

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390206

研究課題名（和文） 大規模ウイルスゲノムワイド解析による慢性C型肝炎病態の包括的解明

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of chronic hepatitis C by large-scale viral genome wide analysis

研究代表者

榎本 信幸 (ENOMOTO NOBUYUKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：20251530

研究成果の概要（和文）：

HCV NS5A の ISDR, IRRDR 領域の変異、core 蛋白 70 番アミノ酸変異がインターフェロン治療反応性を規定していた。プロテアーゼ未投薬症例においてもプロテアーゼ阻害剤の治療抵抗性変異を見出した。コア 70 番アミノ酸の変異が肝発癌にかかわることを明らかとした。IL28B および interferon-alpha を HCV 培養細胞に添加し HCV 増殖抑制効果を検討、両者が HCV 増殖を特異的に阻害することを確認した。

研究成果の概要（英文）：

The virological response to pegylated-interferon/ribavirin therapy (PEG-IFN/RBV) for chronic hepatitis C virus (HCV)-1b infection is quite diverse. However, contribution of virological factors in determining early responses as well as the final outcome in association with interleukin 28B (IL28B) single nucleotide polymorphisms (SNPs) is not understood comprehensively. We undertook a retrospective cohort analysis for 124 consecutive HCV-1b Japanese patients treated by PEG-IFN/RBV. After classification of patients by the initial responses at week 12, the pretreatment dominant complete HCV amino acid sequences in those patients were subjected to systematic sliding window analysis in association with IL28B SNPs analyses (rs8099917) to characterize response-specific viral sequences. One hundred three patients were eligible for the study. When complete HCV open reading frames (ORFs) were compared between patients with (n=10) and without (n=93) a rapid viral response (RVR), NS5A aa2224 to 2248, a part of interferon sensitivity determining region (ISDR), was extracted as the region most significantly associated with this favorable response ($p=4E-04$). Between non-end of treatment response (non-EVR) (n=32) and the remainder (n=71), core aa.70 was extracted ($p=7.0E-08$). IL28B SNP was correlated significantly with the polymorphisms of core 70 ($p=3.4E-06$). On the other hand, the final sustained virological response (SVR) rate was most significantly correlated with NS5A aa2340 to 2382, almost completely coinciding with the interferon ribavirin response determining region (IRRDR) ($p=1.2E-07$). In PEG-IFN/RBV therapy, polymorphisms in IL28B, NS5A-ISDR, core, and most importantly, NS5A-IRRDR have a tremendous influence on the treatment response in association with the viral kinetics, resulting in significantly different outcomes in chronic HCV-1b infection.

The association between hepatitis C virus (HCV) sequences along with interleukin 28B (IL28B) SNP in the development of hepatocellular carcinoma (HCC) has not been well clarified. (1) Complete HCV open reading frame sequences were determined in 20 patients developing HCC and 23 non-HCC patients with HCV-1b infection in 2 distant time points. (2) An additional 230 patients were studied for core and NS5A sequences with HCC development. (3) 98 patients were investigated for changes in the viral core sequences over time. (4) IL28B SNP was investigated in 228 patients. (1) During observation period (HCC for 10.8 years, and non-HCC for 11.1 years), changes of core a.a. 70 and three amino acid positions in NS5A were characteristic of the patients developing HCC. (2) In 230 patients, the Q/H:R ratio at core a.a. 70 was significantly higher in the HCC group (HCC group 43:22 vs. non-HCC group 66:99, $p = 0.001$). (3) A change of core R70Q was observed over time in eleven patients associated with a decrease in platelets ($p = .005$) and albumin over time ($p = .005$) or with HCC occurrence (6/11, 54.5%), whilst a Q70R change was observed in four patients without associated changes in platelets (n.s.) and albumin (n.s.), or HCC occurrence (0/4, 0%). (4) The IL28B SNP showed significant correlation with

the core 70 residue. HCV core a.a.70 residue and its changes over time were associated with HCC development in genotype-1b infection in close correlation with the IL28B SNP.

Protease inhibitor (PI)-resistant hepatitis C virus (HCV) variants may be present in substantial numbers in PI-untreated patients according to recent reports. However, influence of these viruses in the clinical course of chronic hepatitis C has not been well characterized. The dominant HCV nonstructural 3 (NS3) amino acid sequences were determined in 261 HCV genotype 1b-infected Japanese patients before pegylated interferon plus ribavirin (PEG-IFN/RBV) therapy, and investigated the patients' clinical characteristics as well as treatment responses including sustained virological response (SVR) rate. HCV-NS3 sequences were also determined in 39 non-SVR patients after completion of the therapy. Four single mutations (T54S, Q80K, I153V and D168E) known to confer PI resistance were found in 35 of 261 patients (13.4%), and double mutations (I153V + T54S/D168E) were found in 6 patients (2.3%). Responses to PEG-IFN/RBV therapy did not differ between patients with and without PI-resistance mutations (mutation group, SVR 48%; wild-type group, SVR 40%; P = 0.38). On the other hand, 2 mutations appeared in 2 non-SVR patients after PEG-IFN/RBV therapy (I153V and E168D, 5.1%). PI resistance-associated NS3 mutations exist in a substantial proportion of untreated HCV-1b-infected patients. The impact of these mutations in the treatment of PIs is unclear, but clinicians should pay attention to avoid further development of PI resistance.

A proportion of patients infected with genotype 2a hepatitis C virus (HCV) cannot achieve a sustained virological response (SVR) to pegylated-interferon plus ribavirin therapy (PEG-IFN /RBV) but the reason remains unclear. The present study aimed to clarify the possible correlation between viral sequence variations and final outcome. The pretreatment complete open reading frame (ORF) sequences of genotype 2a HCV were determined by direct sequencing for two independent groups of patients (43 patients as test; group 1 and 35 as validation; group 2), and the correlation with the final outcome was explored. Patients with SVR (n=58) and with non-SVR (n=20) differed significantly in pretreatment HCV RNA level (p=0.002), fibrosis score (p=0.047), and cumulative ribavirin dosage (p=0.003). By comparison of all amino acid positions in the complete HCV ORFs, threonine at amino acid (aa) 110 in the core region was remarkably frequent in SVR (p=0.01 for group 1, p=0.004 for group 2, and p=5E - 05 for combined). A sliding window analysis revealed that the total numbers of amino acid variations within the NS5A aa 2258 to 2306 region were significantly high in SVR compared to non-SVR patients (p=0.01 for group 1, p=0.006 for group 2, and p=0.0006 for combined). Multivariate analyses revealed that core aa 110 (p=0.02), NS5A aa 2258-2306 (p=0.03), and cumulative ribavirin dosage (p=0.02) were identified as independent variables associated with the final outcome. The outcome of PEG-IFN/RBV therapy is significantly influenced by variation in the core and NS5A regions in genotype 2a HCV infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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

キーワード：C型肝炎ウイルス，インターフェロン，リバビリン，遺伝子，IL28B，プロテアーゼ阻害剤，レプリコン

1. 研究開始当初の背景

(1) C型肝炎ウイルス(Hepatitis C virus, HCV)

は、国内において約 200 万人が感染しており、年間 3 万人以上が死亡する肝臓の主要

な原因であり、その病原機構および増殖制御の解明は急務となっている。9,500塩基の一本鎖RNAウイルスであるHCVのゲノムは非常に多様性に富み、日本国内において4種類の遺伝子型が存在するとともに、それぞれの遺伝子型内でも患者ごとにゲノム配列は異なる。さらには、HCVゲノムは単一患者体内でも多彩は変異体の集合を成し、その構成は病態の進展とともに経時的に変化する。これに対応してC型慢性肝炎の病態もまた多様性に富み、長期間病変の進展しない無症候性キャリアから、強い炎症に伴い急速に肝硬変から肝臓に進展する症例が存在し、このHCV病原性の多様性はHCVゲノム多型と宿主ゲノム多型の相互作用に起因すると考えられる。

- (2) これまでのインターフェロン単独治療の効果を決定するHCVゲノム因子であるHCV遺伝子型およびインターフェロン感受性決定領域多型は申請者が発見したものである。難治性C型肝炎に対する最新の根治的治療であるインターフェロン・リバビリン併用療法は約半数の患者にのみ有効であるが、その有効性を決定しているHCVゲノム因子は解明されておらず、多くの患者が治療反応性が予測できないまま、副作用が多く、コストのかかる治療法を受けているのが現状である。
- (3) これらのHCV病原性・治療反応性の多様性はHCVゲノム多型と宿主ゲノム多型により規定されていることが予想される。しかし、個々の臨床症例におけるHCV遺伝子のゲノムワイド解析は臨床背景が不明な少数例でのみ行われており、臨床像と関連させたHCV遺伝子多型の全貌は明らかではない。また、その多型の機能的解析もほとんど解明されていない。また、近年、急速に進展している宿主ゲノムワイド解析を、今後、C型肝炎の解析に応用するにあたり、最も重要なことはウイルス側のゲノム多型を臨床像の明確な多数例でゲノムワイドに解析した集団で解析することである。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では大規模症例群においてC型肝炎ウイルス(Hepatitis C Virus, HCV)ゲノムワイド解析を行い、それぞれのC型肝炎症例の臨床像との比較検討により、HCVの病態を規定するHCVゲノム因子を明らかとし、その機序をHCV培養細胞系・HCVレプリコン系で解析するとともに、新たなウイルス増殖系の確立へ応用する。
- (2) 同時に宿主ゲノム側の病因遺伝子・疾患感

受性遺伝子を臨床症例およびHCV培養細胞系で解析することにより、難治性慢性C型肝炎の病態解明・新規診断法および治療法の開発基盤の形成を目指す。

3. 研究の方法

病原性を規定するHCVゲノム領域の解明

- (1) 同一HCV感染症例について、無症候性の病期と、慢性肝炎期、肝硬変期、発癌時のHCVゲノムの経時的変化を比較検討することにより、HCVゲノムのいかなる領域が肝病変の進展に関連するかを明らかとすることが可能となる。
- (2) 本研究では、各病態について100例規模(全体で400症例)でのHCV全ゲノム解析を行い、各病態に相関するウイルスゲノム多型の全貌を明らかとする。
- (3) 申請者らの施設では、過去20年間に種々の肝疾患患者より10万本以上の血清サンプルを保存しており、C型肝炎・肝硬変・肝臓の進展過程における、HCVゲノムの変化を解析可能である。また同時に、病変の進展しない無症候性キャリアのHCVゲノムとの比較解析を行うことにより、病原性を規定しているHCVゲノム領域の解明を行う。

抗ウイルス治療反応性を規定するHCVゲノム領域の解明

- (1) 本研究では、インターフェロン・リバビリン併用療法でHCV増殖の消失しない治療抵抗症例において、治療前および治療中のHCVゲノム構造を同一症例で比較検討することにより、治療中に選択され残存する治療抵抗性HCV変異体のゲノムの特徴を明らかとし、治療反応性を規定しているゲノム領域を同定する。HCVは単一宿主内で多彩な変異体の集合をなしており、このような治療抵抗症例では耐性ウイルスの選択が認められる。したがって、治療中に残存するHCVゲノム構造の解析により耐性機構を明らかとすることが可能である。実際に、この手法で申請者らはインターフェロン単独治療に対するインターフェロン感受性決定領域が同定している。
- (2) 現在、最も強力なC型肝炎治療であるペグインターフェロン・リバビリン併用療法において、インターフェロン単独治療耐性であるHCV遺伝子型1b型・インターフェロン感受性決定領域野生型HCVに感染した症例の約40%が治癒する一方、25%の症例は6ヶ月以上の長期治療によっても血液中のウイルスが消失しない

null-responder である。このような症例について、いかなる HCV ゲノム領域および宿主ゲノムをがその反応性を規定しているかを明らかとすることは、治療効果予測法の確立、耐性機序の解明に大きな情報をもたらす。

- (3) また、抗ウイルス治療でウイルスが消失しない症例でも、肝炎の鎮静化がしばしば認められるが、その機序はこれまで明らかとなっていない。本研究ではこれらの症例についてもいかなる HCV 遺伝子構造がこの減少に関与するかを解明する。
- (4) 申請者らの研究チームはすでに、平成19年度までに約 500 症例のペグインターフェロン・リバビリン併用療法を施行中である。治療反応性が症例により大きく異なり、強力な抗ウイルス治療によっても、ほとんどウイルス増殖が低下しない症例を集積しており、これらの全症例における HCV ゲノムの解析を行う。
- (5) さらに、平成 20 年度以降、これまでとは全く異なる C 型肝炎治療薬であるプロテアーゼ阻害薬、ポリメラーゼ阻害薬の臨床試験が開始される。これらの治療においても、その治療反応性には HCV ゲノム構造が深く関与していることが想定されている。本研究では、これらの新規薬剤の治療症例においてもウイルスゲノムワイド解析を開始する。

HCV 増殖を制御する宿主分子群の包括的解析

- (1) HCV レプリコンをインターフェロンを用いて細胞内から排除した細胞(キョア細胞)に再度 HCV レプリコンを導入すると通常の Huh7 細胞(ナイーブ細胞)に比べ非常に効率よくレプリコンが増殖する HCV 高増殖細胞株が得られる。これは HCV 増殖には宿主分子の発現状態が重要な因子となっていることを示している。
- (2) HCV 感染およびインターフェロン治療時に発現変化している遺伝子を cDNA microarray 解析により検索、HCV の増殖を制御する宿主分子を同定し、宿主細胞のいかなる遺伝子発現の差異が HCV 増殖を制御しているかを明らかとし、その発現制御のゲノム基盤を明らかとする。

4. 研究成果

病原性を規定する HCV ゲノム領域の解明

- (1) インターフェロン治療後に HCV 排除が得られなかったにも関わらず肝発癌の見られなかった症例と、肝発癌の認められた症例

について、治療前の保存血清 50 症例から HCV の全ゲノム解析を行い、このような肝発癌にかかわる HCV ゲノムの特徴を探索し、候補となる変異を同定した。

- (2) 肝移植症例については、治療前後および肝炎再発時の HCV 全ゲノム解析を行い、肝移植後の肝炎病態を規定するゲノム多型の探索を開始した。
- (3) 肝発癌にかかわる HCV ゲノムの特徴を探索し、コア 70 番アミノ酸の変異が関わることを明らかとした。さらにコア 70 番変異は肝病変の進展と関連し経時的に変化すること、一部の症例においては患者体内において混在状態となっていることを明らかとした。またコア 70 番の変異は宿主側の IL28B 遺伝子多型と密接な関連があるが、発癌に関与しているのはコア 70 番変異であり IL28B は発癌には直接の関連はなかった。

抗ウイルス治療反応性を規定する HCV ゲノム領域の解明

- (1) インターフェロン・リバビリン併用療法で HCV 増殖の消失しない治療抵抗症例において、治療前および治療中の HCV ゲノム構造を同一症例で比較検討することにより、治療中に選択され残存する治療抵抗性 HCV 変異体のゲノムの特徴を明らかとし、治療反応性を規定しているゲノム領域を探索した。その結果、NS5A の ISDR 領域の変異は治療早期のウイルスの急速な減少に関連しており、一方、core 蛋白 70 番アミノ酸変異は、ペグインターフェロン・リバビリン治療でもウイルス減少の認められない null response に関連していることを明らかとした。
- (2) 同様の検討を genotype 2a についても施行し、core 領域内の 70 番アミノ酸とは異なる領域に感受性に関連している可能性のある残基を同定した。genotype 2b についても検討し、NS5A 領域内に感受性に関連している可能性のある領域を同定した。
- (3) NS3/4A プロテアーゼ領域を含む HCV ゲノム領域において、約 260 例の Genotype-1b 症例についてシーケンスを行い、次世代の治療薬として期待されているプロテアーゼ阻害剤の治療抵抗性変異をプロテアーゼ未投薬症例においても見出されることを明らかとし、今後のプロテアーゼ阻害薬導入に際しては、注意が必要であることを示した。
- (4) インターフェロン・リバビリン併用療法での治療効果は ISDR 変異症例については非常に高いことを確認した。一方、コア 70 番

変異は抵抗性に関与するがこれは主として IL28B 遺伝子多型を介する間接的なものであり、治療抵抗性は IL28B 遺伝子より規定されていた。さらに IL28B major type においては著効例と再燃例が存在するがこれは NS5A の IRRDR 変異によって規定されいることを明らかとした。すなわち HCV の NS5A がインターフェロン治療のウイルス側の反応性全般を規定していることが明らかとなった。

HCV増殖を制御する宿主分子群の包括的解析

(1) IL28B および interferon- α を HCV 培養細胞に添加し HCV 増殖抑制効果を検討、両者が HCV 増殖を特異的に阻害することを確認した。さらに IL28B および interferon- α を同時に添加すると相乗的な抑制効果が得られた。これらの条件で DNA microarray を用いて細胞内の遺伝子発現の変化の包括的検討を行い、両者ともに多数の ISG を誘導すること、同時添加の場合には一群の ISG が特に大きく変動することを見出し、これらが HCV 増殖抑制においては特に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

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 15 件)

①Masayuki Kurosaki, Enomoto N, et al. Pretreatment Prediction of Response to Pegylated-Interferon Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C using Genetic Polymorphism in IL28B and Viral Factors.

Journal of Hepatology 2010; 54(3):439-48. 査読有

②Sakamoto N, Enomoto N, et al. ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C.

Hepatology Res. 2010 Nov;40(11):1063-1071. 査読有

③Kurosaki M, Enomoto N, et al. Hepatic steatosis in chronic hepatitis C is a significant risk factor for developing hepatocellular carcinoma independent of age, sex, obesity, fibrosis stage and response to interferon therapy.

Hepatology Res. 2010 Sep;40(9):870-7. 査読有

④Asahina Y, Enomoto N, et al. Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection.

Hepatology. 2010 Aug;52(2):518-27. 査読有
⑤Nakagawa M, Enomoto N, et al.

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 Jun;45(6):656-65. 査読有

⑥Enomoto N, Maekawa S. HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy. **Intervirology.** 2010;53(1):66-9. 査読有

⑦Nishimura-Sakurai Y, Enomoto N, et al. Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells.

J Gastroenterol. 2010 May;45(5):523-36. 査読有

⑧Watanabe S, Enomoto N, et al. Prolonged treatment with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin improves sustained virological response in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan.

Hepatology Res. 2010 Feb;40(2):135-44. 査読有

⑨Sekine-Osajima Y, Enomoto N, et al. Two flavonoids extracts from *Glycyrrhizae radix* inhibit in vitro hepatitis C virus replication.

Hepatology Res. 2009 Jan;39(1):60-9. Epub 2008 Jul 20. 査読有

⑩Kurosaki M, Enomoto N, et al. The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase levels are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy.

J Hepatology. 2008 May;48(5):736-42. Epub 2008 Feb 26. 査読有

⑪Amemiya F, Maekawa S, Enomoto N, et al. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection.

J Infect Dis. 2008 Feb 1;197(3):361-70. 査読有

⑫Jin H, Enomoto N, et al. Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses hepatitis C virus replication in vitro.

Hepatology Res. 2008 Sep;38(9):909-18. 査読有

⑬Sekine-Osajima Y, Enomoto N, et al. Development of plaque assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity.

Virology 2008 Feb 5;371(1):71-85. Epub 2007 Oct 22. 査読有

⑭Sakamoto N, Enomoto N, et al. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant

adenovirus expressing short hairpin RNA.

J Gastroenterol Hepatol. 2008

Sep;23(9):1437-47. Epub 2007 Aug 7 査読有

⑮Asahina Y, Enomoto N, et al.

Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response.

Gastroenterology. 2008 May;134(5):1396-405.

Epub 2008 Feb 1 査読有

〔学会発表〕（計 6 件）

①Shindo H, Maekawa S, Enomoto N, et al. Characterization of protease inhibitor resistance mutations in untreated patients infected with genotype 1b HCV. EASL(45th Annual meeting of the European association for the study of the liver)WIEN, 2010.4.15

②Maekawa S, Enomoto N, et al. Analysis of the reponse to pegylated-interferon plus ribavirin therapy in chronic HCV-1b infection using comprehensive information of viral and host factors. EASL(45th Annual meeting of the European association for the study of the liver)WIEN, 2010.4.16

③Maekawa S, Enomoto N, et al. Analysis of the response to pegylated-interferon plus ribavirin therapy in chronic HCV-1b infection using comprehensive information of viral and host factors. EASL(45th Annual meeting of the European association for the study of the liver)WIEN, 2010.4.16

④Maekawa S, Enomoto N, et al. Analysis of the early response and the final outcome to pegylated-interferon plus ribavirin therapy in chronic HCV-1b infection using comprehensive information of viral and host factors. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Sep.10-14, 2010 Yokohama

⑤Kazuki Komase, Maekawa S, Enomoto N, et al. Extensive analysis of serum cytokines associated to the response in the PEG-IFN+RBV combination therapy in genotype 1b HCV infection. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Sep.10-14, 2010 Yokohama

⑥Mika Miura, Maekawa S, Enomoto N, et al. Investigation for viral genomic regions associated to hepatocarcinogenesis in hepatitis C. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Sep.10-14, 2010 Yokohama

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 信幸 (ENOMOTO NOBUYUKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・

教授

研究者番号：20251530

(2) 研究分担者

前川 伸哉 (MAEKAWA SHINYA)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・

講師

研究者番号：70397298

(3) 連携研究者

なし