

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590737

研究課題名（和文）C型慢性肝炎に対するIFN治療におけるIL28B多型とコア領域変異の影響

研究課題名（英文）Impact of viral amino acid substitutions and host IL28B polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus

研究代表者 今村 道雄 (IMAMURA MICHIO)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：40403513

研究成果の概要（和文）：ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、C型肝炎ウイルスのCore70および91のアミノ酸変異はウイルスの感染、増殖、インターフェロン（IFN）感受性には影響が無いのに対し、IFN感受性決定領域（ISDR）変異は感染および増殖能を低下させることを見出した。さらにIL28B遺伝子型（rs8099917）がTTの症例では、TG/GGの症例に比べ、IFN投与前の肝臓内IFN誘導遺伝子（ISGs）の発現量が低く、IFN投与後、これらの発現が強く誘導されるため、IFN治療効果が高い可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

Using human hepatocyte chimeric mice, we found that hepatitis C virus (HCV) replication levels and response to interferon (IFN) are affected by mutations in the ISDR, not by amino acid substitutions in HCV Core region. We also found that the effect of IFN was significantly greater, and intrahepatic expression levels of IFN-stimulated genes were significantly higher in mice with the favorable IL28B allele.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：消化器内科

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型慢性肝炎，インターフェロン，IL28B遺伝子多型，HCV Core変異，ISDR，ヒト肝細胞キメラマウス

1. 研究開始当初の背景

C型慢性肝炎に対するインターフェロン

（IFN）治療効果には、種々の因子が関与している。ウイルス側因子としてはC型肝炎ウ

イルス (HCV) genotype, ウイルス量の他, Core領域 70 および 91 番目および IFN 感受性規定領域 (ISDR) の変異数が挙げられる. また宿主因子としては IL28B 遺伝子多型が挙げられる. これらの因子は IFN 療法の治療効果に関与していることが知られているが, どのような機序により治療効果に関与しているのかは明らかでない.

2. 研究の目的

HCV Core および ISDR 変異あるいは IL28B の遺伝子多型がどのように治療効果に関与しているのかを HCV 感染マウスを用いて検討した. また C 型慢性肝炎患者の肝生検サンプルを用いて, IFN 治療前の肝臓内 IFN 誘導遺伝子 (ISGs) 発現量と IFN 治療効果を検討した.

3. 研究の方法

Genotype 1b 型の急性重症 C 型肝炎患者の血清よりクローニングした HCV 全長クローン (HCV-KT9) を用いた. HCV-KT9 はコア領域に R70Q および L91M のアミノ酸変異を有していた. 一方, NS5A の ISDR 領域には変異を認めなかった (Core-Mutant-ISDR 0). このクローンの ISDR 領域に 4 カ所 (Core-Mutant-ISDR 4) または 9 カ所 (Core-Mutant-ISDR 9) のアミノ酸変異を挿入したクローン, およびコア領域の aa70 および 91 のアミノ酸変異を野生型に置換させたクローン (Core-Wild-ISDR 0), さらに ISDR 領域に 4 カ所 (Core-Wild-ISDR 4) または 9 カ所 (Core-Wild-ISDR 9) のアミノ酸変異を挿入した 6 種類のクローンを作製した. 全長 cDNA を挿入した plasmid より, *in vitro* transcription 法により RNA を合成し, 30 ug の RNA をヒト肝細胞キメラマウスの肝臓内に直接注入した. ヒト肝細胞キメラマウスは 4 種類のヒト肝細胞 (Donor A, B, C, D) を移植したマウスを使用した. Donor A, B, C, D の IL28B 遺伝子型 (rs8099917) は TG, TT, TG, TT であった. 注入後, 2 週おきにマウス血清を採取し, real-time PCR により血中 HCV RNA を定量した. さらに 1,500 IU/g の IFN- α を 2 週間連日投与した. また

C 型慢性肝炎患者の肝生検サンプルを用いて I 治療前の肝臓内 ISGs 発現量とその後の行ったペグインターフェロン/リバビリン併用療法の治療効果の関係を検討した.

4. 研究成果

ヒト肝細胞キメラマウスを用いて, HCV の Core および ISDR 変異あるいは宿主の IL28B 遺伝子多型が, ウイルスの感染, 増殖および IFN 感受性に及ぼす影響を検討した. Core 領域の 70 および 91 番が野生型 (Core-Wild), 変異型 (Core-Mutant) あるいは ISDR に変異を 0, 4, 9 カ所挿入した HCV 全長クローンを作製し, ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓内に投与した. Core 変異の有無は, 感染成立率, 血中 HCV RNA 量, IFN 投与による血中 HCV RNA の低下量に影響はなかったが, ISDR の変異は感染成立率, 血中 HCV RNA 量を明らかに低下させた. また IL28B 遺伝子型 (rs8099917 SNP) が TT の肝細胞を移植したマウスと TG の肝細胞を移植マウスでは, 感染の成立率は同程度であったが, 前者のマウスでは後者のマウスに比べ, 血中 HCV RNA 量が有意に高値であり, IFN- α 投与による肝臓内 ISGs 発現量が有意に高く, 血中 HCV RNA 低下量も有意に高かった. これらの結果から, HCV の Core の変異はウイルスの感染, 増殖, IFN 感受性には影響が無いのに対し, ISDR 変異は感染および増殖能を低下させるものと考えられ, また rs8099917 TT の症例は, IFN 投与による肝臓内 ISGs 発現量が高く, IFN 治療効果が高いことが示唆された.

Genotype 1 型の C 型慢性肝炎患者において IL28B 遺伝子多型が TG/GG のマイナーアレルの症例はペグインターフェロン/リバビリン併用療法の治療効果が低い, これらの症例の中でも治療によって一度でも血中ウイルスの陰性化が得られる症例 (VR, virological response) と一度も陰性化が得られない症例 (NVR, non-virological response) がある. 1 型 HCV 感染患者の肝生検サンプルを用いた解析では, ペグインターフェロン/リバビリン併用 (PR) 療法によって一度でも血中ウイルスの陰性化が得られた症例 (VR, virological response

) は、一度も陰性化が得られない症例 (NVR, non-virological response) に比べ、肝臓内のPKR, OAS, MxAなどのインターフェロン誘導遺伝子 (ISGs) 発現量が有意に低かった。さらにIL28B多型別に検討するとTTの症例ではTG/GGの症例に比べ、これらの発現は有意に低かった。ヒト肝細胞キメラマウスの結果と併せると、IL28B TTの症例は、TG/GGの症例に比べ肝臓内ISGs発現量が低く、IFN投与によりその発現がより強く誘導されるため、治療効果が高いことが示唆された。またこれらの結果から、難治性のIL28B遺伝子型を有する患者には、肝臓内ISGs発現を強く誘導させる、またはISGs発現を介さないIFN以外の治療法の開発が必要と思われた。

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4件)

- 1) Chayama K, Hayes CN, Imamura M. Impact of interleukin-28B genotype on in vitro and in vivo systems of hepatitis C virus replication. *Hepatology*, 査読あり, 42(9):2012, 841-53
- 2) Hayes CN, Imamura M, Aikata H, Chayama K. Genetics of IL28B and HCV-response to infection and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 査読あり, 9(7):2012, 406-17
- 1) Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host IL28B polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology*, 査読あり, 54(3):2011, 764-771
- 2) Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tsuge M, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Inverse association of IL28B genotype and liver mRNA expression of genes promoting or

suppressing antiviral state. *J Med Virol*, 査読あり, 83(9):2011, 1597-607

[学会発表] (計6件)

- 1) 今村道雄, 阿部弘美, 平賀伸彦, 越智秀典, 茶山一彰. C型肝炎ウイルスの感染およびIFN治療におけるIL28B遺伝子多型の影響. 第77回インターフェロンサイトカイン学会 神戸 2012年6月1日.
- 2) Michio Imamura, Hiromi Abe, Nobuhiko Hiraga, Masataka Tsuge, Shoichi Takahashi, C. Nelson Hayes, Hidenori Ochi, Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato, Kazuaki Chayama. Impact of Viral Amino Acid Substitutions and Host IL28B polymorphism on Replication and Susceptibility to Interferon of Hepatitis C Virus. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011年11月4日
- 3) Michio Imamura, Nobuhiko Hiraga, Masataka Tsuge, Shoichi Takahashi, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes, Hidenori Ochi and Kazuaki Chayama. The influences of viral mutations on HCV infectivity, replication ability and the susceptibility to interferon in human hepatocyte chimeric mice. The 7th APASL Single Topic Conference, Chiba, 2010年12月17日
- 4) Michio Imamura, Hidenori Ochi, Hiromi Abe, Tomokazu Kawaoka, Yoshimasa Hashimoto, Shoichi Takahashi, C. Nelson Hayes, Kazuaki Chayama. IL-28B predicts response to peginterferon-alfa-2b plus ribavirin therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *HCV 2010*, Yokohama, 2010年9月13日
- 5) 今村道雄, 越智秀典, 茶山一彰. C型慢性肝炎患者におけるIL28B多型とウイルス側および宿主側因子との関連. 第46回日本肝臓学会総会 山形 2010年6月27日.
- 6) 今村道雄, 越智秀典, 茶山一彰. C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療におけるIL28B多型とCore領域変異の影響.

第 96 回日本消化器病学会総会 新潟
2010 年 4 月 23 日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

今村 道雄 (IMAMURA MICHIO)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：4 0 4 0 3 5 1 3

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：