

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）

HCVに対する抗ウイルス治療後、SVR後の病態に関する研究

業務項目：SVR後肝癌を含む肝病変の発生・変化に関する研究

担当責任者：小池和彦 東京大学 教授

研究協力者：建石良介 東京大学 特任講師

研究要旨：平成 26 年 9 月から国内初の経口剤のみによる C 型肝炎治療が可能になり、これまでインターフェロンを含む治療に不適とされていた高齢者や肝線維化進行例などに対して高率に SVR が期待できる時代が到来した。これらインターフェロン不適格例は、同時に発癌高リスク群でもあり、SVR 後の発癌率の低下についてのエビデンスが不足している。SVR 例における肝線維化・肝機能の変化と発癌の実態を把握するため、通院中の患者コホートを設定し、ファイブロスキャンによる肝硬度測定と経過観察を開始した。

A. 研究目的

直接作用型抗ウイルス薬(DAA)によるSVR後の肝線維化及び肝機能の改善状況と肝発癌の実態を把握すること。

B. 研究方法

当院消化器内科通院中の HCV-RNA 陽性 C 型慢性肝炎患者に対して通常の診療行為の一環として腹部超音波検査による肝臓スクリーニングとファイブロスキャンによる肝硬度測定を行った。比較対象として、当院にてインターフェロンを含む抗ウイルス療法が施行され、SVR が得られている症例を設定した。

（倫理面の配慮）

本研究は、通常の診療の範囲内で行う観察研究であり、東京大学医学部倫理委員会の承認を得て行っている。

C. 研究結果

当院フォロー中で、インターフェロン治療後 SVR が得られた患者は 244 人(男性 139 人、女性 105 人)、インターフェロン開始時年齢 56.3 ± 10.1 歳、SVR 達成後平均観察期間 6.1 ± 4.7 年、発癌例 17 人であった。当院フォロー中で、DAA 治療を検討されている患者は 606 人(男性 236 人、女性 370 人、平均年齢 69.2 ± 11.8 歳)であった。現在までにファイブロスキャン測定された者は 184 人で、ファイブロスキャン値は 11.3 ± 8.9 kPa であった。2014 年末までに 52 人において DAA 治療を開始した。

D. 考察

いまだ相当数の患者がインターフェロン非適応を理由に治療待機状態となっている。今後、その大半が DAA による治療適応となると予想される。SVR 後発癌のリスクは、高齢などを背景にインターフェロン療

法のそれよりも高いことが予想されるため、注意深い観察による肝癌早期発見が重要になる。

E. 結論

DAA 治療による SVR 後の肝線維化及び肝機能の改善状況および肝発癌のリスク因子解明を目的としたコホート研究を開始した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Minami T, Tateishi R, Shiina S, Nakagomi R, Kondo M, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, Koike K. Comparison of improved prognosis between hepatitis B- and hepatitis C- related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2015 Jan 6. doi: 10.1111/hepr.12468. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25559860.
- 2) Fujiwara N, Tateishi R, Nakagawa H, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Slight elevation of high sensitivity C-reactive protein to predict recurrence and survival in patients with early stage hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2014 Jul 29. doi: 10.1111/hepr.12398. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25070147.

- 3) Nakagawa H, Fujiwara N, Tateishi R, Arano T, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Impact of serum levels of IL-6 and adiponectin on all-cause, liver-related, and liver-unrelated mortality in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30(2):379-388. PubMed PMID: 25168107.
- 4) Fujiwara N, Tateishi R, Kondo M, Minami T, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Masuzaki R, Nakagawa H, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Cause-specific mortality associated with aging in patients with hepatocellular carcinoma undergoing percutaneous radiofrequency ablation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2014;26(9):1039-1046. PubMed PMID: 25051219.
- 5) Asaoka Y, Tateishi R, Nakagomi R, Kondo M, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Frequency of and predictive factors for vascular invasion after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2014 Nov 14;9(11):e111662. doi:10.1371/journal.pone.0111662. eCollection 2014. PubMed PMID: 25397677.
- 6) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. The impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular

- carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus Infection. *Hepatol Res* 2014;44(10):E137-44. PubMed PMID: 24125181.
- 7) Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Tsubouchi H, Kumada H. Discrimination of fibrotic staging of chronic hepatitis C using multiple fibrosis markers. *Hepatol Res* 2014;44(11):1047-1055. PubMed PMID: 23941604.
- 8) Minami T, Tateishi R, Shiina S, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, Koike K. Spontaneous clearance of serum hepatitis C virus RNA during the clinical course of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2014;44(10):E32-37. PubMed PMID: 23841664.
- 9) Kondo M, Ishizawa T, Enooku K, Tokuhara Y, Ohkawa R, Uranbileg B, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Kokudo N, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased serum autotaxin levels in hepatocellular carcinoma patients were caused by background liver fibrosis but not by carcinoma. *Clin Chim Acta* 2014;433:128-134. PubMed PMID: 24642343.
- 10) Kumada H, Suzuki Y, Ikeda K, Toyota J, Karino Y, Chayama K, Kawakami Y, Ido A, Yamamoto K, Takaguchi K, Izumi N, Koike K, Takehara T, Kawada N, Sata M, Miyagoshi H, Eley T, McPhee F, Damokosh A, Ishikawa H, Hughes E. Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection. *Hepatology* 2014;59(6):2083-2091 PubMed PMID: 24604476.
- 11) Enooku K, Nakagawa H, Soroida Y, Ohkawa R, Kageyama Y, Uranbileg B, Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased serum mitochondrial creatine kinase activity as a risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer* 2014;135(4):871-879. PubMed PMID: 24420733.
- 12) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2014;49(4):748-754. doi: 10.1007/s00535-013-0826-x. PMID: 23689989.
- 13) Sato M, Kondo M, Tateishi R, Fujiwara N, Kato N, Yoshida H, Taguri M, Koike K. Impact of IL28B Genetic Variation on HCV-Induced Liver Fibrosis, Inflammation, and Steatosis: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2014 Mar 17;9(3):e91822. doi: 10.1371/journal.pone.0091822. eCollection 2014. PubMed PMID: 24637774.

2. 学会発表

なし

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

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)）
HCVに対する抗ウイルス治療後、SVR後の病態に関する研究
委託業務成果報告（業務項目）

SVR 後肝組織の微小構造の解析に関する研究

担当責任者 飯島 尋子（兵庫医科大学 内科肝胆膵科 教授・超音波センター センター長）

研究要旨 HCV肝炎SVR後の持続肝障害に関する検討を行った。

A.研究目的

血中ウイルス陰性の持続肝障害肝障害患者の組織について解析を行った。

B.研究方法

HCV潜在性肝炎患者の肝組織からのHCV-RNA検出と組織学的異常に関して検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究はいずれも非侵襲的な検討であり、実際の臨床に沿って行われるものであるが、倫理面については当院の倫理委員会（倫ヒ第92号）においても了承済みである。

C.研究結果

4例中1例で肝組織中にHCV-RNAを検出した。組織学的にミトコンドリア異常があることが確認された。

D.考察

肝組織中に残存するHCV-RNAは炎症や発癌に関与しているかを明らかにする必要がある。

E.結論

ミトコンドリア異常が血中HCV陰性症例でどの程度発癌に関与するかを今後検討する必要がある。

F.研究発表（該当論文・発表以外削除願います）

1.論文発表

2.学会発表

1. Aizawa Nobuhiro, Nakano Chikage, Hasegawa Kunihiro, Takata Ryo, Aoki Tomoko, Hashimoto Kenji, Ishii Akio, Takashima Tomoyuki, Sakai Yoshiyuki, Ikeda Naoto, Tanaka Hironori, Iwata Yoshinori, Enomoto Hirayuki, Saito Masaki, Iijima Hiroko, Iimuro Yuji, Fujimoto Jiro, Nishiguchi Shuhei. Relationship between the mitochondria gene abnormality in liver tissues in patients with chronic viral hepatitis C and the hepatocarcinogenesis. The 65rd Annual Meeting of the American Association for the Study

of Liver
Diseases(AASLD2014)2014.11 Boston

G . 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

C型肝炎の治療前後における血中代謝物の網羅的比較解析

担当責任者 鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授

研究要旨 インターフェロン/リバビリン投与に無効で、プロテアーゼ阻害剤含治療によりSVRが達成された症例から治療前後の血液検体を採取し、脂質、糖、アミノ酸、ヌクレオチドなどを含む血清中の各種低分子量代謝物をキャピラリー電気泳動&質量分析技術により網羅的に定量的解析を行った。予備的ながら、プロテアーゼ阻害剤含治療によるウイルス消失に関連したアミノ酸変動を見出した。

A. 研究目的

直接作用型抗ウイルス薬(DAA)のみの治療で9割以上の患者にウイルス学的著効(SVR)が期待できるようになってきている。一方、SVR後の肝障害や肝癌の発症も報告されており、HCV消失後の肝機能改善/維持、病態の進展については未だ不明な点が多い。全体研究開発として、今後増加するSVR後症例の適切な管理のため、SVR後の肝病態の解明と新たな検査系・対処法の確立を目指している。

本分担研究では、インターフェロン(IFN)/リバビリン(RBV)/プロテアーゼ阻害剤(PI)投与またDAA二剤投与によってSVRが達成された症例について治療前後の血中代謝物を網羅的に解析することにより、HCV感染に伴う代謝異常がSVRに伴ってどのように改善されたかを明らかにする。

B. 研究方法

IFN/RBV/PI治療を受け奏功した慢性C型肝炎患者の治療前と治療後の血清を収集した。各血清に対し9倍量のメタノール(LC/MS用)を添加、ボルテックス後、血清の10倍量のクロロフォルム(HPLC用)及び4倍量の超純水を添加、数秒間ボルテックス後、2300xg、4、5分間遠心操作。上層(水相画分)を採取し、限外ろ過ユニット(5K)に供し遠心操作(9100xg、4、6時間程度)を行って液を回収しメタボローム解析を行った。解析は、キ

ャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析装置(CE-TOFMS)のカチオン及びアニオンモードによるイオン性代謝物質の定量測定を実施した。

(倫理面への配慮)

肝疾患患者等からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮する。当該研究機関の医の倫理委員会に申請し、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。

C. 研究結果

血清検体からの水溶性分画抽出、イオン性代謝物質解析によりどの程度(何種類程度)の物質検出が可能か、を明らかにし、治療成績に相関するような代謝物は認められるかを予備的に評価するため、IFN/RBV療法に無効、その後のIFN/RBV/PI治療でSVRが達成された患者2名の検体についてメタボローム解析を行った。その結果、各血清由来検体の質量分析から148種類のピーク(カチオンモード94種類、アニオンモード54種類)が検出され、ライブラリー検索によって各ピークに候補化合物を付与された。これらは、アミノ酸、糖、脂質、ヌクレオチドの各代謝経路に關与する物質であった。患者血清50 uLからの検体調製によりメタボローム解析が十分可能で

あることが示された。

治療成績と代謝物量との相関を調べた結果、ある種のアミノ酸またアミノ酸代謝物で、初回治療前、治療無効時には変動しないものの、IFN/RBV/PI 治療に伴って有意な量的変動を示すことが観察された。

D . 考察

HCV関連の肝発がんにはHCV感染によって誘発される脂質、糖類の代謝異常が関連することが示されている。DAA含治療後に代謝異常がどのように改善、変動するかを把握することは治療後の適切な管理、対処法を確立するために極めて重要である。

本年度、患者血清からのメタノール、クロロホルム抽出、CE-TOFMS解析によって代謝物の網羅的、定量的解析が可能であることを確認し、予備的ながら、IFN/RBV/PI治療によるウイルス消失に連動したアミノ酸変化を見出した。

次年度以降、更にDAA含治療前後の患者血清を収集、メタボローム解析を実施する。得られたデータを蓄積し、病態改善の指標となる代謝物質変動を明らかにすることを目指す。

E . 結論

患者血清由来検体で代謝物の網羅的解析が可能であることを確認し、予備的ながら、プロテアーゼ阻害剤含治療によるウイルス消失に関連したアミノ酸変動を見出した。

F . 研究発表

1. 論文発表

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- in Infectious Virus Production. J Virol. 88: 7541-7555, 2014.

1. Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H,

Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting Cellular Squalene Synthase, an Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus. J Virol. 89: 2220-2232, 2015.

2. 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. 95: 2658-2667, 2014.
3. Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. J Virol Methods 207: 38-44, 2014.
4. Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, Suzuki T, Lee J, Park EY. Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection. Biosens Bioelectron. 58:33-39, 2014.

G . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

厚生労働科学研究委託費（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）

SVR後肝組織の微小炎症の免疫学的機序の検討

担当責任者 考藤達哉 国立国際医療研究センター
肝炎・免疫研究センター 肝疾患先進医療研究室長

研究要旨：抗HCV治療によってHCVが排除(SVR)された後にも肝がんが発症する例が増加しているが、SVR後発がんの免疫学的機序や発がんに関与するリスク因子の詳細は明らかではない。効率的なSVR後肝がんスクリーニング方法を確立するためには、病態の解明やリスク因子の同定が必要である。SVR後肝がんには持続する軽微な炎症や線維化が関与する可能性がある。肝微小炎症の免疫学的機序や線維化進展機序の解明を通して、SVR後肝がんの病態を明らかにすることを目的とする。

様々な固形がんにおいて、発がんやがんの進展には癌微小環境が関与することが報告されている。今年度は、癌微小環境の構成細胞である線維芽細胞を、非SVR肝がん組織（切除肝）から分離培養し、線維芽細胞が肝がん細胞やマクロファージの形質・機能に及ぼす影響を検討した。癌から分離した線維芽細胞は、免疫抑制型マクロファージ（M2）を誘導し、肝がん細胞の浸潤能を亢進させた。がん関連線維芽細胞が肝がんの病態に関与する可能性が示された。

A.研究目的

HCVが排除された（SVR）後も、高齢者や線維化進展例では、高率に肝がんが発症する。現時点ではSVR後肝がんのリスク因子や、発がん機序は明らかではなく、適切な肝がんのスクリーニング体制は確立されていない。SVR後でも微小な肝炎症が残存しており、線維化進展や発がんに関与する可能性があるが、この微小炎症の機序は明らかではない。本研究では、SVR後に残存する微小炎症の免疫学的機序を解明し、発がんリスク因子を同定することを目的とした。

B.研究方法

様々な固形がんでがん微小環境が発がんやがんの進展に関与することが報告されている。がん微小環境構成細胞である線維芽細胞を非SVR肝がん組織や背景肝組織（肝切除標本）から直接分離し、培養系を樹立した。線維芽細胞と単球、肝がん細胞との共培養系を用いて、マクロファージ分化や肝がんの悪性化（浸潤能）への影響を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は国立国際医療研究センター倫理審査委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える。

C.研究結果

肝がん組織や非がん部組織から線維芽細胞を分離し培養株として樹立した。肝がん線維芽細胞（Cancer-associated fibroblast, CAF）は単球をIL-10産生型M2マクロファージに分化させた。またCAFは単球の遊走能を亢進させた。CAF培養上清を肝癌細胞株（Huh7）に添加すると、Matrigelへの浸潤能が亢進した。

D.考察

肝がん関連線維芽細胞（CAF）はM2マクロファージの分化誘導、肝がん細胞の悪性化に関与しており、肝がんの進展に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

E.結論

肝がん微小環境を構成する線維芽細胞は、免疫細胞やがん細胞の機能を修飾することで、肝がんの病態に関与する可能性が明らかとなった。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Mukaide M, Sugiyama M, Korenaga M, Murata K, Kanto T, Masaki N, Mizokami M. High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70. *J Virol Methods*. 2014; 207: 169-77
- 2) Harada N, Hiramatsu N, Oze T, Morishita N, Yamada R, Hikita H, Miyazaki M, Yakushijin T, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kanto T, Kasahara A, Oshita M, Mita E, Hagiwara H, Inui Y, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, Inoue A, Hayashi N, Takehara T. Risk factors for hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients with normal alanine aminotransferase treated with pegylated interferon and ribavirin. *J Viral Hepatitis*. 2014 5: 357-65

2.学会発表

- 1) Kanto T, Yoshio S, Sugiyama M, Mizokami M. Natural killer cells as

immunological sentinels against HBV infection. The 2nd Japan-Italy Liver workshop, Hepatitis, setatosis and hepatocellular carcinoma: molecular basis and clinical links. Hiroshima, Japan, 2014.

- 2) Yoshio S, Kanto T, Sugiyama M, Shouji H, Mano Y, Aoki Y, Nishida N, Korenaga M, Murata K, Mizokami M. Distunct helper roles of dendritic cell subsets in NK cell-dependent HBV suppression in bystander infected cells. The Liver Meeting AASLD 65th Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA, 2014

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

厚生労働科学研究委託事業（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））

HCV に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の病態に関する研究
委託業務成果報告（業務項目）

ペグインターフェロン・リバビリン無効例に対するシメプレビル 3 剤併用療法の有効性と耐性変異の解析

担当責任者：平松 直樹 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 講師

研究要旨：当院ならびに関連施設において、2014 年 7 月までに Simeprevir (SMV) 3 剤併用療法を開始した Pegylated-interferon/Ribavirin (P/R) 無効例 45 例 (平均年齢: 61.3 歳、男性/女性: 24/21 例) を対象とした。全例における治療効果は、RVR (4 週時 HCV RNA 陰性化) が 52%、EOT (治療終了時 HCV RNA 陰性化) が 75%、SVR4 (治療終了 4 週後 HCV 陰性化) が 39% であった。RVR 達成例においても SVR4 は 50% と低率であった。また、P/R 無効例のうち、partial responder の著効率は 50% と null responder の 31% に比し高い傾向であった。P/R 治療の後に Telaprevir (TVR) 3 剤併用療法を施行し非著効であった症例では、全例非著効となったが、SMV 開始時には TVR 耐性変異 (V36, T54, V55) は消失あるいは微量であり、SMV 併用療法の治療効果に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。今後、症例を重ねて検討を行なう予定である。

A. 研究目的

わが国の臨床試験では、前治療無効例に対する Simeprevir (SMV) 3 剤併用療法の著効率は約 4 割と低率であった。今回、Pegylated-interferon/Ribavirin (P/R) 無効例において、SMV 併用療法の治療効果に関与する因子を検討した。

B. 対象と方法

当院ならびに関連施設において、2014 年 7 月までに SMV 3 剤併用療法を開始した P/R 無効例 45 例 (平均年齢: 61.3 歳、男性/女性: 24/21 例、肝線維化ステージ F0-2/F3-4: 22/18、IL28B SNP TT/non-TT: 18/22 例、P/R 治療効果 partial responder/null responder: 12/28 例) を対象とした。このうち 4 例は、P/R 治療の非著効後に Telaprevir (TVR) 3 剤併用療法

を施行し、非著効であった症例 (再燃 2 例、無効 2 例) であり、TVR 併用療法終了後、平均 26 ヶ月にて SMV 併用療法を開始した。治療効果は治療終了 4 週後 HCV 陰性化率 (SVR4) で判定した。一部の症例については、次世代シーケンサー (Ion PGM) を用いて耐性変異を解析した。

C. 研究結果

全例における治療効果は、RVR (4 週時 HCV RNA 陰性化) が 52% (21/41)、EOT (治療終了時 HCV RNA 陰性化) が 75% (19/26)、SVR4 が 39% (10/26) であり、非著効の内訳は、再燃 9 例、無効 7 例であった。RVR 例の SVR4 は 50% と低率であり、治療終了後の再燃率は 53% と高率であった。各因子別 SVR4 は、男性/女性: 39%/39%、65 歳未満/65 歳以上: 36%/42%、

肝線維化 F0-2 /F3-4:36%/40%、IL28B SNP TT/non-TT:50%/36%、P/R 治療効果 partial/null:50%/31%であった。治療前の SMV 耐性変異と治療効果の関連については現在解析中である。P/R 無効例-TVR 療法非著効例では、RVR 25%(1/4)、EOT 50%(2/4)であったが、全例非著効であった(再燃 2 例、無効 2 例)。SMV 開始時の次世代シーケンサーによる薬剤耐性変異の解析では、再燃の 2 例では、各々、V36A(0.2%)/T54A(0.2%)/V55L(0.3%)/S122T (1.7%)、F43L(4.0%)/F43S(0.5%)/Q80L(81.0%)/S122N(17.3%)が検出され、無効の 2 例では、1 例で V36F(1.1%)/Q80L(99.7%)が検出され、他の 1 例では変異は検出されなかった。また、無効例の 2 例では、治療中止時に SMV 開始時に認めなかった D168V と D168E が検出された。

D. 考察

IFN-based therapy においては、Direct-acting antiviral(DAA)との併用においても、IFN 治療へのウイルス反応性が不良な前治療(P/R)無効例では、高い著効率は期待できないものと考えられた。さらに、こうした DAA を併用した治療の非著効例では、ほとんどの症例で耐性変異ウイルスが出現し、その後の IFN-free の DAAs 治療に影響を及ぼす可能性がある。今後、治療前/治療後のウイルス変異と治療効果との関連について、Direct sequence 法や Deep sequence 法を用いた詳細な検討が必要である。

E. 結論

本検討における P/R 無効例に対する SMV3 剤併用療法では、治療終了後、約半数に再燃を

認めた。また、P/R 無効例-TVR 療法非著効例では、全例非著効となったが、SMV 開始時には TVR 耐性変異(V36,T54,V55)は消失あるいは微量であり、SMV 併用療法の治療効果に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。今後、症例を重ねて検討を行なう予定である。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

- 1) Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, et al. Using early viral kinetics to predict anti viral outcome in response-guided pegylated interferon plus ribavirin therapy among patients with hepatitis C virus genotype 1. *J Gastroenterol.* 2014 Apr;49(4):737-47
- 2) Harada N, Hiramatsu N, Oze T, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients with normal alanine aminotransferase treated with pegylated interferon and ribavirin. *J Viral Hepat.* 2014 May;21(5):357-65.
- 3) Hiramatsu N, Oze T, Takehara T. Suppression of hepatocellular carcinoma development in hepatitis C patients given interferon-based antiviral therapy. *Hepatol Res.* in press

2. 学会発表：

- 1) 平松直樹、林 紀夫、竹原徹郎 . “TVR/Peg-IFN/RBV 併用療法における TVR 投与量が与える治療効果ならびに副作用へのインパクト” シンポジウム「難治性C型肝炎治療の展望」第 100 回日本消化器病学会大会 (東京) 2014

2) 小瀬嗣子、平松直樹、竹原徹郎．“高齢者
C 型肝炎に対するプロテアーゼ阻害剤併用療
法の現況と有用性 - 多施設共同研究 - ” ワー
クショップ「高齢者肝疾患の最適医療：個別化医
療の工夫」第 18 回日本肝臓学会大会、第 56
回日本消化器病学会大会(神戸) 2014

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究委託事業（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）

HCV に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の病態に関する研究

SVR 後の発がん関連因子の検討

担当責任者：黒崎雅之 武蔵野赤十字病院 消化器科部長

研究要旨：C 型慢性肝炎の治療法の進歩により、発がんリスクの高い症例でも HCV 駆除が可能となり、今後は SVR 後の発がんが増加する可能性が危惧される。本年度の研究では、1992 年から 2009 年までに従来型のインターフェロン単独あるいはリバビリン併用療法により SVR を達成した症例における発がんリスクを分析し、SVR 前のデータと発がんとの関連性を検討した。年齢の発がん予測における AUROC は 0.73、最適 cut off 値 58 歳の感度は 90%であった。肝線維化を反映する血小板数の AUROC は 0.70、15 万以下の発がん予測における感度は 56%、特異度は 69%であった。SVR 達成後の AFP 値も発がんの有意な予測因子であり AUROC は 0.72、最適 cut off 値は 5.6 以上の感度は 61%、特異度は 80%であった。AFP 値は、高齢、肝線維化進行と関連する因子であったが、多変量解析では、これら 3 因子は独立危険因子であった。SVR 後の発がん例で、男性、AFP 値、高齢、肝線維化進行の 4 危険因子のうち、2 因子以上を保有していたのが 85%、3 因子以上が 52%であり、これらの因子保有数で発がんリスクの高い症例の一次囲い込みが可能であった。この一次囲い込みに該当する症例の中で、さらなる危険因子を同定することが来年度以降の課題である。

A. 研究目的

C 型慢性肝炎の治療法の進歩により、従来は治療困難であった高齢・線維化進行例などの発がんリスクの高い症例でも HCV 駆除が可能となった。その結果として、今後は SVR 後の発がんが増加する可能性が危惧される。

直接作用型抗ウイルス剤（DAA）を含む治療は現在の第一選択薬であるが、その臨床導入はテラプレビルは 2011 年、シメプレビルは 2013 年 11 月、ダクラタスビル・アスナプレビルは 2014 年 9 月であり、いまだ SVR 達成例の長期追跡データはない。今後はこれらの治療で SVR となった症例の前向き追跡は必須である。

本年度の研究では、従来型のインターフェロン単独あるいはリバビリン併用療法により SVR を達成した症例における発がんリスクを分析し、SVR 後の発がんリスク因子を同定した。

B. 研究方法

1992 年から 2009 年までに SVR を達成した C 型慢性肝炎の治療前のデータと、治療終了後の発がんとの関連性を検討した。

C. 研究結果

年齢は有意な発がん予測因子であり、その AUROC は 0.73、最適 cut off 値は 58 歳であった。58 歳以上の発癌予測における感度は 90%であった。肝線維化を反映する血小板数の AUROC は 0.70、最適 cut off 値は 15 万であった。15 万以下の発癌予測

における感度は 56%、特異度は 69%であった。同様にアルブミン値の AUROC は 0.70、最適 cut off 値は 4.0 であった。4.0 以下の発癌予測における感度は 68%、特異度は 65%であった。

SVR 達成後の AFP 値も発がんの有意な予測因子であり、その AUROC は 0.72、最適 cut off 値は 5.6 であった。5.6 以上の発癌予測における感度は 61%、特異度は 80%であった。高齢者や線維化進行例では SVR 達成後の AFP 値正常化率が、非高齢者と比較し 8%低下し、非線維化進行例と比較し 19%低下した。このように AFP 値は、高齢、肝線維化進行と関連する因子であったが、多変量解析では、これら 3 因子は独立危険因子であった。

SVR 後に発がんした症例は、男性、AFP 値、高齢、肝線維化進行の 4 因子のうち、2 因子以上を保有していたのが 85%、3 因子以上が 52%であり、これらの因子保有数で発がんリスクの高い症例の一次囲い込みが可能であった。

D. 考察

治療前因子の組み合わせで、SVR 後の発がんリスクが高い症例を囲い込むことができる。DAA 治療例に置いて、これらのリスク因子と発がんの関連を検討する必要があり、またこの一次囲い込みに該当する症例の中で、さらなる危険因子を同定することが来年度以降の課題である。

E. 結論

高齢、線維化進行、AFP の非正常化は、DAA を含まない治療で SVR となった C 型肝炎例における発がんに関連する因子である。DAA 治療における同因子の発がんへの寄与度について検討が必要である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yasui Y, Kudo A, Kurosaki M, Matsuda S, Muraoka M, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Matsunaga K, Nakanishi H, Tsuchiya K, Itakura J, Takahashi Y, Tanaka S, Asahina Y, Enomoto N, Arii S & Izumi N. Reduced organic anion transporter expression is a risk factor for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients: a propensity score matching study. *Oncology* 2014; 86:53-62.
2. Tamaki N, Kurosaki M, Matsuda S, Nakata T, Muraoka M, Suzuki Y, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Matsunaga K, Taki K, Asahina Y & Izumi N. Prospective comparison of real-time tissue elastography and serum fibrosis markers for the estimation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients *Hepatol Res* 2014;44:720-727.
3. Tamaki N, Kurosaki M, Matsuda S, Muraoka M, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y & Izumi N. Non-invasive prediction of hepatocellular carcinoma development using serum fibrosis marker in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 2014;

49:1495-1503.

2. 学会発表

なし

H. 知的所得権の出願・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

HCV に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の病態に関する研究
HCV 感染ヒト化肝臓キメラマウスの SVR モデル作製と肝病理組織学的及び遺伝子解析

担当責任者 坪田昭人 東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 基盤研究施設 教授

研究要旨

SVRは、抗HCV療法における効果判定基準の一つであり、短期的な血清学的エンドポイントに過ぎない。またSVR達成後の病態に関してはほとんどわかっていない。本研究では、ヒト化肝臓キメラマウスにおけるSVRモデルを確立すること、そのモデルを用いて肝組織内微細構造変化を再現すること、その微細構造変化の意義について特に電子顕微鏡学的検討を行うことである。現在進行中であるが、一部その結果が出始めており、さらに検討を進めている。

A. 研究目的

SVR (sustained virological response) は、抗 HCV 療法における効果判定基準の一つであり、短期的な血清学的エンドポイントに過ぎない。「“SVR = 肝炎治癒”としてよいのか?」、「何をもって肝炎の治癒なのか?」、「SVR 後いつまでフォローすべきか?」など明確にすべき課題は多い。また組織学的治癒が最終エンドポイントと考えられるが、SVR 後の肝組織内微細構造の変化や状態は未解明な部分が少なくない。SVR を達成したヒト対象での詳細な検討は、サンプルの入手困難さや倫理的な観点等より限界がある。本研究の目的は、それらの限界を克服するために肝臓をヒト化したマウスモデルを用いて、SVR 後の肝細胞内潜在的 HCV 残存の可能性や微細構造も含めた肝組織病理学的観点からの病態解明を行うことである。

B. 研究方法

HCV 持続感染ヒト化肝細胞キメラマウスの SVR モデル作製
公益財団法人 実験動物中央研究所
(神奈川県川崎) で樹立された
NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug} Tg(Alb-Plau)11-4/ShiJic マウス (7 週令・雄、以下 TK-NOG マウス) を東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター

実験動物施設内の TK-NOG マウス専用隔離個室 P2A で飼育した。自殺遺伝子

である thymidine kinase (TK) を肝細胞特異的に発現している TK-NOG マウスに独自のプロトコールで基質である ganciclovir (GCV) を腹腔内投与し肝傷害を惹起させ、相応の肝傷害が生じた段階で尾静脈投与により HCV を接種した。

接種後 1~2 週毎に血清 HCV 量 (real-time PCR) を測定し、HCV の持続感染が確認された後に DAAs (direct-acting antiviral agents) を 4 週間連日投与し、血中 HCV を陰性化させた。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京慈恵会医科大学の動物実験委員会、病原体等安全管理委員会、遺伝子組み換え実験安全対策委員会、倫理委員会で承認済みである。

HCV 持続感染ヒト化肝細胞キメラマウス SVR モデルの肝細胞微細構造の検討

上記の血中 HCV 陰性化を“SVR”状態とみなし、マウスの肝組織内 HCV 残存の可能性を HCV 遺伝子レベルや微細構造の変化を電子顕微鏡や免疫組織学的に検討した。

C. 研究結果

HCV 持続感染ヒト化肝細胞キメラマウスによる SVR モデルの確立
ヒト血清アルブミン濃度は 0.8~3.7 mg/mL であり、ヒト肝細胞置換率に換算すると約 80%のマウスが 40~70%

の範囲にあった。血清 HCV RNA 量は接種後 6~8 週で 5.1~7.3 log copy/mL に達していた。DAAs 投与後は速やかに血清 HCV RNA 量が低下したが、必ずしも陰性化には至らず一部に留まった。

HCV 持続感染ヒト化肝細胞キメラマウス SVR モデルの肝細胞微細構造の変化

DAAs により HCV 持続感染から持続陰性化したヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞を 2.5% glu- taraldehyde 固定後処理し、電子顕微鏡検査で検討した結果、今回の検討では明らかな HCV に特徴的所見は得られなかった。

D. 考察

HCV 持続感染ヒト化肝細胞キメラマウスによる SVR モデルの確立
TK-NOG マウスの GCV による肝傷害の程度は予想以上に個体間で相当な差がある。おそらく GCV に対する感受性の相違によるものと考えられる。したがって、ヒト肝細胞移植に最適な肝傷害範囲 (ALT 200~500 IU/L) の調整が難しい。肝傷害の程度をその都度見極めながら適量の GCV 投与を調整しなければならない。本研究では段階的投与のアルゴリズムを作成し有用なことが確認できた。またヒト肝細胞移植時にも解凍後の肝細胞維持方法、iPS 再生医療で実用化されている方法の適用、肝細胞増殖因子の投与、移植後の GCV 投与などの工夫でさらにヒト肝細胞置換率の向上とマウスの生存率が期待できるものと考えられた。

HCV 持続感染ヒト化肝細胞キメラマウス SVR モデルの肝細胞微細構造の変化

HCV 感染に特徴的な肝細胞微細構造に関しては議論の余地があり、一定の見解を得るまでには至っていない。臨床では SVR 症例からの発癌が最も重要な問題であり、SVR 症例をどのように経過観察していくかが課題である。SVR 後の病態が明らかになれば、その解決の手がかりになり得る。特に発癌と関連する肝細胞微細構造の電子顕微鏡所見がわかれば、その本態に迫れると思われる。SVR 後の所見のみならず HCV 持続感染状態の所見や実際の HCV 患者症例・SVR 患者症例での肝組織学的検討が必須である。

E. 結論

HCV 感染ヒト化肝臓キメラマウスの SVR モデルが作製できた。ヒト化肝臓マウスモデルを介して SVR を再現することで、SVR 後の肝組織内病態が解明され得る。しかし、いくつかの課題も浮き彫りになった。キメラマウスのより確実に高いヒト肝細胞置換率への改良、より確実な HCV 持続感染後の陰性化への薬剤投与方法、さらに動物モデルと多くの臨床例の肝組織学的所見の照合などが必要である。SVR 後の肝組織内病態が解明できれば、肝障害の再燃や肝発癌の予測、“肝炎治癒”のより絶対的な診断基準を明示することができ、経過観察方法も含め患者・医療・社会の精神的・経済的負担を効率

的に軽減できると考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

1) Nakagawa A, Atsukawa M, Tsubota A, Shimada N, Abe H, Kondo C, Itokawa N, Arai T, Hashimoto S, Matsushita Y, Fukuda T, Nakatsuka K, Iwakiri K, Kawamoto C, Aizawa Y, Sakamoto C. Relationship between HCV dynamics and sustained virological responses in chronic hepatitis C genotype 1b patients treated with telaprevir-based triple therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014;26:1329-34.

2) Abe H, Tsubota A, Shimada N, Atsukawa M, Kato K, Takaguchi K, Asano T, Chuganji Y, Sakamoto C, Toyoda H, Kumada T, Ide T, Sata M, Aizawa Y. Predictors of response to 24-week telaprevir-based triple therapy for treatment-naïve genotype 1b chronic hepatitis C patients. *Gastroenterol Res Pract*. 2014:549709.

3) Atsukawa M, Tsubota A, Shimada N, Abe H, Kondo C, Itokawa N, Nakagawa A, Iwakiri K, Kawamoto C,

Aizawa Y, Sakamoto C. Serum 25(OH)D3 levels affect treatment outcomes for telaprevir/peg-interferon/ ribavirin combination therapy in genotype 1b chronic hepatitis C. *Dig Liver Dis*. 2014;46:738-43.

4) Furihata T, Matsumoto S, Fu Z, Tsubota A, Sun Y, Matsumoto S, Kobayashi K, Chiba K. Different interaction profiles of direct-acting anti-hepatitis C virus agents with human organic anion transporting polypeptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:4555-64.

5) Abe H, Tsubota A, Shimada N, Atsukawa M, Kato K, Takaguchi K, Asano T, Chuganji Y, Sakamoto C, Toyoda H, Kumada T, Ide T, Sata M, Aizawa Y. Factors associated with sustained virological response in 24-week telaprevir-based triple therapy for chronic hepatitis C genotype 1b patients with the IL28B minor genotype. *Hepatol Res*. 2014 [Epub ahead of print]

6) Tsubota A, Mogushi K, Aizaki H, Miyaguchi K, Nagatsuma K, Matsudaira H, Kushida T, Furihata T, Tanaka H, Matsuura T. Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p in poor virologic response to interferon-based combination therapy for chronic hepatitis C. *PLoS One*. 2014;9:e97078.

- 7) Atsukawa M, Tsubota A, Shimada N, Kondo C, Itokawa N, Nakagawa A, Fukuda T, Matsushita Y, Narahara Y, Osada Y, Yamaguchi H, Nakatsuka K, Iwakiri K, Kawamoto C, Sakamoto C. Effect of fluvastatin on 24-week telaprevir-based combination therapy for hepatitis C virus genotype 1b-infected chronic hepatitis C. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2014;26:781-7.
- 8) Tsubota A, Shimada N, Atsukawa M, Abe H, Kato K, Ika M, Matsudaira H, Nagatsuma K, Matsuura T, Aizawa Y. Impact of IL28B polymorphisms on 24-week telaprevir-based combination therapy for Asian chronic hepatitis C patients with hepatitis C virus genotype 1b. J Gastroenterol Hepatol. 2014;29:144-50.
- 9) Nagatsuma K, Hano H, Murakami K, Shindo D, Matsumoto Y, Mitobe J, Tanaka K, Saito M, Maehashi H, Owada M, Ikegami M, Tsubota A, Ohkusa T, Aizawa Y, Takagi I, Tajiri H, Matsuura T. Hepatic stellate cells that coexpress LRAT and CRBP-1 partially contribute to portal fibrogenesis in patients with human viral hepatitis. Liver Int. 2014;34:243-52.
- H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）
- 特許取得
特になし
実用新案登録
特になし
その他
特になし

2. 学会等発表

別紙報告

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）
委託業務成果報告（業務項目）

HCVに対する抗ウイルス治療後、SVR後の病態に関する研究

担当責任者：丸澤 宏之 京都大学医学研究科 消化器内科

分担研究課題：SVR 後の肝組織ゲノム解析

研究要旨：

近年、腫瘍細胞だけではなく、癌の発生母地となった慢性炎症組織中の非癌部の上皮細胞にも、発癌前の段階からすでに遺伝子変異やエピジェネティックな変化が蓄積されていることがわかってきた。そこで、次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム解析法を活用し、HCVの持続感染による慢性肝炎・肝硬変組織中に潜在・蓄積したゲノム異常の全体像を明らかにすることにより、SVR達成時に、すでに肝組織に発癌に必要な十分なゲノム異常を保有していることがSVR発癌に寄与しているという可能性を検証することを本研究課題の目的とする。今回の検討から、HCV感染による慢性肝疾患では、腫瘍発生前から多数の遺伝子変異が潜在性に蓄積していることが明らかとなり、これらの遺伝子変異が癌の発生や癌の進展に深く関与しているものと推定された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルスの基礎研究における昨今のめざましい成果を受けて、C型肝炎治療は、近年めまぐるしく進歩を遂げてきた。他方、SVR達成後に肝発癌を認める報告が以前より多数なされている。SVR後発癌の特徴としては、SVR後5年以内に診断されることが多く、診断時の進行度が早いことが報告されてきた。このように、SVR後発癌症例の臨床的特徴についてのエビデンスは蓄積されてきたが、なぜC型肝炎ウイルスを排除した後に肝発癌をきたすのかについては、諸説あるものの、その分子基盤については未だ明らかにされていない。

HCV感染による慢性肝炎/肝硬変を背景に発生する肝癌は、同時性・異時性に多発する(多中心性発癌)特徴を示すことが知られている。HCCは、HCV感染を背景とした慢性肝疾患から次々と新たな癌が発生するという特徴を有しており、他臓器の癌と比べても、根治的な局所治療後の無再発生存率が低く、極めて予後不良となっている。すなわち、発癌という観点からは、HCV感染による慢性肝疾患は、臓器全体がきわめて発癌ポテンシャルの高い前癌状態にあるといえる。近年、癌細胞だけではなく、癌の発生母地となった慢性炎症組織中の非癌部の上皮細胞にも、発癌前の段階からすでに遺伝子変異やエピジェネティックな変化が蓄積されていることもわかってきた。すなわち慢性炎症には、発癌に必要な遺伝子レベルでの異常を惹起する機構が備わっ

ているものと推定される。

近年のゲノム解析機器は著しく進歩し、次世代シーケンサーと呼ばれる高速シーケンサーが各研究分野に急速に浸透しており、本解析装置を用いた癌の遺伝子異常の研究成果も多数発表されている。本研究課題では、次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム解析法を活用し、HCVの持続感染による慢性肝炎・肝硬変組織中に潜在・蓄積したゲノム異常の全体像を明らかにすることにより、SVR達成時にすでに肝組織に発癌に必要な十分なゲノム異常を保有していることが、SVR発癌に寄与しているという可能性を検証することを目的とする。

B. 研究方法

1. 対象；

本年度は、HCV感染により発癌をきたした肝硬変症例において、癌部とともに、その背景となる非癌部の全エクソン解析を行い、腫瘍発生前から非腫瘍部肝組織に潜在するゲノム異常の全体像をとらえることを目標とした。解析対象は、多発HCCを有するHCV(+)肝硬変3症例と単発HCCの1症例、計4症例である。多発HCC症例では2つのHCCと非癌部肝硬変を、単発HCC症例においては癌部と非癌部の肝硬変組織の全エクソン解析を行った。

2. 方法；

各症例の肝癌腫瘍組織と非癌部である背景肝組織のそれぞれから抽出したDNAサンプルを対象とし、約60Mb

の全エクソン配列を網羅したオリゴキャプチャーでエクソン領域を選択的に捕捉回収し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列の決定を行った。引き続き、NextGENe ソフトウェアによる mapping、dbSNP との異同比較、KEGG を用いた pathway 解析など一連の情報解析を行い、体細胞変異部位の同定とその生物学的意義についての評価を行った。次世代シーケンサー解析には、最新の大量並列シークエンス・テクノロジーを活用した次世代シーケンサー（Life Technology 社 Ion Proton）を platform とした。この deep sequencing の特性を最大限に活用することにより、1 回のランあたりリード数は約 8,000 万、総解析塩基数は平均 5-10 Gb の遺伝子配列の決定と遺伝子発現プロファイル解析が可能となり、従来の方法では得ることができなかった飛躍的な遺伝子情報量を解析することが実現した。

C. 研究結果

まずはじめに、HCC の腫瘍部の全エクソン解析を実施した。7つの腫瘍組織の検討からは、計 768 遺伝子で 970 個の体細胞変異が生じていることがわかった。これらの遺伝子がどのような細胞機能に関連しているかを調べてみると、様々な代謝経路に関連した遺伝子が最も多く含まれていることがわかった。さらに、多発 HCC を有する 3 症例では、同時多発した 2 個の腫瘍間における変異パターンの傾向に違いがあることもわかった。症例 1 では 32 遺

伝子、症例 2 では 9 遺伝子と、2 個の腫瘍で検出された遺伝子変異の約 30% 程度が重複していたのに対し、症例 3 においては腫瘍間における遺伝子変異の共通点は全く認めなかった。つまり、前者では、同時多発した HCC は肝内転移により発生、後者は多中心性に個々に発癌してきたものと推定され、多発する HCC の発生経路の差異による遺伝的背景の違いを明瞭に反映しているものと考えられた。

次に、同様の全エクソン解析を非癌部肝硬変組織にも実施したところ、病理組織学的には腫瘍の発生を認めない肝硬変組織においても、多数の遺伝子変異が潜在していることが明らかとなった。驚くべきことに、症例によっては、癌部よりも多くの変異を有する例も存在していた。さらに、これらの変異の中には癌部と共通して存在する変異も認められ、これらの変異遺伝子の中には発癌に関わるものが含まれている可能性が示唆された。

D. 考察

近年のゲノム解析の進歩により、徐々に HCC におけるゲノム異常の全貌が明らかになりつつある。これらのゲノム情報を利用した新規治療の開発や個別化治療が期待されることはもちろんである。しかしながら、HCV 感染による慢性肝炎/肝硬変を背景として発生した HCC では、腫瘍組織の解析のみならず、その発癌母地となっている背景肝組織の評価はきわめて重要である。今回の検討により、HCV 感染による慢

性肝疾患では、腫瘍発生前から多数の遺伝子変異が潜在性に蓄積していることが明らかとなり、これらの遺伝子変異が癌の発生や癌の進展に深く関与しているものと推定された。今後、SVR後に肝発癌をきたした症例の肝組織において同様の検討を進めることにより、ウイルス排除にもかかわらず肝癌の発生に至る遺伝子異常の基盤を明らかにするとともに、経口剤による抗ウイルス療法により発癌予防が期待できる症例の絞り込みのための一助となる情報を集約することを目指していく。

E. 結論

HCV 治療後の SVR 症例の肝組織病態をゲノム異常の潜在レベルという視点から評価することにより、抗ウイルス療法を完了した症例中、将来の発癌リスクの高い群を絞り込むことができれば、治療後フォローアップの方法や期間などを個別化することが可能となり、医療経済的な波及効果も大きいことが期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeda A, Shimizu T, Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Mizuguchi A, Shimizu K, Hatano E, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Leptin Receptor Somatic Mutations are frequent in HCV-

infected Cirrhotic Liver and associated with Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2014. 146(1): 222-232.

- 2) Ueda Y, Kaido T, Ito T, Ogawa K, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Mori A, Miyagawa-Hayashino A, Hga H, Marusawa H, Chiba T, Uemoto S: Chronic rejection associated with antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2014. 97: 344-350.
- 3) Inuzuka T, Ueda Y, Morimura H, Fujii Y, Umeda M, Kou T, Osaki Y, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Reactivation from occult HBV carrier status is characterized by low genetic heterogeneity with the wild-type or G1896A variant prevalence. *J Hepatology*. 2014. 61: 492-501.

2. 学会発表

- (1) Ohtsuru S, Ueda Y, Chiba T, Marusawa H. Infectivity and clinical significance of defective hepatitis C virus clones in chronic hepatitis C patients. The 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2015.3.12-15,

Istanbul.

- (2) Inuzuka T, Ueda Y, Chiba T, Marusawa H. Clinical and viral characteristics of HBV reactivation from occult carrier status triggered by chemotherapy or immunosuppressive therapy. The 11th JSH Single Topic Conferences. 2014.11.20, Hiroshima.
- (3) 大鶴繁、上田佳秀、犬塚義、千葉勉、丸澤宏之. C型慢性肝炎における欠損型 HCV の感染病態と臨床的意義. 第 24 回抗ウイルス療法研究会総会 2014.5.7-9. 山梨.

H. 知的所得権の出願・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

特記事項なし

厚生労働科学研究委託事業（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））

HCV に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の病態に関する研究
委託業務成果報告（業務項目）

SVR 後肝障害症例の解析

担当責任者：林 和彦 名古屋大学医学部附属病院 病院講師

研究要旨：C型肝炎ウイルス変異とSVR後発癌の関連を解析して、発癌の高危険群を同定して、効率と経済的なフォローアップ法を考案する。SVR後発癌と非発癌の治療前のウイルス変異を解析して、その相違を検討することで、重要な変異を同定する。

E. 研究目的

C型肝炎ウイルス変異とSVR後発癌との関連を解析して、発癌の高危険群を同定する。画期的なHCV薬の登場でSVRが急増し、その病態の解明が必要となる。

継続した観察を行い、変異の影響を解明する。

E. 結論

HCVコア領域70番92番変異を投与前を測定したが、SVR発癌例が少なく更なる観察が必要である。

F. 研究方法

SVR後発癌と非発癌の治療前のウイルス変異を解析して、その相違を検討することで、重要な変異を同定する。

F. 健康危険情報

特記すべき事項は発生せず。

（倫理面への配慮）

書面でインフォームド・コンセント取得

G. 研究発表

1. 論文発表：

1) C型慢性肝炎におけるNS3とNS5A領域の薬剤耐性変異とペグインターフェロン 2b・リバビリン・テラプレビル併用療法の効果について

2. 学会発表：

1) Effect of Peginterferon alfa-2b and Ribavirin on Hepatocellular Carcinoma Prevention in Older Patients with Chronic Hepatitis C.

J Gastroenterol Hepatol.100-103 ; 2014

G. 研究結果

550例の治療前のHCVウイルス変異を測定した。そのうち190例の現在まで経過を観察した。5例のSVR発癌を確認したが、少数のため解析が困難であったので、残りの症例の解析を進める。

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：該当なし

H. 考察

HCVコア領域70、75、92番変異を解析したが、発癌例が少数のため、有意な検討が困難であった。今後残りの症例の解析と

2. 実用新案登録：該当なし

3. その他：該当なし

別紙 3

厚生労働科学研究費補助金（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））

HCV に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の病態に関する研究

委託業務成果報告（業務項目）

非肝臓細胞で複製可能な HCV 変異株とその miR-122 非依存的な複製

担当責任者 福原崇介 大阪大学微生物病研究所 助教

研究要旨：HCV は肝臓に感染指向性を持つが、これまでに肝外組織に病変性を認めることが知られており、HCV が非肝臓細胞でも増殖できる可能性が示唆される。HCV の増殖には肝臓特異的に発現している miR-122 が重要であるが、非肝臓細胞では miR-122 非依存的に HCV が複製・増殖している可能性がある。そこで miR-122 非依存的な HCV 増殖機構について検討するために、miR-122 ノックアウト Huh7 細胞を樹立した。ノックアウト細胞では、ウイルスタンパク質の翻訳活性や HCV 複製効率が顕著に抑制されたが、培養上清中への粒子産生が認められた。さらに、ウイルスを継代することで、ノックアウト細胞で高い感染性を認める HCV を得た。この HCV は miR-122 の阻害剤に抵抗性を示すことから、miR-122 に非依存的に複製していることが確認された。さらに、この変異株は非肝臓細胞由来の培養細胞においても miR-122 非依存的に効率よく複製することが可能であった。以上から、実際の患者体内において非肝臓組織がリザーバーとなり、HCV の持続感染を通してこうした変異 HCV が出現しうること、そして再活性化を引き起こす可能性が示唆された。

A. 研究目的

HCV 感染患者に対し、現在臨床現場では インターフェロンとリバビリンによる治療が行われているが、近年ウイルスタンパク質を直接標的とした抗 HCV 薬の開発により、劇的に著効率が上昇した。その一方で、これまでに、HCV 患者由来の末梢血単核球やマクロファージ、脳などの非肝臓細胞におけるウイルス RNA の複製が報告されている。この様な肝外組織でのウイルス増殖は、治療後に血中からウイルス RNA が検出できなくなったとしても、非肝臓細胞において HCV が潜伏感染

し、微量の感染性粒子を産生することで、ウイルス再感染を来す、リザーバーとなっている可能性を示唆している。しかしながら、これまで非肝臓系の細胞に HCV は感染し、ウイルスの複製が可能であることは示されてきたが、従来用いられてきた野生型 HCV では複製効率が低いため粒子の産生は検出できておらず、非肝臓細胞での感染性粒子の産生は実証されていない。今回、人工ヌクレアーゼを用いて miR-122 をノックアウトした Huh7 細胞を樹立し、miR-122 非依存的な HCV 増殖機構について検討した。

B. 研究方法

人工ヌクレアーゼを *In vitro* で合成した mRNA を導入することで発現させ、細胞をクローニングし、遺伝子解析することによって miR-122 のノックアウト Huh7 細胞を樹立した。それらの細胞に対する HCV の感染性を qRT-PCR および Focus forming assay によって検討した。また、より HCV 高感受性を示す Huh7.5.1 細胞を用い、同様に miR-122 のノックアウト Huh7.5.1 細胞で数代継代することで、適応した HCV 変異株を得た。この変異株を miR-122 阻害剤存在下で miR-122 ノックアウトおよび回復 Huh7 細胞に感染させ、その阻害効果の有無を検討した。また、非肝臓系の培養細胞である Hec1B や 293T 細胞に対して miR-122 存在・非存在下での野生型および変異型 HCV の複製効率を比較した。最後に、複数の非肝臓由来の培養細胞に対して野生型および変異型 HCV の複製効率を比較した。

(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「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」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、個人情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

HCV 感染 miR-122 ノックアウト細胞において、ウイルスタンパク質の翻訳活性や HCV 複製効率は顕著に抑制されたが、培養上清中への感染性粒子産生がわずかに認められた。一方、より HCV 高感受性で

ある Huh7.5.1 細胞由来の miR-122 ノックアウト細胞で高いウイルス増殖能が認められたため、ウイルスを継代することでノックアウト細胞に適応させた HCV 変異株を得た。この変異株を miR-122 ノックアウト Huh7 細胞に感染させると、miR-122 存在下における野生株感染に匹敵する増殖性を示した。一方、miR-122 存在下では、野生型と変異型 HCV の増殖性に有意な差は認められなかったため、この変異株は miR-122 への依存性が低下していることが示唆された。また、この変異株は野生株と比べ、miR-122 阻害剤に対してより抵抗性を示したため、miR-122 非依存性を獲得し、さらに効率良く複製可能となっていることが明らかとなった。また、変異型 HCV は、非肝臓系の培養細胞である Hec1B や 293T 細胞に対しても、miR-122 存在下に匹敵する高い HCV-RNA 複製効率を示した。その他複数の非肝臓由来の培養細胞に対しても同様に、変異型 HCV は高効率に複製することが可能であった。

D. 考察

今回の検討により、miR-122 ノックアウト細胞に HCV を適応させることで得られた変異株は、miR-122 非依存的な HCV 増殖が可能であることが明らかとなった。

また我々は、HCV の粒子産生には、肝臓特異的な脂質親和性のアポリポタンパク質 (ApoB や ApoE) のみならず、非肝臓組織でも発現が認められる他のアポリポタンパク質や両親媒性の α -ヘリックス構造をもつ分泌型タンパク質が重要であることを明らかにしている。アポリポタンパク質以外にもこうした特徴をもつタンパク質は種々の組織で発現していることから、今後は、複製能の高い変異型 HCV の感染により、非肝臓系細胞からの HCV 粒子産生の可能性を検討したい。

E. 結論

miR-122 非依存的に増殖する変異型 HCV は、miR-122 非存在下でも非肝臓細胞で2. 効率よく複製することができる。

F. 健康危険情報 特になし。

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. 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
5. 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

H. 知的所有権の出願・登録状況 特になし。

