

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26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 - 梅山秀明 -	----- 7
2 . B型肝炎ウイルスキャリアの死因に関する検討 - 熊田卓、豊田秀徳 -	----- 14
3 . HBVウイルス感染による肝線維化機序の解明 河田則文	----- 17
4 . 血液疾患患者からのHBV再活性化に対する処置と予後に関する研究 - 田守昭博 -	----- 24
5 . 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 - 棚橋俊仁 -	----- 27
6 . 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 - 榎本大 -	----- 31
7 . B型肝炎における経過予測及びHBs抗原消失に関するウイルス遺伝子変異の探索 - 本多隆 -	----- 36
8 . 次世代シークエンサーによるS領域の多様性の評価 - 矢野嘉彦 -	----- 41
9 . 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 - 岩館満雄 -	----- 45
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胰病態内科学・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。母子感染にて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、ウイルスの排除を目的とした新規治療薬開発を目的としている。

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。母子感染にて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。35歳未満の患者はインターフェロンにてある程度の確立でウイルスの排除が期待できるが、35歳以上ではインターフェロン単独ではその効果は期待できない。抗HBV治療として核酸アナログは、ウイルスの増殖抑制効果は期待通りの成果を示しているが、投薬中止にてHBVは高率に再燃し、ウイルスの排除は困難であり、ウイルスの持続感染は肝硬変

や肝発癌のリスクとなっている、そのためウイルスの排除を目的とした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。

次世代シークエンサー (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クエンスを行い、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 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 細胞を用いて HBV 感染患者血清より HBV の安定感染系の樹立を行ない、低分子化合物の抗ウイルス活性をモニターした。また国立感染症研究所より分与された、Hep38.7-Tet、HepG2.2.15.7 を用いて HBV 実験感染系を樹立した(持続感染系の確立は早川、村上が行なった)。

抗ウイルス薬候補の検索

HBV ゲノムにコードされている 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。また宿主の持つウイルスの複製に関する因子に対する阻害剤(1) -glucosidase inhibitors、(2) LTR、(3)TLR7 の 3 種において *in silico screening* を用いて機能を阻害する低分子化合物を探索している。(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 3 分割し HBV 全ゲノム配列の増幅を実施した(Inuzuka T et al. 2014)。全ゲノム配列に由来する PCR 産物をイルミナ社 MiSeq にて行い適切なリード数と適切なデプスの評価を行った。しかしながらプライマー間の PCR 増幅効率が異なる

ため、リード数が領域によって異なる点、と PCR による増幅によって正確なウイルスのリード数が反映されない可能性を考え、HBV 感染血清より DNase 処理、界面活性剤処理を行ない、PCR 処理を行なわずにウルトラディープシークエンス解析を行なった(Sasaki M et al. J Gen Virol 2014)。解析に必要なリード数が得られ、PCR を行なった場合と遜色ない解析結果を得ることができた。

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クエ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

(1) 直接ウイルス作用型抗ウイルス剤と宿主因子阻害型抗ウイルス剤の探索

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。この方法を用いて新規核酸アナログ候補としてピリミジン型 100 種、プリン型 100 種を AKos library より *in silico* screening にて選別した、次に既に他の疾患で使用されているもの、文献的に報告があるもの、日本で手に入らないものは除外し、ピリミ

ジン型 6 種、プリン型 6 種を選別した。そのうち細胞毒性がなく上清中ウイルス DNA を有意に減少させたものはピリミジン型 2 種、プリン型 2 種あった。さらに capsid 合成阻害候補を同様に *in silico* screening で 100 種選別した。そのうち 16 種の抗ウイルス効果を確認した所、細胞毒性がなく抗ウイルス効果があったものは 4 種選択できた。これらの薬剤は 100 μ M の濃度で作用するために、より作用効果の強い低分子化合物の選択が必要である。具体的には低分子化合物の構造が類似しているもの Tanimoto 係数 0.8-0.9 のものと 0.7 程度の低分子化合物を選別し解析を行なう予定である。

また宿主側のウイルス複製に必要な分子 (1) -glucosidase inhibitors、(2) LT R、(3)TLR7の3種において *in silico* screening を用いて機能を阻害する低分子化合物を探索している。

(2) ウィルス変異解析

B 型肝炎感染患者 114 検体についてイルミナ社 MiSeq を用いて解析を行った。各検体は 100 万シークエンスリード、1 万デプス以上の解析結果が得られており、ウイルスの変異解析に充分耐え得るデータ取得が可能とした。エンテカビル治療前後ににおけるアミノ酸の変異を major/minor clone 別に解析した所、治療経過中に major clone で遺伝子発現変異は同定できなかったが、minor clone には既報でエンテカビル耐性に関与する変異

を同定することができた。さらに PCR を用いずに行なった NGS 解析でも同様にエンテカビル耐性変異が minor clone で同定された。

D. 考察

現時点で選択できた新規核酸アナログと capsid 合成阻害剤は細胞毒性がないが、作用を発揮するために高濃度で投与する必要がある。そのため構造解析を再度行ない、Tanimoto 係数をもとに類似化合物を探索し、より作用効果の高い化合物を探索する必要がある。また現時点では高濃度で薬効を発揮しているが、複数の薬剤例えば宿主側の免疫応答を改善薬としてインターフェロンと今回我々が得た新規化合物を使用する。また新規の宿主因子阻害剤を組み合わせることにより、有効な治療成績が得られる治療方法の確立を目指とする。

ウイルス変異解析は新規の PCR を用いない方法で HBV のクローニングをカタログ化し、ウイルス変異株の出現時期、薬剤応答との関連を明らかにする。さらに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. Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Kozuka R, Hayashi T, Kohmoto M, Jomura H, Morikawa H, Murakami Y, Shiomi S, Kawada N. Long-term Outcome of Sequential Therapy with Lamivudine Followed by Interferon in Nucleoside-naïve, Hepatitis B e-antigen-positive Patients with Chronic Hepatitis B Virus Genotype C Infection. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 2015 Apr 17
2. Murakami Y, Hayakawa M, Yano Y, Tanahashi T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Iwadate M, Umeyama H. Discovering novel direct acting antiviral agents for HBV using *in silico* screening. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015 Jan 2; 456(1):20-8
3. 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 hematologic malignancy. Journal of Gastroenterology and Hepatology 2014 Sep;29(9):1715-21.

学会発表

1. 榎本大、西口修平、田守昭博、城村尚登、小塚立藏、打田佐和子、森川浩安、村上善基、河田則文。HBeAg陽性 B 型慢性肝炎に対する核酸アノログ/IFN sequential 治療後の長期経過 第 51 回日本肝臓学会総会 平成 27 年 5 月 21 日 熊本市
2. 村上善基、早川路代、河田則文。in silico screening を用いた新規抗 HBV 薬探索 第 51 回日本肝臓学会総会 平成 27 年 5 月 21 日 熊本市
3. 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
4. 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
5. Tamori A, Hino M, Kawamura E, Hagiwara A, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Iwai S,

Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. CLINICAL CHARACTERISTICS OF HEPATITIS B VIRUS REACTIVATION IN A PROSPECTIVE LONG-TERM STUDY FOR PATIENTS WITH HEMATOLOGIC MALIGNANCY 49th The international liver congress 2014 Apr 11 London GB

6. Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Uchida-Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Murakami Y, Jomura H, Shiomi S, Kawada N. LONG-TERM OUTCOME OF SEQUENTIAL THERAPY WITH LAMIVUDINE FOLLOWED BY INTERFERON IN NUCLEOSIDE-NAIVE, HEPATITIS B E ANTIGEN-POSITIVE PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B VIRUS GENOTYPE C INFECTION 49th The international liver congress 2014 Apr 11 London GB
7. Murakami Y, Iwadate M, Hayakawa M, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Y-h Taguchi, Umeyama H Attempt to development for direct acting antiviral agent for HBV 2014 HBV International Meeting 2014 Sep 4, Los Angels CA

H. 知的財産権の出願、登録状況	
1. 特許取得	なし
なし	3. その他
2. 実用新案登録	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）
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し、*in silico screening*によってウイルスタンパク機能阻害薬候を探索し、ウイルスの排除を目的とした新規治療薬開発を目指している。後半の計算機を使う目的を達成するために、当然のこととして、時には方法論を開発しながら、計算研究の道筋をいろいろ決定する必要があり、当該報告者はこの分野の担当をした。

A. 研究目的

当該報告者の属する当該研究班はHBVに感染した各患者様の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とを企画している。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つもりである。この情報は慢性B型肝炎治療方法の標準化に有用であ

ると考えている。上記の状況において、当該報告者の目的の1つはHBV DNA polymeraseタンパク質のcatalytic domainの3次元構造の構築を計算機で行い、既存薬物との相互作用の起こり易さを、計算機で数値化して、視覚化することである。当該報告者の、もう一つの主たる目的を以下に記述する。HBVはpreS/S、preC/C、X、DNA polymeraseと4種のORFを持っていることを踏まえて、計算プログラムで計算をしてみると、preS/S、XのORFに関して我々の開発したIsolated FAMSDプログラムでは信頼できる3次元立体構造は得られ

ない。preC/C、DNA polymerase の立体構造は計算できるので、それぞれのタンパク質の機能を阻害する低分子化合物の探査を、我々の開発した *in silico screening* プログラム ChooseLD を用いて実行する。この方法の特徴を強調すると、市場で買うことができないような新規な活性低分子化合物候補を提示するのではなく、既存の薬剤バンクや、低分子化合物バンクにおいて、購入という手段で、手に入れられるものの中から提示する。当該ターゲットタンパク質との相互作用を計算して順位を付け、購入を勧めるものである。初期の研究ステージでは、合成研究者が新規に低分子化合物を合成することができないために、創薬の費用と時間が大幅に軽減する。平成 26 年度に続いて、平成 27 年度において、この方法を用いて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成功させることを念じて初期段階の計算をする。ウイルス複製に必要な宿主側のタンパク質に注目して、以下のような低分子化合物を検討している。
(1) -glucosidase inhibitors、(2) LT R agonists、(3) TLR7 agonists の 3 種の化合物群においての *in silico screening* の可能性の検討である。即ち、これら -glucosidase、LT R、TLR7 のタンパク質の機能を阻害したり、促進したりする低分子化合

物を探索している。

B. 研究方法

(1) 抗ウイルス薬候補の検索

HBV ゲノムにコードされている Large HBs (Pre S1, Pre S2, S)、HBcAg (capsid protein)、HBx protein、DNA polymerase (Reverse Transcriptase) のアミノ酸配列を query として、タンパク質立体構造データベース (PDB) を検索すると、HBcAg と DNA polymerase のみ、信頼できる 3 次元立体構造が得られるとの計算結果を得た。これらの 2 つのタンパク質において、低分子化合物を受容するような表面の空隙に、*in silico screening* (ChooseLD program) 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。RT 領域について HIV の RT タンパク質をもとにした標的タンパク質モデルを創作し、*in silico screening* の方法で、purine 型、pyrimidine 型の核酸アノログを、探索して活性化合物を探し当てた。さらに、Capsid protein の X 線構造を参考にして、HBe タンパクのモデルを作成して、阻害剤を探索して、活性化合物を探し当てた。Large HBs タンパクのモデルは、信頼できる実験構造を見つけられないために、結果的に立体構造モデルが製作できないため、重合阻害剤を探索できなかった。一方、宿主の持つウイルスの複製に関与する因子に關係して、抗ウイルス活性がありそうな (1) -glucosidase 阻害剤、(2) LT R

agonist、(3)TLR7 agonist の 3 種において *in silico screening* を用いて機能を変化させる低分子化合物の探索を検討し、-glucosidase 阻害剤が適切なる選択であるとの予備計算を済ませている。

(2) ウィルス変異解析

当該研究班の棚橋、矢野、田口、村上のウィルス変異解析の実行と、熊田、豊田、河田、田守、榎本、本多からの検体と臨床情報提供によって、ウィルス変異解析に必要なリード数が得られ、PCR を行なった場合と遜色ない解析結果を得ることができているとのことである。故に、本格的に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 との薬効に関係した相互作用の起こりやすさを protein-ligand docking program ChoosLD (*in silico screening* の機能も含むプログラム)を用いて推定し、薬効の治療効果予測ができる可能性も視野に入ってきた。

C. 結果

(1) 直接ウィルス作用型抗ウィルス剤と宿主因子阻害型抗ウィルス剤の探索

当該研究班代表のグループが、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。この方法を用いて新規核酸アナログ候補としてピリミジン型 100 種、プリン型 100 種を AKos library より *in silico screening* にて選別した、次に、既に他の疾患で使用されているも

の、文献的に報告があるもの、日本で手に入らないものは除外し、ピリミジン型 6 種、プリン型 6 種を選別した。そのうち細胞毒性がなく上清中ウイルス DNA を有意に減少させたものはピリミジン型 2 種、プリン型 2 種あった。

さらに preC/C に関係して、capsid 合成阻害候補を、同様に *in silico screening* で 100 種選別した。そのうち 16 種の抗ウイルス効果を実験で確認した所、細胞毒性がなく抗ウイルス効果があったものについて 4 種選択できた。しかし、これらの薬剤は 100 μ M の濃度で作用するために、より作用効果の強い低分子化合物の選択が必要である。具体的には低分子化合物の構造が類似しているもの、即ち Tanimoto 係数 0.8-0.9 のものと 0.7 程度の低分子化合物を選別し解析を行なう予定である。

また宿主側のウイルス複製に必要な低分子化合物を、(1) -glucosidase inhibitors、(2) LT R agonists、(3) TLR7 agonistsにおいて、ChoosLD プログラムが適用できる項目に限定して、*in silico screening* を用いて機能を阻害する低分子化合物を探索する（平成26年度から平成27年度にかけて）。

(2) ウィルス変異解析

当該研究班代表グループを中心にして、エンテカビル治療前後におけるアミノ酸の変異を major/minor clone 別に解析した所、治療経過中に major clone で遺伝

子発現変異は同定できなかったが、minor clone には既報でエンテカビル耐性に関する変異を同定することができている。さらに PCR を用いずに行なった NGS 解析でも同様にエンテカビル耐性変異が minor clone で同定された。

HBcAg と DNA polymerase のみだが、信頼できる 3 次元立体構造が得られるので、これらに関係した機能に関連する範囲で、耐性変異を説明できる可能性があり、当該研究者としては、当てはまる実例を見つけたい。

D. 考察

研究代表者グループによる実験で、現時点で選択できた活性のある新規核酸アノログと capsid 合成阻害剤は、細胞毒性がないが、作用を発揮するために高濃度で投与する必要がある。そのため計算機による構造解析を再度行ない、Tanimoto 係数をもとに類似化合物を探索し、より作用効果の高い化合物を探索する必要がある。現時点では、上記で発見した化合物は高濃度で薬効を発揮しているが、例えば宿主側の免疫応答の改善薬として機能するインターフェロンと今回我々が得た新規化合物を併せて使用することも興味深い。また、現在研究中である新規の宿主因子阻害剤を組み合わせることにより、有効な治療成績が得られる可能性もある。

当該研究実験者らによって、ウイルス変異解析は新規の PCR を用いない方法で HBV のクローンをカタログ化し、ウイルス変異株の出現時期、薬剤応答との関連を明らかにできる可能性が高い状況にある。

当然、計算機を利用して、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易さを docking program ChooseLD を用いて推計算し、薬効の治療効果予測ができる可能性が高い。

E. 結論

当該研究者が計算機を用いてのタンパク構造解析により新規抗ウイルス薬候補を選別し、当該研究代表者グループが *in vitro* で薬効の存在と細胞毒性の無いことを確認し、*in vivo* 実験に進む薬剤を選択できる可能性があることがわかった。さらに、計算機を用いた構造解析で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できるかもしれない。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Murakami Y, Hayakawa M, Yano Y, Tanahashi T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Iwadate M, Umeyama H. Discovering novel direct acting antiviral agents for HBV using *in silico* screening. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015 Jan 2; 456(1):20-8

学会発表

1. 村上善基、早川路代、河田則文。in silico screening を用いた新規抗HBV 薬探索 第51回日本肝臓学会総会 平成27年5月21日 熊本市
2. Murakami Y, Iwadate M, Hayakawa M, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Y-h Taguchi, Umeyama H Attempt to development for direct acting antiviral agent for HBV 2014 HBV International Meeting 2014 Sep 4, Los Angeles CA

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型肝炎ウイルスキャリアの死因に関する検討

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1994年から2014年の20年間に大垣市民病院を受診したHBs抗原陽性のB型肝炎ウイルス(HBV)キャリア3047例中当院で死亡が確認された403例である。死因を肝疾患関連死(肝細胞癌・肝不全)と肝疾患非関連死(他臓器癌・多臓器疾患)に分けて検討し、初診時の簡易的線維化マーカーであるFIB-4 index(AST×年齢/[血小板×ALT])、HBVDNA量、HBs抗原量と死因・死亡年齢についても検討した。肝細胞癌による死亡が157例38.9%、肝不全による死亡が34例8.4%、他臓器癌による死亡が105例26.0%、他臓器疾患による死亡が108例26.7%で肝疾患関連死は191例47.3%であった。他臓器癌では血液癌(悪性リンパ腫、多発性骨髄腫など)が、他臓器疾患では外傷の占める割合が増加していた。20年間を1995年～1999年、2000年～2004年、2005年～2009年、2010年～2014年の4群に分けて検討すると死亡年齢は最近になるにつれて高齢となっていた($p=0.0022$)。FIB-4 indexと死因を見ると線維化が高度になるにつれて明らかに肝疾患関連死亡が高くなっていた($p<0.0001$)。HBVDNA量と死因の間には関係は認められなかった。HBs抗原量についても高値例で肝疾患関連死亡が高くなっていた($p=0.0023$)。一方死亡年齢を見るとHBs抗原量が高値の例で明らかに死亡年齢が低くなっていた($p<0.0001$)。以上から、HBVDNA量を低下させるよりもHBs抗原量を低下させる方がHBVキャリアの生命予後に対するインパクトは強いと推定された。

共同研究者

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

157例38.9%、肝不全による死亡が34例8.4%、その他の癌による死亡が105例26.0%、その他疾患による死亡が108例26.7%であった。肝疾患関連死は191例47.3%であった。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)キャリアは、自然経過では高率に肝硬変、肝細胞癌に進展し、肝疾患に関する有害事象が生命予後を決定すると考えられてきた。近年、核酸アナログ(NA)製剤の出現でHBVキャリアの予後は著明に改善した。NA投与によっても一定の割合で肝細胞癌の発生を認めるが、いわゆる非代償性肝硬変(黄疸、腹水、肝性脳症等)による死亡はほぼ防げるようになってきた。われわれは以前よりNA投与が、肝細胞癌の発生率を明らかに抑制するとともに、生命予後も改善することを示してきた。

今回われわれは、当院にてHBVキャリアと診断された(HBs抗原陽性例)、経過観察された症例の全死亡原因について検討し、死因とHBVマーカーとの関係についても検討した。

B. 研究方法

対象は1995年から2014年の20年間に大垣市民病院を受診しHBs抗原が陽性でHBVキャリアと診断された3047例中、当院で死亡を確認された403例である。

これらの死因を、肝疾患関連死亡(肝細胞癌もしくは肝不全)と肝疾患非関連死(多臓器疾患もしくは他臓器癌)に分けて検討した。なお、肝不全の中には肝疾患に関連した消化管出血も含めた。

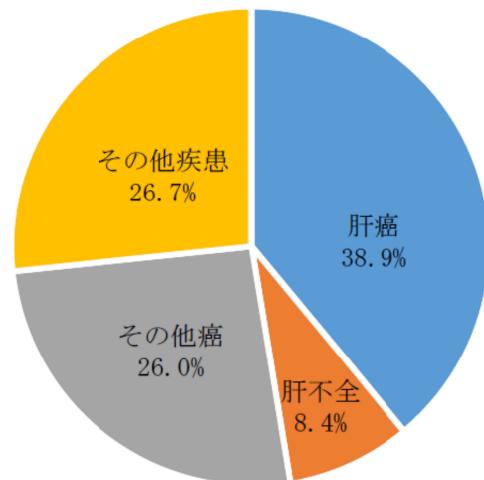
また測定が可能であった症例で初診時の線維化の程度、ウイルス量、HBs抗原量と死因・死亡年齢の関係についても検討した。肝線維化のマーカーは簡易的線維化マーカーであるFIB-4 index(AST×年齢/[血小板×ALT])を用い、2以下、2～4、4超の3群に分けて検討した。

C. 結果

1)全体の死因(図1)

HBVキャリア3047例中当院で403例が死亡した。403例の死因を検討すると、肝細胞癌による死亡が

図1、HBVキャリアの死因(n=403)



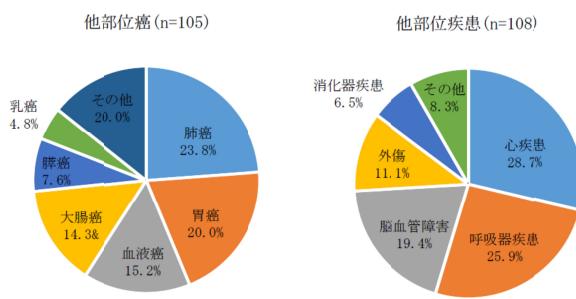
2)肝疾患非関連死の死因(図2)

経過観察中他部位癌で105例が死亡した。その部位は肺癌が23.6%、胃癌が20.0%、血液癌が15.2%、大腸がんが14.3%、膵癌が7.6%、乳癌が4.8%であった。血液癌の(悪性リンパ腫、多発性骨髄腫など)の増加が特徴であった。

経過観察中他部位の疾患で108例が死亡した。その部位としては心疾患が28.7%、呼吸器疾患が25.9%、脳血管障害が19.4%、外傷が11.1%、消化器疾患が6.5%であった。死因として外傷の占める割合が高かった。

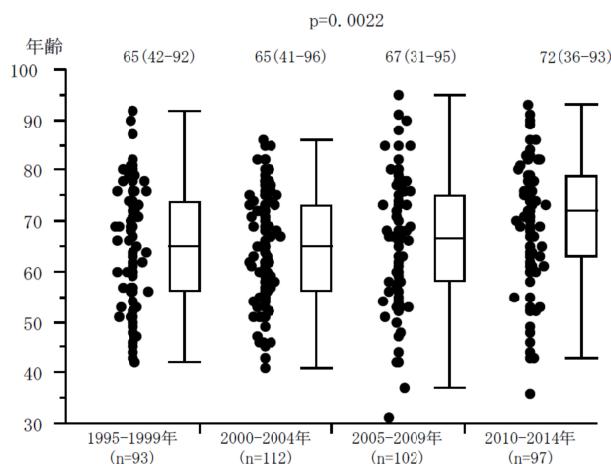
3)年代別の死亡年齢(図3)

図2、肝以外の死因



20年間を 1995年～1999年、2000年～2004年、2005年～2009年、2010年～2014年の4群に分けて検討すると死亡時の年齢の中央値はそれぞれ65歳、65歳、67歳、72歳と最近になるに従い有意に高齢となって

図3、年代別の死亡時年齢(n=404)

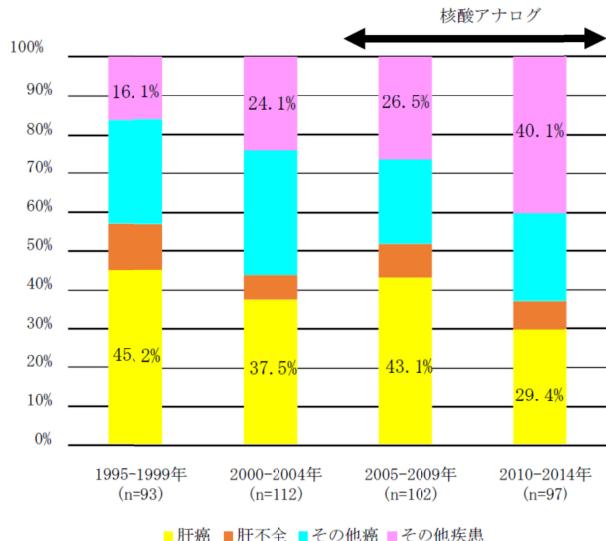


いた (p=0.0022)。

4) 年代別の死因(図4)

同様に20年間を1995年～1999年、2000年～2004年、2005年～2009年、2010年～2014年の4群に分けて検討すると、今回の検討では有意差を認めなかったが、最近となるに従い、肝細胞癌による死亡は減少し

図4、年代別の死因

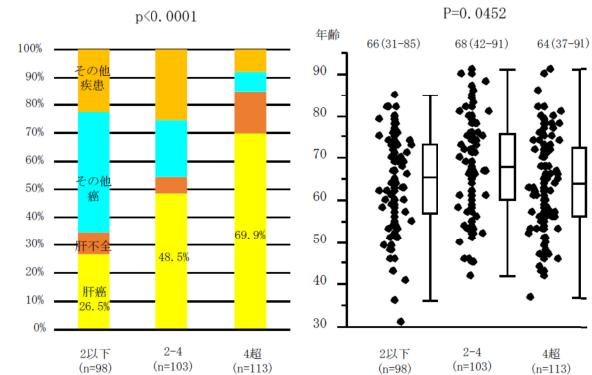


その他の疾患による死亡が増加してきていた。

5) FIB-4 indexと死因・死亡年齢

FIB-4 indexを2以下、2～4、4超の3群に分けて検討すると、肝疾患関連死はそれぞれ35.7%、54.4%、85.0となり線維化が進むにつれて明らかに肝疾患関連死が増加していた(p<0.0001)。また死亡年齢も線維化高度群で低くなる傾向があった(p=0.0452)。

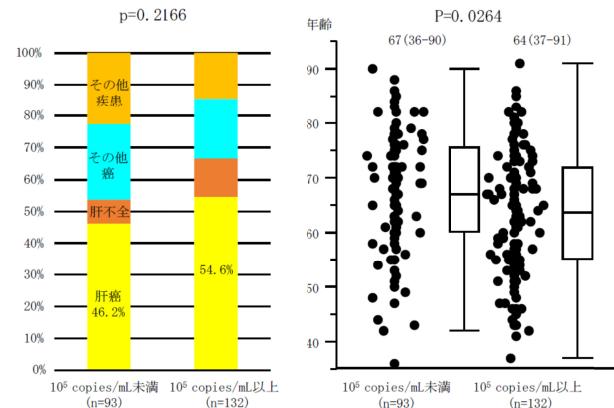
図5、FIB-4 indexと死因・死亡年齢



6) HBVDNA量と死因・死亡年齢

死因をウイルス量が 10^5 copies/mL未満と 10^5 copies/mL以上に分けて検討すると両群間による死因の差は認めなかった。死亡年齢はウイルス量が 10^5 copies/mL以上の群で低くなる傾向を認めた(p=0.0264)。

図6、HBVDNA量と死因・死亡年齢



7) HBs抗原量と死因・死亡年齢(図7)

死因を HBs抗原量が 10^3 IU/mL未満と 10^3 IU/mL以上の2群に分けて検討すると、 10^3 IU/mL以上の群で有意に肝疾患関連死が増加していた(p=0.0023)。また死亡年齢に関しても 10^3 IU/mL以上の群で明らかに年齢が低かった(p<0.0001)。

D. 結論

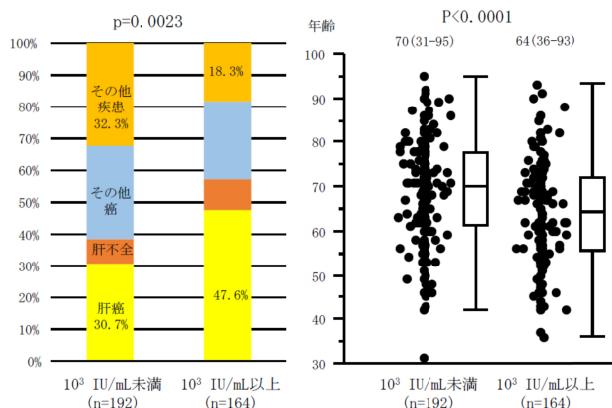
1995年から2014年の20年間にHBVキャリアの死因について検討した。

肝疾患関連死は約半数であった。

他臓器癌では血液癌が多臓器疾患では解消の占める割合が増加していた。

死亡年齢は近年になるにつれて高齢となっていた。

図7、HBs抗原量と死因・死亡年齢



線維化の高度の例、HBs 抗原量の多い症例で明らかに肝疾患死が増加しており、死亡年齢も HBs 抗原量の多い症例で明らかに低かった。

以上から、HBVDNA 量を低下させるよりも HBs 抗原量を低下させる方が HBV キャリアの生命予後に対するインパクトは強いと推定された。

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, Kaneoka Y, Maeda A. A laboratory marker, FIB-4 index, as a predictor for long-term outcomes of hepatocellular carcinoma patients after curative hepatic resection. *Surgery*. 2015 Apr; 157(4):699-707
2. Takada K, Toyoda H, Tada T, Ito T, Hasegawa R, Gotoh T, Ichikawa H, Sone Y, Kumada T. Accurate and rapid identification of feeding arteries with multidetector-row angiography-assisted computed tomography for transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2015 Mar 21.
3. Tada T, Kumada T, Toyoda H, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Kitabatake S, Yama T. Impact of the BTR and BCAA granule therapy in patients with HCC: a propensity score analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Mar 19.
4. Johnson PJ, Berhane S, Kagebayashi C, Satomura S, Teng M, Reeves HL, O'Beirne J, Fox R, Skowronska A, Palmer D, Yeo W, Mo F, Lai P, Iñarrairaegui M, Chan SL, Sangro B, Miksad R, Tada T, Kumada T, Toyoda H. Assessment of liver function in patients with hepatocellular carcinoma: a new evidence-based approach-the ALBI grade. *J Clin Oncol*. 2015 Feb 20; 33(6):550-8.
5. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Kitabatake S, Ito T. Risk Factors of HCC Development in Non-cirrhotic Patients with Sustained Virologic Response for Chronic HCV Infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Feb 13.
6. Ito T, Kumada T, Toyoda H, Tada T. FIB-4 index for assessing the prognosis of hepatocellular carcinoma in patients with Child-Pugh class A liver function. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015 Feb 4.
7. Nagasawa T, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda E, Matsuura J, Toyoda H, Kaneoka Y, Kumada T, Kozawa O. Heat shock protein 20 (HSPB6) regulates TNF- α -induced intracellular signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys*. 2015 Jan 1; 565:1-8.
8. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Sone Y, Maeda A, Kaneoka Y. Non-hypervascular hypointense nodules on Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI as a predictor of outcomes for early-stage HCC. *Hepatol Int*. 2015 Jan; 9(1):84-92.
9. Tada T, Kumada T, Toyoda H, Ito T, Sone Y, Okuda S, Ogawa S, Igura T, Imai Y. Diagnostic accuracy for macroscopic

- classification of nodular hepatocellular carcinoma: comparison of gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced magnetic resonance imaging and angiography-assisted computed tomography. *J Gastroenterol.* 2015 Jan; 50(1): 85-94.
10. Tada T, Kumada T, Toyoda H, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Kitabtake S, Ito T. Long-term prognosis of patients with hepatitis B infection: causes of death and utility of nucleos(t)ide analogue therapy. *J Gastroenterol.* 2014 Nov 7.
11. Tada T, Kumada T, Toyoda H, Ito T, Sone Y, Kaneoka Y, Maeda A, Okuda S, Otobe K, Takahashi K. Utility of contrast-enhanced ultrasound with perflubutane for diagnosing the macroscopic type of small nodular hepatocellular carcinomas. *Eur Radiol.* 2014 Sep; 24(9):2157-66.
12. Toyoda H, Kumada T, Tada T. Postinterferon α -fetoprotein elevation and risk of hepatocellular carcinoma development after sustained virological response: cause or results? *Hepatology.* 2014 Aug; 60(2):762-3.
13. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Ito T, Maeda A, Kaneoka Y, Kagebayashi C, Satomura S. Changes in highly sensitive alpha-fetoprotein for the prediction of the outcome in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Cancer Med.* 2014 Jun; 3 (3):643-51.
14. Fox R, Berhane S, Teng M, Cox T, Tada T, Toyoda H, Kumada T, Kagebayashi C, Satomura S, Johnson PJ. Biomarker-based prognosis in hepatocellular carcinoma: validation and extension of the BALAD model. *Br J Cancer.* 2014 Apr 15; 110(8):2090-8.
15. Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tanaka J, Kagebayashi C, Satomura S. High-sensitivity Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein assay predicts early detection of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2014 Mar; 49(3):555-63.
16. 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.

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26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 ウィ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。肝線維化の診断法においては組織学的検査のように侵襲的なものではなく、血清バイオマーカーやFibroScan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、B型慢性肝疾患組織におけるmiRNAとCygb発現の関係に焦点を絞って解析する。

A. 研究目的

直接型抗HCVの開発により慢性C型肝炎では効率よくウィルス排除が得られるようになり、ウィルス学的著効(SVR)がほぼ100近く達成する事が可能になった。一方、B型肝炎では核酸アナログ製剤でウィルスを制御することは可能となつたが、一旦感染したB型肝炎ウィルス(HBV)を肝細胞から駆除することは依然として困難であり、肝細胞内でのウィ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、侵襲的であるため非侵襲的で反復検査が可能な方法の出現が望まれている。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。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。また慢性C型肝炎の治療前肝生検組織105例よりmiRNAの解析をマイクロアレ

イでおこない肝線維化の進展に関連する miRNAを同定した(PLoS ONE 2012)。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

I. 平成26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RNA later (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、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。個人情報は臨床情報と連結可能匿名化を行い厳重に管理する。

4) 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-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を詳細に検討し、CygB発現細胞の存在様式を明らかにする。

5) マウス慢性肝疾患モデルの作成

線維化に関与するmiRNAの機能解析をin vivoで行うために、四塩化炭素(CCL4)の腹腔内投与とチオアセトアミド(TAA)投与マウスを慢性肝疾患モデルマウスとして使用した。マウスのmiRNA発現はアテロコラーゲンとdouble strand mature miRNAを混ぜマウス尾静脈より投与した

マウス肝組織をHE染色、sirius red染色を用いて形態的な変化を評価し、sirius red染色ではその染色されている部位を数値化して客観的な評価とした。

また肝組織よりtotal RNAを抽出し遺伝子発現をリアルタイムqPCRにて行った。

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いて肝線維化に関係する miRNA の同定とその機能解析

現在マイクロアレイを用いてデータを取得した状態で、マイクロアレイ解析結果は統計解析支援環境の R を用い、肝線維化の状態に応じて発現が変化している miRNA は複数個得られるが、その中からもっとも肝線維化の程度と相關している miRNA として miR-29 family を同定した。また miR-29a/b/c の標的遺伝子同定には miRTarBase

(<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>) を用いておこなった。

肝組織中の miRNA の中で肝線維化に関係しているものとしてスクリーニングを行い、肝星細胞株 (LX-2) に該当する miR-29a を過剰発現し、標的遺伝子候補として Collagen 1 (Col1A1), platelet derived growth factor C (PDGFC) の発現が低下することを確認した。

(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ナル抗体を既に 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。

C 型慢性肝疾患組織を用いた検討より、Cygb は特に F4 細胞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)。

(3) 肝線維化が進行した CCL4 マウス、TAA マウスに miR-29a を尾静脈より投与したところ肝線維化が改善する事が分かった。Cygb と miR-29a の発現は両者間に相關は見られなかった(論文執筆中)。

D. 考察

miRNA が発癌に関与している事はほぼコンセンサスになっており、miRNA の発現異常に伴って miRNA が発現している癌遺伝子または癌抑制遺伝子の発現がカスケード式に変化する事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 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 (Gut 2012)。本研究では B 型慢性肝疾患において肝線維化の進展に関する 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) また日常臨床上の利用のみならず、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. Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis. Hai H, Tamori A, Kawada N. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 6236-43.
2. Noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. Enomoto M, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 12031-8 (2014).

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。

血液疾患患者からのHBV再活性化に対する処置と予後に 関する研究

分担研究者 田守 昭博 大阪市立大学准教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)感染既往のある血液疾患例ではHBV再活性化の頻度が高く、原疾患治療中にはHBVモニタリングが義務付けられている。今回、我々が継続しているHBV再活性化前向き試験から再活性化例の特徴と核酸アナログ介入の効果と安全性について評価し、さらに介入後の予後について核酸アナログ中止基準についても検討した。結果：HBV再活性化は悪性リンパ腫に対するリツキシマブ併用治療30例中3例、造血幹細胞移植19例中5例に発生した。また原疾患治療前に血清HBs抗体価200 mIU/ml以上の症例からはHBV再活性化は発生しなかった。再活性化例への核酸アナログ介入は有効であり、肝不全を伴う肝炎は発症しなかった。特に定期モニタリング遵守例からはALTの上昇はなかった。介入した核酸アナログを中止した4例中2例にて再度のHBV増加があった。

A. 研究背景と目的

免疫抑制・化学療法中にHBs抗原陰性(HBV感染既往)例からHBVの増加が起こることが知られている。HBV再活性化が問題視されるのは、一旦肝炎が発症すると高率に重症肝障害へ進展し、肝不全による死亡例が多いめである。そこでHBV再活性化に対するガイドラインが作成・周知されてきたがその病態は十分に解明された訳ではない。我々は7年前からHBV感染既往例を登録し前向きに追跡している。多施設からの報告と同様、HBV再活性化のリスクが高い病態は悪性リンパ腫例へのリツキシマブ併用化学療法と造血幹細胞移植である。今回、HBV再活性化に関与している因子を明らかにするため血液疾患治療中に発症したHBV再活性化例を対象にHBV因子と宿主因子別にその特徴を解析した。

B. 研究方法

対象は、大阪市立大学病院において2007年12月から2013年までにHBV再活性化前向き研究に登録されたHBV感染既往例の内、悪性リンパ腫に対するリツキシマブ併用治療30例と造血幹細胞移植19例である。肝臓学会のガイドラインに沿ってHBV DNAをreal time PCR法にて毎月測定し、2.1 log以上に増加した際にエンテカビル(核酸アナログ)投与を開始した。

C. 研究結果

リツキシマブ併用治療3例(10%)と造血幹細胞移植5例(26%)にHBV再活性化を認めた。再活性化の時期は、リツキシマブ併用治療例では中央値3ヶ月(2-10)と1年以内であった。一方、造血幹細胞移植例では22ヶ月(9-36)と1年以降であった。治療前の血清HBs抗体価はHBV再活性化のなかった症例では全例 200 mIU/ml以上を示した。再活性化が起こった時

には1例を除き、全例にてHBs抗体は検出されなかつた。造血幹細胞移植例では前HBs抗体価が低い症例ほどHBV再活性化の頻度が高いことが示唆された。

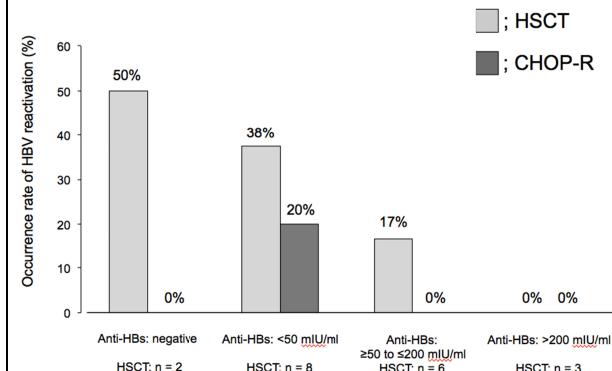


図1. HBs抗体価とHBV再活性化頻度

次にHBV再活性化におけるウイルス側の要因を検討するためにDirect sequence法にて再活性化したHBV DNA塩基配列を解析した。特にHBs抗原の決定基である'a' determinant域に注目した。

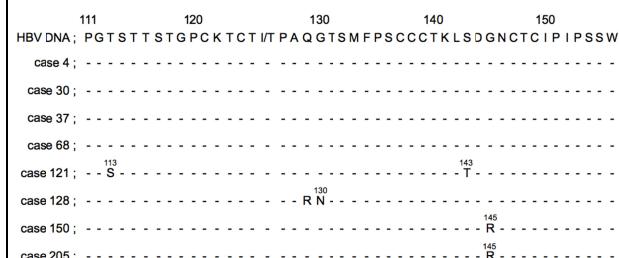


図2. 再活性化した8例のHBV塩基配列(HBsAg決定基)

8例中4例にHBs抗原決定基にアミノ酸置換を伴う塩基配列の変化を認めた。

最後に再活性化例においてエンテカビルをいつまで投薬すべきかについて検討した。HBs抗原陰性かつHBV DNAが検出されない状態が6ヶ月以上継続した原疾患治療例に限って患者同意を得た後にエンテカビル投与を中止した。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎緊急対策研究事業）
分担研究報告書

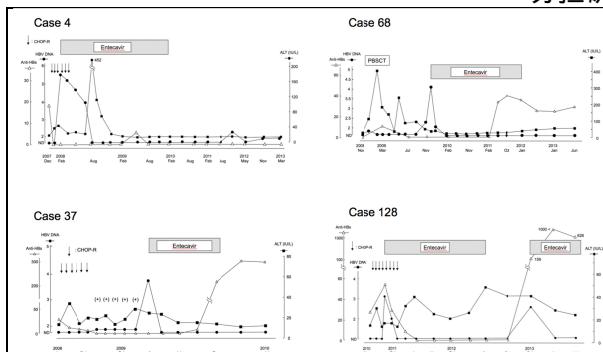


図3.エンテカビルを中止したHBV再活性化4例
上記の臨床経過に示される様にHBs抗体が陽性化していた2例ではエンテカビル中止後もHBV DNAの増加はなかった。一方、HBs抗体陰性のままエンテカビル中止した2例ではHBVの再上昇を認めた。

D. 考察

血液疾患(悪性リンパ腫へのリツキシマブ治療や造血幹細胞移植)ではHBV既往感染例に対する再活性化ガイドラインは良好に機能しており、HBV再活性化の頻度から鑑みても遵守すべき治療指針であると考えられた。その病態には患者の免疫力(特にHBs抗体量)の低下と感染例したHBV塩基配列が関与していることが推測された。本研究は少数例の検討であり病態解明と再活性化へのさらなる予防策開発のためには継続した解析が必要である。

E. 結論

HBV再活性化モニタリングを遵守された症例では適切な核酸アナログ介入が実施され、その予後は良好であった。またHBs抗体の獲得により、核酸アナログ中止の可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Discovering novel direct acting antiviral agents for HBV using in silico screening. Murakami Y, Hayakawa M, Yano Y, Tanahashi T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Iwadate M, Umeyama H. Biochem Biophys Res Commun. 2015; 456:20-8.
2. Noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. Enomoto M, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. World J Gastroenterol. 2014; 20: 12031-8.
3. Successful Treatment of Hepatitis B Virus-associated Membranous Nephropathy with Entecavir and Immunosuppressive Agents. Ochi A, Ishimura E, Ichii M, Ohno Y, Nakatani S, Kobayashi I, Shima H, Tsuda A, Shidara K, Mori K, Tamori A, Inaba M. Nephrology (Carlton). 2014; 19:595-6.
4. Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis. Hai H, Tamori A, Kawada N. World J Gastroenterol. 2014; 20: 6236-43.

5. 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; 29: 1715-21.

2. 学会発表

1. Prospective study of hepatitis B virus reactivation in rheumatoid arthritis patients on immunosuppressive therapy: Evaluation of both HBsAg-positive and -negative cohorts. Tamori A, Goto H, Tada M, Inui K, Kawamura E, Hagihara A, Uchida K-S, Morikawa H, Morikawa H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. 2014. 65th American Association for the study of liver diseases (Boston)
2. Clinical characteristics of hepatitis B virus reactivation in a prospective long-term study for 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. 2014. 49th European Association for the study of the liver diseases (London)
- 3.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

特になし。

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

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
Murakami Y, Hayakawa M, Yano Y, Tanahashi T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Iwadate M, Umeyama H.	Discovering novel direct acting antiviral agents for HBV using in silico screening.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	456	20-28	2015
Enomoto M, Morikawa H, Tamori A, Kawada N.	Noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B.	<i>World J Gastroenterol</i>	20	12031-12038	2014
Ochi A, Ishimura E, Ichii M, Ohno Y, Nakatani S, Kobayashi I, Shima H, Tsuda A, Shidara K, Mori K, Tamori A, Inaba M.	Successful Treatment of Hepatitis B Virus-associated Membranous Nephropathy with Entecavir and Immunosuppressive Agents.	<i>Nephrology (Carlton)</i>	19	595-596	2014
Hai H, Tamori A, Kawada N.	Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis.	<i>World J Gastroenterol</i>	20	6236-6243	2014
Tamori A, Hino M, Kawamura E, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N.	A prospective long-term study of hepatitis B virus reactivation in patients with hematologic malignancy	<i>J Gastroenterol Hepatol</i>	29	1715-1721	2014

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究経費）

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が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。核酸アナログ製剤による慢性B型肝炎の治療前後に採取したヒト患者血清から、HBVゲノムを抽出し、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ニングのHBV株の存在が報告されており、单一宿主内での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、2万クローニングに至るHBV株の解析が可能であった。今回の研究では、核酸アナログ製剤による治療前後に、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、クローニング数別にHBV株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、核酸アナログ製剤などの抗ウイルス剤を投与する際に、合理的な事前予測として役立

ち、不適切な抗ウイルス剤の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 PCR・ウルトラディープシークエンス
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 PCR 法で部分的に増幅し、イルミナ社 MiSeq を用いて、4 ウィルス検体のウルトラディープシークエンスを実施した。平均収得リード数は、72 万 6 千リードあり、すべての検体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 PCR・ウルトラディープシークエンス

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クエンスを実施し、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として、W-1、W-2、W-3 の設計を実施した。また、適切なコントロール配列を有する検体の構築を実施した。

3. PCR 法を必要としないダイレクト・ウルトラディープシークエンス

ウイルスゲノムの増幅を必要とせず、感染者血清から HBV ゲノムを直接採取し、ダイレクト・ウルトラディープシークエンス法の確立を試みた。この方法の確立により、PCR 法による増幅効率の不均一に起因する実験誤差が回避可能となり、また多数検体処理も実施し得る。

C. 結果

1. プール検体数の検討

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 PCR・ウルトラディープシークエンスを実施した。平均収得リード数は 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 検体では、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 PCR・ウルトラディープシークエンスでは、平均収得リード数は 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 検体のディープシークエンスにおいても、平均収得リード数は 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クエンスの実施が、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部位は収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W-1、W-2、W-3を設計した。3種類のPCR産物によるマルチプレックスPCRライブラリーを構築し、PCR・ウルトラディープシークエンスを実施し、HBV遺伝子全長に一様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23検体、投与後7検体のPCR・ウルトラディープシークエンスを実施済みである。

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（ジェノタイプC）が挙げられる（Hepatology 2006）。ゲノム変異解析の参考配列として用い、さらにシークエ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クエンスでは、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、変異解析の参考配列として有用と

考えられる。

4. PCR法を必要としないダイレクト・ウルトラディープシークエンス

HBVゲノムはウイルスカプシドに包まれている。4検体を用いて、カプシド酵素処理の影響を検討した。カプシドの酵素処理が未実施であると、ウイルスゲノムの各塩基部位では、1千リード程度のカバレッジであり、ディープシークエンスは不可能であった。カプシド酵素処理に伴い、ウイルスゲノムの各塩基部位で1万リード以上のカバレッジが得られ、ダイレクト・ウルトラディープシークエンスによる解析が可能であった。但し、 10^{-6} コピー以下のウイルス量検体では、収得リードが少なく、解析不可能であった。

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クエンスで、4万クローニに至る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、核酸アナログ製剤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化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。この点を克服するため、PCR 法を必要としないダイレクト・ウルトラディープシーケンスの確立を試みた。カプシドの酵素処理に伴い、ウイルスゲノムの各塩基部位で十分なリード数が得られ、ダイレクト・ウルトラディープシーケンスによる解析が可能と考えられた。しかし、血清ウイルス量が 10^{-6} コピー以下の低値な検体は、取得リード数が少なく、解析が不十分である。今後は、PCR あるいはダイレクト・ウルトラディープシーケンスにより、血清ウイルス量が 10^{-6} コピー以下の検体の HBV 遺伝子全長をどのようにして検出するのか、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 PCR およびダイレクト・ウルトラディープシーケンスで、1 万クローン以上の遺伝子

多様性のある 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が可能である。この薬剤応答性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

Widasari DI, Yano Y, Heriyanto DS, Utsumi T, Yamani LN, Rinonce HT, Wasityastuti W, Lusida MI, Soetjipto, Okada R, Murakami Y, **Tanahashi T**, Azuma T, Hayashi Y. A Deep-Sequencing Method Detects Drug-Resistant Mutations in the Hepatitis B Virus in Indonesians. *Intervirology*. 2014 Oct 31;57(6):384-392.

Iwamoto A, **Tanahashi T**, Okada R, Yoshida Y, Kikuchi K, Keida Y, Murakami Y, Yang L, Yamamoto K, Nishiumi S, Yoshida M, Azuma T. Whole-genome sequencing of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* characterizes unidentified variants of multidrug resistant efflux pump genes. *Gut Pathog*. 2014 Jun 26;6:27.

Horibe S, Matsuda A, **Tanahashi T**, Inoue J,

Kawauchi S, Mizuno S, Ueno M, Takahashi K, Maeda Y, Maeguchi T, Murakami Y, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dys-regulation of cell cycle associated proteins. *Life Sci.* 2015 Jan 24. [Epub ahead of print]

2.実用新案登録
なし

3.その他
なし

学会発表

次世代シーケンサーを用いたヘリコバクターピロリ菌癌性蛋白 CagA に特徴的な変異の検出. 岩本彰、樋橋俊仁、岡田理菜、小川浩史、張菁芸、吉田優、東健. 第 9 回日本ゲノム微生物学会年会 2015 年 3 月 6-7 日 (神戸大学百年記念館、神戸)

次世代シーケンサーを用いた本邦におけるヘリコバクターピロリ菌 cagA 遺伝子の全ゲノム解析. 岩本彰、樋橋俊仁、楊林、山本幸司、東健. 第 20 回日本ヘリコバクタ－学会学術集会 2014 年 6 月 29 日 (東京ステーションコンファレンス、東京)

次世代シーケンサーによる肝発癌に関する miRNA の網羅的解析. 村上善基、樋橋俊仁、田口善弘、豊田秀徳、熊田卓、榎本大、田守昭博、河田則文. 第 100 回日本消化器病学会総会 2014 年 4 月 24 日 (東京国際フォーラム、東京)

H. 知的財産権の出願、登録状況

1.特許取得
なし

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

エンテカビル(ETV)を開始し12ヶ月以上観察したB型慢性肝疾患150例(核酸アナログ未治療121例/ラミブジンからの切り替え29例)を対象とした。未治療例では12ヶ月のHBV DNA < 2.1 log₁₀ コピー/mLへの低下は82%、HBeAg陽性例では12ヶ月の陰性化率は21%であった。難治要因として、治療前高ウイルス量のみがETVによりHBV DNAまたはHBeAg陰性化が得られない独立因子であった。抗ウイルス効果不良例において高感度PCR-Invader法でも潜在する薬剤耐性株を検出することは出来なかった。

A. 研究目的

B型慢性肝炎・肝硬変に対する現行の抗ウイルス薬としてインターフェロン(IFN)と核酸アナログがあるが、核酸アナログは経口薬で副作用が少なく効果も確実であるため汎用されている。核酸アナログはB型肝炎ウイルス(HBV)複製過程の逆転写を阻害し、またchain terminator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。ところが肝細胞の核内に存在し複製中間体としてはたらく閉環状完全二重鎖DNA(cccDNA)には作用しないためウイルスを排除することは出来ず、長期の治療に伴い薬剤耐性が問題となる。現在、第一選択薬として位置づけられているエンテカビル(ETV)やテノホビルの5年の耐性出現率は0~1.2%と非常に低

率ではあるが、治療早期の抗ウイルス効果が不良の難治例では将来の耐性出現が懸念される。

今回我々は、1)難治例の頻度を明らかにし、その臨床的特徴について解析した。また、2)HBV DNAが陰性化しない症例では、breakthroughを来す前から耐性ウイルスが潜在するかについても解析した。

B. 研究方法

対象

対象は、i) ETVを導入し12ヶ月以上観察した核酸アナログ未治療のB型慢性肝疾患121例(49±13歳、男性69%、HBeAg陽性43%、HBV DNA中央値6.7 log₁₀ コピー/mL、genotype C 92%、慢性肝炎/肝硬変/肝癌 75/10/36)。ii) ラミブジンからETVに切り替え12ヶ月以上観察

しえた 29 例(50±12 歳、男性 79%、HBeAg 陽性 45%、HBV DNA 中央値 $4.4 \log_{10}$ コピー/mL、genotype C 95%)であった。

治療効果について、6 ヶ月、12 ヶ月の HBV-DNA $< 2.1 \log_{10}$ コピー/mL への低下をそれぞれ VR₆、VR₁₂、HBeAg 陽性例においては 6 ヶ月、12 ヶ月の HBeAg 陰性化を SR₆、SR₁₂ と定義した。

HBV 薬剤耐性変異の検出には Line probe 法 (INNO-LiPA HBV DR Ver. 2Plus) と PCR Invader 法 (BML) を用いた。

(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。

C. 結果

ETV の抗ウイルス効果に寄与する因子の検討

核酸アナログ未治療の HBeAg 陽性 52 例に対する成績は VR₆ 17 例(33%)、VR₁₂ 35 例(67%)、SR₆ 10 例(19%)、SR₁₂ 11(21%) であった。HBeAg 陰性 69 例に対する成績は VR₆ 53 例(77%)、VR₁₂ 64 例(93%) であった。

核酸アナログ未治療全 121 例において VR₁₂ に寄与する独立因子として、HBeAg 陰性であることが抽出された(表 1)。また HBeAg 陽性 69 例において SR₁₂ を得られた症例は、治療前 HBV DNA が有意に低いことが示された($P = 0.026$ 、表 2)。

表 1 VR₁₂ に寄与する因子(多変量解析)

Factors	Category	HR (95% C.I.)	P
HBeAg	positive	1	0.048
	negative	3.57 (1.01-12.98)	
HBsAg (Log IU/L)	≥ 3.5	1	0.091
	< 3.5	2.58 (0.86-7.74)	
HBV-DNA (Log copies)	≥ 6.7	1	0.33
	< 6.7	2.00 (0.49-8.12)	

表 2 SR₁₂ に寄与する因子(単変量解析)

	Serological responders (n = 10)	Serological non-responders (n = 38)	P
Age (years)	42 ± 10	42 ± 11	N.S.
Sex (%Male)	7 (70%)	26 (68%)	N.S.
ALT (IU/L)	418 ± 486	200 ± 236	N.S.
Platelet ($\times 10^4 / \text{mm}^3$)	17.8 ± 4.7	18.2 ± 7.4	N.S.
HBsAg (\log_{10} IU/L)	3.31 ± 0.73	3.77 ± 0.65	N.S.
HBeAg (C.O.I.)	24.7 (7.7- 1261)	1554 (118.4- 1600<)	0.077
HBV-DNA (\log_{10} copies/mL)	7.3 ± 0.8	8.2 ± 1.1	0.026
Precore (wild/mixed/mutant)	6/2/1	20/18/0	N.S.
Core Promotor (wild/mixed/mutant)	2/1/6	8/3/26	N.S.
Genotype (A/B/C/D)	0/0/10/0	1/2/34	N.S.
Grade (A1/A2/A3)	2/5/2	15/9/3	N.S.
Stage (F1/F2/F3/F4)	3/5/1	13/8/6/1	N.S.
HCC (%)	1 (10%)	4 (11%)	N.S.

N.S., not significant

ETV効果不良例における耐性ウイルスの存在について

直近の検査で HBV DNA $\geq 2.1 \log_{10}$ コピー/mL であった核酸アナログ未治療 7 例とラミブジンからの切り替え 5 例に対して耐性ウイルスの検出を試みた(表 3)。

ウイルスの検出に関して、HBV DNA $< 3.0 \log_{10}$ コピー/mL の検体では、Line probe 法、Invader 法ともに感度以下であった。HBV DNA 3.0 ~ 4.0 \log_{10} コピー/mL の 6 検体では、Line probe 法で 33%、Invader 法で 100% に、HBV DNA > 4.0

\log_{10} コピー/mL の 2 検体では Line probe 法、Invader 法とも 100% にウイルスの検出が可能であった。

耐性ウイルスに関しては、Line probe 法では 5%、Invader 法では 2% 以上を占めれば検出可能であった。核酸アナログ未治療では最長 49 ヶ月の ETV 投与で、いずれの方法でも耐性変異は検出されなかつた。ラミブジンからの切り替え例では 4 例で耐性変異が検出された。

表 3 直近の検査で HBV DNA $\geq 2.1 \log_{10}$ コピー/mL であった症例における耐性変異

Age (years)	Sex	NUC	Duration of ttt (mos)	HBV-DNA (Log copies)	Line probe	Invader	Direct sequence
57	M	Experienced	15	5.6	L180L/M A181A/T T184T/ILFM M204M/V N236N/T	L180M A181T T184 I/M M204V N236T M250L	A181T N236T
49	M	Experienced	42	4.7	L180M T184T/SCGA M204V	L180M T184A S202G M204V/I M250L/V	L180M T184A M204V
47	M	Experienced	16	3.3	wild	M204I	wild
29	M	Experienced	42	2.2	(-)	(-)	M204I
43	M	Experienced	37	2.2	(-)	(-)	(-)
72	F	Naïve	26	4.0	(-)	wild	(-)
43	M	Naïve	35	3.7	(-)	wild	(-)
66	M	Naïve	20	3.4	(-)	wild	(-)
67	F	Naïve	19	3.4	(-)	wild	(-)
57	M	Naïve	16	3.1	wild	wild	wild
48	M	Naïve	38	2.9	(-)	(-)	(-)
51	M	Naïve	18	2.5	(-)	(-)	(-)

D. 考察

我が国における肝癌による死亡は年間30,000人以上と推定され、悪性新生物による死亡では肺癌、胃癌、大腸癌に次いで第4位となっている。その成因としてはC型肝炎ウイルス(HCV)が最も多く約70%を占めているが、HCVに対しては直接作用型抗ウイルス経口薬を2剤併用することにより、IFNフリーでも高率にウイルスの排除が得られるようになった。一方、成因の約15%を占めるHBVに対しては核酸アナログ単剤ではウイルスの排除は困難で、単独または核酸アナログとの併用で使用可能な新規治療薬の開発が急務である。そこで核酸アナログ治療の難治要因や耐性機序を解明することは引き続き重要な研究課題である。

第一世代の核酸アナログ薬であるラミブジンではポリメラーゼ遺伝子の逆転写酵素ドメインの204番のアミノ酸置換(いわゆるYMDD変異)により年率十数%、アデフォビルでは236番または181番のアミノ酸置換により年率数%の割合で薬物耐性が出現することが知られている。これに対してETVは、204番に加えて169番、184番、202番、250番のいずれかの置換が加わらなければ耐性にならない所謂genetic barrierの高い薬剤であり、実際、5年の耐性出現率は1.2%と報告されている。テノホビル耐性に関しては194番置換が関連するという報告もあるが、実際の6年耐性出現率は0%であり、コンセンサスは得られていない。

Keeffeらは'Roadmap concept'として、核酸アナログ投与24週でHBV DNAの陰性化が得られない難治例では、将来の耐性化が懸念されるため、治療方針の変更を検討することを勧めている(*Clin Gastroenterol Hepatol* 2008)。我々の検討では治療前高ウイルス量のみが、ETVによりHBV DNAまたはHBeAgの陰性化が得られない難治要因であった。

治療前に高ウイルス量であることが、陰性化が得られにくい要因であることは至極当然であるが、同時に治療前から耐性ウイルスが潜在している可能性も考えられる。現在、commercialに使用可能なHBV耐性変異検出キットとしてLine probe法、PCR Invader法が挙げられる。既報のごとく、Line probe法では5%以上(Degertekin B et al. *J Hepatol* 2009)、Invader法では2%以上(Tadokoro K et al. *J Virol Methods* 2011)耐性ウイルスが占めれば検出可能であった。未治療例では高感度のInvader法を用いても、治療前から潜在する耐性ウイルスを検出することは出来なかった。我々は更に次世代シークエンサーを用いて、より高感度に(未知のものも含め)耐性ウイルスの検出を試みている(詳細は他項)。

E.結論

- 1) 治療前高ウイルス量はETVによりHBV DNAまたはHBeAg陰性化が得られない難治要因であった。

- 2) PCR Invader 法は、Line probe 法より高感度で、HBV DNA $\geq 3.0 \log_{10}$ copies/mL かつ耐性ウイルスが 2%以上を占めれば検出可能であった。
- 3) 核酸アナログ未治療例では PCR-Invader のような高感度法でも潜在する薬剤耐性ウイルスは検出されなかつた。

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, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. Noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol.* 20: 12031-8 (2014).

学会発表

2. Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Uchida-Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Murakami Y, Jomura H, Shiomi S, Kawada N. Long-term outcome of sequential therapy with lamivudine followed by interferon in nucleoside-naive, hepatitis B e antigen-positive patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection. 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL) April 12, 2014, London

3. 榎本大, 西口修平, 河田則文。HBeAg 陽性 B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ/IFN sequential 治療後の長期経過：特に HBsAg、HBcrAg の変化について。第 100 回日本消化器病学会総会 ワークショッピング「B 型肝炎抗ウイルス療法の進歩と課題」 平成 26 年 4 月 26 日 東京都

4. 榎本大, 斎藤正紀、榎本平之、西口修平、津田泰宏、樋口和秀、打田佐和子、森川浩安、村上善基、田守昭博、河田則文。B 型慢性肝炎に対するエンテカビル/IFN sequential 療法：特に PEG-IFN と従来型 IFN の比較について。第 18 回日本肝臓学会大会 平成 26 年 10 月 23 日 神戸市

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、肝癌に至る症例がある。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。昨年度は肝炎の鎮静化に I97L 変異が関与する可能性を報告した。本年度の検討では I97L の変異は HBeAb 陽性例で HBeAb 陰性例と比較して高率にみられた。変異がみられる症例ではその後の経過で HBVDNA、ALT の低下が見られ、一部の症例で HBsAg が陰性化した。

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、肝癌により年間約 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 の產生が停止すことや Basal Core Promoter (BCP) の A1762T/G1764A の変異で PreC mRNA の転写効率が低下し HBeAg 產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 Log copies/mL 以上かつ ALT が 31IU/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。昨年度は HBeAb 陽性例の少数例で検討を行った。本年度の研究では HBe 抗体陰性症例および陽性症例において、B 型慢性肝炎症例において coreI97 変異がその後の経過に及ぼす影響を検討することを目標とした。

B. 研究方法

2 年以上経過観察ができた慢性 B 型肝炎患者(genotype C) 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で coreI97 変異が測定された 82 症例を対象とした。HBVDNA 5.0 Log copies/mL 以上かつ ALT 31IU/mL 以上で推移したものの或いは、肝障害の持続があり核酸アノログ製剤を使用した症例を経過不良例とし、それ以外を経過観察可能例とした。またその後の経過観察後に HBsAg が消失したかどうかも検討した。Core 領域のダイレクトシークエンスを行い確認した。

患者背景

HBeAb 陰性例は 21 例、HBeAb 陽性例

は 61 例であり、平均年齢、性別の割合、GTP、T.Bil、Alb、血小板、観察期間に有意な差は見られなかったが、ALT は HBeAb 陰性例で 52.0 (27.0-92.0) IU/L と HBeAb 陽性例の 25.0 (17.0-41.5) IU/L と比較して有意に高値であった。また HBsAg 値はそれぞれ、3235 (1932-31809) IU/mL、1730 (476-4520) IU/mL と HBeAb 陰性例で有意に高値であり、HBVDNA は 8.5 (7.7-9.1) Log copies/mL、4.5 (3.5-5.6) Log copies/mL と HBeAb 陰性例で有意に高値であった。

HBeAb 陽性例において I97wild と I97L 変異ありの背景を比較すると、I97L 変異のある症例で年齢が 43 (35-49) 歳であり I97wild の 49 (41-62) 歳と比較して有意に若年であった($P=0.046$)。しかし、他の性別、ALT、GTP、T.Bil、Alb、血小板値、HBsAg、HBVDNA、観察期間に関して有意な差はみられなかった。

(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付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を適正に管理保存している。

C. 結果

HBeAb 陰性例、HBeAb 陽性例の I97L 変異の割合

HBeAb 陰性例において I97L 変異は 14.3% (3/21)、HBeAb 陽性例においては 50.8% (31/61) 見られ、HBeAb 陽性例で有意に高率に存在していた ($P=0.002$)。

HBeAb 陽性の有無、I97L 変異の有無によるその後の経過

HBeAb 陰性例では I97wild の症例で 1 例のみが経過観察可能例であったが、I97L 変異例も含めて他の 20 例は経過観察不良例であった。一方、HBeAb 陽性例では I97wild の症例は 36.0% (9/25) が経過観察可能例であったのに対して I97L 変異がある症例では 67.7% (21/31) で経過観察可能例であり、有意に I97L 変異がある症例で経過観察可能例が高率であった ($P=0.018$)。

HBeAb 陽性例で I97L 変異がある症例では HBVDNA は 4 Log copies/mL から徐々に低下し 3 Log copies/mL 程度まで低下したが、I97Lwild の症例では 5 ~ 6 Log copies/mL で推移した。ALT 値も I97L 変異がある症例では経過とともに 30IU/L 未満で推移し肝炎の鎮静化がみられたのに対して、I97wild の症例では時々 ALT の上昇がみられ、30IU/以上で推移した。

HBeAb 陽性の有無、I97L 変異の有無による HBsAg 消失の有無

HBeAb 陰性例では I97L 変異の有無に

かかわらず HBsAg の消失は見られなかつた。一方、HBeAb 陽性例では I97wild の症例では HBsAg の消失はみられなかつたが、I97L 変異のある症例の 8 例 25.8% で HBsAg が消失していた ($P=0.006$)。

D. 考察

本研究では I97L の変異は HBeAb 陽性例で HBeAb 陰性例と比較して高率にみられた。変異がみられる症例ではその後の経過で HBVDNA、ALT の低下が見られ、一部の症例で HBsAg が陰性化した。

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)。

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つたため、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 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 量が低下していくことが推察できる。今回の検討において HBeAb 陰性例で I97L 変異の頻度は低く HBeAb 陽性例では頻度が高く、更にその後 HBsAg が消失した症例もみられたことから、肝硬変でない HBe 抗体陽性で、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

B 型慢性肝炎において、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ある。

F.健康危険情報

特記事項なし。

G.研究発表

論文発表

1. Ishigami M, Honda T, Ishizu Y, Onishi Y, Kamei H, Hayashi K et al. Frequent incidence of escape mutants after successful hepatitis B vaccine response and stopping of nucleos(t)ide analogues in liver transplant recipients. Liver Transpl. 2014;20:1211-1220

2. Imai N, Ishigami M, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K et al. Transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: A review of techniques. World J Hepatol. 2014;27:844-850
3. Tachi Y, Hirai T, Miyata A, Ohara K, Iida T, Ishizu Y, Honda T, et al. Progressive fibrosis significantly correlates with hepatocellular carcinoma in patients with a sustained virological response. Hepatology Research 2015;30:178-183
4. Hayashi K, Katano Y, Ishuzu Y, Kuzuya T, Honda T, Ishigami M et al. Association of interleukin 28B polymorphism and mutations in the NS5A region of hepatitis C virus genotype 2 with interferon responsiveness J Gastroenterol Hepatol 2015;30:178-183
5. Honda T, Ishigami M, Hayashi H, Ishizu Y, Kuzuya T, Hayashi K et al. Effect of Peginterferon alfa-2b and Ribavirin on Hepatocellular Carcinoma Prevention in Older Patients with Chronic Hepatitis C. J Gastroenterol Hepatol 2015;30:321-328
6. Honda T, Ishigami M, Luo F, Ishizu Y, Kuzuya T, Hayashi K et al. Hepatitis B e antigen and hepatitis B surface antigen seroclearance with emergence of lamivudine-associated mutation and core mutation after elevation of CD4 in a patient with hepatitis B and HIV. Internal Medicine 2015;54:585-590

7. Ishizu Y, Ishigami M, Suzuki N, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K et al. Endoscopic treatment of esophageal varices on hemophilic patients with liver cirrhosis. *Gastrointest Endosc* 2015;81:1059-1060
8. Yamada K, Ishigami M, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K, Goto H. Association between responses to interferon therapy and genetic variation in interferon -28B and the core region of hepatitis C virus genotype 3a. *J Med Virol*. In Press.
9. Ando T, Kojima K, Isoda H, Eguchi Y, Honda T, Ishigami M, Kimura S. Reactivation of resolved infection with the hepatitis B virus immune escape mutant G145R during dasatinib treatment for chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol*. In Press.
10. 本多 隆、石上雅敏、新家卓郎、今井則博、阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵一、石津洋二、葛谷貞二、林 和彦、石川哲也、中野 功、片野義明、後藤秀実. C型慢性肝炎難治例におけるPeg-IFN/RBV併用療法の治療効果と発癌抑制効果. *消化器科* 2014;58:337-341
- 11.
- 学会発表
1. Honda T, Ishigami M, Luo F, Ishizu Y, Kuzuya T, Hayashi K, Shimomura Y, Goto H Oral supplementation of BCAA alleviates hepatic steatosis and liver injury associated with NASH 63th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD). Nov. 9, 2014 Boston
 2. 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 聰、石津洋二、葛谷貞二、林 和彦、石川哲也、中野 功、後藤秀実. HBe 抗体陽性 B型慢性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。分岐鎖アミノ酸による NASH マウスモデルにおける肝脂肪抑制効果. 第 100 回日本消化器病学会総会 平成 26 年 4 月 26 日 東京都
 3. 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 聰、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型慢性肝炎難治例における PegIFN・Ribavirin・Telaprevir3剤併用療法の治療効果. 第 50 回日本肝臓学会総会 平成 26 年 5 月 29 日 東京都
 4. 本多 隆、石上雅敏、加藤幸一郎、新家卓郎、今井則博、阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵一、石津洋二、葛谷貞二、林 和彦、中野 功、石川哲也、後藤秀実. 高齢者 C型慢性肝炎における PegIFN・Ribavirin・Simeprevir3剤併用療法の治療効果.

JDDW-Japan2014 平成 26 年 10 月 8 日

5. 本多 隆、石上雅敏、後藤秀実. 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.
第 40 回日本肝臓学会東部会 平成 26
年 11 月 27 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

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**

次世代シーケンサーによるS領域の多様性の評価

分担研究者 矢野嘉彦 神戸大学・微生物感染症学講座 講師

研究要旨

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

A. 研究目的

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

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

って宿主の免疫機構から回避し持続感染をきたすことが知られている。

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

B. 研究方法

インドネシアジャワ島スラバヤ市の病院より採取された 30 名の B 型肝炎ウイルス持続感染

者(慢性肝炎11例、肝硬変肝癌19例)を対象としている。QIAamp DNA Blood Mini Kits (QIAGEN社)を用いて患者血液よりDNAを抽出し、特異的プライマー：HB8F (nt1824-1843; TTCACCTCTGCCTAATCCTC)、HB6R (nt1803-1784; AACAGACCAATTATGCCTA)、HB2F (nt414-433; TGCTGCTATGCCTCATCTTC)、HB3R (nt1107-1084; AGTTGGCGAGAAAGTGAAGGCCCTG)。によりMHR領域を含む693bpのS領域を増幅した。Nextera Sample Prep Kit(イルミナ社)を用いてPCR産物を調整した後、MiSeq シーケンサー(イルミナ社)を用いてシーケンスを行った。

ウイルスの多様性を比較検討した。

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

(倫理面への配慮)

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

C. 結果

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

次世代シーケンスによって得られたMHR領域のアミノ酸変異の多様性について、全アミノ酸に対して20%以上の変異を認める変異の多い領域(major population)、5～20%の変

異を認める中間領域(intermediate population)、1～5%の変異を認める変異の少ない領域(minor population)に分類した。

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

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

D. 考察

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

今回の次世代シーケンスの結果では、MHR領域の変異は肝硬変肝癌患者により高頻度に認められたが、これまでより病態の進行した肝炎患者においてMHR領域の変異頻度が高いことはいくつかの文献で報告されている。この要因としては、当初から存在した変

異ウイルスが持続感染の後に肝癌へ進展させる可能性と、ウイルスの複製過程で出現した変異ウイルスが持続感染や肝癌への病態進展に関わっている可能性がある。MHR 領域変異が病態の進行における役割については、引き続き詳細に検討する必要がある。

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

論文発表

1. Yano Y, Azuma T, Hayashi Y. Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics. *World J Hepatol.* 2015 Mar; 27(7):583-92. doi: 10.4254/wjh.v7.i3.583. Review. PMID: 25848482
2. Utsumi T, Wahyuni RM, Lusida MI, Yano Y, Priambada NP, Amin M, Purwono PB, Istimagfiroh A, Soetjipto, Brulé A, Hotta H, Hayashi Y. Full genome characterization and phylogenetic analysis of hepatitis B virus in gibbons and a caretaker in Central Kalimantan, Indonesia. *Arch Virol.* 2015 Mar; 160(3):685-92. doi: 10.1007/s00705-014-2323-9. Epub 2015 Jan 7. PMID: 25559671
3. Murakami Y, Hayakawa M, Yano Y, Tanahashi T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Iwadate M, Umeyama H. Discovering novel direct acting antiviral agents for HBV using in silico screening. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jan 2; 456(1):20-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.024. Epub 2014 Nov 15.
4. Widasari DI, Yano Y, Heriyanto DS, Utsumi T, Yamani LN, Rinonce HT, Wasityastuti W, Lusida MI, Soetjipto, Okada R, Murakami Y, Tanahashi T, Azuma T, Hayashi Y. A

- deep-sequencing method detects drug-resistant mutations in the hepatitis B virus in indonesians. *Intervirology*. 2014;57(6):384-92. doi: 10.1159/000366420. Epub 2014 Oct 31. PMID: 25382636
5. Utsumi T, Yano Y, Amin M, Lusida MI, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Acute hepatitis due to hepatitis A virus subgenotype IA as an imported infectious disease from Indonesia. *Kobe J Med Sci*. 2014 Oct 1;60(2):E43-7. PMID: 25339259
 6. Juniastuti, Wibowo BP, Wibawa ID, Utsumi T, Mustika S, Amin M, Wahyuni RM, Kurniawan H, Hendrayana A, Setiawan PB, Yamani LN, Soetjipto, Yano Y, Hotta H, Hayashi Y, Lusida MI. Interleukin-28B polymorphisms and response of chronic hepatitis C patients from Indonesia to pegylated interferon/ribavirin treatment. *J Clin Microbiol*. 2014 Jun;52(6):2193-5. doi: 10.1128/JCM.00768-14. Epub 2014 Apr 2.
 7. Utsumi T, Yano Y, Hotta H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus. *World J Med Genet*. 2014 May 27; 4(2): 19-26.
 8. Bai F, Yano Y, Kim SR, Seo Y, Miki A, Saito M, Hirano H, Momose K, Minami A, Hatazawa Y, Hayakumo T, Widasari DI, Rinonce HT, Sugano M, Tani S, Yoon S, Imoto S, Azuma T, Hotta H, Hayashi Y. Mutational diversity of NS5A and NS3 during triple therapy (telaprevir, pegylated-interferon- α 2b and ribavirin) for genotype 1b chronic hepatitis C: The Kobe Hepatitis Therapeutic Group. *Int J Mol Med*. 2014 Jun;33(6):1652-6. doi: 10.3892/ijmm.2014.1706. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24647743
 9. Juniastuti, Utsumi T, Nasronudin, Alimsardjono L, Amin M, Adianti M, Yano Y, Soetjipto, Hayashi Y, Hotta H, Lusida MI. High rate of seronegative HCV infection in HIV-positive patients. *Biomed Rep*. 2014 Jan;2(1):79-84. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24649073
 10. Juniastuti, Utsumi T, Aksono EB, Yano Y, Soetjipto, Hayashi Y, Hotta H, Rantam FA, Kusumobroto HO, Lusida MI. Predominance of precore mutations and clinical significance of basal core promoter mutations in chronic hepatitis B virus infection in Indonesia. *Biomed Rep*. 2013 Jul;1(4):522-528. Epub 2013 May 15. PMID: 24648979

学会発表

1. Takako Utsumi, Rury M. Wahyuni, Maria I. Lusida, Yoshihiko Yano, Nur P. Priambada, Mochamad Amin, Priyo B. Purwono, Anittaqwa Istimagfiroh,

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

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

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

分担研究者 岩館満雄
中央大学大学理工学部生命科学科・准教授

研究要旨

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

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

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

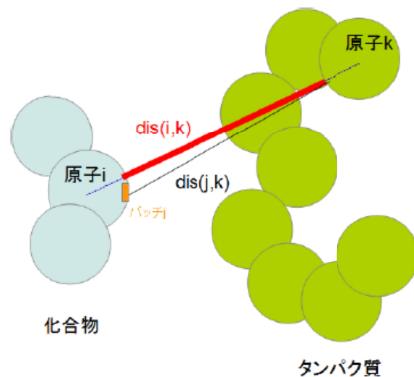


図 1 タンパク質とその近傍にある任意の化合物の疎水性を想定した場合

式 1

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

式 2

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

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

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

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

表 1 f 値の一覧(梅山・赤羽の論文より)

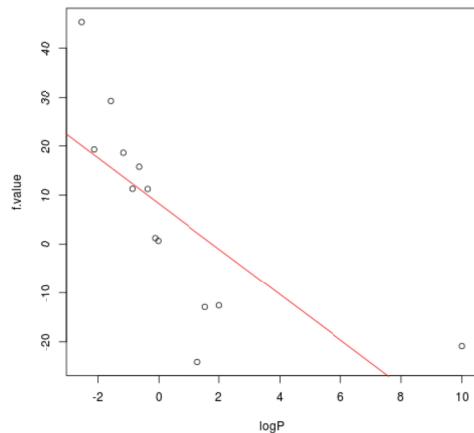


図 2 縦軸は f 値、横軸は $\log P$

C . 研究結果

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

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

式 3

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

(k は係数)

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

D . 考察

本法は顕著な相関係数の改善は見られ有効な方法として十分な検討の価値があると考えられる。しかしながら、問題は計算時間にあり従来型の ChooseLD の二桁ほど多い計算時間をする点が課題である。また、ターゲットとしてまだ一つのタン

パク質のみ試したのみであり、より広範囲での試行を要すると考えられる。現在、計算時間短縮を模索中。

E . 結論

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

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表 未発表
2. 学会発表 未発表

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 未取得
2. 実用新案登録 未登録
3. その他

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

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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト(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
Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Kozuka R, Hayashi T, Kohmoto M, Jomura H, Morikawa H, Murakami Y, Shiomomi S, Kawada N.	Long-term Outcome of Sequential Therapy with Lamivudine Followed by Interferon and Cytokine in Nucleoside-naïve, Hepatitis B e-antigen-positive Patients with Chronic Hepatitis B Virus Genotype C Infection.	Journal of Interferon and Cytokine Research	in press	Apr 17	2015
Murakami Y, Hayakawa M, Yano Y, Tanahashi T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Iwadate M, Umeyama H.	Discovering novel direct acting antiviral agents for HBV using in silico screening	Biochemical and Biophysical Research Communications.	456	20-28	2015
Tamori A, Hino M, Hagiwara 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 hematologic malignancy.	Journal of Gastroenterology and Hepatology	29	1715-1721	2014
Toyoda H, Kudada T, Tada T, Kaneko Y, Maeda A.	A laboratory marker, FIB-4 index, as a predictor for long-term outcomes of hepatocellular carcinoma patients after curative hepatic resection.	Surgery.	94	192-207	2013

Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiya M, Seto WK, Yuen MF, Pons-suwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuurra K, Tanaka Y, Kuroasaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Higie 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
Tamori A, Kawada N.	HLA class II associated with outcomes of hepatitis B and C infections.	World J Gastroenterol.	19	5395-3401	2013
Tamori A, Kawada N.	HLA class II associated with outcomes of hepatitis B and C infections.	World J Gastroenterol.	19	5395-3401	2013
Tamori A, Kawada N.	HLA class II associated with outcomes of hepatitis B and C infections.	World J Gastroenterol.	19	5395-3401	2013

