

平成 22 年 4 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009 年度

課題番号：19790502

研究課題名（和文）C 型肝炎ウイルス IRES 領域の遺伝子解析による治療効果予想因子の同定
研究課題名（英文） Identification of predictors in treatment response by mutational analysis of internal ribosome entry site within hepatitis C virus

研究代表者

緒方 啓（OGATA KEI）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：90309766

研究成果の概要（和文）：

ペグインターフェロンおよびリバビリン併用療法（以下 PEG・RBV 療法）を行った C 型肝炎（以下 CH-C）症例において、血清中 C 型肝炎ウイルス（以下 HCV）の internal ribosome entry site（以下 IRES）領域の遺伝子変異解析を行った。治療開始後より 12 週以内に血中 HCV RNA が陰性化した例を 12w(-) 群、12 週目および 24 週目において血中 HCV RNA 陽性であった例を 12w(+) 群と定義した。12w(-) 群 23 例、12w(+) 群 18 例の計 41 例の解析を行った。IRES の主要部位である domain II（以下 dII）および domain III（以下 dIII）領域での変異分布を解析したところ、dII においては両群で際立った差を認めなかったが、12w(-) 群においては dIII の変異が 12w(+) 群に比べて多い傾向にあった。さらに dIII の中でも 141 から 252 番目の領域（以下 dIII 141-252）の塩基において顕著な差を認めた ($P < 0.05$)。HCV IRES の dIII の変異解析が、CH-C に対する PEG・RBV 療法において新たな治療効果予測因子の確立に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed mutations in the internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus (HCV) in the serum of patients with chronic hepatitis C (CH-C) who had received combination therapy with pegylated interferon and ribavirin (PEG-RBV therapy). We defined a 12w(-) group as those patients who became negative for serum HCV RNA within 12 weeks after treatment initiation, and a 12w(+) group as those who were positive for serum HCV RNA at 12 and 24 weeks. The 12w(-) and 12w(+) groups consisted of 23 and 18 patients, respectively, totaling 41. Analysis of the major HCV IRES domains, domains II (dII) and III (dIII), showed no marked difference in dII mutations between the two groups. However, the frequency of mutations in dIII tended to be higher in the 12w(-) than in the 12w(+) group, and was significantly higher in dIII at nucleotides 141-252 (dIII 141-252) ($P < 0.05$). These results suggest that mutation analysis of the HCV IRES dIII contributes to establishing new treatment response predictors in PEG-RBV therapy for CH-C.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	400,000	0	400,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	800,000	240,000	1040,000
年度			
年度			
総 計	1,900,000	450,000	2,350,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学(細目番号 7202)

キーワード：C型慢性肝炎、HCV、効果予測、IRES、ペグインターフェロン、リバビリン

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦において多数を占めるgenotype 1b型の CH-C症例はPEG・RBV療法をもってしても治療抵抗性である。また副作用のために治療を中断する例も多い。さらに今後増加すると考えられる高齢症例に対しての治療効果も危惧されており、より正確な効果予測因子を確立することが急務である。

(2) 性別、年齢、肝繊維化進行度など効果を規定する宿主因子が明らかにされてきた一方で、ウイルス学的因子としてはgenotype、ウイルス量以外に決定的なものが存在しなかった。しかし、同じgenotype 1b型の高ウイルス量のCH-C症例でも、実際の臨床現場においては明らかに治療開始後の HCV RNA kineticsが異なる例が存在している。即ち、ウイルス学的効果予測因子が存在することを示唆する。

(3) 近年、Akutaら¹⁾やEnomotoら²⁾がPEG・RBV療法における新たな効果予測因子(Core, ISDR変異)を報告しており、難治性とされるgenotype 1b型CH-C症例の中にも治療感受性が高い例と低い例が存在する要因の一つとしている。

(4) 筆者は、HCVのIRES領域に着目して研究を行ってきた。その理由としてIRESはHCVの蛋白質翻訳とRNA複製の両方に深く関わる重要なfactorであり、HCV RNA kineticsとも関連があると考えられたためである。筆者は、インターフェロンおよびリバビリン併用療法(以下IFN・RBV療法)を行った genotype 1b症例のIRES領域を血清からクローニングして遺伝子変異を解析した。その結果、著効例と無効例との間にIRES変異パターンの差異を認め、IRESの変異がCH-Cの治療効果予測因子となりうる可能性が示唆された³⁾。

(5) 一方、治療中には血中HCV RNAが陰性化していたが、終了後に再出現するHCVとはどういう特徴をもつウイルスなのか?という疑問に対して明解な答えはない。しかし、臨床の現場においては、そのような症例に数多く遭遇する。この疑問に答えるヒントとして、HCVが血中以外の組織に潜伏感染(latent infection)していることを示唆しうる報告(文献4, 5))が見受けられる。これらのHCVをクローニングして、その特徴を明らかにできれば、さらに有用な効果予測因子となりうる可能性がある。

(文献)

- 1) Akuta N et al, J Med Virol 2007, 79, 1686-95.
- 2) Enomoto N et al, N Engl J Med 1996, 334, 77-81.
- 3) Ogata K et al, Arch of Virol 2008, 153, 1575-79.
- 4) Daniel M. Forton et al, J of Virology, 2004, vol 78, 10, 5170-5183.
- 5) G Di Liberto et al, Gastroenterology, 2006;131:76-84.

2. 研究の目的

(1) PEG・RBV療法を行ったgenotype 1b型のCH-C症例において、治療感受性が異なる二群間でのHCV IRES領域の遺伝子変異比較を行い、新たなウイルス学的効果予測因子を同定する。

(2) 既報の因子(Core, ISDR変異)とIRES領域の変異データとを組み合わせることで、より正確な治療効果予測因子を確立する。

(3) latent infectionしていると考えられるHCVのクローニングを行い、治療抵抗性HCVのウイルス学的特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PEG・RBV療法における治療感受性群と抵抗性群を以下のように定義する。

12w(+)群：治療開始後より12週以内に血清HCV RNAが陰性化せず、尚且つ24週目も陽性である例。

12w(-)群：治療開始後より12週以内に血清HCV RNAが陰性化し、その後も陰性化が持続する例。

(2) 久留米大学病院にてPEG・RBV療法を行っている症例から治療前、治療中、治療終了後の血清、血球成分を採取し凍結保存。その中

から12w(+)群および12w(-)群の定義に適合する例を、各々30例ずつ選択。各例の経時的サンプルのIRESクローニングを行っていく。

実験の具体的方法は以下の通りである。

- ① kitを用いた方法で、RNAの抽出を行う。
- ② RT-PCR法にてIRESをcDNA化し、さらにPCR法およびnested PCR法にて増幅する。
- ③ IRESをTA cloning法にてクローニングし、sequence解析を行う。

(3) 複数の臨床パラメータ（ウイルス量、性別、年齢、肝繊維化進行度、ウイルス陰性化時期、薬剤コンプライアンスなど）とIRES変異のデータから単変量・多変量解析を行い、新たな治療効果予測因子を確立する。

4. 研究成果

(1) 集積症例の内訳・臨床背景

治療を完遂できた症例のうち、12w(+)群18例、12w(-)群23例の計41例が解析可能であった。両群の臨床背景因子において、統計学的有意差は認めなかった。しかしIFN治療歴において、12w(-)群では治療歴のない症例が多い傾向が見られた。(表1)

表1：12w(+)群および12w(-)群の臨床的背景

	12w(+)群 (n=18)	12w(-)群 (n=23)	P value
年齢	57.1±6.2	53.5±10.9	P = 0.30 ^a
性別(M/F)	8 / 10	15 / 8	P = 0.18 ^b
HCV RNA(KIU/ml)	2233.9±1203.2	2029.6±1404.4	P = 0.54 ^a
血小板(x10 ⁹ /ul)	16.1±4.6	14.7±4.0	P = 0.45 ^a
Hb(g/dl)	14.1±1.5	14.0±1.4	P = 0.74 ^a
肝生検組織(F1, 2/3, 4)	10 / 4	14 / 7	P = 0.53 ^c
IFN歴(あり/なし)	9 / 8	6 / 17	P = 0.08 ^b

a : Mann-Whitney U test
b : Chi-square test
c : Fisher's exact test

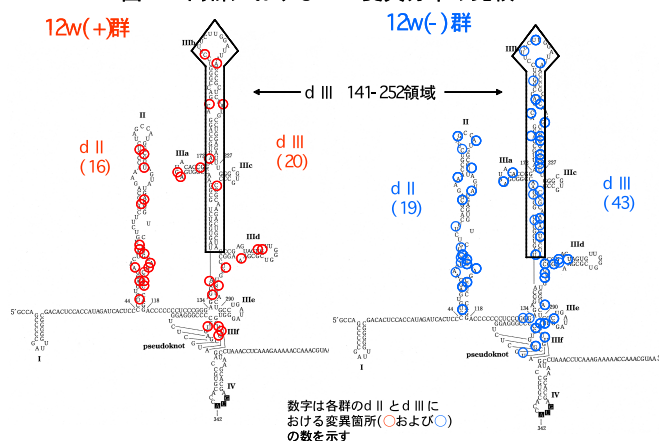
(2) IRESの遺伝子変異解析

①両群でのIRES変異パターン

12w(+)群18例、12w(-)群23例の治療前血清よりHCV IRESのクローニングを行い、両群で変異の比較解析を行った。各症例から6

clone以上の解析を行い、両群での変異パターンの差異を検討した。その結果、12W(+)群ではdⅡに16箇所、dⅢに20箇所の変異を認めた。一方、12w(-)群ではdⅡに19箇所、dⅢに43箇所の変異を認め、dⅢの変異数において大きな差を認めた。即ち、治療に感受性を示す例では、dⅢへ変異が集中する傾向が見出された。(図1)

図1：両群におけるIRES変異分布の比較



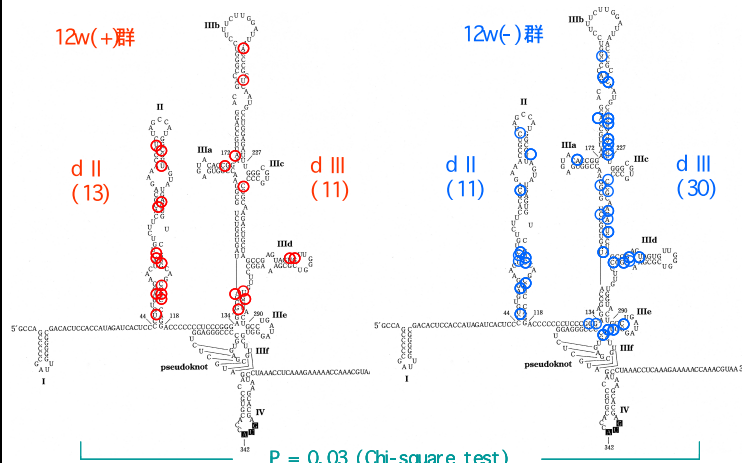
②dⅢ領域における絞込み

新たな効果予測因子を確立するために、dⅢの中で、さらに領域を絞り込むための解析を行った。その結果、dⅢの141から252番目の塩基にわたる領域において顕著な差を認めた。(図1)

③治療抵抗性因子の模索

IRESの遺伝子変異において、その二次構造の変化に、より多大な影響を与えると考えられるstem部分のみの変異パターンを比較した。その結果12w(+)群においては、12w(-)群よりもdⅡでのstem部位変異が全体の中で占める割合が相対的に増加しており、統計学的に有意差を認めた。即ち、dⅡstem変異は治療抵抗性に関わる因子である可能性が示唆された。一方で、dⅢ141-252での変異は12w(-)群に圧倒的に多く認められ、この領域の変異が治療感受性に深く関わる可能性が高いことを改めて確認しえた。(図2)

図2：両群におけるStem部分でのIRES変異分布



(3) 新たな効果予測因子の模索

今回の研究の対象症例において、IRES変異解析に加えてCore変異(70 / 91)を測定した。12w(+)群は18例全例、12w(-)群は1例を除いた22例で行った。既報の予測因子であるCore変異と今回のIRES変異との結果を組み合わせることで、より精度の高い効果予測因子を見出すための解析を行った。

①12w(+)群でのCoreとIRES変異との関連

Coreの変異解析では6例(33%)がW / Wであり、2例(11%)がW / M、4例(22%)がM / W、5例(28%)がM / M、1例が拮抗/Mであった。IRES変異解析との関連をみると、治療抵抗性が予測されるM / M型5例中4例(80%)においてIRES dⅢ141-252変異陰性であった。

②12w(-)群でのCoreとIRES変異との関連

22例のうち9例(41%)がW / W、2例(9%)がW / M、2例(9%)がM / W、3例(14%)がM / M、5例(23%)が拮抗/ W、1例(5%)が拮抗/拮抗であった。W / W型9例中全例(100%)がIRES dⅢ141-252変異陽性であった。

③IRESとCore変異との組み合わせ

これまでの研究から得られた結果より、治療

感受性にはIRES d III 141-252領域が、また治療抵抗性にはd II stem領域の変異が大きく関わる可能性が示された。さらに既報の感受性・抵抗性因子であるCore 70番目の変異(W or M)を組み合わせることで、新たな治療効果予測因子の確立を試みた。その結果、d III 141-252変異とCore70番目の変異との組み合わせは、12w(+)および12w(-)両群において統計学的有意差を認めた。その中でも特にd III 141-252変異の有無は、単独でも強い効果予測因子となりうる可能性が示された。(図3) 尚、本研究で得られた以上のデータをまとめた論文を現在投稿準備中である。

the study of the liver, 2008年4月23-27日, イタリア・ミラノ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緒方 啓 (OGATA KEI)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：90309766

(2) 研究分担者

()

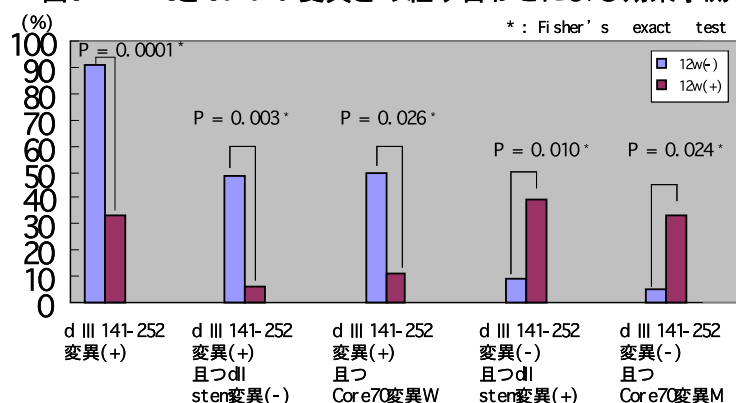
研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

図3：IRESとCore70 変異との組み合わせによる効果予測



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

①緒方啓、HCV IRES の塩基配列比較によるペグインターフェロン・リバビリン(Peg-Riba)併用療法感受性の検討、第 13 回日本肝臓学会大会、2009 年 10 月 14 日、京都

②緒方啓、ペグインターフェロン・リバビリン(Peg-Rib)併用療法に抵抗性・感受性を示すHCV cloneのIRES領域における遺伝子変異解析、第44回日本肝臓学会総会、2008年6月5日、愛媛

③Kei Ogata, A MUTATIONAL ANALYSIS OF THE INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE IN HEPATITIS C VIRUS IN PATIENTS TREATED WITH PEGYLATED INTERFERON WITH RIBAVIRIN, 43rd Annual Meeting of the European Association for