

タイム PCR を用いて経時的に測定し、抗 HCV 効果を比較した。各系統 3-4 匹のマウスで検討した。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得た。

C. 研究結果

IL28 遺伝子型(rs8099917)の TT, TG and GG は 34, 19 and 1 例それぞれ認められた。PEG-IFN/RBV 投与 24 時間後の HCV 減少量は TG/GG に比較して TT で有意に高値であった (-1.08 vs. -0.39 LogIU/ml) (図 1)。さらに 1, 2, 4, 8, 12 週までの HCV 減少量は TG/GG に比較して TT で有意に高値であった (-1.58 vs. -0.62, $P < 0.001$; -2.35 vs. -0.91, $P < 0.001$; -3.48 vs. -1.56, $P < 0.001$; -4.53 vs. -2.37, $P < 0.01$; -4.93 vs. -2.86, $P < 0.001$.)。また第 1 相(Ph1)および第 2 相(Ph2)の HCV 減少量は TG/GG に比較して TT で有意に高値であった (Ph1/day 0.94 ± 0.83 vs. 0.38 ± 0.40 logIU/ml, $P < 0.001$; Ph2/week 0.08 ± 0.06 vs. 0.04 ± 0.03 logIU/ml, $P < 0.001$)。

キメラマウスにおいては HCV-1b の感染源接種により全例 HCV 感染を確認した。PEG-IFN α 2a により、ウイルス量は徐々に減少し、14 日目での HCV-RNA 減少量(log reduction)を比較した結果、rs8099917-TT(major)では平均 2.3log の減少を認めたのに対して、rs8099917-GG(minor)では平均 1.9log の減少となり両群間で有意差を認めなかった (図 2)。

D. 考察

C 型肝炎に対する PEG-IFN/RBV 治療効果を規定する IL28B 遺伝子多型(SNP)が同定され HCV ダイナミクスにも大きく関与することが報告されている。本検討でも 2 相性の HCV-RNA の減量が認められ、ヒトにおける PEG-IFN/RBV 治療後の第 1 相(Ph1)および第 2 相(Ph2)の HCV 減少量は TG/GG に比較して TT で有意に高値であった。一方キメラマウスにおいては 2 相性の HCV 減量が認められたが IL28B 遺伝子型による差を認めなかった。

IL28B 遺伝子多型と HCV の自然排除については宿主の自然免疫系との関連が報告されている。興味深いことに、黄疸を伴う HCV の急性感染は rs8099917 TT が他のアリルに比較して多いことが報告されている (32% VS. 5%, $P=0.047$)。このことから HCV の急性感染においては rs8099917 TT がより強い自然排除と関連する事が示唆される。

PEG-IFN/RBV 治療の効果予測因子は多く存在する。HCV 遺伝子型、Core や NS5A と PEG-IFN/RBV 治療の効果との関連が報告されている。HCV-1b についてはコアの 70 と 91、また ISDR の変異が PEG-IFN/RBV 治療の効果との関連あるとされている。本件討ではコア 70 変異株、ISDR 野生株がキメラマウスへ投与された。今後コア 70 アミノ酸、ISDR の野生株と変異株などについてキメラマウスを用いて HCV ダイナミクスを検討する必要がある。

E. 結論

キメラマウスは SCID マウスであることから、T cell、B-cell 系が作用していない。免疫不全状態において、IL28 遺伝子型の異なるマウス間で IFN の抗 HCV 効果に差が見られなかったことより、

実際の臨床でみられる IL28B 遺伝子型による治療効果の差は、肝細胞自体の影響というより免疫担当細胞の役割も重要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Elkady A, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Sugiyama M, Khan A, Ali EM, Mouhamed L, Abou el-fetouh S, AbdEl-Hameed AR, Mizokami M. Performance of two Real-Time RT-PCR assays for quantitation of hepatitis C virus RNA: evaluation on HCV genotypes 1-4. J of Med Virol;82 1878-88: 2010.

2) Kurbanov F, Tanaka Y, Matsuura K, Sugauchi F, Elkady A, Khan A, Hasegawa I, Ohno T, Tokuda H, Mizokami M. Positive selection of core 70Q variant genotype 1b hepatitis C virus strains induced by pegylated interferon and ribavirin. J infect Dis;120 1663-71:2010.

2. 学会発表

1) 菅内文中, 田中靖人, 西田奈央, 松浦健太郎, 黒崎雅之, 坂本直哉, 日野啓介, 西口修平, 泉並木, 徳永勝士, 城卓志, 溝上雅史。C型慢性肝炎に対する PEG-IFN/RBV 併用療法の治療効果と IL28B 遺伝子多型との関連 年齢・性別によるサブ解析。第 14 回日本肝臓学会大会 2010 年 10 月 13, 14 日 横浜

2) 松浦健太郎, 田中靖人, 西田奈央, 杉山真也, 黒崎雅之, 泉並木, 田守昭博, 阿部弘一, 菅内文中, 坪内博仁, 野尻俊輔, 城卓志, 徳永勝士, 溝上雅史。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 型肝炎ウイルス自然排除に関与する。第 14 回日本肝臓学

会大会 2010 年 10 月 13, 14 日 横浜

3) Matsuura K, Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Izumi N, Tamori A, Abe K, Honda M, Kaneko S, Tsubouchi H, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Tokunaga K, Mizokami M.

Identification of genetic variants of IL28B gene associated with clinical course of hepatitis C virus infection in Japanese population. The 61st annual meeting of the AASLD, 2010, Boston MA USA.

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

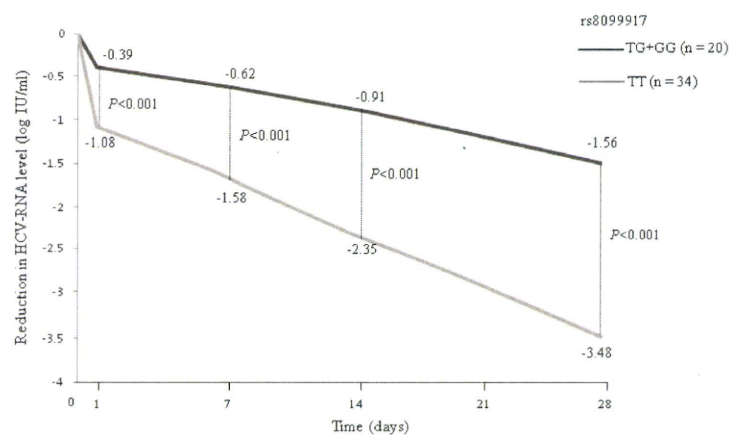
Table 1. Four lines of PXB mice using uPA/SCID mice and 4 different lots of human hepatocytes containing various SNPs around the *IL28B* gene

Donor	Race	Age	Gender	rs8103142	rs1297986	rs8099917
					0	
A	African American	5 Years	Male	minor-homo	minor-homo	heterozygous
B	Caucasian	10 Years	Female	minor-homo	minor-homo	heterozygous
C	Hispanic	2 Years	Female	Major-homo	Major-homo	Major-homo
D	Caucasian	2 Years	Male	Major-homo	Major-homo	Major-homo

Table 2. Dosage and time schedule of PegIFN-alpha2a inoculated with HCV-1b

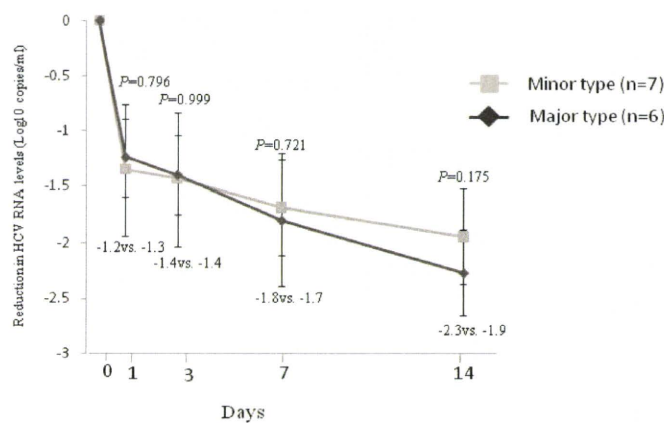
Donor	No. of Animals	Test Compound	Dose			
			Level (µg/kg)	Conc. (µg/mL)	Volume (ml/kg)	Frequency
A	3	PegIFN-alpha2a*	30	3	10	Day 0, 3, 7, 10
B	4	PegIFN-alpha2a	30	3	10	Day 0, 3, 7, 10
C	3	PegIFN-alpha2a	30	3	10	Day 0, 3, 7, 10
D	3	PegIFN-alpha2a	30	3	10	Day 0, 3, 7, 10

图1



Median reduction of HCV RNA levels (log IU/ml) at 1, 7, 14 and 28 days between genotype TT and TG/GG in patients treated with PEG- IFN/RBV.

图2



Median reduction of HCV RNA levels (log10 copies/ml) after administering PEG-IFN to 4 lines of chimeric mice and 4 different lots of human hepatocytes chimeric mice containing various rs8099917 SNPs around the IL28B gene as major type (TT), and minor type (TG or GG).

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

研究分担者 坂本 直哉 東京医科歯科大学・分子肝炎制御学講座 准教授

分担研究課題：宿主遺伝子に関連した治療抵抗性機構の解析

研究要旨：我々は機能が未知である IFN λ s の働きを解明し、その作用を増強する薬剤をすることを目的として研究を遂行している。今回我々はインターフェロン作用を増強する化合物のスクリーニングを遂行し、植物界に広く分布するトリテルペノイド化合物の一つである toosendanin に HCV 増殖抑制効果および interferon 作用増強効果があることを見いだした。HCV レプリコン細胞に toosendanin 存在下で 24 時間培養後インターフェロン α を添加することにより、ISG 発現増強とともに HCV 増殖が相乗的に抑制された。さらに IFN λ 下流のシグナルを亢進することも確認された。以上の結果より Toosendanin 関連化合物は IFN 作用増強薬として有用である可能性が示唆された。

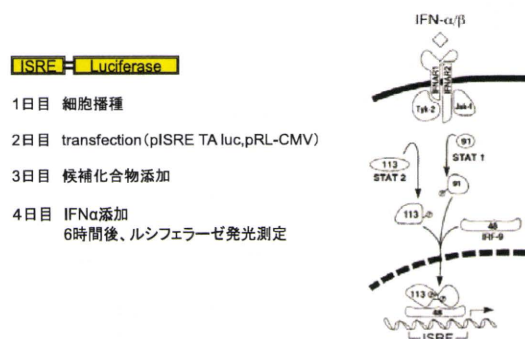
A. 研究目的

現在まで多くの抗 HCV 薬の開発が行われているがインターフェロン α は今なお、抗 HCV 薬の key drug である。しかしながら最も成績のいいペグインターフェロン（IFN）と抗ウイルス薬のリバビリルン（RBV）併用療法においても難治性の genotype I 症例においては、完治率は約 50% と十分な成績ではない。現在、新規抗 HCV 薬が多数開発中ではあるが、単独で既存の治療を凌駕する効果は現在のところ得られておらず、IFN を基軸とした併用療法が中心である。その為、現在 IFN 治療の成績を規定する因子の in-vitro における検討が必要とされる。

我々は、独自に開発した HCV 培養増殖系を用い、抗ウイルス薬感受性に関わる宿主蛋白の探索、機能解析を進め、新たな抗ウイルス療法を開発することを目的として研究を遂行している。本研究において坂本は、ランダム合成化合物ライブラリーの High-throughput screening (HTS) により、IFN- λ レセプター下流のシグナルを制御する小分子を探索し、植物界に広く分布するトリテルペノイド化合物の一つである toosendanin に HCV

増殖抑制効果および interferon 作用増強効果があることを見いだしたのでその作用機構を解析した。

ISRE-Reporterを用いたIFN- α 作用増強薬のスクリーニング



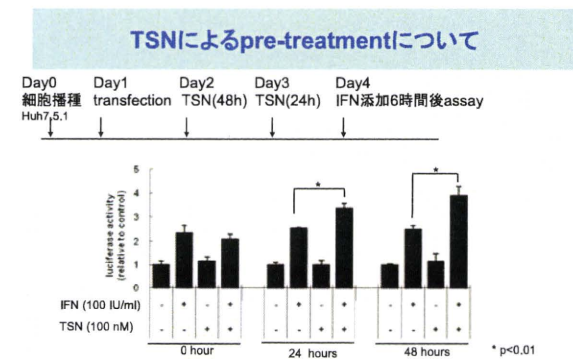
B. 研究方法

Toosendanin を Huh751/1b レプリコン発現細胞（Huh7/Rep-Feo）に添加し、IFN 併用・非併用下での HCV 増殖抑制効果を評価し、50%作用濃度（EC50）を算出した。同時に細胞毒性試験として MTS assay により 50%毒性濃度（CC50）を測定した。インターフェロン効果は ISRE-luciferase リポーターアッセイにて評価し、ISGF3 の成分である STAT1、STAT2、IRF9 を real time RT-PCR にて、

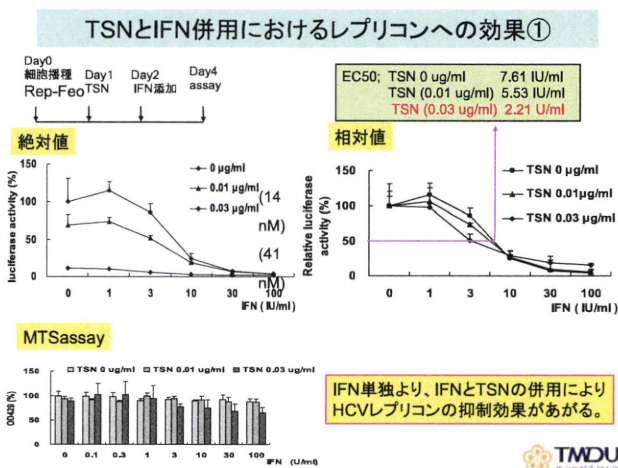
STAT1、STAT2 のリン酸化を Western blotting にて解析した。

C. 研究結果

Toosendanin は HCV レプリコンを細胞毒性を示さず特異的に抑制した ($IC_{50}=8\text{ng/ml}$ 、 $CC_{50} > 30\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $\text{selectivity index} > 3.8 \times 10^3$)。Toosendanin と IFN の併用は、それぞれの単独投与に比べ低濃度で同等の HCV 増殖抑制効果が見られ、相乗的に作用すると考えられた。

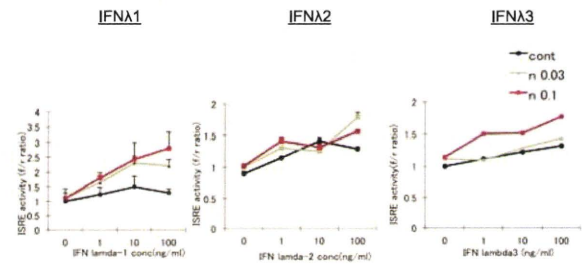


IFN による ISRE リポーター誘導能は Toosendanin $0.01 \sim 0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 併用下では有意に高く、IFN 作用を増強することが示された。Toosendanin 併用下では IFN による STAT2 リン酸化が増強した。



Toosendanin 前投与 24 時間後に IFN- $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$ をそれぞれ添加したところ IFN 誘導性の ISRE リポーター活性の誘導がより顕著に見られ、Toosendanin は IFN- λ 下流のシグナルを亢進することが示された。

TSN存在下でのIFN($\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$) とISRE



D. 結論

Toosendanin は強力かつ特異的な HCV 複製抑制効果を認め、新規抗 HCV 治療薬としての可能性が示唆された。作用基序として、ISRE 活性の上昇およびその上流 STAT 2 のリン酸化が増加しており、ISG3 量体もしくはその上流に作用点があると考えられた。

E. 来年度以降の研究課題

- IFN- λ シグナル解析のため、その発現系・応答系を別個に解析するためのリポータープラスミドおよび標的培養細胞系を構築する。IFN- λ 発現系として IL28A、IL28B および IL29 遺伝子の転写調節領域を含むルシフェラーゼリポータープラスミドを構築し、転写調節に関連する上流の蛋白の解析を進める。IFN- λ 応答系として ISRE-リポータープラスミドおよび IFN- λ レセプター発現細胞下部を使用する。
- IFN 発現増強小分子の大規模スクリーニング：ランダム合成化合物ライブラリー約 10,000 化合物の High-throughput screening (HTS) により、IFN- λ 発現を増強する化合物、および IFN- λ 依存性の遺伝子発現を増強する化合物を探索する。使用するライブラリーは炭素骨格を基本とし生体利用可能な化合物から構成される。同定された小分子の IFN- λ シグナル増強機構を解析する。さらに、独自に開発した HCV レプリコン系および HCV-JFH1 ウイルス培養系を用いて抗ウイルス効果の検証を行う。

F. 研究発表

1. 英文原著

1. Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Yasuhito Tanaka, Yuko Sekine-Osajima, Mayumi Ueyama, Masayuki Kurosaki, Nao Nishida, Akihiro Tamori, Yuki Nishimura-Sakurai, Yasuhiro Itsui, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Shuhei Hige, Yoshito Ito, Eiji Tanaka, Yoichi

- Hiasa, Namiki Izumi, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Mamoru Watanabe: Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b. *J Medical Virol* 2011;83(5):871-78.
2. Machi Yamamoto, Naoya Sakamoto (equal contribution), Tetsuya Nakamura, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Yuki Nishimura-Sakurai, Sei Kakinuma, Seishin Azuma, Kiichiro Tsuchiya, Takanobu Kato, Takaji Wakita and Mamoru Watanabe: Studies on virus kinetics using infectious fluorescence- tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatology Research* 2011; *in press*.
 3. Masayuki Kurosaki, Naoya Sakamoto, Manabu Iwasaki, Minoru Sakamoto, Yoshiyuki Suzuki, Naoki Hiramatsu, Fuminaka Sugauchi, Akihiro Tamori, Mina Nakagawa, Namiki Izumi: Sequences in the Interferon Sensitivity Determining Region and Core Region of Hepatitis C Virus Impact Pretreatment Prediction of Response to Peg-interferon Plus Ribavirin: Data Mining Analysis. *J Medical Virol* 2011; *in press*.
 4. Masayuki Kurosaki, Naoya Sakamoto, Manabu Iwasaki, Minoru Sakamoto, Yoshiyuki Suzuki, Naoki Hiramatsu, Fuminaka Sugauchi, Hiroshi Yatsuhashi, and Namiki Izumi: Pretreatment Prediction of response to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C using data mining analysis. *J Gastroenterol* 2010; *EPub*.
 5. Naoya Sakamoto, Yasuhito Tanaka, Mina Nakagawa, Hiroshi Yatsuhashi, Shuhei Nishiguchi, Nobuyuki Enomoto, Seishin Azuma, Yuki Nishimura-Sakurai, Sei Kakinuma, Nao Nishida, Katsushi Tokunaga, Masao Honda, Kiyoaki Ito, Masashi Mizokami, and Mamoru Watanabe: ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon-alfa and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatology Research* 2010; 40(11):1063-1071.
 6. Goki Suda, Naoya Sakamoto, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Kako Mishima, Yuko Onuki-Karakama, Machi Yamamoto, Yusuke Funaoka, Takako Watanabe, Kei Kiyohashi, Sayuri Nitta, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Kiichiro Tsuchiya, Michio Imamura, Nobuhiko Hiraga, Kazuaki Chayama, and Mamoru Watanabe: IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. *Virology* 2010; 407:80-90.
 7. Yuko Karakama, Naoya Sakamoto, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Megumi Tasaka-Fujita, Yuki Nishimura-Sakurai, Sei Kakinuma, Shinya Oooka, SeishinAzuma, Kiichiro Tsuchiya, Hiroshi Onogi, Masatoshi Hagiwara, and Mamoru Watanabe: Inhibition of HCV replication by a specific inhibitor of serin-arginine-rich protein kinase. *Antimicrob Agent Chemother* 2010; 54(8):3179-3186.
 8. Mina Nakagawa, Naoya Sakamoto, Mayumi Ueyama, Kaoru Mogushi, Satoshi Nagaie, Yasuhiro Itsui, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Hiroshi Tanaka, Nobuyuki Enomoto, and Mamoru Watanabe: Mutations in the Interferon Sensitivity Determining Region and virological response to combination therapy with Pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b infection. *J Gastroenterol* 2010; 45(6):656-665.
 9. KyeongJin Kim, Kook Hwan Kim, Hye Young Kim, Hyun Kook Cho, Naoya Sakamoto, JaeHun Cheong: Curcumin inhibits hepatitis C virus replication via suppressing the Akt-SREBP-1 pathway. *FEBS Letter* 2010; 584(4):707-12.
 10. Tomokazu Mizui, Shunhei Yamashina, Isei Tanida, Motoki Takashima, Yoshiyuki Takei, Takashi Ueno, Naoya Sakamoto, Kenich Ikejima, Tsuneo Kitamura, Nobuyuki Enomoto, Tatsuo Sakai, Eiki Kominami, Sumio Watanabe: Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J Gastroenterol*. 2010 Feb;45(2):195-203.
2. 総説
1. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守: シクロフィリン阻害剤. 肝胆膵 2011; *in press*.

2. 坂本直哉: STAT-C 多剤併用療法: 脱インターフェロン治療なるか? 肝胆膵 2011; in press.
3. 坂本直哉: 新しいインターフェロン製剤: PEG インターフェロン λ を中心に. 肝胆膵 2010; in press.
4. 箴島裕子、中川美奈、坂本直哉: HCV の複製・増殖機構と遺伝子型・遺伝子変異. 日本臨床 2010, in press
5. 坂本直哉: インターロイキン 28-29(IL-28・IL-29)-インターフェロン λ . 臨床免疫・アレルギー科特集: サイトカインのすべて 2010 in press.
6. 箴島裕子、中川美奈、坂本直哉: C型肝炎の日常診療: 治療の適応、選択の実際. medicina 2010;47(3):2010-2103
7. 坂本直哉: PEG-IFN+RBV 非著効例に対する PEG-IFN+RBV の再治療戦略. 日経 CME 2010 年 8 月号別冊.
8. 坂本直哉: 新規治療薬の開発動向. 最新医学 2010; 65(9):1919-1924.
9. 坂本直哉: STAT-C(Specifically Targeted Antiviral Therapy for hepatitis C)開発の動向. 肝胆膵 2010 増刊号: 204-208.
10. 植山真由美、中川美奈、坂本直哉、渡辺守: IL-6 と肝炎・肝発癌. 肝胆膵 2010; 60(5):849-856.
11. 坂本直哉、中川美奈、渡辺守: 肝疾患における血液生化学検査, IL28B 肝胆膵 2010; 60(4):657-660.

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）

分担者研究報告書

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

研究分担者：本村 和嗣 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官

分担研究課題：新型シーケンサーによる HCV ゲノム網羅的解析

研究要旨：我々は、新型シーケンサーを用い、HCV感染者体内の準種の種類とダイナミズムを包括的に解析する方法を研究する。初年度はシーケンス条件の検討と改良、独自の編集プログラムの作製を行い、包括的ゲノム解析の系を構築した。（１）独自の編集—エラー補正プログラムを用いて、シーケンスエラーの含有率（人為的変異率）は0.01%未満に低減できた。（２）準種の存在頻度推定の精度を検証し、1%までの準種の存在までは確認できた。（３）準種動態の解析への応用として、コア遺伝子領域70番目のアミノ酸の出現頻度と治療応答性について調べた。“core領域70番目のアミノ酸がグルタミンであるウイルスの存在”と“治療抵抗性”の関係は認められなかった。

A. 研究目的

2009年、名古屋市立大学研究グループ、田中、溝上らが、C型肝炎(HCV)に対する標準的治療であるペグインターフェロン α + リバビリン (PEG-IFN/RBV) 併用療法において IL28B (IFN λ 3) 周辺の遺伝子多型 (SNPs) が治療効果を規定していることを報告した (Tanaka Y. Nat Genet. 2009;41)。IL28B の一塩基多型が major homo のとき、PEG-IFN 治療効果が 80% 期待できるが、残り 20% は治療不応答である。我々は、治療応答性に関わるウイルス側要因の影響を調べるために、感染者生体内に存在する HCV を網羅的に解析したい。しかし、感染者体内の準種の種類や動態を解析する系はない。既存の技術では、血清中に 20% 未満存在するウイルスを検出することは困難である。我々は、新型シーケンサーの大容量配列情報収集能力に着目した。HCV 感染者体内に 1% 以上存在する準種の種類や動態を包括的に解析することで、持続感染を理解する手がかりを得たい。今年度は、編集—エラー補正プログラムを

構築し、大容量配列情報収集・解析の系を構築した。

B. 研究方法

(1) シーケンスエラーの頻度解析

HIV-1_{LAI} プラスミドの V3 領域 (105 塩基) を PCR で増幅し、FLX 454 (Roche) を用い、増幅産物の塩基配列を網羅的に取得した (~110,000 塩基)。HIV-1_{LAI} プラスミド配列と異なる塩基を抽出するプログラムを作製し、塩基置換、挿入・欠失等のシーケンスエラーの頻度を計算した。シーケンスエラーが優先的に生じる箇所 (ポリ A/G/C/T 配列を特定し、ポリ配列のエラーを補正するプログラムを作った。

(2) 準種の存在頻度推定の精度検証

HIV-1_{LAI} プラスミドと HIV-1_{NL4-3} プラスミド (10^1 – 10^7 コピー) を適当な比率で混ぜ (10:1, 100:1, 1000:1)、V3 と周辺領域を PCR で増幅し、FLX 454 (Roche) を用い、増幅産物の塩基配列を網羅的に取得した (~14,476,400 塩基)。HIV-1_{LAI}

とHIV-1_{NL4-3}に特徴的な塩基を指標にしてシーケンス配列を分類するプログラムを作製し、2種のウイルス配列の存在頻度を計算した。

(3) 臨床試料を用いた解析

2002年02月03日から2007年10月22日の間に、名古屋市立大学の消化器内科を受診—加療を受けた19症例（SVR: 12症例、NR: 7症例）を対象とした。19名の血清中のHCVのコア遺伝子N末領域の配列を解析した。血清より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を使って、HIV RNAを抽出した後、特異的逆転写プライマーを用いてcDNAを合成した。cDNAをtemplateにして、HCV core 領域をnested PCRにより増幅した。FLX 454 (Roche) を用い、増幅産物の塩基配列を網羅的に取得した。

(1) で作製した補正プログラムで補正した配列情報を用いて、core領域70番目のアミノ酸の存在頻度、準種の動態の解析した。

(倫理面からの配慮について)

ヒト由来臨床材料を使う研究は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行った。動物実験は、研究機関の倫理審査会の審議を受け、承認を得て行った。組換え DNA 実験は、実験を実施する研究機関の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) 独自の編集—エラー補正プログラムによるシーケンスエラーの低減

HIV-1_{LAI} プラスミドのシーケンスエラーの含有率（人為的変異率）は、エラー補正をすることで 0.01%未満に低減した（0.857%のエラー率が0.0027%に低減）。

(2) 準種の存在頻度推定の精度検証

HIV-1_{LAI} プラスミドと HIV-1_{NL4-3} プラスミドの混合物を出発材料にした場合、HIV-1_{LAI} プラスミドが 1%以上含まれるときは、コピー数に依存せずに、ほぼ頻度を反映して検出された（図1）。

(3) 準種動態解析への応用

多検体（最大 48 検体）を、同時にシーケンスする系を作った。一回の解析で、60 万種類の配列（平均長 450 塩基）、約 2 億 7 千万塩基が得

られた。IFN 耐性関連変異（R70Q or H）をもつ HCV 準種（>1%）は、10 名の検体で検出された（SVR: 7/12 症例、NR: 3/7 症例）。

今回の解析対象では、core 領域 70 番目のアミノ酸多型と 治療抵抗性の関係は認められなかった。

D. 考察

FLX454とエラー補正プログラムを用い、検体中に 1 %前後の割合で存在する準種を検出する系を構築した。pyro-sequence法では、原理的にポリ配列周辺に人為的変異が生じやすい。実際、我々の解析で人為的変異率は約~0.9%であった。本状況では、収集された配列より実在する準種か人為的変異かの判別が困難である。我々は、独自にエラー補正プログラムを構築し、補正処理後、0.0027%まで低減できた。そして、異なる比率、濃度で、準種頻度の精度を検証し、1.0%までの準種の存在までは確認できた（図1）。よって、我々は、1.0%前後の頻度であれば、実在の可能性があると考えている。

今回の我々の解析対象では、SVRとNRのコア70番目のアミノ酸の多型とIFN治療抵抗性の間に明確な関連は認められなかった。しかし、対象とした症例数が少ないため明確に断言はできない。

E. 結論

初年度は、血清試料から、一回の解析で、HCV 準種の 60 万種類の配列（平均長 450 塩基）を取得する系を作った。SVR と NR のコア 70 番目のアミノ酸の多型と IFN 治療抵抗性の間に明確な関連は認められなかった。次年度以降は、HCV コア領域の準種の動態の解析を行いたい。得られた情報を基に、治療抵抗性ウイルスのコア遺伝子全領域または全ゲノムをクローニングし、その特徴を解析する。また、得られた準種の存在を確認するため、real-time PCR を用いて検出する系を構築し検証する。

謝辞

糞便試料の収集に、以下の先生にご協力いただきました。厚く御礼申し上げます。

田中靖人先生（名古屋市立大学）、杉山真也 先生（国立国際医療研究センター）、溝上雅史先生（国立国際医療研究センター）

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

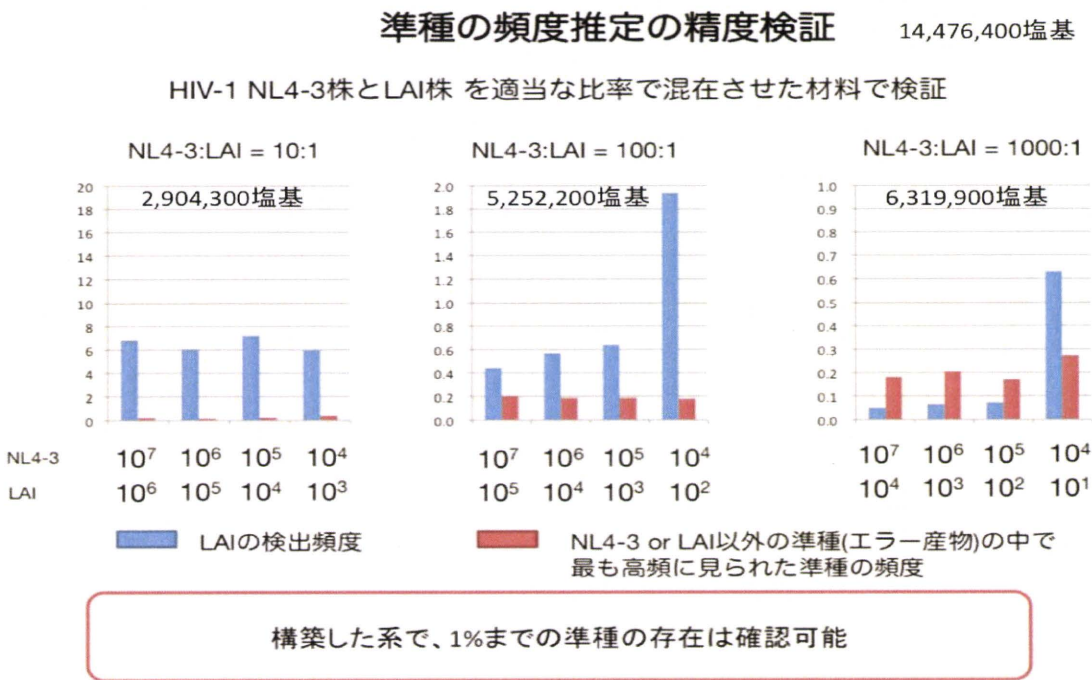
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1



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（平成 22 年度）

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

研究分担者：本多 政夫 金沢大学医学部先端医療技術学 教授

分担研究課題：肝炎の進展、治療反応性に寄与する宿主遺伝子発現データベースの構築

研究要旨：肝炎の進展や IFN 療法の反応性の違いにはウイルス側因子に加え、宿主側因子の果たす役割が極めて重要と考えられる。ゲノムワイド関連解析（GWAS）による一塩基多型（SNP）解析により、IFN 療法に対する反応性に加え、肝炎の進展に寄与する宿主因子の違いも明らかにされることが期待される。本年度は、PegIFN+Rib 併用療法を受けた C 型慢性肝炎症例の治療前及び治療開始 2 週後の末梢血液の遺伝子発現と治療効果及び IL28B 遺伝子多型との関連性を検討した。遺伝子発現解析とゲノムワイド関連解析を組み合わせることにより、病態の解明と新しい治療法開発が可能になると考えられた。

A. 研究目的

肝炎の進展や IFN 療法の反応性の違いにはウイルス側因子に加え、宿主側因子の果たす役割が極めて重要と考えられる。ゲノムワイド関連解析（GWAS）による一塩基多型（SNP）解析により、IFN 療法に対する反応性の違いや、肝炎の進展に寄与する宿主因子の違いが明らかにされることが期待される。一方で、ゲノム上で認められる変化が実際に遺伝子発現の変化として再現されるかを網羅的遺伝子発現により解析することが病態の解明と治療への応用という観点から重要である。

B. 研究方法

PegIFN+Rib 併用療法を施行した C 型慢性肝炎症例 168 例を対象とした。91 症例において治療前の肝組織及び末梢血液の遺伝子発現プロファイリングを Affymetrics gene chip（133U Plus 2.0）にて解析した。さらに治療前と治療開始 2

週後の末梢血液の ISG の発現変化と治療効果及び IL28B 遺伝子多型との関連性に付き検討した。

C. 研究結果

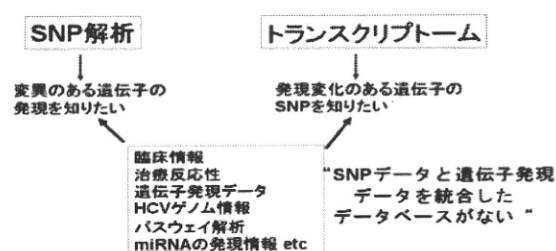
PegIFN+Rib 併用療法を施行した症例の治療前の肝生検組織では ISG を高発現している群では IFN 療法の反応が不良であり、ISG 低発現群では IFN 療法の反応が良好である傾向が認められることを先に報告した（Gastroenterology 2010）。今回、治療前の末梢血液の ISG 発現を解析した。肝組織と異なり末梢血液では治療反応例と不応例では ISG の発現に差は認められなかった。しかしながら治療 2 週後の ISG の誘導は治療反応群で有意に高かった。IL28B の遺伝多型と ISG の発現誘導に関しては有意な違いは認められなかった。治療前の肝組織と末梢血液の遺伝子発現を比較すると、IL28B メジャーでは肝組織における ISG 発現と末梢血液の ISG 発現は有意に相関し、肝組織における遺伝子発現と末梢血液の遺伝子発現は

一致した傾向が認められた。一方、IL28B マイナーでは肝組織と末梢血液の ISG 発現の関連性は消失していた。

D. 考察

遺伝子発現解析とゲノムワイド関連解析を組み合わせることにより、病態の解明と新しい治療法開発が可能になると考えられる。

SNPデータと遺伝子発現データの統合



今回、C 型慢性肝炎症例の末梢血液の遺伝子発現と治療効果及び IL28B 遺伝子多型との関連性につき検討した。IL28B メジャーとマイナーでは肝組織と末梢血液の遺伝子発現の関連性に違いが認められ、免疫応答における違いが示唆された。

E. 結論

C 型慢性肝炎症例の末梢血液の遺伝子発現と治療効果及び IL28B 遺伝子多型との関連性につき検討した。IL28B マイナーでは肝組織と末梢血液の遺伝子発現が異なっており、免疫応答の違いが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, Honda M and Kaneko S. Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific T cell responses in patients with

hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2011. in press.

2) Sunagozaka H, Honda M, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2010 Dec 2. [Epub ahead of print]

3) Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab*. 2010 Nov 3;12(5):483-95.

4) Honda M, Nakamura M, Tatenno M, Sakai A, Shimakami T, Shirasaki T, Yamashita T, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Differential interferon signaling in liver lobule and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2010 Nov;53(5):817-26. Epub 2010 Jul 15.

5) Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. *J Infect Dis*. 2010 Jul 1;202(1):75-85.

6) Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y, Kaneko S. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res*. 2010 Jun 1;70(11):4687-97.

7) Honda M, Sakai Y, Yamashita T, Yamashita T, Sakai A, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tatsumi I, Miyazaki Y, Tanno H, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system cancers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Sep 10;400(1):7-15.

8) Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K,

Mizokami M, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2010 Aug;139(2):499-509.

9) Ootsuji H, Honda M, Kaneko S, Usui S, Okajima M, Okada H, Sakai Y, Takamura T, Horimoto K, Takamura M. Altered hepatic gene expression profiles associated with myocardial ischemia. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 ;3(1):68-77.

10) Hodo Y, Hashimoto S, Honda M, Yamashita T, Suzuki Y, Sugano S, Kaneko S, Matsushima K. Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. *Genomics*. 2010 95(4):217-23.

11) Takatori H, Yamashita T, Honda M, Nishino R, Arai K, Yamashita T, Takamura H, Ohta T, Zen Y, Kaneko S. dUTP pyrophosphatase expression correlates with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2010 30(3):438-46.

2. 学会発表

1) Masao Honda, Akito Sakai, Tatsuya Yamashita, Yasunari Nakamoto, Eishiro Mizukoshi, Yoshio Sakai, Taro Yamashita, Mikiko Nakamura, Takayoshi Shirasaki, Katsuhisa Horimoto, Yasuhito Tanaka, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Shuichi Kaneko. Hepatic ISG Expression is Associated with Genetic Variation in Interleukin 28B and the Outcome of IFN Therapy for Chronic Hepatitis C. The 7th APASL Single Topic Conference "Hepatitis C Virus". 千葉市 (口演)

2) Masao Honda, Akito Sakai, Tatsuya Yamashita, Yasunari Nakamoto, Eishiro Mizukoshi, Yoshio Sakai, Taro Yamashita, Mikko Nakamura, Tkayoshi Shirasaki, Katsuhisa Horimoto, Yasuhito Tanaka, Katsushi Tokunaga, Masashi

Mizokami, Shuichi Kaneko. Hepatic ISGs are associated with genetic variation in IL28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. AASLD (the 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases) アメリカ ボストン (ポスター
3) Masao Honda, Akito Sakai, Tatsuya Yamashita, Yasunari Nakamoto, Eishiro Mizukoshi, Yoshio Sakai, Taro Yamashita, Mikko Nakamura, Tkayoshi Shirasaki, Katsuhisa Horimoto, Yasuhito Tanaka, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Shuichi Kaneko. Hepatic ISGs are associated with genetic variation in IL28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. The 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 横浜市 (口演)

4) 本多政夫, 酒井明人, 金子周一. C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療抵抗性における肝内 ISG s 発現と IL28B 遺伝子多型の役割. 第 14 回日本肝臓学会大会. 横浜市 ワークショップ (口演)

5) 本多政夫, 酒井明人, 金子周一. 肝内インターフェロン誘導遺伝子と治療抵抗性の分子機序. 第 96 回日本消化器病学会総会. 新潟市 シンポジウム (口演)

G. 知的所得権の所得状況

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（平成 22 年度）

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

研究分担者：五條堀 孝 国立遺伝学研究所・生命情報・DDBJ 研究センター・教授

分担研究課題：肝炎ウイルス統合データベースの構築およびネットワーク解析

研究要旨：ウイルス性肝炎に関して、宿主(ヒト)側とウイルス側双方の要因のデータを収集し、患者より得られた臨床情報を加えて多次元的に構成されたデータベースを、前研究班において構築した。本研究では、C型肝炎の薬剤反応性に影響を及ぼすと考えられる IL28B およびその周辺のネットワーク解析を、同データベースを応用して遂行した。併せて、同解析により得られた知見を基に、同データベースの拡充に必要な機能定義を行った。

A. 研究目的

本研究では、ウイルス性肝炎を特徴付けるプロファイルを構築し、それがテーラーメイド医療の分野で利用されることを目的としている。その実現のために構築されたデータベースを、実際にホスト側要因のネットワーク解析に応用し、特に C型肝炎の治療効果を決める因子の関係性に関する知見を得る。さらに、その知見を踏まえ、同データベースの有用性向上を目指した機能拡充の方向付けを行う。

B. 研究方法

同データベースより、C型肝炎の薬剤反応性に強く相関する SNP、およびその周辺の遺伝子として IL28B の存在が確認されるため、その周辺の蛋白質間相互作用を対象に計算機上でネットワーク解析を行う。その結果をフィードバックすることで、同データベースの機能拡充の指針を策定する。

C. 研究結果

IL28B の蛋白質間相互作用解析をゲノムネット

ワークプラットフォームで遂行することで、IFN λ と IFN α の相互作用、および JAK-STAT 経路との関連性を示すことができた。

D. 考察

前述の結果より、蛋白質間相互作用ネットワーク解析が C型肝炎の治療効果を決める因子の関係性を調べる上で重要であると考えられるため、同解析に活用可能な相互作用情報、遺伝子発現情報のデータベースへの導入が有用性向上に効果的であると考えられる。

E. 結論

蛋白質間相互作用ネットワーク解析の有用性を示すことができ、それを基にデータベースの機能拡充の指針を策定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Gaudet P, Bairoch A, Field D, Sansone SA, Taylor C, Attwood TK, Bateman A, Blake JA, Bult CJ, Cherry JM, Chisholm RL, Cochrane G, Cook CE, Eppig JT, Galperin MY, Gentleman R, Goble CA, Gojobori T, Hancock JM, Howe DG,

Imanishi T, Kelso J, Landsman D, Lewis SE, Mizrahi IK, Orchard S, Ouellette BF, Ranganathan S, Richardson L, Rocca-Serra P, Schofield PN, Smedley D, Southan C, Tan TW, Tatusova T, Whetzel PL, White O, Yamasaki C(2011) Towards BioDBcore: a community-defined information specification for biological databases.

Nucleic Acids Res. 39, D7-D10.

2. Nakamura Y, Komiyama T, Furue M, Gojobori T, and Akiyama Y(2010) CIG-DB: The database for human or mouse immunoglobulin and T cell receptor genes available for cancer studies.

BMC Bioinformatics. 11 (398) , 1-9.

3. Moolhuijzen P, Kulski JK, Dunn DS, Schibeci D, Barrero R, Gojobori T, Bellgard M. (2010) The transcript repeat element: the human Alu sequence as a component of gene networks influencing cancer. *Funct Integr Genomics.* 10 (3), 307-319.

2. 学会発表

T. Gojobori (2010) “Genomic evolution of hepatitis C virus and its implication to understanding of dynamic molecular interaction with the host system” (基調講演)、HCV2010 (第 17 回 C 型肝炎及び関連ウイルスに関する国際会議、パシフィコ横浜 (神奈川))
9 月 10 日

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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（平成 22 年度）

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

研究分担者：新井 理 名古屋市立大学 大学院医学研究科 研究員

分担研究課題：ウイルス性肝炎に対する応答性を既定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築

研究要旨：ウイルス性肝炎に関して、宿主(ヒト)側とウイルス側双方の要因のデータを収集し、患者より得られた臨床情報を加えて多次元的に構成されたデータベースを、前研究班において構築した。本研究では、同データベースを研究者に公開すると共に、宿主側因子の情報の展開として、遺伝子発現情報を取り扱えるよう、そのスキーマを拡充した。併せて、多種類の情報の相互参照を念頭に、利用者インターフェースのプロトタイプを構築した。

A. 研究目的

本研究では、ウイルス性肝炎を特徴付けるプロフィールを構築し、それがテララーメイド医療の分野で利用されることを目的としている。その実現のために構築されたデータベースの宿主側因子の情報を拡充するため、遺伝子発現情報を追加し、併せて、それに適した利用者インターフェースを構築する。

B. 研究方法

五條掘班員により、データベース活用には遺伝子発現に関連する情報の導入が望ましいことが示されている。それを受け、同データベースにそれらの情報を導入するために、そのスキーマを拡充する。また、既存 SNP 情報と遺伝子発現情報を相互参照できるよう、利用者インターフェースのプロトタイプを構築する。

C. 研究結果

導入対象は遺伝子発現量、制御領域情報、塩基修飾情報とし、情報の種類に依らず統一的に管理

できる構造にスキーマを拡充した。利用者インターフェースは、宿主ゲノムを軸として全情報を表示する形式を採用し、プロトタイプを構築した。

D. 考察

情報の種類に依らないデータベース構造を採ることで、今後の情報の追加に柔軟に対応可能と考えられる。宿主ゲノムを軸とした利用者インターフェースは、情報間の容易な相互参照を実現したと考えられる。

E. 結論

相互参照が容易で将来的な情報追加に柔軟に対応できる形で、同データベースの機能追加の枠組みが実現できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

III. 研究成果の刊行一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
渡辺久剛、斎藤貴史、西瀬雄子、邵力、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、奥本和夫、斎藤孝治、富樫 整、新沢陽英、河田純男	HCV コホート研究による持続感染者の自然経過	佐田通夫 ・新沢陽英 ・斎藤貴史	HCV 感染の natural course を探る：わが国におけるコホート研究	山形大学出版	山形	2011	45-50

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Kurbanov F, <u>Tanaka Y</u> , Matsuura K, <u>Sugauchi F</u> , Elkady A, Khan A, Hasegawa I, Ohno T, Tokuda H, <u>Mizokami M.</u>	Positive selection of core 70Q variant genotype 1b hepatitis C virus strains induced by pegylated interferon and ribavirin.	J Infect Dis.	201(11)	1663-1671	2010
* <u>Tanaka Y</u> , Nishida N, Sugiyama M, <u>Tokunaga K</u> , <u>Mizokami M.</u>	lambda-Interferons and the single nucleotide polymorphisms: A milestone to tailor-made therapy for chronic hepatitis C.	Hepatol Res.	40(5)	449-460	2010
*Akkarathamrongsin S, Sugiyama M, Matsuura K, Kurbanov F, Poovorawan Y, <u>Tanaka Y</u> , <u>Mizokami M.</u>	High sensitivity assay using serum sample for IL28B genotyping to predict treatment response in chronic hepatitis C patients.	Hepatol Res.	40(10)	956-962	2010

Elkady A, <u>Tanaka Y</u> , Kurbanov F, <u>Sugauchi F</u> , Sugiyama M, Khan A, Ali EM, Mouhamed L, Abou el-fetouh S, AbdEl-Hameed AR, <u>Mizokami M</u> .	Performance of two Real-Time RT-PCR assays for quantitation of hepatitis C virus RNA: evaluation on HCV genotypes 1-4.	J of Med Virol.	82	1878-88	2010
Ishiguro S, Inoue M, <u>Tanaka Y</u> , <u>Mizokami M</u> , Iwasaki M, Tsugane S; for the JPHC Study Group.	Impact of viral load of hepatitis C on the incidence of hepatocellular carcinoma: A population-based cohort study (JPHC Study).	Cancer Lett.	300(2)	173-179	2011
Kusakabe A, <u>Tanaka Y</u> , Inoue M, Kurbanov F, Tatematsu K, Nojiri S, Joh T, Tsugane S, <u>Mizokami M</u> .	A population-based cohort study for the risk factors of HCC among hepatitis B virus mono-infected subjects in Japan.	J Gastro- enterol.	46(1)	117-124	2011
*Afdhal NH, McHutchison JG, Zeuzem S, Mangia A, Pawlotsky JM, Murray JS, Shianna KV, <u>Tanaka Y</u> , Thomas DL, Booth DR, Goldstein DB; Pharmacogeneti cs and Hepatitis C Meeting Participants.	Hepatitis C pharmacogenetics: state of the art in 2010.	Hepatology.	53(1)	336-345	2011