

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 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790622

研究課題名（和文） HCV 母子感染例における HCV ゲノム分子進化速度と IFN 治療効果の関係

研究課題名（英文） Relationship between the nucleotide substitution rate of the hepatitis C virus and the effects of interferon therapy in children.

研究代表者

伊藤 孝一（ITO KOICHI）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00444977

研究成果の概要（和文）：HCV 母子感染例の小児 7 例を対象に PEG-IFN 単独療法直前、治療後 2-4 週での HCV NS5b 領域の遺伝子解析を行った。PEG-IFN α -2a 90 μ g または 180 μ g を週 1 回、24 週間または 48 週間皮下注投与され、6 例は治療完遂し、1 例は 12 週で治療中止した。治療 4、8 週時の HCV-RNA 陰性化は、2 例（29%）、7 例（100%）。治療終了後 24 週での HCV-RNA 陰性（SVR）は 6 例（86%）。7 例全てにおいて治療後 2-4 週時点で HCV NS5b 領域に変異を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：Seven children infected by hepatitis C virus were treated with PEG-IFN α -2a at a dose of 90-180 μ g/kg s.c., once a week for 24-48 weeks. Six patients completed the treatment. One patient discontinued the treatment at 12 weeks. RVR was achieved in 2 (29%) of the 7 patients. EVR was achieved in 7 (100%) of the 7 patients. SVR was achieved in 6 (86%) of the 7 patients. We isolated HCV-RNA from the sera of 7 children and analyzed the NS5b region. The nucleotide sequences in the NS5b region of HCV obtained from each of the children under treatment were identical to those of before treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	400,000	120,000	520,000
2011 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
年度			
総計	700,000	210,000	910,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：HCV・遺伝子・NS5B・IFN・母子感染

1. 研究開始当初の背景

(1) 最近では、輸血用血液のスクリーニング法が進み HCV の感染経路として輸血によるものはほとんど無くなり、新たな患者の発生は減少している。しかし、残念ながら、現時点では HCV については確立された母子感染予防法

はなく、母親の血清中 HCV RNA が陽性の場合、その約 10% に母子感染が成立するとされ、現在でも全国では数百人規模の新規感染例が存在すると推定される。感染例の約 2/3 は HCV キャリアの状態となり、大部分は小児期から成人に至るどこかで慢性肝炎を発症する。

今後、これら母子感染例の予後を予測し、治療を進めていく上で、HCV 母子感染の病態を解明することは、重要な課題の一つと考えられる。今回、我々は HCV 母子感染例を対象に、検出したウイルスの遺伝子解析を実施することにより、病態の一部を解明したいと考え今回の着想に至った。

(2) HCV 遺伝子のNS5B 領域は、HCV RNA ゲノムの複製において重要な役割を担っている RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) をコードし、その領域の変異はHCV RNA の複製に重要な影響を与えることが、明らかとなっており、インターフェロン (IFN) 治療との関連性も指摘されている。しかし、HCV母子感染例の小児期におけるHCV NS5B領域の多様化(進化)について検討された研究は少なく、特にIFN治療中のNS 5B領域の変異についての詳細は不明である。そこで、今回我々はHCV NS5B領域を主要な解析対象とした。

(3) 我々は以前の報告で、HCV 母子感染例において、出生時、母子のHCV クローンの高変異領域 (HVR) の E2/NS1 を比較すると、児から検出された株は必ずしも母親から検出されたそれと一致するわけではなく、その後の経過でウイルスが多様な変化を来すことを示した。また、NS5B 領域を対象とした研究では児の塩基置換速度は母と比較して遅い傾向があることを明らかにした。このことは宿主の immune pressure の違いを反映していると示唆された。今回は塩基置換速度の違いが、IFN治療効果に与える影響を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

PEG-IFN 単独療法を施行した HCV 母子感染例の小児を対象に、その血清から RT-PCR 法、Direct Sequence 法を用いて HCV NS5B 領域の遺伝子を増幅し、塩基配列を決定する。経時的に採取した血清から、検出したウイルスの塩基配列の変化を調査し、治療前と治療中の塩基置換速度を比較する。また、塩基置換速度と IFN 治療効果との関係についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PEG-IFN 単独療法を施行したHCV母子感染

例の小児を対象に、血液を採取。採取した血液は凝固後、直ちに遠心し、RNA抽出時まで凍結保存した。

(2) 保存血清50 μ lよりSepaGene-RVR (三光純薬)を用い、添付のマニュアルに従いRNAを抽出した。抽出したRNA、random primer及び逆転写酵素SuperScript IIを用い、cDNAを作成後、NS5B領域に設定したprimer及び、FastTaqを用い、nested PCR法で増幅した。用いたプライマー配列はNS5B_8278S(8258-8278):

TGATACCCGCTGYTTTGACTCと

NS5B_8618AS(8618-8639):

GTACCTGGTCATAGCCTCCGTGである。

増幅産物は、3%アガロースゲルで泳動後、陽性バンドからDNAを切り出した。切り出したDNA、2nd PCRで用いたprimer、BigDye Kit (Applied BioSystems)にて、Sequence反応を実施し、ABI 3100 DNAシーケンサーでNS5B領域の336塩基配列の塩基配列を決定 (Direct Sequence法)した。

(3) IFN治療前、治療中のウイルスのNS5B領域の336塩基配列を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 対象は母子感染による小児HCV感染7例(3-16歳,男:女=4:3)。HCV 遺伝子型と血中ウイルス量の内訳は、Genotype 1b 高ウイルス量1例、Genotype 2a 高ウイルス量5例、Genotype 2b 高ウイルス量1例。抗ウイルス療法としてPEG-IFN α -2a 90 μ g または 180 μ g を週1回、24週間または48週間皮下注射与を行った。減量・中止基準は添付文書に従った。6例は治療完遂し、1例はALT著増のため12週で治療中止した。治療4週時、8週時のHCV-RNA陰性化は、それぞれ2例(29%)、7例(100%)だった。治療終了後24週でのHCV-RNA陰性(SVR)は6例(86%)だった。治療中止した1例も4年以上HCV-RNA陰性が続いている(表1)。副作用は発熱5例、ALT上昇3例、下痢2例、脱毛2例、好中球減少2例、関節痛1例。

表1 患者背景

症例	性	年齢	遺伝子型	ウイルス量(U/ml)	治療期間(週)	治療	HCV-RNA陰性化(週)	SVR
1	F	8	1b	1300	52	完遂	8	+
2	M	5	2a	1400	9	中止	8	+
3	F	16	2a	1300	24	完遂	4	+
4	M	5	2a	1000	48	完遂	8	+
5	F	12	2b	1000	48	完遂	8	+
6	M	5	2a	1000	48	完遂	4	+
7	M	3	2a	1000	48	完遂	8	+

(2) IL28B 遺伝子多型解析は 6 例がメジャーアレル (TT)、1 例がマイナーアレル (TG) だった(表 2)。

表2 IL28B遺伝子多型 (rs8099917)

症例	IL28
1	TT
2	TT
3	TT
4	TG
5	TT
6	TT
7	TT

(3) 治療開始後 4 週間で HCV-RNA の陰性化が確認された症例 1, 2, 4, 5, 7 については治療直前、治療 2 週目、4 週目の血液検体を用いた。治療開始後 8 週間で HCV-RNA の陰性化が確認された症例 3, 6 については治療直前、治療 2 週目、3 週目の血液検体を用いた。解析を行った 7 例全てにおいて、治療中の HCV NS5B 領域の塩基配列は治療直前のものと同じであり、変異を認めなかった。

(4) 成人領域では IL28B 遺伝子多型のうち、代表的な SNP である rs8099917 (マイナーアレル G) の治療効果別のアレル頻度を解析すると、治療反応群では、メジャーアレル (TT) の割合が高く、無効群ではマイナーアレル (TG+GG) の割合が高く、マイナーアレルの患者では治療抵抗性であることが示されている。今回の検討では、症例 4 はマイナーアレルにも関わらず、著効を示した。症例 4 は HCV 遺伝子型が著効しやすい 2a 型であったことと、小児であることが、著効を得られた

要因と考えられる。IL28B 遺伝子解析が、治療効果の予測に有用であることは既に成人領域で示されており、小児においても今後、症例を増やして検討する必要がある。

(5) NS5B 領域に変異をきたした場合、HCV 複製機構に大きな影響を与え、ウイルス増殖能は大幅に低下する可能性がある。今回の検討では PEG-IFN 治療によって HCV NS5B 領域に変異をきたさないことが示されたため、IFN の抗ウイルス効果は別の機構によるものと考えられた。

(6) 小児 C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN 単独療法の治療成績は良好であり、安全性も高い。今後の課題は、IFN 治療による HCV の他の遺伝子領域が変異の有無と、治療効果との関係である。症例を増やして検討を行いたい。

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 2 件)

- ① Tomoyuki Tsunoda, Ayano Inui, Yuri Etani, Yuki Kiyohara, Tokio Sugiura, Koichi Ito, Reiko Miyazawa, Ikuo Nagata, Shinobu Ida, Tomoo Fujisawa, Efficacy of pegylated interferon- α 2a monotherapy in Japanese children with chronic hepatitis C, Hepatology Research, 査読有, 41, 2011, 393-404
- ② 伊藤孝一、杉浦時雄、後藤健之、新生児の経静脈栄養に伴う胆汁うっ滞症、日本臨床 領域別症候群シリーズ 肝・胆道系症候群I 肝臓編 (上)、査読無、2010、406-409

[学会発表] (計 11 件)

- ① 杉浦時雄、遠藤剛、伊藤孝一、PEG-IFN 単独療法が有効であった C 型肝炎ウイルス関連糸球体腎炎の一女兒例、第 39 回日本肝臓学会西部会、2011 年 12 月 10 日、岡山
- ② 栗屋梨沙、上田博子、後藤盾信、伊藤孝一、垣田博樹、杉浦時雄、長崎理香、加藤稲子、齋藤伸治、戸苅創、脳瘤・多彩

- な脳形成異常を合併した羊膜索症候群の1例、第56回日本未熟児新生児学会・学術集会、2011年11月15日、東京
- ③ 青山幸平、遠藤剛、伊藤孝一、杉浦時雄、著明な胆汁うっ滞を認めた Zelleweger 症候群の1例、第38回日本小児栄養消化器肝臓学会、2011年10月8日、盛岡
- ④ 遠藤剛、伊藤孝一、杉浦時雄、B型肝炎ウイルスキャリアにおけるプレコア、コアプロモータ領域の変異についての検討、第114回日本小児科学会学術集会、2011年8月12日、東京
- ⑤ 鈴木敦詞、伊藤孝一、亀井美智、遠藤剛、杉浦時雄、伊藤康彦、斉藤伸治、佐藤陽子、近藤知史、鈴木達也、石倉聡、急激な肝腫大を契機に発見された神経芽腫の一例、第28回日本小児肝臓研究会、2011年7月16日、つくば
- ⑥ 加藤丈典、山本宗美、浅野里美、佐橋剛、伊藤孝一、杉浦時雄、血清および尿中胆汁酸分析を行ったARC症候群の1例、第47回日本周産期・新生児医学会学術集会、2011年7月12日、札幌
- ⑦ 鈴木敦詞、伊藤孝一、垣田博樹、杉浦時雄、加藤稲子、戸苅創、肝線維症をきたした一過性骨髄異常増殖症(TAM)の一例、第47回日本周産期・新生児医学会学術集会、2011年7月12日、札幌
- ⑧ 伊藤孝一、芦刈友加、加藤晋、新生児・乳児期に高度の胆汁うっ滞を呈した先天性汎下垂体機能低下症の4例、第47回日本周産期・新生児医学会、2011年7月12日、札幌
- ⑨ 大林勇輝、伊藤孝一、石田敦士、若月準、垣田博樹、杉浦時雄、水野晴夫、加藤稲子、水野健太郎、林祐太郎、佐藤陽子、近藤知史、鈴木達也、伊藤錦哉、和田郁雄、水谷栄太、後藤志信、鈴木伸宏、片野広之、胎児期よりフォローされたOEIS complexの1、第251回日本小児科学会東海地方会、2011年2月6日、名古屋
- ⑩ 杉浦時雄、後藤健之、伊藤孝一、遠藤剛、竹中学、幸脇正典、小山典久、加藤稲子、戸苅創、壊死性腸炎の病因と予防 壊死性腸炎における交換輸血前後のサイトカインプロファイリング、第55回日本未熟児

新生児学会・学術集会、2010年11月6日、神戸

- ⑪ 遠藤剛、伊藤孝一、杉浦時雄、エンテカビルで治療したB型急性肝炎重症型の15歳男児例、第37回日本小児栄養消化器肝臓学会、2010年10月9日、高松

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤孝一 (ITO KOICHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00444977

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし