

機関番号：23903
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390213
 研究課題名（和文）B型肝炎ウイルス遺伝子型毎の薬剤耐性メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of drug resistance among HBV genotypes

研究代表者

溝上 雅史（MIZOKAMI MASASHI）
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・客員教授
 研究者番号：40166038

研究成果の概要（和文）：1、ガイドラインの検証：多施設ランダム化比較臨床試験を実施、短期的にはエンテカビル(ETV)切り替えが推奨された。2、キメラマウスを用いた *in vivo* 感染実験：(1) ETV 耐性株に対する低分子化合物の同定。(2) 潜在性 HBV 感染患者の血清を用いた感染実験によりその感染性を証明。3、ETV 耐性メカニズムの解明：ETV 耐性変異(180M, 202G, 204V)に伴い逆転写酵素の立体構造が変化し ETV との結合能が低下。

研究成果の概要（英文）：1. Randomized controlled trial evidenced that switching treatment to ETV was recommended during at least 2 years' follow-up period in patients treated with LAM for more than 3 years maintaining HBV DNA less than 2.6 log copies/ml. 2. Using chimeric mice model, we found new small compounds to inhibit ETV resistant. 3. We found that the low binding affinity for ETV to the DNA binding domains, involving conformational change of the binding pocket of HBV RT by the ETVr substitutions, could induce BT. ETV should be considered as a first-line option for nucleoside-naïve patients; however, it is not an optimal therapy for patients with LVDr.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：B型肝炎ウイルス、エンテカビル、ラミブジン、薬剤耐性、キメラマウス

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は1967年に発見され今年で丁度40年になるにも関わらず、現在でも世界中で約4億2千万人の持続感染者が存在し、世界中で年間100万人がHBVによる肝硬変や肝がんで死亡し、本邦でも約100万人の持続感染者と年間約6,000人が肝がんで死亡しているが、その治療法も確立していない(WHO 2006)。その理由は主に次の4点であった。

(1) HBVの臨床像が世界的に異なっていることへの理解が十分では無かったこと。

(2) HBVの世界的統一された分類が存在しなかったこと。

(3) HBVの効率的な細胞培養ができなかったこと。

(4) HBVの感染実験がチンパンジーでしかできなかった。

2. 研究の目的

逆転写酵素(RT)阻害剤はHBVに対する有効な治療法であるが、耐性が高率に出現することが大きな問題である。わが国においてRT阻害剤の第一選択剤であるエンテカビル(ETV)耐性頻度及びその変異パターンを多施設共同研究により検討する。さらに、ガイドラインで推奨されているETVへの切り替えの有用性を検証する。基礎的検討として、我々がすでに確立している感染モデルを用いて薬剤耐性出現のメカニズムを明らかにすると同時に、耐性株に対して有効な新規薬剤の探索を行う。さらに、RT阻害剤投与による耐性変異に伴うRTの立体構造の変化や治療抵抗性に寄与するアミノ酸側鎖の親水・疎水性や電荷分布の変化について検討する。

3. 研究の方法

臨床的検討

多施設共同研究により、ラミブジン(LVD)からETVへの切り替えの有効性に関してランダム化比較臨床試験で検討した。

基礎的検討

(1)すでに報告されている Genotype に対応した LVD耐性株クローン、ETV耐性株クローンを作成する。耐性変異株の複製能・感染能を検討する。

(2) *in vitro*複製モデルを用いて 薬剤感受性(IC50)などを求める。キメラマウスを用いた検討。

(3) 耐性変異に伴う立体構造の変化と治療抵抗性に寄与する立体構造や電荷分布を推測する。電荷分布や疎水性・親水性の違いがRT阻害剤の結合能を変化させる可能性が考えられるからである。また、専用解析ソフトを用いてドッキングシミュレーションを行う。

(4) 早期に耐性株出現例や晩期(投与後5年以上)出現例の血清をヒト肝細胞置換キメラマウスに接種し、長期に観察する。耐性出現パターンを比較する。

(5) 潜在性HBV感染におけるHBV DNAの再活性化；潜在性HBV感染者(HBsAg陰性、HBV-DNA陽性)血清の感染性に関して、免疫不全ヒト肝細胞置換マウスを用いて検証する。

4. 研究成果

臨床的検討

ガイドラインの検証：3年以上LVD単独投与により効果が得られている

(HBV-DNA<2.6)B 型慢性肝炎症例に対して、LVD 継続投与群と ETV 切り替え投与群でのランダム化比較臨床試験を実施した。その結果、LVD 継続群では高率にブレイクスルーを認めたが(40%)、ETV 切り替え群では平均 13 カ月の観察で 1 例もブレイクスルーを認めなかった。短期的には ETV 切り替えが推奨された。

基礎的検討

(1) すでに報告されている Genotype に対応した LVD 耐性株クローン、ETV 耐性株クローンを複数作成した。細胞内でのウイルス複製能は、若干の低下にとどまったが、感染効率は明らかに低下した。

(2) 今後わが国で問題となる可能性がある ETV 耐性株に対して、抗ウイルス効果を有する低分子化合物を *in vitro* 複製モデルでスクリーニングした結果、複数の候補化合物が同定された。キメラマウスを用いた *in vivo* 感染モデルでも、その抗ウイルス効果が検証された。

(3) エンテカビル(ETV)耐性メカニズムの解明 : ETV 耐性変異(180M, 202G, 204V)に伴い、RT の立体構造が変化し、ドッキングシュミレーションにより ETV との結合能が低下することが証明できた。

(4) 早期に耐性株出現例や晩期(投与後 5 年以上)出現例の血清をヒト肝細胞置換キメラマウスに接種し、長期に観察した。今後、ultra-deep sequencing を実施する予定。

(5) 潜在性 HBV 感染【HBsAg 感度以下、HBV-DNA 陽性】患者の血清を用いた感染実

験 : 免疫不全状態にあるヒト肝細胞キメラマウスに接種したところ、感染が成立するマウスが存在した。献血スクリーニングをすり抜けて、輸血後 B 型肝炎が発生する可能性を示唆する重要なデータと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Wu S, Tanaka Y, Mizokami M. et al. (10 人中 9 番目). 査読有. Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species during hepatitis B e antigen seroconversion. J Hepatol. 2011;54(1):19-25.
- ② Kusakabe A, Tanaka Y, Mizokami M. et al. (9 人中 9 番目). 査読有. A population-based cohort study for the risk factors of HCC among hepatitis B virus mono-infected subjects in Japan. J Gastroenterol. 2011;46(1):117-124.
- ③ Yuen MF, Tanaka Y, Sugauchi F, Mizokami M. et al. (13 人中 12 番目). 査読有. Transmissibility of Hepatitis B Virus (HBV) Infection through Blood Transfusion from Blood Donors with Occult HBV Infection. Clin Infect Dis. 2011;52(5):624-632.
- ④ Sugauchi F, Tanaka Y, Mizokami M. et al. (8 人中 8 番目). 査読有. Virological and clinical characteristics on reactivation of occult hepatitis B in patients with hematological malignancy. J Med Virol. 2011;83(3):412-418.

- ⑤ Roman S, Tanaka Y, Mizokami M. et al. (7人中6番目). 査読有. Occult hepatitis B in the genotype H-infected Nahuas and Huichol native Mexican population. J Med Virol. 2010;82(9):1527-1536.
- ⑥ Matsuura K, Tanaka Y, Mizokami M. et al. (22人中22番目). 査読有. Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes among Patients with Chronic Infection in Japan Shifting toward an Increase of Genotype A. J Clin Microbiol. 2009; 47(5):1476-1483.
- ⑦ Tanaka Y, Mizokami M. et al. (11人中11番目). 査読有. Characteristics of hepatitis B virus genotype G coinfecting with genotype H in Chimeric Mice Carrying Human Hepatocytes. Virology. 2008; 376(2):408-415.

[学会発表] (計 16 件)

- ① Sugauchi F. IN VIVO MODEL USING UPA/SCID MICE WITH HUMAN HEPATOCYTES TO STUDY CROSS-GENOTYPE PROTECTIONS OF HBV AND A ROLE OF HBS ANTIGEN MUTATION IN IMMUNITY ESCAPE. The 61st annual meeting of the AASLD. 2010年10月30-11月3日. The Hynes Convention Center (Boston USA).
- ② Kusakabe A. Mizokami M. A POPULATION-BASED COHORT STUDY FOR THE RISK FACTORS OF HCC AMONG HEPATITIS B VIRUS MONOINFECTED SUBJECT IN JAPAN. 2010年10月30-11月3日. The Hynes Convention Center (Boston USA).
- ③ 松浦健太郎. 溝上雅史. ラミブジン投与例におけるエンテカビル切り替え無作

為割り付け試験. 第46回日本肝臓学会総会. 2010年5月27-28日. ホテルメトロポリタン山形(山形市).

- ④ 菅内文中. B型慢性肝炎難治例への対策 B型肝炎に対する Adefovir、Entecavir の治療成績と多剤耐性HBV変異株に対する Tenofovir の有効性. 第13回日本肝臓学会大会. 2009年10月14-16日. 京都国際会館(京都市).
- ⑤ Tanaka Y. Three-year assessment of entecavir resistance in chronic hepatitis B patients and the mechanism of viral breakthrough by the resistance substitutions. The 59st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2008年11月2日. Moscone West Convention Center (San Francisco USA).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝上 雅史(MIZOKAMI MASASHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・客員教授
研究者番号: 40166038

(2) 研究分担者

田中 靖人(TANAKA YASUHITO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 90336694

菅内 文中(SUGAUCHI FUMINAKA)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 20405161

Fuat Kurbanov (FUAT KURBANOV)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号: 10444978
(2008年度・2009年度のみ)