

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790701

研究課題名(和文) ヒト肝細胞キメラマウスと次世代シーケンサーを用いた肝炎ウイルスゲノムの解析

研究課題名(英文) Analysis of hepatitis virus genomes using human hepatocytes transplanted chimeric mice and ultra-deep sequencing.

研究代表者

阿部 弘美 (Abe, Hiromi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・准教授

研究者番号：70572329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：直接作用型抗ウイルス薬(DAAs)は今後のC型慢性肝炎の中心的役割を担うものと期待され開発されてきたが耐性ウイルスの出現が問題となる。HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いてDAAの組み合わせと治療効果、また次世代シーケンサーを用いて耐性変異の出現について解析した。ヒト肝細胞キメラマウスにDAAの標的となる各領域に変異を入れたHCVクローンやそれらの変異を組み合わせたHCVクローンを感染させDAAs投与を行った。その結果今回検討した3種類すべてのDAAの組み合わせで耐性変異の出現が見られた。3者併用療法では予めこれらの耐性変異が治療前に存在するかどうか考慮する必要があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Direct-acting antiviral agents (DAAs) against hepatitis C virus (HCV) have been developed. The aim of this study is to investigate efficacy of combinations of NS3 inhibitor with NS5A or NS5B inhibitor and track the emergence of resistant strains. Human hepatocyte chimeric mice were infected with serum from HCV patients or infectious clones carrying resistance mutations and treated with combinations of DAAs. Nucleotide and amino acid sequences were analyzed by both direct and ultra-deep sequencing. Mice infected with a clone with each DAAs resistant mutations responded poorly to NS5A inhibitor and NS3 inhibitor combination therapy. Although HCV RNA became undetectable soon after the beginning of combination therapy with NS5A and NS5B inhibitor, rebound with emergence of resistance against all three drugs occurred. Our results showed that resistant strains easily develop from cloned virus strains by mutation.

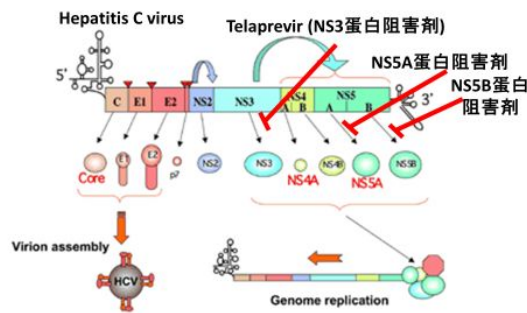
研究分野：医歯薬学

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：ヒト肝細胞キメラマウス 肝炎ウイルス 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルスは3.2kbの不完全2本鎖DNAをゲノムとして持つヘパドナウイルス科のDNAウイルスでありB型肝炎の原因となる。肝硬変、肝癌へと進行する病気である。現在我が国では約120万人のHBV感染者がいると言われている。HBVに感染しても宿主の免疫反応によって自然に排除される場合もあるが近年増加している genotype A は比較的高い確率で慢性化を起こす。B型肝炎患者に対する治療法としてはインターフェロン、核酸アナログがあるが前者の著効率は30-40%、後者でも耐性ウイルスの出現が避けられず完全なHBV排除には至らない。ヒト肝炎ウイルスはヒトとチンパンジーの肝細胞にのみ感染することが知られている。一方C型肝炎ウイルスは9.6kbの1本鎖RNAをゲノムとするフラビウイルス科のウイルスである。C型肝炎患者に対する治療としてはペグインターフェロン(Peg-IFN)/リバビリン(Rbv)併用療法が一般的である。2009年にはIL28BのSNPによりPeg-IFN/Rbv併用療法の治療効果に違いがあることが報告され、さらに新規ウイルス蛋白阻害剤であるTelaprevirの認可を目前に控え患者個人の病態に合わせた治療が期待される。しかし、TelaprevirはPeg-IFN/Rbvと3者併用で認可されるが従来のPeg-IFN/Rbv併用療法より副作用が高頻度に出ると言われていること、TelaprevirはHCV genotype 1bに効果があるがそれ以外の genotype には効果が期待できないことが問題である。



国立感染症研究所ホームページを一部改変

2. 研究の目的

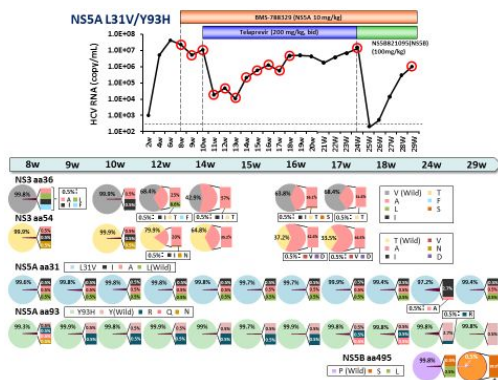
本研究ではB型肝炎患者に対してラミブジン、エンテカビル、アデフォビルなどの核酸アナログを施行した症例、C型肝炎患者に対してTelaprevir、NS3蛋白阻害剤、NS5A蛋白阻害剤、NS5B蛋白阻害剤を施行した症例の血清サンプル、ヒト肝細胞キメラマウスに感染性クローンを接種してHCV感染させ新規DAAを投与した血清サンプルを次世代シーケンサーを用いてウイルスゲノムを解析しウイルス側の治療抵抗性因子を検討する。

3. 研究の方法

DAA治療を施行したB型肝炎患者、C型肝炎患者の詳細なデータベースを構築する。C型肝炎患者についてはIL28Bのタイピング、HCVコア蛋白のアミノ酸、ISDR、IRRDR領域の変異数を調べる。著効例ではDAA治療前、非著効例では治療前、治療中ウイルスが再上昇したポイントの患者血清を次世代シーケンサーサンプルとする。さらに各IL28Bアレルのヒト肝細胞キメラマウスを作製し、DAA治療を開始する前のC型肝炎患者血清または感染性クローンを感染させ種々のDAAを投与する。さらにin vitroで報告されている変異を導入したクローンを感染させたマウスでも同様に解析する。治療前の耐性変異の有無と治療成績との関連、クローンを感染させた場合の変異の出現の有無、臨床経過とヒト肝細胞キメラマウスとの差異を検討しDAA治療効果予測、宿主側ウイルス側の両者の治療抵抗性因子を組み合わせた治療方法の枠組みを構築する。

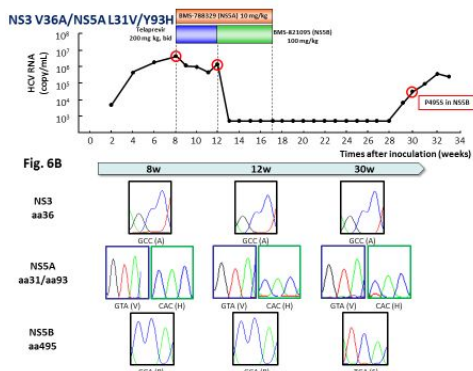
4. 研究成果

TelaprevirとNS5A阻害剤の併用により血中HCV RNAは投与4週間後に検出限界以下まで減少した。一方、HCV genotype 2の患者血清を感染させたマウスでは併用投与によるHCV RNAの低下は1 logのみであった。次に1b型HCVクローン(KT-9)を用いてマウスにモノクローナルなHCVを感染させた。NS3 V36A変異クローン感染マウスではTelaprevirとNS5A阻害剤の併用により血中HCV RNAは検出限界以下まで減少した。しかし、NS5A L31V変異クローン感染マウスでは、ウイルス量の再上昇を認め、さらにNS5A Y93H、NS3 V36Aの変異が出現した。NS5A L31V+Y93H変異クローン感染マウスに対するTelaprevirとNS5A阻害剤の併用療法でもウイルス量の再上昇が見られ新規のT54A(NS3)変異が出現した。また、このマウスの治療14週後にTelaprevirをNS5Bポリメラーゼ阻害剤に置き換えるとウイルス量の上昇が再び見られP495S(NS5B)の変異が出現した。



NS3 V36A+NS5A L31V+Y93Hの変異クローンに対するTelaprevirとNS5A阻害剤の併用療法では血中HCV RNAの低下は治療4週間で1 logのみであった。さらにTelaprevirとポリメラーゼ阻害剤の併用療法4週間を行うと血中

HCV RNA は検出限界以下に減少した。しかし、治療終了 11 週間後にウイルス量は再上昇した。



今回検討した 3 種類すべての DAA の組み合わせで耐性変異の出現が見られた。3 者併用療法では予めこれらの耐性変異が治療前に存在するかどうか考慮する必要がある。HCV の完全排除に向けてさらに検討する必要がある。本研究の成果は、American Journal of Gastroenterology に掲載された。またこの研究成果を、アメリカ（ボストン）にて開催された American Association Study for the Liver Diseases や日本肝臓学会総会に於いて発表した。

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 4 件)

・全て査読有

1. Murakami E, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Honda Y, Ono A, Kosaka K, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Chayama K. Antimicrob Agents Chemother. 2014. 58:2105-2012. doi: 10.1128/AAC.02068-13

2. Miki D, Ochi H, Takahashi A, Hayes CN, Urabe Y, Abe H, Kawaoka T, Tsuge M, Hiraga N, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Takahashi S, Akuta N, Suzuki F, Ikeda K, Kumada H, Karino Y, Toyota J, Tsunoda T, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. HLA-DQB1*03 Confers Susceptibility to Chronic Hepatitis C in Japanese: A Genome-Wide Association Study. PLoS One. 2013;8:e84226. doi: 10.1371/journal.pone.0084226.

3. Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. A novel

TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. Biochem Biophys Res Commun. 2013;441:230-235. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.040.

4. Abe H, Hayes CN, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, Takahashi S, Ochi H, Chayama K. A translational study of resistance emergence using sequential direct-acting antiviral agents for hepatitis C using ultra-deep sequencing. Am J Gastroenterol. 2013;108: 1464-1472. doi: 10.1038/ajg.2013.205.

[学会発表](計 2 件)

1. Abe H, Hayes CN, Hiraga N, Imamura M, Miki D, Tsuge M, Ochi H, Chayama K. Expression levels of IFNL4 and other IFN λ s are determined by dinucleotide polymorphism of IFNL4 and correlate with basal expression levels of interferon stimulated genes and effect of interferon. The 64th AASLD Annual Meeting, Washington DC, USA. November 1- 5, 2013 (Oral)

2. 阿部弘美, C. Nelson Hayes, 平賀伸彦, 今村道雄, 柘植雅貴, 三木大樹, 山田一磨, 高橋祥一, 越智秀典, 茶山一彰. ヒト肝細胞キメラマウスと次世代シーケンサーを用いた新規抗ウイルス薬に対する HCV ゲノムの解析 2013 年 6 月 6~7 日 第 49 回日本肝臓学会総会・東京(口頭発表)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/naika1/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

阿部 弘美 (ABE Hiromi)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：70572329