

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860513

研究課題名(和文) HCVキメラウイルス感染培養系を用いた薬剤耐性機序の解析

研究課題名(英文) To analyze the mechanisms of HCV drug resistance by using chimeric HCV cell culture system

研究代表者

須田 剛生 (Suda, Goki)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：20447460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎のIFNに対する抵抗性の詳細な機序は不明である。我々は新規にgenotype 2bのHCVをクローニングしJFH1株とのキメラウイルスを構築し長期培養が可能であることを明らかにした。IFNとともに長期培養する事によりIFN抵抗性のHCV株を抽出しえた。シーケンサーによる解析にて、構造遺伝子部分に2カ所の変異が入っていることが明らかとなった。この変異を有するウイルスを構築しIFN抵抗性となる事を確認した。このウイルスを用いる事によりHCVのIFN抵抗性の機序の解明に役立つ事が期待される。更に患者血清から次世代シーケンサーを用いて治療前の耐性ウイルスの存在と治療成績の関連を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of HCV resistance to IFN has not been well understood. We conducted homologous recombination between HCV-2b and JFH1 and ensured that the chimeric virus could be long-cultured. Then we long-cultured HCV-2b/JFH1 chimeric virus (C3) with or without IFN and compared virus kinetics between the two groups, and tried to extract IFN resistant clone. Supernatant HCV of C3 decreased immediately. However, 6 weeks after IFN treatment, replication of one C3 clone increased. Comparison of amino acid sequences revealed two sequence differences in structure region. Next we constructed these two sequence differences substituted C3 clone (IFNrC3) and compared IFN sensitivity between IFNrC3 and C3 by transfection into cells and subsequently IFN treatment. The newly constructed IFNrC3 showed resistance to IFN.

Additionally, we investigated prevalence of resistant HCV against DAA in Japan by using NGS. The existence of resistant virus did not affect treatment outcome in TPV based therapy.

研究分野：肝臓病学

キーワード：HCV IFN 薬剤耐性ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は国内に150万人以上の感染者が存在し、日本における慢性肝疾患・肝癌の主因である。新規治療薬開発により治療成績が向上したが、テラプレビルを用いた3剤併用療法を用いても、PEG-IFN/RBV療法の無効症例では著効が得られる率は30-40%程度であり十分な治療効果とはいえ、高率に生じる薬剤耐性変異が問題となる。従って、IFN治療抵抗性の機構解明と責任分子の探索が急務である。

申請者らは急性C型肝炎患者血清よりHCV genotype2b型クローンを構築し、ヒト肝臓キメラマウスへの接種により感染性を確認した(Suda, *Virology* 2010)。Genotype 2bと2a株間のキメラウイルスを用い、コア蛋白のアミノ酸配列により規定されるウイルス感染細胞の、Interleukin-6 (IL-6)、および suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)の発現誘導能の差異がIFN感受性を決定することを報告した(Suda, *Virology* 2010)。さらに、臨床治療抵抗性であるHCVコア70/91番アミノ酸変異株を構築し、治療抵抗性の分子機構を検討したところ、変異株感染細胞ではIFN感受性が低下しており、コア変異株が惹起する小胞体ストレスにより産生されるIL-6およびSOCS3が原因であることを見出した(、Funaoka and Suda, *J Virol* 2011)。今後、抗ウイルス治療の主流になるDirect-acting antivirals (DAA)は多くがIFNとの併用で使用されるが、IFN感受性関連遺伝子、および薬剤耐性ウイルス変異が最終治療効果を規定するかは十分解明されていない。

## 2. 研究の目的

我々が樹立したHCV長期培養系により遺伝子変異の蓄積した新規長期培養ウイルスを用いてレプリコンでは解析できない構造遺伝子部位の薬剤耐性HCV株を薬剤と共培養する事により明らかにする。

また、IFN抵抗HCV株を解析することにより新たなIFN耐性機序の解明とそれに係わる宿主因子の検討2)長期培養系をもちいてレプリコンでは解析困難な構造遺伝子部位薬剤耐性変異を含めた検討を行う。

申請者の研究室で保有する次世代シーケンサー (ION PGM System, Life Technologies)を用いてIFN添加培養およびIFNとDAA(プロテアーゼ阻害薬またはNS5A阻害薬)併用添加培養により動的に生じる薬剤耐性変異をdeep sequencingにより検出・解析する。さらにIFN+DAA併用療法を施行し

たC型慢性肝炎患者において、治療前後の患者血清から抽出したHCVをdeep sequenceすることにより治療前から存在するDAA耐性、あるいはIFN抵抗性遺伝子を有するウイルスの検索と、同ウイルスが治療効果に与える影響の検討を行う。同定した薬剤耐性変異を我々が構築したHCVクローンに導入することにより変異ウイルスのウイルス動態、薬剤耐性機序、耐性変異が他薬剤に与える影響の検討を行う。

## 3. 研究の方法

### HCV長期培養系を用いた薬剤耐性HCVの抽出と、薬剤耐性機構の解析

我々が樹立した遺伝子変異の蓄積した新規長期培養ウイルスを用いて下記のごとく施行する。

1)IFNとの共培養にてIFN耐性変異ウイルスの分離を行い、親株である2b/JFH1キメラウイルスに耐性変異候補を導入し、ウイルスkineticsの解析、IFN耐性機序の解明、関連する宿主因子の解析を行う。

2)構造遺伝子を欠くHCVレプリコンでは解析できない構造遺伝子部位の薬剤耐性HCV株、粒子形成を阻害する薬剤耐性HCV株の分離を各種薬剤と共培養により抽出し、抽出した遺伝子変異を親株に導入し薬剤耐性機構の解析を行う。

### 次世代シーケンサーを用いた薬剤耐性クローンの検討

申請者グループが独自に有する次世代型シーケンサーを用いてIFN+DAA併用療法前後のC型慢性肝炎患者の血清からHCVを抽出しdeep sequenceを行い(1)治療前の薬剤耐性ウイルスの存在と治療成績との関連、(2)治療開始後、動的に出現する薬剤耐性ウイルスの検出(3)治療不成功例における治療後の薬剤耐性ウイルスの動的な変化について検討を行う。

同定した新規薬剤耐性変異は、我々が有する感染培養系ウイルスに薬剤耐性変異を導入し、ウイルスkineticsの解析、薬剤耐性機序の解析を行う。

## 4. 研究成果

(1)我々が樹立した新規HCV長期培養ウイルスにIFNを加えて共培養を行ったところIFN耐性ウイルスを単離しえた。そのIFN抵抗性を有するウイルスの全長のシーケンスを行ったところ構造遺伝子領域のエンベロープ蛋白1、エンベロープ蛋白2の部位にアミノ酸変異を伴った変異を二か所認めた。その変異を親株となるウイルスに導入し

Huh751 細胞にトランスフェクションし IFN を添加し IFN 抵抗性が惹起されるかどうかの検討を行った。変異を導入していない親株の HCV と比較検討を行ったところ変異を導入した HCV は親株と比して IFN に対して耐性となる事が確認され IFN 耐性ウイルス感染培養系の樹立に成功した。

現在、IFN 耐性ウイルスに存在するエンベロープ蛋白に耐性変異を導入したエンベロープ蛋白の恒常発現細胞を構築し耐性化機構の詳細な検討を行っている

また、塩酸アマンタジンと共培養を行う事により耐性ウイルスを抽出可能であった。現在更なる検討を行っている。

(2) 現在、慢性 C 型肝炎の治療の主流となっているのが HCV のウイルス蛋白を直接的にターゲットとした薬剤 (DAA; direct acting antivirals) である。高い治療効果が認められる一方、薬剤耐性ウイルスが大きな問題となっている。我々の研究室で保有する次世代シーケンサーを用いて DAA 治療前後の患者血清を使用し解析を行った。DAA 失敗症例においては、高率に耐性ウイルスが出現する事、IFN 併用療法であれば検討症例においては治療前に存在したプロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスは治療効果に影響しない事を明らかにした。臨床検体から同定した薬剤耐性変異を我々が、構築した HCV クローンに導入して検討を行ったところ、fitness が低下する事、IFN に対しては親株と同等の感受性を有する事を invitro にて明らかにした。DAA 治療失敗例により、DAA 多剤耐性ウイルスが出現した際に再度の IFN 治療を再考するデータと考えられた

##### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

1. Sato F<sup>1</sup>, Kubota Y, Natsuizaka M, Maehara O, Hatanaka Y, Marukawa K, Terashita K, Suda G, Ohnishi S, Shimizu Y, Komatsu Y, Ohashi S, Kagawa S, Kinugasa H, Whelan KA, Rustgi AK, Nakagawa H, Sakamoto N. EGFR inhibitors eliminate cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma by suppressing epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biology & Therapy* 2015 in press. 査読有
2. Onishi R, Ohnishi S, Higashi R, Watari M, Yamahara K, Okubo N, Nakagawa K, Katsurada T, Suda G, Natsuizaka M, Takeda H, Sakamoto N. Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates dextran sulfate sodium-induced severe colitis in rats. *Cell Transplantation* 2015 in press. 査読有
3. Tsunematsu S, Chuma M, Kamiyama T, Miyamoto N, Yabusaki S, Hatanaka K, Mitsuhashi T, Kamachi H, Yokoo H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Orimo T, Wakayama K, Ito J, Sato F, Terashita K, Nakai M, Tsukuda Y, Sho T, Suda G, Morikawa K, Natsuizaka M, Nakanishi M, Ogawa K, Taketomi A, Matsuno Y, Sakamoto N. Intratumoral artery on contrast-enhanced computed tomography imaging: differentiating intrahepatic cholangiocarcinoma from poorly differentiated hepatocellular carcinoma. *Abdom Imaging*. 2015 in press. 査読有
4. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Chuganji Y, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terasita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuizaka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N; NORTE Study Group. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions. *Hepatology Res* 2015 in press doi: 10.1111/hepr.12421. 査読有
5. 須田剛生, 坂本直哉 sofosbuvir genotype2 耐性変異「肝胆膵」2015 5 月号、in press、査読無
6. 須田剛生, 坂本直哉「レプリコンシテム」*Frontiers in Hepatitis* 創刊号 2015、in press 査読無
7. 須田剛生, 坂本直哉「HCV に対する新薬の開発状況と将来の実地診療」*Medical Practise* 2015 32 巻 3 号 447-451、査読無し
8. 須田剛生, 坂本直哉「C 型慢性肝炎に対する新規抗ウイルス薬(DAA s)併用インターフェロン療法」*Medicina* 2015 年 2 月号 305-307、査読無し
9. 須田剛生, 坂本直哉「インターフェロンと経口抗ウイルス薬 (DAA) の作用の違い」*肝臓クリニカルアップデート* 2015 Vol.1 No.1、in press、査読無し
10. Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuizaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis* 2014;35(2):272-81 doi: 10.1093/carcin/bgt343、査読有
11. Tsunematsu S, Natsuizaka M, Fujita H,

- Otsuka N, Terashita K, Sato F, Kobayashi T, Nakai M, Tsukuda Y, Horimoto H, Sho T, Suda G, Nakanishi M, Hashino S, Chuma M, Sakamoto N. Hepatosplenic Gamma-delta T-cell Lymphoma Associated with Epstein Barr Virus. Intern Med. 2014; 53(18):2079-82. 査読有
12. 須田剛生 「インターフェロン少量長期療法の実際と新薬時代における役割」内科, 113 巻 4 号 2014, 681-685 査読無し
  13. 須田剛生, 坂本直哉 「C型肝炎治療の現況と新展開(3剤併用療法、DAA経口薬など)」2014『肝疾患 Review 2014~2015』34-38、査読無し
- [学会発表](計12件)
1. 2015年3月7日北海道消化器学会地方会(110回) 須田剛生 小川浩二 坂本直哉 「当院におけるgenotype1b高ウイルス量C型慢性肝炎に対するSOF+LDV±RBV併用療法の治療成績」札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
  2. 2014年11月29日 須田剛生 古家乾 坂本直哉 「DAA併用療法におけるDAA耐性ウイルス/治療予測因子の検討」肝臓病学会東部会 シンポジウム 京王プラザホテル(東京都・新宿区)
  3. 2014年11月24日 須田剛生 「C型肝炎は完治できる時代へ」日本臨床検査医学学会 集会 シンポジウム 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
  4. 2014年11月20日 Goki Suda<sup>1</sup>, Mitsuteru Natsuizaka<sup>1</sup> Yoko Tsukuda<sup>1</sup>, Seiji Tsunematsu<sup>1</sup>, Fumiyuki Satou<sup>1</sup>, Katsumi Terasita<sup>1</sup>, Takuya Sho<sup>1</sup>, Masato Nakai<sup>1</sup>, Kenichi Morikawa<sup>1</sup>, Kouji Ogawa<sup>1</sup>, Naoya Sakamoto 肝臓病学会シングルトラック 広島グランヴィアホテル(広島県・広島市)
  5. Goki Suda<sup>1</sup>, Yoko Tsukuda<sup>1</sup>, Seiji Tsunematsu<sup>1</sup>, Fumiyuki Satou<sup>1</sup>, Katsumi Terasita<sup>1</sup>, Takuya Sho<sup>1</sup>, Masato Nakai<sup>1</sup>, Mitsuteru Natsuizaka<sup>1</sup>, Makoto Chuma<sup>1</sup>, Naoya Sakamoto Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reaction. 65th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA. (USA) November 9, 2014 Hynes Convention Center
  6. 2014年10月23日 須田剛生 永坂敦 坂本直哉 JDDW 「Analysis of First and Second Generation Protease Inhibitor Combination Therapy in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection」パネルディスカッション 神戸国際展示場2号館(兵庫県・神戸市)
  7. 2014年5月29日 須田剛生 中馬誠 坂本直哉 「C型慢性肝炎に対するDAA療法の治療予測因子・薬剤耐性ウイルスの検討」肝臓病学会総会 シンポジウム ホテルニューオータニ(東京都・千代田区)
  8. 2014年4月24日 須田剛生 中馬誠 坂本直哉 「プロテアーゼ阻害剤併用療法の治療予測因子・薬剤耐性ウイルスの検討」消化器病学会総会 ワークショップ 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
  9. Goki Suda<sup>1</sup>, Yoshiya Yamamoto<sup>2</sup>, Astusi Nagasaka<sup>3</sup>, Ken Furuya<sup>4</sup>, Yoko Tsukuda<sup>1</sup>, Seiji Tsunematsu<sup>1</sup>, Fumiyuki Satou<sup>1</sup>, Katsumi Terasita<sup>1</sup>, Keita Horimoto<sup>1</sup>, Takuya Sh Masato Nakai<sup>1</sup>, Mitsuteru Natsuizaka<sup>1</sup>, Makoto Chuma<sup>1</sup>, Naoya Sakamoto Serum granulysin level is correlated with severity of telaprevir induced dermatological adverse reactions and could be a useful predictor. APASL (Asian Pacific Association for The Study of the Liver) Brisbane (Australia) Brisbane Convention & Exhibition Centre 2014 12-15 March
  10. Goki Suda, Yoko Tsukuda, Mitsuteru Natsuizaka, Makoto Chuma, Naoya Sakamoto Establishment of Interferon resistant genotype 2b/JFH-1 chimeric Hepatitis C virus cell culture system. 64th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Washington DC (USA) Walter E. Washington Convention Center 2013 Nov 1-5
  11. 2013年10月10日 JDDW(日本消化器病関連学会週間) Telaprevir/Peg-IFN/RBV3剤併用療法の治療効果および副作用予測因子の解析 須田剛生 中馬誠 坂本直哉 シンポジウム(グランドプリンス高輪ホテル)(東京都・港区)
  12. 2013年6月6日 肝臓病学会総会 Telaprevir/Peg-IFN/RBV3剤併用療法の治療効果および副作用予測因子の解析 須田剛生 中馬誠 坂本直哉 シンポジウム1京王プラザホテル(東京都・新宿区)
- [図書](計1件)
- 佃曜子 須田剛生 他: 「検査値を読む2013」1246-7、南江堂、2013
6. 研究組織
  - (1) 研究代表者
    - 須田 剛生 (SUDA, Goki)
    - 北海道大学・大学院医学研究科・特任助教
    - 研究者番号: 20447460
  - (3) 連携研究者
    - 坂本 直哉 (SAKAMOTO, Naoya)
    - 北海道大学・大学院医学研究科・教授
    - 研究者番号: 10334418