

2009 33010A

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

# ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する 新規診断・治療法の開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子周一

平成22 (2010) 年3月

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

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する  
新規診断・治療法の開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 周一

平成22(2010)年 3月

## ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

### 研究組織

<u>研究代表者</u>		
金子 周一	金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学	教授
<u>研究分担者</u>		
竹原 徹郎	大阪大学大学院医学系研究科・消化器内科学	准教授
宇都 浩文	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座 消化器疾患・生活習慣病学	講師
前川 伸哉	山梨大学大学院医学工学総合研究部	講師
田中 靖人	名古屋市立大学大学院医学研究科	教授
花田 賢太郎	国立感染症研究所・生化学	部長
菅 裕明	東京大学先端科学技術研究センター	教授
堀本 勝久	独立行政法人産業技術総合研究所生命情報工学研究センター 生体ネットワークチーム	研究チーム長

# 目 次

## I. 総括研究報告

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

金子 周一 ----- 1

## II. 分担研究報告

1. C型肝炎におけるインターフェロン治療と免疫細胞のシグナル伝達

竹原 徹郎 ----- 11

2. ヒト肝組織および末梢血を用いたプロテオーム診断法の開発

宇都 浩文 ----- 14

3. 末梢血ジェノミクスを用いたウイルス性肝炎医療の開発

前川 伸哉 ----- 19

4. B型肝炎ウイルス感染キメラマウスおよび培養細胞系を用いたジェノミクス解析

田中 靖人 ----- 22

5. 脂質代謝系解析を用いたウイルス性肝炎に対する医療開発研究

花田 賢太郎 ----- 25

6. ジェノミクス技術による新規薬剤リードの探索研究

菅 裕明 ----- 28

7. 統計的因果推定法に基づくジェノミクス解析法の研究	
堀本 勝久	----- 31
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 37

# I. 総括研究報告



ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

研究代表者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：

ウイルス性肝炎における包括的転写産物および蛋白解析、包括的脂質解析、包括的薬物探索、統計的ジェノミクス解析を実施した。研究の技術的要素は、1) トランスクリプトーム（翻訳）研究、2) プロテオームおよびリピドーム研究、3) ジェノミクス情報処理の研究に分類され、解析対象は治療前後のウイルス肝炎肝組織（肝細胞）、キメラマウス肝臓、肝細胞がん、血液、および免疫系を用いた。本研究は3年計画で進行しており、3年目にあたる本年度の成果を記載した。

インターフェロン感受性とインターフェロン誘導遺伝子との関係を明らかにし、診断の候補マーカーを抽出した。IL28B領域の遺伝子多型とインターフェロン誘導遺伝子の関係を示した。末梢血を用いて肝がん診断が可能であることを示した。オートファジー分子機構が抗HCV薬の標的となりうることを明らかにした。肝線維化の進展阻止にTLR4経路を標的とする可能性を見いだした。肝硬変及び肝がん細胞において計測されたデータに適用し、進展要因遺伝子ネットワーク群を同定することに成功した。C型肝炎ウイルスの標的蛋白質に対する環状特殊ペプチドを獲得することができた。

A. 研究目的

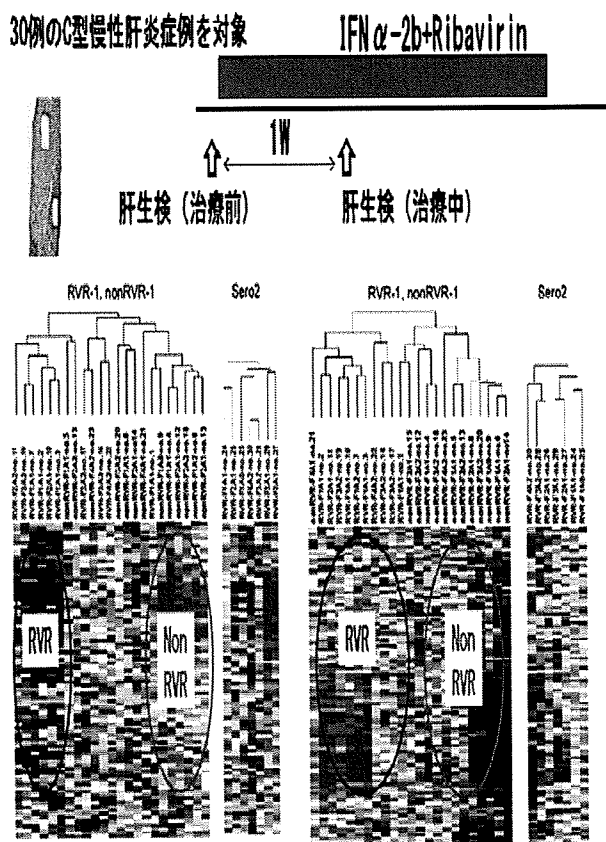
ウイルス性慢性肝炎に対する治療法は、高額で長期にわたり、また副作用も大きい。しかるにその治療効果は限られており、個々の患者に適した治療法を選択することはむずかしい。そこで本研究は、最新の科学技術を用い、1) 最適の治療法を選択するための分子指標を用いた診断法の開発、2) 治療効果の正確な予測を行うための分子を用いた診断法の開発、3) 分子を用いた新たな治療法の研究開発を行うことを目的とした。

B. 研究方法と結果

(1) C型慢性肝炎に対するインターフェロンの投与によって変動する遺伝子の解析（金子）

インターフェロン $\alpha$ ・リバビリン療法を行ったC型慢性肝炎症例30例を対象に治療前と治療後1週における肝生検を行いレーザーキャプチャーダイセクションを用いて肝細胞と浸潤リンパ球組織を得て核酸を抽出し、DNAチップを用いて包括的に発現している遺伝子を解析した。インターフェロン投与によって変動する遺伝子を抽出し

(interferon stimulated genes:ISGs)、治療開始4週後における血液中ウイルス量の変動から rapid viral response (RVR) 群と、それ以外 non-RVR 群に分けて検討を行った。



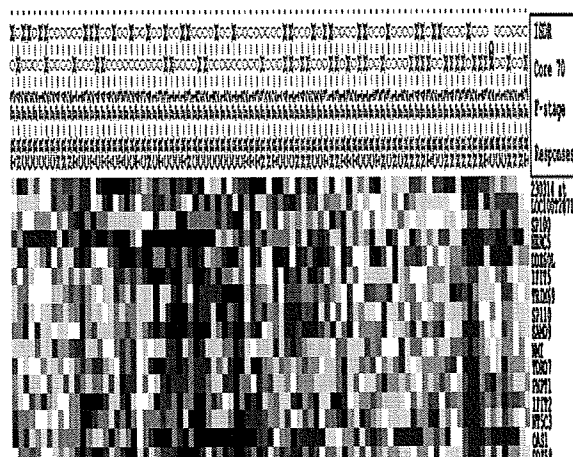
インターフェロン投与によってウイルス量が低下する serotype 1 の RVR 群は上図の左に示すように治療前の肝細胞において ISGs の発現が高くないものの、投与後は右のように ISGs の発現が高くなっていた。一方、ウイルス量が低下しない Non-RVR 群では上図の左のようにインターフェロン治療前においてすでに肝細胞における ISGs の発現が高く、インターフェロンが投与されても ISGs の発現上昇は低かった。しかし、serotype 2 の症例では治療前の ISGs 発現量にかかわらず RVR を示した。リンパ

球においては治療後に ISGs の上昇が認められるものの、その変動幅は小さくなく、また、治療効果との関係もなかった。

即ち、C型慢性肝炎に対するインターフェロンの抗ウイルス効果は ISGs によって引き起こされると考えられるが、ウイルス量が8週の早期に低下しない群では、治療前から ISGs の発現が上昇しておりインターフェロン投与後の ISGs 発現の誘導が小さいことが有効性の低下に関連していることが示唆された。

## (2) C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン療法の治療効果と関連する分子の解析 (金子)

48 週のペグインターフェロン・リバビリン療法を行った 168 例を対象に治療前に肝生検を行った。核酸を抽出し DNA チップを用いて ISGs の発現を解析した。治療効果の判定は治療終了後、6ヶ月に行った。臨床背景に加え、肝組織における線維化、血液中 HCV 量、HCV コア領域、ISDR 領域を加えて統計解析を行った。



上図には ISGs の発現量を示したが、著効が得られた群は左の ISGs が低い群に多



く、無効であった群は右の高い群が多かった。このことは、先に示したインターフェロン投与8週の抗ウイルス効果だけでなく、ペグインターフェロン・リバビリン療法が終了後の効果においても、インターフェロン投与前の ISGs の発現量が寄与していることを示していた。

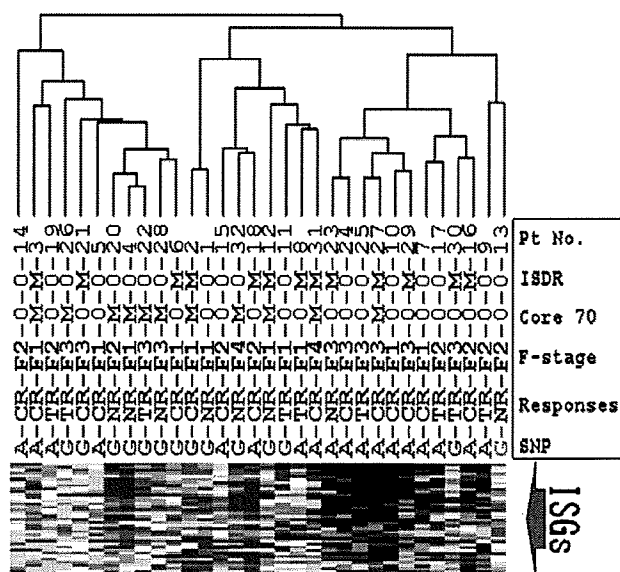
	Odds	95% CI	P value
<b>SVR に寄与する因子</b>			
ISGs (Mx, IFI44, IFIT1) ≤ 3.5	5.50	(2.40-14.5)	0.0002
ISDR (≥ 2)	5.09	(2.50-14.3)	0.0002
HCV-RNA (≤ 1900 KIU/ml)	3.10	(1.31-6.04)	0.0073
F stage (F1-2)	2.73	(1.23-6.80)	0.0336
Age (≤ 58)	2.36	(1.32-6.04)	0.0481
<b>NR に寄与する因子</b>			
ISGs (Mx, IFI44, IFIT1) >3.5	8.65	(3.92-20.2)	<0.0001
Core 70M	2.43	(1.08-5.55)	0.0313

多変量ロジスティック回帰を用いて解析すると48週のペグインターフェロン・リバビリン療法の治療効果SVRに寄与する因子はISGs、ウイルスISDR、ウイルス量、

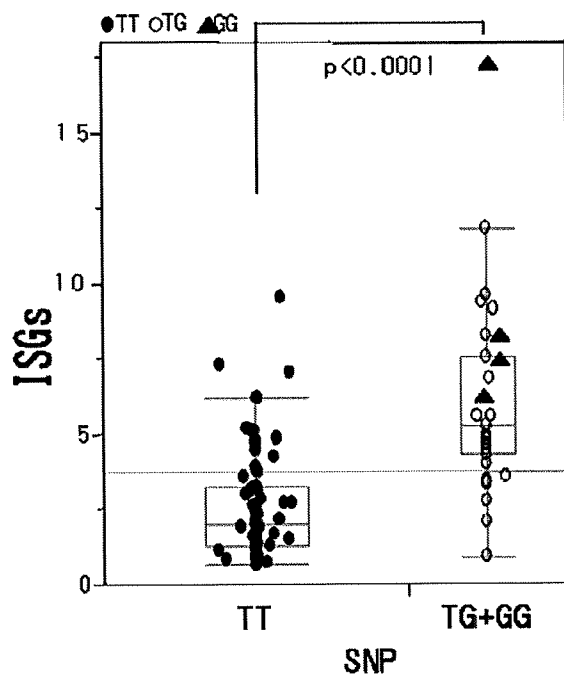
線維化、年齢であった。治療効果NRに寄与する因子はISGsとウイルスコア70番目の変異であった。

### (3) IL28領域の遺伝子多型とインターフェロン誘導遺伝子(ISGs)の関連(金子)

この解析に用いた症例についてIL28領域の遺伝子多型解析を名古屋市立大学の田中教授班において解析していただき、ISGsを含む各種の因子と治療効果との関連を解析した。



上図に示すように、IL28領域の遺伝子多型とISGsの発現量および治療効果の3者は良く相関していた。続いて、その変異とISGsの発現量の関係を解析した。



IL28B 領域の多型が TT を示す群はインターフェロン投与前の ISGs の発現量が低く治療効果が良かった。TG および GG を示す群は ISGs の発現量が高く、治療効果が悪かったことが示された。多変量解析を用いても、IL28B 領域の多型と相関する因子は ISGs だけとなり、その Odds 比は 17.8 ( $p < 0.0001$ ) という高いものであった。

#### (4) C型肝炎におけるインターフェロン治療と免疫細胞のシグナル伝達 (竹原)

C型肝炎患者(遺伝子型1型、高ウイルス量; CHC)を対象とし、末梢血単核球を単離した。細胞表面マーカーとして CD56, CD3 により免疫細胞をサブセット毎に区別し、細胞内 IFN シグナル関連分子として phospho-STAT1 (pSTAT1), pSTAT4, STAT1 の発現量をフローサイトメトリーにて解析した。C型肝炎患者については、ペグインターフェロン・リバビリン治療開始前と開始後1日目に解析した。また、治療前血中

HCV-RNA が 1,000KIU/ml 以上の高ウイルス量症例に限って、治療前 NK 細胞内 STAT1 発現量と治療開始後 8 週目の血中 HCV-RNA 残存の有無との関連を検討した。

STAT1 自身が IFN 誘導遺伝子 (ISG) の一つであることから治療開始前後の STAT1 発現量の変化を投与された IFN- $\alpha$  によって誘導された遺伝子発現とみなした。C型肝炎患者において、治療開始前の NK 細胞内 STAT1 発現量と、治療開始後 NK 細胞において誘導される遺伝子発現量とは逆相関関係を示した。すなわち、治療開始前 NK 細胞内 STAT1 発現量が高いほど、誘導される遺伝子発現量が減弱していた。また、治療前 NK 細胞内 STAT1 発現量が比較的高い症例においては、治療開始後 8 週目の血中 HCV-RNA が残存する傾向を、比較的低い症例においては、消失する傾向を認めた。

#### (5) 末梢血ジェノミクスを用いたウイルス性肝炎医療の開発 (前川)

PEG-IFN+RBV 併用療法を受けた HCV genotype 1b・高ウイルス量症例のうち、初期の治療反応性が大きく異なる 2 群 50 症例 (SVR 群 25 例、non SVR 群 25 例) を対象に、治療開始前の血清を用いて網羅的に 36 種類の cytokine の発現を sandwich ELISA 法により定量的に測定した。

測定した 36 種類の cytokine について ROC 曲線下面積を計算し、最適カットオフ値を求めた。その結果 SVR 群において、治療前 IL-8 が有意に低く ( $p = 0.035$ )、治療前 RANTES は有意に高かった ( $p = 0.042$ )。また、NS5A 領域のアミノ酸変異数が 0 または 1

個である症例に限定して解析した場合、SVR群では治療前RANTESは有意に高く ( $p=0.017$ )、治療前sICAM-1も高い傾向にあった ( $p=0.056$ )。

#### (6) ヒト肝組織および末梢血を用いたプロテオーム診断法の開発 (宇都)

C3a-8100 の肝癌診断マーカーとしての有用性を検証するために、肝癌患者と肝癌を合併していない慢性肝疾患患者の血清を用いて、既存の腫瘍マーカーおよび C3a-8100 の診断能を比較した。

血清 MnSOD 濃度を HCV 関連肝疾患患者で比較検討した。

SELDI および MALDI で検出した 7770m/z ピークタンパクおよび 2861m/z ピークタンパクの同定および臨床的意義を検討した。

肝癌診断において、既存の肝癌マーカーである AFP、AFP レクチン分画、PIVKA-II と比較して、C3a-8100 のピーク値は感度が最も高く、ROC AUC も最も高値であり、肝癌診断に有用であった。

血清 MnSOD 濃度は健常者もしくは慢性肝炎患者と比較し、肝癌患者で高く、肝癌患者の中では Child A よりも Child B もしくは C の患者で、Liver Damage A よりも Liver Damage B もしくは C の患者で有意に高く、肝予備能と関連していた。

7770m/z タンパクはケモカイン関連分子である可能性が示唆され、培養肝癌細胞で発現していた。また、2861m/z ピークタンパクは同定できていないが、慢性肝炎よりも肝癌で有意に高値を示した。

#### (7) B型肝炎ウイルス感染キメラマウスおよび培養細胞系を用いたジェノミクス解析 (田中)

肝線維化発症に寄与する HBV 遺伝子型 (HBV/C) と寄与しない遺伝子型 (HBV/A) に感染したキメラマウス肝臓から RNA を抽出し、逆転写酵素を使用して cDNA を合成した。マイクロアレイ解析で上げられた候補遺伝子に対して、リアルタイム PCR を実施し、線維化の有無で比較解析を実施した。TLR3, 4, 9, TIMP1, IL6 に対するプライマーを用意し、内在性コントロールを利用した相対定量法で解析を行った。

TLR の肝組織中での発現と産生細胞を確認するため、各種抗体を利用して蛍光染色を実施した。

また、肝組織への浸潤細胞を同定するために、各自然免疫単相細胞に対する免疫染色を行った。

HBV 感染による線維化が亢進した群 (HBV/C 感染群) では、リアルタイム PCR による解析により TLR4 の発現が亢進していた。TLR4 の下流に位置する IL6 を確認したところ、TLR4 発現が亢進した群において高値を示した。さらに、IL6 が発現を誘導することが知られている TIMP1 の発現についても亢進していることが明らかとなっており、TLR4 からの一連の経路が線維化に関与していると考えられた。一方で、TLR3, 9 の発現量を確認したところ線維化の有無では違いが無く、これらの遺伝子経路は肝線維化には関与していないと考えられた。

蛍光染色により肝組織を染色した結果、

単核球のマーカーである CD163 と TLR4 の強い発現が一致して観察され、単核球で主に TLR が誘導されていると考えられた。ウイルス感染後も線維化が認められない HBV/A 感染群では、単核球の浸潤はある程度認められるものの TLR4 の強い誘導は認められなかった。

その他に、肝組織に浸潤している細胞について解析を行ったところ、ミエロペルオキシダーゼで強く染色が認められる細胞が多数観察され、好中球であることがわかった。活性酸素種の産生を担当しており、線維化亢進群において非線維化群の 15 倍程度の発現が認められていることから好中球が主に産生していると考えられた。

#### (8) 脂質代謝系解析を用いたウイルス性肝炎に対する医療開発研究 (花田)

脂肪滴産生・リポファジーに関与するオートファジー関連分子の HCV 産生に対する影響について、RNAi によるオートファジー分子のノックダウンによる細胞内 HCVmRNA・HCV 関連タンパク質産生および HCV 粒子産生への影響を調べた。またオートファジーのマーカーである LC3 抗体を用いた間接蛍光抗体法により、細胞生物学的解析を行った。

評価系としては培養細胞を用いた HCV 産生系を利用することとした。細胞はヒト肝細胞由来の Huh7.5.1 細胞を用いた。HCV は、ヒト劇症肝炎患者から分離された JFH-1 株を用いた。Huh7.5.1 細胞に HCV を 37°C 2 時間感染後、6 日後まで対数的にウイルス蛋白は増加した。この実験系を用

いて、HCV 感染 1 日後および 3 日後にノックダウンを行い、HCV 感染 5 日後に HCV 粒子産生を評価した。

HCV 感染細胞においてオートファジー関連遺伝子産物の経時変化を調べたところ、HCV 関連タンパク質が顕著に増加する感染 5 日後、6 日後において、オートファゴソームのマーカー分子である LC3-リン脂質結合体(LC3-II)の蓄積が認められた。リソソームの主要タンパク質分解酵素群 (カテプシン B、D、L) の阻害剤を用いて LC3-II のリソソーム分解を調べたところ、リソソームにおける LC3-II 分解が抑制されていた。従って、HCV 感染によりリソソーム・オートファゴソーム融合が阻害され、オートファゴソームが異常蓄積した形でオートファジー不全が引き起こされていることが、明らかになった。

Atg7 ノックダウンにより、培地中に放出される HCV 粒子の量が減少していた。このとき、細胞内 HCVmRNA 量および細胞内 HCV core, NS5A, NS3 産生量はほとんど影響がなかった。また、細胞の生存率もほとんど影響が無く、ノックダウンによるインターフェロン mRNA の誘導もほとんど起こらなかった。オートファジーに関連するクラス III PI3 キナーゼ複合体のコンポーネントである Beclin 1 のノックダウンによっても同様の結果が得られた。従って、オートファジー関連分子は分泌経路には影響せず、HCV 粒子細胞外放出に特異的に影響することが示唆された。

HCV 感染によりオートファジー不全・オートファゴソームが異常蓄積していること

から、HCV core・NS5A や脂肪滴とオートファゴソームが共局在する可能性が考えられたが、顕著な共局在は認められなかった。

#### (9) ジェノミクス技術による新規薬剤リードの探索研究 (菅)

RaPID(Random Peptide Integrated Discovery)システムを駆使し、翻訳系を用いて特殊ペプチドを合成、薬剤探索にあてた。RaPID ディスプレイ法を用い、標的蛋白質への阻害剤の迅速探索を行った。

RaPID ディスプレイ法を用いて、HCV 関連標的 NS5A(His)、LEL(GST-biotin)ドメイン (括弧内は固定タグを示す) への特殊環状ペプチド阻害剤探索の継続、および La 蛋白質 (His)の発現・精製を行った。NS5A に対しては特殊環状ペプチドの濃縮に成功し、特殊ペプチドの配列情報を取得した。代表的なペプチドに関して化学合成を行い、ヴィトロでの結合活性を観測した結果、最も良い結合能力をもつもので、約 50nM の解離定数をもっていることが判明した。現在、HCV リプリコンを用いて、複製阻害活性の阻害評価を開始している。

#### (10) 統計的因果推定法に基づくジェノミクス解析法の研究 (堀本)

グラフィカル連鎖モデル及び経路整合性アルゴリズムに基づくネットワーク推定法を肝がんについて計測されたデータに適用し、遺伝子間の関連性をグラフ表現する。

既開発のグラフィカル連鎖モデルに基づくネットワーク推定法を、経路整合性アルゴリズムに基づく推定法と組み合わせるこ

とで、クラスター間の関係性から遺伝子間の関係性を推定する方法に改良した。肝硬変及び肝がん細胞において計測されたデータに適用し進展要因遺伝子ネットワーク群を同定することに成功した。

#### (倫理面の配慮)

臨床試験に関わる研究、ヒト材料を用いる研究、および動物実験は各種の指針を遵守し行った。

#### C. 考察

2009 年に国内外の 3 カ所のグループから同時に IL28B 領域の遺伝子多型と 48 週のペグインターフェロン・リバビリン療法の治療効果との密接な関係が示された。この結果は生まれつきインターフェロン療法の治療効果が規定されていることを示しており、大きな衝撃を持って迎えられた。しかし、その機序は不明であり、これまで治療効果との関係が示されたウイルス量、ウイルス変異、肝線維化との関連が問題となった。

C 型慢性肝炎に対するインターフェロンの治療効果はインターフェロン誘導遺伝子 (ISGs) の発現に引き続くタンパクによって高ウイルス効果が示されることがわかっている。

今回の研究によって、IL28B 領域の遺伝子多型と ISGs とが Odds 比 17.8 で関連していることが示され、ひとつの機序が示された。

ISGs が治療前から発現量が多い状態はウイルスに対する反応が高まっていること

を示唆する。効ウイルス活性を示すタンパクの活性が高まっているかを確認する必要があるものの、ISGs が高い状態ではウイルスコア 70 番が変異を示す可能性が考えられた。これらの結果と関連して、末梢血の発現遺伝子、サイトカイン、発現タンパクを用いて、インターフェロン治療の効果を予測する診断法が開発される可能性が示された。

さらに、血液のタンパクを用いる方法によって従来は診断が困難であった肝細胞癌の早期診断や経過観察が出来る可能性が明らかとなった。また、酸化ストレスのマーカーが見いだされたことは今後の展開が期待される。

活性酸素種が脂質を酸化し TLR4 のリガンドとなることが知られていることから、線維化群で見られた活性酸素種の高発現がこの線維化進展に寄与していることが考えられたため、今後は過酸化脂質の定量とリガンドとしての機能を評価する必要がある。

オートファジー分子に注目した HCV 治療法・薬剤の研究はきわめてユニークなものになる可能性が示された。

RaPID ディスプレイ法を用いることで、HCV 関連標的への環状特殊ペプチドの探索が可能であることが示された。

ウイルス感染や疾患進展など表現型変化に伴う細胞内分子ネットワーク構造変化を推定する 3 つの数的手法を開発することで、表現型変化に対応する分子ネットワーク変化解析が可能となった。

#### D. 結論

- (1) インターフェロン感受性と関与する C 型肝炎におけるインターフェロン誘導遺伝子を明らかにし、診断の候補マーカーを抽出した。
- (2) IL28B 領域の遺伝子多型とインターフェロン誘導遺伝子の関係を明らかにした。
- (3) 末梢血を用いてインターフェロン反応性予測、および肝がん診断が可能であることを示した。
- (4) NK 細胞においてシグナル伝達や誘導遺伝子発現を含めた。
- (5) IFN- $\alpha$  反応性が、CHC では変調をきたしていることが明らかになり、治療効果との関連を示唆した。
- (6) オートファジー分子機構は HCV 粒子のアセンブリあるいは HCV 粒子特異的な細胞外への放出に関与している可能性を示した。
- (7) 肝線維化の進展には活性酸素種を介した TLR4 経路の活性化が重要であることを示唆した。
- (8) 計測されたデータに適用し進展要因遺伝子ネットワーク群を同定することに成功した。
- (9) 標的蛋白質に対しての環状特殊ペプチドを獲得することができた。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

「研究成果の刊行に関する一覧」に記載



G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

## II. 分担研究報告

C型肝炎におけるインターフェロン治療と免疫細胞のシグナル伝達

竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科 准教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス感染による慢性化の成立機序および抗ウイルス治療に対する抵抗性メカニズムの解明には、宿主側因子として、免疫担当細胞におけるシグナル伝達や遺伝子発現について包括的に理解する必要がある。今回我々は、NK細胞、NKT細胞、T細胞といった免疫エフェクター細胞におけるIFN- $\alpha$ により伝達されるシグナルや遺伝子発現について解析した。また、IFN- $\alpha$ 治療効果との関連についても検討した。C型肝炎患者（遺伝子型1型、高ウイルス量；CHC）を対象とし、末梢血単核球を単離した。対照に健常者（Healthy control；HC）由来末梢血単核球を用いた。前年度までに以下のことが明らかになった。①細胞内STAT1発現量は、NK細胞においてHCに比しCHCで有意に高かった。②NK細胞におけるIFN- $\alpha$ 刺激で誘導されるpSTATの程度は、HCに比しCHCでpSTAT1は有意に増強、pSTAT4は有意に減弱し、STAT1発現量とそれぞれ有意な正相関、逆相関関係を示した。③NK細胞におけるIFN- $\alpha$ 刺激による誘導遺伝子発現は、HCに比しCHCで、pSTAT4シグナル下流の*Ifn-g*が有意に減弱し、pSTAT1シグナル下流の*Socs1*が有意に増強し、*Perforin*、*Granzyme-b*は減弱傾向を認めた。最終年度である今年度は、さらに以下のことが明らかになった。治療前NK細胞内STAT1発現量と治療開始後のIFN誘導遺伝子発現量が逆相関関係を示した。すなわち治療前STAT1発現量が高いほど、投与されたIFN- $\alpha$ に対する応答性が減弱する傾向を認めた。また、治療前NK細胞内STAT1発現量が比較的高い症例においては、治療開始後8週目の血中HCV-RNAが残存する傾向を、比較的低い症例においては、消失する傾向を認めた。ウイルス排除に重要な役割を果たすNK細胞においてシグナル伝達や誘導遺伝子発現を含めたIFN- $\alpha$ 反応性が、CHCでは変調をきたしていることが明らかになり、治療効果との関連も示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルスは、高頻度に慢性肝炎を引き起こし、最終的には肝細胞癌を発生させること、また、最先端の抗ウイルス療

法でも著効率は5割程度にとどまり治療抵抗性であることから、C型肝炎ウイルス感染症は大きな健康問題の一つである。抗ウイルス療法の柱はインターフェロン- $\alpha$

(IFN- $\alpha$ )であり、IFN- $\alpha$ により誘導される抗ウイルス蛋白による直接的作用と、IFN- $\alpha$ により誘導される免疫調節作用を介した免疫細胞によるウイルス感染細胞排除作用によると考えられている。従って、治療抵抗性メカニズムの解明には、免疫細胞におけるIFN- $\alpha$ シグナル伝達や遺伝子発現について包括的に理解する必要がある。本研究においては、免疫細胞、特にNK細胞、NKT細胞、T細胞といったエフェクター機能を有する細胞におけるIFN- $\alpha$ により伝達されるシグナルや遺伝子発現について解析することとした。

## B. 研究方法

C型肝炎患者（遺伝子型1型、高ウイルス量；CHC）を対象とし、末梢血単核球を単離した。対照として健常者（Healthy control；HC）由来の末梢血単核球を用いた。細胞表面マーカーとしてCD56、CD3により免疫細胞をサブセット毎に区別し、細胞内IFNシグナル関連分子としてphospho-STAT1(pSTAT1)、pSTAT4、STAT1の発現量をフローサイトメトリーにて解析した。C型肝炎患者については、ペグインターフェロン・リバビリン治療開始前と開始後1日目に解析した。また、治療前血中HCV-RNAが1,000KIU/ml以上の高ウイルス量症例に限って、治療前NK細胞内STAT1発現量と治療開始後8週目の血中HCV-RNA残存の有無との関連を検討した。

## C. 研究結果

STAT1自身がIFN誘導遺伝子

(Interferon stimulated gene；ISG)の一つであることから治療開始前後のSTAT1発現量の変化を投与されたIFN- $\alpha$ によって誘導された遺伝子発現とみなした。C型肝炎患者において、治療開始前のNK細胞内STAT1発現量と、治療開始後NK細胞において誘導される遺伝子発現量とは逆相関関係を示した。すなわち、治療開始前NK細胞内STAT1発現量が高いほど、誘導される遺伝子発現量が減弱していた。また、治療前NK細胞内STAT1発現量が比較的高い症例においては、治療開始後8週目の血中HCV-RNAが残存する傾向を、比較的低い症例においては、消失する傾向を認めた。

## D. 考察と結論

治療前NK細胞内STAT1発現量とIFN誘導遺伝子発現は、逆相関関係を示したことから、細胞内STAT1発現量が高まるほど、投与されたIFN- $\alpha$ に対する応答性が減弱することが示唆された。さらに、治療前NK細胞内STAT1発現量が高い症例ほど、治療抵抗性となることが示唆された。

最新の国際的な報告から、肝臓におけるIFN誘導遺伝子発現が高い症例ほど、IFN- $\alpha$ 治療（ペグインターフェロン・リバビリン併用治療含む）効果が減弱する傾向が認められるとされている。今回の結果は、それらの報告と一致するものであり、また肝組織のみならず、末梢血単核球の一部のサブセットでも同様の傾向が認められることを示すものである。

治療前NK細胞内のSTAT1発現量が、治療効果予測マーカーとなることが期待され

る。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Itose I, Kanto T, Kakita N, Takebe S, Inoue M, Higashitani K, Miyazaki M, Miyatake H, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis. *J Viral Hepat* 2009;16: 844-852.
- 2) Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Anticancer chemotherapy inhibits MHC class I-related chain A ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009;69:8050-8057.
- 3) Uemura A, Takehara T, Miyagi T, Suzuki T, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Natural killer cell is a major producer of interferon gamma that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice. *Cancer Immunol Immunother* (in press).
- 4) Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, Sasakawa A, Yamamoto M, Kohga K, Miyagi T, Kanto T, Hiramastu N, Akagi T, Akashi M, Hayashi N. EphA2 derived peptide vaccine with amphiphilic poly ( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles elicits an antitumor effect against mouse liver tumor. *Cancer Immunol Immunother* (in press)

### 2. 学会発表

The American Association for the Study of Liver Diseases, 60th Annual Meeting AASLD, October 30-November 3, 2009, Boston, MA, USA.

- 1) Kodama T, Takehara T, Shimizu S, Hikita H, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N. #97 Thrombocytopenia deteriorates cholestasis-induced liver fibrosis in mice.
- 2) Shimizu S, Takehara T, Kodama T, Hikita H, Yamamoto M, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N. #1310 Let-7 family negatively regulates Bcl-xL expression and induces apoptosis in cooperation with sorafenib in human hepatocellular carcinoma.
- 3) Miyagi T, Takehara T, Shimizu S, Nishio K, Kohga K, Tatsumi T, Hayashi N. #1373 Interferon- $\alpha$  signaling in natural killer cells is impaired in chronic hepatitis C infection.

## F. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

特になし

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）  
分担研究報告書

ヒト肝組織および末梢血を用いたプロテオーム診断法の開発  
～プロテオミクスによるウイルス性肝疾患のバイオマーカー探索～

宇都 浩文 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座  
消化器疾患・生活習慣病学 講師

研究要旨：本研究では、プロテオミクスを用いた肝疾患のバイオマーカーを探索しており、肝癌マーカーC3a f-8100、酸化ストレスマーカーMnSODを同定している。本年度はそれらのマーカーの臨床的意義を継続して検証するとともに、新規のバイオマーカー候補をさらに探索した。C3a f-8100は既存の肝癌マーカーよりも診断マーカーとしての感度が高く、ROC AUC解析では最も診断能が高かった。また、HCV感染者における血清MnSOD濃度は非肝癌患者と比較し、肝癌患者で有意に高値となり、その濃度は背景肝の病態と関連した。さらに、肝癌患者では肝予備能の低下に伴い血清MnSODが上昇した。その他、SELDIで検出した7770m/zピークの候補タンパクが肝癌で発現すること、MALDIで検出した2861m/zピークが肝癌マーカー候補であることを明らかにした。以上のことから、プロテオーム解析を用いたバイオマーカー探索が、肝疾患の新しい診断マーカー候補の同定につながる可能性がある。

A. 研究目的

今までにプロテオミクスを用いて肝疾患患者血清もしくは初代培養肝細胞から肝癌マーカーC3a-8100、肝機能正常のHCV感染と関連するC4a、酸化ストレスマーカーMnSODを同定している。本研究では同定したタンパクの発現メカニズムやC型肝炎ウイルス（HCV）関連肝疾患患者の血清を用いて、新規のバイオマーカー候補をさらに探索した。

B. 研究方法

1) 肝癌患者血清中に出現する分子量約8100DaのC3a断片の肝発癌治療前後の比較

C3a-8100の肝癌診断マーカーとしての有用性を検証するために、肝癌患者と肝癌を合併していない慢性肝疾患患者の血清を用いて、既存の腫瘍マーカーおよびC3a-8100の診断能を比較した。

2) 初代培養ヒト肝細胞から同定したMnSODのHCV関連患者血清中における臨床的意義の検討

血清MnSOD濃度をHCV関連肝疾患患者で