

特集II 早期肝細胞癌の診断ストラテジー

肝細胞癌高リスク群の囲い込みを目的とした新規糖鎖マーカーの探索*

松浦 健太郎**
田中 靖人***

Key Words : glycan, hepatocellular carcinoma, liver fibrosis, lectin microarray

はじめに

本邦における B 型肝炎, C 型肝炎感染者はそれぞれ150万人, 200万人程度であると推定されている。B 型肝炎においては, 成人での初感染では, 急性化した後にウイルスが排除されることが大半であるが, 一定の割合で肝炎の遷延化が起きる。特に, 近年, 本邦では稀であった genotype A の急性肝炎が増加しており, 肝炎の遷延化, 慢性化率が高いことが問題となっている¹⁾²⁾。C 型肝炎では, その大部分の症例(70~80%)で感染後慢性化することが知られており, 治療によりウイルスが排除されない限り, 持続的に肝障害が進行し, 感染から20~30年程度の後には, 肝硬変に進展し, 肝細胞癌へと至ることが知られている。なお, 国立がんセンターの発表するがん統計情報によると, 原発性肝癌によって2004年度には34,507人が死亡しており, その9割以上は, B 型や C 型肝炎ウイルス感染者である。特に本邦においては C 型肝炎患者の高齢化が進み, 発癌に至る症例の割合も多くなっている。肝細胞癌の発生率と肝線維化の程度は相関することが知られており, 肝線維化の把握は肝細胞

癌の高リスク群を予測する上できわめて重要である。本稿では, 最近, われわれと共同研究施設により同定された血清中の糖鎖関連の肝線維化マーカーを中心に解説する。

肝線維化進展と発癌

肝細胞癌の発生頻度は, 肝臓の線維化の程度と相関することが知られており, C 型肝炎患者における線維化の程度別の発癌率は, F0~1 で年率0.5%, F2で1.5%, F3: 5%, F4: 7~8%程度である(図1)。したがって, 発癌を予測する上で肝臓の線維化の程度を確定することは重要である。従来, この診断には肝生検が用いられ, 実際に肝組織を観察することから信頼度の高い検査であるといえる。しかしながら, 肝生検は, 経皮的に肝臓の組織を直接採取する検査であるため, 侵襲性が高く出血などのリスクもあり, 進行する病態を評価するために繰り返し行うことは身体的負担が大きい。このようなことから, より非侵襲的な肝線維化の検査法が考案されてきた。簡便な血液検査で得られるヒアルロン酸, IV型コラーゲン, IV型コラーゲン7S, III型コラーゲン N 末端ペプチド(PIIINP), あるいは汎用される血液検査の結果の組み合わせから肝線維化を推定する計算式を用いた方法, 最近ではtransient elastographyを用いた肝線維化評

* Search for glycan biomarkers to predict hepatocellular carcinoma.

** Kentaro MATSUURA, M.D., Ph.D.: 名古屋市立大学大学院医学研究科消化器・代謝内科学[〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1]; Department of Gastroenterology and Metabolism, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya 467-8601, JAPAN

*** Yasuhito TANAKA, M.D., Ph.D.: 名古屋市立大学大学院医学研究科病態医学(ウイルス学)

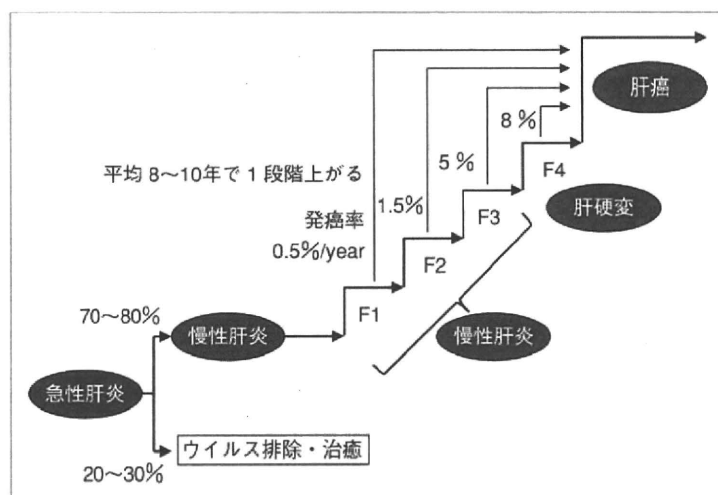


図1 C型肝炎の病態進展と発癌
(日本肝臓学会・編. 慢性肝炎の治療ガイド 2008. より引用改変)

価法などが知られている。そこで、われわれはより高感度かつ特異的な肝線維化診断法を目指し、近年、第3の生命鎖として注目されている糖鎖に着目し、肝線維化あるいは発癌にかかわる新規糖鎖マーカーの開発を行っている。

糖鎖とは

糖鎖は核酸、蛋白質につぐ第3の生命鎖として注目されている。その理由の一つには、蛋白質の半分以上には糖鎖が付加されているという事実がある。糖鎖は蛋白質や脂質に結合して、複数の単糖が樹状につながったものであるが、蛋白質に比べて糖鎖は多様性があり、また構造が複雑なため、その解析は難解であった。近年、質量分析などの進歩や糖鎖遺伝子の改変動物を用いた機能解析の成果により、糖鎖の研究が飛躍的に発展し、蛋白質の安定化、体内輸送、活性化、細胞間の情報伝達、細胞同士の接着に関与すること、またウイルスや病原菌は糖鎖を認識して侵入することなどが報告されている(図2)。またさまざまな病気の発症の解明や、診断、治療に糖鎖研究が欠かせないことが明らかになってきている。診断への応用としては、炎症、癌化に伴う同一糖蛋白質の糖鎖構造の変化をとらえることにより、糖鎖疾患マーカーの開発が試みられている(図3)。

糖鎖関連マーカーの従来法

1. α -fetoprotein (AFP) と AFP-L3 分画

AFPは、わが国で約30年間の実績のある腫瘍マーカーであり、AFP-L3は糖鎖構造の変化を利用したマーカーである。AFPは背景病変としての慢性肝炎や肝硬変の非癌部肝細胞においても産生されるため、肝細胞癌診断の特異度は低い。成人における基準値については10ng/ml以下とされているが、実地臨床の場では20ng/mlをカットオフ値とする傾向にある。第15回全国原発性肝癌追跡調査報告によるとAFP値が21ng/ml以上の陽性症例は62.5%であり、感度が高いとは言いがたい。肝細胞癌を発症していない肝硬変症で30~50%、慢性肝炎で約20%が陽性を示すとの報告が多く、AFP値によって肝細胞癌の有無を判断することは限界がある。しかしながら、AFP値の上昇が持続する場合には、肝細胞癌を合併している危険率は高いと考えられる。AFP-L3分画は、このAFP陽性の肝癌患者に対する特異性を高めるべく開発されたマーカーで、1996年5月から保険適用となった腫瘍マーカーである。臨床的にはAFP-L3分画は肝細胞癌以外で上昇を示すことはほとんどないため、上昇を示した場合は肝細胞癌と診断しうるが多い。生体内では癌化に伴って、ももとの蛋白質の機能に多大な影響を持つ糖鎖側鎖構造の変化

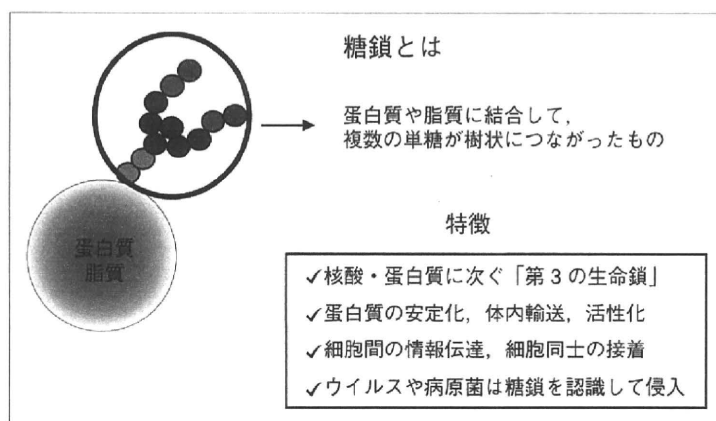


図2 糖鎖構造と特徴

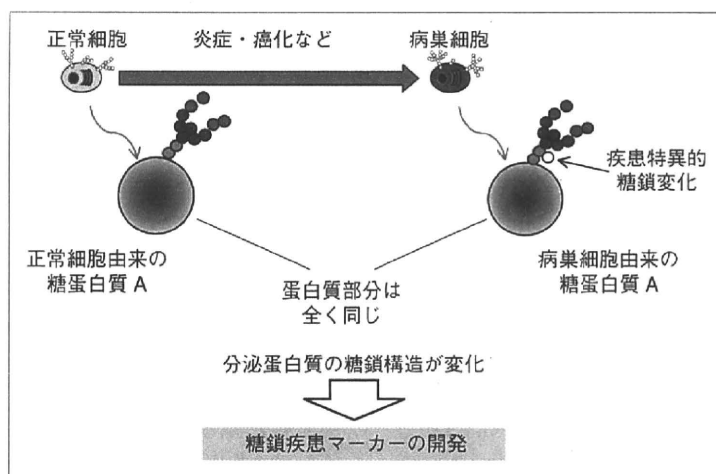


図3 病態変化と糖鎖構造の変化

が起こる。AFP-L3分画とは、AFPの232番目のアスパラギン酸に結合する1本の糖鎖にフコースが結合して構造変化したもの(コアフコース)である(図4)。レクチンとは、ある特定部分の糖鎖構造を認識し結合する蛋白質のことであるが、このコアフコースを認識するレンズマメレクチン(lens culinaris agglutinine; LCA)を用いたレクチン親和性電気泳動を用いて分離されるバンドを陽極側からL1, L2およびL3とすると、肝細胞癌患者ではL3分画の占める比率が増加し、臨床的に応用されている。カットオフ値(正常)は10%以下とすることが多い。AFP-L3分画は肝細胞癌の生物学的悪性度を反映するとされており、陽性率が高い場合には予後が不良であることが知られている³⁾⁴⁾。

一方、陰性であったとしても肝細胞癌の存在を否定できるものではない。特異性が高い一方、感度は低く早期の肝細胞癌のスクリーニングには限界があるため、臨床的にはAFP陽性例での測定が望ましいとされている(日本肝癌研究会の肝癌追跡調査報告書では10%をカットオフ値とすると感度は35.6%であった)⁵⁾。

2. IgGの糖鎖修飾の変化

近年報告された糖鎖関連の肝線維化マーカーとしては、IgGの糖鎖構造の変化を利用したものがある。ヘテロフィリックな α -Gal(Gal α -1-3Gal β 1-(3)4GlcNAc-R)エピトープに対するIgGの糖鎖修飾が肝硬変の進展に伴って変化することが確認された。この抗体は通常時にも血清中の

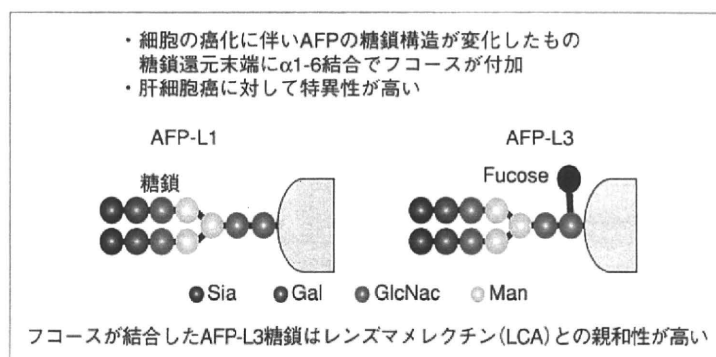


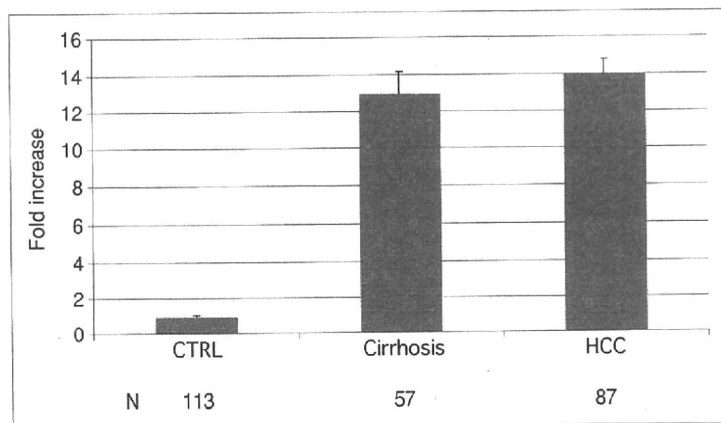
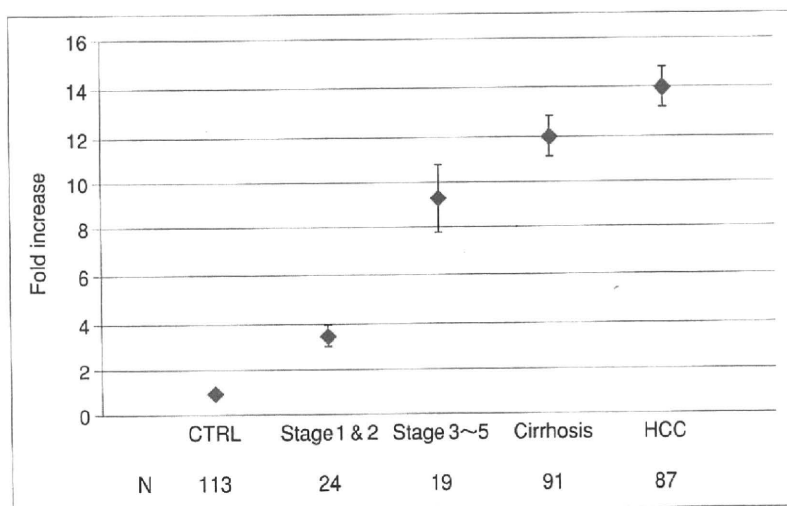
図4 AFP-L3(レクチン反応性AFP)

IgGの1%を占めているものである。この抗原は通常はヒト以外の細菌等存在するものであり、ヒトでのこの抗体の機能は不明であるが、腸内細菌叢のエントロバクターに対する制御をしていると推定されている。健常者と肝硬変患者を対象としてこのIgGについて検討したところ、線維化の進展度合いに従って、糖鎖修飾が変化していることが明らかとなった⁶⁾。このようなIgGの糖鎖修飾の変化と病態との関連は、これまでも報告されており、関節リウマチ、自己免疫性疾患、全身性エリテマトーデス、細菌感染、ヒト免疫不全ウイルスの慢性感染等でも知られている^{7)~10)}。この著者らは臨床検体を用い、この糖鎖変化と肝線維化の進展について検証したところ、線維化進展度が重度であるものに関しては、感度91%、特異度79%を示した。IgGの総量は肝線維化の進展により2~3倍の増加を示すが、ここで検出された特異的な糖鎖変化した抗 α -Gal抗体は平均で13倍程度の増加を示し、IgGの総量とは独立して産生されていることが明らかとなった(図5-a)。また、線維化の進展度別にプロットを行った場合に、健常者に対して、ステージ1と2では血清中のデータで、3.5倍、ステージ3以上では9倍、肝硬変では12倍、肝細胞癌では14倍の発現量が観察でき、肝線維化の程度に応じて増加していくことが報告されている(図5-b)。現在のところ、このような変化が認められる理由は不明であるが、血清を用いた検査で判定が可能となるこのIgGとレクチンを利用することで簡便に肝線維化の程度を推測できるとしている。

新規肝線維化マーカー

今回われわれが参画したプロジェクトでは、罹患あるいは疾患の進展の程度に伴って起きる糖蛋白質上の糖鎖の構造変化に焦点を絞り、その量的および質的变化を示す糖蛋白質を糖鎖疾患マーカーと見なし探索する戦略を考案し、実施した。

健常者の血清と疾患群(線維化進展度別)の血清を比較することで、糖鎖遺伝子の発現プロファイルの違いを利用し、実際に産生、分泌された糖蛋白質糖鎖をレクチンマイクロアレイ分析し、患者群で特徴的に産生する糖鎖に反応するレクチンあるいは抗糖鎖抗体のプロープを選択した。特異的に分泌される糖蛋白質の中から、産業総合研究所で開発されたisotope-coded glycosylation-site-specific tagging(IGOT)法などの質量分析を基礎とした方法でそのコア糖蛋白質を同定する。同定された糖蛋白質を患者血清より精製し、再度レクチンアレイを基礎とした方法等で糖鎖構造変化を確認するといった大きく分けて3ステップで糖鎖疾患マーカー候補を多数見出した(図6)。今回使用したシステムは血中に存在する標的糖蛋白質を簡易に精製し、レクチンマイクロアレイによりその糖鎖構造を比較プロファイルできるシステムである。大きな特徴は、数十ng程度の糖蛋白質を生体成分から簡易精製し、比較解析できることである。既存技術である質量分析や液体クロマトグラフィーを用いての比較糖鎖解析の場合、少なくとも10 μ gの精製糖蛋白質が必要であった。本システムが開発されたことで、

図 5-a 病態とレクチン反応性IgGの発現変化(文献⁶⁾より改変引用)図 5-b 肝線維化の進展度別に解析したレクチン反応性IgGの発現量
(文献⁶⁾より改変引用)

血清や組織などに微量にしか存在せずに分析が不可能であった糖蛋白質の比較糖鎖解析が可能になった。また貴重な臨床検体をごく微量だけ使用し分析することが可能になった。

このシステムを活用し、得られたマーカー候補分子の中から、糖蛋白質分子(α 1酸性糖蛋白質; AGP)の糖鎖構造変化が、肝線維化の進展を非侵襲的に検査しうるマーカーとなるかを検証した。肝炎患者、肝硬変患者、肝細胞癌患者、および健康者各5例ずつ0.5 μ lの血清からAGPを簡易精製し、レクチンマイクロアレイによる比較糖鎖解析を行ったところ、シグナルの得られたレク

チンのうち、非肝硬変例および肝硬変例で、顕著な変化を示したレクチン6種を見出した。そこで、肝炎ウイルスに罹患し、肝生検により線維化の程度が病理診断された患者群125症例を対象に分析し、統計学的に肝線維化の進展と最も相関があるレクチンをさらに選抜した。その結果、2種のレクチン(AOL, MAL)がF3とF4の間に有意差を示し、慢性肝炎と肝硬変を見分けるマーカーとなりうる事が明らかとなった(図7)。さらに臨床診断済み慢性肝炎患者45症例および肝硬変患者43症例について確認試験を実施したところ、AOLは、検出力として感度86%、特異

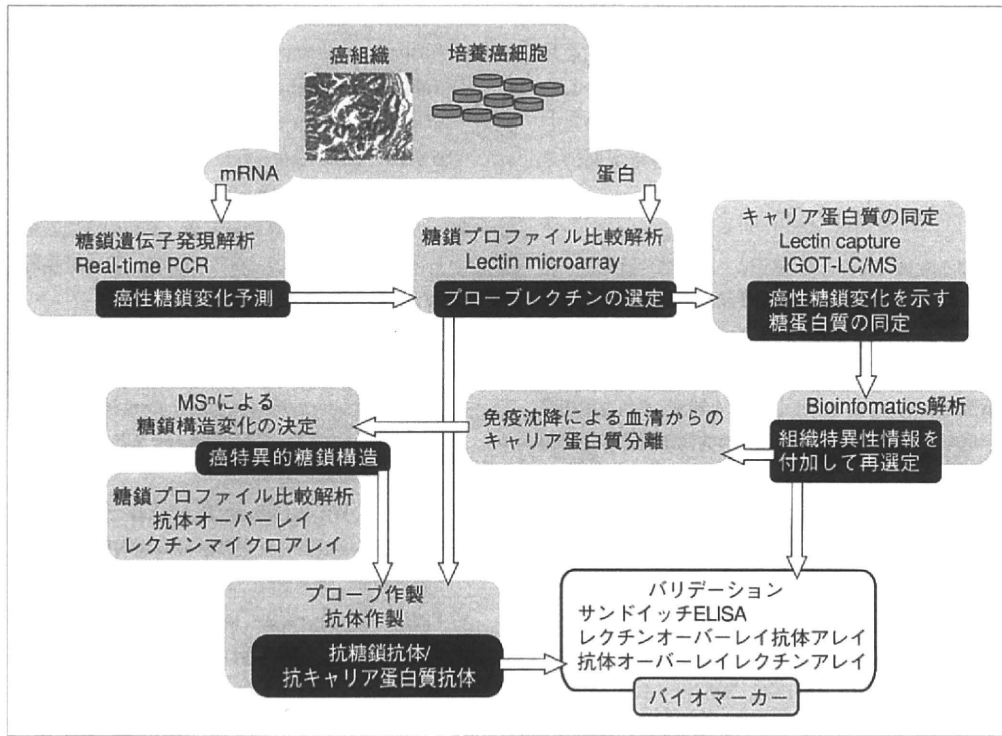


図6 バイオマーカー探索のフローチャート

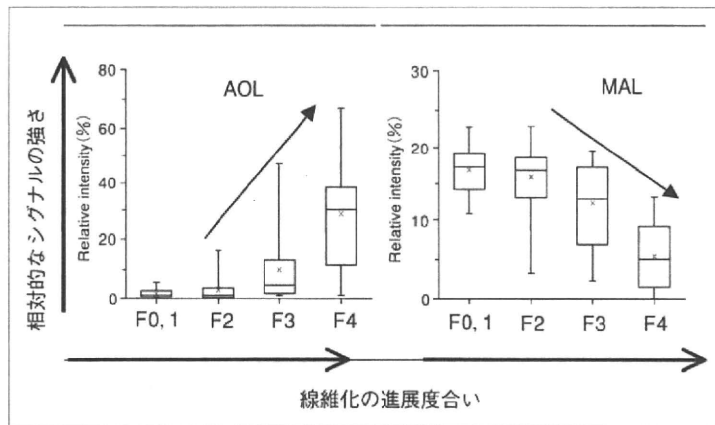


図7 新規肝線維化マーカーと線維化進展度合いの相関

度91%，正診率89%，MALは，感度91%，特異度89%，正診率90%であった。さらに，2つのシグナルを組み合わせてみたところ，感度95%，特異度91%，正診率は93%となり，この結果は現存するいずれの血清マーカーの成績よりも良いものであった。

おわりに

われわれの開発した新規糖鎖マーカーをはじめとした非侵襲性でより感度・特異度にすぐれた検査系を確立することにより，患者の身体的負担を軽減し，肝線維化の進展を推定できるよ

うになり、その結果、肝細胞癌の高リスク群の囲い込みが可能となる。この糖鎖構造変化を用いたバイオマーカー探索により、今回紹介した肝線維化マーカーのみならず、癌をはじめとしたさまざまな疾患関連マーカーの開発が期待される。

謝辞：本稿で紹介した内容は、産業総合研究所・糖鎖医工学研究センター「糖鎖機能活用技術開発」プロジェクト(MGプロジェクト)(プロジェクトリーダー、成松 久)と国立国際医療センター国府台病院肝炎・免疫研究センター(センター長、溝上雅史)と名古屋市立大学医学部(教授、田中靖人)との共同研究において得られた肝疾患マーカー開発の研究成果である。

文 献

- 1) Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, et al. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006 ; 44 : 326.
- 2) Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, et al. 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 : 1476.
- 3) Oka H, Saito A, Ito K, et al. Multicenter prospective analysis of newly diagnosed hepatocellular carcinoma with respect to the percentage of *Lens culinaris* agglutinin-reactive alpha-fetoprotein. *J Gastroenterol Hepatol* 2001 ; 16 : 1378.
- 4) Yamashita F, Tanaka M, Satomura S, et al. Prognostic significance of *Lens culinaris* agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein in small hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 1996 ; 111 : 996.
- 5) 日本肝癌研究追跡調査委員会. 第17回全国原発性肝癌追跡調査報告書(2002~2003). 日本肝癌研究会. 2003.
- 6) Mehta AS, Long RE, Comunale MA, et al. Increased levels of galactose-deficient anti-Gal immunoglobulin G in the sera of hepatitis C virus-infected individuals with fibrosis and cirrhosis. *J Virol* 2008 ; 82 : 1259.
- 7) Moore JS, Wu X, Kulhavy R, et al. Increased levels of galactose-deficient IgG in sera of HIV-1-infected individuals. *Aids* 2005 ; 19 : 381.
- 8) Parekh RB, Dwek RA, Rademacher TW. Rheumatoid arthritis as a glycosylation disorder. *Br J Rheumatol* 1988 ; 27 Suppl 2 : 162.
- 9) Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 1985 ; 316 : 452.
- 10) Parekh RB, Roitt IM, Isenberg DA, et al. Galactosylation of IgG associated oligosaccharides : reduction in patients with adult and juvenile onset rheumatoid arthritis and relation to disease activity. *Lancet* 1988 ; 1 : 966.

* * *

特集Ⅱ C型肝炎ウイルスの感染・増殖メカニズムと臨床応用

IL28B遺伝子多型はC型肝炎ウイルスの自然排除に関与する*

松浦健太郎**
田中靖人***

Key Words : hepatitis C virus (HCV), *IL28B*, single nucleotide polymorphism (SNP), spontaneous clearance

はじめに

本邦のC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus ; HCV) 感染者は約200万人存在するとされる。HCVはいったん感染すると7~8割が慢性肝炎に移行し、治療によりウイルスの消失が得られなければ、肝硬変、肝臓へと進展する症例も多い。一方で、C型急性肝炎の2~3割の症例でHCVが自然排除され、免疫応答にかかわる宿主側因子が深く関与していることが報告されてきたが、そのメカニズムは解明されていない。われわれは、最近、C型慢性肝疾患に対するペグインターフェロン+リバビリン (PEG-IFN/RBV) 併用療法による治療効果と*IL28B*遺伝子多型について報告したが¹⁾、この*IL28B*遺伝子多型がHCVの自然排除にも関与するとの報告がなされた²⁾。本稿では、*IL28B*遺伝子多型と治療効果、HCVの自然排除の関連について述べる。

インターフェロン治療効果予測因子

C型慢性肝疾患の治療はPEG-IFN/RBV併用療法の登場で格段に進歩したが、日本人に最も多

いgenotype 1型、高ウイルス量の症例では50%程度の根治しか得られず、約20%はこの併用療法がまったく効かないのが現状である。しかも、治療期間が長期にわたるため、特に高齢者ではさまざまな副作用により減量、中断を余儀なくされるとの問題もある。したがって、治療前の効果予測が重要と考えられる。その治療効果予測因子として、genotype、ウイルス量、コア領域やNS5A領域のアミノ酸変異などのウイルス側因子に加えて、PEG-IFN/RBVのアドヒアランス (薬剤因子)、年齢、性差、肝線維化進展度、インスリン抵抗性などの宿主側因子の重要性が多数報告されている (図1)。一方、ヒトゲノム計

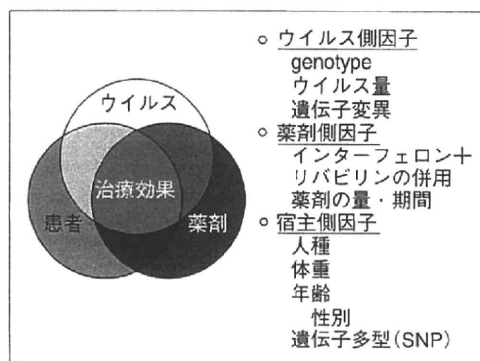


図1 インターフェロン治療効果とウイルス、薬剤、宿主側因子

* Identification of genetic variants of the *IL28B* associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus.

** Kentaro MATSUURA, M.D., Ph.D.: 名古屋市立大学大学院医学研究科消化器・代謝内科学 (〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1); Department of Gastroenterology and Metabolism, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya 467-8601, JAPAN

*** Yasuhiro TANAKA, M.D., Ph.D.: 名古屋市立大学大学院医学研究科病態医学 (ウイルス学)

画の成功により、ヒト遺伝子は個人差として約300個に1個、全ゲノムで約1,000万か所の一塩基多型(SNP; single nucleotide polymorphism)が存在し、このSNPが個々の疾患の発症、薬剤反応性や副作用に大きく関与することが続々と明らかとなってきている。近年、ゲノムワイドに均一に配置された約90万箇所のSNPを一括タイピングすることが可能となり、この手法を用いてわれわれは昨年、C型慢性肝炎に対するIFN治療反応性にきわめて強く関連するSNPを同定した¹⁾。

疾患関連遺伝子の同定

一般に、ある疾患の発症、薬剤反応性、副作用などに関与する遺伝子の同定を目指す時、ある候補遺伝子からアプローチする手法が用いられてきた。すなわち、推定される病態機序などから選ばれた遺伝子の変異や多型について患者群、健常群におけるcase-control studyを行い、疾患関連遺伝子を同定する。この方法では、ある程度の成功率で疾患関連遺伝子を同定できるが、全ゲノムで解析した場合、真に強く関連しているとは限らない。一方で近年、ゲノムワイド関連分析法(GWAS; genome-wide association study)は、ヒトのさまざまな多因子疾患にかかわる遺伝子を網羅的に探索する戦略として大きな注目を浴びている。この背景としては、大規模なSNP解析技術の進歩が大きな役割を果たしており、ゲノムワイドに均一に配置された約90万箇所のSNPを一括タイピングすることが可能となったことがあげられる。日本人集団の場合、これにより全ゲノムの約87%が網羅可能であるものと考えられている。これにより、候補遺伝子から疾患関連遺伝子を同定する従来の手法では不可能であった全ゲノムを対象に網羅的に解析することができるようになり、真に関連する遺伝子を同定することが可能となった。

IL28B遺伝子多型と治療効果

われわれは、PEG-IFN/RBV併用療法の有効性に関連するSNPを同定するために、GWASを実施した。すなわち、PEG-IFN/RBV併用療法が有効(再燃例も含む)であった日本人患者と無効であっ

た患者142人に関して、ヒト遺伝子の中で個人差があるとされる約90万箇所をAffymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0を用い分析した結果、19番染色体のIL28B遺伝子周辺に治療無効に関連する有意なSNPを発見した(図2)。さらに、別のコホート群を用いて解析したところ、IL28B遺伝子周辺に治療抵抗性に強く関連した複数のSNPが存在し、これらは強い連鎖不平衡にあった。このうちの代表的なSNPであるrs8099917の治療効果別のアリル頻度について図3に示す。すなわち、治療反応群(著効群+再燃群)では、メジャーアリル(TT)、無効群ではマイナーアリル(TG+GG)の割合が高く、マイナーアリルの患者では治療抵抗性であることが示された。さらに、従来からIFN治療効果に寄与する因子であることが報告されている年齢、性別、血小板数、肝線維化、HCV-RNA量を含めて多変量解析を行ったところ、これらの因子をはるかに凌ぐ危険率約30倍の確率($P=2.68 \times 10^{-32}$)で、rs8099917のSNPがPEG-IFN/RBV併用療法の無効に寄与していることが明らかとなった(表1)。

われわれの報告と同様の結果が同時期に欧米でも報告され²⁾⁴⁾、異なる人種(ヒスパニック、アフリカ系アメリカ人、ヨーロッパ系アメリカ人)においてもIL28B遺伝子多型が治療効果に強く関与することが証明された。また、興味深いことにGeらの報告では、IL28B遺伝子多型のアリル頻度は人種間で異なり、この頻度が著効率と相関していることが述べられている。すなわち、IL28B遺伝子多型が治療効果の得られやすいメジャーアリルの頻度は、アジア人で80~90%、ヨーロッパ系アメリカ人およびヒスパニックで70~80%であるが、従来IFN治療が効きにくいとされていたアフリカ系アメリカ人では30~50%と低値であり、IL28B遺伝子多型が人種間の治療効果の差に関与していることが証明された³⁾。

IL28B遺伝子多型とHCV自然排除

さらに、ThomasらによりIL28B遺伝子多型はHCVの自然排除にも関連していることが報告された²⁾。すなわち、HCVを自然に排除した患者と持続感染者のコホート研究において、代表的なIL28B遺伝子多型の一つであるrs12979860がメ

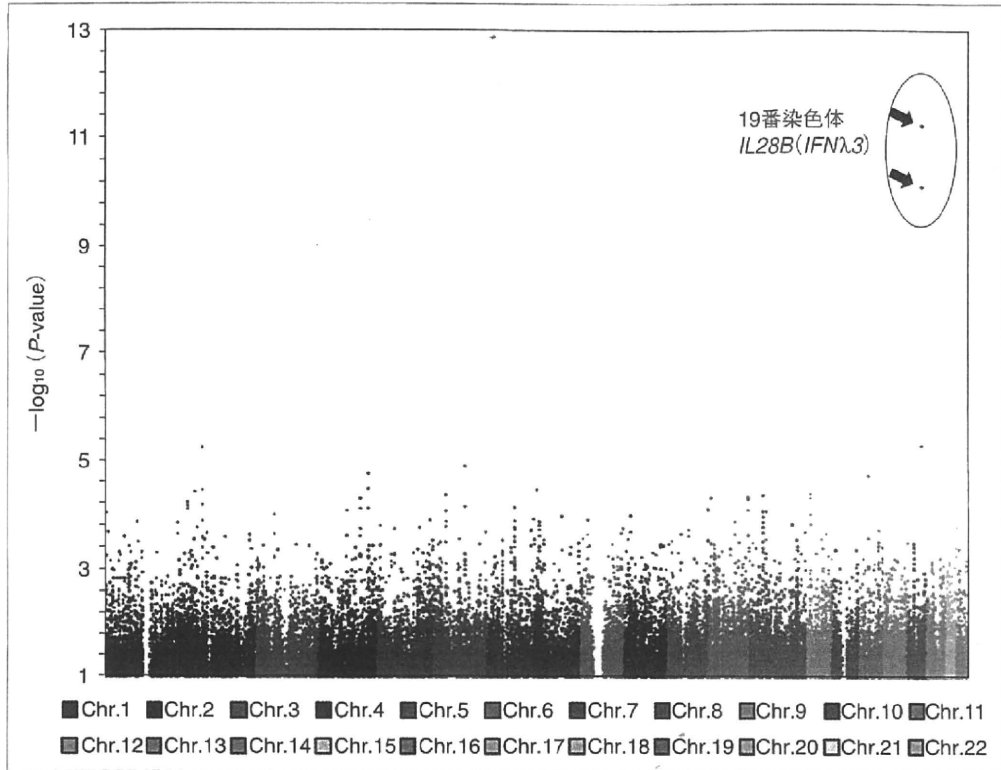


図2 ゲノムワイド関連解析

PEG-IFN/RBV併用療法が有効(再燃例も含む)例と無効例で各染色体上のそれぞれのSNPのアリル頻度について比較し算出したP値のプロット。19番染色体の*IL28B*遺伝子周辺に治療無効に関連する有意なSNPsを発見した。

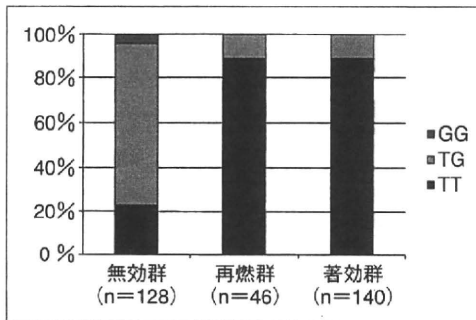


図3 *IL28B*遺伝子多型とPEG-IFN/RBV治療効果 (rs8099917)

*IL28B*遺伝子多型の代表的なSNPであるrs8099917について治療効果別にみると、無効群ではマイナーアリル (TG+GG)の割合が高い。

ジャーアリアル(CC)の群では、HCVの自然排除率が高く、*IL28B*遺伝子がウイルス排除に重要な役割を果たしている可能性が示唆された(図4)。

そこで、われわれは、日本人における*IL28B*遺伝子多型とHCVの自然排除の関連について検討するために、HCV自然排除群107例のrs8099917をタイピングし、PEG-IFN/RBV治療での治療反応群(著効+再燃)185例、無効群128例と比較検討した。その結果、rs8099917のメジャーアリル(TT)の頻度は自然排除群94.4%、治療反応群89.2%、無効群23.4%であり、日本人においても*IL28B*遺伝子多型がHCV自然排除にかかわっている可能性が示唆された(図5)。

*IL28B*遺伝子

*IL28B*は19番染色体長腕に位置し約1.5kと非常に小さく、IFN-λ3をコードするが、これは通常のC型肝炎の治療に使用されているIFN-αやβとは異なるIFN-λの1種である。IFN-λには、1, 2, 3が存在しそれぞれ*IL29*、*IL28A*、*IL28B*がコー

表 1 PEG-IFN/RBV治療無効に寄与する因子の多変量解析

Factors	Odds Ratio	95% Conf. Interval	P-values
rs8099917	37.68	16.71~83.85	<0.0001
年齢	1.02	0.98~1.07	0.292
性別	3.32	1.49~7.39	0.003
治療歴	1.12	0.55~2.33	0.750
血小板	0.93	0.87~1.01	0.080
ALT	1.00	0.99~1.00	0.753
線維化stage	1.10	0.73~1.66	0.658
HCV-RNA量	1.01	0.99~1.02	0.139

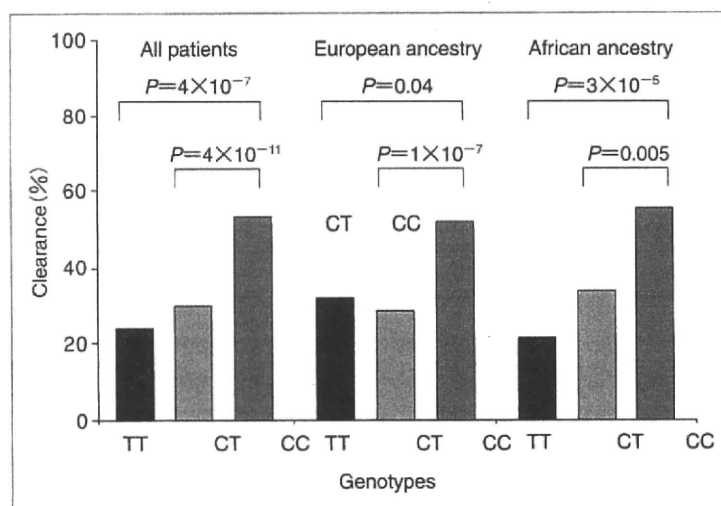


図 4 *IL28B*遺伝子多型とHCV自然排除率(rs12979860)

Rs12979860がメジャーアレル(CC)ではマイナーアレル(CT+TT)と比べHCVの自然排除率が高い。(文献⁹⁾より引用)

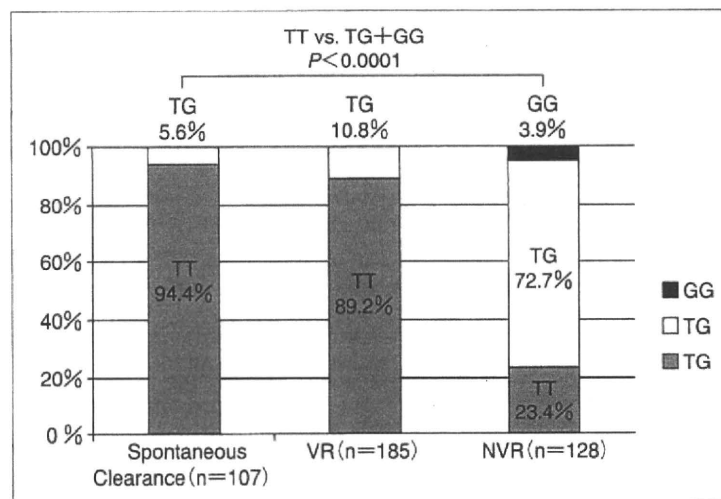


図 5 *IL28B*遺伝子多型とHCV自然排除率(rs8099917)

自然排除群ではrs8099917がマイナーアレル(TG+GG)の割合が低い。

ドする。IFN-λは、レセプターは異なるがIFN-α/βと同じシグナル伝達系であるJAK/STAT経路を活性化し、その下流に存在するIFN誘導遺伝子群(ISGs)を誘導して抗ウイルス効果をもたらすことが報告されている。しかしながら実際の臨床で使用されているIFN-αやβに比べてIFN-λのISGsの誘導は弱く、IFN-λの機能については明らかにされていない。これらが解明されれば、IFN-λを補填あるいは誘導する新しい治療法の確立につながるものと考えられ期待されている。実際にIFN-λ1はすでに臨床試験(phase Ib)がヨーロッパで開始され、副作用が少ないことが明らかにされつつあり、その有効性が期待されている⁵⁾。

おわりに

*IL28B*遺伝子多型がPEG-IFN/RBV治療効果、HCV自然排除に関連することが証明されたことで、今後、HCV感染メカニズムの解明が進むことが期待される。また、臨床面においては*IL28B*遺伝子多型に基づいたテーラーメイド治療が展開されることが予測され、さらには*IL28B*を補填あるいは誘導するといった新規治療法の確立が期待される。

文 献

- 1) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009 ; 41 : 1105.
- 2) Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009 ; 461 : 798.
- 3) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009 ; 461 : 399.
- 4) Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, et al. *IL28B* is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009 ; 41 : 1100.
- 5) Andrew J, Mitchell L, Atif Zaman, et al. Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2010 ; 523 : 822.

* * *

特集II C型肝炎ウイルスの感染・増殖メカニズムと臨床応用

C型慢性肝炎に対する
Peg-IFN/RBV治療効果
予測モデルの構築*

黒崎 雅之**

Key Words: IL28B, hepatitis C virus (HCV), peg-interferon

背景と目的

Genome-Wide Association Study (GWAS)により, IL28B遺伝子近傍のsingle nucleotide polymorphism (SNP)がC型慢性肝炎に対するpeg-interferon・ribavirin (RBV)の治療効果と関連することが複数の研究者からほぼ同時に報告され^{1)~4)}, この遺伝子が治療効果を規定する最も重要な宿主因子であることが示された。一方, 本邦においてはC型肝炎ウイルス (HCV)の遺伝子構造と治療効果との関連が精力的に研究されており, NS5A領域のinterferon sensitivity-determining region (ISDR)^{5)~7)}, Core領域アミノ酸70, 91の遺伝子変異⁸⁾⁹⁾が治療効果と密接に関連することが報告されてきた¹⁰⁾。これらの宿主因子, ウイルス因子をどのように臨床診療に活用してゆくかが, 今後の課題である。

データマイニングは仮説を設定しない網羅的解析手法であり, 従来はビジネス領域で用いられてきたが, 最近では医学分野への応用も行われている。われわれはデータマイニング手法を用いて, C型慢性肝炎に対するpeg-interferon・RBVの治療効果を予測する方法を開発し報告してきた^{11)~13)}。

今回は, ウイルス因子と宿主因子をデータマイニング手法により統合的に解析し, 治療効果予測

モデルを構築することを目的とした。

対象と方法

対象は, 武蔵野赤十字病院, 東京医科歯科大学, 山梨大学, 金沢大学, 名古屋市立大学の5施設においてpeg-interferon・RBV療法を行ったgenotype1b, 高ウイルス量のC型慢性肝炎496例である。IL28B遺伝子近傍のSNP: rs8099917をDigiTag2法により決定し, major alleleをTT, minor alleleをGG/TGと定義した。ISDR, Core70, Core91の遺伝子は, ダイレクトシーケンシング法で決定した。対象症例の平均年齢は57歳, 女性が50%で, 治療抵抗性HCVであるISDR変異数0~1(は88%), Core70変異型(は41%), Core91変異型は40%であった。sustained virologic response (SVR)は治療終了後24週時点でhepatitis C virus-ribonucleic acid (HCV RNA)陰性, null virological response (NVR)は治療中HCV RNA陰性化が得られなかった症例と定義した。

結果

全体の39%がSVR, 30%がNVRであった。IL28Bのmajor alleleは, 全体の70%, minor alleleは全体の30%であった。IL28Bにより治療効果は大きく異なり, IL28B major alleleではSVRが50%でNVRはわずか12%であったのとは対照的に, IL28B minor alleleでは72%がNVRで, SVRはわずか14%であった(図1)。また, 治療中の経時

* Predictive model of response to peginterferon therapy for hepatitis C.

** Masayuki KUROSAKI, M.D., Ph.D.: 武蔵野赤十字病院消化器科[〒180-8610 武蔵野市境南町1-26-1]; Division of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, Musashino 180-8610, JAPAN

カレントセラピー

別刷

月刊カレントセラピー [別刷] 2010 Vol.28 No.8 **8**月号

C型肝炎の治療反応性と宿主因子

松浦健太郎*1・田中靖人*2・溝上雅史*3

abstract

C型肝炎患者に対する治療としてペグインターフェロン+リバビリン併用療法が用いられるが、genotype 1型、高ウイルス量の症例では約50%の著効率であり、約20%は全く効かないのが現状である。治療前の効果予測についてはこれまで、genotype、ウイルス量、コア領域やNS5A領域のアミノ酸変異などのウイルス側因子に加えて、年齢、性差、肝線維化進展度、インスリン抵抗性などの宿主側因子が報告されてきたが、治療前の効果予測は約50%にとどまる。近年、ゲノムワイドに均一に配置された約90万カ所の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) を一括タイピングすることが可能となり、われわれはこの手法を用いて、*IL28B*遺伝子多型がインターフェロン治療反応性にきわめて強く関連することを報告した。

I はじめに

本邦のC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus : HCV) 感染者は約200万人存在するとされる。HCVはいったん感染すると6~8割が慢性肝炎に移行し、自然に治ることはほとんどない。多くは肝硬変、肝癌へと進展し、本邦では年間約2万5千人が肝癌で死亡していることから重要な問題となっている。このため、肝炎治療の推進 (経済的負担軽減) をはかるため2008年4月1日より「B型・C型肝炎患者医療給付事業」がスタートしている。本稿では、C型肝炎の治療反応性と宿主因子について、2009年にわれわれが報告した*IL28B*遺伝子多型を中心に述べる。

II インターフェロン治療と治療反応性

C型肝炎の根治治療として、現時点で最強の治療であるペグインターフェロン+リバビリン

(PEG-IFN/RBV) 併用療法で根治させることができるようになったが、日本人に最も多いgenotype 1型、高ウイルス量の症例では約50%の根治しか得られず、約20%はこの併用療法が全く効かないのが現状である。しかも、治療期間が長期にわたるため、高齢者ではさまざまな副作用により減量、中断を余儀なくされるとの問題もある。したがって、治療前の効果予測がきわめて重要と考えられる。その治療効果予測因子として、genotype、ウイルス量、コア領域やNS5A領域のアミノ酸変異などのウイルス側因子に加えて、PEG-IFN/RBVのアドヒアランス (薬剤因子)、年齢、性差、肝線維化進展度、インスリン抵抗性などの宿主側因子の重要性が多数報告されているが (図1)、それらの因子を総動員して解析しても治療前効果予測は約50%にとどまる。一方、ヒトゲノム計画の成功により、ヒト遺伝子は個人差として約300個に1個、全ゲノムで約1,000万カ所の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) が存在し、このSNPが個々の疾患の発症、薬

*1 名古屋市立大学大学院医学研究科消化器・代謝内科学
*2 名古屋市立大学大学院医学研究科病態医学 (ウイルス学) 教授

*3 独立行政法人国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター長

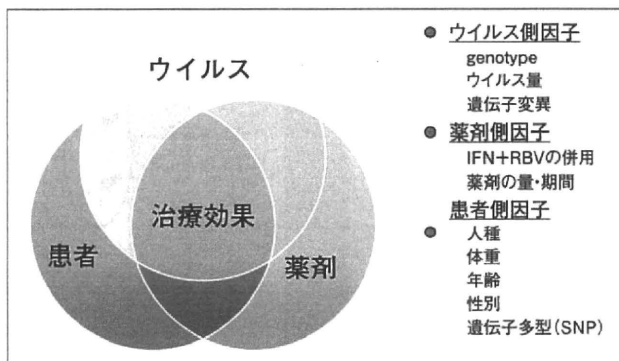


図1 IFN治療効果とウイルス、薬剤、宿主側因子

剤反応性や副作用に大きく関与することが続々と明らかとなってきている。近年、ゲノムワイドに均一に配置された約90万カ所（日本人では62万カ所）のSNPsを一括タイピングすることが可能となり、この手法を用いてわれわれは昨年、C型慢性肝炎のIFN治療反応性にきわめて強く関連するSNPを同定した¹⁾。

III 疾患関連遺伝子の同定

一般に、ある疾患の発症、薬剤反応性、副作用などに関与する遺伝子の同定を目指すとき、従来はある候補遺伝子からアプローチする手法が用いられてきた。すなわち、推定される病態機序などから選ばれた遺伝子の変異や多型について患者群、健常群におけるcase-control studyを行い、疾患関連遺伝子を同定する。この方法では、ある程度の成功率で疾患関連遺伝子を同定できるが、全ゲノムで解析した場合、真に強く関連しているとは限らない。一方で近年、ゲノムワイド関連分析法（genome-wide association study：GWAS）は、ヒトのさまざまな多因子疾患にかかわる遺伝子を網羅的に探索する戦略として大きな注目を浴びている。この背景としては、大規模なSNP解析技術の進歩が大きな役割を果たしており、ゲノムワイドに均一に配置された約90万カ所（日本人では62万カ所）のSNPsを一括タイピングすることが可能となったことが挙げられる。日本人集団の場合、これにより全ゲノムの約87%が網羅可能であるものと考えられている。これにより、

候補遺伝子から疾患関連遺伝子を同定する従来の手法では不可能であった全ゲノムを対象に網羅的に解析することができるようになり、真に関連する遺伝子を同定することが可能となった。この手法を用いることにより、病態進展に多因子が関与すると想定されてきた2型糖尿病、脳血管障害、B型慢性肝炎など、さまざまな疾患において疾患関連遺伝子の同定が矢継ぎ早に報告されている。

IV SNPタイピング法

SNPタイピング法としてよく知られている方法は、個々の多型部位を含むゲノム断片を特異的にPCRで増幅した後にアリルを識別する方法である。この方法は、1,000種程度のSNPを対象としたタイピングであれば実現可能であるが、数千以上となると困難となる。一方、近年になって多型部位特異的なPCRを行わずに大規模なSNPタイピングを行う方法が実用化された。そのひとつとしてAffymetrix社によって確立された方法では、まず制限酵素反応でゲノムDNAを断片化し、それらの断片の両端にアダプター配列を付加して増幅した後、マイクロアレイを用いたアリル特異的なハイブリダイゼーションを行う。現在市販されているAffymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0では一挙に約90万カ所のSNPを解析することが可能である。

また、NishidaらはGWASによって検出された候補領域において第一義的な疾患感受性遺伝子多型を特定すること（絞り込み）に適した技術として、

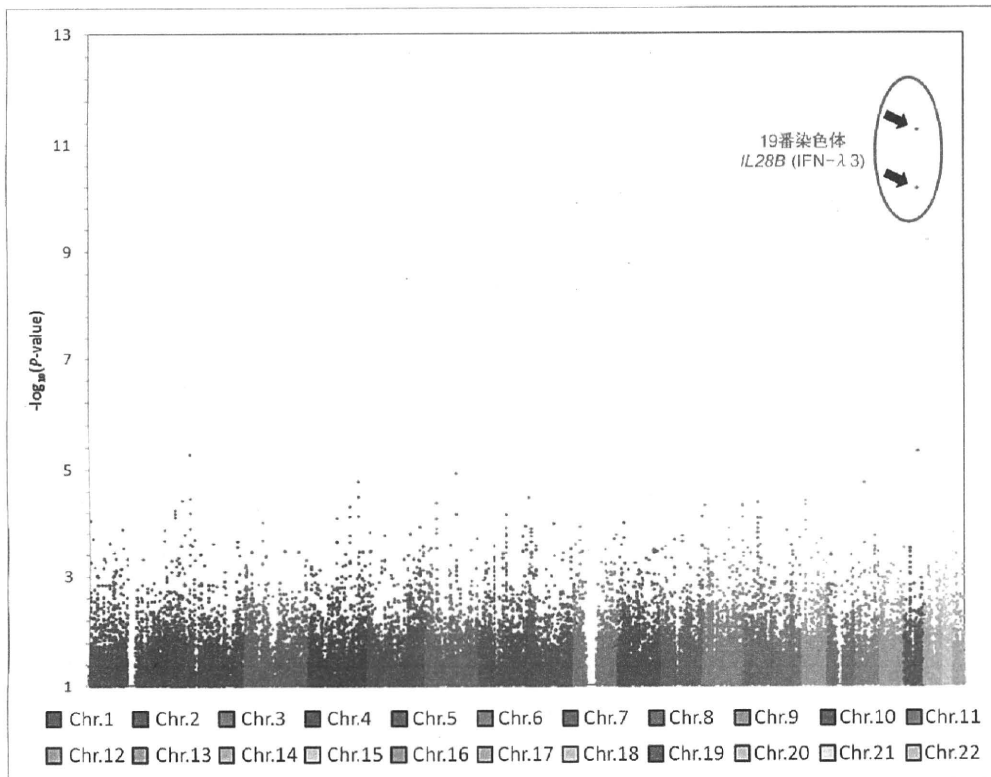


図2 ゲノムワイド関連解析
PEG-IFN/RBV併用療法が有効(再燃例も含む)例と無効例で各染色体上のそれぞれのSNPのアリル頻度について比較計算出したP値のプロット。19番染色体の*IL28B*遺伝子周辺に治療無効に関連する有意なSNPsを発見した。

DigiTag2法を確立した²⁾。DigiTag2法は96カ所(あるいは32カ所)のSNPを同時に解析することができ、同一のマイクロアレイを用いることができる低コストで簡便なSNP解析技術である。これを用いて、GWASで得られた候補SNPから真に疾患に関連するSNPの同定を行う。

V *IL28B*遺伝子多型と治療効果

われわれは、PEG-IFN/RBV併用療法の有効性に関連するSNPを同定するために、GWASを実施した。すなわち、PEG-IFN/RBV併用療法が有効(再燃例も含む)であった日本人患者と無効であった患者142人に関して、ヒト遺伝子のなかで個人差があるとされる約90万カ所をAffymetrix Genome-Wide

Human SNP Array 6.0を用い分析した結果、19番染色体の*IL28B*遺伝子周辺に治療無効に関連する有意なSNPsを発見した(図2)。別のコホート(検証群172人)を用いて、*IL28B*遺伝子および遺伝子周辺を詳細に検討した結果、治療反応性に強く関与するSNPsは複数存在し、しかもすべてが連鎖不平衡であった。この代表的なSNPであるrs8099917(マイナーアリルG)の治療効果別のアリル頻度について図3に示した。すなわち、治療反応群(著効群+再燃群)では、メジャーアリル(TT)無効群ではマイナーアリル(TG+GG)の割合が高く、マイナーアリルの患者では治療抵抗性であることが示された。さらに、従来からインターフェロン(IFN)治療効果に寄与する因子であることが報告されている年齢、性別、血小板数、肝線維化、HCV-RNA量を含め

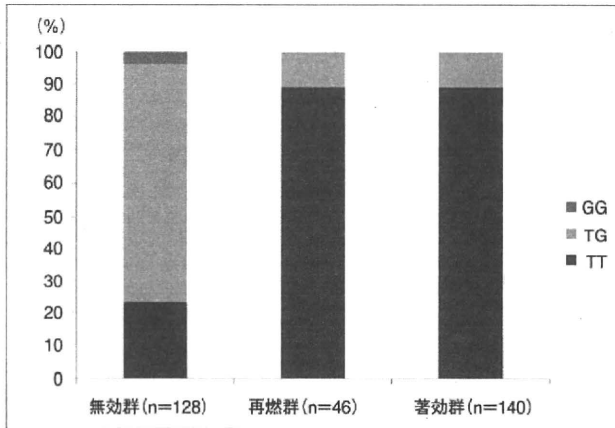


図3
IL28B遺伝子多型とPEG-IFN/RBV治療効果 (rs8099917)
IL28B遺伝子多型の代表的なSNPであるrs8099917について治療効果別にみると、無効群ではマイナーアレル (TG+GG) の割合が高い。

Factors	Odds Ratio	95% Conf. Interval	p-values
rs8099917	37.68	16.71~83.85	<0.0001
年齢	1.02	0.98~1.07	0.292
性別	3.32	1.49~7.39	0.003
治療歴	1.12	0.55~2.33	0.750
血小板	0.93	0.87~1.01	0.080
ALT	1.00	0.99~1.00	0.753
線維化 stage	1.10	0.73~1.66	0.658
HCV-RNA量	1.01	0.99~1.02	0.139

表1
PEG-IFN/RBV治療無効例に寄与する因子の多変量解析

て多変量解析を行ったところ、これらの因子をはるかにしのぐ危険率約30倍の確率 ($P=2.68 \times 10^{-32}$) で、rs8099917のSNPがPEG-IFN/RBV併用療法の無効に寄与していることが明らかとなった (表1)。

IL28Bは19番染色体長腕に位置し約1.5kと非常に小さく、IFN- λ 3をコードするが、これは通常のC型肝炎の治療に使用されているIFN- α や β とは異なるIFN- λ の1種である。IFN- λ には、1, 2, 3が存在しそれぞれIL29, IL28A, IL28Bがコードする。IFN- λ は、レセプターは異なるがIFN- α/β と同じシグナル伝達系であるJAK/STAT経路を活性化し、その下流に存在するIFN誘導遺伝子群 (ISGs) を誘導して抗ウイルス効果をもたらすことが報告されている (図4)。しかしながら実際の臨床に使用されているIFN- α や β に比べてIFN- λ のISGsの誘導は弱く、IFN- λ の機能については明らかにされていない。これらが解明されれば、IFN- λ を補填あるいは誘導する新しい治療法の確立につながるものと考えられ期待されている。実際にIFN- λ 1はす

で臨床試験 (phase I b) がヨーロッパで開始され、副作用が少ないことが明らかにされつつあり、その有効性が期待されている。

VI IL28B遺伝子多型に関する世界の状況

PEG-IFN/RBV併用療法の有効性に関連するGWASについては、同時期に欧米でも報告され^{3), 4)}、いずれの報告もIL28B遺伝子多型が関与するという結果であった。Geらの報告では、白人 (871人)、黒人 (191人)、ヒスパニック (75人) で検討した結果、白人においてIL28B遺伝子から3kb上流のSNP (rs12979860) が著効に強く関連することがわかった。興味深いことに、rs12979860のメジャーアレル (C-アレル) の頻度は、アジアで最も多く (80~90%)、続いて白人 (European-Americans) およびヒスパニック (Hispanics) が70~80%、そして黒人 (African-Americans) は30~50%と低値であり、この頻度が著効率と正に相関していることが述べら

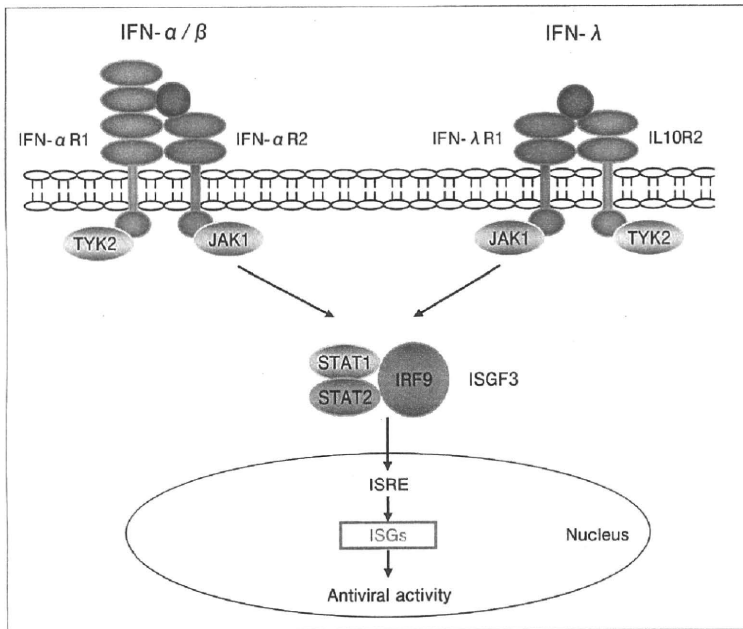


図4
IFNシグナル伝達
IFN-λはIFN-α/βとレセプターは異なるが、同じJAK/STAT経路を活性化し、その下流に存在するIFN誘導遺伝子群 (ISGs) を誘導して抗ウイルス効果をもたらす。

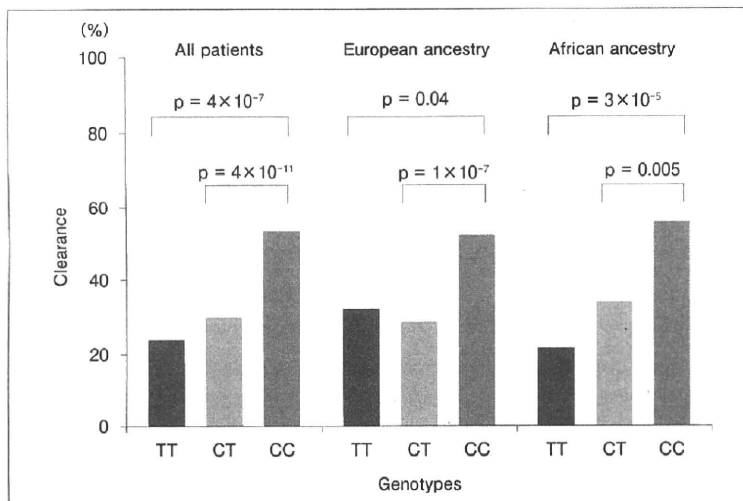


図5
IL28B遺伝子多型とHCV自然排除率 (rs12979860)
rs12979860のアリルがCCではCT+TTと比べHCVの自然排除率が高い。〔参考文献5)より引用改変〕

れている³⁾。Suppiahらは、オーストラリア (北ヨーロッパ起源) およびヨーロッパ諸国 (英国、ドイツ、イタリア、オーストリア) で検討し、われわれと全く同じSNPであるrs8099917がPEG-IFN/RBV併用療法の治療効果に有意に関連していることを報告している⁴⁾。

さらに、rs12979860はHCVの自然排除にも関連していることが報告された⁵⁾。すなわち、HCVを自然に排除した患者388例と持続感染者620例のコホート研究において、IFNの感受性のrs12979860の遺伝子型 (CC) では、HCVの自然排除を促進していることが報告され (図5)、IL28Bがウイルス排除に重

要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Ⅶ おわりに

IL28B 遺伝子多型と PEG-IFN/RBV 治療効果について、独立した3つのグループから、しかも人種を越えた遺伝要因であることが一気に証明されたことで、今後、*IL28B* 遺伝子多型に基づいたテーラーメイド治療が展開されることが予測される。すなわち、治療前にこの SNP を調べることにより根治の見込める患者群を高い確率（的中率80～90%）で選別できるし、効かない人たちは無用な苦痛や出費から免れることができる（的中率80～90%）。また、現在は不明である IFN- λ の機能解析を進めることにより、ウイルス排除のメカニズムの解明、*IL28B* を補填あ

るいは誘導する新規治療法確立の可能性が考えられ期待される。

参考文献

- 1) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al : Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41 : 1105-1109, 2009
- 2) Nishida N, Tanabe T, Takasu M, et al : Further development of multiplex single nucleotide polymorphism typing method, the DigiTag2 assay. *Anal Biochem* 364 : 78-85, 2007
- 3) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al : Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461 : 399-401, 2009
- 4) Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, et al : *IL28B* is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41 : 1100-1104, 2009
- 5) Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al : Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461 : 798-801, 2009