陰性化を継続した。ウイルス陰性化を継続した肝臓内のHCV RNAも陰性化していたためウイルス排除と考えられた。薬剤投与直前の薬剤耐性ウイルスの混在比について次世代シーケンサーを用いて検討したところ、NS3領域の薬剤耐性ウイルスD168Vの割合は2～90%であった。薬剤耐性ウイルスD168Vの割合が10%以下の場合には併用投与によりウイルス陰性化を達成していた。

D. 考察

NS3 D168V薬剤耐性ウイルスに対して、NS5A阻害剤とNS3阻害剤の併用投与によって投与中はウイルス陰性化を達成し、薬剤耐性ウイルスが10%以下の場合にウイルス排除を達成したが、それ以上の場合にはウイルスが再燃した。

E. 結論

薬剤耐性ウイルスの混在比がDAAの抗ウイルス効果に影響を与える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Murakami E, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Honda Y, Ono A, Kosaka K, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Chayama K. Ultradeep sequencing study of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection in patients treated with daclatasvir, peginterferon, and ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2105-12.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

なし

Ⅲ. 学会等発表業績