

た NS5A 阻害剤とプロテアーゼ阻害剤併用24週間投与の治療効果も高く、今後多数例での検討が必要である。またB型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤の長期投与では、多剤耐性ウイルスが出現する症例があり、新規治療薬の効果が期待される。

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. Arase Y, Suzuki F, Kawamura Y, Suzuki Y, Kobayashi M, Matsumoto N, Akuta N, Sezaki H, Hosaka T, Ogawa K, Imai N, Seko Y, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Development rate of chronic kidney disease in hepatitis C virus patients with advanced fibrosis after interferon therapy. *Hepatology Res.* 41:946-954,2011.
2. Imai N, Ikeda K, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H. Previous chemoembolization response after transcatheter arterial chemoembolization (TACE) can predict the anti-tumor effect of subsequent TACE with miriplatin in patients with recurrent hepatocellular carcinoma. *Oncology.* 80:188-194,2011.
3. Chayama K, Hayes CN, Abe H, Miki D, Ochi H, Karino Y, Toyota J, Nakamura Y, Kamatani N, Sezaki H, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H. IL28B But Not ITPA Polymorphism Is Predictive of Response to Pegylated Interferon, Ribavirin, and Telaprevir Triple Therapy in Patients With Genotype 1 Hepatitis C. *J Infect Dis.* 204:84-93,2011.
4. Arase Y, Suzuki F, Kobayashi M, Suzuki Y, Kawamura Y, Matsumoto N, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Ohmoto Y, Amakawa K, Tsuji H, Hsieh SD, Kato K, Tanabe M, Ogawa K, Hara S, Kobayashi T. The Development of Chronic Kidney Disease in Japanese Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Intern Med.* 50:1081-1087,2011.
5. Azakami T, Hayes CN, Sezaki H, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, Abe H, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Ochi H, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Common genetic polymorphism of ITPA gene affects ribavirin-induced anemia and effect of peg-interferon plus ribavirin therapy. *J Med Virol.* 83:1048-1057,2011.
6. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in hepatitis C virus core region predict hepatocarcinogenesis following eradication of HCV RNA by antiviral therapy. *J Med Virol.* 83:1016-1022,2011.
7. Ikeda K, Kobayashi M, Kawamura Y, Imai N, Seko Y, Hirakawa M, Hosaka T, Sezaki H, Akuta N, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H. Stage progression of small hepatocellular carcinoma after radical therapy: comparisons of radiofrequency ablation and surgery using the Markov model. *Liver Int.* 31:692-699,2011.
8. Arase Y, Suzuki F, Kobayashi M, Suzuki Y, Kawamura Y, Matsumoto N, Akuta N, Imai N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Ohmoto Y, Amakawa K,

- Tsuji H, Hsieh SD, Kobayashi T. Efficacy and safety in sitagliptin therapy for diabetes complicated by chronic liver disease caused by hepatitis C virus. *Hepatol Res.* 41:524-529,2011.
9. Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Chayama K, Kamatani N, Nakamura Y, Miyakawa Y, Kumada H. Influence of *ITPA* Polymorphism on Decreases of Hemoglobin during Treatment with Pegylated IFN, Ribavirin and Telaprevir. *Hepatology.* 53;415-421,2011.
 10. Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy. *Gut.* 60:261-267,2011.
 11. Tadokoro K, Suzuki F, Kobayashi M, Yamaguchi T, Nagano M, Egashira T, Kumada H. Rapid detection of drug-resistant mutations in hepatitis B virus by the PCR-Invader assay. *J Virol Methods.* 171:67-73,2011.
 12. 鈴木義之、瀬崎ひとみ、芥田憲夫、鈴木文孝、今井則博、平川美晴、川村祐介、保坂哲也、小林正宏、斎藤聡、荒瀬康司、池田健次、小林万利子、熊田博光。NS5A 阻害剤と NS3 プロテアーゼ阻害剤併用投与における早期抗ウイルス効果。肝臓 2011 ; 67 : 147-149.
 13. 保坂哲也、鈴木文孝、小林正宏、瀬古裕也、今井則博、平川美晴、川村祐介、瀬崎ひとみ、芥田憲夫、鈴木義之、斎藤聡、荒瀬康司、池田健次、小林万利子、熊田博光。B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ療法による HBs 抗原消失とその関連因子の検討。肝臓 2011 ; 52(4) : 255-257.
 14. 小林万利子、鈴木文孝、鈴木義之、芥田憲夫、瀬崎ひとみ、川村祐介、瀬古裕也、保坂哲也、小林正宏、斎藤聡、荒瀬康司、池田健次、熊田博光。コバス TaqManHBV「オート」v2.0 における同一時の血清検体と血漿検体の HBVDNA 検出率の検討。肝臓 2011 ; 52(11) : 756-757.
- ## 2.学会発表
1. 鈴木文孝、池田健次、熊田博光。ワークショップ 6: B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ製剤投与により出現する多剤耐性ウイルスの遺伝子学的検討、第 47 回日本肝臓学会総会、東京、2011.6.2.
 2. 鈴木文孝、瀬崎ひとみ、熊田博光。シンポジウム 10: C 型肝炎に対する新規薬剤（プロテアーゼ阻害剤、NS5A 阻害剤）の治療効果、第 15 回日本肝臓学会大会、福岡、2011.10.21.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
今回の研究内容については特になし。

ウイルス性肝炎の病態に応じたウイルス側因子の解明と治療応用：
C型慢性肝炎の治療抵抗性および肝発癌におけるインターロイキン6(IL-6)の関与

分担研究者 中川 美奈 東京医科歯科大学・消化器内科・助教

研究要旨：本研究は、C型慢性肝炎の治療抵抗性との関与が十分明らかにされていないインターロイキン6(IL-6)の治療抵抗機序の解明を目指し、これまでに以下の結果を得ている。1) 臨床的に治療抵抗性であることが報告されているHCVコア70/91変異株を用いた培養細胞系の検討では、生体同様インターフェロン(IFN)低感受性であり、IL-6上昇、ウイルス粒子形成および分泌低下を認め、小胞体(ER)ストレス蛋白の発現誘導がみられた。2) JFH1細胞培養系を用いた検討でも、IFN低感受性株ではIL-6、SOCS(suppressor of cytokine signaling)3の発現亢進、IFN刺激因子(ISG)抑制がみられ、IL-6抗体処理によりIFN抵抗性が解除された。3) 臨床検体を用いた統計学的解析でも、男性において、治療が効いた群では速やかにIL-6は低下し、低値のまま推移するのに対して、治療抵抗群ではIL-6は持続高値のまま経過した。4) C型慢性肝炎を含めた慢性肝疾患における発癌および肝線維化と血清IL-6値は有意に相関した。以上より多機能サイトカインであるIL-6はERストレスと密接に関与し、治療抵抗性に加え、肝線維化および肝発癌への関与も示唆された。

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対する現在もつとも有効な治療法であるテラプレビルを用いた3剤併用療法でも、PEGインターフェロン(IFN)・リバビリン(RBV)2剤療法で無効であった症例では著効(SVR)が得られる率は30-40%と予想されており、いまだ十分な治療効果とはいえない。このような状況の中で、IFN治療抵抗性に関わる分子の特定は、治療効果の事前予測に利用できる可能性があると同時に、現行の治療では治癒が期待できない難治症例に対する新規薬剤の開発につながる可能性がある。

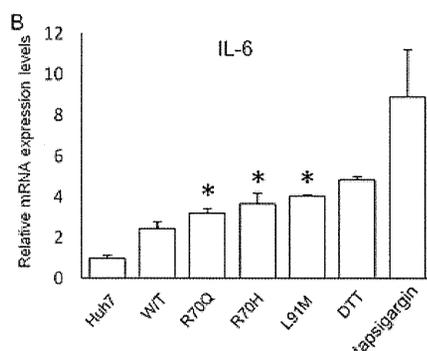
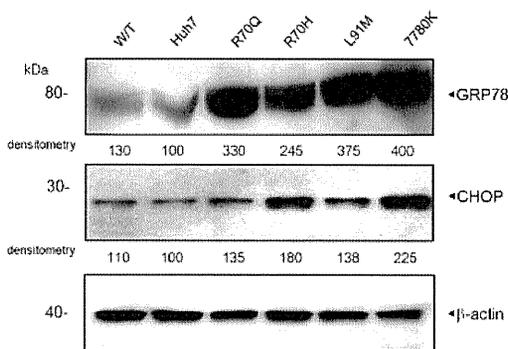
B. 研究方法

- (1) HCV株培養系を用いたウイルス感染・増殖能・インターフェロン感受性の解析
- (2) 小胞体(ER)ストレスからみた治療抵抗機序との関与
- (3) 臨床検体を用いたIL-6および関連遺伝子と治療抵抗性および肝線維化・発癌との関与についての解析

なお本研究は東京医科歯科大学組み換えDNA実験安全管理規定に準拠して行われる。また、ヒトの細胞および組織を用いた研究にあたっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」に準じて当該施設倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得た上で、人権及び利益の確保を行うよう配慮する。

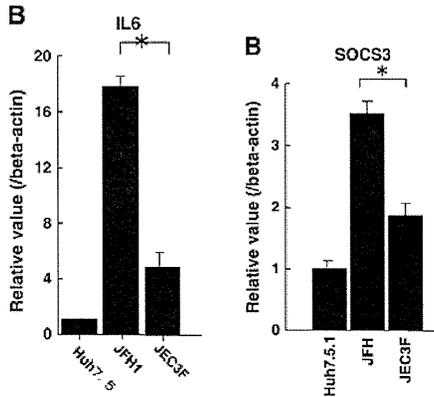
C. 研究結果

1) 臨床的に治療抵抗型であるHCVコア蛋白変異株ではウイルス複製は保たれているものの、粒子形成および分泌低下を認め、小胞体ストレス蛋白の発現誘導、IL-6上昇をみた。さらに、コア変異株ではIFNシグナル系の抑制因子であるSOCS3の発現亢進およびIFN誘導遺伝子(ISG)発現低下をみた(*J Virology* 2011; 85: 5986)。

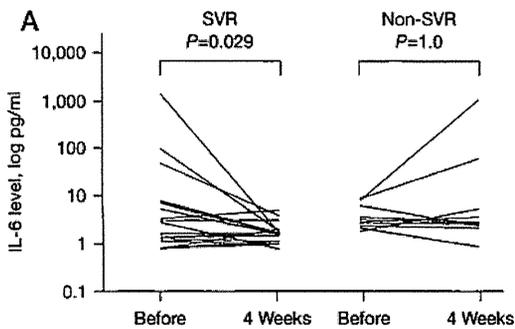


C. 研究結果 (つづき)

2) FN治療抵抗株であるJFH株ではIL-6およびその下流のSOCS3発現が亢進し、ISG抑制をみた (*Virology*. 2010; 407: 80)。



3) 臨床検体でも男性においては治療抵抗症例でIL-6持続高値であることが確認された (*Antiviral Therapy* 2011; 16: 1081-1091)。



4) C型慢性肝炎を含む慢性肝疾患391例でIL-6値と硬変肝および肝発癌の有無を検討すると、肝硬変および肝細胞癌では有意にIL-6高値であった。

D. 考察

本研究の結果から、治療抵抗株ではウイルス複製以降の粒子形成や分泌の機能が障害されているために、細胞内のHCV蛋白が蓄積し、ERストレスが惹起されていることが示唆される。また、ERストレスに関連する何らかのシグナルを介して持続高値となったIL-6によりIFNシグナル系やインスリンシグナル系の抑制因子であるSOCS3の発現亢進がもたらされ、IFN応答性の低下、インスリン抵抗性をはじめとした各種代謝異常がもたらされるものと推測される。発癌への関与の検討では、肝線維化進展を介して発癌に関与している可能性もあるが、非肝硬変症例に限定しても発癌症例でIL-6高値だったことから、IL-6が直接肝発癌にも関与している可能性が示唆され、引き続き検討が必要と考えられる。

1. Ueyama M, Nakagawa M (equal contribution), Sakamoto N, Watanabe M: Serum interleukin-6 levels can predict resistance to treatment of chronic hepatitis C infection with pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin. *Antiviral Therapy* 2011; 16: 1089-1091. 査読有
2. Sakamoto N, Nakagawa M (equal contribution), Watanabe M: Association of IL28B polymorphism with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy in patients with chronic genotype 2 hepatitis C. *J Medical Virol* 2011; 83:871-878. 査読有
3. Funaoka Y, Sakamoto N (equal contribution), Nakagawa M, Watanabe M: Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. *J Virol*. 2011; 85: 5986-94. 査読あり
4. Kurosaki M, Sakamoto N, Nakagawa M, Watanabe M: Pretreatment Prediction of Response to Pegylated-Interferon Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C using Genetic Polymorphism in IL28B and Viral Factors. *J Hepatol* 2011; 54:439-48. 査読有
5. Watanabe T, Sakamoto N (equal contribution), Nakagawa M, Watanabe M: Inhibitory effect of triterpenoid compound with or without interferon-alpha on Hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agent Chemother* 2011; 55: 2537-45. 査読有
6. Onozuka I, Sakamoto N, Nakagawa M, Watanabe M: Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 406: 134-140 査読有
7. Karakama Y, Sakamoto N (equal contribution), Nakagawa M, Watanabe M: Inhibition of HCV replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; 54; 3179-3186. 査読有
8. Nakagawa M, Sakamoto N (equal contribution), Watanabe M: 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 Gastroenterology* 2010; 45:656-65. 査読有

9. Suda G, Sakamoto N (equal contribution), Nakagawa M, Chayama K, Watanabe M: IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. *Virology* 2010; 407: 80-90. 査読有
10. Sakamoto N, Tanaka Y, Nakagawa M, Watanabe M; ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon-a and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatology Res* 2010; 40: 1063-1071. 査読有
11. Machi Yamamoto, Naoya Sakamoto, Tetsuya Nakamura, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Yuki Nishimura-Sakurai, Sei Kakinuma, Seishin Azuma, Takanobu Kato, Takaji Wakita and Mamoru Watanabe: Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatology Research* 2011;41:258-69.
12. Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Tamori A, Mina Nakagawa, 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 Mar;83:445-52.

2. 学会発表

1. 第15回肝臓学会大会 シンポジウム「C型慢性肝炎のインターフェロン治療抵抗性機序における IL-6の関与」
2. 第47回肝臓学会総会 パネルディスカッション「高齢化社会のC型慢性肝炎対策における宿主・ウイルス遺伝子情報に基づく個別化治療の重要性」

3. 第14回肝臓学会大会 パネルディスカッション A455 「C型慢性肝炎患者におけるインターフェロン治療効果におけるインターロイキン-6 (IL-6) の関与」

4. 第14回肝臓学会大会 ポスター発表 「C型慢性肝炎のインターフェロン治療効果とIL28B遺伝子多型の解析」

5. 第46回肝臓学会総会 シンポジウム 「ウイルス遺伝子および宿主IL28B遺伝子情報を統合したC型慢性肝炎治療のオーダーメイド化」

6. 第46回肝臓学会総会 口演発表 「C型慢性肝炎のインターフェロン治療効果とIL28B遺伝子多型の解析」

7. 第38回東部会 パネルディスカッション 「ウイルスおよび宿主遺伝子情報に基づくC型慢性肝炎の治療戦略」

8. 第38回肝臓学会東部会 シンポジウム 「IL28B遺伝子多型と治療抵抗性ウイルス変異からみたC型慢性肝炎の治療抵抗メカニズムの解析」

9. 第7回シングルトピックカンファレンス ポスター発表「IL-28B SNPs and HCV genetic profiles are significant predictors of PEG-interferon plus ribavirin treatment outcomes」

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特記すべきことなし

治療抵抗性 HCV 感染のウイルス遺伝子変異測定法の開発と応用

分担研究者 加藤 直也 東京大学医科学研究所疾患制御ゲノム医学ユニット

特任准教授

研究要旨

1) ペグインターフェロン、リバビリン併用療法（PEG-IFN/RBV）を行った C 型慢性肝炎患者でのコア蛋白第 70 番目アミノ酸の野生型/変異型 C 型肝炎ウイルス（HCV）の個別定量の結果、null virological responder の予測には、ダイレクトシーケンスよりも変異型 HCV 比が有用であった。2) PEG-IFN/RBV 再燃例の変異型 HCV dynamics の解析から、変異型 HCV は、Bcl-xL の発現誘導により排除されにくい性質を有している可能性が示唆された。3) 宿主因子と肝発癌について検討した。PEG-IFN/RBV 感受性の IL28B メジャー型は、マイナー型に比し、より炎症が強く、より線維化が進んでいるが、発癌時年齢が高いことが明らかになった。また、ゲノムワイド関連解析により、C 型肝炎患者における肝癌感受性遺伝子多型として MICA 遺伝子多型を同定した。

A. 研究目的

1) C 型慢性肝炎の標準治療として、ペグインターフェロンとリバビリンの併用療法（PEG-IFN/RBV）が行われている。ジェノタイプ（セロタイプ）1 型高ウイルス量症例では、その奏功率はたかだか 50%に過ぎないが、治療抵抗性を規定するウイルス側因子として、C 型肝炎ウイルス（hepatitis C virus: HCV）コアタンパク第 70 番目アミノ酸の置換が重要であることが明らかになっている。すなわち、野生型アミノ酸（Arg）を有する患者では、変異型アミノ酸（Gln）を有する患者より SVR（sustained virological response）率が高い。そこで、Taqman MGB（minor groove binding）probe を応用した real-time PCR 法により、コアタンパク第 70

番目アミノ酸野生型および変異型の混在比を調べ、治療効果との関連を検討する。

2) PEG-IFN/RBV 再燃例における野生型/変異型 C 型肝炎ウイルスの個別の動態を明らかにし、治療抵抗性の機序を検討する。

3) 肝発癌に関連する宿主側因子の検討を行う。

B. 研究方法

1) HCV コアタンパク第 70 番目アミノ酸の Arg→Gln 変異を高感度に検出・定量する Taqman MGB probe を用いた real time PCR 法により、PEG-IFN/RBV を受ける C 型慢性肝炎患者における野生型および変異型の存在状態を明らかにし、治療効果との関連につき検討する。

2) 野生型と変異型の両者を有する

PEG-IFN/RBV を受けた C 型慢性肝炎患者再燃例で野生型および変異型の個別の動態につき解析し、治療抵抗性の機序を検討する。加えて、野生型と変異型のコアタンパクを肝癌細胞株に発現させ、アポトーシス関連分子に及ぼす影響を解析する。

3) C 型肝炎患者における IL28B 遺伝子 rs8099917 の遺伝子型を決定し、病態との関連を検討する。また、ゲノムワイド関連解析を行い、肝発癌と関連する遺伝子多型を同定する。

(倫理面への配慮)

C 型肝炎患者血清を用いた本解析については、東京大学の倫理委員会の承認を受けている。また、C 型肝炎患者からは書面による同意を得ている。検体は匿名化され、個人情報 は厳格に保護される。

C. 研究結果

1) Taqman MGB probe を用いた real time PCR 法による HCV コアタンパク第 70 番目アミノ酸野生型と変異型の個別高感度定量により、PEG-IFN/RBV を行った 36 例の C 型慢性肝炎患者において、野生型と変異型の存在比率を検討したところ、36 例中 26 例 (72%) が野生型と変異型の両者を有する混在型であった。変異型の比率が高くなるほど、EVR および SVR が得られにくかった。また、null virological responder (NVR) の予測には、ダイレクトシーケンスよりも変異型 HCV 比が有用であった。また、変異型 HCV 存在比率は IL28B マイナー型、血小板数低下と関連していた。

2) 野生型と変異型の両者を有する治療再燃例の解析で、治療前・治療中には野生型が優位であったにもかかわらず、再燃早期 (治療

終了後第 4 週前後) では、変異型 HCV が優位になっていることが認められ、変異型 HCV は、PEG-IFN/RBV の感受性は野生型と同等であるが、野生型より排除されにくい性質を有する可能性が示唆された。

そこで、野生型および変異型のコアタンパクを HepG2 細胞に発現させ、アポトーシスに及ぼす影響につき検討したところ、変異型 HCV は、Bcl-xL の発現を野生型より強く誘導し、排除されにくい性質を獲得している可能性が示された。

3) PEG-IFN/RBV 感受性の IL28B メジャー型は、マイナー型に比し、より炎症が強く、より線維化が進んでいるが、発癌時年齢が高いことが明らかになった。また、ゲノムワイド関連解析を行い、C 型肝炎患者における肝癌感受性遺伝子多型として MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) 遺伝子多型を同定した。G が発癌の protective allele であり、A が risk allele であったが、G allele を有する患者において、A allele を有する患者と比較し、有意に血中可溶性 MICA が上昇しており、MICA 発現が肝癌の発症を抑える可能性が示された。

D. 考察

多くの C 型慢性肝炎患者では、コアタンパク第 70 番目アミノ酸の野生型と変異型が混在しており、治療前の変異型の比率が高いほど、PEG-IFN/RBV 治療において NVR となる。NVR の予測には、現在主に行われているダイレクトシーケンス法より、変異型 HCV 比率が有用であり、変異型 HCV 定量法の臨床的意義が示された。

治療再燃例の解析から、変異型 HCV は、野生型に比し、排除されにくいと考えられた。

治療抵抗性の機序として、変異型は Bcl-xL の発現を野生型より強く誘導し、変異型 HCV 感染肝細胞がアポトーシスにより排除されにくい性質を獲得している可能性が示された。このメカニズムは同時に変異型コアタンパクが発癌にも関連しうることを示唆している。

また、ウイルス側因子のみならず、PEG-IFN/RBV 感受性を規定する IL28B の遺伝子多型が、発癌にも影響していることが明らかになった。その機序の解明が必要である。ゲノムワイド関連解析により、MICA 遺伝子が肝発癌に重要な役割を担っており、NK (natural killer) 細胞が肝発癌に重要なことが判明した。MICA の発現調整により、肝発癌を抑止しうる可能性が示され、肝発癌を抑止する薬剤開発への道を開いた。

E. 結論

コアタンパク野生型と変異型 HCV の PEG-IFN/RBV 治療抵抗性機序の一端が明らかになった。また、肝発癌と関連する宿主側遺伝子多型が同定された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Nakagawa H, Koike K, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2011; 43(5): 455-458.

2) 加藤直也, 室山良介, 古渡礼恵, 大塚基之, 建石良介, 吉田晴彦, 小池和彦, 小俣政男, 中村祐輔, 松田浩一. GWAS による C 型肝癌

感受性遺伝子の同定. *肝胆膵* 2011; 62 (5): 919-925.

3) 加藤直也. 座談会 肝発癌の分子機構. *The Liver Cancer Journal* 2011; 3: 15-25.

4) 加藤直也, 室山良介, 古渡礼恵, 後藤 覚, 李 雯雯, 中川 良, 大塚基之, 建石良介, 吉田晴彦, 小池和彦, 小俣政男, 中村祐輔, 松田浩一. C 型肝炎の GWAS 研究: MICA SNP. C 型肝炎のすべて 2012. C 型肝炎の GWAS 研究: MICA SNP. 2011; 62 (12): 1045-1051.

5) 加藤直也, 室山良介. 新規薬剤(新規プロテアーゼ阻害薬, IFN α など). C 型肝炎—最新治療コンセンサス. *医学のあゆみ* 2011; 239: 1175-1181.

2. 学会発表 (国際学会のみ)

1) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otuka M, Shiina S, Yoshida H, Koike K. IL28B ,minor allele is an independent risk factor for early-age onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* p.565A. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2011/11/4-8, San Francisco, CA • Moscone West

2) Li W, Muroyama R, Hu Z, Kowatari N, Goto T, Yoshida H, Li Q, Omata M, Koike K, Kato N. HCV core amino acid 70 mutant is resistant to PEG-IFN/RBV treatment and its ratio predicts treatment responses in HCV 1B patients. *Hepatology* p.1352A. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2011/11/4-8, San Francisco, CA • Moscone West

H. 知的財産権の出願・登録状況
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

HCV のインターフェロン・リバビリン抵抗性の分子機構に関する研究

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）がインターフェロン（IFN）やリバビリン（RBV）に抵抗性を示す分子機構を解明することを目的とした。従来のHCV研究に多用されてきたヒト肝癌細胞株HuH-7とは異なるヒト肝癌細胞株Li23を用いて開発した遺伝子型1bでHCV 0株由来の全長HCV RNA複製細胞（OL8、OL11およびOL14細胞）を用いて実験を行い、以下に示すような成果を得た。（1）Li23細胞株由来の全長HCV RNA複製細胞（樹立時と2年間継代培養）からIFN- α （50 IU/mL）に抵抗性を示す細胞を選別し、それらの細胞におけるHCVの遺伝子解析を行った。その結果、遺伝的系統樹上クラスターを形成し、かつ特定のアミノ酸置換を有するHCV RNA分子種に収束していることが分かった。（2）Li23細胞株由来の全長HCV RNA複製細胞（3年以上継代培養）からRBV（100 μ M以上）に抵抗性を示す複数の細胞株を樹立した。これらの細胞におけるHCVの遺伝子解析を行った。その結果、遺伝的系統樹上クラスターを形成し、IFN抵抗性細胞株を用いたこれまでの遺伝子解析からは得られたことのない特定のアミノ酸置換を有するHCV RNA分子種に収束していることが分かった。本研究で観察されたRBV抵抗性はRBVの主なトランスポーターであるENT1によるRBVの細胞内への取り込みが低下することによるものではないことを確認した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の感染は肝がん患者の8割に認められており、HCVの持続感染状態であるC型慢性肝炎は肝細胞のがん化の重要な因子である。肝発がんを予防するためには、HCVを体内から排除して持続感染状態を脱することが必須である。C型慢性肝炎に対する有効な治療薬はこれまでペグ-インターフェロン（IFN）とリバビリン（RBV）との併用療法が主流で治癒率も50%程度に留まっていた。最近、HCVプロテアーゼ阻害剤（テラプレビル）が認可され、IFNとRBVとの3剤併用によ

る治療が始まっており、治癒率も70%以上になるものと期待されている。しかしながら、貧血や重篤な薬疹などの副作用により治療中断を余儀なくされる患者も2剤併用療法に較べて2倍程度になり全体としては3割以上となるものと予想されている。また、65歳以上の高齢者では治療適応外の割合も多い。さらに、このような治療法に対しても抵抗性を示す患者も依然として多い。そして、IFNやRBVに対して抵抗性を示す分子機構についても、あまりよく分かっていない。そこで、本研究では、HCVがどのような分子機構に

より IFN や RBV に耐性を示すのかを明らかにすることを目的とした。

IFN については、これまで世界的に汎用されているヒト肝癌細胞株である HuH-7 由来で、我々が独自に開発した全長 HCV RNA 複製細胞（遺伝子型 1b の O 株）を用いて研究を行った。その結果、IFN- α に対して抵抗性を示す細胞内で複製している HCV 分子種は遺伝的に収束する傾向にあることや IFN- α 抵抗性の獲得には、HCV 側と宿主側因子の両方が関与していることを示唆する結果を得た。しかしながら、RBV については、HuH-7 由来の細胞は非感受性であることから、この細胞系は実験には不適であった。

一方、我々は従来の HCV 研究に多用されてきたヒト肝癌細胞株 HuH-7 とは遺伝子発現プロファイルも異なるヒト肝癌細胞株 Li23 を用いて遺伝子型 1b で O 株由来の全長 HCV RNA 複製細胞株 (OL8 や OL11 細胞など) を 2008-2009 年にかけて樹立した。抗 HCV 活性の簡便な定量的アッセイ系 (ORL8 と ORL11) も開発して、各種抗 HCV 剤の評価を行った。その中で、ORL8 や ORL11 アッセイ系では RBV に対して高感受性であることを見出した。ORL8 アッセイ系における 50% 阻害濃度は 8.7 μM となり RBV を投与された患者血中濃度 (約 10 μM) 付近の値が得られた。そこで、我々は ORL8 細胞などが、RBV の作用機序についての解析に適していると考え、実験を施行した。これまでに我々は RBV の抗 HCV 活性は RBV が IMPDH を阻害して細胞内の GTP レベルを急速に低下させることに起因していることを明らかにし、さらなる詳細な機構解析を行っている。

それと並行して、我々は IFN- α や RBV に高感受性を示す Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞からそれぞれの薬剤に抵抗性を示す細胞株を得ることができれば、これらの薬剤の耐性機構を解明できるのではないかと考え本研究を開始した。

昨年度は Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞から IFN に抵抗性を示す細胞を得たので、今年度は IFN 抵抗性細胞内で複製している HCV 遺伝子の解析を行った。RBV に関しては、昨年度 RBV に抵抗性を示す細胞コロニーが得られたので、それらの細胞コロニーから細胞株の樹立を試みた。

B. 研究方法

(1) Li23 由来で IFN に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製細胞における HCV の遺伝子解析

全長 HCV RNA 複製細胞 OL11 とそれから得られた IFN に抵抗性を示す細胞 (OL11r)、OL11 細胞を 2 年間継代培養した OL11(2Y) 細胞とそれから得られた IFN に抵抗性を示す細胞 (OL11(2Y)r) から Total RNA を調製した。得られた RNA を用いて、RT-PCR 法により HCV ゲノムの 5' 末端から NS2 領域までの 5.1 kb と NS3-NS5B 領域までの 6 kb を増幅した。cDNA の作成には Primscript (Takara) を用い、PCR には fidelity の高い KOD-plus DNA polymerase を用いた。増幅した 5.1 kb と 6 kb の DNA 断片を pBR322MS ベクターにクローニングして、それぞれ独立的に得られた 5 クローンの塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列を相互に比較し、GENETYX-MAC プログラムを用いた Neighbor-joining 法による系統樹解析を行った。

(2) Li23 由来で RBV に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製細胞株の樹立

全長 HCV RNA 複製細胞である OL8 細胞を 3.4 年間継代培養した細胞 (OL8(3.4Y))、同じく OL11 細胞を 3.4 年間継代培養した細胞 (OL11(3.4Y)) および OL14 細胞を 3.2

年間継代培養した細胞 (OL14(3.2Y)) を 1 週間ごとに継代する際に、終濃度が 100 μM になるようにして RBV を添加し培養を行った。このような操作を計 10 回行った。並行して RBV を添加しない細胞の継代も行った。

RBV 抵抗性と考えられた場合は、細胞株として増殖させ、改めて RBV を添加して 3 日後の HCV タンパク質 NS5B の量的変化を親株の細胞と Western blot 解析法により比較検討した。

RBV 抵抗性と考えられた細胞由来の HCV 遺伝子の解析も前項に記載した方法により行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのため倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究結果

(1) Li23 由来で IFN に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製細胞における HCV の遺伝子解析

細胞培養時に IFN- α (50 IU/ml) を 4 日ごとに添加し、26 日後に IFN- α 耐性となった細胞コロニーをプールして細胞株とした OL11r 細胞と OL11(2Y)r 細胞由来の HCV 遺伝子の解析を行い、親株の OL11 や OL11(2Y)細胞由来の HCV 遺伝子の塩基配列との比較を行った。それぞれ独立的に得た 5 クローンについて系統樹解析を行った。その結果、前半部 (5'-UTR から NS2 領域の 5.1 kb) と後半部 (NS3 から NS5B 領域の 6 kb) のどちらにおいても、IFN に抵抗性を示した細胞から得られた HCV

遺伝子は系統樹上クラスターを形成し、塩基配列上収束する傾向があった。特に、OL11(2Y)r 細胞から得られた HCV 遺伝子にはその傾向が強かった。また、HCV 遺伝子から推定されるアミノ酸の置換も随所に認められた。解析した 5 クローン中 4 クローン以上で共通して認められたアミノ酸置換 (親株の OL11 細胞や OL(2Y)細胞由来の HCV 分子種との比較による) は OL11r 細胞由来の HCV 分子種では Core, E1 および E2 領域にそれぞれ 1 カ所ずつと少なかったものの、OL11(2Y)r 細胞由来の HCV 分子種では、Core に 4 カ所、E1 に 2 カ所、E2 に 3 カ所、NS2 に 5 カ所、NS3 に 1 カ所、NS4B に 1 カ所、NS5A に 4 カ所、NS5B に 1 カ所と広範囲に及んでいた。このような結果からも、かなり均一化した HCV 分子種が IFN に抵抗性を示した細胞で複製していることが示唆された。

(2) Li23 由来で RBV に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製細胞株の樹立

昨年度、OL8(2Y)と OL11(2Y)細胞から RBV 100 μM の添加 (4 日置きに添加して 26 日間培養)に抵抗性を示す細胞コロニーを、それぞれ 1 個と 12 個得ていたので、それぞれを増殖させ、細胞株とした。OL8(2Y)細胞より得た細胞を OL8(2Y)-R1 と名付けた。OL11(2Y)細胞より得た細胞については、2 個細胞株として樹立できなかったため結果的には 10 細胞株の樹立となり OL11(2Y)-R1~R6、OL11(2Y)-R8、OL11(2Y)-R10~R12 と名付けた。

得られた細胞株の RBV 抵抗性を調べるために、再度、親株の OL8(2Y)と OL11(2Y)細胞も含めて得られた細胞 (4×10^3) を 6 ウェルプレートに播き、RBV 100 μM を 4 日ごとに添加し、25 日間培養観察した。その結果、予想外に、得られた細胞株は親株と同程度に RBV に対して高感受性であることが分かった。また、RBV (25 と 50 μM) 添加 3 日後における HCV NS5B の減

少の程度をウェスタンブロット解析で調べた結果においても、親株と同程度の RBV 感受性を示した。これらの原因として、RBV 耐性としてコロニー化した細胞から細胞株として樹立増殖させる際に、RBV Free にしてしまったことにより、元の高感受性に戻ってしまった可能性が考えられた。また、2 年の継代培養期間では HCV や細胞の多様性という面で RBV 耐性の表現型がまだ現れて来ていない可能性も考えられた。

そこで、今年度は、OL8 細胞を 3.4 年間継代培養した OL8(3.4Y)細胞、OL11 細胞を 3.4 年間継代培養した OL11(3.4Y)細胞および OL14 細胞を 3.2 年間継代培養した OL14(3.2Y)細胞を用いて、RBV に抵抗性を示す細胞株の樹立を目指した。今回は少し方法を変え、1 週間ごとに継代を行っている細胞培養のラインにのせて継代ごとに RBV(100 μ M)を添加することとした。通常の細胞継代では、1 週間ごとに 50-80 倍細胞を希釈している。そこで、それぞれの細胞について、RBV を加えない細胞系列(コントロール)と RBV を添加する細胞系列の 2 系統の細胞を作成した。1 週間ごとの継代時に RBV を添加した。このような継代を 10 週間にわたって継続させた。

その結果、OL8(3.4Y)細胞については、コントロール細胞では 1 週間ごとに平均して 80 倍程度の希釈倍率で継代することができたが、RBV 添加細胞では、添加 2 回目以降、細胞増殖速度が著しく低下し、2 倍希釈するか或は培地交換のみとなり、10 週目に RBV に抵抗性を示しながら増殖する数個の細胞コロニーが得られた。これらの細胞コロニーはプールする形で回収して OL8(3.6Y)-R 細胞と名付けた。

一方、OL11(3.4Y)細胞と OL14(3.2Y)細胞については、OL8(3.4Y)細胞とは RBV 添加後の反応性が異なり、コントロール細胞では、1 週間ごとの細胞の希釈倍率はそれぞれ 50 倍と 80 倍程度であったのに対して、RBV 添加細胞では、添加 2 回目以降、細胞増殖速度が低下するものの、それぞれ 10 倍程度の希釈が可能であった。これ

らの細胞は RBV 存在下でも増殖してくることが分かった。これらの細胞についても、RBV 添加後 10 週を経過した時点で、細胞を回収してそれぞれ OL11(3.6Y)-R と OL14(3.4Y)-R 細胞と名付けた。RBV に抵抗性を示すこれらの細胞については、RBV 存在下で細胞を増殖させ細胞株とした。

次に、得られた OL8(3.6Y)-R、OL11(3.6Y)-R および OL14(3.4Y)-R 細胞とそれぞれに対応するコントロール細胞に RBV (12.5 および 25 μ M)を添加して 3 日後の HCV NS5B の減少の程度をウェスタンブロット解析により調べた。その結果、RBV に抵抗性を示す細胞株[OL8(3.6Y)-R、OL11(3.6Y)-R および OL14(3.4Y)-R]では、RBV 添加 3 日後の NS5B の減少の程度はそれぞれコントロールに用いた親株細胞 [OL8(3.6Y)、OL11(3.6Y) および OL14(3.4Y)]における減少の程度より少ないことが分かった。これらの結果から、得られた細胞がいずれも RBV に抵抗性を示すことが分かった。RBV に対する抵抗性は RBV のトランスポーターである ENT1 の発現低下によるものであることがまず考えられたので、ENT1 の発現レベルをウェスタンブロット解析により調べた。その結果、3 種類の RBV 抵抗性細胞ではそれぞれコントロールの親細胞と比較して ENT1 の発現量にはまったく差がないことが分かった。

次に、RBV に抵抗性を示す細胞株における HCV 遺伝子の塩基配列を解析して、コントロールの親株細胞由来の HCV 遺伝子と配列上差があるかどうかを調べた。これまでに OL8(3.6Y)-R 細胞由来の HCV 遺伝子の NS3-5B 領域について親株の OL8(3.6Y)細胞との比較解析が終了した。その結果、OL8(3.6Y)細胞における HCV の NS3-5B 領域は OL8 細胞の樹立時のものと比較すると 20 カ所以上のアミノ酸置換が検出され、継代による遺伝的多様性の獲得が観察された。OL8(3.6Y)-R 細胞における HCV 遺伝子では、このような遺伝的多様性を保ったまま、幾つかの新たなアミノ酸置換(NS3 領域に 4 カ所と NS5A 領域に 3 カ所)が解析した 5 クローン中すべ

てで検出された。この結果から、RBVに抵抗性を示す細胞では、HCV 遺伝子の塩基配列について親株の細胞における主要な HCV 分子種とは異なる HCV 分子種に収束していることが分かった。この現象は、HCV 遺伝子の系統樹解析において、RBV 抵抗性細胞株由来の HCV 遺伝子が親細胞株由来の HCV 遺伝子とは異なるクラスターを形成することからも確認された。

RBV(100 μ M)に対して抵抗性を示す細胞株が得られたものの高度な RBV 耐性ではなかったことから、細胞に添加する RBV の濃度を 100 μ M から徐々に高めて、RBV に対して高度に抵抗性を示す細胞株の樹立を目指した。添加する RBV の濃度を 1 ヶ月ほどかけて 100 μ M から 400 μ M まで上昇させた。その場合、OL8(3.6Y)-R 細胞では幾つかの細胞コロニーが得られ、モノクローン化細胞株として樹立することができた。一方、OL11(3.6Y)-R 細胞では増殖速度が低下するものの細胞コロニーとはならなかったため、現在、さらに RBV の濃度を 400 μ M に高めて培養を継続している。OL14(3.4Y)-R 細胞も 200 μ M の RBV 添加では耐性の細胞コロニーができなかった。しかしながら、RBV の濃度を 400 μ M まで上昇させると RBV 耐性の細胞コロニーが生じ、15 種類程度のモノクローン化細胞株を樹立することができた。

D. 考察

(1) Li23 由来で IFN に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製細胞における HCV の遺伝子解析

今年度は OL11 細胞および OL11(2Y)細胞由来の IFN 抵抗性細胞 OL11r と OL11(2Y)r から得られた HCV 遺伝子の解析を行い、IFN に抵抗性を示す細胞内では、遺伝的にかなり均一性を示す HCV RNA が複製していることを明らかにした。

遺伝的系統樹解析においても、これらの HCV RNA は 1 つのクラスターを形成してい

た。HCV 遺伝子上広範囲にわたって特定の アミノ酸置換が認められた。これらのアミノ酸置換が IFN 抵抗性を担っている可能性も否定できないが、このようなアミノ酸置換を有する HCV 分子種が増えている均一の細胞集団が IFN の長期投与により選択されてきた可能性がある。今後、OL8(2Y)r 細胞由来の HCV 遺伝子の解析結果が得られる予定であるので、もし OL11(2Y)r 細胞で得られたアミノ酸置換と共通のアミノ酸置換が得られた場合には、ウイルス側因子の可能性を検討する予定である。宿主側因子が関与する可能性については、OL11(2Y)r 細胞を IFN- γ で処理することにより治癒細胞を作成後、細胞樹立当時の全長 HCV RNA を作成した治癒細胞に再度導入することにより全長 HCV RNA 複製細胞を作成し、IFN 感受性試験を行う予定である。

(2) Li23 由来で RBV に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製細胞株の樹立

今年度得られた RBV 抵抗性細胞のうち OL8(3.6Y)-R 細胞からは、親株の OL8(3.6Y)細胞と比較して HCV の NS3 や NS5A 領域にいくつかのアミノ酸置換が検出された。これらのアミノ酸置換はこれまで IFN 抵抗性細胞株を用いた HCV 遺伝子の解析から得られたアミノ酸置換とは異なるものであったことから、RBV 耐性に特徴的なアミノ酸置換である可能性もある。現在、OL11(3.6Y)-R や OL14(3.4Y)-R 細胞由来の HCV 遺伝子の解析を行っていることから、これらの細胞由来の HCV に同様のアミノ酸置換が生じているかどうか今後明らかになるとと思われる。共通のアミノ酸置換が得られた場合は、HCV 側

因子の可能性もあることから、そのアミノ酸置換の導入効果を調べる実験を行う予定である。現在、RBV の濃度を高めた (200-400 μ M) 場合においても抵抗性を示す細胞株が得られ始めているので、これらの細胞株における HCV 遺伝子の解析を行い、RBV 耐性に関わると考えられるアミノ酸配列があるのかどうかを検討する必要がある。

RBV 抵抗性を示す細胞由来の HCV 遺伝子に見出されたアミノ酸置換は、解析した 5 クローンで共通していたもの以外にもクローン特異的なものを検出している。しかしながら、遺伝的系統樹においては、親細胞由来の HCV 遺伝子と比較すると RBV 抵抗性の細胞由来の HCV 遺伝子は一つのクラスターに収束した形となることから、よく似た HCV 分子種の集団になっているとも考えられる。このようなウイルスの遺伝的側面が RBV 抵抗性に寄与していることが考えられる。その一方で、ある特定の細胞集団が RBV の長期添加により選択されてきている可能性もある。この点については、今後得られる予定の高濃度の RBV に対しても抵抗性を示す細胞と親細胞間での cDNA マイクロアレイ解析を行い、宿主因子と RBV 抵抗性との関係の有無を調べる予定である。

E. 結論

今年度の成果は以下のとおりである。

(1) Li23 細胞株由来で IFN- α に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製細胞から遺伝的系統樹上クラスターを形成し、かつ特定のアミノ酸置換を有する HCV RNA 分子種が得られた。(2) Li23 細胞株由来の全

長 HCV RNA 複製細胞(3年以上継代培養した細胞)を用いて RBV に抵抗性を示す複数の細胞株を樹立した。これらの細胞から、遺伝的系統樹上クラスターを形成し、かつ特定のアミノ酸置換を有する HCV RNA 分子種が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. *Virus Res.*, 151(1):61-70 (2011).
- 2) Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: Potential treatment for hepatitis C. *Liver Int.*, 31(6):871-880 (2011).
- 3) Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J. Virol.*, 85(14):6882-6892 (2011).
- 4) Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and hepatitis C virus strains are required for the objective evaluation of anti-hepatitis C virus reagents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 409(4):663-668 (2011).

- 5) Takeshita S, Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H., Matsuzaki T, Otani M, Muraoka T, Akiyama M, Miura S, Ozawa E, Ikeda M, Kato N, Isomoto H, Takeshima F, Nakao K. Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells. J. Gastroenterol., DOI 10.1007/s00535-011-0481-z (2011).
- 6) Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. Virus Genes, DOI 10.1007/s11262-012-0712-2 (2012)
- 7) Iikura M, Furihata T, Mizuguchi M, Nagai M, Ikeda M, Kato N, Tsubota A, Chiba K. ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system. Antimicrob. Agents Chemother., DOI 10.1128//AAC.05762-11 (2012).
- 2011.
- 2) Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and HCV strains are required for the objective evaluation of anti-HCV reagents. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, September 2011
- 3) 森 京子、平岡 修、池田 正徳、有海 康雄、平本 晃子、綿矢 有佑、加藤 宣之. リバビリンの抗 HCV 活性を決定する因子. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月.
- 4) 森 京子、平岡 修、池田 正徳、有海 康雄、平本 晃子、綿矢 有佑、加藤 宣之. リバビリンの抗 HCV 活性を決定する宿主因子の同定. 第 19 回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2011)/ 第 15 回日本肝臓学会大会、福岡、2011 年 10 月.
- 5) 上田 優輝、森 京子、池田 正徳、有海 康雄、加藤 宣之. 抗 HCV 剤の活性評価には複数の細胞株由来の HCV アッセイ系が必要である. 第 47 回日本肝臓学会総会、東京、2011 年 6 月.

2. 学会発表

- 1) Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Identification of a host factor determining the anti-HCV activity of ribavirin. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, September
- 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

C型慢性肝炎におけるIL28B SNPと肝病態に関する研究

分担研究者 千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学講座 教授 横須賀 收

研究要旨

HCV コア70/91アミノ酸変異やIL28B genotypeと肝発癌との関連が報告されている。C型慢性肝炎361例を10年（中央値）経過観察し、IL28B rs8099917 SNPと肝発癌の関連をLog-rank testで検討した。IL28B Major genotypeの症例では、HCV コア70野生型の頻度が高いが、HCV コア70変異型の場合には肝発癌リスクが高い可能性が示唆された。また、ペグインターフェロン、リバビリン併用治療を行った1型高ウイルス124例のうち治療前肝組織におけるStat1核染色の解析が可能であった79例において、IL28B SNPとSVRの関連を検討した。その結果、IL28B Genotypingおよび治療前肝細胞内STAT1の核内移行を評価することはHCV G1 高ウイルス量症例の治療効果予測において有用であることが示唆された。

〈研究協力者〉

神田達郎（同腫瘍内科学、特任講師）
中本晋吾（同分子ウイルス学、助教）
今関文夫（同腫瘍内科学、准教授）

A. 研究目的

IL28B genotype および HCV コア 70 アミノ酸が肝発癌に与える影響を検討する。また、治療開始前肝生検組織における肝細胞内 STAT1 活性化および IL28B genotype (rs8099917) がペグインターフェロン、リバビリン併用療法治療効果に与える影響を検討する。

B. 研究方法

(1) IFN非著効またはIFN未施行例のうち10年以上経過観察され少なくとも10年間は肝発癌を認めなかったHCV G1持続感染例108例を対象とした。IL28B genotype (rs8099917)別に経過観察開始時と長期経過観察後のHCV コア70アミノ酸の変化、肝発癌等について検討した。HCV コア70アミノ酸配列は直接塩基配列決定法にて、70Arg、70 non-Argをそれぞれ野生型、変異型と判定し、IL28B genotypeはTaqMan SNP法にて決定した。(2) 治療前に肝生検を施行した79例の肝組織標本でSTAT1の免疫組織学的染色をDAB法で行い、IL28B genotypeおよび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比較検討した。核小体が判別出来ないほど核が濃染したものをSTAT1の核内移行と判断して肝細胞STAT1の活性化と定

義した。

（倫理面への配慮）千葉大学では少数民族を含む人権に十分配慮をおこなっている。臨床検体は千葉大学医学部倫理委員会の承諾を得た上で取り扱った。遺伝子SNPに関しては同生命倫理委員会の承諾を得た上で解析した。

C. 研究結果

1) IL28B Minor genotype症例ではHCV コア70変異型の割合が高かった。2) 長期経過観察例の約70%でHCV コア70アミノ酸に変化はみられず、特定のアミノ酸への変化はみられなかった。3) IL28B Major genotypeの症例では、HCV コア70野生型の頻度が高かった。4) HCV コア70変異型の場合には肝発癌リスクが高い可能性が示唆された。5) SVRの正診率はIL28B genotypeが57%, STAT1核染色陰性 (<5%) が63%, 両者を合わせると71%であり、治療効果予測に有用であった。

D. 考察

HCV G1 高ウイルス量症例の治療効果予測においてIL28B Genotypingと治療前肝細胞内STAT1の核内移行を評価することにより正診率の向上がみられ有用であることを明らかにした。

E. 結論

治療効果予測においてIL28B Genotypingに治療前肝細胞内STAT1の核内移行を評価することは有用である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Etoh R, Imazeki F, Kurihara T, Fukai K, Fujiwara K, Arai M, Kanda T, Mikata R, Yonemitsu Y, Yokosuka O. Pegylated interferon-alfa-2a monotherapy in patients infected with HCV genotype 2 and importance of rapid virological response. *BMC Res Notes*. 2011 Aug 31;4:316.
- 2) Tamura R, Kanda T, Imazeki F, Wu S, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Fujiwara K, Saito K, Roger T, Wakita T, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C Virus nonstructural 5A protein inhibits lipopolysaccharide-mediated apoptosis of hepatocytes by decreasing expression of Toll-like receptor 4. *J Infect Dis*. 2011 Sep 1;204(5):793-801.
- 3) Kanda T, Imazeki F, Mikami S, Kato K, Shimada N, Yonemitsu Y, Miyauchi T, Arai M, Fujiwara K, Tsubota A, Takada N, Nishino T, Takashi M, Sugiura N, Kimura M, Fukai K, Yokosuka O. Occurrence of hepatocellular carcinoma was not a rare event during and immediately after antiviral treatment in Japanese HCV-positive patients. *Oncology*. 2011;80(5-6):366-72.
- 4) Maruoka D, Imazeki F, Arai M, Kanda T, Fujiwara K, Yokosuka O. Long-term cohort study of chronic hepatitis C according to interferon efficacy. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Feb;27(2):291-9.
- 5) Kanda T, Imazeki F, Wu S, Nakamoto S, Yokosuka O. The assessment of serum hepatitis C virus RNA 12 weeks after the end of treatment using TaqMan polymerase chain reaction is less relevant than after 24 weeks for predicting sustained virological response. *Hepatology*. 2011 Oct;54(4):1482.
- 6) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jul 8;410(3):404-9.

- 7) Miyamura T, Kanda T, Nakamoto S, Wu S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Hepatic STAT1-nuclear translocation and interleukin 28B polymorphisms predict treatment outcomes in hepatitis C virus genotype 1-infected patients. *PLoS One*. 2011;6(12):e28617.
- 8) Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1. *J Virol*. 2012 Feb;86(4):2143-52.
- 9) Miyamura T, Ishii K, Kanda T, Tawada A, Sekimoto T, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Imazeki F, Kiyohara T, Wakita T, Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: Recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatol Res*. 2011 Dec 13. [Epub ahead of print]
- 10) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsushashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y, Kumada H. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res*. 2012 Feb;42(2):139-149.
- 11) Togo S, Arai M, Tawada A, Chiba T, Kanda T, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Clinical importance of serum hepatitis B surface antigen levels in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat*. 2011 Oct;18(10):e508-15.
- 12) Wu S, Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Shirasawa H, Yokosuka O. Nuclear receptor mRNA expression by HBV in human hepatoblastoma cell lines. *Cancer Lett*. 2011 Dec 15;312(1):33-42.

- 13) Kamezaki H, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Maruyama H, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Emergence of entecavir-resistant mutations in nucleos(t)ide-naive Japanese patients infected with hepatitis B virus: virological breakthrough is also dependent on adherence to medication. Scand J Gastroenterol. 2011 Sep;46(9):1111-7.
- 14) Kanda T, Imazeki F, Azemoto R, Yonemitsu Y, Mikami S, Kita K, Takashi M, Sunaga M, Wu S, Nakamoto S, Tawada A, Arai M, Kato K, Yoshida Y, Koma Y, Fujiwara K, Fukai K, Suzuki N, Yokosuka O. Response to peginterferon-alfa 2b and ribavirin in Japanese patients with chronic hepatitis C genotype 2. Dig Dis Sci. 2011 Nov;56(11):335-42.
- 15) Nakamoto S, Kanda T, Imazeki F, Wu S, Arai M, Fujiwara K, Yokosuka O. Simple assay based on restriction fragment length polymorphism associated with IL28B in chronic hepatitis C patients. Scand J Gastroenterol. 2011 Jul;46(7-8):955-61.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表