

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700507

研究課題名（和文） 質量分析計によるインターフェロン・リバビリン療法に対する治療効果
予測因子の同定研究課題名（英文） Identification of biomarker for the combination therapy with IFN
and ribavirin by the mass spectrometry研究代表者 矢野嘉彦 (YANO Yoshihiko)
神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60419489

研究成果の概要（和文）：

C型慢性肝炎は、高率に肝硬変や肝がんへと進行する予後不良な疾患である。根本的な治療法として、一般的にはペグ・インターフェロン(PEG-IFN)とリバビリン(RBV)の併用療法でウイルス駆除を行うことが多いが、著効率は未だ悪い。そこで研究代表者は、PEG-IFNとRBVの併用療法の著効例および非著効例に対して、低分子化合物の量的、質的な変動に対する代謝分子の総体の解析、すなわちメタボローム解析を行うことにより、新たな治療効果予測因子の同定や、さらには新たな治療法開発への応用を目指す。

研究成果の概要（英文）：

Hepatitis virus C is an oncogenic virus to induce liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma via chronic inflammation. Pegylated-interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV) combination therapy is an established therapy, but its efficacy is still low. Based on this background, identification of unknown biomarkers in relation to therapeutic efficacy was carried out by using of the mass spectrometry. This research would be helpful to develop a future therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学

キーワード：検査・診断システム

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)に感染すると(血

液を介した非経口的感染)、高率に慢性肝炎となり(55%~85%)、20~25年で5~20%が肝硬変になる。肝硬変になると年率1~4%の人々が肝がんを発症する。毎年日本では約35000人が原発性肝細胞がんで亡くなるが、そのうち約80%がC型肝炎ウイルス感染が原因と考えられている。C型肝炎ウイルス感染者は全世界では1億2000万人、わが国だけで150万人にもおよぶと推定されており、肝がんの予備軍と呼ぶことができる人々は多数存在する。C型肝炎を治療すると肝炎が沈静化され、肝硬変や肝がんへの進行を防ぐことができることがわかっている。なかでも最も効果的な治療がウイルス駆除である。近年、C型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法は飛躍的な進歩を遂げているが、未だ完全とは言えない。ウイルスのジェノタイプ(1型もしくは2型)、ウイルス量の多寡により治療法・治療効果が異なるが、最も奏効率の悪い1型高ウイルス量だと、最もよく効く治療法であるPEG-IFNとRBVの併用療法でも48%の著効率である。著効率を上げるためには、著効例と非著効例の差を検討すること、そのなかで新たな治療法を開発することが必要となる。また治療が奏功する人とそうでない人を治療前に予測できれば、患者の負担を軽減することができ、医療費の抑制にも貢献できるものと考えられる。

一方、薬理遺伝学の研究分野においては、患者個人の遺伝子型背景を解析することにより、薬剤の治療効果や副作用、至適投与量を予測する試みがなされており、これまでの画一化された治療法から、患者個々の遺伝子型に応じた薬物の投与が検討されている。薬物動態学/薬物力学解析の知見を理解し、患者個人の遺伝子型がもたらす薬物動態の影響を考慮することで、患者個人に対するオーダーメイド治療へ臨床応用できる可能性がある

る。近年、ヒトゲノム塩基配列の完全解読が宣言され、ポストゲノムシーケンス研究の重要性が示唆され、タンパク質解析によるゲノムの解析機能、診断や治療にSNPsなどの遺伝子多型や遺伝子の発現量をマーカーとして利用する試み、さらにゲノム創薬にむけてのホモロジー解析を中心としたゲノミクス研究や、X線、NMR等の構造生物学関連の構造プロテオーム研究も進められている。これらのことから、機能に関連したプロテオーム研究により、タンパク質の量的、質的変動に関する情報が得られ、相互に作用するタンパク質のリンケージ解析が行われ、その生理機能がより詳細に解明されるものと期待される。今後、このような具体的なタンパク質の機能解析に加えて、タンパク質以外の細胞内低分子の量的、質的な変動に対する代謝分子の総体の解析(メタボローム解析)が必要になると思われ、この分野を自分の研究分野に応用しようと着想した。

2. 研究の目的

病態時における細胞においては、疾患に関連したタンパク質の発現および活性の変動により、代謝・分解された新たな代謝産物が生成される。しかし、このような低分子量のペプチドや代謝産物を網羅的、包括的にメタボローム解析した研究は、これまでの質量分析計の精度、ならびにその解析ソフトの問題から、まだ十分な成果を上げていない。しかし近年、高感度液体クロマトグラフィーと質量分析計を組み合わせた複合解析システムが開発され、高速かつ精確な代謝産物の測定、定量が可能となった。そこで、この新たに開発された質量分析計ならびにその解析ソフトを含めた統合システムを使い、メタボリックフィンガープリンティングおよびメタボライトプロファイリングの手法によりイン

ターフェロン・リバビリン併用療法の著効例・非著効例のメタボローム解析を行う。これにより、新たな治療効果予測因子の同定、さらには治療方針の決定や新たな治療法開発への応用を目指す。

3. 研究の方法

課題Ⅰ：メタボリックフィンガープリンティングの適用性の検討

インターフェロン・リバビリン併用療法に対する治療効果予測因子を同定するためには、はじめにインターフェロン・リバビリン併用療法前後、さらには併用療法の著効例と非著効例とを分類、あるいは判別する必要がある。そこで、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）を用いて、代謝産物の変動をパターン解析するメタボリックフィンガープリンティングの手法を行うことで、併用療法前後、ならびに併用療法の著効例と非著効例とをグループ化する。

具体的には、「神戸大学大学院医学研究科医学倫理委員会規程」に従い、肝炎に対するインターフェロン・リバビリン併用療法を実施した患者から、治療前後の血液を提供していただく。血清を回収後、血清中の水溶性代謝産物および脂溶性代謝産物をそれぞれ別に抽出し、得られた抽出液をLC/MSに供する。続いて、得られたクロマトグラムおよびマススペクトラムを用いて主成分分析による比較解析を、インターフェロン・リバビリン併用療法前後で実施する。次に、インターフェロン・リバビリン併用療法効果について臨床的カテゴリーによる評価を実施し、併用療法の著効例と非著効例とに大別してクロマトグラムおよびマススペクトラムを用いて主成分分析による比較解析を実施する。

課題Ⅱ：代謝産物の変動からみた肝炎発症機

構の解明

メタボライトプロファイリングにより変動が確認された代謝産物についての情報とKEGG代謝マップ等のデータベースとを比較検討することで、肝炎が発症した際に誘導される代謝変動を明らかにし、代謝変動の観点から肝炎発症機構を解明する。また、インターフェロン・リバビリン併用療法の著効例と非著効例との間で変動が確認された代謝産物についても同様に比較検討を行い、治療効果の差異の原因を明らかにする。さらには、得られた結果を総合的に評価することで、インターフェロン・リバビリン併用療法が非著効であった場合の将来的な肝炎治療に対するターゲット化合物の候補を明らかに、肝炎治療に対する研究への進展の足がかりとする。

4. 研究成果

C型慢性肝炎は、高率に肝硬変や肝がんへと進行する予後不良な疾患である。根本的な治療法として、一般的にはペグ・インターフェロン（PEG-IFN）とリバビリン（RBV）の併用療法でウイルス駆除を行うことが多いが、著効率は未だ悪い。そこで研究代表者は、PEG-IFNとRBVの併用療法の著効例および非著効例に対して、低分子化合物の量的、質的な変動に対する代謝分子の総体の解析、すなわちメタボローム解析を行うことにより、新たな治療効果予測因子の同定や、さらには新たな治療法開発への応用を目指している。今年度は、臨床サンプルを用いた前処理条件・分析機器条件・データ解析手法の最適化をはかった。臨床サンプルが含有する低分子代謝物の多様性・複雑性を考慮し、主な分析機器としてはGCMSを用いて検討した。水/メタノール/クロロホルム混合溶媒を用いて水溶性/脂溶性代謝物を回収し、(Blight & Dyer

法)、誘導体化処理を行った後に GCMS による解析に供した。さらに解析に必要なサンプル量の検討を行った。これらの予備実験の検討がほぼ終了し、現在、正常人ならびに肝炎ウイルス患者の臨床サンプルを用いて検討を行っている。今後、ガスクロマトグラフィー質量分析計による測定を実施して、治療前後の血清代謝産物存在パターンが健常人に近づくのか否かなどを検討することで、治療効果予測への適用性に関しても明らかにする。

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 5 件)

1. Kawano Y, Nishiumi S, Tanaka S, Nobutani K, Miki A, Yano Y, Seo, Y, Ashida H, Kutsumi H, Azuma T, and Yoshida M. Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor Induces Hepatic Steatosis via Upregulation of Fatty Acid Transport. Arch Biochem Biophys. 2010;504: 221-227.
2. A case of Budd-Chiari syndrome: Gd-EOB-DTPA-enhanced MR findings. Kitajima K, Yoshikawa T, Seo Y, Ohno Y, Yano Y, Miki A, Kanda T, Kanata N, Azuma T, Sugimura K. Magn Reson Imaging. 2011: in publication.
3. Utsumi T, Yano Y, Lusida MI, Amin M, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Serologic and molecular characteristics of hepatitis B virus among school children in East Java, Indonesia. Am J Trop Med Hyg 2010;83:189-193.
4. Youssef A, Yano Y, Utsumi, El-alah E, El-Hameed A, Serwah A, Hayashi Y. Molecular epidemiological study of hepatitis viruses in Ismailia, Egypt. Intervirolog

2009;52:123-131.

5. Utsumi T, Lusida M, Yano Y, Nugrahaputra E, Amin M, Juniastuti, Soetjipto, Hayashi Y. Hotta H. Complete genome sequence and phylogenetic relatedness of hepatitis B virus isolates in Papua, Indonesia. J Clin Microbiol. 2009;47:1842-1847.

[学会発表] (計 4 件)

- 第 13 回日本肝臓学会大会
第 38 回日本肝臓学会西部会
第 46 回日本肝臓学会総会
第 14 回日本肝臓学会大会

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/gi/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野嘉彦 (YANO Yoshihiko)

神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60419489

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし