

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 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
2. 研究開発代表者： 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）
3. 研究開発の成果

① ウイルス変異解析と薬剤応答に関する分析

次世代シーケンサー(NGS)解析の準備として、最低でも100万リード、1万デプスが得られており、ウイルスの変異解析のデータ取得が可能なシステムを構築した(棚橋俊仁)。神戸大学附属病院、名古屋大学附属病院、大垣市民病院、大阪市立大学附属病院に通院中のB型慢性肝炎患者111名の血清中HBVDNAをNGSで解析し、ウイルス変異の多様性を指標にすることで、B型肝炎の病態を予測できることが示唆された。また全ゲノムをPCRを用いないNGS解析法を確立しPCRによる人工的な変異検出の問題を回避できることを示した(伊藤公人)。治療前の核酸アナログ耐性遺伝子を同定し治療前ウイルスのquasispeciesをNGSにより解析した(矢野嘉彦)。

1994年から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例を対象に死因、初診時の簡易的線維化マーカー、HBVDNA量、HBs抗原量との関連を解析すると、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(熊田卓、豊田秀徳)。

大阪市立大における慢性HBVのインターフェロン(IFN)とNA製剤による抗ウイルス効果を評価し、本研究の解析対象となる臨床サンプルの収集を行った。核酸アナログ(NA)製剤治療による抗HBV効果の差異と患者背景の関係、HBV再活性化例における核酸アナログ治療効果と予後とHBs抗体との関係を明らかにした。HBV感染症に対するPEG-IFNとentecavir(ETV)の抗ウイルス効果を解析し、HBVDNA、HBeAgなど治療前高ウイルス量がentecavir効果不良に関連する因子であることを示した。また現在使用されている高感度HBVDNA、HBsAg測定キットを用いても、ETV治療中の患者血清より耐性ウイルスを検出することは出来ないことが明らかになった(河田則文、田守昭博、榎本大)。

肝炎が沈静化した症例の観察開始時にHBVのcoreI97Lの変異が高率に認められ、解析数を増やしたところ、この変異を有する症例は治療の必要性と密接に関係していることを示した(本多隆)。

② 新規抗ウイルス薬創薬

in silico screening結果を効率化するためアルゴリズム改良、低分子化合物選択のためデータベース構築を行い3D構造解析によるHBVタンパクと低分子化合物の結合シミュレーションを実行した(岩館満雄)。疾患の表現系に関与するウイルス遺伝子の変異をmajorおよびminor cloneごとのカタログ化を行い、臨床検体におけるウイルスの3次元構造解析の情報整備を行った(田口善弘)。in silico screeningによるNA剤候補(purine、pyrimidine typeそれぞれ30種)、capsid合成阻害剤候補60種、induced fit type RT阻害剤60種、AGI60種を同定した(梅山秀明)。初代培養肝細胞を使ったin vitro HBV感染実験系を用いてウイルス活性、細胞毒性のモニターを簡便に行う系を作成した。in silico screeningによる抗ウイルス活性持つNA製剤候補4種、core重合阻害薬候補4種、induced fit type RT阻害剤7種、AGI5種を同定した(村上善基)。