

therapy [16–19]. The contribution of the IL28B SNP to the outcome of therapy was confirmed in successive studies, although the mechanism remains under investigation. On this basis, we sought to investigate the impact of the IL28B SNP on disease progression and HCC development, separate from the IFN-based treatment response. As shown in Table 4, we compared the clinical features between the two groups (IL28B GG/TG vs. IL28B TT). Importantly, this comparison disclosed a significant correlation between the core a.a. 70 polymorphisms and the IL28B SNP ($p < 0.001$) and confirmed the existence of a complex interaction between the host and the virus in chronic HCV infection. According to the result, patients with IL28B TG/GG were more likely to be infected with HCV with core a.a. 70Q/H than with core a.a. 70R and vice versa. Although the molecular mechanisms of their relationship remain unknown, it could be speculated that the IL28B SNP has an influence on the viral core sequences, because the host IL28B SNP remains fixed and cannot be influenced by the viral core sequence.

On the other hand, we observed no evident association between the IL28B SNP and HCC development. This was rather unexpected because it is considered that the IL28B SNP has a significant influence on the core a.a. 70 residue. Therefore, to clarify the correlation among core a.a. 70, IL28B, and HCC development, we undertook multivariate analysis to extract the independent variables affecting the core 70 residue. As demonstrated in Table 5, the IL28B SNP and the development of HCC were extracted as variables independently correlated with the core a.a. 70 residue. The result indicates that the core a.a. 70 residue was not only influenced by the IL28B SNP, but also by factors strongly related to HCC development, independent of the IL28B SNP. When considering the result, it is not strange if there is no direct relationship between IL28B SNP and HCC development. In contrast, multivariate analysis undertaken for disclosing factors influencing HCC development revealed that core a.a. 70 residue was a variable independently associated with HCC development other than age, albumin, or platelets even though the IL28B SNP was not extracted (Table 6). However, further comprehensive studies are warranted to disclose the molecular mechanisms for the complicated relationships among core a.a. 70, IL28B, and HCC development.

In conclusion, we have shown that core a.a. 70 was closely associated with disease progression and, often, changes of that residue were accompanied by temporal changes in liver damage, in close relationship with the IL28B SNP.

Acknowledgements This study was supported in part by a Grant-in-Aid scientific research fund of the Ministry of Education, Science, Sports and Culture number 20390206 and in part by a Grant-in-Aid

from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan (H19-kanen-002).

References

1. Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, et al. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990;12:671–675
2. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Mutations in the non-structural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996;334:77–81
3. Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, et al. Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology* 2005;48:372–380
4. Hung CH, Chen CH, Lee CM, et al. Association of amino acid variations in the NS5A and E2-PePHD region of hepatitis C virus 1b with hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 2008;15:58–65
5. El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 2008;48:38–47
6. Moriya K, Nakagawa K, Santa T, et al. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2001;61:4365–4370
7. Okuda M, Li K, Beard MR, et al. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 2002;122:366–375
8. Nishina S, Hino K, Korenaga M, et al. Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology* 2008;134(1):226–238
9. Bartosch B, Thimme R, Blum HE, Zoulim F. Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2009;51:810–820
10. Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2010;29:2309–2324
11. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998;4:1065–1067
12. Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, et al. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region are the important predictor of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2007;46:1357–1364
13. Franco S, Gimenez-Barcons M, Puig-Basagoiti F, et al. Characterization and evolution of NS5A quasispecies of hepatitis C virus genotype 1b in patients with different stages of liver disease. *J Med Virol* 2003;71:195–204
14. Gimenez-Barcons M, Franco S, Suarez Y, et al. High amino acid variability within the NS5A of hepatitis C virus (HCV) is associated with hepatocellular carcinoma in patients with HCV-1b-related cirrhosis. *Hepatology* 2001;34:158–167
15. Nagayama K, Kurosaki M, Enomoto N, Miyasaka Y, Marumo F, Sato C. Characteristics of hepatitis C viral genome associated with disease progression. *Hepatology* 2000;31:745–750
16. Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, et al. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peginterferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology* 2010;139:1577–1585
17. 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;41:1105–1109

18. 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;41:1100–1104
19. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009;461:399–401
20. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009;461:798–801
21. Ogura S, Akuta N, Hirakawa M, et al. Virological and biochemical features in elderly HCV patients with hepatocellular carcinoma: amino acid substitutions in HCV core region as predictor of mortality after first treatment. *Intervirology* 2009;52:179–188
22. Nakamoto S, Imazeki F, Fukai K, et al. Association between mutations in the core region of hepatitis C virus genotype 1 and hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol* 2010;52:72–78
23. Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, et al. Influence of amino-acid polymorphism in the core protein on progression of liver disease in patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol* 2010;82:41–48
24. Hu Z, Muroyama R, Kowatari N, Chang J, Omata M, Kato N. Characteristic mutations in hepatitis C virus core gene related to the occurrence of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009;100:2465–2468
25. Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, et al. Substitution of amino acid 70 in the hepatitis C virus core region of genotype 1b is an important predictor of elevated alpha-fetoprotein in patients without hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2008;80:1354–1362

肝発癌に関連するC型肝炎ウイルス遺伝子領域と *IL28B* SNPの解析

三浦 美香* 前川 伸哉* 門倉 信* 末木 良太* 小馬瀬一樹*
 進藤 浩子* 進藤 邦明* 雨宮 史武* 中山 康弘* 植竹 智義*
 井上 泰輔* 坂本 穰* 榎本 信幸*

1 研究の目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は肝発癌のハイリスクである。従来、ウイルス側因子と肝病態の関連は、インターフェロン治療反応性においてさまざまな解析がなされているが¹⁻³⁾、肝発癌との関連においては十分な検討がなされていない。また、近年ホストの因子として *IL28B* がインターフェロン治療効果を規定することが発見された⁴⁻⁶⁾ が発癌との関連は不明である。本研究ではHCVゲノムの網羅的解析を行い、背景因子を含めて肝発癌に関連するウイルス遺伝子領域を明らかにするとともに、*IL28B* とウイルス側因子の肝発癌の関連について検討した。さらに、次世代シーケンサーを用いて肝発癌に関連するHCV遺伝子変異について解析を行った。

2 方法

(1)長期経過観察が可能であった genotype1b インターフェロン無効症例43例を対象とした。経過中に肝発癌したHCC群20例、非HCC群23例におけるインターフェロン開始前とHCC群の肝発癌時、非HCC群は観察最終時点の各症例2時点について、全アミノ酸配列を決定、経時的変化を検討した。(2)上記の検討で肝発癌と関連が示唆されたコア領域とNS5A領域に着目し、検証群230症例(HCC群65例、非HCC群165例)を用いて同領域のアミノ酸配列を検討した。(3)長期

経過観察が可能であった98例についてコア領域の経時変化を検討した。(4)また、228例については *IL28B* SNP を検討した。(5)さらに先に解析をおこなった83症例については次世代シーケンサーを用いてコア領域の検討を行った。

3 結果

(1) HCC群と非HCC群の経時変化(平均観察期間HCC群10.9年、非HCC群11.1年)を全長で比較すると、HCC群では最も高率に変化していたのは、コア領域のaa 70 (20例中4例でR→Q)、NS5A-ISDR aa 2220 (20例中4例でD→non D)を含む3アミノ酸であった(図1A, B)。(2)新たな230例における検討において、コアaa70Q/Hは70Rに比してHCC群で有意に高率であった(Q/H:R, HCC群43:22 vs. 非HCC群66:99, $p=0.001$) (図2A)。また、慢性肝炎、肝硬変、肝癌へと病期が進行するにつれてコアaa Q/HはRに比較して高率となった(図2B)。(3)コアaa 70の経時変化ではHCC群ではnon-HCC群に比較してQ/Hの比率が多く、経過中R70Qへの変化を17%認めた。これに対し、non-HCC群にのみQ70Rを6%に認めた(図3)。経時変化別に背景因子の比較すると、R70R群では経時的な肝病態の進行はみられたのに対し、Q70Q群ではPLT、Alb値で有意に低下がみられた。また、R70Q群でもQ70Q群と同様にPLT、Alb値で有意に低下を認めた。しかし、初めQであってもRに変化した群ではR70R群と同様に肝病態の悪化は認めなかった。(4) *IL28B* SNPの解析を行った228例の検討では162

*山梨大学医学部第一内科

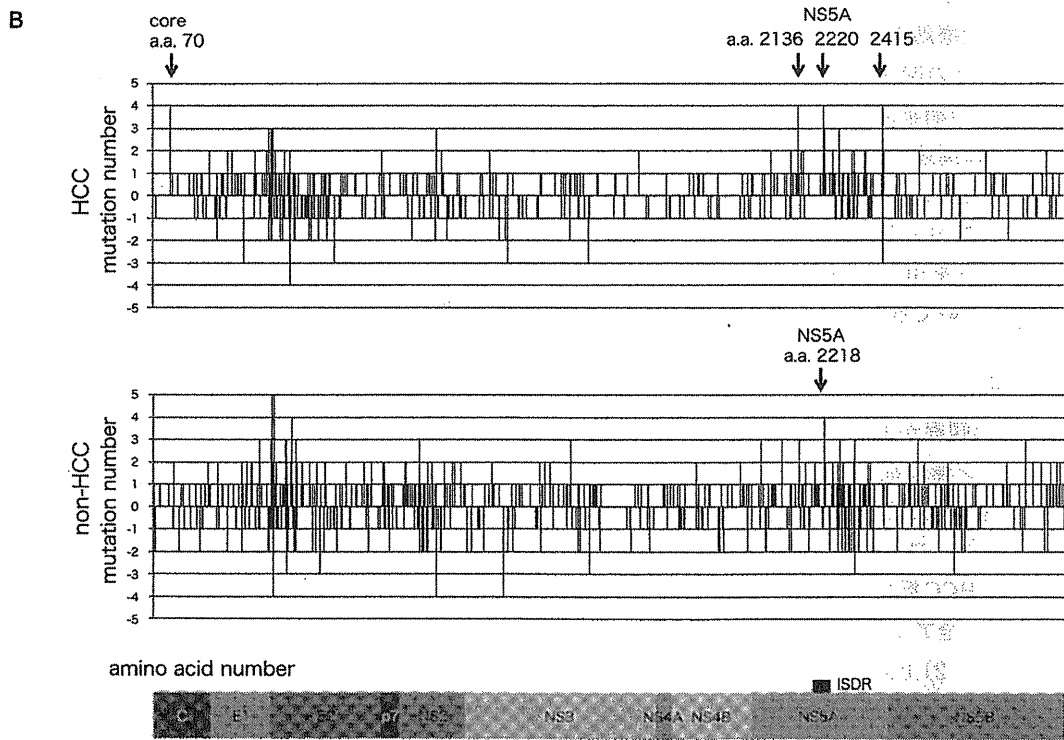
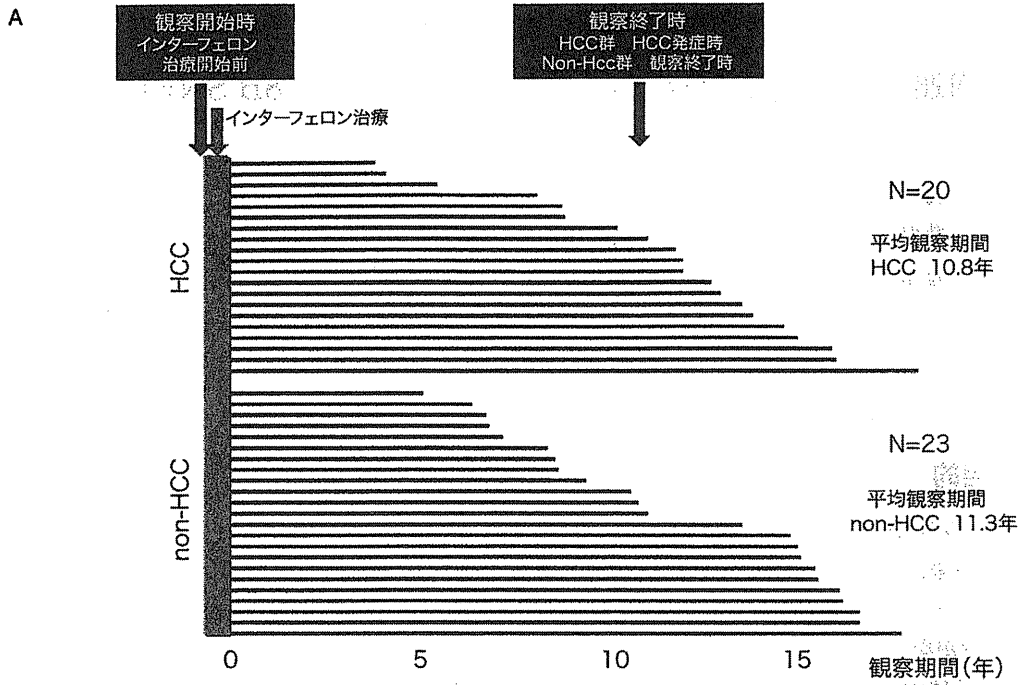


図1

A: 解析対象症例, B: HCV全長における経時変化

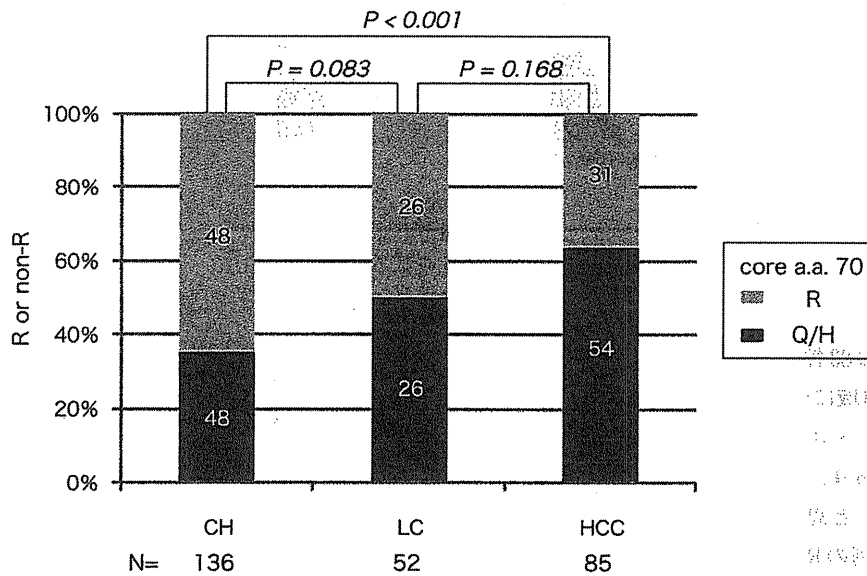
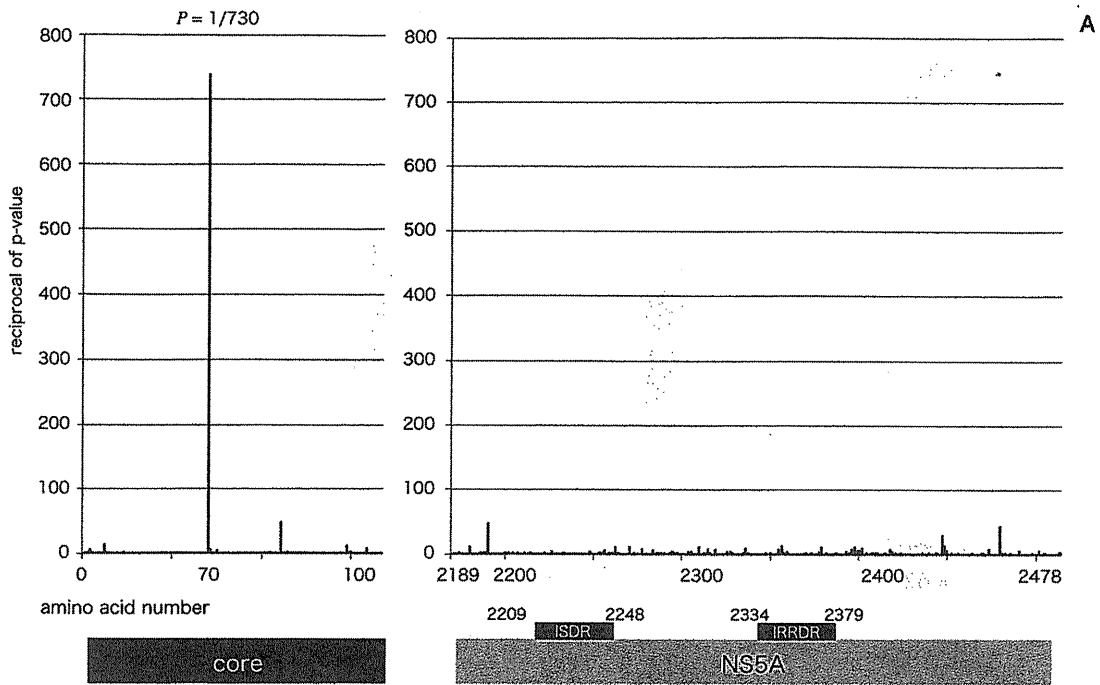


図2

A: コア, NS5A領域のアミノ酸変異, B: コア70アミノ酸変異, 病期進行別

例(71%)がTTで66例(29%)がGG/TGであった。*IL28B* SNP別の患者背景を比較すると, TG/GG群で γ GTP値が有意の高値であった($p=0.02$)。またコア aa 70のQ/H:R率がTG/TT群で有意に

高率($p<0.001$)であった。肝発癌に関する臨床因子を多変量解析を行うと, 年齢, PLT, Albのこれまで肝発癌の原因として既知の因子とは独立に core aa 70が抽出された(表1)。(5)次世代シーク

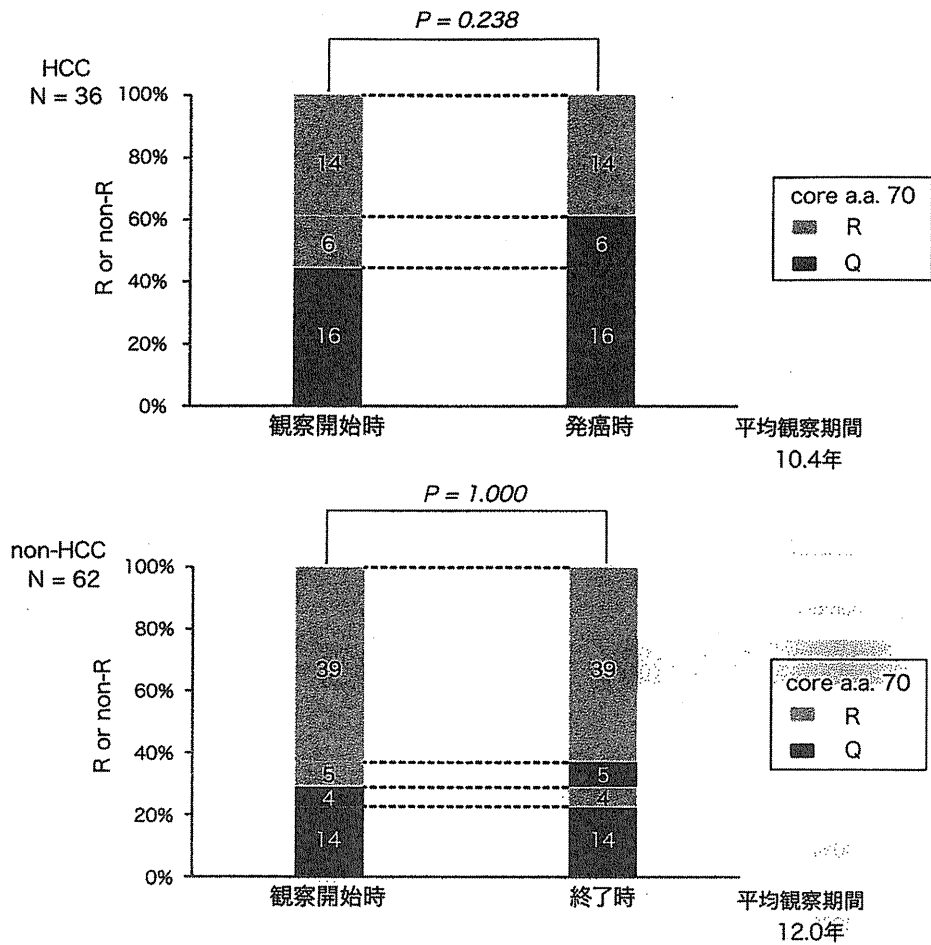


図3

コア70アミノ酸変異，経時変化

エンサーでは83種類のバーコードプライマーを使用しコア領域について同時解析を行った。プラスミドをコントロールとして解析すると1/500程度の変異であり，これがPCRによる変異のバックグラウンドと思われる。コア aa70に着目し得られた83症例のRとQ/Hの混在比率を病期別に比較するとやはり病期の進行につれQ/Hの比率が高くなり，全体の13.3%に5%以上の混在を認めた。混在比率の高い症例は，混合比50%で切ると全例で先のダイレクトシーケンスの結果と一致していた(図4A)。次にIL28B別にみると，TT群に比較しTG/GG群ではQ/Hの比率が高かった。また，5%以上の混在比の群と比較するとTT群ではRが優勢なのに対し，TG/GG群では

Q/Hが優勢であった(図4B)。

4 考 察

近年，コア aa70が肝発癌に関与するとの報告があるが^{7,8)}，これらの研究結果はインターフェロン治療の感受性を反映した可能性がある。本研究においてはインターフェロン著効例を除いた(インターフェロン無治療例と無効例のみで行った)症例のみでの解析であり，やはり core aa70Q/Hは肝炎の進行や発癌に関与を示す結果であった。

これまでコア70の経時変化と肝病態の進行との関連は明らかになっていない。約10年間の観察期間中，15%(15/98)がコア aa70の変化を認め，

表1 肝発癌に関連する臨床因子

Multivariate Analysis (N=228)		
Variables	Odds Ratio (95% CI)	p Value
Sex		
female	1	
Male	1.69 (0.77~3.70)	0.190
Age (years)		
< 65	1	
≥ 65	3.26 (1.47~7.25)	0.004
Platelets (10 ⁴ /mm ³)		
> 12	1	
≤ 12	2.59 (1.26~5.82)	0.021
Albumin (g/dL)		
> 4	1	
≤ 4	7.73 (3.53~16.9)	<0.001
γ GTP (IU/L)		
< 41	1	
≥ 41	1.87 (0.85~4.13)	0.129
ALT (IU/L)		
< 41	1	
≥ 41	1.98 (0.86~4.56)	0.109
<i>IL28B</i>		
TT	1	
TG or GG	0.63 (0.27~1.49)	0.290
Core aa 70		
R	1	
Q/H	2.44 (1.09~5.44)	0.003
previous IFN therapy		
-	1	
+	1.46 (0.68~3.16)	0.331

R70Qが11例に対しQ70Rが4例であった。このうち、R70Q群は病期進行や肝発癌に関与を示したのに対し、Q70R群では病態は安定していた。

また、近年*IL28B* SNPはHCV感染でのペグインターフェロン・リバビリン併用療法の治療効果との相関が示され、非常に重要な結果として注目されているがまだその機序の解明はなされていない。本研究では病期の進行や肝発癌と*IL28B*との関連について、インターフェロン治療効果とは別に解析を行った。この結果、*IL28B* SNPとコア aa 70多型は相関がみられ(p<0.001)、これはホストとウイルス間の複雑な相互作用があることが

示唆された。この分子学的な機序は不明であるが、ホストの*IL28B* SNPは生涯変化しないため、*IL28B* SNPがウイルスのコア領域の遺伝子配列に影響を与えている可能性が考えられた。

一方、*IL28B* SNPと病期進行や肝発癌との関連はコア aa 70に比較して弱かったことは、*IL28B* SNPとコア aa 70は相関を認めていたため意外な結果だった。この結果からは、肝発癌には、他の未知の要因がコア aa 70変異と関連して作用していると考えられた。

今回体内でのウイルスの動態を調べる新しい手法として次世代シーケンサーを用いて解析を

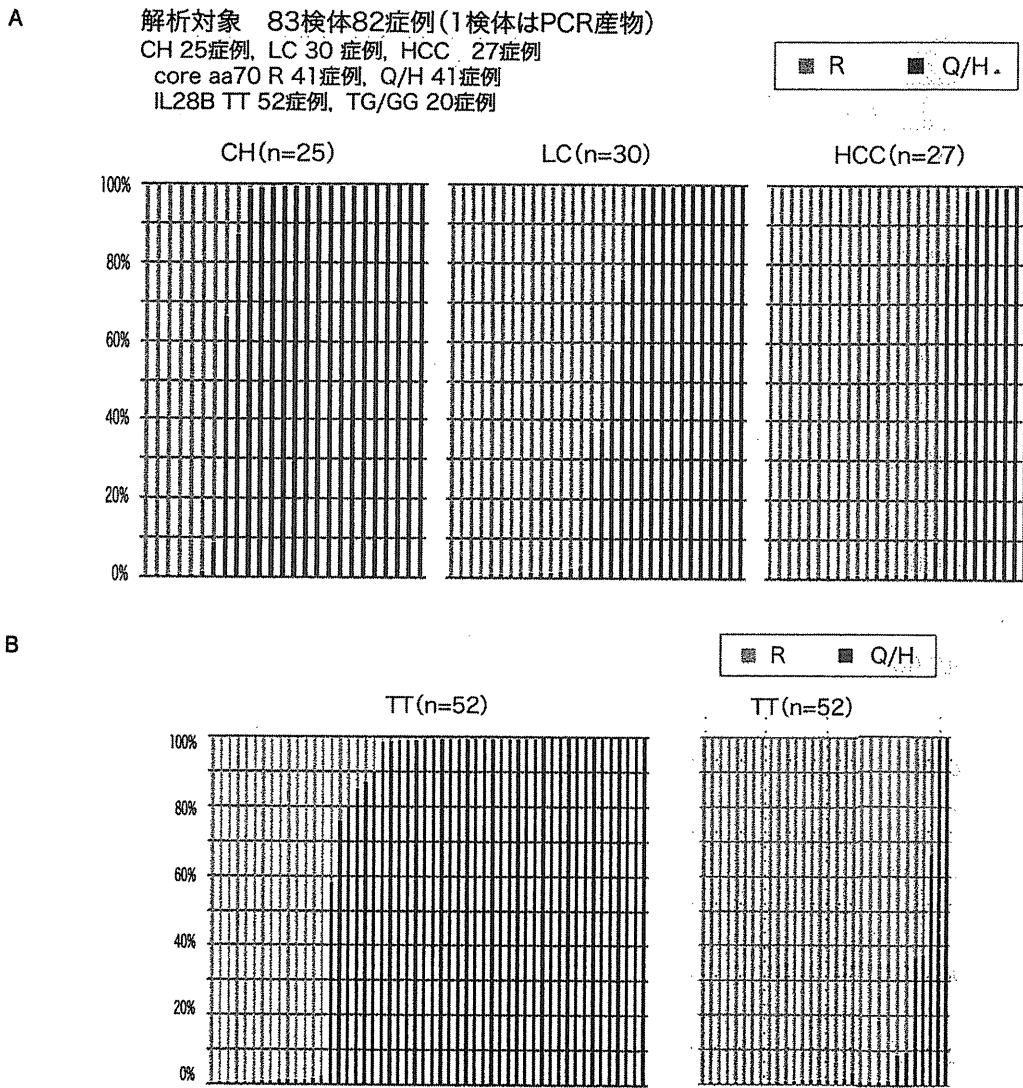


図4 次世代シーケンサーを用いたコア70アミノ酸混在比率

A: 病期進行別 B: IL28B別

行った。次世代シーケンサーを用いるとこれまでのキャピラリーシーケンサーの1,000倍の処理速度で解析が可能となる。次世代シーケンスによっても core aa 70 変異は病期の進行に伴い Q/H が増加していることが確認できた。また IL28B メジャーアレル症例においては core aa 70 変異は R 優位に混在しているのに対し、マイナーアレル症例では Q/H 優位に混在しており、IL28B SNP により core aa 70 の変異パターンが誘導され

ている可能性が示唆された。このコア aa 70 変異のメカニズムは、宿主とウイルスの間の密接な関連が予想され、臨床的に最も重要な点であると考えられた。

5 結論

肝病期の進行や肝発癌には、HCV コア aa 70 変異が関与しており、IL28B SNP と密接に関連しながら経時的に変化していることが考えられた。今後

は次世代シーケンサーを用いることで肝発癌に関連するHCV遺伝子変異について詳細な解析が期待される。

文献

- 1) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y et al : Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 11 : 334 : 77-81, 1996
- 2) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H et al : Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology* 48 : 372-380, 2005
- 3) El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N et al : Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 48 : 38-47, 2008
- 4) 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
- 5) 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
- 6) Ge D, Fellay J, Thompson AJ et al : Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461 : 399-401, 2009
- 7) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y et al : Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region are the important predictor of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 46 : 1357-1364, 2007
- 8) Nakamoto S, Imazeki F, Fukai K et al : Association between mutations in the core region of hepatitis C virus genotype 1 and hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol* 52 : 72-78, 2010

* * *

