

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化等研究事業

B型肝炎ウイルス構造解析による薬剤応答性の評価と新規治療薬開発に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 村上 善基

平成26(2014)年 5月

目 次

I . 総括研究報告	
B 型肝炎ウイルス構造解析による薬剤応答性の評価と新規治療薬開発に関する研究	
- 村上善基 -	1
II . 分担研究報告	
1 . インシリコスクリーニング方法による B 型肝炎ウイルス治療に貢献する活性低分子化合物の開発に関する研究	7
- 梅山秀明 -	
2 . B型肝炎における核酸アナログ投与の生命予後に与えるインパクト	14
- 熊田卓、豊田秀徳 -	
3 . HBVウイルス感染による肝線維化機序の解明	17
- 河田則文 -	
4 . HBV ウィルス変異体の次世代シーケンシングによる同定	22
- 田口善弘 -	
5 . 核酸アナログ治療における末梢血中HBV DNA量の推移と臨床背景に関する研究	24
- 田守昭博 -	
6 . 構造生物学的手法等を用いたB型肝炎治療薬の開発に関する研究	27
- 棚橋俊仁 -	
7 . B型慢性肝炎に対する核酸アナログ/PEG- IFN治療の現状と課題	31
- 榎本大 -	
8 . B型肝炎における経過予測及びにHBs抗原消失に關与するウイルス遺伝子変異の探索	36
- 本多隆 -	
9 . 抗ウイルス剤投与におけるによる薬剤応答性の評価	41
- 矢野嘉彦 -	
10 . タンパク質とリガド結合情報を活用したインシリコスクリーニング	45
- 岩館満雄 -	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	49
IV . 研究成果の刊行物・別刷	51

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
総括研究報告書

B型肝炎ウイルス構造解析による薬剤応答性の評価と新規治療薬開発に
関する研究

研究代表者 村上善基

大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学・准教授

研究要旨

本邦におけるB型肝炎ウイルス(HBV)感染者は1.5%程度と推定される。HBVに感染すると高率に慢性化し、年余の経過を経て慢性肝炎、肝硬変をへて肝細胞癌に至る。インターフェロン、核酸アナログ製剤でウイルスの複製はコントロールできるようになったが、宿主内のウイルスを排除することは困難であり、長期にわたる投薬が必要である。今回我々の研究班はHBVのウイルス構造解析によって薬剤耐性のメカニズムとウイルスの変異の関係を明らかにすること、in silico screeningによってウイルスタンパク機能阻害薬候補を探索し、新規治療方法を確立することを目的としている。

A. 研究目的

本邦におけるHBV感染者は150万人程度と推定される。HBVに感染すると高率に慢性化し年余の経過を経て肝硬変、肝細胞癌に至る。抗HBV治療として核酸アナログは、一定の効果を発揮しているものの投薬中止にてHBVは高率に再燃し、また長期投薬にて薬剤耐性HBVが出現することが懸念される。そのためより効果的で安全な薬剤の開発は急務とされている。

ヒト感染性ウイルスは宿主の免疫応答から回避し持続感染するために遺伝子変異

を高頻度に起こす。このことは抗ウイルス剤への耐性獲得を容易にしていると考えられている。しかし、これまでの遺伝子解析法では、HBV遺伝子に、当初から薬剤耐性を示す自然耐性変異が潜在的に存在していたのか、あるいは感染後にHBV遺伝子がヒト体内で変異し耐性を獲得したのか、評価することは困難であった。次世代シーケンサー(NGS)は高速かつ大量塩基配列解読装置であり、短時間に膨大なウイルス遺伝子塩基配列情報を得ることが可能である。今回の研究では、

核酸アナログによる治療前後に、慢性 B 型肝炎患者から HBV 遺伝子を抽出し、NGS によりウイルスゲノムのウルトラディープシーケンスを行い、コピー数別に HBV 株各クローンのカタログ化を実施する。また HBV の DNA polymerase タンパクの構造解析を行い現在使用しているラミブジン、アデフォビル、エンテカビルの DNA polymerase の catalytic domain との相互作用の起こりやすさを in silico screening を用いて推定し、薬効の治療効果予測を行う。これらの情報を集積し HBV の株ごとの薬剤応答を幅広く臨床の場で利用できるようにデータベース化し公表する、この情報は慢性 B 型肝炎治療方法の標準化に有用であると考えられる。

HBV に対する創薬の計画については、HBV は preS/S、preC/C、X、DNA polymerase と 4 種の ORF を持っている。それぞれのタンパクの機能を阻害する低分子化合物の探査に我々の開発した in silico screening を用いて行う。この方法は新規で低分子化合物を作成するのではなく既存の薬剤バンクや、低分子バンクと関心タンパクの相互作用を検討するもので、新規で薬剤を作成することがないために、創薬の費用と時間が大幅に軽減することが期待される。この方法を用いウイルスの生活環に関係する複数のポイントを阻害する薬剤の開発を試み、2 年以内に臨床第一相試験に移行を目指している。

B. 研究方法

ウイルスの持続感染系の樹立

免疫不全マウスにヒト肝細胞を生着した細胞 PXB 細胞 (フェニックスバイオ社・広島) は HBV や HCV に感染するため、これを用いての HBV の安定感染系の樹立を試みた。細胞培養液は dHGCM (DMEM+10%FBS, EGF, insulin, ascorbic acid, DMSO など) を使用した (Yamasaki et al 2006 J Hepatol)。感染源は HBV に感染したヒト血清 (5.7×10^4 、 5.7×10^5 、 5.7×10^6 copies/ml) を用いた。ウイルスの感染には感染源と PEG8000 (4%) を dHGCM 培地とともに添加した。薬剤の評価を行う際はこのときに同時に薬剤を投与する。一日目に培地交換、二日目に培地交換、7 日目に測定用の培養上清を除去し、dHGCM 培地を添加し、以下 5 日毎に上清を採取した (図 1) (持続感染系の樹立は村上が行った)。

抗ウイルス薬候補の検索

HBV ゲノムにコードされている Small HBs、Middle HBs、Large HBs、HBe Ag、HBc Ag、HBx protein、DNA polymerase に対して in silico screening を用いて抗ウイルス活性を持つ低分子化合物の検索を行った。(探索は梅山、岩館、田口が行った)

(2) ウイルス変異解析

環状である全ウイルスゲノムを増幅するプライマー配列を HBV の複製開始地点である direct repeat を認識する P-1 と P-2

を設計し、HBV 全ゲノム配列の増幅を実施した(Gunther S et al. 1995 J Virol)。全ゲノム配列に由来する PCR 産物のウルトラディープシーケンスをイルミナ社 MiSeq を用いて実施し、適切なリード数と適切なデプスの評価を行った。さらに、全ゲノム配列をカバーするより適切なプライマー配列の設計を実施した。また、適切なコントロールサンプルの構築を実施した。(ウイルス変異解析は棚橋、矢野、田口、村上が行い、検体と臨床情報提供を熊田、豊田、河田、田守、榎本、本多が行った)

(倫理面への配慮)

既にこの解析に関する臨床研究[大阪市立大学大学院医学研究科倫理委員会より次世代シーケンサーを用いた抗ウイルス薬による HBV 株出現の予測]について検体採取機関と当施設の倫理申請を行い、承認を受けている(平成 26)。

C. 結果

ウイルスの持続感染系の樹立

ヒト肝細胞由来の PXB 細胞を用いて HBV の安定感染系を樹立した。HBV に感染したヒト血清(5.7×10^5 copies/ml)を PEG とともに細胞上清中に投与すると感染し、7 日目では細胞上清中に HBVDNA が 3×10^5 copies/ml 検出され、17 日目より上清に HBs 抗原が検出された。またこれらの細胞の上清を新規 PXB 細胞の上清に投与すると同様に HBVDNA と HBs 抗原が上

清中に検出できることを明らかにした。またこの細胞は細胞上清中にアルブミンを 90 日間程度放出することを確認しており、感染初期における薬剤応答、薬剤候補の細胞毒性実験には有用である。この細胞系を使いエンテカビルの抗ウイルス活性を確認したところ投与第 17 日の上清中のウイルス量は 1/100 程度に低下していた。しかしインターフェロンで投与ではウイルス量の減少が同程度に期間では観察することができなかった。この系を使って低分子化合物のウイルス活性を検討する。

抗ウイルス薬候補の検索

HBV ゲノムにコードされている Small HBs、Middle HBs、Large HBs、HBe Ag、HBc Ag、HBx protein、DNA polymerase に対して in silico screening を用いて抗ウイルス活性を持つ低分子化合物の検索を行った。

その中で NTCP protein のモデリングの結果は 2 種の低分子化合物を得た。

HBcAg ; HBc Ag がコードしている protein に対して、モデルを創作した。

DNA polymerase 阻害剤は 4 種の低分子化合物を得たが、1 種は日本では入手不可能であったため、3 種類の化合物を上記の系で検討している。

さらに並列生物情報処理イニシアティブ (iPAB) のコンピュータで薬のための創るコンテストに参加している (<http://www.ipab.org/eventschedule/>)

contest)。標的タンパク質に対して阻害活性を持つと思われる化合物を iPAB が指定した化合物ライブラリーから予測し、化合物 ID を選ぶものである。iPAB はそれらの化合物をアッセイし、阻害物質のランキングを行うことになっている。標的にタンパクを HBV の ORF としてからら持っている膨大なライブラリー(220 万化合物)を使ったこのプロジェクトは薬剤探索には非常に有用である。

(2) ウイルス変異解析

標準的なB型肝炎ウイルス遺伝子配列 genotype CのAB246344を用いてウイルス変異のリファレンスとした。シーケンスエラーを検出するため、大腸菌で AB246344配列を人工合成しウルトラディープシーケンスを行ったところ、平均取得リード数は271万3千リード、ゲノムの各塩基部位に5万リード以上が得られており、変異解析の参照配列として条件は備えていると考えられた。

エンテカビルが投与予定、あるいは投与されているヒト患者5検体の血清から行ったウルトラディープシーケンスでは、平均取得リード数は254万5千リード、ウイルスゲノムの各塩基部位に6万リード以上が得られた。4検体のウルトラディープシーケンスにおいても、平均取得リード数は207万2千リード、ウイルスゲノムの各塩基部位に4万5千リード以上の配列情報が得られた。原理的に、4万クローン以上のHBV株の解析が可能であった。

プライマー配列であるP-1とP-2部位は取得リード数が減少するため、リード数の減少を補う目的で新たなプライマー配列7Fと7Rを設計した。2つのPCR産物(P-1とP-2および7Fと7R)によるマルチプレックスPCRライブラリーを構築し、ウルトラディープシーケンスを実施し、HBV遺伝子全長に一樣なリード数の確保が可能であった。構築したマルチプレックスPCRライブラリーにより、エンテカビル投与前7検体、投与後1検体のウルトラディープシーケンスを現時点で実施している。

D. 考察

HBVの複製系としてPXB細胞は約90日程度HBs抗原、HBVDNAを上清中に放出し、アルブミンも検出できるため、抗ウイルス活性を持った低分子化合物の一次スクリーニングには有用であると考えられた。また現在抗ウイルス活性を持つ低分子化合物のスクリーニングを行っており、それが今年の6月に終了できると考えており、その後順次 *in vitro* で薬効の確認と細胞毒性について検討する予定である。ウイルス変異解析は現在治療中の検体の解析をスタートしており、今年度は情報の収集を行い、治療効果予測式を作成する。

E. 結論

タンパク構造解析より新規抗ウイルス薬候補を選別し、*in vitro* で薬効と細胞毒性を確認し、*in vivo* 実験に進む薬剤を選択

する。また次世代シーケンサーにて薬剤耐性株の出現を予測し、構造解析を用いて薬剤耐性獲得メカニズムを明らかにし、治療前に治療方法の選択可能なアルゴリズムを作成する。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. なし

学会発表

1. 田守昭博、川村悦史、萩原淳司、藤井英樹、打田佐和子、岩井秀司、森川浩安、榎本大、村上善基、河田則文 HBV再活性化における宿主因子とウイルス因子に関する検討 第50回日本肝臓学会総会 平成26年5月29日 東京都
2. 榎本大、飯田綾子、打田佐和子、藤井英樹、元山宏行、小塚立蔵、萩原淳司、川村悦史、岩井秀司、森川浩安、村上善基、田守昭博、河田則文 当院におけるウイルス性肝炎患者の拾い上げに対する院内連携の試み 第50回日本肝臓学会総会 平成26年5月30日 東京都
3. 村上善基、田守昭博、河田則文 HBVを標的としたdirect antiviral agent (DAA)開発方法の試み 第50

回日本肝臓学会総会 平成26年5月29日 東京都

4. 村上善基、榎橋俊仁、田口善弘、豊田秀徳、熊田卓、榎本大、田守昭博、河田則文 次世代シーケンサーによる肝発癌に關与する miRNA の網羅的解析 第 100 回日本消化器病学会総会 平成 26 年 4 月 24 日 東京都
5. 上野綾子、田守明博、高田さゆり、小塚立蔵、元山宏行、川村悦史、萩原淳司、藤井英樹、小林佐和子、岩井秀司、森川浩安、榎本大、村上善基、河田則文 当院における急性 B 型肝炎の現状 第 40 回日本肝臓学会西部会 平成 25 年 12 月 6 日 岐阜市
6. 慢性 C 型肝炎治療効果予測方法の診断. 吉田香奈子、榎橋俊仁、伊丹沙織、松本佳也、村上善基、田守昭博、河田則文、岡田理菜、東健、田口善弘. 次世代シーケンサー第三回研究会 2013 年 9 月 4-5 日 (神戸国際会議場、神戸)

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

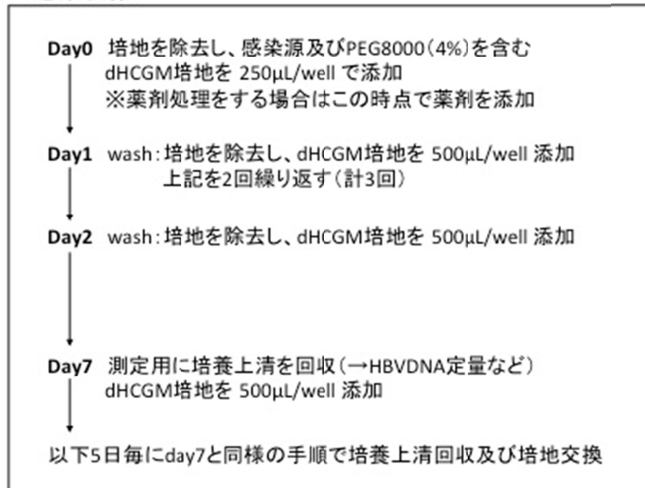
図 1

HBV 感染のプロトコール

PXB細胞への感染protocol

- ・プレート
Type I collagen coated plate
- ・PXB細胞播種密度
 2.1×10^5 cells/cm²
→24wellの場合 4.2×10^5 cells/well
- ・培地
dHCGM
(DMEM+10%FBS, EGF, Insulin,
Ascorbic acid, DMSO, etc.
Yamasaki et al, 2006, J.HepatoI)
- ・感染源
HBV感染患者血清
- ・感染時のHBV量
5~50 GEq/cells
→24wellの場合、
 $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ HBVDNA copies/well

<感染手順>



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

インスクリーニング方法による B 型肝炎ウイルス治療に貢献する活性低分子化合物の発見

分担研究者 梅山秀明 北里大学・名誉教授

研究要旨

B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染者において、病態の差異が genotype や遺伝子の変異、また宿主の免疫応答などが関与していて、感染者治療がとても難しい難病ではあるが、標的タンパク質を数種類に絞りながら、短期間のうちに、B 型肝炎ウイルス治療に貢献する活性化合物の提示を行い、共同研究者の実験を通して、毒性の少ない活性化合物を見出し、最終的には、多くの感染者の病状軽減を目指す。

A. 研究目的

横須賀、稲田 (千葉医学 83 : 133-138, 2007) によると、B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染者は日本では 120 万から 140 万人である。HBV が原因となる肝疾患には急性肝炎、慢性肝炎や肝細胞癌がある。それらの病態の差異には、HBV の genotype や遺伝子の変異、また宿主の免疫応答などが関与していると考えられている。この研究分担者報告では、HBV 関連の疾患に効果のある活性化合物を見つけたい。この新規化合物発見の前段階として、化合物の標的タンパク質の 3 次元構造をいくつか決定することが前提となる。

B. 研究方法

HBV DNA の比較的小さいゲノム上には、X

抗原遺伝子、C 抗原遺伝子、P 抗原遺伝子、S 抗原遺伝子に対応する 4 つの Open Reading Frame (ORF) が存在する。これらから 7 種類のウイルス蛋白が翻訳される。それらは Small HBs、Middle HBs、Large HBs、HBe Ag、HBc Ag、HBx protein、DNA polymerase である。BLAST : Basic Local Alignment Search Tool (NCBI からダウンロード) を使用して、上記標的タンパク質 (query : **目的タンパク質**) を対象にして、タンパク質の立体構造を集めた PDB data base から、アミノ酸配列の類似性指標の大きいタンパク質を探す。このとき統計的有意性の補償を前提としている。このように抽出し、検索された参照タンパク質 (subject) とのアミノ酸配列のアラインメントを参考にして、当該分担者らが作成し

たホモロジーモデリングプログラム FAMS を用いて、query の 3 次元立体構造をモデリングして、計算後に立体座標をファイルとして保存する。当該分担者が創った立体構造モデルは HBc Ag と DNA polymerase (AB246344 polymerase HBV genotype C) である。最初に、HBc Ag のタンパク質モデルを創作した。配列類似性割合が 89.2% である 4G93 (HUMAN HEPATITIS B VIRUS T = 4 CAPSID PROTEIN, ADYW STRAIN) を subject、即ち、参照タンパク質にして 3 次元モデルを創作した。次に、DNA polymerase (Reverse transcriptase) のタンパク質モデルも創作した。配列類似性が約 15% である 3C6T (HIV REVERSE TRANSCRIPTASE IN COMPLEX WITH INHIBITOR)、3KK2 (HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE-DNA COMPLEX WITH DATP BOUND IN THE NUCLEOTIDE BINDING SITE : REVERSE TRANSCRIPTASE P66 SUBUNIT)、3V4I (HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE WITH DNA AND AZTTP MOLECULE : HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE P66 SUBUNIT) を subject、即ち、参照タンパク質にして 3 次元モデルを創作した。さらに、宿主側において、HBV が侵入するとき、受容体として働く NTCP (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide) のタンパク質モデルも創作した。配列類似性が 21.5% である 3ZUX (A bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT) を subject、即ち、参照タンパク質にして 3 次元モデルを創作した。

(倫理面への配慮)

今のところ必要なし

(当該研究分担者がこの研究に関して、所有する知的財産と引用文献)

ChooseLD : 知的財産

[JP 特許番号第 4564097 号\(2010 年 8 月 6 日登録\)](#)

[インシリコスクリーニング装置、および、インスクリーニング方法](#)

[Chem Pharm Bull \(Tokyo\), 56\(5\), 742-744 \(2008\).](#)

C. 結果

ここでは、理解しやすいように、最初に NTCP protein のモデリングの結果を説明する。Query タンパク質のアミノ酸配列は NCBI の

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

サイトの Protein データベースからダウンロードした。配列を次に示す。

```
>gi|2498046|sp|Q14973.1|NTCP_HUMAN
```

```
RecName: Full=Sodium/bile acid
```

```
cotransporter; AltName: Full=Cell
```

```
growth-inhibiting gene 29 protein;
```

```
AltName: Full=Na(+)/bile acid
```

```
cotransporter; AltName:
```

```
Full=Na(+)/taurocholate transport
```

```
protein; AltName:
```

```
Full=Sodium/taurocholate
```

```
cotransporting polypeptide; AltName:
```

```
Full=Solute carrier family 10 member 1
```

```
MEAHNASAPFNFTLPPNFGKRPTDLALSIVLVFMLFFI
```

```
MLSLGCTMEFSKIKAHLWPKGLAIALVAQYGIIMPLTA
```

```
FVLGKVFRLKNI EALA ILVCGCSPGGNLSNVFSLAMKG
```

```
DMNLSIVMTTCSTFCALGMPLLLYIYSRGIYDGLKD
```

KVPYKGI V I S L V L V L I P C T I G I V L K S K R P Q M R Y V I K G
G M I I L L C S V A V T V L S A I N V G K S I M F A M T P L L I A T S S L
M P F I G F L L G Y V L S A L F C L N G R C R R T V S M E T G C Q N V Q L C
S T I L N V A F P P E V I G P L F F F P L L Y M I F Q L G E G L L L I A I F
W C Y E K F K T P K D K T K M I Y T A A T T E E T I P G A L G N G T Y K G E
D C S P C T A

この配列に対して3次元モデルの創作し、
結果を下記に示す(図1)。

TAUROCHOLIC ACID
(2-[(3beta,5beta,7alpha,12alpha,14beta,17alpha)-3,7,12-trihydroxy-24-oxocholan-24-yl]amino)ethanesulfonic acid
2-[[[(4R)-4-[(3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-3,7,12-tris(oxidanyl)-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoyl]amino]ethanesulfonic acid)をドッキングした創作モデルである。

このモデルのどこかと hepatitis B virus が相互作用をして宿主細胞に侵入するので、
阻害する化合物の最初の発見の試みとして、
この図に示される TAUROCHOLIC ACID と競合するような低分子化合物を検討するのも一つの手段と考えられる。
侵入のメカニズムは曖昧だが、一つの手がかりを見つけられかもしれない。

次に、当該分担者は gene C (HBcAg ; HBc Ag)がコードしている protein に対して、
モデルを創作した。

このアミノ酸配列は以下に示す。日本に感染者が多い標準的タイプのC型を取り扱った。

>gi|116812285|dbj|BAF36032.1| PreC/C protein [Hepatitis B virus]:212aa from GenBank: AB246344.1 Hepatitis B virus DNA, complete genome, clone : C_JPN22

MQLFHLCLII SCSCPTVQASKLCLGWLWDMIDPYKEF
GASVELLSFLPSDFPNI RDLLDTASALYREALSPEH
CSPHHTALRQAI LCWGELMNLATWVGSNLEDPASRELV
VSYVNVNMG LK I RQLLWFHI SCLTFGRET VLEYLV SFG
VWIRT P P A Y R P P N A P I L S T L P E T T V V R R R G R S P R R R T P
S P R R R R S Q S P R R R R S Q S R E S Q C

創作した3次元モデルを下記に示す(図2)。
ウイルスのコアタンパク質の集合促進化合物 (Assembly accelerator compound) AT-130 が結合されている3次元構造である。

実験として登録された参照タンパク質の結晶ユニットにはA鎖B鎖C鎖D鎖があり、
Cyan color はB鎖で、Green color はC鎖である。
Assembly accelerator AT-130 がB鎖C鎖の間に巧みに結合している。
C鎖に結合した AT-130 には他の結晶格子内のタンパク質が “B鎖に対するC鎖” のように繰り返して結合してくるので、この二つの AT-130 は同等の結合化合物と考えてよい。
しかし、
当該分担者はcore proteinの形成の阻害をして、Hepatitis B virus の阻害剤を見つけることを目的にしているの、むしろ、C鎖に結合した AT-130 より大きい化合物を探して、core protein の形成を阻害できれば幸いと考えている。

Core proteinに結合していない状態でNCBI

の化合物サイトからダウンロードした Assembly accelerator compound AT-130 の構造を下記に示す(図3)。

Assembly accelerator compound AT-130 に似ているという下記に示す化合物 BAS 00392625 をB鎖C鎖の間にドッキングを試みた。この時、当該分担者らが開発した ChooseLD プログラムを使用した。この化合物が阻害化合物として機能すれば、当該研究の目的と一致した現象となる(図4)。

上記に述べた方法で、より大きな化合物を結合させるつもりだが、Core proteinのウイルス殻の形成を阻害するかどうかは当該研究を進めてみないとわからない。しかし、新しい展開であることは確かである。

次に当該分担者は Viral DNA polymerase 阻害剤を探す試みを今年度に続いて来年度も続けるつもりである。AB246344 polymerase HBV genotype C: 290aa using HIVの配列をいかに示す。

>AB246344 polymerase HBV genotype C:
290aa using HIV alignment
NPHNTTESRLVVDVDFSQFSRGSTHVSWPKFVAVPNLQSLT
NLLSSNLSWLSLDVSAAFYH I PLHPAAMP HLLVGSSGL
PRYVARLSSTSRNI NHQHGTMQDLHDSCSRNLYVSLLL
LYKTFGRK LHL YSHPI I LGFRKI PMGVGLSPFLLAQFT
SAICSVVRRAPFHCLAFSYMDDIVLGAKSVQHLES LFT
SITNFLLSLGIHLNPNKTKRWGYS LNFMGYVIGSWGTL
PQEHIVLKLKQCFRKLPVNRPI DWKVCQRIVGLLGFAA
PFTQCGYPALMPLYACIQSKQAFT

当該分担者が創作した3次元モデルを次に示す。当該分担者は RNA base のタイプに

よって、基質の結合を阻害するタイプが変わるという仮説を作り、in-silico screening をするための鍵穴を2つ創作した。即ち、RNA base のタイプがプテリジン環とピリミジン環の場合を区別して in-silico screening を実行した。下記に使った鍵穴(ピリミジン環の場合)サンプルを示す(図5)。

さらに、HIV ではその存在が証明されている基質の反応を阻害するように induced-fit をおこした

HBV の3次元モデルを創作した。下記に示す(図6)。いろいろな induced-fit サイトに入りそうな化合物を中央にドッキングしてある。当該分担者は、このように RNA dependent DNA polymerase を阻害する化合物を来年度も見つけるよう努力する。

さらに、Hepatitis B virusのRNA dependent DNA polymerase の RNaseH ドメインの3次元構造を創作することを試すが、相当困難で、HIV の RNA dependent DNA polymerase の RNaseH ドメインの阻害剤を in-silico screening して、その結果を Hepatitis B virus の細胞実験で試すことも、当該研究代表者と検討するつもりである。

D. 考察

当該研究分担者の研究はタンパク質の3次元構造の創作とそれらを利用した In-silico screening である。Hepatitis B virusが HIV に似ているところもあるが、多々違ってもし

るので、理論担当である当該分担者は当該研究グループの代表者と当該研究グループのメンバーとよく議論して、この研究の成功、即ち、Hepatitis B virusに対する薬物の発見に向かいたい。

E. 結論

当該研究は2年目に入るが、当該研究分担者としては、来年度こそ、活性化合物を、In-silico screeningで提案し、Hepatitis B virusの患者に役に立つ研究をするつもりである。

F. 健康危険情報

研究分担者は関係なし。

G. 研究発表

1. 論文発表なし
2. 学会発表なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- なし
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

図1 .NTCP タンパクの三次元モデル

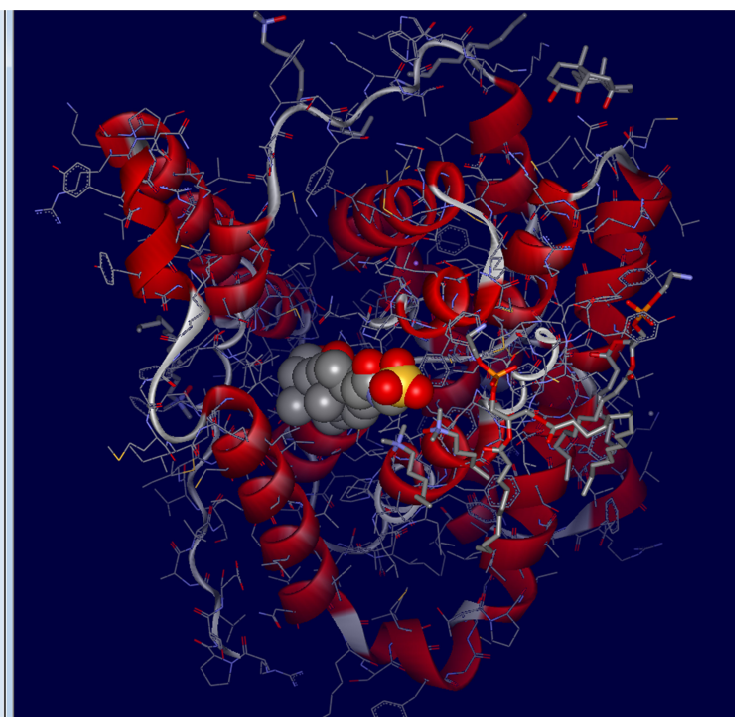


図2 .HBV core タンパクの3次元モデル

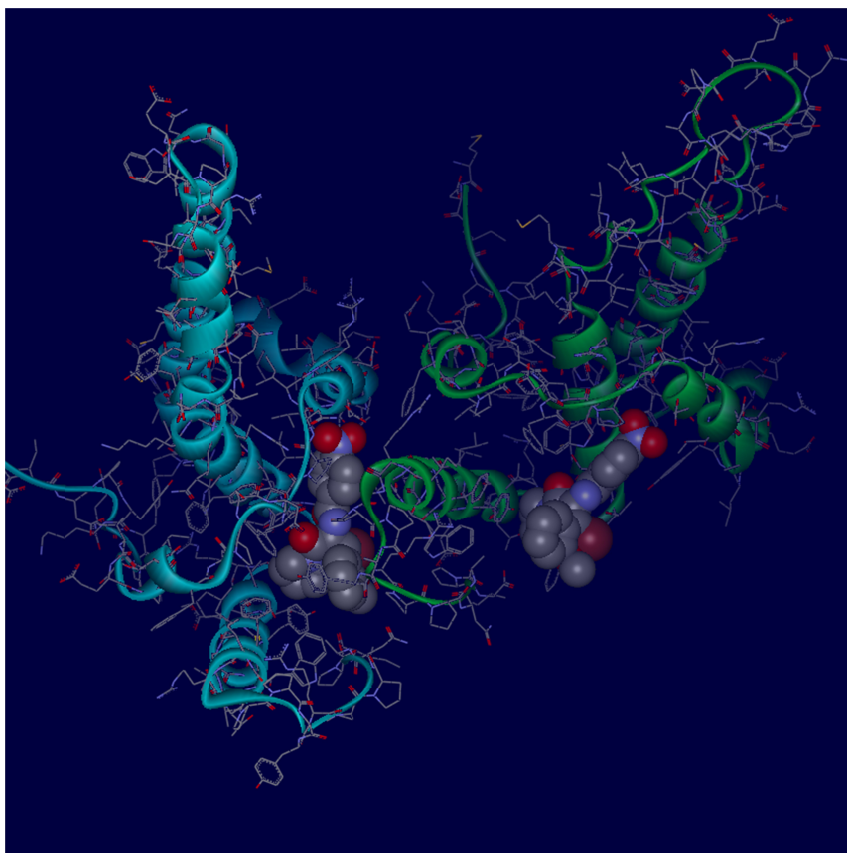


図3 .Assembly accelerator compound (AT-130)の構造

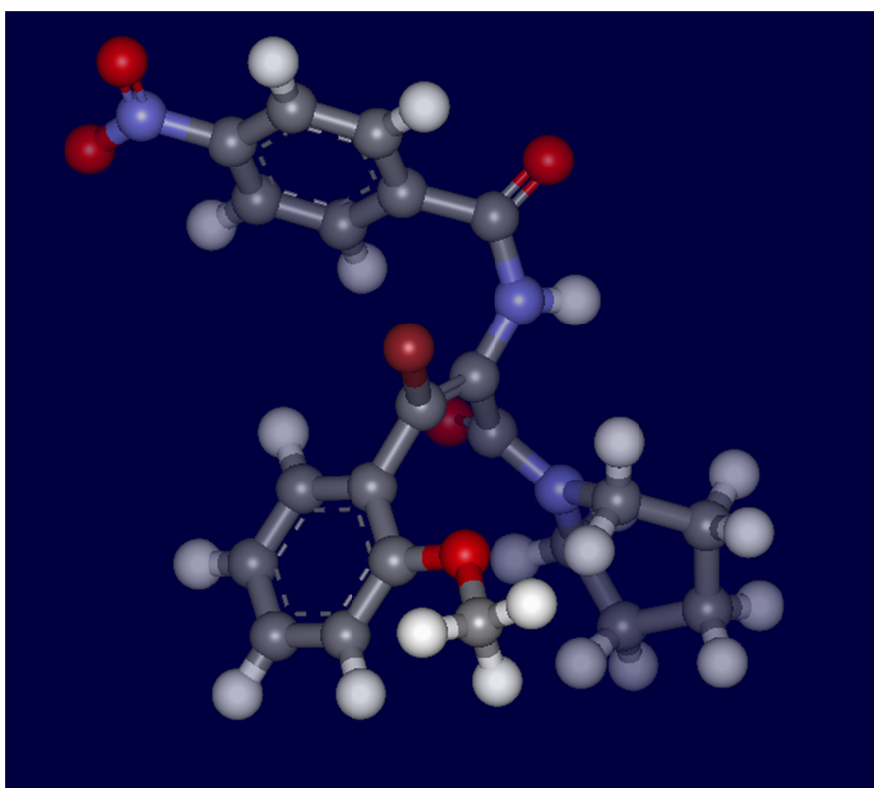


図4 .BAS 00392625(AT-130 に類似しているタンパク)と core タンパクのB鎖とC鎖のドッキングモデル

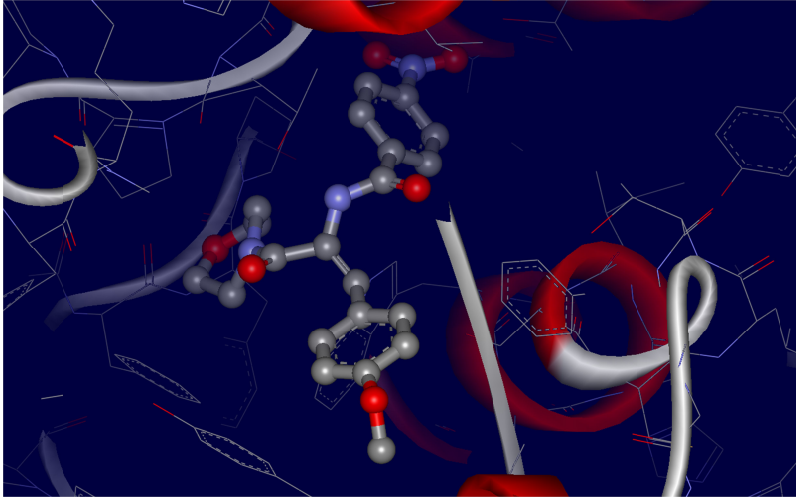


図5.RNA base がプテリジン環の場合の基質とタンパクの鍵穴のモデル

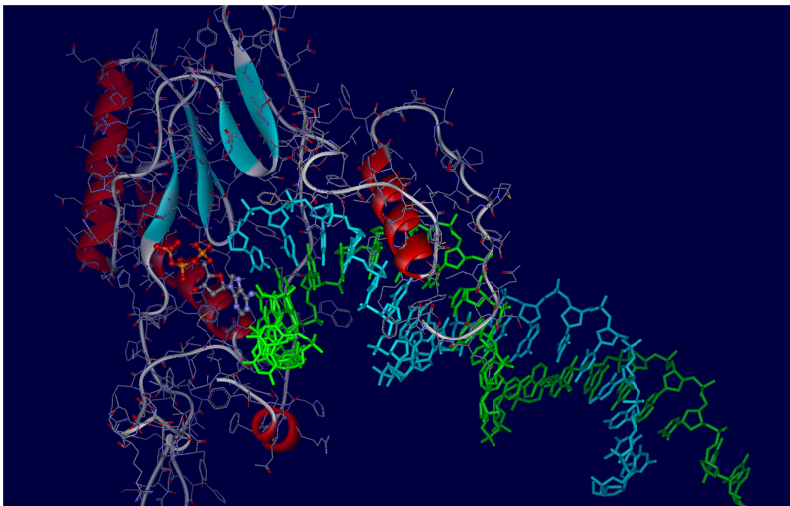
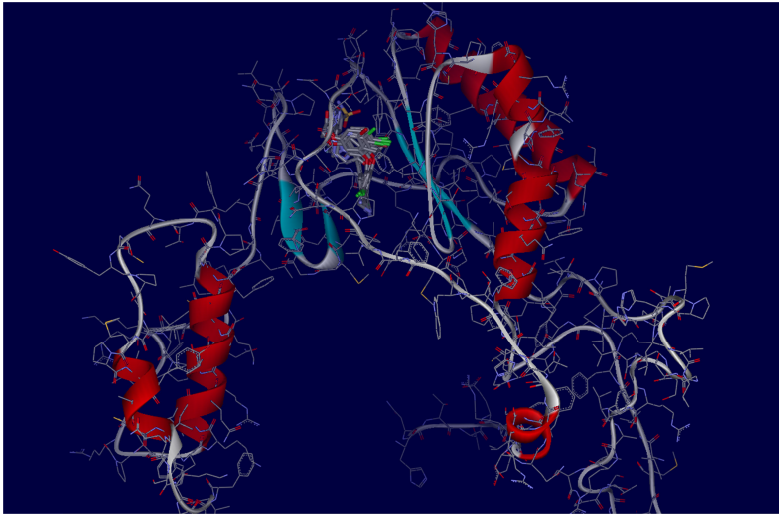


図6. 基質の反応を阻害する induced-fit を起こした HBV モデル



厚生労働省難治性疾患対策研究事業（肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
「B型肝炎ウイルス構造解析による薬剤応答性の評価と新規治療薬開発に関する研究」

B型肝炎における核酸アナログ投与の生命予後に与えるインパクト

分担協力者 熊田 卓 大垣市民病院 消化器内科 副院長

研究要旨:対象は大垣市民病院に1991年から2010年の間に受診したHBVキャリア2220例のうちHBs抗原が3年以上陽性、経過観察開始日から3年以上経過、血液生化学検査は年2回以上施行、NA群でNAは1年以上服用、発癌例では経過観察開始後1年以降で診断（NA群ではNA服用開始後1年以降に発癌）を満たす919例を選択し、検討1ではNA投与群149例、非投与群732例で肝癌関連生存率、肝疾患関連生存率、全生存率について検討した。検討2では発癌に関与するとされている年齢、性別、HBVDNA量、HBe抗原の有無、血小板数、ALT値の6因子を傾向スコア法でマッチさせNA投与群149例と、NA非投与群149例が選択し同様に肝癌関連生存率、肝疾患関連生存率、全生存率について検討した。検討1の結果では肝癌関連生存率、肝疾患関連生存率、全生存率に差は認められなかった。これはNA非投与群に非活動性キャリアが多く含まれたためと考えられた。背景因子を合わせた検討2では、NA投与群とNA非投与群の5年、10年、15年の生存率はそれぞれ98.6%と98.6%、96.3%と88.0%、93.1%と74.9%で、NA投与群が有意に長期間生存していた（ $P=0.002$ ）。肝癌関連生存率と肝疾患関連生存率ともにNA投与群がNA非投与群に比し有意に長期間生存していた（ $P=0.022$ および 0.013 ）。死因についてみると全死亡数の減少を認めたものの、死亡原因に占める肝疾患関連死、肝癌関連死の比率には差を認めなかった。

共同研究者

豊田秀徳 大垣市民病院消化器内科 医長
多田俊史 大垣市民病院消化器内科 医長

A. 研究目的

B型肝炎に対して核酸アナログ（NA）が保険収載され10年以上が経過した。NAが使用可能となつてからB型肝炎で非代償期の肝硬変となり不幸な転帰をとる症例は激減した。そして、NAの発癌抑制に関しても本邦から多くの報告が見られ（Matsumoto A, et al. Hepatol Research 2005, Kumada T, et al. J Hepatol, 2013, Hosaka T, et al. Hepatology, 2013）その効果は確認されている。しかし、B型肝炎におけるNA投与の生命予後に対する効果を確認した論文は少ない。

本研究では、当院で長期間観察したB型肝炎キャリアの長期予後をNA介入例と非介入例で比較し、NA投与が生命予後に与えるインパクトについて検討した。

B. 研究方法

1) 対象1 (hospital based cohort study)

対象は大垣市民病院に1991年から2010年の間に受診したHBVキャリア2220例である。これらのうちHBs抗原が3年以上陽性、経過観察開始日から3年以上経過、血液生化学検査は年2回以上施行、NA群でNAは1年以上服用、発癌例では経過観察開始後1年以降で診断（NA群ではNA服用開始後1年以降に発癌）を満たす症例は919例で、NA投与群149例、非投与群732例で肝癌関連生存率、肝疾患関連生存率、全生存率について検討した。

2) 対象2 (傾向スコア法)

NA群は1年以上服用

NA投与群187例とNA非投与群732例で、発癌に関与するとされている年齢、性別、HBVDNA量、HBe抗原の有無、血小板数、ALT値の6因子を傾向スコア法でマッチしたところNA投与群149例と、NA非投与群149例が選択された。これら2群を同様に肝癌関連生存率、肝疾患関連生存率、全生存率について検討した。

²乗検定もしくはFisherの直接確率計算法を使用した。生存率の算出はKaplan Meier法、差の検定にはlog rank検定を用いた。

C. 結果

1) 検討1

対象1の919例を使用して検討を行った。背景因子は表1に示すようにNA投与群は非投与群に比し高齢で、遺伝子型Cが多く、HBVDNA量もHBs抗原量もHBe抗原陽性率もALT値も有意に高値であった。一方、血小板は有意に低値であった

表1、患者背景 (検討1)

	NA投与群 (n=187)	NA非投与群 (n=732)	P値
年齢	53 (27-81)	48 (0-84)	<0.001
性別 (男性/女性)	112/75	399/333	0.186
Gyentotype (A/B/C/他)	2/6/170/1	32/70/476/3	<0.001
HBV-DNA (log copies/ml)	6.7 (0.0-9.9)	3.7 (0.0-9.9)	<0.001
HBs抗原 (IU/ml)	3.5 (0.6-5.5)	3.3 (0.1-7.9)	<0.001
HBcrAg (log copies/ml)	5.6 (2.9-7.0)	2.9 (2.9-7.0)	<0.001
HBe抗原 (陽性/陰性)	91/96	163/569	<0.001
プレコア (野生/変異)	39/127	110/416	0.481
コアプロモーター (野生/変異)	34/124	155/324	0.010
血小板 (/ μ l)	15.2 (3.2-38.8)	19.5 (3.7-55.1)	<0.001
ALT (IU/l)	69 (7-1088)	25 (5-3410)	<0.001
観察期間 (年)	10.9 (3.1-20.9)	10.8 (3.0-20.9)	0.828

図1は全体の生存曲線を示している。NA投与群とNA非投与群の5年、10年、15年の生存率はそれぞれ98.9%と99.3%、95.7%と93.9%、92.1%と88.9%で両群間に差は認めなかった

図2には肝癌関連したことで死亡した場合の生存率（肝癌関連生存率）と肝疾患に関連したことで死亡した場合の生存率（肝疾患関連生存率）を示した。1)の肝癌関連生存率と2)の肝疾患関連生存率はNA投与

群と NA 非投与群では差を認めなかった。

図1、全体の生存曲線(検討1)

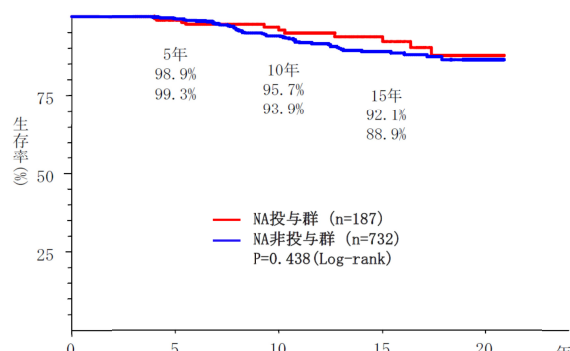
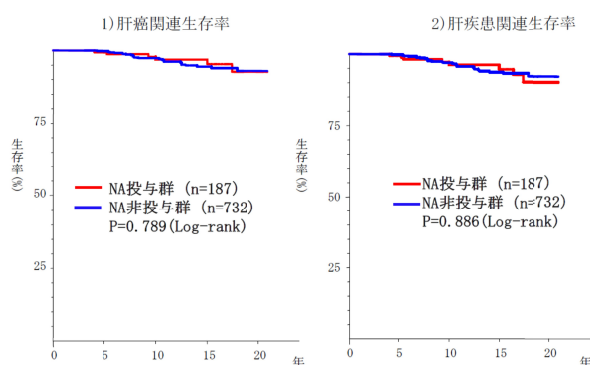


図2、肝癌関連生存率と肝疾患関連生存率(検討1)



経過観察中に NA 投与群で 11 例、NA 非投与例で 55 例死亡した。内訳をみると NA 投与群での死因は肝疾患関連死が 8 例 74.7% (うち肝癌関連死は 54.6%) であった。一方、NA 非投与群での死因の検討では肝疾患関連死が 29 例 52.7% (うち、肝癌関連死は 47.3%) であった。

2) 検討 2

検討 1 では NA 非投与群に非活動性キャリアが多く含まれ差が出なかったと考えられる、表 1 の背景因子の結果を見れば明らかである。このため発癌に關与するとされている年齢、性別、HBVDNA 量、HBe 抗原の有無、血小板数、ALT 値の 6 因子を傾向スコア法でマッチさせた。選択された NA 投与群 149 例と NA 非投与群 149 例の背景因子を表 2 に示す。NA 投与群で遺伝子型 C が多く、HBs 抗原量も多かったがそれ以外で差は認められなかった。

図 3 は全体の生存曲線を示している。NA 投与群と NA 非投与群の 5 年、10 年、15 年の生存率はそれぞれ 98.6%と 98.6%、96.3%と 88.0%、93.1%と 74.9%で、NA 投与群が有意に長期間生存していた (P=0.002)。

図 4 は肝癌関連生存率と肝疾患関連生存率を示した。肝癌関連生存率と肝疾患関連生存率ともに NA 投与群が NA 非投与群に比し有意に長期間生存していた (P=0.022 および 0.013)。

年齢、性別、NA 投与の有無、HBVDNA 量、HBe 抗原の有無、血小板、ALT の 7 因子を投入して、変数増加法で Cox 比例ハザードモデルで生存に關与する因子を検討すると、唯一 NA 投与の有無が選択され、NA 非投与群に対する NA 投与群のハザード比は 0.312

(0.142-0.686) であった。

表2、患者背景 (検討2)

	NA投与群 (n=149)	NA非投与群 (n=149)	P値
年齢	52 (27-81)	48 (0-77)	0.580
性別 (男性/女性)	87/62	92/57	0.554
Genotype (A/B/C/不明)	5/135/1/8	11/115/23/0	0.007
HBV-DNA (log copies/ml)	6.7 (0.0-9.7)	6.7 (0.0-9.9)	0.344
HBs抗原 (IU/ml)	3.5 (0.6-5.5)	3.4 (0.1-7.9)	0.033
HBcrAg (log copies/ml)	5.6 (2.9-7.0)	5.1 (2.9-7.0)	0.101
HBe抗原 (陽性/陰性)	71/78	74/75	0.728
プレコア (野生/変異)	0/34	0/23	0.105
コアプロモーター (野生/変異)	0/27	0/25	0.760
血小板 (μl)	15.2 (3.2-38.8)	15.2 (3.7-47.0)	0.711
ALT (IU/l)	65 (7-1088)	53 (10-3410)	0.054
観察期間 (年)	11.5 (3.1-20.9)	11.7 (3.0-20.9)	0.499

図3、全体の生存曲線 (検討2)

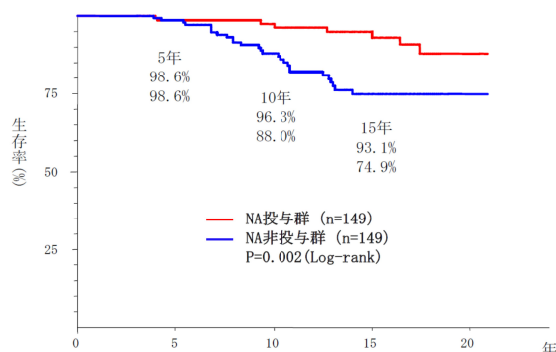
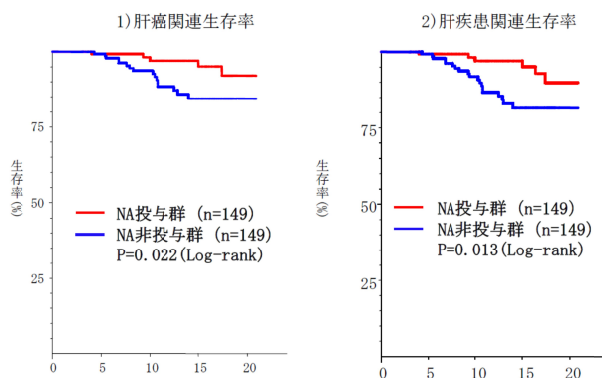


図4、肝癌関連生存率と肝疾患関連生存率(検討2)



死因についてみると、経過観察中に NA 投与群では 8 例死亡し、NA 非投与群では 27 例死亡した。比率は変わらないものの NA 非投与群での肝疾患関連死は 19 例 (うち肝癌関連死は 19 例) であり、NA 投与群の肝疾患関連死の 6 例 (うち肝癌関連死は 5 例) に比し多かった。

D、結論

今回の検討で背景因子を合わせて NA 投与群と NA 非投与群の生命予後を比較すると、明らかに NA 投与群の予後が良好であり、B 型肝炎における NA 投与の生命予後におけるインパクトが証明できた。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Murakami Y. Impact of hepatitis B virus integration into liver tissue on the efficacy of peginterferon and ribavirin therapy in hepatitis b virus-negative chronic hepatitis C patients. *J Clin Gastroenterol*. 2014 Jan; 48(1):73-9. doi: 10.1097/MCG.0b013e31829c409d. PubMed PMID: 23842217.
2. Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriyaama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Niinomi T, Yasuda S, Andou Y, Yamamoto K, Tanaka J. Effect of nucleos(t)ide analogue therapy on hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B patients: a propensity score analysis. *J Hepatol*. 2013 Mar; 58(3):427-33. doi: 10.1016/j.jhep.2012.10.025. Epub 2012 Oct 30. PubMed PMID: 23123221.

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）

分担研究報告書（平成25年度）

研究分担者 河田則文 大阪市立大学 教授

分担研究課題：HBV ウイルス感染による肝線維化機序の解明

研究要旨：慢性肝疾患では肝線維化の進展が患者の予後を左右するため、肝線維化のさらなる分子メカニズム解析、診断法や治療法の確立が急務である。慢性肝疾患の診断法においては血清バイオマーカーのように非侵襲的に肝線維化を診断することが臨床的に重要な課題であり、近年、血中マイクロRNA (miRNA)のバイオマーカーとしての有用性が議論されている。今回の研究では、B型慢性肝炎の肝線維化マーカーとなりうるmiRNAを同定することを目的とする。一方、我々はサイトグロビン (cytoglobin, Cygb)の肝炎症・線維化、発がんへの関与に注目しており、本分子のヒト肝組織での発現が線維化と関係する可能性を見出してきた。本研究では、ヒトB型慢性肝疾患組織におけるCygb発現に焦点を絞って解析する。

A. 研究目的

近年の抗肝炎ウイルス療法の急展開によりC型肝炎では高率にウイルス排除が得られるようになった。一方、B型肝炎では核酸アナログ製剤でウイルスを制御することは可能となったが、一旦感染したB型肝炎ウイルス (HBV)を肝細胞から駆除することは依然として困難であり、肝細胞内でのウイルス持続感染は肝臓における慢性的な壊死・炎症を惹起し、それに対する非実質細胞 (肝星細胞、筋線維芽細胞など)による修復と実質細胞 (肝細胞)の再生が、肝線維化と肝発癌に繋がると考えられている。従って、血清中のHBVをモニターするのみでなく、肝組織内の病態を把握できるマーカーが重要である。これまで肝線維化の評価は肝生検による病理診断で行われてきたが、侵襲的であり出血等の合併症の可能性もあるため反復検査は不可能である。近年、FibroScanのような組織硬度を測定する医療機器が開発されているが、高価であり全ての医療機関で導入されることは困難である。また、ヒアルロン酸やコラーゲン断片などのいわゆる血清中の線維化マーカー

も用いられているが、その正確性においてはまだ検討の余地が残されている。従ってB型肝炎においても血清バイオマーカーなど非侵襲的な方法で肝線維化を診断することは臨床的に重要な課題である。

一方、我々の研究グループではラット肝星細胞からサイトグロビン (cytoglobin, Cygb)というグロビン蛋白を見出した。即ち、Cygbはミログロビン (Mb)、ヘモグロビン (Hb)、ニューログロビン (Ngb)に次いで哺乳類4番目のグロビンであると判明した (J Mol Biol 2004;339:873; Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2006;62:671)。我々はCygbの生体内における役割を明らかにする目的でCygbノックアウトマウス (Cygb^{-/-})を作製し、ジエチルニトロサミン (diethylnitrosamine, DEN)による肝癌発生モデルを作製した。その結果、Cygb^{-/-}は野生型に比較して増強した肝線維化反応を伴いながら易発がん性を呈すること、さらに、その過程に酸化ストレスの亢進状態が関与することを観察した (Am J Pathol 2011;179:1050)。即ち、Cygb欠損は、DEN処理

下の肝臓において炎症・酸化ストレス・線維化反応を有意に増強させていた。以上のようなこれまでの研究を背景としてヒトの慢性肝障害におけるCygb発現を臨床サンプルで精査して、Cygbのヒト慢性肝障害への寄与、特に、B型慢性肝炎での発現変動を解析する。

B. 研究方法

1. 平成25年度

1) 患者への研究参加の説明と同意の取得

対象は肝生検を受けるB型慢性肝疾患患者。本研究は臨床検体(肝組織、血液)を対象としたものであり、所属大学である大阪市立大学医学部倫理委員会へは本研究の内容を報告し審査の上、承認を得た。

2) 臨床検体の採取と保存

・肝組織の保存：15G Tru-cut 針を用いて肝生検を行い、病理組織学的に肝臓の壊死・炎症と線維化診断に必要な量が十二分に採取された場合の余剰の肝組織の一部を本研究に用いる。得られた肝組織はRNAlater (Ambion Inc.) に速やかに浸透し2時間室温で静置した後、一旦-30℃で保存する。その後、mirVana miRNA isolation kit (Applied Biosystems)を用いてtotal RNAを抽出し-80℃で保存する。

・血清の保存：肝生検の前後あるいは抗ウイルス治療を行う際に経時的に血清を採取し-80℃で保存する。

3) データファイルの作成と管理

・臨床背景(年齢、性別、血液生化学所見、ウイルス学的検査、病理学的検査)のデータファイルを作成し、外部メディアの連結していないPCにて保存する。個人情報と臨床情報と連結可能匿名化を行い厳重に管理する。

4) マイクロアレイを用いたmiRNA発現の網羅的解析

これまでのC型肝炎における研究で、軽度肝線維化例と肝線維化進展例のmiRNA発現の網羅的解析結果を比較したところ、miR-199、200、221、222をはじめ数種類のmiRNAが肝線維化マーカーの候補としてあがった。今回の研究ではB型肝炎の肝線維化進展メカニズムがC型肝炎と異なると想定し、肝組織および血清においても同様にmiRNAの発現プロファイルの網羅的解析を行う。

5) リアルタイムPCRを用いたmiRNA発現の定量的解析

マイクロアレイ解析の結果、肝線維化に関与していると想定されるmiRNAの血中での変化を、リアルタイムPCRを用いて定量的に解析する。ここで用いるTaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems)ではmiRNAに特異的なプライマーを用いた逆転写と、その後のTaqManプローブを用いたリアルタイムPCRにより、前駆体ではなく成熟miRNAのみを特異的に定量することが可能である。

6) ヒト肝組織におけるCygbの発現

生検で得られたヒト肝組織を用いて、免疫染色でCygb発現を検討する。

(a)ヒトの慢性肝炎、肝硬変、肝がん組織におけるCygb陽性細胞の存在様式についての検討

ヒト肝組織の実質部、グリソン鞘や線維性隔壁部、がん部(C型とB型、非B非C型由来、がんも高分化型、低分化型など分化度を病理医とともに診断)をCRBP-1、Cygb、SMA、FBLN2に対する抗体を用いて染色し、Cygb陽性細胞の存在様式を明確化する。多重の蛍光抗体法を用いてその細胞の分類を行う。

(b)肝癌の腫瘍部とその周囲の非腫瘍部における筋線維芽細胞の挙動とそれらが発現する分子(特に TGF- β や VEGF などの増殖因子)とその受容体、さらには、細胞シグナルの活性化との関係性を詳細に検討し、Cygb 発現細胞の存在様式を明らかにする。

C. 研究結果

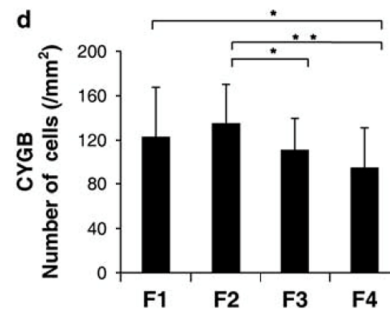
(1) B 型慢性肝疾患患者血清ならびに組織における miRNA 発現

- 患者への研究参加と同意の取得に関しては順調に進んでいる。同意の得られる患者においては肝生検を施行し、病理組織検査に用いる以外の組織検体の一部を miRNA 解析用に別途保存している。また、組織は病理学的に F0~F4 に分類してデータ収集している。同時に、抗ウイルス療法治療前後の血清を保存収集している。
- 血清中 miRNA の網羅的解析に向けた準備状況: Agilent 社の miRNA Array 解析に向けて患者血清から RNA 分画を採取収集している。また、近年エクソソーム中の miRNA が安定でよりよいバイオマーカーになりうる可能性が示唆されており、エクソソーム分画においても解析を行う予定である。
- さらに、当研究室では次世代シーケンサーも導入したので、これを用いた解析を行い、miRNA Array を用いた結果との相互関係について解析する予定である。
- C 型慢性肝炎において線維化との関連が強く示唆された miR-199, 200, 221/222 に関して、B 型慢性肝疾患との関連性を検討する。

(2) ヒト B 型慢性肝疾患組織における Cygb の

発現解析

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



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

D. 考察

癌研究の分野においては、ある種の miRNA が癌抑制遺伝子を制御することによって発癌に関与するなど、新たな知見が明らかになっている。これに対し、B 型慢性肝疾患の肝線維化機構における miRNA の意義を検討した研究の報告はほとんどない。我々は C 型慢性肝疾患において肝線維化とともに発現増加する新しいバイオマーカーの候補として miR-221 と miR-222 を見出した(Ogawa, Enomoto M, et al. Gut 2012)。すなわち miR-221 と miR-222 は、ヒトの C 型慢性肝炎において肝線維化の進行につれて発現上昇すること、I 型コラーゲンや

平滑筋アクチンの mRNA 発現と良好な相関を示すこと、2 種類の肝線維化動物モデルでも肝線維化の進行につれて発現上昇すること、培養肝星細胞の活性化に伴って発現上昇することなどを見出した。本研究では B 型慢性肝疾患において**肝線維化の進展に關与する** miRNA を同定し、臨床応用可能な肝線維化マーカーの開発を目指す。予想される結果として、i) miRNA を用いて非侵襲的に肝線維化を診断することが出来れば、反復して検査することが可能となり、治療による肝線維化改善効果を判定することが出来る。ii) また日常臨床上的利用のみならず、検診などにおいてのスクリーニング目的でも利用可能かもしれない。iii) 肝線維化は発癌の前段階と考えられるため、当該 miRNA は腫瘍マーカーとしても利用可能かもしれない。iv) 肝線維化の分子機構を解明することは、究極的には抗線維化治療の開発に繋がる可能性がある。

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

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

E. 結論

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

F. 研究発表

論文発表

1. Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver. Motoyama H, Komiyama T, Thuy le TT, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Iwai S, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Murakami Y, Yoshizato K, Kawada N. Lab Invest. 2014;94:192-207.
2. Combination therapy with a nucleos(t)ide analogue and interferon for chronic hepatitis B: simultaneous or sequential. Enomoto M, Tamori A, Nishiguchi S, Kawada N. J Gastroenterol. 2013;48:999-1005.

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

学会発表

1. Accelerated liver cancer development in Cytoglobin-deficient mice treated with chemicals/diet via the priming of stellate cells and activation of local fibrosis, inflammation, and oxidative stress. Le TT, Matsumoto Y, Hai H, Yoshizato K, Kawada N. AASLD-The Liver Meeting 2013, November 2-5, Washington DC, USA

G. 知的所得権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

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

HBV 変異体の次世代シーケンシングによる同定

分担研究者 田口善弘 中央大学・物理学科 教授

研究要旨

B型肝炎ウイルス(HBV)は他のウイルスと同じように高頻度で変異体を生成する。その結果、容易に薬物耐性を獲得することが憂慮される。次世代シーケンスを用いて得られた HBV ゲノムのショートリードデータから変異体を特定する技術の確立を目指す。

A. 研究目的

患者から分離した HBV ウイルスのゲノムを MiSeq でシーケンシングして得られたショートリードデータを用いて HBV ウイルスゲノムの変異を検出する方法論を確立する。

B. 研究方法

患者から分離した HBV ゲノムから他の分担者が作成した MiSeq によるショートリードデータを受け取る。データは患者単位で単一の fastq ファイルとして提供される。提供された fastq ファイルをリファレンスゲノムに bowtie を用いて貼り付ける（図 1）。

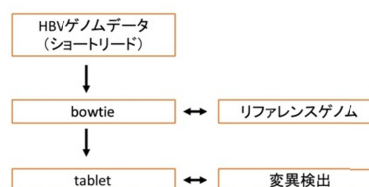


図 1 解析のデータフロー図

C. 結果

他の研究者から提供されたショートリードをリファレンスゲノムに張り付けた結果、十分な数のリードをリファレンスゲノムに張り付けることがbowtieにはあることが確認された。また張り付けたリード（アセンブリ）をtabletで可視化することで少なくともマジョリティのHBVゲノムの変異は検出可能であることを確認した（図 2）。

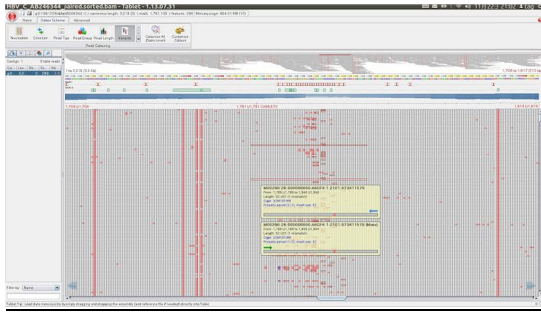


図2 ゲノムブラウザtabletで可視化されたリファレンスゲノムに対する患者から分離されたHBVゲノムアッセムブリに於ける変異検出例のスナップショット(赤)。

D. 考察

当初の想定ではマイノリティのHBVゲノム変異も検出することができるという想定であったが、実際にHBVゲノムから得られたショートリードデータをリファレンスゲノムに張り付けた結果、マジョリティ変異以外のゲノム変異はシーケンシング時に不可避免的に導入されるノイズと区別が難しいことがわかった。

E. 結論

MiSeqを用いたHBVゲノムのシーケンシングはリファレンスゲノムに対するマジ

ョリティの変異を検出するだけの精度があることが確認された。しかし、マイノリティの変異を検出するのはシーケンシングの精度的に困難であることがわかった。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

核酸アナログ治療における末梢血 HBVDNA 量の推移と臨床背景に
関する研究

分担研究者 田守昭博

大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学・准教授

研究要旨

B 型慢性肝炎例において核酸アナログであるエンテカビル治療は、安全でかつ安定した抗 HBV 効果を示すことが報告されている。しかし、全ての患者において同一の抗 HBV 効果を得ることができる訳ではない。そこで今回、核酸アナログ初回治療例 60 症例を対象としてエンテカビル投与後の HBV DNA 量の推移と患者臨床背景を比較検討した。その結果、薬剤内服コンプライアンスが不良であった 4 例の内、2 例においてエンテカビルに対する薬剤耐性が出現した。一方、コンプライアンスが良好でありながら HBV DNA 量が十分に低下しない症例には薬剤耐性を認めなかった。エンテカビルを 0.5 mg から 1 mg へ増量することで良好な抗 HBV 効果を獲得した。

A. 研究背景と目的

B 型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療にはインターフェロンか核酸アナログのいずれかが用いられる。核酸アナログの適応は肝線維化進展例および 40 歳以上の患者であるが、内服薬でかつ副作用が少ないことから、若年齢症例を含めて多くの患者に使用されている。一方、薬剤中止にて肝炎が再燃する率が高く、長期治療では薬剤耐性となった B 型肝炎ウイルス (HBV) の出現が知られている。現在、我が国において使用可能な核酸アナログ製剤の中でエンテカビルが最も薬剤耐性の出現頻度が低率で副作用も少ないことから第一選択薬とされている。今回の検討では、核酸アナログ初回治療例におけるエンテカビルの治療効果と抗ウイルス効果不良例への対策について臨床経過を解析

した。

B. 研究方法

対象は、エンテカビルが保険承認された 2006 年 9 月から 2012 年 9 月までに大阪市立大学病院においてエンテカビル治療を開始した 60 例である。内訳は男性 40 例、女性 20 例であり年齢の中央値 47 歳 (24 歳-68 歳)。HBV 遺伝子型は A-type 4, B-type 1, C-type 48, D-type 1 であった。バラクルード 0.5 mg 投与した。治療開始前の HBV DNA 量は 4.2 Log - 9.1 Log<であり中央値は 6.9 Log であった。(図 1)。

C. 研究結果

エンテカビル治療開始後、定期検査に来院し追跡可能であった症例は50例である。HBV DNA量が定量値未満(2.1 Log/ml)へ低下した経時的な推移は、6ヶ月;14%(7/50), 1年;33%(16/49), 2年;75%(33/44), 3年;79%(23/29), 4年;86%(18/21), 5年;94%(17/18)であった。エンテカビル内服のコンプライアンスが不良であった4例ではHBV DNAは2.1 Log/ml未満へ低下することはなく、内2例においてエンテカビル耐性を検出した。一方、内服コンプライアンス良好でありながらHBV DNAが1年を経ても3 Log/ml未満へ低下しなかった4例では薬剤耐性変異は検出されなかった。そこで4例に対して2年目以降、エンテカビルを1 mgへ増量して治療を継続した。増量後HBV DNA量の低下を認めた。

D. 考察

エンテカビルの標準投与量は1日1回0.5 mgでありほとんどの症例ではこの量にて十分な抗HBV効果を発揮している。しかし今回の解析では、初回核酸アナログ治療例においても0.5 mgでは治療効果が不十分であり、1 mgに増量することでその効果を発揮できる症例が存在することが明らかとなった。このような症例は、治療前のHBV DNA量が非常に多くかつHBe抗原陽性例であった。一方、ウイルス側要因では既報にあるエンテカビル耐性(図2)は検出していない。すなわちラミブジン変異に加えてT184A/F/G/L, S202G/I, M250Vの変異はなかった。しかし、これら耐性変異以外にも薬剤用量に依存したウイルス変異部位が存在する可能性がある。Direct Sequencingでは検出されず埋もれているHBVクローンの中には核酸アナログへの反応性も多様である可能性がある。今後は、次世代シーケンサを用いて多様なHBVクローンの存在を明らかにする必要がある。

E. 結論

既報の耐性変異以外にもバラクルードの抗HBV効果が不良となる症例が存在した

。その場合にはバラクルードの投与量を通常の倍量にすることにより治療効果の改善を認めた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. A prospective long-term study of hepatitis B virus reactivation in patients with hematologic malignancy. Tamori A, Hino M, Kawamura E, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. J Gastroenterol Hepatol in press

2. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia.

Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. PLoS One. 2014 Feb 10;9(2):e86449.

3. HLA class II associated with outcomes of hepatitis B and C infections. Tamori A, Kawada N. World J Gastroenterol. 2013 Sep 7;19(33):5395-401.

2. 学会発表

1. 前向き登録例の長期経過からみたHBV再活性化対策の現状。田守昭博他、肝臓 2013;54:Supp Page A446

2. B型慢性肝炎に対するPEG-IFNの早期抗ウイルス効果：Sequential療法も含めて。榎本大、田守昭博、河田則文。肝臓 2013;52:Supp. Page A484

3. 全数調査から見た輸血後B型肝炎ウイルス陽転例の解析-HBV再活性化の可能性-。田守昭博他、肝臓 2013;54:Supp Page A43

4.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特になし。

図1 エンテカビル治療中のHBV DNA量の推移

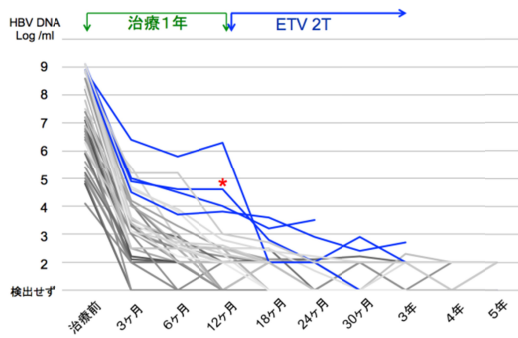
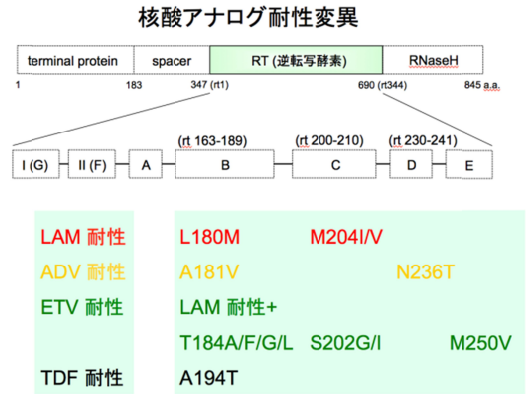


図2 HBVの核酸アナログ耐性変異



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

構造生物学的手法等を用いた B 型肝炎治療薬の開発に関する研究

分担研究者 棚橋 俊仁 神戸薬科大学医療薬学研究室 准教授

研究要旨

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

A. 研究目的

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

次世代シーケンサー（NGS）は高速かつ大量塩基配列解読装置であり、短時間に膨大なウイルス遺伝子塩基配列情報を得ることが可能である。予備検討では、2 万クローンに至る HBV 株の解析が可能であった。今回の研究では、核酸アナログによる治療前後に、慢性 B 型肝炎患者から HBV 遺伝子を抽出し、NGS によりウイルスゲノムのウルトラディープシーケンスを行い、コピー数別に HBV 株各クローンのカタログ化を実施する。このウイルス塩基カタログ情報は、抗ウイルス剤を投与する際の事前予測に役立つ、抗ウイルス剤の不適切な投与に伴う

耐性ウイルスの出現を抑制し、不要な医療費の削減効果をも期待出来るため、厚生労働行政上、有益をもたらす。

B. 研究方法

1. HBV ゲノム逆転写酵素配列 (694 bp) のウルトラディープシーケンス

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

2. HBV ゲノム全配列 (3215 bp) のウルトラディープシーケンス

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

(倫理面への配慮)

C. 結果

1. プールサンプル数の検討

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

5検体のウルトラディープシーケンスでは、平均取得リード数は254万5千リード、ウイルスゲノムの各塩基部位に6万リード以上が得られた。4検体のウルトラディープシーケンスにおいても、平均取得リード数は207万2千リード、ウイルスゲノムの各塩基部位に4万5千リード以上の配列情報が得られた。原理的に、4万クローン以上のHBV株の解析が可能であり、4検体をプールしたディープシーケンスの実施が、運用上適切であると考えられた。

2. マルチプレックスPCRライブラリーの構築

プライマー配列であるP-1とP-2部位は取得リード数が減少するため、リード数の

減少を補う目的で新たなプライマー配列7Fと7Rを設計した。2つのPCR産物(P-1とP-2および7Fと7R)によるマルチプレックスPCRライブラリーを構築し、ウルトラディープシーケンスを実施し、HBV遺伝子全長に一樣なリード数の確保が可能であった。構築したマルチプレックスPCRライブラリーにより、エンテカビル投与前7検体、投与後1検体のウルトラディープシーケンスを現時点で実施している。

3. コントロールゲノムAB246344の構築

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

D. 考察

ヒト体内においてHBVは、多様な変異体の集合として存在しており、抗ウイルス剤への耐性を示す自然耐性変異体の検出は、HBVゲノムの臨床的意義の解明へつながる。我々は、核酸アナログによる治療前後に、慢性B型肝炎患者からHBV遺伝子を抽出し、NGSによるウルトラディ

ープシーケンスで、4万クローンに至るHBV株を、薬剤応答別にカタログ化し得ることを明らかにした。さらに、核酸アナログの投与前から潜在的に微量に存在する薬剤抵抗性ウイルスを検出し得る可能性を示した。今後は、解析検体を増加させ、HBV株各クローンの塩基カタログをより多数例で推進させる。

エンテカビル投与前後のヒト患者血清からHBV遺伝子を抽出し、PCR法でHBV遺伝子全長を増幅させている。エンテカビル投与後は、ウイルス量が減少するため、PCR法での検出結果に影響を及ぼす。我々の検討では、 10^6 コピー以下のウイルス量では、シングルPCR法で、HBV遺伝子全長の増幅が困難である点を見出している。血清ウイルス量が 10^6 コピー以下の検体に対して、PCR法でHBV遺伝子全長をどの様にして検出するのか、今後の検討課題としている。

E. 結論

NGSによるウルトラディープシーケンスで、これまでになく膨大な塩基情報を、より高速で、より感受性高く同定し得ることが可能となりつつある。今回のウルトラディープシーケンスで、4万クローンに至るHBV株を、エンテカビルの治療効果別にカタログ化することを可能としている。このウイルス塩基配列情報を基盤とし、ウイルス蛋白の立体構造解析へと繋げ、抗ウイルス剤との親和性を検討

する。これら統合的な解析により、将来の慢性 B 型肝炎の治療の更なる改善が期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

該当なし

学会発表

次世代シーケンサーによる B 型肝炎ウイルス薬剤耐性領域の変異解析. 矢野嘉彦、岡田理菜、柵橋俊仁、Dewiyani Widasari、東健. 次世代シーケンサー第三回研究会 2013 年 9 月 4-5 日(神戸国際会議場、神戸)

慢性 C 型肝炎治療効果予測方法の診断. 吉田香奈子、柵橋俊仁、伊丹沙織、松本佳也、村上善基、田守昭博、河田則文、岡田理菜、東健、田口善弘. 次世代シーケンサー第三回研究会 2013 年 9 月 4-5 日(神戸国際会議場、神戸)

次世代シーケンサーを用いたクラリスロマイシン耐性ヘリコバクターピロリ菌の全ゲノム解析. 岡田理菜、柵橋俊仁、岩本彰、吉田幸生、菊池馨、慶田喜秀、吉田優、東健. 次世代シーケンサー第三回研究会 2013 年 9 月 4-5 日(神戸国際会議場、神戸)

H. 知的財産権の出願、登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

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

B型慢性肝炎に対する核酸アナログ/PEG-IFN治療の現状と課題

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

研究要旨

B型慢性肝炎に対してエンテカビル(ETV)/IFN sequential 療法を行った 37 例（従来型 IFN 使用 24 例、PEG-IFN 使用 13 例）における抗ウイルス効果について検討した。ETV から PEG-IFN への切り替えによって HBs 抗原低下が得られ、かつその低下率は従来型 IFN を用いた時より有意に大きかった。ETV から PEG-IFN への切り替えによって HBV DNA は若干上昇するが、投与中の HBV DNA は従来型 IFN を用いた時より低値に抑えられていた。PEG-IFN 終了後の長期経過は今後の検討課題であるが、少数例ながら HBs 抗原の陰性化が得られたことは注目に値する。

A. 研究目的

B型慢性肝疾患に対して、本邦では4種類の核酸アナログとインターフェロン(IFN)が使用可能である。核酸アナログは、強力な抗ウイルス効果を有し、経口薬であるためコンプライアンスが良く、自覚的な副作用もほとんど認めず、短期的には医療経済的にも優れる。ところが、中止後には高率に再燃が起るため投与は長期に及び、長期投与による耐性が問題となる。一方、IFNは免疫調整薬であるため効果は不確実であるが、効果が得られた場合は投与終了後も持続することが多い。

核酸アナログの中止を目的にIFNに切り替えるいわゆるsequential治療が試みられているが、一般的に本邦での成績は芳しくない。これは本邦ではB型慢性肝

疾患の約85%をgenotype Cが占め、genotype AまたはBに比較してIFN反応性が不良であることが一因として挙げられる。一方、我々は特に若年のB型慢性肝炎において、核酸アナログ短期投与でもHBe抗原陰性化が得られた症例では、IFN sequential療法の効果が良好であることを報告してきた。最近、B型慢性肝炎に対してPEG-IFN 2aの48週投与が承認され、成績の向上が期待されている。また治療目標としてALT、HBe抗原、HBV DNAに加え、HBs抗原の低下が重要視されるようになった。

そこでB型慢性肝炎に対するエンテカビル(ETV)/IFN sequential療法の有用性について、特に従来型IFNを用いた症例とPEG-IFNを用いた症例との比較を行っ

た。治療効果の判定については ALT 正常化、HBe 抗原陰性化、HBV DNA 低下に加え、HBs 抗原低下についても評価した。

B. 研究方法

対象

対象は当院ならびに関連施設において 2006 年以降に IFN sequential 療法を受けた B 型慢性肝炎 37 例である。

治療プロトコール

- 1) Non-PEG 群：2010 年以前の 24 例には ETV(バラクルード®、ブリストル・マイヤーズ)0.5 mg を約 48 週間投与した後、4 週間、従来型 IFN(オーアイエフ®、大塚製薬)500 万単位週 3 回を併用して中止し、その後 IFN を 20 週間単独投与した。
- 2) PEG 群：2010 年以降の 13 例には ETV を約 48 週間投与した後、4 週間 PEG-IFN 2a (ペガシス®、中外製薬)90~180 µg 週 1 回を併用して中止し、その後 PEG-IFN を 44 週間単独投与した。

治療効果判定

治療効果については、投与終了 24 週の ALT 正常化、HBe 抗原陰性化、HBV DNA < 10⁴ コピー/mL をもって著効とした。

(倫理面への配慮)

この臨床研究はヘルシンキ宣言を遵守し、GCP に基づいて実施している。被検者

の個人情報については、個人情報保護法に基づいて適切に取り扱う。また既に当施設の倫理申請を行い、承認を受けている(受付番号 1092、2186)。

C. 結果

従来型 IFN を用いた sequential 療法による抗ウイルス効果

Non-PEG 群(39±7 歳、男性 23/24、ALT 257±203 IU/L、genotype C 23/24、HBs 抗原 3.7±0.7 Log IU/mL、HBe 抗原陽性 24/24、HBV DNA 7.6±0.8 Log コピー/mL、F3/F4 17%)における IFN 開始時、IFN 終了時、終了後 6 ヶ月の HBs 抗原の変化(Log)は平均 +0.08、-0.21、-0.19、HBe 抗原陰性化は 29%、33%、29%、HBV DNA の変化(Log)は平均 -5.5、-4.4、-1.5、HBV DNA < 10⁴ コピー/mL は 100%、71%、21%であった。

PEG-IFN を用いた sequential 療法による抗ウイルス効果

PEG 群(36±6 歳、男性 8/13、ALT 297±346 IU/L、genotype C 12/13、HBs 抗原 3.4±0.6 Log IU/mL、HBe 抗原陽性 10/13、HBV DNA 7.5±1.5 Log コピー/mL、F3/F4 0%)における PEG-IFN 開始時、開始後 6 ヶ月、PEG-IFN 終了時の HBs 抗原の変化(Log)は平均 -0.01、-0.60、-0.90、HBe 抗原陰性化は 20%、60%、57%、HBV DNA の変化(Log)は平均 -5.2、-4.5、-4.6、HBV DNA < 10⁴ コピー/mL は 100%、77%、75%であった。PEG 群における IFN

開始後 6 ヶ月の HBs 抗原の低下は、Non-PEG 群に比較して有意に大きかった ($P < 0.05$)。

従来型 IFN と PEG-IFN の抗ウイルス効果の比較

投与終了 6 ヶ月後の効果判定において、Non-PEG 群の 5/24 (21%) に著効が得られた。PEG 群の効果判定可能例における著効は 1/4 (25%) であったが、1 例 (39 歳、男性、治療前 ALT 63 IU/L、HBs 抗原 902 IU/mL、HBe 抗原陰性、HBV DNA 5.0 Log コピー/mL、A1F1) では、PEG-IFN 24 週目に HBs 抗原陰性化が得られ、その後も著効を維持している。

D. 考察

フランスの Serfaty らは、ラミブジン / IFN sequential 治療のプロトコールを考案し報告した (*Hepatology* 2001; 34: 573-7)。彼らはラミブジンを 20 週投与した後、4 週間 IFN を併用して中止し、その後 IFN を 24 週単独投与した。これにはラミブジンにより HBV DNA 量を低下させることにより IFN の効果を増強させる目的と、IFN によりラミブジン中止後の再燃を防ぐ狙いがあると思われる。対象は B 型慢性肝疾患 14 例 (全例 IFN 投与歴あり、HBe 抗原陽性 11 例、肝硬変 5 例) であった。治療終了 24 週の時点で、57% に ALT 正常化、57% に HBV DNA 陰性化 (DNA プローブ法)、45% に HBe 抗原のセロコンバージョン、21% に HBs 抗原のセロコンバージョン

を認め、注目を集めた。しかし、症例数が少ないこと、比較試験でないこと、IFN 反応性の良い genotype A が半数近くを占めることが問題として残された。

我々も 2002 年以來、Serfaty らのグループに準じたプロトコールで HBe 抗原陽性例に対してラミブジン / IFN sequential 治療を行い、2007 年にその成績を報告した (*J Interferon Cytokine Res* 2007; 27: 201-7)。ラミブジンを約 24 週間投与した後、4 週間 IFN を併用して中止し、その後 IFN を 20 週間単独投与したところ、治療終了 24 週後に ALT 正常化かつ HBe 抗原陰性化かつ HBV DNA $< 10^4$ コピー/mL を満たした著効例は、24 例中 7 例 (29%) であった。

2006 年 9 月以降は、エンテカビルを約 48 週間投与した後、4 週間 IFN を併用して中止し、その後 IFN を 20 週間単独投与するプロトコールに変更した。エンテカビルの投与期間をラミブジンより長期に設定した理由は、1) ラミブジンは 6 ヶ月以上投与すると耐性変異の出現が危惧されたが、エンテカビルは少なくとも 1 年以内は耐性が生じないことが分かっていたからと、2) ラミブジン / IFN sequential 治療ではラミブジン投与中の HBe 抗原、HBV DNA の低下が良好な症例ほど治療効果が良かったからである。

更に 2011 年 9 月には B 型慢性肝炎に対して HBe 抗原陽性、陰性に関わらず PEG-IFN 2a の 48 週投与が承認された。それ以降はエンテカビルを約 48 週間投与した

後、4週間 PEG-IFN を併用して中止し、その後 PEG-IFN を44週間単独投与するプロトコールに変更した。そこで今回は特に従来型 IFN を用いた症例と PEG-IFN を用いた症例との比較を行った。

核酸アナログは HBV 複製過程の逆転写を阻害し、またチェーンターミネーターとして DNA 鎖伸長を停止させることによりウイルスの増殖を強力に抑制するが、肝細胞の核内に存在し複製中間体として働く閉環状完全二重鎖 DNA (cccDNA) には直接作用しない。そのため核酸アナログ治療の中止により、HBV は再び増殖し肝炎は高率に再燃する。最近、肝内の cccDNA 量と相関する血清マーカーとして HBs 抗原、HBcr 抗原が注目されている。HBcr 抗原はプレコア/コア領域から翻訳される HB コア抗原、HBe 抗原、p22cr 抗原などの総称であり、そのアッセイ系は本邦で開発された。

核酸アナログ/IFN sequential 治療には、大きく2つの目的が考えられる。まず、1)核酸アナログの中止を目的とするものが挙げられる。核酸アナログで HBe 抗原が陰性化した(または陰性)症例では、厚労省研究班の治療ガイドラインに準拠して sequential 治療を考慮する。ところが核酸アナログを導入した症例は、35歳以上の IFN 反応性の不良例や肝線維化進行例が多くを占め、実際には HBV DNA の持続的陰性化を目指し核酸アナログを継続することが多い。一方、核酸アナログで HBe 抗原陰性化が得られなくても、IFN

により著効が得られるものも存在し、若年で核酸アナログを導入した症例では sequential 治療を考慮して良いと考える。

2) IFN の効果増強を目的とするものが挙げられる。35歳未満で過去の IFN 単独療法に反応しなかった症例や、35歳以上でも IFN 投与歴のない症例には sequential 治療を考慮して良いと考える。

E. 結論

- 1) ETV から PEG-IFN への切り替えによって HBs 抗原低下が得られ、かつその低下率は従来型 IFN を用いた時より有意に大きかった。
- 2) ETV から PEG-IFN への切り替えによって HBV DNA は若干上昇するが、投与中の HBV DNA は従来型 IFN を用いた時より低値に抑えられている。
- 3) PEG-IFN 終了後の長期経過は今後の検討課題であるが、少数例ながら HBs 抗原の陰性化が得られたことは注目される。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

- 1 Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Kobayashi S, Sakaguchi H, Shiomi S, Kim SR, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Kawada N. Entecavir and interferon- sequential therapy in

Japanese patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. J Gastroenterol. 48: 397-404 (2013).

- 2 Enomoto M, Tamori A, Nishiguchi S, Kawada N. Combination therapy with a nucleos(t)ide analogue and interferon for chronic hepatitis B: simultaneous or sequential. J Gastroenterol. 48: 999-1005 (2013).

学会発表

1. 小塚立蔵, 榎本大, 川村悦史, 萩原淳司, 藤井英樹, 村上善基, 打田佐和子, 岩井秀司, 森川浩安, 田守昭博, 河田則文。B 型慢性肝疾患における核酸アナログ中止後の再燃リスクを規定する因子の検討。第 49 回日本肝臓学会総会 平成 25 年 6 月 6 日 東京都
2. 榎本大, 田守昭博, 河田則文。B 型

慢性肝炎に対する PEG-IFN の早期抗ウイルス効果：Sequential 療法も含めて。第 17 回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション 2「B 型肝炎治療の最前線」 平成 25 年 10 月 10 日 東京都

3. 田守昭博, 榎本大, 河田則文。前向き登録例の長期経過からみた HBV 再活性化対策の現状。第 17 回日本肝臓学会大会 シンポジウム 1「B 型肝炎ウイルス再活性化の予防・治療の現状と課題」 平成 25 年 10 月 10 日 東京都

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
2. その他
なし

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

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

分担研究者 本多 隆 名古屋大学医学部附属病院 助教

研究要旨

B型肝炎症例では自然経過でHBs抗原が消失する予後の良い症例と肝炎が持続して肝硬変、肝臓に至る症例がある。B型慢性肝炎に対する標準的治療には核酸アナログ治療やインターフェロン治療がある。しかしながらB型肝炎に対する核酸アナログ治療やインターフェロン治療を考慮する際、HBe抗体陽性となった症例において、その後ウイルス量が低下して肝炎が沈静化し自然経過で予後の良い、治療介入の必要ない症例と肝炎が持続し肝硬変に進むリスクがあり治療が必要な症例を見極めることが重要になる。HBe抗体陽性の少数例での検討では肝炎が沈静化して治療が必要ない経過となった症例の観察開始時にHBVDNAのCoreのI97Lの変異が高率に認められた。またHBs抗原消失症例でも同様な変異がみられた。

A. 研究目的

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

硬変に進むリスクがあり治療が必要な症例を見極めることが重要になる。

またHBeAg陰性例においてPreCore(PC)領域のG1896Aの変異によりstop codon(TAG)が形成されHBeAgの産生が停止することやBasal Core Promoter(BCP)のA1762T/G1764Aの変異でPreC mRNAの転写効率が低下しHBeAg産生が減少することが報告されている。しかし、PC変異やBCPの変異によりその後の経過を予測することは難しく、自然経過で変動するALT値やHBVDNA変動の時間的推移を勘案し適切な治療開始時を決定するこ

とが勧められている。現在日本の厚生省のガイドラインで B 型慢性肝炎 HBe 抗原陰性例では HBVDNA が 4 Logcopies/mL 以上かつ ALT が 3IU/L 以上で治療の介入をすすめている。しかし、retrospective に症例の経過をみると中にはその後、結果的に自然経過で治療が必要なかった症例もあり肝炎が沈静化するかどうか判断するための指標が望まれる。そこで本研究では HBe 抗体陽性症例において、その後の経過と観察開始時の HBVDNA 全塩基配列を比較検討し肝炎が沈静化するウイルス変異を同定することを目標とした。

B. 研究方法

検討 1. 全塩基配列による比較検討。

2 年以上の経過観察ができた慢性 B 型肝炎患者の対象例のうち観察開始時に血清保存がおこなわれている症例を対象とした。(A 群 n=10) 経過中 HBVDNA 5.0 LogIU/mL 以上、ALT 120 IU/mL 以上に上昇した症例。(B 群 n=12) HBVDNA 5.0 LogIU/mL 未満、ALT 60 IU/mL 未満で推移した症例。(C 群 n=13) HBVDNA 4.0 LogIU/mL 未満、ALT 30 IU/mL 未満で推移した症例(その後 HBsAg が消失した症例も含む) genotype C の合計 35 症例において経過観察開始時の保存血清を用いて、PCR を用いてダイレクトシーケンス法により HBVDNA の全塩基配列を決定し比較検討した。

BCP、PC 領域の変異を各群で比較検討した。また Envelope, Core, X, Polymeras

e 領域においてアミノ酸毎に各群における変異の割合が A 群<B 群<C 群となる変異を抽出し、各群における変異の割合を比較検討した。

検討 2 症例数を増加させ Core での変異の検討。

検討 1 で同定された coreI97L 変異を A, B, C 群に分けて症例数を増加させて Core 領域のダイレクトシーケンスを行い確認した。

患者背景

A 群、B 群、C 群の患者背景は HBVDNA が各群 6.2±1.6, 4.2±0.3, 3.5±0.9 copies/ml であり A 群と比較して B 群、C 群では有意に低値であった。また ALT 値は各群 105.8±1.6, 24.8±10.2, 18.8±6.4 IU/L であり A 群と比較して B 群、C 群では有意に低値であった。性別、年齢、T.Bil 値、Alb 値、血小板値、HBsAg 値において各群間に有意な差を認めなかった。

(倫理面への配慮)

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

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

C. 結果

検討 1.

PC, BCP 遺伝子の検討

PCのG1896A変異はA群で50%、B群で63.6%、C群で75.0%とA,B,Cとなるにつれ変異率が増加していたが、各群に有意な差は認められなかった。PC変異 G1899AはA群で10%、B群で9.1%、C群で25.0%とA,B,Cとなり、C群になると変異率が増加していたが、各群に有意な差は認められなかった。一方BCP変異のA1762TはA群で100%、B群で90.9%、C群で63.6%とA,B,Cとなるにつれ変異率が低下している傾向がみられた。

全遺伝子解析の各領域における遺伝子変異割合

Envelope に 3 カ所、Core に 4 カ所、Polymease に 2 カ所 A 群 < B 群 < C 群の割合で増加する変異がみられた。そのなかで Core I97L の変異は A 群 30%、B 群 50%、C 群 90.9%と B、C 群になるに従い高率に認められた (P=0.0154)。

検討 2.

A群n=28内HCC2例、B群n=18内HCC2例、C群n=15と症例数を追加してcore I97L変異を確認したところA群21%、B群50%、C群80%とB、C群になるにつれ変異率が上昇していた。C群15例中4例でS抗原が消失していた。

D. 考察

本研究で得られた HBeAg 陰性である genotype C の B 型慢性肝炎症例(Plt 低下、HCC 合併例を除く)においてその後 HBVDNA 4.0 LogIU/mL 未満、ALT 30 IU/mL 未満で推移した症例には core I97L の変異が高率に認められていた。

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

本症例では HBeAg が clearance された HBeAg 抗体陽性例を対象にしているが、Core I97L の変異は HBVDNA 5.0 LogIU/mL 以上、ALT 120 IU/mL 以上に上昇した症例では 30%と変異率は低率であり、一方 HBVDNA 4.0 LogIU/mL 未満、ALT 30 IU/mL 未満で推移した症例には core I97L の変異が高率に認められていた。Ehata らの論文では HBeAb が陽性であるものは 4 例全例で I97L 変異が陽性であった。この違いは以前の測定法では HBVDNA が低値まで測定できなかったため、HBVDNA 4.0 LogIU/mL 未満と低ウイルス量の症例が以前の報告では検討できていない可能性があると思われた。

一方、In vitro の解析では core 領域の I97 は HBVcapsid 粒子の構造や機能への感受性が高く重要な部位であり、I97L への変異により immature secretion が認められている (Bo Ning et al. J of Virology 2004;78:13653-1366)ことから、I97L 変異が認められる症例では HBVNDNA 量が低下してくることが推察できる。以上のことから肝硬変でない HBe 抗体陽性で HBVDNA が 4log copies/mL 未満になっている症例において、Core I97L 変異は B 型肝炎のその後の沈静化を予測するのに有用な可能性がある。

E.結論

Genotype C の B 型肝炎 HBe 抗体陽性例において、治療を選択するためにその後の経過を予測するには、HBVDNA、ALT の値に加えて Core I97L の変異測定が有用になる可能性が示唆された。

F.健康危険情報

特記事項なし。

G.研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. Takashi Honda, Yoshiaki Katano, Satoshi Nakano, Yoji Ishizu, Teiji Kuzuya, Kazuhiko Hayashi, Masatoshi

Ishigami, Hidemi Goto. Effect of combination therapy peginterferon alfa-2b and ribavirin on prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C and normal aminotransferase levels DDW2013 May 18, 2013 Orlando

2. 本多 隆、片野義明、後藤秀実。HBe 抗体陽性 B 型肝炎における経過予測に必要なウイルス遺伝子変異の検討。第 49 回日本肝臓学会総会 平成 25 年 6 月 7 日 東京都
3. 本多 隆、片野義明、後藤秀実。高齢者 C 型肝炎に対する PegIFN・Ribavirin・Telaprevir3 剤併用療法の治療効果。JDDW2013 平成 25 年 10 月 7 日 東京都
4. 本多 隆、石上雅敏、新家卓郎、今井則博、阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵一、中野 聡、石津洋二、葛谷貞二、林 和彦、中野 功、石川哲也、片野義明、後藤秀実。C 型肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン 併用療法著効後における発癌例の検討。第 40 回日本肝臓学会西部会 平成 25 年 12 月 6 日 岐阜市

H.知的財産権の出願、登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

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

抗ウイルス剤投与におけるによる薬剤応答性の評価

分担研究者 矢野嘉彦 神戸大学・微生物感染症学講座 講師

研究要旨

B型肝炎ウイルス(HBV)は、慢性肝炎から肝硬変、肝癌を引き起こす発癌ウイルスである。近年さまざまな核酸アナログ製剤をはじめ、抗ウイルス剤が開発され、治療効果が認められているが、ウイルス側の変異による耐性化の問題はいまだ認められる。本研究では、抗ウイルス剤投与下での HBV ゲノムの多様性(quasispecies)を検討することから薬剤応答性および耐性獲得のメカニズムを評価し、新規治療薬開発へつなげていくことを目的としている。神戸大学ではこれまでのインドネシアとの連携共同研究から、検体採取と解析を進めている。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)は、慢性肝炎から肝硬変、肝癌を引き起こす発癌ウイルスである。近年さまざまな核酸アナログ製剤をはじめ、抗ウイルス剤が開発され、治療効果が認められているが、ウイルス側の変異による耐性化の問題はいまだ認められる。本研究では、抗ウイルス剤投与下での HBV ゲノムの quasispecies を検討することから薬剤応答性および耐性獲得のメカニズムを評価し、新規治療薬開発へつなげていくことを目的としている。

B. 研究方法

B型肝炎ウイルスキャリアのインドネシア人

12名の血液検体を使用した。うち治療歴のないインドネシア人7名と抗ウイルス剤(テルビブジン)投与中のインドネシア人5名より血液を採取し、B型肝炎患者血清よりHBV-DNAを抽出した。B型肝炎ウイルスの既知の薬剤耐性領域であるポリメラーゼ領域(AA119-306)をPCR direct sequencingにより配列を確認した。同時にIllumina MiSeq Sequencerにより塩基配列を決定した。その結果をGenomics Workbench ver 6.0.1を用いてウイルス quasispecies の検討を行なった。

また本研究では、神戸大学倫理委員会 No.1036「インドネシア・ジョクジャカルタにおける肝炎ウイルスの解析」、およびガジャマ

ダ大学の院内倫理委員会の承認を受けており、また両国の血液運搬に関しても大学間での MTA(material transfer agreement)を交わすなど、倫理面には配慮した上で所定の手続きを経ている。

C. 結果

12 検体の取得リード数は 584,849 ~ 2,159,560(平均 1,123,670)、平均カバレッジは 6,411 ~ 38,391(平均 17,595)であった。0.5%以上のマイナークローンを有意とすると、既知の薬剤耐性変異とされている領域には、I169L/M $2.81 \pm 0.73\%$, V173A/L/E $2.04 \pm 0.38\%$, L180F/S $1.25 \pm 0.46\%$, T184P/A/S $3.83 \pm 2.06\%$, M204I/L/V $3.00 \pm 1.16\%$, N236S/T/I $2.22 \pm 0.85\%$, M250I $0.75 \pm 0.19\%$ と変異が検出された。このうちテルビブジン使用中の患者において、I169M/L および M204L/I のマイナークローンの変異比率が未治療患者に比べて有意に低かった ($p < 0.05$)。

D. 考察

抗ウイルス剤治療時の薬剤耐性領域の問題については詳細に検討されている。今回の検討でも、既知の薬剤耐性領域の変異が治療前および治療中患者からも検出され、これらの変異が薬剤によって誘導されているというより治療前から存在していることが改めて示された。治療時に誘導される変異については、まだ症例が少なく、検討できた領域

が短いため、今後のさらなる検討を要する段階と思われる。

防ぐ狙いがあると思われる。対象は B 型慢性肝疾患 14 例(全例 IFN 投与歴あり、HBe 抗原陽性 11 例、肝硬変 5 例)であった。治療終了 24 週の時点で、57%に ALT 正常化、57%に HBV DNA 陰性化(DNA プローブ法)、45%に HBe 抗原のセロコンバージョン、21%に HBs 抗原のセロコンバージョンを認め、注目を集めた。しかし、症例数が少ないこと、比較試験でないこと、IFN 反応性の良い genotype A が半数近くを占めることが問題として残された。

我々も 2002 年以来、Serfaty らのグループに準じたプロトコールで HBe 抗原陽性例に対してラミブジン/IFN sequential 治療を行い、2007 年にその成績を報告した(*J Interferon Cytokine Res* 2007; 27: 201-7)。ラミブジンを約 24 週間投与した後、4 週間 IFN を併用して中止し、その後 IFN を 20 週間単独投与したところ、治療終了 24 週後に ALT 正常化かつ HBe 抗原陰性化かつ HBV DNA $< 10^4$ コピー/mL を満たした著効例は、24 例中 7 例(29%)であった。

2006 年 9 月以降は、エンテカビルを約 48 週間投与した後、4 週間 IFN を併用して中止し、その後 IFN を 20 週間単独投与するプロトコールに変更した。エンテカビルの投与期間をラミブジンより長期に設定した理由は、1)ラミブジンは 6 ヶ月以上投与すると耐性変異の出現が危惧さ

れたが、エンテカビルは少なくとも1年以内は耐性が生じないことが分かっていたからと、2)ラミブジン/IFN sequential 治療ではラミブジン投与中のHBe抗原、HBV DNAの低下が良好な症例ほど治療効果が良かったからである。

更に2011年9月にはB型慢性肝炎に対してHBe抗原陽性、陰性に関わらずPEG-IFN 2aの48週投与が承認された。それ以降はエンテカビルを約48週間投与した後、4週間PEG-IFNを併用して中止し、その後PEG-IFNを44週間単独投与するプロトコルに変更した。そこで今回は特に従来型IFNを用いた症例とPEG-IFNを用いた症例との比較を行った。

核酸アナログはHBV複製過程の逆転写を阻害し、またチェーンターミネーターとしてDNA鎖伸長を停止させることによりウイルスの増殖を強力に抑制するが、肝細胞の核内に存在し複製中間体として働く閉環状完全二重鎖DNA(cccDNA)には直接作用しない。そのため核酸アナログ治療の中止により、HBVは再び増殖し肝炎は高率に再燃する。最近、肝内のcccDNA量と相関する血清マーカーとしてHBs抗原、HBcr抗原が注目されている。HBcr抗原はプレコア/コア領域から翻訳されるHBコア抗原、HBe抗原、p22cr抗原などの総称であり、そのアッセイ系は本邦で開発された。

核酸アナログ/IFN sequential 治療には、大きく2つの目的が考えられる。まず、1)核酸アナログの中止を目的とする

ものが挙げられる。核酸アナログでHBe抗原が陰性化した(または陰性)症例では、厚労省研究班の治療ガイドラインに準拠してsequential治療を考慮する。ところが核酸アナログを導入した症例は、35歳以上のIFN反応性の不良例や肝線維化進行例が多くを占め、実際にはHBV DNAの持続的陰性化を目指し核酸アナログを継続することが多い。一方、核酸アナログでHBe抗原陰性化が得られなくても、IFNにより著効が得られるものも存在し、若年で核酸アナログを導入した症例ではsequential治療を考慮して良いと考える。2)IFNの効果増強を目的とするものが挙げられる。35歳未満で過去のIFN単独療法に反応しなかった症例や、35歳以上でもIFN投与歴のない症例にはsequential治療を考慮して良いと考える。

E. 結論

抗ウイルス剤による薬剤応答については、まだ症例を増やし今後の検討を要すると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

タンパク質とリガンド結合情報を活用したインシリコスクリーニング

分担研究者 岩館満雄 中央大学理工学部生命学科准教授

研究要旨

本研究ではタンパク質 - リガンド結合情報を活用したインシリコスクリーニング法、また ChEMBL のようなアッセイ実験情報を活用することで、活性値の値を予測する手法を示している。今後 PDB 等のタンパク質立体構造データベースにおいて、タンパク質 - リガンド結合情報はますます増加していくと考えられる。さらに、ChEMBL データベースに代表されるアッセイ実験情報も同様に増加していくと考えられる。今後の IT 創薬において、これらの情報を利用することは重要であると考えられ、本研究のような実験情報に基づくインシリコスクリーニング法は有効であると考えられる。

A. 研究目的

基質や薬物などのリガンドが酵素や受容体などのターゲットタンパク質へ結合する関係は、鍵と鍵穴の関係として知られている。近年、バーチャルスクリーニングというコンピュータ上で鍵と鍵穴の関係を選別する技術が多く用いられている。バーチャルスクリーニングには、二つの方法がある。一つはターゲットタンパク質のモデル構造を構築し、リガンド結合サイトなどの、薬剤を結合させたい部位に対して、化合物候補全てをドッキングするようなタンパク質立体構造に基づく方法(SBDD)がある。もう一つは化

合物の特徴抽出からターゲットタンパク質との相互作用認識に必要な薬物分子の 3 次元空間的配置のようなファーマコホア情報を引き出す方法(LBDD)がある。しかし、これらの手法から得られる結果は線形性を失っており、正確な活性値の予測などが不可能である。さらに、タンパク質立体構造データベース Protein Data Bank(PDB)に存在するタンパク質 - リガンド結合情報が増加しており、これらの情報を活用することが出来ていない。さらに ChEMBL のような、創薬研究にとって有用な Structure Activity Relationship(SAR)情報のデータベースの

公開が進んでいる。現在 ChEMBL には 121 万を超える化合物とそれらを用いた 64 万件のアッセイ実験による 1 千万件以上の活性情報が登録されている。しかし、現在行われているバーチャルスクリーニングでは、これらの情報が活用されていない。

本研究では、立体構造既知のタンパク質リガンド複合体構造、また ChEMBL のような実験情報を利用した新たなインシリコスクリーニングの手法の構築を目的としている。

B. 研究方法

HIV-1 のタンパク質 - リガンドペアを元にしたクラスタリング

タンパク質立体構造データベースとして 2013 年 6 月 1 日時点の PDB を使用した。20 残基以上のタンパク質を対象に、配列相同性 95%以上、長さカバー率 90%以上を双方向に要求し、クラスタリングを実行する。作成されたクラスター内において、あるタンパク質をクエリーとした時に、そのタンパク質の持つリガンドを中心とした半径 10 Å 以内に存在する残基を切り取り、クラスター内すべてのタンパク質から対応する立体構造部分を同様に切り取る。切り出した構造に対して、総当たりで側鎖まで含めた全原子を対象に RMSD を計算、距離マップを作製した。この距離マップを元に、k-means によるクラスタリングを実行する。図 1 に、クラスタリングの結果の一例を示す。

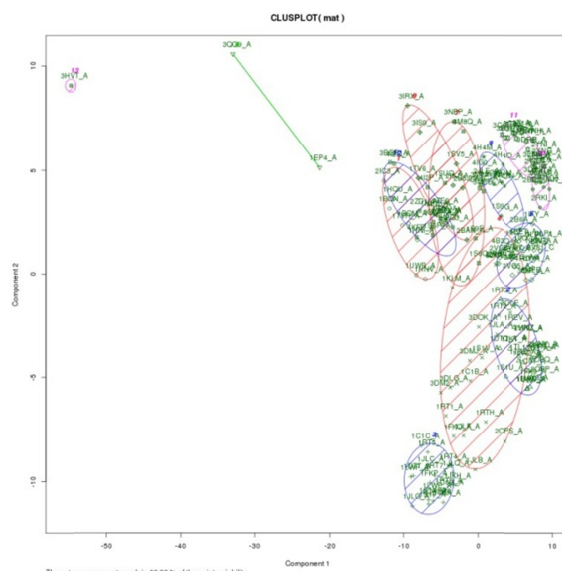


図 1. HIV-1 のタンパク質 - リガンドペアを元にしたクラスタリング

クラスタリングの結果作成されたクエリータンパク質の属するクラスターから、ターゲットタンパク質となる代表タンパク質と、クラスター内の各タンパク質の持つリガンド群を得ることが出来る。これらは後述のドッキングシミュレーションに利用される。また、コンフォメーションの異なるタンパク質をクエリーとして同様の処理を行うことで、タイプの異なるターゲットタンパク質とリガンド結合情報を得ることが出来る。これらの情報を元に、chooseLD 法によるターゲット化合物とのドッキングシミュレーションを行う。chooseLD 法は、タンパク質リガンド結合情報を元に、ターゲットタンパク質とターゲット化合物のドッキングシミュレーションを行う手法である。

ターゲット化合物のデータベースとして、アッセイ実験の情報が掲載されている ChEMBL を利用した。ChEMBL から取得した化合物をターゲット化合物として、クラスタリングによって得たターゲットタンパク質、リガンド結合情報を元に、ドッキングシミュレーションを行った。本研究ではターゲットタンパク質として HIV-1 逆転写酵素と Heat Shock Protein alpha を用いている。例として、以下に HIV-1 逆転写酵素に関する結果を記載する。

C 結果 インシリコスクリーニングにおけるスコアと実験値との相関関係

chooseLD を実行した結果、ターゲット化合物ごとに FPAscore と呼ばれるスコアが算出される。この値が高いほど医薬品としての効能が高いことを示す。この FPAscore と ChEMBL に記載されている活性値を比較する。また、ChEMBL 化合物ごとに様々なアッセイ実験が行われているため、アッセイ実験別に FPAscore と活性値の比較を行った。アッセイ実験は ASSAY ID により分類されている。例として、以下に HIV-1 の ASSAY ID:196180 における FPAscore と活性値(Ki)の結果をグラフで示す。

図2の横軸は FPAscore、縦軸は活性値(Ki)を示している。Ki は酵素と阻害物質の結合反応の平行定数であり、値が低いほど阻害剤としての効果が高いことを示す。図2の結果における相関係数は-0.5522556、

p-value は 0.04058 を示しており、有意な逆相関関係が見られた。

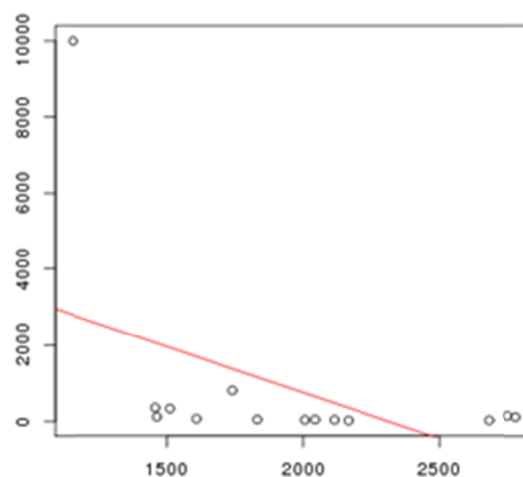
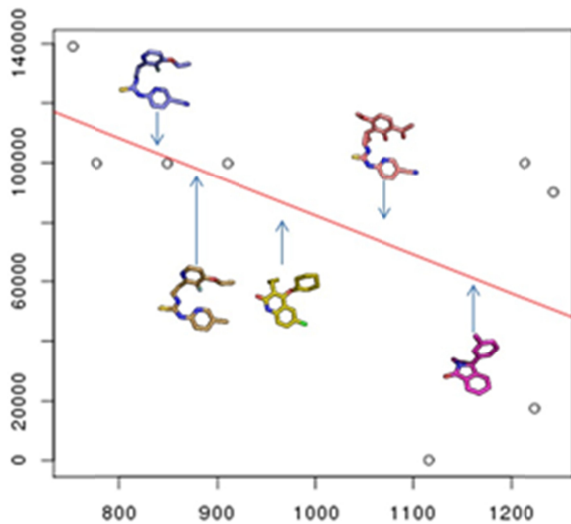


図2. ASSAY ID: 196180 における FPAscore と活性値 (Ki)

同様の処理を HIV-1 逆転写酵素、Heat Shock Protein 90-alpha の全ターゲットタンパク質 リガンド結合情報を用いて、ChEMBL からそれぞれのタンパク質に薬剤効果のある化合物に対してインシリコスクリーニングを実行した。

HIV-1 逆転写酵素のターゲットタンパク質 リガンド結合情報は 13、ChEMBL の活性情報から IC50, EC50, Ki を用いて、それぞれのアッセイデータ数が 3786, 589, 234 件となった。同様に Heat Shock Protein 90-alpha のターゲットタンパク質 リガンド結合情報は 17、IC50, EC50, Ki のアッセイデータ数が 295, 91, 36 件となった。これら全てに対してインシリコスクリーニングを実行することで、各ターゲットタンパク質 リガンド結合情報と ASSAY ID ごとに、図2のような FPAscore



と活性値の相関結果を得ることが出来る。この内、有意に負の相関関係が成立しているものを抽出する。これらのデータから FPA score と活性情報の線形関係を得ることが出来る。つまり、適切な実験条件や化合物を用いたインシリコスクリーニングを行うことができ、ターゲット化合物の活性値の予測をすることが出来る。

D 考察

今回の例では HIV についての研究であるが、これは収録されているデータが豊富である点からである。HBV への適用の可能性については、未知数である。

E. 結論

タンパク質 - リガンド結合情報を活用したインシリコスクリーニング法、また ChEMBL のようなアッセイ実験情報を活用することで、活性値の値を予測する手法を示した。

我々はこの手法を Experiment Based Drug Design (EBDD) と名付けた。今後 PDB などのタンパク質立体構造データベースにおいて、タンパク質 - リガンド結合情報はますます増加していくと考えられる。さらに、ChEMBL のようなアッセイ実験情報データベースも同様に増加していくに従い IT 創薬において、本研究のような実験情報に基づくインシリコスクリーニング法の有効生が高まっていくと考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

4. なし

学会発表

なし

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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tamori A, Hino M, Hagihara A, Kawamura E, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N.	A prospective long-term study of hepatitis B virus reactivation in patients with hematological malignancy.	J Gastroenterol and Hepatol	in press		2014
Toyoda H, Kumada T, Tada T, Murakami Y.	Impact of hepatitis B virus integration into liver tissue on the efficacy of peginterferon and ribavirin therapy in hepatitis B virus-negative chronic hepatitis C patients.	J Clin Gastroenterol.	48	73-73	2014
Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Niinomi T, Yasuda S, Andou Y, Yamamoto K, Tanaka J.	Effect of nucleos(t)ide analogue therapy on hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B patients: a propensity score analysis.	J Hepatol	58	427-433	2013
Motoyama H, Komiyama T, Thuy Le TT, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Iwai S, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Murakami Y, Yoshizato K, Kawada N.	Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver.	Lab Invest	94	192-207	2013

Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Ponsuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Higuchi S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M.	New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia.	PLoS One.	10	e86449	2014
Tamori A, Kawada N.	HLA class II associated with outcomes of hepatitis B and C infections.	World J Gastroenterol.	19	5395-3401	2013
Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Kobayashi S, Sakaguchi H, Shiomi S, Kimura SR, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Kawada N.	Entecavir and interferon-sequential therapy in Japanese patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B.	J Gastroenterol	48	397-404	2013
Enomoto M, Tamori A, Nishiguchi S, Kawada N.	Combination therapy with a nucleos(t)ide analogue and interferon for chronic hepatitis B: simultaneous or sequential.	J Gastroenterol	48	999-1005	2013