

## 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 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790646

研究課題名（和文） IL-28B の SNP と HCV 遺伝子に関する研究

研究課題名（英文）

Analysis of the relationship between IL28B SNP and HCV genome

研究代表者

阿部 弘美 (ABE HIROMI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・特任助教

研究者番号：70572329

研究成果の概要（和文）：

慢性 C 型肝炎患者に対する治療薬はペグインターフェロン・リバビリン併用療法が主なものである。近年慢性 C 型肝炎に対する治療抵抗性を規定する SNP が IL-28B 遺伝子内に存在することが報告された。本研究では患者肝生検サンプルを用いて治療前の肝内インターフェロン関連遺伝子の発現状態を調べ、IL-28B の SNP が著効例に多いタイプでは抗ウイルス遺伝子の発現が低く、インターフェロンシグナルを負に制御する遺伝子の発現が高いことを報告した。

研究成果の概要（英文）：

The current standard treatment for patients chronically infected with HCV is the combination of peg-interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV). It has been reported that genetic variations within IL28B gene are associated with the effect of the PEG-IFN and RBV combination therapy. In this study, we investigated the expression levels of interferon related genes in the liver using liver biopsy from HCV patients before the treatment. We reported that the expression levels of anti-viral genes are lower, but those of negative regulator in IFN signaling are higher in favorable IL28B genotype patients.

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	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：肝臓学、ヒトゲノム、ウイルス、ヒト肝細胞キメラマウス

1. 研究開始当初の背景

ペグインターフェロン、リバビリン併用療法の HCV 治療効果と SNP の Genome Wide Association Study(GWAS)による関連解析の結果、*IL-28B* 遺伝子近傍の SNP (rs8099917, rs12979860) が併用用法の効果と非常に強い相関を認めることが報告された (Ge et al. Nature 2009, Thomas et al. Nature Genetics 2009, Tanaka et al. Nature

Genetics 2009, Suppiah et al. Nature Genetics 2009)。これらの報告では、*IL-28B* の調節領域に存在する SNP により発現量が異なり、これが治療効果の差異と関連することが推定されているが、実際肝細胞において *IL-28* の産生に差があるかどうかや、*IL-28B* とインターフェロン  $\alpha$  の相乗効果に関しては明らかにされていない。C 型肝炎のより有効な治療方法を開発するためには、これ

らのメカニズムを明らかにしてゆく必要がある。我々は、genotype 1a, 1b, 2a, 2b の感染性クローンをもつヒト肝細胞を移植したキメラマウスに感染させ、リバーシジェネティクスによる HCV の biology の検討を可能としている。(Tsuge et al. *Hepatology* 2005, Kimura et al. *J Gen Viral* 2008)。このマウスは scid であり、免疫反応が起こらないため移植した肝細胞 allele の影響を直接検討することができる。またウイルス側の要因としてあげられている core 領域のアミノ酸 70 番、91 番の変異、NS5A (ISDR) の変異数、NS5A (IRRDR) の変異が治療効果についてもクローンに変異を導入することにより検討することができる。これらの要因を明らかにすることにより、IL-28B 周辺の分子を利用した新規治療の開発につながる分子の探索やオーダーメイド治療の確立への礎が築かれることが期待される。

## 2. 研究の目的

C 型慢性肝炎に対する治療はペグインターフェロンやリバビリンの併用により改善したが、難治性の genotype 1b, 高ウイルス量の症例ではウイルスを完全に排除できるのは 50% 程度であり、治療によるうつ病や肺線維症など重篤な副作用があることが問題である。治療薬のインターフェロンはサイトカインのひとつであることから、治療効果の差異の要因として、ヒトゲノムの微妙な差異 (SNP 等) に由来する免疫反応の差、感染したウイルスゲノムの配列の差異に由来するインターフェロン抵抗性の差などが考えられる。本研究ではこれら宿主側、ウイルス側の両者を詳細に検討し、C 型慢性肝炎の治療の改善を目指すとともに新規治療のシーズとなる遺伝子の探索を行う。

## 3. 研究の方法

既に得られている IL-28B の多型、ウイルスの配列、臨床背景から治療効果にもっとも寄与する因子の絞り込みを行う。IL-28B の各種 allele を有するキメラマウスを作製し、インターフェロンに抵抗性、高感受性のウイルスを感染させ、治療効果に寄与するウイルス側の要因、宿主側の因子とその interaction をアレイ解析などにより明らかにする。innate immunity と interferon receptor 以下のシグナルを評価することにより、C 型肝炎ウイルスのインターフェロン抵抗性の鍵となる宿主因子とウイルス因子の interaction の詳細を明らかにし抵抗性因子を排除するような新規治療薬の候補を探索する。探索された分子の有効性を JFH1-genotype 1b chimera virus を用いた in vitro の系、キメラマウスを用いた in vivo の系で確認する。

## 4. 研究成果

平成 22 年度は、IL-28B の SNP をタイピングした HCV 患者のウイルスのアミノ酸配列と臨床背景について詳細なデータベースを構築し、HCV core アミノ酸の配列、ISDR (NS5A) の変異数、血小板、組織学的進行、トランスアミラーゼなど種々の臨床データを調べ相関を解析した。さらに、HCV core, ISDR, IRRDR の領域に種々の変異を有するクローン化ウイルスを作製し、IL-28B の SNP が major, minor allele homo 各々のヒト肝臓を持つキメラマウスを作製して感染実験を行い、これらのマウスにインターフェロン- $\alpha$  を投与し治療効果を検討することとした。IL-28B genotype と HCV 患者のウイルス学的検討、臨床情報との相関を解析したところ、日本人に多い rs8099917 の genotype TT の症例で・GTP は有意に低い組織学的に進行している症例が多く、HCV core は wild type が有意に多いことを見出し報告した。また、治療前の肝内インターフェロン誘導遺伝子 (ISG) の発現は IL-28B genotype TT の症例の方が有意に低いことがわかった。このことはインターフェロン治療の著効例のほうが非著効例よりも ISG の発現が低いというこれまでの報告と一致する。

平成 23 年にはさらに、これらマウスの肝組織の発現解析を行い、インターフェロン応答の差異、ウイルスの抵抗因子の要因を明らかにすることとした。マウス肝組織の発現解析では、各種 IL-28B allele 間で、HCV 感染によって発現量に変化する遺伝子、長期インターフェロン- $\alpha$  投与により発現量に変化する遺伝子を調べたところ、IL-28B genotype TT のマウスに長期間インターフェロン- $\alpha$  投与すると抗ウイルス遺伝子の発現は高値を維持していた。反対に、IL-28B genotype GG のマウスではそれらの遺伝子の発現上昇は一過性のものであった。HCV 感染による抗ウイルス遺伝子の発現上昇で IL-28B genotype 間による差は認められないことから IL-28B genotype TT のマウスは長期インターフェロン- $\alpha$  投与により抗ウイルス遺伝子の発現を維持してウイルスを排除しやすい環境となっていることがわかった。C 型肝炎ウイルスのインターフェロン抵抗性因子を見いだすため次世代シーケンサーを用いた解析を行い現在解析中である。

## 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 29 件) 全て査読有り

1. IL28B polymorphism is associated with fatty change in the liver of chronic hepatitis 1 C patients.

Ohnishi M, Tsuge M, Kohno T, Zhang Y, **Abe H**, Hyogo H, Kimura Y, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Tanaka S, Arihiro K, Chayama K. 2012.

**J Gastroenterol.** In press.

2. Severe Necroinflammatory Reaction Caused by Natural Killer By Fas/FasL Interaction and Dendritic Cells in Human Hepatocyte Chimeric Mouse Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, **Abe H**, Miki D, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. 2012.

**Hepatology.** In press.

3. Serum PAI-1 is a novel predictor for response to pegylated interferon- $\alpha$ 2b plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C virus infection.

Miki D, Ohishi W, Ochi H, Hayes CN, **Abe H**, Tsuge M, Imamura M, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. 2012.

**J Viral Hepat.** 19:126-133.

4. Toward the establishment of a prediction system for the personalized treatment of chronic hepatitis C.

Ochi H, Hayes CN, **Abe H**, Hayashida Y, Uchiyama T, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. 2012.

**J Infect Dis.** 205:204-210.

5. Hepatitis C virus infection suppresses the interferon response in the liver of the human hepatocyte chimeric mouse.

Tsuge M, Fujimoto Y, Hiraga N, Zhang Y, Ohnishi M, Kohno T, **Abe H**, Miki D, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Miya F, Tsunoda T, Chayama K.

2011.

**PLoS One.** 6

6. A Genome-Wide Association Study of Chronic Hepatitis B Identified Novel Risk Locus in a Japanese Population.

Mbarek H, Ochi H, Urabe Y, Kumar V, Kubo M, Hosono N, Takahashi A, Kamatani Y, Miki D, **Abe H**, Tsunoda T, Kamatani N, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. 2011.

**Hum Mol Genet.** 20: 3884-3892.

7. Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers.

Miki D, Ochi H, Hayes CN, **Abe H**, Yoshima T, Aikata H, Ikeda K, Kumada H, Toyota J, Morizono T, Tsunoda T, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. 2011.

**Nat Genet.** 43: 797-800.

8. Effects of hepatitis B virus infection on the interferon response in immunodeficient human hepatocyte chimeric mice.

Tsuge M, Takahashi S, Hiraga N, Fujimoto Y, Zhang Y, Mitsui F, **Abe H**, Kawaoka T, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. 2011.

**J Infect Dis.** 204: 224-228.

9. IL28B But Not ITPA Polymorphism Is Predictive of Response to Pegylated Interferon, Ribavirin, and Telaprevir Triple Therapy in Patients With Genotype 1 Hepatitis C.

Chayama K, Hayes CN, **Abe H**, Miki D, Ochi H, Karino Y, Toyota J, Nakamura Y, Kamatani N, Sezaki H, Kobayashi M,

Akuta N, Suzuki F, Kumada H. 2011.

**J Infect Dis.** 204: 84-93.

10. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wild type clone in vivo.

Hiraga N, Imamura M, Abe H, Nelson Hayes C, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. 2011.

**Hepatology.** 54: 781-788.

11. Impact of viral amino acid substitutions and host IL28B polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus.

Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. 2011.

**Hepatology.** 54: 764-771.

12. Inverse association of IL28B genotype and liver mRNA expression of genes promoting or suppressing antiviral state.

Abe H, Hayes C. N, Ochi H, Tsuge M, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. 2011.

**J Med. Virol.** 83:1597-1607.

13. Common genetic polymorphism of ITPA gene affects ribavirin-induced anemia and effect of peg-interferon plus ribavirin therapy.

Azakami T, Hayes CN, Sezaki H, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, Abe H, Miki D, Tsuge M,

Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Ochi H, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. 2011.

**J Med. Virol.** 83: 1048-1057.

14. Prediction of response to peginterferon-alfa-2b plus ribavirin therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b.

Hashimoto Y, Ochi H, Abe H, Hayashida Y, Tsuge M, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Nelson Hayes C, Ohishi W, Kubo M, Tsunoda T, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. 2011.

**J Med. Virol.** 83: 981-988.

15. IL-28B predicts response to chronic hepatitis C therapy -fine-mapping and replication study in Asian populations.

Ochi H, Maekawa T, Abe H, Hayashida Y, Nakano R, Imamura M, Hiraga N, Kawakami Y, Aimitsu S, Kao JH, Kubo M, Tsunoda T, Kumada H, Nakamura Y, Hayes CN, Chayama K. 2011.

**J Gen Virol.** 92: 1071-1081.

16. Animal model for study of human hepatitis viruses.

Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, Abe H, Tsuge M, Imamura M. 2011.

**J Gastroenterol Hepatol.** 26:13-18.

17. Amino acid substitutions in core and NS5A regions of the HCV genome can predict virological decrease with pegylated interferon plus ribavirin therapy.

Kitamura S, Tsuge M, Hatakeyama T, Abe H, Imamura M, Mori N, Saneto H, Kawaoka T, Mitsui F, Hiraga N, Takaki S, Kawakami Y, Aikata H, Takahashi S,

Ohishi W, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. 2011.

**Antivir Ther.**;15:1087-1097.

18. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo.

**Abe H**, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K. 2011.

**J Hepatol.** 55:11-18.

19. Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice.

Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, **Abe H**, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. 2011.

**J Hepatol.** 54: 872-878.

20. IL28 variation affects expression of interferon stimulated genes and peg-interferon and ribavirin therapy. 2011.

**Abe H**, Hayes CN, Ochi H, Maekawa T, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Nakamura Y, Chayama K.

**J Hepatol.** 54: 1094-1101.

21. A single nucleotide polymorphism in activated cdc42 associated tyrosine kinase 1 influences the interferon therapy in hepatitis C patients. 2011.

Fujimoto Y, Ochi H, Maekawa T, **Abe H**, Hayes CN, Kumada H, Nakamura Y,

Chayama K.

**J Hepatol.** 54: 629-639.

22. Predictive value of the IL28B polymorphism on the effect of interferon therapy in chronic hepatitis C patients with genotypes 2a and 2b.

Kawaoka T, Hayes CN, Ohishi W, Ochi H, Maekawa T, **Abe H**, Tsuge M, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Tsunoda T, Nakamura Y, Kumada H, Chayama K. 2011.

**J Hepatol.** 54:408-414.

23. HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy. 2011.

Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, **Abe H**, Miki D, Imamura M, Ochi H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K.

**Gut.** 60:261-267.

24. ITPA polymorphism affects ribavirin-induced anemia and outcomes of therapy--a genome-wide study of Japanese HCV virus patients.

Ochi H, Maekawa T, **Abe H**, Hayashida Y, Nakano R, Kubo M, Tsunoda T, Hayes CN, Kumada H, Nakamura Y, Chayama K. 2010.

**Gastroenterology.** 139:1190-1197.

25. Common variation of IL28 affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients.

**Abe H**, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ohishi W, Arihiro K, Kubo M, Nakamura Y,

Chayama K. 2010.

**J Hepatol.** 53:439-443.

26. Importance of serum concentration of adefovir for Lamivudine-adefovir combination therapy in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. Mitsui F, Tsuge M, Kimura T, Kitamura S, **Abe H.** Saneto H, Kawaoka T, Miki D, Hatakeyama T, Hiraga N, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Takahashi S, Hayes CN, Igarashi H, Morimoto K, Shimizu M, Chayama K. 2010.

**Antimicrob Agents Chemother.** 54:3205-3211.

27. Differential effects of interferon and lamivudine on serum HBV RNA inhibition in patients with chronic hepatitis B.

Huang YW, Chayama K, Tsuge M, Takahashi S, Hatakeyama T, **Abe H.** Hu JT, Liu CJ, Lai MY, Chen DS, Yang SS, Kao JH. 2010.

**Antivir Ther.**15:177-184.

28. HBx protein is indispensable for development of viraemia in human hepatocyte chimeric mice.

Tsuge M, Hiraga N, Akiyama R, Tanaka S, Matsushita M, Mitsui F, **Abe H.** Kitamura S, Hatakeyama T, Kimura T, Miki D, Mori N, Imamura M, Takahashi S, Hayes CN, Chayama K. 2010.

**J Gen Virol.** 91:1854-1864.

29. G to A hypermutation of TT virus.

Tsuge M, Noguchi C, Akiyama R, Matsushita M, Kunihiro K, Tanaka S, **Abe H.** Mitsui F, Kitamura S, Hatakeyama T, Kimura T, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S,

Hayes CN, Chayama K. 2010.

[学会発表] (計5件)

1. **阿部弘美** IL28B の遺伝子多型とその他の調節機構による抗ウイルス遺伝子と抑制性遺伝子の間の反対方向の調節. 日本肝臓学会. 2011年 6月2日~3日. 東京

2. **Abe H.** et al. Pretreatment of hepatoma cell lines with IL28B delays interferon-induced ISG expression, whereas pretreatment with neutralizing antibodies against IL28B reduces ISG expression levels. 46<sup>th</sup> Annual Meeting of European Association for the Study of the Liver (EASL), March 30-April 3, 2011 Berlin, Germany.

3. **Abe H.** et al. Reciprocal control of interferon stimulated gene mRNAs between positive anti-viral effector and negative regulator by IL28B gene polymorphism and by another regulatory mechanism. AASLD Annual Meeting, October 29-November 2, 2010. Boston, USA.

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/naikal/>

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/nbard/bio/m/saisei.htm>

<http://www.src.riken.go.jp/group/liver/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 弘美 (ABE HIROMI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・特任助教

研究者番号 : 70572329

(2) 研究分担者

( 該当なし )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( 該当なし )

研究者番号 :