

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

分担研究者： 徳永 勝士 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学 教授  
研究協力者： 西田 奈央、澤井 裕美、馬渡 頼子、提嶋 恵美

分担研究課題：ゲノムワイド関連分析による肝炎の宿主遺伝要因の探索

研究要旨：肝炎ウイルスに感染した宿主側の病態促進因子及び薬剤応答性を規定する遺伝要因の解明を目的として、90万種類以上のSNPを対象としたゲノムワイド関連分析を実施した。今年度は、慢性ウイルス性肝疾患患者群（うつ病、扁平苔癬群）388検体を追加してタイピングした。これまでに解析した全慢性ウイルス性肝疾患患者群1,210検体のうち1,114検体でQC call rateが95%以上となり、Overall call rateの平均は98.65%となった。C型肝炎に対する標準治療であるPeg-IFN $\alpha$ +RBV併用療法の副作用であるうつ症状の発症、好中球数減少、およびHCV感染による扁平苔癬を発症する患者群を対象としたゲノムワイド関連解析を実施した。いずれのGWASにおいてもゲノムワイド有意水準に達する遺伝子領域を同定することはできなかったが、複数か所の候補遺伝子領域を検出した。

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルスに感染した宿主を対象としたゲノムワイド関連分析を行うことにより、宿主側の肝病態進展に寄与する遺伝因子、治療効果に寄与する遺伝因子、ウイルス感染感受性に寄与する遺伝因子を探索することを目的とする。

### B. 研究方法

90万種以上のSNP解析用プローブが搭載されたAffymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0（以下、SNP Array 6.0）を用いて、慢性ウイルス性肝疾患患者群を対象としたSNPタイピングを行い、患者群を病態および薬剤応答性に応じてサブグループに分類してゲノムワイド関連分析を行う。

本研究では、ゲノムワイド関連分析で検出された候補遺伝子領域に対して、2次パネルを用いた

再現性確認実験（Replication study）を実施することにより、疾患感受性遺伝子の同定を目指した（図1）。

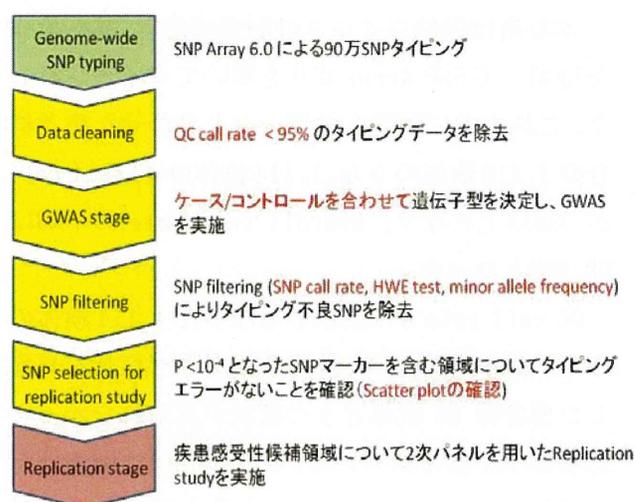


図 1 GWAS の実施手順

ゲノムワイド関連分析における擬陽性関連の発生を効果的に抑えるために、以下の手順で SNP filtering を実施する：(1) QC call rate が 95% 以上となったタイピングデータを選択する。(2) 対象群と対照群を合わせて Genotyping Console ver4 ソフトウェアによる遺伝子型を決定する。(3) SNP Array 6.0 に搭載された全 90 万 SNP の中に含まれる、日本人では頻度が低く統計解析に不適切な SNP やタイピング精度の低い SNP を除去する。(4) 統計解析の結果から  $P$  値  $< 10^{-4}$  となった SNP についてタイピング生データである散布図を確認し、擬陽性関連が疑われる SNP を除去する。

ゲノムワイド関連分析は、われわれが開発した GeneChip analysis ver2.0.10 ソフトウェアを用いて実施する。ゲノムワイド関連分析で検出された疾患感受性候補遺伝子領域において、HapMap データを用いた連鎖不平衡解析から TagSNP を選択し、DigiTag2 法を用いた Replication study を実施する。解析対象となる SNP の遺伝子型を決定するためのソフトウェアとして、われわれは SNP Star ver0.0.1.0 ソフトウェアを開発した。決定された遺伝子型に基づいて、アリル頻度、遺伝子型頻度、劣性モデル、優性モデルの 4 つの統計解析結果を得る。

### C. 研究結果

本年度は慢性ウイルス性肝疾患患者 388 検体を追加して SNP Array 6.0 を用いてタイピングした。これまでに取得したデータと合わせた患者群合計 1,210 検体のうち、1,114 検体は QC call rate が 95% 以上となり、Overall call rate の平均は 98.65% となった。

QC call rate が 95% 以上となった 1,114 検体のうち、Peg-IFN $\alpha$ +RBV 併用療法でうつ症状を発症した患者群 69 検体とうつ症状が見られなかった患者群 181 検体について、ゲノムワイド関連解析を実施した。ゲノムワイド有意水準 ( $P = 8.05 \times 10^{-8}$ ) に達する SNP を含む遺伝子領域は検出で

きなかったが、 $P < 10^{-4}$  を示す 82SNPs が存在する全 46 個所の候補遺伝子領域を検出した。

また、HCV による扁平苔癬群 87 検体と扁平苔癬なし群 86 検体について、ゲノムワイド関連解析を実施した結果、ゲノムワイド有意水準 ( $P = 8.44 \times 10^{-8}$ ) に達する SNP を含む遺伝子領域は検出できなかったが、 $P < 10^{-4}$  を示す 59SNPs が存在する全 29 個所の候補遺伝子領域を検出した。

さらに、Peg-IFN $\alpha$ +RBV 併用療法により好中球数が減少する患者群を対象としてゲノムワイド関連解析を実施した。ここでは、好中球数が 750 以下となる患者群 114 検体、好中球数が 600 以下となる患者群 50 検体をそれぞれケース群とし、好中球数が 1,000 以上となる患者群 302 検体をコントロール群とした 2 段階の GWAS により、候補遺伝子領域の絞り込みを行った (図 2)。最終的に 2 段階の GWAS でオッズ比 (OR) が強まった 135SNPs に、各 GWAS で  $P < 10^{-4}$  を示した 57SNPs を加えた全 192SNPs を Replication 解析の対象 SNP として選択した。GWAS で用いた検体とは独立のケース群 122 検体 (好中球数 750 以下)、コントロール群 316 検体 (好中球数 1,000 以上) を用いて、現在 Replication 解析を進めている。



図 2 好中球数減少群を対象とした GWAS

### D. 考察

うつ病を対象とした GWAS では、Peg-IFN $\alpha$ +RBV 併用療法でうつ症状を発症した患者群が 69 検体と少なかったために、十分な検出力を持った検定ができていない。また、HCV での扁平苔癬発症の

有無で2群に分けた GWAS においても、両群の検体数はそれぞれ 100 検体に満たず、やはり十分な検出力を持った検定ができていない。今後、可能な限り検体数の増加が望まれる。

また、Peg-IFN $\alpha$ +RBV 併用療法により好中球数減少を引き起こす遺伝要因の探索については、2段階の GWAS で  $P = 3.63 \times 10^{-6}$  (OR = 2.72) となる SNP を筆頭に、計 192SNPs を Replication 解析の候補 SNP として選択した。

## E. 結論

Peg-IFN $\alpha$ +RBV 併用療法でうつ病を発症する遺伝要因の探索、および HCV による扁平苔癬の発症に関わる遺伝要因の探索を目的とした GWAS では、現段階の検体数では十分な検出力ではない可能性があることから、うつ病発症群を 150 検体程度、また扁平苔癬群を 50 検体程度追加して、再度 GWAS を実施する予定である。

好中球減少群を対象とした GWAS では、2段階の GWAS の中でオッズ比が強まる SNP を候補 SNP として選択するという戦略を取った。今後 replication study で検証する予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Yuki NS, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, **Tokunaga K**, Mizokami M, Watanabe M; Ochanomizu-Liver Conference Study Group: Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b., *J Med Virol.* 83(5): 871-8 (2011)

2) Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama

M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsushashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, **Tokunaga K**, Mizokami M: Genome-wide association study identified ITPA/DDRGG1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C., *Hum Mol Genet.* 20 (17): 3507-16 (2011)

3) Kurosaki M, Tanaka Y, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Tamaki N, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Matsuura K, Sugauchi F, Enomoto N, Nishida N, **Tokunaga K**, Mizokami M, Izumi N: Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphatase gene and anaemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin. *Antivir Ther.* 16(5): 685-94 (2011)

4) Nishida N, Mawatari Y, Sageshima M, **Tokunaga K**: Highly Parallel and Short-Acting Amplification with Locus-Specific Primers to Detect Single Nucleotide Polymorphisms by the DigiTag2 Assay. *PLoS One.* 7(1): e29967 (2012)

### 2. 学会発表

1) **Tokunaga K**: Lessons from genome-wide search for disease-related genes, The 20<sup>th</sup> Annual Conference of Korean Genome Organization, Gangoe-myeon, Korea, 2011.

2) Nishida N, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, Koike A, Matsuura K, Tanaka Y, Sugiyama M, Ito K, Mizokami M, **Tokunaga K**, A genome-wide association study identifies the association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance, International Congress of Human Genetics 2011, Montreal, 2011.

3) Nishida N, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, Matsuura K, Tanaka Y, Sugiyama M, Ito K, **Tokunaga K**, Mizokami M, The association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance, American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2011, San Francisco, 2011.

4) 澤井裕美、西田奈央、田中靖人、松浦健太郎、伊藤清顕、溝上 雅史、**徳永勝士**、ゲノムワイド関連解析による B 型肝炎ウイルス排除機構に關与する遺伝要因の探索、第 56 回日本人類遺伝学会、幕張、2011

5) 澤井裕美、西田奈央、田中靖人、松浦健太郎、伊藤清顕、溝上雅史、**徳永勝士**、B 型肝炎の慢性化・ウイルス排除機構と HLA-DP との関連、日本組織適合学会第 20 回大会、三島、2011

## G. 知的所得権の所得状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

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

分担研究者：溝上 雅史 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター  
センター長

分担研究課題：次世代シーケンサーを用いた IL28B の解析

研究要旨：C型慢性肝炎の治療効果に関連するIL28B遺伝子周囲のSNPsについて個々の機能解析を実施した。その結果、プロモーター領域に存在したTA繰り返し配列の長さがIL28B発現量に関わることを明らかとした。加えて、IL28Bの生物学的な役割や機能を明らかとするためにヒトとチンパンジーのIL28B周囲の配列を比較することで、進化の過程で保存された領域と構造変化した領域を同定した。これらの結果を基盤とすることでヒトとチンパンジーのIL28B遺伝子の持つ抗ウイルス活性の比較を行うことが可能となり、次年度の生体内での機能を解析する準備を整えた。

## A. 研究目的

本年度では、IL28B の発現量とその機能解析を実施することを目的とした。

## B. 研究方法

C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロンとリバビリン併用療法で治療抵抗性を示した患者群と治療反応性であった患者群について、GWAS で同定した多型について個々の変異を導入することで、各 SNP の持つ機能を検討した。

また、IL28B の生物学的機能の解明のために、ヒトとチンパンジーのゲノムを高速シーケンスとキャピラリーシーケンスを併用することで詳細に解読、比較することで遺伝学的な側面からの遺伝子の機能と役割について解析した。

## C. 研究結果

これまでの SNPs を用いたゲノムワイド関連解

析で同定した SNPs について個別にその影響を解析した。細胞株を用いた解析で、IL28B 遺伝子内のイントロンに位置する rs11881222 と rs28416813 について検討したところ、いずれもスプライシングや mRNA の発現量に差はなく、この多型が IL28B 発現に影響を与えていることは否定的であった。

続いて、非同義置換となる rs8103142 について検討を行った。野生型と変異型のリコンビナント蛋白を作製し、ISRE-Luc のレポーターアッセイで IL28B の活性を確認した。その結果、いずれでも活性に違いはなく、このアミノ酸置換の影響も否定的であった。

最後にプロモーター領域にある rs72258881 と rs4803219 について検討した。両 SNPs の野生型と変異型を組み合わせにして導入したフラグメントを Luc ベクターに挿入し、プロモーターアッセイで検討した。その結果、rs72258881 の多型

が導入されたときに転写活性が変化した。この多型はTAの繰り返し配列で、繰り返し数を13回から10回にした場合に転写活性が低下した。

健常検体で検討したところ、この繰り返し数が、10-18回まで確認できた。それを再びプロモーターアッセイで転写活性を確認したところ、長くなるほどに活性が増加した。

チンパンジーとヒトのIL28B周囲のゲノム構造を解析したところ、ヒトとチンパンジーの間で相同な領域と構造の異なる領域を同定した。この違いはチンパンジーの亜種に依存しており、チンパンジーの中でも違いがあることが明らかとなった。

#### D. 考察

GWASで同定された有意なSNPsについて個々の機能を検証したところ、プロモーター領域の多型が発現量を規定していた。他にも遠位に存在している有意なSNPsが存在していることから、その領域についても高次構造を取ることで転写活性を変化させる可能性があり、さらなる検討を進める必要がある。

チンパンジーゲノムの解析によりヒトとの相違点が明らかとなった。今後はヒトとチンパンジーIL28B遺伝子の抗ウイルス活性を比較していくことで遺伝子内の重要なアミノ酸配列を同定し、進化の中でIL28B遺伝子がどのような意義を果たして来たか明らかとしていく。

#### E. 結論

IL28Bの発現量を規定する因子の一つとして、rs72258881の多型を同定した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M,

**Mizokami M.** (2011) Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. PLoS ONE 6(10):e26620.

##### 2. 学会発表

・ 「IL-28B 遺伝子周囲に存在する SNPs の機能解析と臨床的意義」杉山真也、田中靖人、**溝上雅史**. シンポジウム S2-13. 第19回日本消化器関連学会週間. 福岡. 2011年10月20日.

・ 「Polymorphism of IL-28B promoter region could improve the prediction value of response to CHC treatment following rs8099917 genotyping.」Masaya Sugiyama, Yasuhito Tanaka, **Masashi Mizokami** Poster P-407, American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, Nov 5<sup>th</sup>, 2011.

#### 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 23 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

分担研究者：黒崎 雅之 武蔵野赤十字病院 消化器科 部長

分担研究課題：C 型肝炎薬剤応答性のデータマイニング解析

研究要旨：C 型肝炎の標準治療薬は、ペグインターフェロン・リバビリンの 2 剤併用から、HCV 阻害剤を含む 3 剤併用療法へと移行しつつある。しかしながら、現時点で唯一使用できる HCV 阻害剤の Telaprevir は肝硬変、高齢者、貧血症例では使用が困難である。特に発癌リスクが高い症例では早急な治療が必要であるが、薬剤選択の際には安全性を十分に担保した治療戦略が必要である。武蔵野赤十字病院でペグインターフェロン・リバビリンの 2 剤併用療法を施行した 514 例を対象とし、発癌リスクで層別化した治療効果、Telaprevir 使用困難症例における治療効果とその規定因子について解析した。また 2 剤併用療法による高度貧血を ITPA と臨床データの組み合わせで予測するデータマイニングモデル、ITPA にかわり治療早期の貧血を用いた予測方法も考案した。発癌リスクが高い症例では、線維化進行例が多いが IL28B 遺伝子 Minor の頻度、ISDR 野生型の頻度、Core70 変異型などの治療抵抗性要因の頻度は発癌リスクにより差はなかった。発癌リスクが高い症例でも 70% の確率でウイルス学的反応が得られた。Telaprevir 治療が困難である 65 歳以上、肝硬変、貧血（ヘモグロビン値 12 未満）のいずれかを有する症例は、現在の治療対象症例の 49% であり、IL28B Major タイプ、ISDR 変異 2 個以上、血小板数 15 万以上が治療効果と関連する独立因子であった。データマイニング解析では、治療開始前のヘモグロビン値、クレアチニンクリアランス、ITPA 遺伝子が有意な貧血予測因子であったが、ITPA を 2 週時点でのヘモグロビン値減少 1.0 で置換しても、予測精度は同様であり、治療中の貧血（ヘモグロビン 10g 未満）の頻度が 61～75% と高率な症例を同定できた。Telaprevir は貧血リスクが高い症例では使用困難であるため、高度貧血の予測は薬剤選択の判断基準の一つとして活用できる。

#### A. 研究目的

C 型肝炎の標準治療薬は、ペグインターフェロン・リバビリンの 2 剤併用から、HCV 阻害剤を含む 3 剤併用療法へと移行しつつある。しかしながら、現時点で唯一使用できる HCV 阻害剤の Telaprevir は肝硬変、高齢者、貧血症例では使用が困難である。このような症例でも、より副作用の少ない次世代の HCV 阻害剤で治療は可能で

あるが、発癌リスクの高い症例においては、次世代治療薬まで待機することは困難であり、現在使用できるペグインターフェロン・リバビリンの 2 剤併用療法の工夫により、ウイルス学的著効を目指す必要がある。そこで、今回は既報の発癌リスク評価方法（Kurosaki et al J Hepatol in press）にもとづき、発癌リスクが高い症例の頻度、ウイルス因子・宿主因子からみた難治例の比率、2 剤

併用療法による実際の治療効果、治療効果向上のための方策について検討した。また、高度貧血をITPA 遺伝子解析により予測する方法、ならびにITPA が測定できない際に治療早期のヘモグロビン値減少から高度貧血を予測する方法について検討し、貧血リスクに基づく治療法選択についても考案した。

## B. 研究方法

武蔵野赤十字病院でペグインターフェロン・リバビリンの2剤併用療法を施行した514例を発癌リスクで層別化し、治療成績の実態を検討した。

また、これら治療対象となったコホートにおけるTelaprevir 使用困難症例の頻度を検討し、当該症例におけるペグインターフェロン・リバビリンの2剤併用療法の治療効果とその規定因子について解析した。

ペグインターフェロン・リバビリンの2剤併用療法による高度貧血をITPA と臨床データの組み合わせで予測するデータマイニングモデルを構築した。また、ITPAにかわり、治療早期の貧血を用いた予測方法も考案した。

## C. 研究結果

既報の発癌リスク評価方法 (Kurosaki et al J Hepatol in press) により、最も発がんリスクが高い60歳以上、血小板数15万未満、アルブミン4.0未満の発癌高リスク症例(5年発癌率21%)においては、F3-4の線維化進展例の頻度が49%と高率であり、続いて発癌率の高い60歳以上、血小板数15万未満だがアルブミン4.0以上で、AST40以上の症例(5年発癌率7.3%)ではF3-4の頻度は36%であった。しかし、インターフェロン治療効果と密接に関連する宿主因子IL28B 遺伝子Minorの頻度、ISDR野生型の頻度、Core70変異型の頻度は、発癌リスクが高い症例と低い症

例で有意な差はなく、発癌リスクにより治療抵抗性要因の分布に差はなかった。

実際に発癌リスクが高い症例と低い症例におけるペグインターフェロン・リバビリンの2剤併用療法の治療効果を検討すると、ウイルス学的著効SVRは41% vs 54%と13%の差異を認めたと、HCV RNAが陰性化しないNVRの頻度は30% vs 18%であり、発癌高リスク症例でも70%の確率でウイルス学的反応が得られることが確認できた。

発癌リスクに関わらず、Telaprevir 治療が困難である65歳以上、肝硬変、貧血(ヘモグロビン値12未満)のいずれかを有する症例は、現在の治療対象症例の49%であった。これらの症例に限定した多変量解析では、IL28B Majorタイプ(odds比3.1)、ISDR変異2個以上(odds比3.1)、血小板数15万以上(odds比3.1)が治療効果と関連する独立因子であった。ウイルス学的反応が得られた症例における再燃関連因子の検討では、総リバビリン量が2.5g/体重(kg)未満での再燃率が40%であったのに対し、2.5~3.0gでは30%、3.0~3.5gでは26%、3.5g以上では17~19%と再燃率がリバビリン量依存性に段階的に低下した。

ITPA Minor型を見分ける判別因子として、2週時点でのヘモグロビン値低下はAUROCが0.773であり、2週時点でのヘモグロビン値低下が1.0未満であれば、ITPA Minorを感度81%、特異度62%で予測可能であった。また、2週時点でのヘモグロビン値減少が1.0未満では、全経過における高度貧血(ヘモグロビン減少3.0以上)の頻度が29%であったのに対し、2週時点でのヘモグロビン値減少が1.5以上の症例では81%であり、治療早期のヘモグロビン減少は、高度貧血予測に有用であった。

データマイニング解析では、治療開始前のヘモグロビン値、クレアチニンクリアランス、ITPA 遺伝子が有意な貧血予測因子であったが、ITPAを2週時点でのヘモグロビン値減少1.0で置換し

ても、予測精度は同様であった。治療開始前のヘモグロビン値が 14 未満、クレアチニンクリアランス 90 未満、あるいはクレアチニンクリアランスが 90 以上でも ITPA が Major 型あるいは治療開始 2 週時点でのヘモグロビン値減少が 1.0 以上の症例では、治療中の貧血（ヘモグロビン 10g 未満）の頻度が 61～75%と高率であった。

#### D. 考察

発癌リスクの高い症例には線維化進展例が多く含まれるが、ウイルス学的難治例、宿主因子難治例の頻度は発癌リスクとは独立しているため、従来型の 2 剤併用療法も治療選択肢の一つとなる。今後の標準療法は Telaprevir を含む 3 剤併用療法になるが、現在の治療対象の 49%は Telaprevir 使用が困難な症例である。これらの症例における治療効果規定因子は IL28B、ISDR 変異、血小板数であり、ウイルス学的反応が得られれば、3.5g/体重(kg)以上のリバビリンを投与することで高率に SVR が得られる。

Telaprevir は、貧血リスクが高い症例では使用困難であるが、治療開始前のヘモグロビン値、クレアチニンクリアランス、ITPA 遺伝子、あるいは 2 剤併用療法開始後 2 週時点でのヘモグロビン値減少により、治療中の高度貧血が予測できる。これらの情報は薬剤選択の判断基準の一つとして活用できる。

#### E. 結論

Telaprevir 併用療法は今後の標準療法になると考えられる。貧血を予測することで Telaprevir 使用困難な症例を同定することは、安全性を担保するうえで重要である。Telaprevir 使用困難な症例に対して 2 剤併用で治療を行う際には、リバビリン量 3.5g/体重(kg)以上を確保するなど、個別化の治療戦略をたてることで、SVR の向上が目指せる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) **Kurosaki M**, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Yatsunashi H, Izumi N. Pretreatment prediction of response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C using data mining analysis. *J Gastroenterol* 2011; 46:401-409.
- (2) **Kurosaki M**, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N & Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol* 2011; 54:439-448.
- (3) **Kurosaki M**, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Tamori A, Nakagawa M, Izumi N. 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 Med Virol* 2011;83(3):445-52.
- (4) **Kurosaki M**, Tanaka Y, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Tamaki N, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Matsuura K, Sugauchi F, Enomoto N, Nishida N, Tokunaga K, Mizokami M & Izumi N. Relationship between polymorphisms of the ITPA gene and anemia

or outcome after treatment with pegylated-interferon and ribavirin. *Antiviral Therapy* 2011; 16(5): 685-694

- (5) Hiramatsu N, **Kurosaki M** (equal contribution), Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Sugauchi F, Tamori A, Kakinuma S, Matsuura K and Izumi N. Pretreatment Prediction of Anemia Progression by Pegylated interferon Alpha-2b Plus Ribavirin Combination Therapy in Chronic Hepatitis C Infection: Decision-Tree Analysis. *J Gastroenterol* 2011;46:1111-1119.
- (6) **Kurosaki M**, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Yatsuhashi H & Izumi N. Age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among early virological responders to peg-interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. *Antivir Ther* 2012;17(1):35-43.
- (7) **Kurosaki M** and Izumi N. Decision model incorporating IL28B genotype and ISDR could identify patients with high probability of SVR among patients who failed to achieve RVR. *J Hepatol* 2011 in press
- (8) Tanaka Y, **Kurosaki M**, (equal contribution), Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hum Mol Genet* 2011; 20(17): 3507-3516.

- (9) **Kurosaki M**, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Izumi N. Data mining model using simple and readily available factors could identify patients at high risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2012; 56(3): 602-608.

## 2. 学会発表

米国肝臓学会 2011 : Kurosaki, M et al .Prediction model of ribavirin-induced anemia incorporating ITPA genotype could identify chronic hepatitis C patients at high risk of relapse after early virological response to pegylated-interferon and ribavirin therapy

## 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 23 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

分担研究者：八橋 弘 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 治療研究部長  
研究協力者：橋元 悟 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 肝臓内科

分担研究課題：PEG-IFN/RBV 治療早期の血中 HCV-RNA 量の減衰の検討  
(IL28B 遺伝子多型と治療前血中 IP-10 値により 4 群に層別化して)

研究要旨：Genotype1型のC型慢性肝炎に対するPEG-IFN/RBV治療において、IL28B 遺伝子多型と治療前血中IP-10値により層別化して、治療初期のHCV-RNA減衰を検討した結果、IL28B遺伝子多型TTおよびIP-10低値において減衰が良好であった。2因子を組み合わせた4群での検討では、TTかつ低値例において第1相のHCV-RNA減衰が  $1.97 \pm 0.85$  (logIU/ml/day) と他の3群と比して有意に良好な減衰であった。HCV-RNA 累積陰性化率は、TTかつ低値例で高率であり、4週64%・8週96%・12週96%であった。同じIL28B遺伝子多型でもIP-10低値例ではHCV-RNA減衰が良好であり、IP-10 値はIL28B遺伝子多型とは独立したHCV-RNA減衰に関わる因子と考えられた。

## A. 研究目的

C型慢性肝炎におけるPEG-IFN/RBV併用療法において、IL28B 遺伝子多型はウイルス側や宿主側因子の中で著効を予測する最も有用な因子である。また、血中インターフェロン $\gamma$ 誘発蛋白10kDa(IP-10もしくはCXCL10)も、治療前値がウイルス学的反応性と相関するとされている。同時に、治療前IP-10値はGenotype1型におけるPEG-IFN/RBV治療の第1相(治療開始から24時間まで)のHCV-RNA減衰と逆相関するとされている。

そこで、IL28B 遺伝子多型と治療前血中IP-10値により4群に層別化して治療早期のHCV-RNA量の減衰を検討した。

## B. 研究方法

長崎医療センターで2007年3月～2010年8

月にGenotype1型のC型慢性肝炎に対してPEG-IFN $\alpha$ 2a/RBV併用療法を導入した82例を対象とし、治療早期のHCV-RNA減衰およびHCV-RNA累積陰性化率について検討した。

<定義>

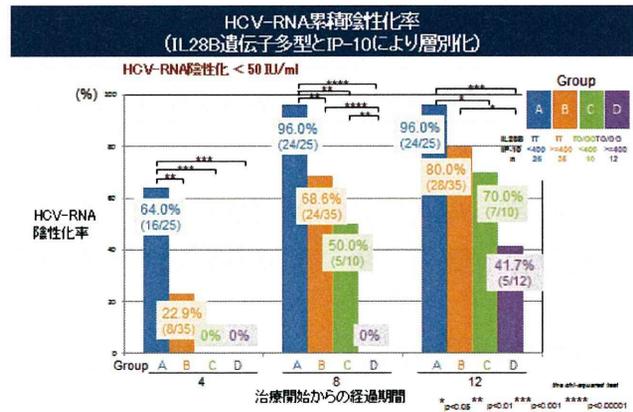
- ・IL28B 遺伝子多型はrs8099917を対象とし、TTをMajor・TG/GGをMinor genotypeとした。
- ・IP-10はELISA法で測定し、400pg/mlをカットオフ値とした。
- ・HCV-RNA陰性化判定は、50コピー/ml未満とした。
- ・IL28B 遺伝子多型と治療前血中IP-10値に基づき以下のように4群に層別化した。  
A群:IL28B TT and IP-10<400, n=25  
B群:IL28B TT and IP-10 $\geq$ 400, n=35  
C群:IL28B TG/GG and IP-10<400, n=10  
D群:IL28B TG/GG and IP-10 $\geq$ 400, n=12

(倫理面への配慮)

本研究は「臨床研究に関する倫理指針」(改訂版)を遵守し、当院倫理審査委員会の承認を受けて実施した。検体の採取および診療情報の利用に関しては、患者から書面にてインフォームド・コンセントを得た。検体の処理にあたっては、匿名化し、患者が特定できないようにした。

C. 研究結果

Genotype1 型の C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/RBV 治療での、治療早期の HCV-RNA 減衰は IL28B 遺伝子多型 TT・IP-10 低値例において有意に良好であった。第 1 相の HCV-RNA 減衰量(logIU/ml/day)は、A/B/C/D 群がそれぞれ  $1.97 \pm 0.85 / 1.12 \pm 0.71 / 0.55 \pm 0.44 / 0.36 \pm 0.31$  であり、A 群において他群と比して有意に減衰が良好であった。HCV-RNA 累積陰性化率(%)は、A/B/C/D 群がそれぞれ 4 週時 64.0/22.9/0/0、8 週時 96.0/68.6/50.0/0、12 週時 96.0/80.0/70.0/41.2 であった。



D. 考察

IL28B 遺伝子多型別に治療前血中 IP-10 値を検討すると、両群における IP-10 値の分布に明らかな差を認めなかった。したがって、治療早期の HCV-RNA 減衰に関して IP-10 値は、IL28B 遺伝子多型とは独立した規定因子であると考えられた。

E. 結論

C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/RBV 治療において、IL28B 遺伝子多型と治療前血中 IP-10 値は第 1 相の HCV-RNA 減衰と密接な関連が認められた。

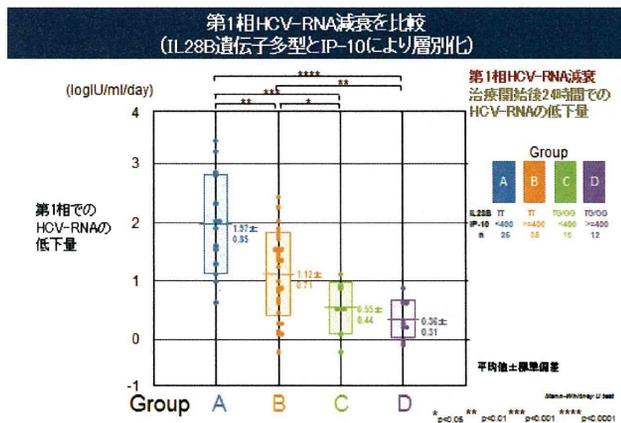
治療効果良好とされる IL28B 遺伝子多型 TT 症例でも、治療前 IP-10 が低値であれば、IFN 感受性がより良好であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

1) Hashimoto S., Yatsuhashi H., Fukuda M., Kugiyama Y., Fukushima M., Bekki S., S.K. Bae, Motoyoshi Y., Saeki A., Nagaoka S., Abiru S., Komori A., Ishibashi H. Pretreatment serum



IP-10 and IL28B single nucleotide polymorphism for the prediction of the first phase decline of HCV-RNA in patients with chronic hepatitis C (Poster presentation). AASLD 2011 San Francisco, USA, 2011. 11. 4-8

2) 橋元 悟, 八橋 弘, 福田実可, 戸次鎮宗, 佐々木龍, 斐 成寛, 本吉康英, 小澤栄介, 長岡進矢, 阿比留正剛, 小森敦正, 石橋大海: IL28B 遺伝子多型と血中 IP-10 値から見た治療初期の HCV-RNA 推移および治療効果に関する検討(ポスター発表). 第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011. 6. 2-3

3) 橋元 悟, 八橋 弘, 福田実可, 戸次鎮宗, 佐々木龍, 斐 成寛, 本吉康英, 小澤栄介, 長岡進矢, 阿比留正剛, 小森敦正, 石橋大海: IL28B 遺伝子多型と治療前血中 IP-10 値からみた治療効果予測(ワークショップ口演発表). 第 97 回日本消化器病学会九州支部例会, 久留米, 2011. 6. 24-25

## 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 23 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

研究協力者：松浦 健太郎 名古屋市立大学 大学院医学研究科 臨床研究医

分担研究課題：C型慢性肝疾患患者における、ペグインターフェロン・リバビリン  
併用療法の治療効果、貧血と宿主因子についての検討

研究要旨：ゲノムワイド関連解析により、ITPA 遺伝子多型がペグインターフェロン・リバビリン治療中の貧血に関連することが報告された。そこで、ペグインターフェロン・リバビリン療法中の貧血に寄与する要因について、また ITPA 遺伝子多型が治療効果に与える影響について検討した。リバビリンの減量を要する高度の貧血の発症には、ITPA 遺伝子多型、クレアチニンクリアランス、治療前の Hb 値が寄与していることが判明し、これらの要因を組み合わせることにより高度貧血の予測能が向上した。また、ITPA 遺伝子多型がリバビリンの投与量に影響し、治療効果にも寄与することが明らかとなった。

#### A. 研究目的

C型慢性肝疾患の治療はペグインターフェロン/リバビリン（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、特に高齢者では様々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。従って、治療前の効果、副作用予測が重要と考えられる。PEG-IFN/RBV治療における副作用として溶血性貧血が知られており、RBVのアドヒアランス、治療効果に影響することから、その発現予測は重要な課題である。2010年にFellayらにより PEG-IFN/RBV療法に伴う貧血に関連するITPA遺伝子のSNPが同定された。しか

しながら、従来、PEG-IFN/RBV療法における貧血に関しては、性別、年齢、腎機能なども関連することが報告されており、ITPA遺伝子多型を加えて解析した場合にどの要因が強く関連しているかは十分に明らかにされていない。また、ITPA遺伝子多型と治療効果の関連については、これまでの海外からの報告では、治療効果には影響しないとされているが、本邦からは影響するという報告もあり検証が必要である。そこで、PEG-IFN/RBV治療中の貧血に関わる要因、ITPA遺伝子多型と治療効果との関連について検討した。

#### B. 研究方法

全国多施設共同研究において、PEG-IFN/RBV療法を施行した genotype 1、高ウイルス量のC

型慢性肝疾患患者468例において、【検討1】治療開始4週で高度貧血(3g/dL以上のHb低下,あるいはHb<10g/dL)に至る頻度,要因【検討2】ITPA遺伝子多型と治療効果との関連について検討した。

のIL28B遺伝子多型(rs8099917)、ITPA 遺伝子多型(rs1127354)は TaqMan 法により解析した。

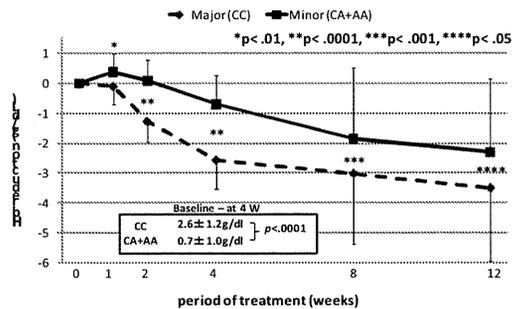
(倫理面への配慮)

ヒト遺伝子解析を含めた本研究の目的・方法、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うえで臨床試験を遂行した。ヒト由来試料の解析にあたり、新規試料については必ずインフォームドコンセントを取得し、既存試料についてはインフォームドコンセントの取得されたもののみを取り扱い、解析データの公表に際しては個人情報保護を徹底した。本研究は名古屋市立大学大学院医学研究科ヒト遺伝子解析倫理委員会の承認を得ており(平成19年3月30日)、他施設の研究協力者は各所属機関の倫理委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

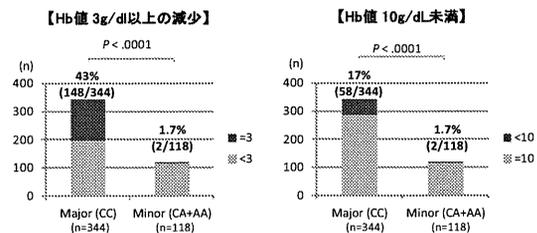
#### 【検討1】治療開始4週で高度貧血に至る頻度,要因についての検討

全症例におけるrs1127354がヘテロ/マイナーホモ接合体(CA/AA)の頻度は29%であった。全治療期間においてメジャーホモ接合体;CCでHb値が低く、Hbの減少値の差は治療開始4週で顕著であった(CC;-2.6±1.2g/dl, CA+AA;-0.7±1.0g/dl, p<.0001)(図1)。



(図1) ITPA遺伝子多型と治療中のHb減少値の推移

治療開始4週でHbが3g/dL以上減少した例はrs1127354: CCで43%(148/344), CA/AAで1.7%(2/118)であった(p<0.0001)。一方、Hb<10g/dlとなった例はCCで17%(58/344)、CA/AAでは1.7%(2/118)であり(p<0.0001)、CA/AA群では4週の時点で高度貧血に至る割合は極めて低いことが示された(図2)。



(図2) 治療開始4週での高度貧血の有無

さらに治療開始4週までにRBVの減量基準であるHb<10g/dLとなる治療前要因(年齢、性別、体重、血小板値、Hb値、クレアチンクリアランス(CLcr)、rs1127354遺伝子多型)について多変量解析を行うとHb値、rs1127354遺伝子多型、CLcrが有意な因子であった(表1)。

(表1) 治療開始4週でHb<10g/dLとなる治療前要因

	Hb < 10g/dL (n=59)	Hb = 10g/dL (n=403)	単変量解析 P value	多変量解析 P value
Gender: M / F	14 / 45	218 / 185	<.0001	0.24
Age (years)	59.9 ± 7.6	56.7 ± 10.1	0.019	0.084
BW (kg)	54.8 ± 9.0	61.5 ± 10.8	<.0001	0.38
Cre (mg/dL)	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.47	
Creatinine clearance (ml/min)	80.4 ± 22.1	96.1 ± 25.7	<.0001	0.002
Hb (g/dL)	13.0 ± 1.4	14.3 ± 1.3	<.0001	<.0001
Platelet (x10 <sup>4</sup> /μl)	14.8 ± 6.4	15.9 ± 6.3	0.12	
ALT (IU/L)	63.3 ± 52.8	81.0 ± 69.6	0.06	
ITPA: rs1127354 CC / CA+AA	57 / 2	287 / 116	<.0001	0.0004

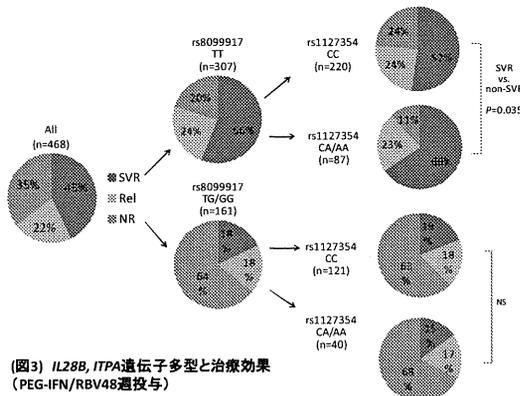
#### 【検討2】ITPA 遺伝子多型と治療効果との関連についての検討

genotype 1、高ウイルス量の PEG-IFN/RBV48 週投与 468 例において、ITPA 遺伝子多型と治療効果について検討した。まず、SVR に寄与する治療前要因について多変量解析をおこなったところ、血小板値、HCV-RNA 値、ISDR 変異数、肝線維化、IL28B 遺伝子多型が有意な要因であり、ITPA 遺伝子多型は治療効果に有意には関連していなかった(表 2)。

(表 2) PEG-IFN/RBV48 週投与例の SVR に寄与する治療前要因 (多変量解析)

	OR	Multivariable analysis (95%CI)	P value
Age, years	0.996	0.953–1.041	0.8670
Gender, male	1.271	0.499–3.241	0.6153
Hb, g/dl	1.196	0.833–1.717	0.3316
Platelet count, $\times 10^4/\mu\text{l}$	1.192	1.090–1.304	0.0001
ALT, IU/l	1.006	1.000–1.012	0.0570
HCV-RNA, log IU/ml	0.171	0.069–0.424	0.0001
Core 70, wild	0.833	0.365–1.902	0.6648
ISDR, =2	5.192	1.324–20.361	0.0181
Fibrosis, F0-2	2.739	1.058–7.091	0.0378
rs8099917, TT	17.334	6.037–49.772	<0.0001
rs1127354, CA/AA	1.222	0.525–2.842	0.6418

治療効果には IL28B 遺伝子多型が極めて強く関連するため、IL28B 遺伝子多型別に ITPA 遺伝子多型と治療効果について検討したところ、治療抵抗性の rs8099917: TG/GG 群においては、ITPA 遺伝子多型に関わらず治療効果は極めて不良であった。一方、rs8099917: TT 群では貧血になりにくい rs1127354: CA/AA 群において CC 群と比べ SVR 率が高い傾向にあった ( $p=0.035$ ) (図 3)。



(図 3) IL28B, ITPA 遺伝子多型と治療効果 (PEG-IFN/RBV48 週投与)

そこで、全治療期間における RBV の総投与量を検討したところ、rs1127354: CA/AA 群では CC 群に比べ多く、これにより再燃率が低下し、SVR 率の

向上につながるものと考えられた。

## D. 考察

PEG-IFN/RBV 療法患者における高度貧血の発症には、ITPA 遺伝子多型が強く寄与していることが判明した。また、CLcr も貧血に関わる有意な因子であり、これらの因子を参考に治療早期の貧血を予測することで適切な RBV 投与量の設定、治療中止の回避が可能となると考えられる。また、ITPA 遺伝子多型は

RBV アドヒアランスに影響し、治療効果にも寄与している結果が得られた。したがって、ITPA 遺伝子多型などの要因から、貧血のハイリスクと考えられる群においては、RBV の減量を余儀なくされる頻度が高く、治療期間を延長することにより治療効果の向上にもつながるものと考えられる。

## E. 結論

ITPA 遺伝子多型は PEG-IFN/RBV 療法による貧血の予測因子として重要である。また、RBV 投与量に影響し、治療効果にも関連することが示された。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, **Matsuura K**, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki

- N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol.* 2011;54(3):439-48.
2. Sugauchi F, Tanaka Y, Kusumoto S, **Matsuura K**, Sugiyama M, Kurbanov F, Ueda R, Mizokami M. Virological and clinical characteristics on reactivation of occult hepatitis B in patients with hematological malignancy. *J Med Virol.* 2011;83(3):412-8.
  3. Kurosaki M, Tanaka Y, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Tamaki N, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, **Matsuura K**, Sugauchi F, Enomoto N, Nishida N, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N. Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphatase gene and anaemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin. *Antivir Ther.* 2011;16(5):685-94.
  4. Hiramatsu N, Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Sugauchi F, Tamori A, Kakinuma S, **Matsuura K**, Izumi N. Pretreatment prediction of anemia progression by pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C infection: decision-tree analysis. *J Gastroenterol.* 2011 ;46(9):1111-9.
  5. Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, **Matsuura K**, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsushashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hum Mol Genet.* 2011;20(17):3507-16.
  6. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, **Matsuura K**, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Izumi N. Data mining model using simple and readily available factors could identify patients at high risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2012; 56(3): 602-608.
  7. 中村恵利那、角田浩一、**松浦健太郎**、菅内文中、新海登、田中靖人. HBs 抗原定量値の臨床的有用性の検討. *臨床病理.* 2011;59(9): 838-843.
2. 学会発表
    1. **Matsuura K**, Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Izumi N, Tamori A, Abe K, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Tsubouchi H, Tokunaga K, Mizokami M. Genetic Polymorphism in *IL28B* gene associated with clinical course of hepatitis C virus infection in Japanese population. 21th

Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Feb. 19, 2011. Bangkok, Thailand.

2. **松浦健太郎**、田中靖人、飯尾悦子、日下部篤宣、新海登、宮木知克、野尻俊輔、城卓志、溝上雅史. C型慢性肝疾患に対するペグインターフェロン・リバビリン療法とITPA遺伝子の検討. 第47回日本肝臓学会総会. 平成23年6月2日. 東京
3. **松浦健太郎**、田中靖人、溝上雅史. IL28B・ITPA遺伝子検査に基づいたペグインターフェロン・リバビリン治療効果予測. 第15回日本肝臓学会大会. 平成23年10月21日. 福岡.
4. **Matsuura K**, Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Watanabe T, Sugauchi F, Kurosaki M, Izumi N, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsushashi H, Nishiguchi S, Hino K, Kaneko K, Nojiri S, Joh T, Tokunaga K, Mizokami M. *IL28B and ITPA* gene variants correlate with treatment efficacy in pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Nov. 4-8, 2011, San Francisco, USA.
5. **松浦健太郎**、田中靖人、溝上雅史. IL28B・ITPA遺伝子検査に基づいた個別化治療の展望. 第39回日本肝臓学会西部会. 2011年12月9日. 岡山.
6. 渡邊綱正、**松浦健太郎**、新海登、飯尾悦子、日下部篤宣、菅内文中、徳永勝士、溝上雅史、田中靖人. 香港におけるHBVキャリア成立とHLA-DP領域SNPsの関連性. 第19回 日本消化

器関連学会週間（肝臓学会）. 平成23年10月20日. 福岡.

7. Sugauchi F, Tanaka Y, **Matsuura K**, Watanabe T, Tajiri K, Kishi H, Mizokami M. Cross-genotype protection of HBV and a role of HBs antigen mutation in immunity escape in vitro and in vivo model using uPA/SCID mice with human hepatocytes. American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Nov. 4-8, 2011, San Francisco, USA.

## 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

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 23 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

分担研究者：渡辺 久剛 山形大学医学部消化器内科学 講師  
研究協力者：石井 里佳 山形大学医学部消化器内科学 特任助教  
研究協力者：邵 力 山形大学大学院医学研究科公衆衛生学 助教

分担研究課題：肝炎コホートにおける自然治癒・肝発癌関連因子の解析

研究要旨：C 型肝炎高浸淫地域の一般住民コホートにおけるウイルス自然治癒・肝発癌関連因子としての IL28B 遺伝子多型の意義を検討するため、今年度は HCV 抗体陽性者 1,078 名の HCV 自然治癒と肝発癌予後を調査した。IL28B 近傍 SNP と HCV 自然治癒との関係を検討したところ、ヘテロ/マイナー群に比べ、メジャーホモ群において有意にその頻度が高かった。さらに HCV 自然治癒に関連する因子を Cox 比例ハザードモデルにより解析したところ、IL28B 遺伝子多型が最も重要なリスク要因であった。本コホートにおける発癌リスクは男性、ALT 値 31 単位以上、genotype 1b、BMI 23 以上、HCV RNA 陽性、腹部超音波検査所見であったが、今年度の発癌調査を加味して IL28B 遺伝子多型とそのリスクとの関連を解析すると、肝発癌例と非発癌例においてその頻度に差が見られた。住民ベースの HCV 抗体陽性者における肝炎コホート研究から、IL28B 遺伝子多型が HCV 感染者の自然予後を規定する重要な宿主因子としてその役割を果たしている可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

ペグインターフェロン・リバビリン併用療法の治療効果や副作用を事前予測することは肝炎治療の個別化に重要であり、そのためにはまず抗ウイルス治療適応例の選択や肝発癌に関わる因子について、HCV 持続感染者の自然経過とその背景を明らかにすることが必要である。

病院コホートにおいては、宿主因子 IL28B 遺伝子多型が、ペグインターフェロン、リバビリン併用治療効果に影響するのみならず、HCV 自然治癒に関連することが示されており（Thomas et al;

Nature 2009, Rauch et al; Gastroenterology 2010）、さらに HCV 感染に伴う肝発癌と複数の宿主因子との関連が報告されているが（Kumar et al: Nat genet 2011, Miki et al; Nat Genet 2011）、IL28B 遺伝子多型と肝発癌との関連ははまだ結論に至っていない。そこで平成 23 年度分担研究では、住民ベースの肝炎コホートにおける HCV 抗体陽性者 1,078 名全員を対象に HCV 感染予後調査を行い、HCV 自然治癒および肝発癌に関わる宿主因子 IL28B 遺伝子多型の意義を検討した。

## B. 研究方法

C型肝炎高浸淫地域住民7,925名を対象にHCV抗体検査を行ったところ、HCV抗体陽性者は1,078名（HCV抗体陽性率13%）であった。これら全員に対し、自記式質問票による感染要因調査、身長、体重、BMI、血液生化学検査、HCV抗体、HCV genotype、HCV RNA、HBs抗原、HBs抗体、HBc抗体、専門医による腹部超音波を用いた肝がん検診のほか、IL28B近傍SNP（rs8099917）を測定した。

これら1,078名のうち、HBs抗原陽性例やインターフェロン治療例、30歳未満の若年者および80歳以上の高齢者を除いた913名について自然治癒関連因子を解析した。またHCV抗体陽性全例の肝発癌調査をもとに、発癌関連因子をCox比例ハザードモデルにより分析した。

## C. 研究結果

本コホートにおけるHCV抗体陽性例1,078名のIL28B近傍SNPの頻度は、メジャーホモタイプ（T/T）が877例（81.4%）、ヘテロタイプ（T/G）が183例（17.0%）、マイナーホモタイプ（G/G）が18例（1.6%）であった。

30歳以上80歳未満を対象に、メジャーホモ群とヘテロ/マイナー群における背景の比較を行ってみると、メジャーホモ群ではヘテロ/マイナー群に比べ、AST値、ALT値、 $\gamma$ -GTP値、ZTT値が低く、腹部エコーによる慢性肝炎所見の頻度も低い傾向にあった。IL28B近傍SNPとHCV自然治癒との関係を検討したところ、メジャーホモ群（730名）におけるHCV自然治癒率は375名（51.4%）であり、ヘテロ/マイナー群（167名）の49名（29.3%）に比べ、有意にメジャーホモの頻度が高かった（ $p < 0.01$ ）。さらにHCV自然治癒に関連する因子をCox比例ハザードモデルに

より解析したところ、IL28B遺伝子多型が最も重要な因子であった（ハザード比10.83, 95%CI: 2.64–44.4,  $p < 0.01$ ）。

次に本コホートにおける累積肝発癌率をKaplan-Meier法で検討すると、男性、ALT値31単位以上、genotype 1b、BMI 23以上の場合において有意に肝発癌率が高かった。肝発癌例78例と非発癌例827例を比較すると、肝機能異常例、HCV RNA持続陽性例、超音波検査で慢性肝疾患所見を有する例に多く肝発癌が見られた。さらに今年度の肝発癌調査を加味し、IL28B遺伝子多型と肝発癌リスクとの関連をみると、肝発癌例におけるIL28B SNPはヘテロ/マイナーの頻度が27%を占める一方、非発癌例では17%とその頻度に差を認めた。

## D. 考察

30歳以上80歳未満のインターフェロン治療歴のない住民ベースの肝炎コホートにおいて、HCV抗体陽性者1,078名全員を対象に、今年度のHCV感染予後調査からHCV自然治癒および肝発癌に関わる宿主因子IL28B遺伝子多型の意義を検討した。

HCV抗体陽性例全例における解析から、IL28B遺伝子多型はHCV自然治癒に関わる最も強い関連因子であることが確認された。また、対象となるHCV抗体陽性例全例の予後調査を加味し、本コホートからの肝発癌例について検討すると、IL28Bヘテロ/マイナー群の頻度が肝発癌例において高い結果であった。HCV感染に伴う肝発癌とIL28B遺伝子多型との関連はいまだ結論に至っていないが、これらヘテロ/マイナー群においては自然経過あるいは抗ウイルス治療によるHCV排除が得られにくいことが発癌と関連して