

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590760
 研究課題名 (和文) C型肝炎ウイルス増殖と病態を規定するインターフェロン関連分子とその多型
 研究課題名 (英文) Interferon stimulated genes and its polymorphisms determining Hepatitis C virus replication and pathogenesis of hepatitis C
 研究代表者
 加藤 直也 (KATO NAOYA)
 東京大学・医科学研究所・特任准教授
 研究者番号：90313220

研究成果の概要 (和文)：C型肝炎ウイルス (HCV) が感染すると、インターフェロン (IFN) が誘導される。IFN は抗ウイルス分子を誘導し、HCV 増殖を抑える。IFN に誘導される PKR、MxA、OAS は、HCV 増殖を抑えたが、IFN 治療の際に重要なのは MxA であった。また、OAS の HCV を抑える効果の弱いタイプの患者は、肝硬変に進行しやすかった。C型慢性肝炎からの発癌には個人差があるが、ゲノムワイド関連解析により MICA 遺伝子多型が肝癌のなりやすさを決めていることを突き止めた。

研究成果の概要 (英文)：Hepatitis C virus (HCV) infection induces interferon (IFN). IFN induces antiviral molecules that suppress HCV replication. Although IFN stimulated genes, PKR, MxA, and OAS suppressed HCV replication, only MxA was essential in IFN treatment. In addition, chronic hepatitis C (CHC) patients having OAS polymorphism with weaker anti-HCV activity were easier to develop cirrhosis. There are individual differences for development of hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with CHC. Genome wide association study (GWAS) identified HCC susceptible single nucleotide polymorphism (SNP) in MICA gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、PKR、OAS、コア蛋白、肝癌、GWAS、SNP

1. 研究開始当初の背景

わが国のC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) 感染者は約200万人にもおよび、また、毎年3万人以上が命を失う肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma: HCC) 患者の約80%がC型肝炎ウイルスによるものであり、C型肝炎は、わが国における健康上の大いなる脅威である。その治療として、インターフェロン (interferon: IFN) が用いられているが、リバビリン併用という最強の治療法によっても、わが国で最も多いジェノタイプ1型で高ウイルス量の患者では、その奏功率は50%に満たず、満足すべき治療法は確立されていない。より良いIFN治療の確立は急務である。

る脅威である。その治療として、インターフェロン (interferon: IFN) が用いられているが、リバビリン併用という最強の治療法によっても、わが国で最も多いジェノタイプ1型で高ウイルス量の患者では、その奏功率は50%に満たず、満足すべき治療法は確立されていない。より良いIFN治療の確立は急務である。

本来、ウイルス感染により、自然免疫系を介してIFNが誘導され（IFN産生系）、IFNに誘導される分子はウイルス増殖を抑制する（IFN作動系）。HCV感染においても、これらIFN関連分子は、HCV増殖と密接に関連しているものと思われる。実際、われわれはHCVのRNAポリメラーゼが内因性のIFNを誘導する一方で、HCVの他の蛋白がこの内因性IFNの誘導を阻止していることを発見し、報告した（Otsuka et al. Hepatology 2005、Moriyama et al. Hepatol Int 2007）。

2. 研究の目的

(1) IFN産生系と作動系のIFNシグナル伝達経路に関わる分子が、実際にHCV増殖に対し、どのような影響を及ぼしているかを網羅的に解析することで、IFNによるHCV増殖抑制に関わる分子を同定し、そのメカニズムを明らかにすることを第一の目的としている。特に、HCV増殖を抑制する宿主のIFN伝達経路を構成する分子群を明らかにすることで、より良いIFN治療法開発の礎となることを期待している。

(2) また、C型肝炎の病態、殊にその個人差は、ウイルス変異に代表されるウイルス側因子と、SNP（single nucleotide polymorphism）に代表される宿主側因子により規定されると考えられる。実際にわれわれは、HCV コア蛋白の変異がC型肝炎における炎症に関連し（Hoshida et al. J Infect Dis 2005）、また、Interleukin 18などのSNPが肝癌になりやすさを規定することを明らかにしてきた（Wang et al. Hepatology 2003、Wang et al. Clin Cancer Res 2004、Kato et al. Hepatology 2005、Dharel et al. Clin Cancer Res 2006）。そこで、HCV増殖に関わるIFNシグナル関連分子の多型が、病態の個人差に及ぼす影響を明らかにすることを第二の目的としている。

3. 研究の方法

(1) 最近開発されたHCV自律増殖・複製系を用いる。一つはHCV subgenomic repliconシステムである（Yokota et al. EMBO rep 2003）。本システムにおいては、HCV増殖が、ルシフェラーゼ活性により、簡便に測定できる。もう一つは全長HCVゲノム複製・感染システムである（Wakita et al. Nat Med 2005）。本システムにおいては、HCV増殖が、培養細胞上清中に分泌されるコア蛋白の定量により、簡便に測定できる。

(2) IFN関連分子は、培養細胞内に強制発現

し、その抗HCV効果を検定する。また、同時にRNA interferenceを用いて、IFN関連分子をノックダウンした細胞を樹立することにより、その抗HCV効果を検定する。

(3) IFN 関連分子 SNP は、基本的に、IFN 関連分子の発現を量的に左右するプロモーター部位の SNP、および、IFN 関連分子を質的に変えるエクソン部位の SNP

（nonsynonymous SNP）につき、TaqMan 法、あるいは直接塩基配列決定法などを用いて、約 1,000 例の C 型肝炎患者白血球 DNA を用いて解析する。

4. 研究成果

(1) HCV 増殖を規定する IFN 誘導遺伝子とその多型が病態に及ぼす影響

HCV 感染により、自然免疫系を介し IFN が誘導され、IFN 誘導分子は HCV 増殖を抑制する。そこで、代表的 IFN 誘導分子である PKR、MxA、OAS の抗 HCV 効果について検討するとともに、OAS および HCV 認識に関わる TLR3 の SNP と C 型肝炎の病態との関連につき検討した。

①PKR knocked down (KD) Huh7 細胞を樹立し、HCV 増殖に対する PKR の働きを HCV サブゲノムレプリコンと JFH1 全長 HCV ゲノムを用いて検討した。PKR KD 細胞においては、コントロール細胞に比し、HCV はより多く増殖した。また、PKR を強制発現させると、HCV サブゲノムレプリコン、JFH1 全長 HCV ゲノム共にその増殖が抑制された。すなわち PKR は HCV 増殖を抑制することが明らかになった。しかしながら、PKR KD Huh7 細胞では、IFN の効果は Huh7 細胞と変わらず、IFN 治療において、PKR は必須でないことが判明した。

②MxA KD Huh7 細胞を樹立し、HCV 増殖に対する MxA の働きを検討した。MxA KD 細胞においても、コントロール細胞に比し、HCV はより多く増殖した。また、MxA を強制発現させると、HCV サブゲノムレプリコン、JFH1 全長 HCV ゲノム共にその増殖が抑制された。すなわち MxA は HCV 増殖を抑制することが明らかになった。しかも MxA KD Huh7 細胞では、IFN の効果は Huh7 細胞に比して減弱しており、IFN 治療において、MxA は必須であることが判明した。

③OAS をレプリコンと全長ゲノムが複製している Huh7 細胞に強制発現し、HCV 増殖に対する OAS の働きを検討した。OAS の強制発現により、HCV 増殖は抑制された。すなわち OAS は HCV 増殖を抑制することが明らかになった。しかしながら、OAS を発現し

ていない Huh7 細胞でも、IFN の効果は Huh7 細胞と変わらず、IFN 治療において、OAS は必須でないことが判明した。

409 例の C 型肝炎患者において、OAS の SNP と臨床病態との関連を検討した。OAS の A4119G (Ser to Gly) 多型は、より高値の ALT 値、および肝硬変と関連し、また、機能的には HCV 増殖抑制能が弱かった。すなわち、HCV 増殖抑制能の弱い OAS を有する C 型肝炎患者では、病態が進行しやすいことが明らかになった。

⑤ 437 例の C 型肝炎患者において、TLR3 の SNP と臨床病態との関連を検討した。TLR3 の C6300T (Leu to Phe) 多型は、より高値の ALT 値、より少ない血小板数、および肝硬変と関連し、また、機能的には IFN 誘導能が弱かった。ここでも IFN 誘導能が弱い遺伝子型を有する患者では、肝病変が進展しやすい可能性が示された。

(2) HCV コア蛋白第 70 番目アミノ酸置換とペグインターフェロン (PEG-IFN)、RBV 併用療法 (PEG-IFN/RBV) 治療効果および発癌との関連

最近になり HCV コア蛋白の第 70 番目アミノ酸の置換が発癌や PEG-IFN/RBV に対する抵抗性に関与していることが報告された。

① データベースから HCV コア領域のシーケンスをダウンロードし非癌患者および肝癌患者で比較したところ、確かにコア蛋白の第 70 番目アミノ酸の変異型は肝癌と関連していた。

② コア蛋白第 70 番目アミノ酸の野生型および変異型の個別定量法を確立し、PEG-IFN/RBV を行った患者におけるそれぞれのダイナミクスにつき検討した。ほとんどの患者において HCV コア領域 70 アミノ酸の野生型と変異型が混在しており、変異型優位の症例では PEG-IFN/RBV に治療抵抗性であるにもかかわらず、同一患者内における野生型と変異型 HCV の治療早期ダイナミクスには違いがなかった。すなわち、同一患者内の野生型と変異型の治療感受性は同等であった。しかしながら、再燃例では変異型が早期に出現し、変異型は排除されにくい可能性が示された。

(3) ゲノムワイド関連解析による肝発癌に関わる宿主遺伝子多型の解析

HCV 感染から肝硬変、HCC への進展には著しい個人差がある。C 型肝炎における肝発癌に関わる SNP につきゲノムワイド関連解析 (genome wide association study: GWAS) を試みた。まず、C 型肝炎患者 721 例、HCV 陰性コントロール 2,890 例を対象として、イルミ

ナチップ (432,703 SNPs) により GWAS を行った。それにより抽出された 8 SNPs につき、C 型肝炎患者 673 例、コントロール 2,596 例を対象として、追試験を行った。その結果、MICA 遺伝子の 5'UTR 領域の SNP が強く ($P = 4.2 \times 10^{-13}$) 肝癌と関連していた。MICA 遺伝子の SNP は C 型慢性肝炎から肝癌への進展にも有意に関連していた。また本 SNP のリスクアレルは血中の低 MICA 濃度と有意に ($P = 1.38 \times 10^{-13}$) 関連していた。MICA 遺伝子多型あるいは血中 MICA 濃度測定は C 型肝炎発癌のバイオマーカーとして極めて有望のみならず、MICA 発現の制御は新規 HCC 治療薬の開発につながると期待される。

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 13 件)

- 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: 455-458(査読有)
- ② Kojima K, Takata A, Vadnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, Kondo Y, Kang YJ, Kishikawa T, Kato N, Xie Z, Zhang WJ, Yoshida H, Omata M, Nepveu A, Koike K. MicroRNA122 is a key regulator of α -fetoprotein expression and biologically aggressive behavior of hepatocellular carcinoma. **Nat Commun** 2011; 2: 338(査読有)
- ③ Takata A, Otsuka M, Kogiso T, Kojima K, Yoshikawa T, Tateishi R, Kato N, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Direct differentiation of hepatic cells from human induced pluripotent stem cells using a limited number of cytokines. **Hepatol Int** (in press)(査読有)
- ④ Chang J-H, Kato N, Muroyama R, Taniguchi H, Guleng B, Dharel N, Shao R-X, Tateishi K, Jazag A, Kawabe T, Omata M. Double-stranded-RNA-activated protein kinase inhibits hepatitis C virus replication but may be not

- essential in interferon treatment. **Liver Int** 2010; 30: 311-318(査読有)
- ⑤ Ohki T, Tateishi R, Goto E, Sato T, Masuzaki R, Imamura J, Goto T, Kanai F, Kato N, Shiina S, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Influence of anti-HBc seropositivity on the risk of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients after adjusting for confounding factors. **J Viral Hepat** 2010; 17: 91-97(査読有)
- ⑥ Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Yoshida H, Sato S, Kato N, Kanai F, Sugioka Y, Ikeda H, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. **Hepatology** 2009; 49: 1954-1961(査読有)
- ⑦ Li C-Z, Kato N, Chang J-H, Muroyama R, Shao R-X, Dharel N, Sermsathanasawadi R, Kawabe T, Omata M. Polymorphism of OAS-1 determines liver fibrosis progression in hepatitis C by reduced ability to inhibit viral replication. **Liver Int** 2009; 29: 1413-1421(査読有)
- ⑧ Nakagawa H, Maeda S, Yoshida H, Tateishi R, Masuzaki R, Ohki T, Hayakawa Y, Kinoshita H, Yamakado M, Kato N, Shiina S, Omata M. Serum IL-6 levels and the risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients; An analysis based on gender differences. **Int J Cancer** 2009; 125: 2264-2269(査読有)
- ⑨ Sato T, Tateishi R, Yoshida H, Ohki T, Masuzaki R, Imamura J, Goto T, Kanai F, Obi S, Kato N, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Ultrasound surveillance for early detection of hepatocellular carcinoma among patients with chronic hepatitis C. **Hepatol Int** 2009; 3: 544-550(査読有)
- ⑩ 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(査読有)
- ⑪ Ohki T, Tateishi R, Sato T, Masuzaki R, Imamura J, Goto T, Yamashiki N, Yoshida H, Kanai F, Kato N, Shiina S, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Obesity is an independent risk factor for hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2008; 6: 459-464(査読有)
- ⑫ Sermasathanasawadi R, Kato N, Muroyama R, Dharel N, Shao R-X, Chang J-H, Li C-Z, Kawabe T, Omata M. Association of IRF-7 gene polymorphism with liver cirrhosis in chronic hepatitis C patients. **Liver Int** 2008; 28: 798-806(査読有)
- ⑬ Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Yoshida H, Sato S, Kato N, Kanai F, Sugioka Y, Ikeda H, Shiina S, Kawabe T, Omata M: Risk Assessment of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients by transient elastography. **J Clin Gastroenterol** 2008; 42: 839-843(査読有)
- [学会発表] (計 6 件)
- ① Kato N, Kumar V, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Otsuka M, Tateishi R, Yoshida H, Omata M, Koike K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide study identifies susceptibility loci for hepatitis C virus induced hepatocellular carcinoma. 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 2011/3/30-4/3. Berlin, Germany
- ② Li W, Muroyama R, Hu Z, Kowatari N, Goto T, Yoshida H, Li Q, Omata M, Koike K, Kato N. Core mutant ratio is associated with response to PEG-IFN/RBV treatment in HCV genotype 1b patients. The 21st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2011/2/17-20
- ③ Li W, Kato N. Mutant ratio of amino acid 70 in genotype 1b HCV core protein is associated with response to PEG-IFN/RBV treatment. The APASL 7th Single Topic Conference "Hepatitis C Virus". 2010/12/17-18. Chiba, Japan
- ④ Kato N. Quantification of hepatitis C virus genotype 1b codon 70 wild and mutant types and their response to PEG-IFN/RBV treatment. BIT's 1st World Congress of Virus and Infections 2010. 2010/7/31-8/3. Busan, Republic of Korea
- ⑤ Kato N, Hu Z, Muroyama R, Goto T, Kowatari N, Chang J, Omata M. Amino acid substitutions at position

70 of HCV genotype 1b core region is related to the increased HCC risk and non-virological response to PEG-IFN plus RBV combination therapy. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2009/10/3-7. Nice, France

- ⑥ 加藤直也、常金海、小俣政男. C型肝炎ウイルス増殖と病態を規定するインターフェロン関連分子とその多型. 第94回日本消化器病学会総会. 2008年5月8日. 福岡

[図書] (計2件)

- ① Omata M, Yoshida H, Shiina S, Kato N. Hepatocellular carcinoma “epidemics” in Japan. In: Karayiannis P, Main J, Thomas H eds. Hepatitis C virus. International Medical Press Ltd. 2009: 5.1-5.10
- ② 加藤直也. 肝胆膵診療エキスパートマニュアル. 羊土社. 2008: 192-196

[その他]

- ① 東京大学医科学研究所 発表論文解説: ゲノムワイド関連解析により HCV 陽性肝細胞癌の感受性遺伝子を同定 (<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/research/papers/hcv.php>)
- ② MTPPro 記事: 【寄稿】 遺伝子検査で慢性 C型肝炎患者の発がんリスクが予測可能に (<http://mtpro.medical-tribune.co.jp/mtpronews/1104/1104072.html>)

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 直也 (KATO NAOYA)
東京大学・医科学研究所・特任准教授
研究者番号: 90313220

(2)研究協力者

室山 良介 (MUROYAMA RYOSUKE)
東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号: 50549459