

抗ウイルス性サイトカインを利用した新規治療法の開発

担当責任者 株式会社フェニックスバイオ 立野（向谷）知世 取締役研究開発部長

研究要旨

HCV 感染に対する宿主因子の影響を検討する為、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスからヒト肝細胞を分離し、コラーゲンコートプレート上で平面培養を行った。まず genotype 1a に感染したヒト肝細胞を用いて検討したところ、細胞の播種密度が高い方が上清中の HCV RNA 量を高く維持出来る事が明らかとなった。また、PEG-IFN で処理すると明らかな HCV RNA 量の低下を認めたことから、培養 12 日目の上清中には *in vitro* で新規に合成された HCV RNA が放出されている事が示唆された。次に genotype 3a に感染したヒト肝細胞を培養し、上清中と細胞内の HCV RNA 量の検討を行ったところ、細胞内の HCV RNA 量の低下に伴って上清中の HCV RNA 量が低下する事が示された。今回の結果から、生体内で HCV に感染したヒト肝細胞であれば、一定期間は培養下でも HCV を複製し上清中に放出可能である事が示された。

共同研究者氏名

石田雄二 (株)フェニックスバイオ
山崎ちひろ(株)フェニックスバイオ
柳 愛美 (株)フェニックスバイオ
吉実康美 (株)フェニックスバイオ

測定した。13 週齢以降に、7 mg/mL 以上のヒトアルブミン濃度を示した個体に対して、HCV genotype 1a, 3a を接種した(10^4 copies/匹)。接種後 4 週目と 5 週目に採血を行い、以下に示す方法で血中の HCV 量を定量し、感染が成立している事を確認した。

A. 研究目的

これまでヒト新鮮肝細胞を用いた *in vitro* HCV 感染系は存在しない。その原因は、HCV 感染による宿主因子の誘導が考えられている。そこで今回我々は、HCV 感染キメラマウスから分離したヒト肝細胞の *in vitro* 培養系を用いて、培養条件の HCV 感染に対する影響を調べた。

コラゲナーゼ灌流によるヒト肝細胞の分離
HCV 感染が確認されたキメラマウスから、山崎ら（2010年）の方法に従ってコラゲナーゼ灌流を行い、ヒト肝細胞を分離した。平均すると、キメラマウス1匹から約 1.5×10^8 個の細胞が分離された。分離された細胞のうち、ヒト肝細胞の割合は 90-95% 程度で、生存率は 80% 以上であった。

B. 研究方法

HCV 感染キメラマウスの作製

既報の論文（立野ら 2004 年）に従って、以下のようにキメラマウスを作製した。3 週令の albumin enhancer/promoter-urokinase cDNA-plasminogen activator-transgenic/SCID (cDNA-uPA/SCID) マウスに対して、脾臓経由で市販の凍結ヒト肝細胞（Hispanic、2 歳、女兒、BD）を 1 匹あたり 1.25×10^5 個移植した。移植後 3 週目と 8 週目、およびそれ以降は週 1 回の割合で尾静脈から採血を行い、ラテックス凝集免疫比濁法（LZ テスト‘栄研’ U-ALB、栄研化学）にて生化学自動分析装置（JCA-BM6050、日本電子）を用いて血中のヒトアルブミン濃度を

HCV 感染ヒト肝細胞の培養

HCV 感染ヒト肝細胞を文献（山崎ら 2006、石田ら 2015 *in press*）に従って培養した。培養には Biocoat 24-well plate（コーニングインターナショナル）を使用し、細胞の播種密度は $0.5-4 \times 10^5$ 個/well とした。播種 2 日目以降は 5 日毎に培地交換を行い、必要に応じて HCV RNA 定量用に培養上清を回収した。また一部の細胞に対しては、Pegylated Interferon- α 2a（PEG-IFN、[Pegasys] 中外製薬）を 9 μ g/mL で培養開始時から持続的に暴露し、HCV RNA 量への影響を評価した。

HCV RNA 量の定量

SepaGene RV-R RNA extraction system (三共純薬)を用いて 5 μ L の血清もしくは 30 μ L の培養上清から RNA を抽出し、30 μ L の DW に溶解した。5 μ L の RNA 溶液と、以下のプライマー、プローブを用いてリアルタイム PCR 法(TaqMan EZ RT-PCR Core Reagent, ABI Prism 7500 sequence detector system、ライフテクノロジーズ)で HCV RNA 量の定量を行った。

Forward primer (nucleotides 130-146),
5' -CGGGAGAGCCATAGTGG-3'

Reverse primer (nucleotides 290-272),
5' -AGTACCACAAGGCTTTTCG-3'

TaqMan probe (nucleotides 148-168),
5' -CTGCGGAACCGGTGAGTACAC-3' (Dye: FAM for 5', TAMRA for 3')

PCR条件は以下の通り。

50 2 min, 60 30 min, 95 5 min \times 1 サイクル

95 20 sec, 62 1 min \times 50 サイクル

HCV感染細胞からのRNA回収には、TRIZOL (ライフテクノロジーズ)を使用した。回収されたRNAを用いて、上記の方法でHCV RNA量の定量を行った。

(倫理面への配慮)

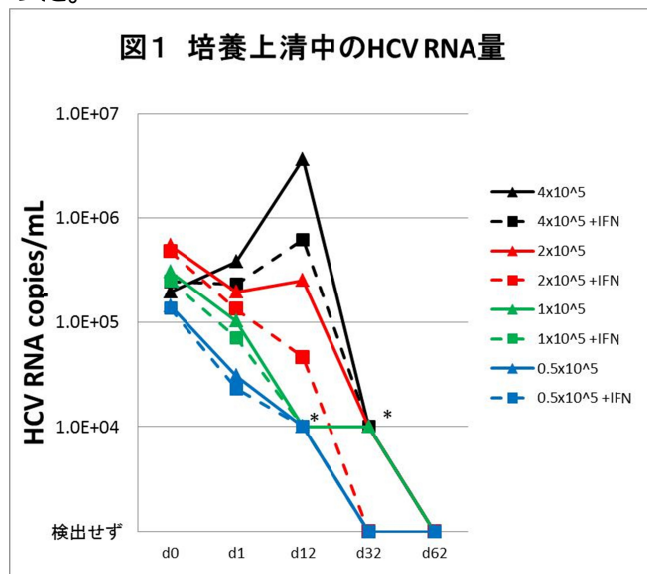
ヒト肝細胞キメラマウスの作製に使用した凍結ヒト肝細胞は、適切なインフォームドコンセントの元で採取されており、市販されているものである。その使用にあたっては、株式会社フェニックスバイオのヒト組織利用に関する倫理委員会の承認を得た。また本実験に関わる動物実験についても、株式会社フェニックスバイオの動物実験倫理委員会の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

先ずHCV genotype 1aが感染したキメラマウスから回収されたヒト肝細胞を、コラーゲンコートプレートに0.5, 1, 2, 4 $\times 10^5$ 個/wellで播種し、PEG-IFN存在下と非存在下でそれぞれ平面培養を行った。培養期間を通じて、HCV感染肝細胞は非感染細胞に比べて顕著な形態変化や生存率の変化等は観察されなかった。培養上清中のHCV RNA量の定量結果を図1に示した。

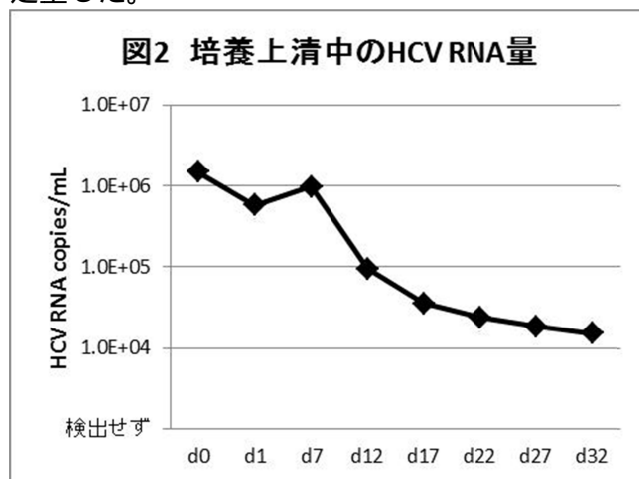
4 $\times 10^5$ 個/wellで播種した場合は、d0, d1に比べてd12で明らかなHCV RNA量の上昇が確認された。また同じd12で比較した場合、PEG-IFN添加によってHCV RNA量が1/5に低下したことから、少なくともd12まではHCV RNAの複製と培養上清への放出が起きているものと推測された。2 $\times 10^5$ 個/wellで播種すると、d12でのHCV RNA量は4 $\times 10^5$ 個/wellで播

種した場合の1/10以下となったが、それでもPEG-IFN添加により更なるHCV RNAの低下が確認された。0.5 $\times 10^5$ 個/wellと1 $\times 10^5$ 個/wellでそれぞれ播種した場合は、d12では定量下限以下のHCV RNA量しか検出されなかった。以上の事から、感染細胞の播種密度が高いほど、上清中のHCV RNA量が長く維持出来る事が判明した。しかしながら、d32以降はいずれの条件でもHCV RNA量は定量下限以下となった。

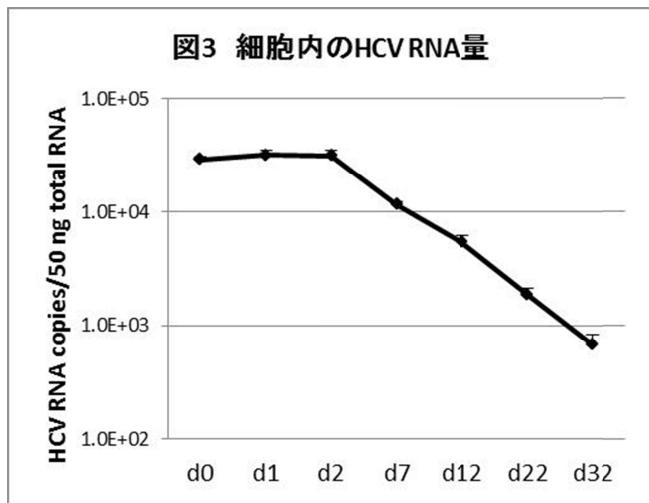


HCV genotype 1a感染キメラマウスから分離したヒト肝細胞培養上清中のHCV RNA量。横軸は上清を回収した培養日数(播種日をd-1とする)で、縦軸は上清中のHCV RNA量。実線がPEG-IFN非存在下で、点線がPEG-IFN存在下(9 μ g/mL)を示す。定量下限は1 $\times 10^4$ copies/mLで、*は定量下限以下を示す。(n=1)

次に、HCV genotype 3aを感染させたキメラマウスからヒト肝細胞を分離し、4 $\times 10^5$ 個/wellで播種し、培養上清中(図2)と細胞内(図3)のHCV RNA量を定量した。



HCV genotype 3a感染キメラマウスから分離したヒト肝細胞培養上清中のHCV RNA量。播種細胞数は、4 $\times 10^5$ 個/well。(n=1)



HCV genotype 3a感染キメラマウスから分離したヒト肝細胞中のHCV RNA量。条件は図2と同じ。バーは標準偏差。(n=3)

上清のHCV RNA量については、d7までは大きな変化は無く、その後は徐々に低下したがd32の時点でも 1×10^4 copies/mL以上を維持していた。細胞内のHCV RNA量については、d7の時点から低下する傾向が確認された。培養上清・細胞内HCV RNA量共に、培養開始直後と終了時点で比べるとおよそ2けた程度の低下が認められ、上清の値と良く相関している事が示された。

D. 考察

HCV genotype 1aの感染キメラマウスを用いた実験では、播種細胞数が多いほどより効率よくHCVを複製し細胞上清に放出している事が示された。これまでの実験から、肝細胞は高密度で培養した方が肝機能を高く維持出来る事が知られている。今回のHCV感染細胞においても、高密度で培養する事で肝機能が保たれ、HCV RNAの複製・放出が維持されたと考えられる。

今回の実験では、元々HCVに感染した動物から肝細胞を採取している事から、生体内で産生されたHCV RNAが細胞培養系に持ち越されていると考えられる。しかしながら、PEG-IFNにより、明らかなHCV RNA量の低下が認められたことから、genotype 1aに関しては少なくともd12の時点までは新たなHCV RNAの合成と上清中への放出が起きていると考えられた。

Genotype 1a・3aとも、d32にかけてHCV RNA量の低下が認められた。HCV genotype 3aの結果から、培養上清中のHCV RNA量と細胞内のHCV RNA量は概ね相関していたことから、上清中のHCV RNA量の低下は、細胞におけるHCV RNA複製能の低下に起因すると考えられる。今回のように培養期間が長くなるとHCV RNAの複製能が低下する理由是不明であるが、初代ヒト肝細胞に対して*in vitro*でHCVを感

染させると、IFNの産生が誘導される事が既に知られており、初代ヒト肝細胞ではHCVの持続感染が成立しない要因の一つと考えられている。今回の実験においても、HCV感染細胞をキメラマウスから取り出して培養することで形質が変化し、*in vivo*では誘導されないIFN産生が起きている可能性が考えられる。

今回の実験では2つのgenotypeを用いたが、それぞれのgenotypeで、*in vitro*でのウイルス量の推移が異なる点は興味深い。我々のデータでは、キメラマウス血中のHCV RNA量を比較すると、genotype 1aと3aは同等であるにも関わらず(data not shown)、d0の培養上清に放出されていたウイルス量に関しては、genotype 3aの方が明らかに高い値を示した。また、1aではd7からd12にかけて明らかなHCV RNA量の増加が見られたのに対して、3aではそのような変化は認められなかった。今回の実験では同じドナー由来のヒト肝細胞を移植している事から、これら違いは、明らかに感染源の違いに起因するものである。

E. 結論

キメラマウスから分離したHCV感染ヒト細胞を高密度(24 wellプレートの場合、 4×10^5 細胞/well)で培養する事で、*in vitro*でもHCV RNAの複製及び上清中への放出が確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H.: Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene. *Cell Transplant.* (in press)
- 2) Tateno C, Yamamoto T, Utoh R, Yamasaki C, Ishida Y, Myoken Y, Oofusa K, Okada M, Tsutsui N, Yoshizato K.: Chimeric mice with hepatocyte-humanized liver as an appropriate model to study human peroxisome proliferator-activated receptor- *Toxicol Pathol.* (in press)
- 3) Ohtsuki S, Kawakami H, Inoue T, Nakamura K, Tateno C, Katsukura Y, Obuchi W, Uchida Y, Kamiie J, Horie T, Terasaki T.:

Validation of uPA/SCID mouse with humanized liver as a human liver model: protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases by LC-MS/MS. *Drug Metab Dispos.*, 2014; 41: 1039-1043.

- 4) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C: Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. *Am J Path.* (in press)
- 5) Sanoh S, Naritomi Y, Fujimoto M, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S: Predictability of plasma concentration-time curves in humans using single-species allometric scaling of chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica* (in press)
- 6) Yamazaki H, Kuribayashi S, Inoue T, Honda T, Tateno C, Oofusa K, Ninomiya S, Ikeda T, Izumi T, Horie T: Zone analysis by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry of in vivo protein bindings of idiosyncratic hepatotoxicants troglitazone and flutamide bioactivated in chimeric mice with humanized liver. *Toxicology Research* (in press)

2. 学会発表

- 1) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Watashi K, Abe H, Wakita T, Chayama K, Tateno C: Hepatitis B Virus Spread in Primary-cultured Human Hepatocytes Isolated from Chimeric Mice with Humanized Liver. 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop (2014.4, Taipei, Taiwan)
- 2) 石田雄二 山崎ちひろ 吉実康美 柳愛美 山尾美香留 阿部弘美 茶山一彰 立野知世: キメラマウスから分離した初代培養ヒト肝細胞におけるHBVの水平感染. 第50回日本肝臓学会 (2014.5, 東京)
- 3) Ishida Y, Yamasaki C, Yoshizane Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Tateno C: In vitro evaluation of fresh human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice®). 第87回組織培養学会 (2014.5, 東京)
- 4) 立野 知世: ヒト肝細胞キメラマウスの改良と応用. 第21回肝細胞研究会 (2014.6, 東京)
- 5) 石田雄二、山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美 田中靖人、立野知世: ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞を用いたHBV genotypeの性状比較. 第21回肝細胞研究会 (2014.6, 東京)
- 6) 山崎ちひろ、岩成宏子、島田卓、木村達治、岩崎由美子、加国雅和、石田雄二、立野知世: ヒトALT-1特異的ELISAを用いたヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト肝毒性の検出. 第21回肝細胞研究会 (2014.6, 東京)
- 7) 柳愛美、山崎ちひろ、吉実康美、石田雄二、立野知世: ヒト肝細胞キメラマウス肝臓におけるヒトEpCAMの発現. 第21回肝細胞研究会 (2014.6, 東京)
- 8) 石田雄二 山崎ちひろ 吉実康美 柳愛美 山尾美香留 阿部弘美 茶山一彰 立野知世: ヒト肝細胞キメラマウス由来の新鮮培養ヒト肝細胞におけるHBVの水平感染第10回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム (2014.7, 広島)
- 9) Yanagi A, Yamasaki C, Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C: Characterization and proliferation assessment of hCK19- and hEpCAM-positive cells in bile duct-ligated chimeric mice with humanized livers. 2014 FASEB Summer Research Conference (2014.7, Keystone, CO)

- 10) 内田 宅郎, 平賀 伸彦, 今村 道雄, 柘植 雅貴, 阿部 弘美, 相方 浩, 石田 雄二, 立野 知世, 茶山 一彰: cDNA-uPA/SCID マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスの作製および肝炎ウイルス感染. 第 18 回日本肝臓学会大会 (2014.10, 神戸)
- 11) 平賀伸彦, 今村道雄, 内田宅郎, 柘植雅貴, 阿部弘美, 相方 浩, 石田雄二, 立野知世, 茶山一彰: 超免疫不全 TK-NOG マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウス. 第 18 回日本肝臓学会大会 (2014.10, 神戸)
- 12) Nelson CN, Abe H, Akamatsu S, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K: Hepatitis B virus infection efficiency and immune response decrease with cell density in primary cultured hepatocytes. 65TH AASLD (2014.11, Boston)
- 13) Uchida T, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Murakami K, Chayama K: A novel humanized cDNA-iPA/SCID mouse for the study of HBV and HCV infections. 65TH AASLD (2014.11, Boston)
- 14) Hiraga N, Imamura M, Uchida T, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K: A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infection. 65TH AASLD (2014.11, Boston)
- 15) DebRoy S, Hiraga N, Imamura M, Canini L, Pohl RT, Persiani S, Uprichard SL, Perelson AS, Tateno C, Chayama K, Dahari H: HCV kinetics in uPA-SCID chimeric mice with humanized livers during intravenous silibinin monotherapy. 65TH AASLD (2014.11, Boston)
- 16) Ishida Y, Chung TL, Imamura M, Hiraga N, Canini L, Uprichard SL, Perelson AS, Tateno C, Dahari H, Chayama K: HBV infection in humanized chimeric mice has multiphasic viral kinetics from inoculation to steady state and an HBV half-life of 1 hr. 65TH AASLD (2014.11, Boston)
- 17) Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Ishida Y, Tateno C: In vitro evaluation of human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice[®]) transplanted using cells from three different donors. 19th North American ISSX Meeting/29th JSSX Meeting (2014. 10, San Francisco, CA)
- 18) 土居 茜, 佐能 正剛, 山崎ちひろ, 石田雄二, 加国雅和, 立野知世, 太田茂: ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた CYP2D6 基質のヒト体内動態予測. 第 53 回日本薬学会中国四国支部学術大会 (2014.11, 広島)
- 19) Tateno C: Development of novel chimeric mice with humanized livers and infected with HBV as hosts. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B-Recent progress in basic and clinical research (2014.11, Hiroshima)
- 20) 山崎ちひろ, 吉実康美, 柳愛美, 景山豊, 岩崎由美子, 石田雄二, 立野知世: ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞 "PXB-cellss" の性状解析. 細胞アッセイ研究会シンポジウム (2015.1, 東京)
- 21) 立野知世: ヒト肝細胞を担持するキメラ非ヒト動物. 第 8 回ラットリソースリサーチ研究会 (2015.1, 京都)
- 22) 高橋美和, 立野知世, 石田雄二, 井上薫, 吉田緑: ヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス) における卵胞発育不全. 第 31 回日本毒性病理学会 (2015.1, 東京)

H. 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。

3. その他

特記事項無し

厚生労働科学研究委託費（肝炎等克服実用化研究事業 肝炎等克服緊急対策研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

ビタミンA誘導体によるC型肝炎ウイルス感染制御

（抗ウイルス性サイトカインを利用した新規治療法の開発）

島上哲朗 金沢大学附属病院消化器内科 助教

研究要旨：現在C型肝炎の治療は、インターフェロン製剤を中心とした治療法から、C型肝炎ウイルス（以下HCV）の複製を直接抑制するDirect Acting Antivirals（DAA）に移行しつつある。DAAの使用により、インターフェロン製剤を使用した治療法に比べて副作用が少なく、また高い抗ウイルス効果を得ることが可能となった。しかしながらDAA製剤の問題点として、DAA耐性ウイルスの出現・選択により治療不成功例となり、多剤耐性ウイルスが残存しうること、またその高額な薬価があげられる。今回、新規抗ウイルス薬としてビタミンA誘導体に注目してHCV培養細胞系を用いてその抗ウイルス効果を解析した。その結果以下のことが明らかとなった。1)複数のビタミンA誘導体は、Gt1a、Gt1b、Gt2aいずれのGenotypeのHCVに対してもHCV複製抑制効果を認めた。2)ビタミンA誘導体の中でも、肝癌のchemopreventionの有用性が報告されているPeretinoin（NIK333）によるHCV複製抑制効果が最も強力であった。3)PeretinoinによるHCV複製抑制効果は、時間依存性かつ用量依存性であった。4)PeretinoinはウイルスのRNA複製のみでなく、感染性粒子産生能も抑制した。来年度以降Peretinoinの抗ウイルス作用機序の解明を行う。

A. 研究目的

現在C型肝炎の治療は、インターフェロン製剤を中心とした治療法から、C型肝炎ウイルス（以下HCV）の複製を直接抑制するDirect Acting Antivirals（DAA）に移行しつつある。DAAの使用により、インターフェロン製剤を使用した治療法に比べて副作用が少なく、また高い抗ウイルス効果を得ることが可能となった。しかしながらDAA製剤の問題点として、DAA耐性ウイルスの出現・選択による治療不成功例となり、多剤耐性ウイルスが残存しうること、またその高額な薬価があげら

れる。そのため、耐性ウイルスが出現しづらく、安価な抗ウイルス薬を開発することが急務である。

今回、そのような抗ウイルス薬の一つとしてビタミンA誘導体に注目した。同じく脂溶性ビタミンであるビタミンDは、HCVに対する抗ウイルス活性を有するため、インターフェロン製剤にビタミンDを併用することでウイルス排除率が改善することが知られている。ビタミンA誘導体に関しては、培養細胞系を用いた検討では、HCV複製を促進するという報告と、抑制するという相反する報告が存在し、

HCV 複製における役割は明らかとなっていない。

今回、HCV 複製に対するビタミン A 誘導体の影響を、HCV 培養細胞系を用いて検討した。

B. 研究方法

- 今回ビタミン A 誘導体として、all-trans retinoic acid (ATRA)、9-cis retinoic acid (9-cis RA)、13-cis retinoic acid (13-cis RA)、NIK333 (Peretinoin) の 4 種類を用いた。
- ビタミン A 誘導体の HCV 複製に与える影響は、肝癌細胞株 (Huh-7.5) 細胞を用いて検討した。
- 用いた HCV 株は、いずれも肝癌細胞株において複製することが知られている、Gt1a H77S.3、Gt 1b N.2、Gt2a JFH1、Gt1a/2a chimera HJ3-5 を用いた。
- これら HCV 遺伝子の p7 と NS2 の間には、分泌型ルチフェラーゼである Gaussia luciferase (以下 GLuc) 配列が挿入されているため、GLuc 活性をウイルス複製の指標として用いた。感染性粒子産生能は、FFU assay、細胞増殖に与える影響は MTT assay により評価した。

(倫理面への配慮)

本研究では感染性粒子を産生しうる HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの

使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。

C. 研究結果

- 上述した 4 種類の HCV RNA を Huh-7.5 細胞に遺伝子導入し、ATRA、9-cis RA、13-cis RA、Peretinoin を様々な濃度で投与したところ、いずれのビタミン A 誘導体投与においても HCV 複製の抑制を認めため、ウイルス複製を 50%抑制する濃度 EC50 を算出した(表 1)。全てのビタミン A 誘導体が、いずれの HCV 株に対してもウイルス複製抑制効果を認めた。また Peretinoin が最も強い抗ウイルス効果を示した。

表 1 ビタミン A 誘導体 EC50

HCV	Peretinoin		ATRA		9-cis RA		13-cis RA	
	Mean (μM)	SD (μM)	Mean (μM)	SD (μM)	Mean (μM)	SD (μM)	Mean (μM)	SD (μM)
H77S.3	9	1	32	3	29	7	41	4
N.2	19	1	53	5	75	8	83	17
HJ3-5	18	2	25	1	51	6	82	17
JFH1	20	1	25	1	61	8	78	11

- 4 種類のビタミン A 誘導体に関して培養細胞の細胞増殖に与える影響を CC50 により評価した(表 2)。Peretinoin が最も強い細胞増殖抑制効果を示したが、それは HCV 複製を抑制する濃度より高濃度であった。

表 2 ビタミン A 誘導体 CC50

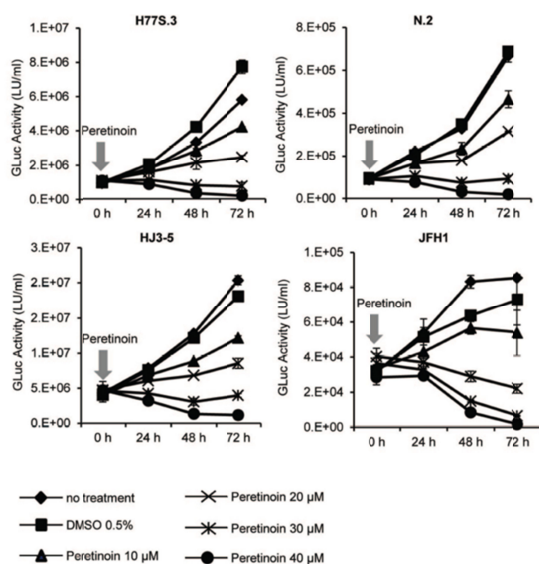
Peretinoin		ATRA	9-cis RA	13-cis RA
Mean (μM)	SD (μM)	Mean (μM)	Mean (μM)	Mean (μM)
68	5.2	>100	>100	>100

4 種類のビタミン A 誘導体の中で最も強い抗ウイルス効果を示し、さらに発癌抑制効果も報告されている

Peretinoin に着目して詳細な解析を行った。

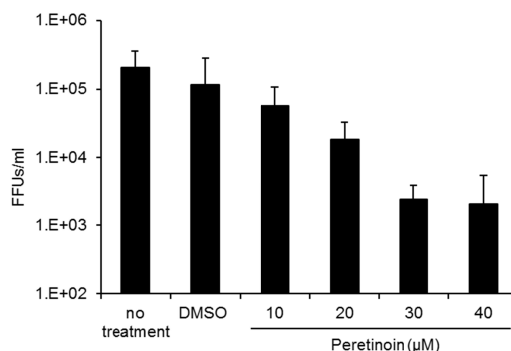
- H77S.3、N.2、JFH1、HJ3-5 RNA を Huh-7.5 細胞に遺伝子導入し、これらの HCV が持続的に複製していることを確認後、Peretinoin を 10、20、30、40 μM の濃度で投与し、経時的にウイルス複製を GLuc 活性により測定した。(図 1) その結果、Peretinoin は、いずれの HCV に対しても濃度依存的かつ時間依存的なウイルス複製抑制効果を示した。

図1 Peretinoinによる抗ウイルス効果



- HJ3-5 株持続複製 Huh-7.5 細胞を 10、20、30、40 μM の Peretinoin で 48 時間処理し、感染性粒子産生能に与えるを FFU assay により評価した(図 2)。その結果、Peretinoin は濃度依存的に感染性粒子産生能も抑制した。

図2 Peretinoinの感染粒子産生能に与える影響



D. 考察

今までの報告ではビタミン A 誘導体の HCV 複製に与える効果は不明であった。しかしながら、今回の検討でビタミン A 誘導体は HCV 複製抑制効果を有することが明らかとなった。特にビタミン A 誘導体の中でも、肝臓治療後の発癌抑制効果が報告されている Peretinoin が最も強力な抗ウイルス効果を有していたことは非常に興味深い。

さらに現在の C 型慢性肝疾患患者の肝臓治療後の Peretinoin による発癌抑制効果を検証する第 3 相試験が本邦において行われている。そのため Peretinoin は発癌抑制効果と HCV に対する抗ウイルス効果を有する分子である可能性が考えられる。

来年度以降 Peretinoin による抗ウイルス効果の作用機序を明らかにする予定である。

E. 結論

- 複数のビタミン A 誘導体において、Gt1a、Gt1b、Gt2a いずれの Genotype の HCV に対しても HCV 複製抑制効果を認めた。
- ビタミン A 誘導体の中でも、肝臓の chemoprevention の有用性が報告され

ている Peretinoin (NIK333)による HCV 複製抑制効果が最も強力であった。

- Peretinoin による HCV 複製抑制効果は、時間依存性かつ用量依存性であった。
- Peretinoin はウイルスの RNA 複製のみでなく、感染性粒子産生能も抑制した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- signaling pathway. *Hepatology*. 60(5):1519-30.2014
- 2) Yamane D, McGivern DR, Wauthier E, Yi M, Madden VJ, Welsch C, Antes I, Wen Y, Chugh PE, McGee CE, Widman DG, Misumi I, Bandyopadhyay S, Kim S, Shimakami T, Oikawa T, Whitmire JK, Heise MT, Dittmer DP, Kao CC, Pitson SM, Merrill AH Jr, Reid LM, and Lemon SM. Regulation of the hepatitis C virus RNA replicase by endogenous lipid peroxidation. *Nature Medicine*. 20(8):927-35.2014
- 3) Li Y, Masaki T, Shimakami T, Lemon SM. hnRNP L and NF90 Interact with Hepatitis C Virus 5'-Terminal Untranslated RNA and Promote Efficient

Replication. *J Virol*. 88(13):7199-7209.2014

- 4) Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. *Sci Rep*. 4:4688.2014

2. 学会発表

1. 島上哲朗、本多政夫、金子周一 前治療無効例に対するテラプレビル併用3剤併用療法48週間延長投与に関する検討 第100回日本消化器病学会総会 シンポジウム6-9, 口演
2. 島上哲朗、本多政夫、金子周一 IL28B Genotype, ISGs 発現量, 前治療反応を用いたテラプレビル併用抗HCV療法における治療効果予測と至適治療期間に関する検討 第50回日本肝臓学会総会 シンポジウム1-8, 口演
3. Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Murakami S, and Kaneko S. ACYCLIC RETINOID, PERETINOIN, INHIBITS HEPATITIS C VIRUS REPLICATION AND INFECTIOUS VIRUS RELEASE IN CELL CULTURE. The 49th Meeting of the European Association for the Study of the Liver (London) Poster

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項無し

宿主因子を標的とする新規薬剤の開発

担当責任者 京都大学 ウイルス研究所 土方 誠 准教授

研究要旨

近年用いられている C 型肝炎ウイルス（HCV）タンパク質を直接標的とした薬剤、所謂 DAA に対する抵抗性 HCV の出現に対処するため、抵抗性ウイルスが出現しにくいことが予想される宿主因子を標的とした薬剤の開発をおこなった。まずは、これまで既に我々が報告している感染性 HCV 産生阻害効果を持つトロンボキサン A2 合成酵素 (TXAS) 阻害薬の薬効作用機序の解析をおこなった。肝癌由来培養細胞を TXAS 阻害薬で処理した時に発現が変動する遺伝子をマイクロアレイ法で解析し、数十種類の候補遺伝子を見出した。また、HCV レプリコン細胞を用いて薬剤ライブラリーによって HCV 複製を抑制する新たな薬剤をスクリーニングすることにより、ステアリル CoA デサチユラーゼ (SCD) 阻害薬が効果的に HCV ゲノム複製を抑制することを見出した。SCD 阻害薬は既存の DAA と併用することで相加的にその効果を上昇させ、またインターフェロンと併用することで相乗効果を示した。このことから SCD 阻害薬が既存薬の効果を上昇させる併用薬の候補となることがわかった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の慢性感染患者に対する治療法の開発は近年著しく進歩し、HCVタンパク質を直接標的とした薬剤、所謂、DAAによる治療が極めて効果が高いことがわかっている。一方、DAAによる治療ではHCVのゲノム変異による薬剤抵抗性ウイルスの出現が問題となりつつある。そこで、抵抗性ウイルスが出現しにくいことが予想される宿主因子を標的とした薬剤を併用することでこの問題は解決可能でと考えられた。そこで、本研究ではHCVの生活環の様々な過程について、これを阻害するような宿主細胞因子に対する阻害薬を見出し、その抗HCV効果について明らかにすることを目

的とした。

本研究では2つの研究で宿主因子を標的とした抗HCV薬開発をおこなった。まず一つは、これまで明らかにしているトロンボキサン合成酵素（TXAS）阻害薬による感染性HCV粒子産生抑制の薬効機序の詳細を明らかにして、さらに直接的に感染性HCV粒子産生抑制をおこなう薬剤の開発をおこなうものである。これまでの解析からTXAS阻害薬の効果は脂質メディエーターであるトロンボキサンA2（TXA2）の合成阻害であり、TXA2下流因子による感染性HCV粒子産生亢進の阻害であることがわかっているが、ヒト肝細胞には既知TXA2受容体であるTPの発現が認められていない。したがって、ヒト肝細胞に

はTP非依存的なTXA2シグナル系が存在することが考えられた。

まず、この未知のTXA2シグナル系を同定し、感染性HCV粒子産生の関連を明らかにして、これを効率良く阻害する方法の間髪を目指した。さらに、既存のHCVレプリコン細胞と薬剤ライブラリー等を用いて、HCV複製に関与する未知の細胞因子を同定し、その阻害剤を抗HCV薬へと応用することも目指した。

B. 研究方法

1. ヒト肝細胞における新規TXA2シグナルを見出すために、TXAS阻害薬による感染性HCV粒子産生抑制効果が観察できるHuH7細胞をTXAS阻害薬ON01301で処理し、その遺伝子発現様式を未処理のものとマイクロアレイ法によって比較した。

2. HCVサブゲノムレプリコン細胞LucNeo#2細胞を用いて、いくつかの薬剤ライブラリーをスクリーニングした。効果的にHCVサブゲノムレプリコンの複製を阻害した薬剤について、その標的に関連する細胞因子に対する阻害剤などを用いて、その効果を検証した。また既存の抗HCV薬との併用効果について検証した。

(倫理面への配慮)

この研究は既存の培養細胞を用いておこなっているものであり、特に倫理面に問題となるような実験は含まれていない。

C. 研究結果

1. TXAS阻害剤ON01301処理 / 未処理のHuH7細胞の遺伝子発現様式を比較することで発現が上昇した遺伝子約150個、発現が著しく

低下した遺伝子490個を見出した。Pathway解析により活性化されているシグナルが約70、抑制されているシグナルが約70見出された。いくつかの遺伝子発現について異なるTXAS阻害剤Ozagrelに対する反応性を検証して、標的を絞っている。

2. 薬剤ライブラリーのスクリーニングにより、抑制効果を示す薬剤十数種類を見出した。いくつかの標的に対する薬剤について解析を進めているが、抑制効果に強かったものとして、アセチルCoAカルボキシダーゼ1(ACC1)阻害剤CP640186についてさらに解析を進めた。ACC1は、HCVゲノム複製に関与することが既に報告されている脂肪酸合成系の初発酵素である。ACCにはACC1とACC2が存在するが、ACC2阻害剤1717-1はHCV複製にまったく影響しなかったため、HCV複製に関与するのがACC1であることが明らかになった。脂肪酸合成経路でACC1下流に存在する脂肪酸合成酵素FASに対する阻害剤GSK1995010は他のFAS阻害薬で報告されている通りHCVゲノム複製を抑制したが、どのようにFASによって産生される長鎖飽和脂肪酸がHCVゲノム複製に関与するのかは不明だった。そこで次にFASで産生される長鎖飽和脂肪酸を修飾する酵素に着目した。長鎖飽和脂肪酸はステアシルCoA不飽和化酵素(SCD)により一価不飽和脂肪酸へと修飾されることが知られている。そこでSCD阻害薬であるMK8245の効果を検証した結果、用量依存的に効果的なHCVゲノム複製阻害が認められた。この抑制効果はSCDの産物である一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸やパルミトレイン酸を培地に添加する事で解除されたことから、これら一価不飽和脂肪

酸がHCVゲノム複製に機能していることがわかった。オレイン酸やパルミトレイン酸の培地への添加はACC1阻害剤によるHCVゲノム複製阻害を抑制したことから、脂肪酸生合成系のHCVゲノム複製への関与の少なくとも一部はこの一価不飽和脂肪酸合成が重要な役割を果たしていると考えられた。MK8245処理はレプリコン細胞のみならず、組換え体HCVであるJFH 1株の感染増殖をも抑制した。また、既存の抗HCV薬テラプレビル（プロテアーゼ阻害薬）、ダクラタスビル（抗NS5A薬）あるいはインターフェロン α との同時処理をおこなって、その抑制効果を検証したところ、テラプレビルとダクラタスビルとは相加的に阻害抑制効果を示し、インターフェロン α とは相乗効果を示すことを明らかにした。

D. 考察

1. HuH7遺伝子発現様式はTXAS阻害剤により大きく変化していることがわかった。このことはこの細胞にはTP非依存的なTXA2シグナル系が存在し、各種遺伝子発現の制御に機能していることが推定された。

2. SCD阻害剤は効率良くHCVゲノム複製を抑制することがわかった。このことは本年度内に海外の別のグループからも報告され、一価不飽和脂肪酸がHCV複製複合体の形成に機能することが示されている。つまり、SCD阻害剤はウイルスタンパク質を介さず直接HCVゲノム複製を阻害する効果的な抗HCV薬になることが考えられる。MK8245は構造上肝臓に運ばれるようにデザインされているため、副作用の少ない薬剤とされており、他の抗HCV薬との併用で十分な効果を示すことが期待された。近年、脂肪酸生合成

抑制剤は、糖尿病や肥満の治療薬や抗がん剤としての効果が示されており、抗HCV効果だけでなく、同時にHCVの感染と関連する疾患の抑制にも効果がある可能性が考えられた。

E. 結論

肝細胞ではTXA2が種々の遺伝子発現の制御に関与している可能性があり、今後の研究でこの新しい細胞内シグナル系の発見やその応用としての新たな抗HCV薬細胞因子標的の同定が期待された。また、脂肪酸生合成系の阻害薬、特にSCD阻害薬による一価不飽和脂肪酸合成阻害は耐性変異を誘導しにくい新たな抗HCV薬となることがわかった。

G. 研究発表

1. 論文発表
準備中

2. 学会発表

長谷川輝、岡村 瞳、赤堀祐一、津川陽司、仁尾泰徳、土方 誠、一価不飽和脂肪酸合成は HCV ゲノム複製に重要な役割を有する、第62回日本ウイルス学会学術集会、平成26年11月、横浜

阿部雄一、土方 誠、朝長 毅、リン酸化プロテオミクス解析によるC型肝炎ウイルス増殖に必要なウイルスタンパク質リン酸化就職の網羅的探索、第62回日本ウイルス学会学術集会、平成26年11月、横浜

土方 誠、HCV培養系開発から見出された新たなHCV薬の標的、第27回広島肝臓研究会学

術講演会、平成26年5月、広島
(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

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

インターフェロン 3 遺伝子導入に基づく C 型肝炎治療法の開発 （抗ウイルス性サイトカインを利用した新規治療法の開発）

担当責任者 高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨

インターフェロン（IFN）- λ は 3 種のサブクラスからなる III 型 IFN であり、治療抵抗性 HCV 感染の治療への適用が期待される。本研究では HCV 感染治療を目的とした IFN- λ 3 遺伝子治療法の開発に関する検討を行った。本年度は短期発現型 IFN- λ 3 発現ベクターとして pcDNA3.1 ベクター、持続型 IFN- λ 発現ベクターとして pCpG-mcs を選択し、これにヒト IFN- λ 3 の cDNA を挿入したベクター、pCMV-IFN- λ 3 および pCpG-IFN- λ 3 を構築した。構築したプラスミドベクターを HCV レプリコン感染細胞 LucNeo#2 細胞にトランスフェクションしたところ IFN- λ 3 の発現と HCV レプリコンの減少を確認した。また、ハイドロダイナミクス法により遺伝子導入されたマウスにおいて、血中 IFN- λ 3 が検出されることを確認した。

A. 研究目的

C型肝炎の治療は直接作用型抗ウイルス剤（DAA）の登場により大きな変化を迎えた。現在までに認可され使用されているテラプレビル、シメプレビルによりC型肝炎治療は格段に改善され、DAA経口剤のみでも80%を超える高率の治癒が期待されている。しかしながら、これらの高い効果にもかかわらず、多剤耐性ウイルスの出現によって完治が困難となった症例も明らかとなった。また、患者数が多いために治療の開発が先行して来たC型肝炎ウイルス（HCV）のgenotype1b, 2以外の感染に対する治療手段もいまだ不十分である。また、DAAは肝機能あるいは腎機能の低下した患者において使用が困難な場合が存在する。したがって、難治性あるいは治療適用が困難な症

例に対しての治療手段の開発が望まれる。

インターフェロン（IFN）- λ は、III型IFNであり、IFN- λ 1, - λ 2, - λ 3の3種類のサブタイプが存在する。IFN- λ 1のポリエチレングリコール（PEG）修飾体を用いて、C型肝炎患者に対する臨床試験が行われ、従来汎用されてきたPEG修飾IFN- α と同程度の治療効果を得られる一方で、副作用の発生を大きく低減可能であることが報告されている。この結果は、ユビキタスに発現しているIFN- α の受容体とは異なり、IFN- λ の受容体は肝細胞をはじめとした一部の細胞においてのみ発現していることから、標的細胞以外への作用が少なかったために副作用が誘導されにくかったことを示す結果と考えられる。また、これまでのC型肝炎の治療において、患者のゲノムDNAにおけるIFN- λ 3（別

名：インターロイキン-28B)の遺伝子多形が治療効果に影響すること、とくにIFN- λ 3の発現が低くなる多形を有する患者において治療効果が有意に低いことが報告されていたことから、IFN- λ 3も抗HCV効果を有すると期待されるが、IFN- λ 3の抗HCV効果についての情報は乏しい。

本研究ではIFN- λ 3のHCV感染治療への適用の可能性について検証することを目的として、IFN- λ 3を遺伝子の形で導入するIFN- λ 3遺伝子治療の開発について検討を開始した。これまでの分担者らの遺伝子治療に関する研究から、治療用遺伝子をコードしたプラスミドDNAの特性が遺伝子発現プロファイルに大きな影響を与えることを明らかとなっている。そこで本研究では、持続的あるいは短期の発現を可能とするプラスミドベクター、pCpGベクターおよびpCMVベクターを選択し、これにIFN- λ 3遺伝子を挿入することとした。培養細胞系を用いて、構築したプラスミドベクターからのIFN- λ 3遺伝子発現の確認を行うとともに、HCVレプリコン細胞を用いてその抗HCV効果について検証を行った。また、マウスに対してハイドロダイナミクス法を用いて遺伝子導入を行った後に、IFN- λ 3の血清中濃度推移について評価を行った。

B. 研究方法

プラスミドベクター

IFN- λ 発現プラスミドベクターとして、pCpGベクターにIFN- λ 3遺伝子を挿入したpCpG-IFN- λ 3、およびpCMVベクターにIFN- λ 3遺伝子を挿入したpCMV-IFN- λ 3を構築した。

培養細胞

アフリカミドリサル腎細胞COS7細胞、HCVレプリコン肝細胞LucNeo#2細胞は定法に従って培養した。

培養細胞への遺伝子導入

LucNeo#2細胞への遺伝子導入はX-tremGeneを用いて行った。COS7細胞への遺伝子導入はLipofectamine2000を用いて行った。

IFN- λ 3濃度の測定

IFN- λ 3濃度はR&D社のIFN- λ 3のELISAキットを用いて測定した。

LucNeo#2細胞を用いた抗HCV効果の評価

LucNeo#2細胞にIFN- λ 遺伝子を導入あるいはその培養上清にIFN- λ を添加した後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ(Luc)活性を測定することでHCV数を評価し、抗HCV効果を判定した。

マウスへの遺伝子導入と血中濃度推移の評価

NakedのプラスミドDNAをマウス体重の約10%に相当する容量の生理食塩水に溶解し、マウス尾静脈から急速に投与した。経時的に採血を行い血清を回収した後、ELISA法により血清中IFN- λ 濃度を測定した。

C. 研究結果

構築した各プラスミドベクターをCOS7細胞に遺伝子導入したところ、いずれのプラスミドベクターのトランスフェクションによっても培養上清中にIFN- λ 3が産生されることを確認した。また、pCMV-IFN- λ 3遺伝子導入後の培養上清中へのIFN- λ 3産生は、pCpG-IFN- λ 3遺伝子導入後の産生量と比較

して10倍以上高かった。次に、COS7細胞にIFN- λ 3遺伝子を導入後に回収した培養上清を、LucNeo#2細胞に添加し、Luc活性を測定することでHCVレプリコン量を評価した。その結果、添加したIFN- λ 3量依存的な抗HCV効果が得られた。

LucNeo#2細胞に各プラスミドDNAを遺伝子導入後にLuc活性を測定することでHCV量について評価した。その結果、pCMV-IFN- λ 3遺伝子導入によってpCpG-IFN- λ 3群と比較して10倍以上高いIFN- λ 3産生が認められた。pCMV-IFN- λ 3の遺伝子導入によりある程度の抗HCV効果が得られた一方で、pCpG-IFN- λ 3の遺伝子導入による抗HCV効果はほとんど得られなかった。また、その抗HCV効果はIFN- γ 遺伝子導入により得られるものと比較して有意に低かった。

マウスに対して各プラスミドDNAを遺伝子導入後のIFN- λ 3血清中濃度推移を評価したところ、pCMV-IFN- λ 3遺伝子導入初期に比較的高いIFN- λ 3血中濃度が得られたが、速やかに低下した。pCpG-IFN- λ 3遺伝子導入後に得られる血中IFN- λ 3濃度は低く、投与後3日後には検出限界以下となった。

D. 考察

pCMV-IFN- λ 3から発現するIFN- λ 3は、抗HCV効果を有することが明らかとなった。一方でその抗HCV効果はpCpG-IFN- γ 遺伝子導入と比較して低かったが、これはpCMV-IFN- λ 3からのIFN- λ 3の産生量がpCpG-IFN- γ からのIFN- γ 産生量の1/10以下と低かったためと推察された。また、マウスにpCMV-IFN- λ 3を投与することでIFN- λ 3が

認められたことから、IFN- λ 3遺伝子導入によりIFN- λ 3を供給可能であることが実証された。一方で、pCpG-IFN- λ 3を投与した後に持続的なIFN- λ 3発現が得られなかったが、これはこのベクターからのIFN- λ 3の発現効率が低かったためであると推察された。

E. 結論

IFN- λ 3によって抗HCV効果が得られる可能性が示されるとともに、マウスに対して遺伝子導入することでIFN- λ 3遺伝子発現が得られることを実証した。今後は、プロモーター領域をはじめとしたプラスミド骨格の最適化によって、高効率かつ持続的なIFN- λ 3発現を可能とするプラスミドベクターを開発する。併せて、IFN- λ 1遺伝子治療のC型肝炎への適用の可能性について検討を行う予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watcharanurak K, Zang L, Nishikawa M, Yoshinaga K, Yamamoto Y, Takahashi Y, Ando M, Saito K, Watanabe Y, Takakura Y. Effects of upregulated indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 by interferon γ gene transfer on interferon γ -mediated antitumor activity. *Gene Ther.* 2014;21:794-801.
2. Yin Y, Takahashi Y, Ebisuura N, Nishikawa M, Takakura Y. Removal of transgene-expressing cells by a specific immune response induced by sustained transgene expression. *J Gene Med.* 2014;16:97-106.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 藤本眞衣、安藤 満、高橋有己、濱名温志、西川元也、高倉喜信 . 腫瘍血栓結合性ペプチド融合インターフェロンの設計と遺伝子導入による腫瘍指向性インターフェロン遺伝子治療法の開発 アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014、東京、9月
2. 濱名温志, 安藤満, 藤本眞衣, 高橋有己, 西川元也, 高倉喜信 . 血栓結合型インターフェロン 誘導体の遺伝子導入によるインターフェロン 癌遺伝子治療効果の増強 日本薬学会第135年会、神戸、3月

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

厚生労働科学研究委託費（肝炎等克服実用化研究事業 肝炎等克服緊急対策研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

次世代シーケンサーと系統樹解析を用いた DAA 耐性変異の検討 （宿主因子を標的とする新規薬剤の開発）

担当責任者 前川伸哉 山梨大学医学部 第一内科 講師

研究要旨：Direct antiviral agents (DAA)は、従来の治療で難治性のC型慢性肝炎に高い有効性を示すが、薬剤耐性の出現が大きな問題となる。しかし耐性変異 HCV がどのような過程で出現するのか十分に解明されてはいない。

本研究ではプロテアーゼ阻害剤/PEG-IFN/RBV3 剤併用療法において、DAA 治療に伴う quasispecies の動態および薬剤耐性変異の発生と経過を明らかにするために、次世代シーケンサーにより得られる大量のウイルスゲノムデータを系統樹解析によって詳細に解析した。

その結果、治療後超早期のウイルスゲノム多様性減少と最終治療効果、あるいは宿主 IFL3SNPは有意な関連があり、超早期における多様性変化で治療効果を予測しうる可能性が示唆された。治療前に少数の耐性変異を認めた症例では、そのHCVは臨床的耐性HCVに進展せず、臨床的耐性は野生型のHCVに変異が生じ耐性を獲得したと考えられた。一方、治療抵抗性になるにつれて、

Quasispecies の系統は大きく変化することが明らかとなった。

共同研究者氏名

佐藤光明

山梨大学医学部第一内科 助教

榎本信幸

山梨大学医学部第一内科 教授

A. 研究背景・目的

Direct antiviral agents (DAA)は、従来の治療で難治性のC型慢性肝炎に高い有効性を示すが、薬剤耐性の出現が大きな問題である。しかし耐性変異 HCV がどのような過程で出現するのか十分に解明

されてはいない。

一方、C型肝炎ウイルス(HCV)は宿主内で quasispecies と呼ばれる混在状態で存在し治療反応や病態形成に関与することが想定されていたが詳細な検討はこれまで技術的に困難であった。しかしながら近年の次世代シーケンス技術を用いることにより、このような解析も可能になりつつある。

DAA 治療に伴う quasispecies の動態および薬剤耐性変異の発生と経過を明らかにするために、次世代シーケンサーに

より得られる大量のウイルスゲノムデータを系統樹解析によって詳細に解析した。

B. 研究方法

テラプレビル (TVR) / ペグインターフェロン/リバビリン 3 剤併用療法を施行した genotype1b HCV 34 例を対象とし、次世代シーケンサー Roche GS Junior を用い、HCV の NS3 プロテアーゼ領域の deep sequence を行い、以下の検討を行った。

(1) 3 剤併用療法開始超早期の quasispecies の変化と治療効果の関連を明らかにする。

(2) Non-SVR 8 症例における TVR 耐性変異の発生と経過を明らかにする

(3) 治療に伴う quasispecies の動態を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本研究は梨大学における倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究成果

(1) 34 症例中、SVR 群は 26 例 (76%) であり、non-SVR は 8 例 (24%) であった。ウイルスゲノムの多様性をシャノンエントロピー (Sn) あるいはウイルスゲノムの平均変異率 (Mf) で求めると、ウイルスゲノム多様性は 3 剤併用療法開始わずか 12 時間後には SVR 群で減少していたが、non-SVR 群では減少は認めなかった。また IFL3 SNP のメジャー群 (TT) ではマイナー群 (TG/GG) と比較して多様性の減少が顕著であった。

(2) Non-SVR 群では治療抵抗性になるにつれて、ウイルス量が再上昇するが、ウイ

ルス量再上昇に伴い、治療前に存在した一部の population が選択され、quasispecies の構成が変化した。

しかし、治療終了後耐性変異が消失しても quasispecies の構成変化は維持された。

一方、治療前に認めた少数の耐性変異 HCV は、臨床的耐性 HCV へと進展しなかった。

(3) ウイルス再上昇に伴う quasispecies の系統変化は non-SVR 全例で認められた。耐性変異が消失しても quasispecies の系統は治療前に戻らなかった。シメプレビルでもテラプレビル同様 quasispecies の選択が生じたが、PEG-IFN+RBV 治療経過、自然経過では特定の quasispecies の選択は認めなかった。

D. 考察

3 剤併用療法開始後、わずか 12 時間後の多様性の変化で治療効果を予測することができる可能性が示唆された。その多様性の変化は IFL3 SNP と関連があり、IL28B SNP は IFN 反応性を規定するため、早期の多様性の変化は IFN が関連していると考えられた。

治療前に少数の耐性変異を認めた症例は、その HCV が臨床的耐性 HCV に進展せず、野生型の HCV に変異が生じ耐性を獲得したと考えられた。

一方、ウイルス再上昇に伴う quasispecies の系統変化は、NS3 プロテアーゼ阻害剤使用における一般的な現象であることが考えられた。耐性変異が消失しても系統変化が維持される理由は現時点で明らかではないが、本現象はその後の経過や DAA による再治療に影響を与える可能性があり、今後の検討を要する。

E . 結論

耐性変異を含む広範囲の塩基配列を deep sequence を用いて直列的に解析し、従来のホットスポット部位だけの検討では分からなかった耐性の起源、quasispecies の動態を詳細に解析し得た。

G . 研究発表論文発表

1 . 論文発表

1. Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsushashi H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, Honda M, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, Tanaka Y.

Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C.

Hum Genet. 2015 Mar;134(3):279-89. doi: 10.1007/s00439-014-1520-7. Epub 2014 Dec 17.

2. Itakura J, Kurosaki M, Takada H, Nakakuki N, Matsuda S, Gondou K, Asano Y, Hattori N, Itakura Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Takahashi Y, Maekawa S, Enomoto N, Izumi N.

Naturally occurring, resistance-associated hepatitis C virus NS5A variants are linked to IL28B genotype and are sensitive to

interferon-based therapy.

Hepatol Res. 2015 Jan 6. doi: 10.1111/hepr.12474. [Epub ahead of print]

3. 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. 2014 Nov 15;88(22):13352-66.

4. Tatsumi A, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N.

Liver stiffness measurement for risk assessment of hepatocellular carcinoma.

Hepatol Res. 2014 Jun 24. doi: 10.1111/hepr.12377. [Epub ahead of print]

5. Miura M, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Tatsumi A, Takano S, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N.

Deep sequencing analysis of variants resistant to the non-structural 5A inhibitor daclatasvir in patients with genotype 1b hepatitis C virus infection.

Hepatol Res. 2014 Feb 25. doi: 10.1111/hepr.12316. [Epub ahead of print]

6. 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,

Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T,
Araki T, Enomoto N.

Hepatocellular carcinoma risk assessment
using gadoxetic acid-enhanced hepatocyte
phase magnetic resonance imaging.

Hepatol Res. 2014 Dec;44(13):1339-1346.

H. 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。

3. その他

特記事項無し

HCV 感染の細胞特異性における Quasispecies の意義に関する検討

（宿主因子を標的とする新規薬剤の開発）

担当責任者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨 C型肝炎ウイルス (HCV)の慢性感染に伴う末期肝硬変および肝細胞癌に対する治療として肝臓移植が広く行われているが、肝移植後再発肝炎は難治性であり、再感染機構を解明する必要がある。本研究は、新しいグラフトへの再感染における HCV の遺伝子多型(Quasispecies)の意義を明らかにすることを目的とした。In vitro の感染系で、Huh7 細胞に馴化した HCVcc (HCVcc/Huh7)と Hep3B 細胞に馴化した HCVcc (HCVcc/Hep3B)を作製した。次世代シーケンスの結果、それぞれ異なった Quasispecies を保持しており、異なる細胞株に感染させた際に、さらに新たな Quasispecies が出現することが明らかになった。HCVcc/Huh7 は Huh7 細胞に対して、HCVcc/Hep3B は Hep3B/miR-122 細胞に対して特異的に高い感染性を示した。これらの結果から、Quasispecies は細胞特異的な高い感染性を得るために重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、SCID マウスを用いた in vivo の検討では、Huh7 細胞や Hep3B 細胞と異なる Quasispecies が in vivo で選択されることが明らかになった。HCV-RNA の Quasispecies は移植時のドナーグラフトや新規感染者に対する効率的な感染成立に重要な役割を担う可能性がある。また、ウイルスが薬剤抵抗性を獲得する際にも Quasispecies が重要な役割を演じる可能性がある。

A. 研究目的

HCV に感染すると高率に慢性化し、肝硬変を経て肝細胞癌を発症する。ペグ化 IFN とリバビリン、プロテアーゼ阻害剤の併用により治療効果に改善が認められているが、末期肝硬変や切除不能な肝癌に対する治療法は肝移植のみである。肝移植後再発 C 型肝炎は難治性であり、HCV の再感染機構を明らかにする必要がある。最近我々は、miR-122 を強制発現させた Hep3B 細胞が Huh7 細胞と同程度に HCVcc の感染増幅を許容することを明らかにした。本研究では HCVcc が増幅可能な細胞株である Huh7 細胞および Hep3B/miR-122 細胞、さらに in vivo モデルとしてヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HCV 感染の細胞特異性における Quasispecies の意義を明らかにすることを目的とした。さらに、本研究では、

miR-122 阻害剤の抵抗性獲得における Quasispecies の役割を明らかにする。

B. 研究方法

In vitro で合成した JFH1 株由来の HCV-RNA を Huh7.5.1 および Hep3B/miR-122 細胞に導入し、それぞれの細胞でウイルスの Passage を継続し、それぞれの細胞に馴化した高力価のウイルスである HCVcc/Huh7 および HCVcc/Hep3B を産生し、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析を行った。同時に、HCVcc/Huh7 および HCVcc/Hep3B の細胞特異的な感染性を評価した。さらに、それらのウイルスを異なる細胞に感染させた際の Quasispecies の変化を解析

した。また、HCVcc/Huh7 および HCVcc/Hep3B を 2 種類のドナー由来のヒト肝細胞キメラマウスそれぞれに感染させ、感染成立後の Quasispecies の変化を検討した。また、TALEN を用いて miR-122 ノックアウト Huh7 細胞を作製し、HCV の感染性を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、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、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析に関する共通指針」に則り各研究実施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、また提供試料、個人情報等を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

In vitro で合成した HCV-RNA を導入した Huh7.5.1 細胞からは 18 日後に、Hep3B/miR-122 細胞からは 55 日後に 10^5 FFU/ml を超える力価の感染性粒子が産生された。Huh7 細胞に馴化した HCVcc を HCVcc/Huh7、Hep3B 細胞に馴化した HCVcc を HCVcc/Hep3B とし、それぞれから独立した獲得変異が同定された。HCVcc/Huh7 は Huh7.5.1 細胞に、HCVcc/Hep3B は Hep3B/miR-122 細胞に高い感染性を示した。HCVcc/Hep3B および HCVcc/Huh7 をそれぞれ新たに Huh7 細胞および Hep3B 細胞に再馴化させたところ、新たな Quasispecies が出現した。出現した変異を導入した HCV-RNA は細胞特異的な感染性の違いを認めなかったことから、細胞特異的な感染性には単一の変異ではなく、Quasispecies が重要な役割を演じていることが示唆された。また、HCVcc/Huh7 および HCVcc/Hep3B は 2 種類のドナー由来のヒト肝細胞キメラマウ

スに同等の感染性を示した。HCVcc/Hep3B は 6 頭中 1 頭で、HCVcc/Huh7 は 6 頭中 5 頭で感染が成立した。そこで、HCVcc/Huh7 の感染後 24、72、120 時間および 7 日での遺伝子多型を Deep Sequence で検討した。キメラマウス内では、Huh7 細胞では、消失した多型が主に増殖しており、Huh7 細胞とキメラマウスの肝臓では、異なったウイルス株が選択されることが示唆された。

次に、miR-122 阻害剤の抵抗変異株を得るために、TALEN を用いて miR-122 ノックアウト Huh7 細胞を作製した。親株に比べて感染性は低いものの、HCV の感染増殖は miR-122 非依存的に起こりうるということが明らかになった。

D. 考察

肝移植や急性感染における新規感染巣への HCV の感染成立における Quasispecies の役割を in vitro および in vivo で Huh7 細胞および Hep3B 細胞を用いることで検討した。In vitro でも in vivo でも新たな感染環境で効率的に HCV が増えるために、Quasispecies が関与していることが示唆される。今後は、薬剤耐性における Quasispecies の意義、特に miR-122 阻害剤に抵抗を示す HCV を用いて、その意義を明らかにする予定である。

E. 結論

HCV の肝移植後再感染や急性感染における効率的な複製において、Quasispecies が重要な役割を演じている。

G. 研究発表

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. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, and Matsuura Y. Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus. *J. Virol.* 2014; 88: 5578-5594

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 HCV. 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
5. Sayaka Aizawa, Toru Okamoto, Takahisa Kouwaki, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura, Processing of core protein by signal peptide peptidase participates in propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014
6. Yoshiharu Matsuura, Toru Okamoto, Takasuke Fukuhara, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
7. 山本聡美、福原崇介、小野慎子、和田真実、塩川舞、岡本徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスの感染におけるアポリポタンパク質受容体の役割、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
8. 和田真実、福原崇介、中村昇太、小野慎子、山本聡美、塩川舞、岡本徹、小池和彦、松浦善治、アポリポ蛋白質の両親媒性 α ヘリックスはHCVの感染性粒子産生に寄与する、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
9. 岡本徹、相澤清香、杉山由加理、幸脇貴久、福原崇介、森石恆司、小池和彦、松浦善治、C型肝炎ウイルスの病原性発現におけるシグナルペプチドペプチダーゼの役割、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
10. 福原崇介、山本聡美、小野慎子、和田真実、岡本徹、茶山一彰、松浦善治、HCVの Quasispecies は増殖性に関与する、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
11. 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
12. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 21st

International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014

13. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 第 73 回 日本癌学会学術総会、横浜、2014

H . 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

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が必要で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：脇田隆字 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、脂質代謝に關与する化合物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、關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關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關与の分子機構を

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關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、市野瀨志津子、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、金ソルイ、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

厚生労働科学研究委託費（肝炎等克服実用化研究事業 肝炎等克服緊急対策研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

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、

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。

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+ダクラ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- 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- 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