

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 29 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590751

研究課題名（和文）HCV IRES 領域の遺伝子変異解析を用いた C 型慢性肝炎治療効果予測法の確立

研究課題名（英文）Establishment of predictors in treatment response of chronic hepatitis C by mutational analysis of internal ribosome entry site within hepatitis C virus

研究代表者

緒方 啓 (OGTATA 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）を行い、著効・無効・再燃となった C 型慢性肝炎（以下 CH-C）を 60 例以上解析。各例の HCV RNA における internal ribosome entry site（以下 IRES）領域の遺伝子変異解析を施行した。無効群においては、過去にインターフェロン治療歴を有する例が多く、それらの例では IRES の domain III（以下 d III）領域に変異を有さない例が多かった。一方、著効例では IRES の domain III に変異を有する例が多い傾向であった（ $P < 0.05$ ）。即ち、過去の抗ウイルス療法により抵抗性 HCV が選択されている可能性が示唆された。また再燃例において、治療終了時（市販の HCV RNA 定性法で陰性時）の血清からクローニングされた IRES の塩基変異解析を行うと、IRES 領域の 119 番目の塩基に特徴的な変異を有することが分かった。PEG・RBV 療法の無効群・著効群において IRES 119 番目塩基の変異を比較すると、両群において差を認め、さらに HCV コア領域の変異と相関することが分かった。即ち HCV の IRES 塩基変異とコア変異との関連性が、治療効果と相関することが示された。ウイルス側因子としての治療抵抗性メカニズムを探求する上で重要な知見と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Combination therapy with pegylated interferon and ribavirin (below, PEG/RBV treatment) was performed, and 60 or more cases of Chronic Hepatitis C (below, CH-C), resulting in responders, non-responders and relapsers, were analyzed. An analysis was performed of the genetic mutation in the internal ribosome entry site (below, IRES) area of the HCV RNA in each case. In the non-response group, many cases had a history of previous interferon therapy, and in those cases, many cases had no mutations in the IRES domain III (below, d III) area. On the other hand, in the response cases, there was a tendency ($P < 0.05$) for many cases to have mutation in IRES d III. In other words, this indicates that there is a possibility that resistant HCV due to previous antiviral therapy is being selected. In the relapse cases, when an analysis was performed of the IRES base mutation cloned from blood serum at the conclusion of treatment (when negative, by a commercially available HCV RNA qualitative method), it was found that there was a characteristic mutation in base 119 in the IRES area. In the non-response group and response group for PEG/RBV treatment, when IRES base 119 mutations were compared, a discrepancy was observed between both groups, and furthermore, a correlation was found with HCV core area mutations. In other words, a correlation was indicated between the relationship between HCV IRES base mutations and core mutations, and the treatment results. In the search for the treatment resistant mechanism as a viral factor, this is believed to be an important finding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

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型慢性肝炎、IRES、ペグインターフェロン、リバビリン、効果予測

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の開始当初、日本におけるC型慢性肝炎(以下 CH-C)に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法(以下 PEG・RBV療法)の治療成績は、大多数を占める genotype 1 型・高ウイルス例において約 50%の著効率であった。また、PEG・RBV療法は少なからず副作用を伴い、中止する例も多かった。その為に、より正確な効果予測因子を確立することは急務であった。

(2) CH-C の治療効果を決定する因子としては、ウイルス側因子と宿主側因子に分けられる。ウイルス側因子としては従来、Akuta ら(文献 1)が報告する HCV コア変異などの HCV RNA 遺伝子変異が治療感受性を決定する 1 つの要因として考えられてきた。

(3) 宿主側因子としては、長い間、決定的な要因が同定されなかったが、2009 年に Tanaka ら(文献 2)が IL-28B 遺伝子変異の差が、強力な効果予測因子となりうることを報告した。

(4) 筆者は、これまで HCV RNA の internal ribosome entry site(以下 IRES)に着目して研究を行ってきた。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 領域の遺伝子変異を調べたところ、著効例と無効例で IRES の変異パターンに差を認め、IRES 変異と CH-C の治療効果との関連性が筆者により初めて示唆された(文献 3)。

(5) さらに筆者は 2007-2009 年度における科研費(若手(B))における研究成果として、IRES の変異は IFN・RBV療法のみならず、PEG・RBV療法においても治療効果との関連性があることを報告した。

(6) 一方、CH-C 症例は年々高齢化が進んで

おり、最適な治療法選択や治療完遂、副作用対策の為に、新たな効果予測因子を 1 つでも多く見出すことが重要である。さらに先述した既知の因子と組み合わせることで、より正確な治療方針決定につながると考えられる。

(参考文献)

- 1) Akuta N, et al, J Med Virol 2007, 79, 1686-95.
- 2) Tanaka Y, et al, Nat Genet 2009, 41, 1105-09.
- 3) Ogata K, et al, Arch of Virol 2008, 153, 1575-79.

2. 研究の目的

(1) 新たな効果予測因子をウイルス側から見出すことを最大の目的とする。治療方針決定に有用であるばかりでなく、新規薬剤への開発にもつながる可能性がある為である。

(2) 基礎医学と臨床医学の両方の観点から、CH-C 治療の問題点を浮かび上がらせて今後の対策への一助とする。

3. 研究の方法

(1) PEG・RBV療法を行う genotype 1b 且つ高ウイルス量の CH-C 症例を prospective に集積する。これまでの研究成果で培ったノウハウを基に、症例の治療前血清からクローニングされた HCV IRES 領域の遺伝子変異解析を行い、IRES 領域の中で治療感受性・抵抗性を決定する領域をさらに絞り込んでいく。IRES 領域のクローニング方法は TA cloning 法および direct sequence 法を用いた。

(2) 得られた data を基に、他の臨床パラメータと共に統計学的解析を行っていく。最終的に、PEG・RBV療法を行う CH-C 症例における、より正確な効果予測因子を見出す。

(3) 対象とする CH-C 症例を、治療効果により以下に分類した。

①無効群：治療開始後に HCV RNA が陰性化せず、無効であった例。

②再燃群：治療開始から 24 週以内に HCV RNA が陰性化したか、治療終了後に再燃した例。一部の例は延長投与を行った。

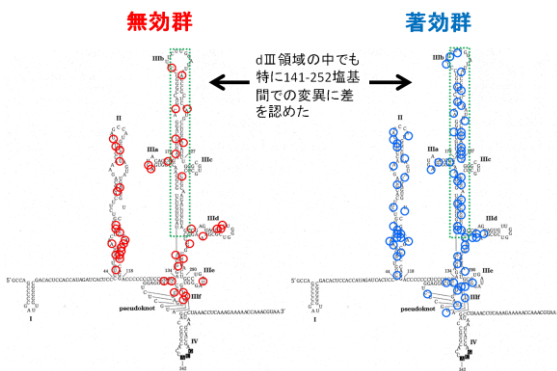
③著効群：治療開始から 12 週以内に HCV RNA が陰性化し、著効した例。

4. 研究成果

(1) 無効群・著効群での IRES 変異

PEG・RBV 療法を行い無効であった 24 例および著効であった 29 例を対象に、IRES 塩基配列を TA cloning 法にて解析した。その結果、図 1 に示すように dIII 領域に変異の差を認めた。即ち、著効群において dIII 領域の変異を多く認めた。

図1：両群での IRES 変異の比較



(2) IRES 変異と IFN 治療歴との関連

無効群および著効群における臨床背景因子の比較を行ったところ、表 1 に示すように IFN 治療歴と IRES dIII 141-252 変異の有無において有意差を認めた。即ち、IRES dIII 141-252 変異を有する例は治療に反応する傾向があるが、過去に IFN 歴があり且つ IRES dIII 141-252 変異を有さない場合は、過去の治療により抵抗性 HCV が selection されている可能性が示された。

表1：IRES 変異と臨床背景因子の比較

	無効群 (n=24)	著効群 (n=29)	
年齢	56.2±8.8	52.5±11.7	N.S. ^a
性別(M/F)	12 / 12	19 / 10	N.S. ^b
HCV-RNA(Log IU/ml)	6.4±0.3	6.3±0.3	N.S. ^a
血小板(x10 ⁹ /ul)	15.9±4.6	15.7±4.5	N.S. ^a
Hb(g/dl)	14.2±1.4	14.1±1.4	N.S. ^a
肝生検組織(F1,2/3,4)	13 / 6	17 / 7	N.S. ^b
IFN 歴(あり/なし)	11 / 12	6 / 23	P < 0.05 ^b
dIII 141-252 変異(あり/なし)	9 / 15	25 / 4	P < 0.05 ^c

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

(3) 治療抵抗性因子の同定

2007-2009 年度における若手(B) 科研費研究においては、PEG・RBV 療法における治療抵抗性因子の 1 つとして、IRES の domain II 領域の stem 部位の変異の差が示唆された。しかし今回の研究で症例数を重ねるに従い、両群での差が認められなかった。その為、新たな視点で抵抗性因子を模索する必要性があった。そこで今回、再燃群の治療経時的サンプルから得られた HCV のウイルス学的解析を行うことで、抵抗性 HCV の特徴を見出すことを試みた。

(4) 再燃群における HCV の特徴

6 例の再燃例において、治療終了時(市販の HCV RNA 定性法にて陰性)の血清から、独自の高感度 RT-PCR 法および PCR 法にて HCV IRES 領域のクローニングを行うことができた。さらにこの 6 例の治療前・再燃時のサンプルから IRES のクローニング(direct sequence)を行い比較したところ、119 番目の塩基に特異的な変異が生じていることが分かった。(図 2) 即ち、治療前に比べて終了時および再燃時には IRES 119 番目の塩基は T から A に変異している傾向があった。この結果より、IRES の 119 番目の塩基が A である HCV は治療抵抗性である可能性が示唆された。(図 3)

図2：再燃群における IRES 119 塩基変異の経時的推移

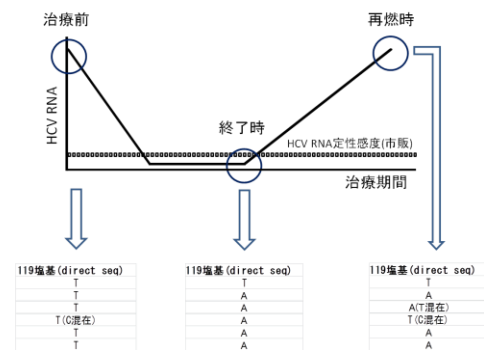
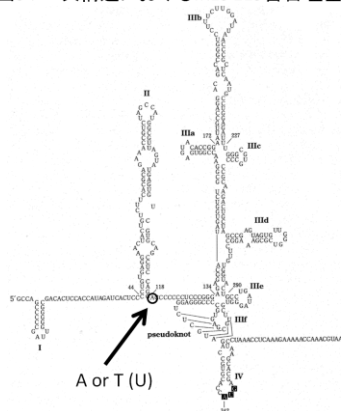


図3：二次構造における IRES 119 番目塩基の位置



(3) 治療抵抗性因子の同定

(5) 無効群・著効群での IRES 119 塩基変異
PEG・RBV 療法の再燃群の解析から得られた治療抵抗性 HCV の特徴を、PEG・RBV 療法無効群・著効群で再検証するために、prospective に計 33 例を集積した。両群の背景因子を表 2 に示す。各例の治療前のサンプルから IRES をクローニングし、direct sequence 法にて塩基配列を比較した。その結果、無効群 16 例中 10 例において IRES 119 番塩基は A であり、著効群 17 例中 10 例において IRES 119 番塩基は T であった。119 番目以外に両群において傾向の差が出る塩基部位は認めなかった。

(6) IRES119 番塩基とコア変異との関連

保存性が高い IRES の中で 119 番目の塩基に diversity が存在することは、何らかのウイルス学的意義があると考えられる。そこで (5) における 33 例において、既知の効果予測因子である HCV コア変異との関連を解析した。表 2 に示すように、両群においてコアの 70 番アミノ酸変異の差に有意差を認めた。さらにコア 70 番アミノ酸変異と IRES119 塩基変異との関連を解析したところ、著効群においては IRES119 塩基が T の際にコア 70 番アミノ酸が wild である傾向、無効群においては IRES119 塩基が A の際にコア 70 番アミノ酸が mutant である傾向が強く、有意差を認めた (表 2)。従来、コア 70 番アミノ酸が mutant であることは、治療抵抗性となりやすい因子とされてきた。その為、この結果から CH-C のウイルス側の治療抵抗性因子の 1 つとして、IRES 変異とコア変異の相関が示唆されたと考えられた。

表 2: 無効および著効群の背景因子 (IRES119 塩基のデータ含む)

	無効群 (n=16)	著効群 (n=17)	
年齢	56.7±10.0	52.8±9.4	N.S. ^a
性別(M/F)	10 / 6	10 / 7	N.S. ^b
HCV-RNA(Log IU/ml)	6.4±0.3	6.2±0.5	N.S. ^a
血小板(x10 ⁹ /ul)	16.7±5.2	16.5±4.7	N.S. ^a
Hb(g/dl)	14.4±1.6	13.9±1.4	N.S. ^a
肝生検組織(F1,2/3,4)	9 / 3	10 / 4	N.S. ^c
Core70(wild/mutant)	5 / 11	12 / 5	P < 0.05 ^c
Core70W+IRES119T / Core70M+IRES119A	3 / 8	9 / 4	P < 0.05 ^c

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

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 1 件)

① Kuhara K, Ide T, Uchimura N, Kumashiro R, Arinaga T, Miyajima I, Murashima S, Ogata K, Kuwahara R, Fujimoto Y, Sakai K,

Ishii K, Morita Y, Shirachi M, Sata M
The Importance of a Prior Psychiatric Examination in Pegylated Interferon and Ribavirin Combination Treatment for Chronic Hepatitis C. 査読有, Kurume Medical Journal, Vol. 59, 2012, 39-44.

[学会発表] (計 4 件)

① 緒方 啓, 井出達也, 桑原礼一郎, 宮島一郎, 有永照子, 佐田通夫. HCV RNA 定性陰性のサンプルからクローニングされた HCV のウイルス学的特徴. 第 16 回日本肝臓学会大会, 2012 年 10 月 10 日, 神戸市

② 緒方 啓, 井出達也, 桑原礼一郎, 宮島一郎, 有永照子, 古賀郁利子, 神代龍吉, 佐田通夫. HCV IRES 領域の変異と治療感受性に関するウイルス学的検討. 第 15 回日本肝臓学会大会, 2011 年 10 月 20 日, 福岡市

③ K Ogata, T Ide, M Sata et al, Strong correlation between mutations in IRES domain III region of hepatitis C virus and sensitivity to anti-viral therapy for chronic hepatitis C. 第 33 回日本分子生物学会年会, 2010 年 12 月 10 日, 神戸市

④ K Ogata, T Ide, M Sata et al, Comparative study of mutations of HCV IRES is useful for the prediction of the effectiveness of the pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C. 第 61 回米国肝臓学会, 2010 年 10 月 31 日, 米国・ボストン

[図書] (計 1 件)

① 井出達也, 有永照子, 宮島一郎, 緒方啓, 久原孝一郎, 桑原礼一郎, 佐田通夫. 医事出版社, C 型慢性肝炎におけるインターフェロン治療 - 治療の工夫とウイルス側要因 - 肝臓フォーラム' 10 記録集
発行年: 2011 年
ページ: p 136 ~ p 144

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: