

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390117

研究課題名(和文)感染症に対するインターフェロンラムダ3の応答性とその特異的な機能の解明

研究課題名(英文)Response and specific function of IFN-lambda3 against infectious diseases

研究代表者

溝上 雅史(Mizoakmi, Masashi)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：40166038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：IL28B遺伝子の転写蛋白インターフェロン λ 3(IFN- λ 3)の測定法を新規開発し、患者末梢血単核球をex vivo刺激で得られた上清や血清のIFN- λ 3が良好なPeg-IFN/RBV併用療法効果予測が可能で本法の臨床的有用性を証明した。また、BDCA3陽性樹状細胞はC型肝炎ウイルスを認識し、toll-like receptor 3を介してIFN- λ 3を産生することを示した。

研究成果の概要(英文)：We have newly developed a detection assay for IFN-lambda3 protein, being encoded by IL28B gene that predict the efficacy of pegylated interferon and ribavirin (Peg-IFN/RBV) therapy for chronic hepatitis C patients. Using this assay, we demonstrated that IFN-lambda3 levels in the supernatant of peripheral mononuclear cells stimulated with toll-like receptor 7 agonist or serum levels of IFN-lambda3 more favorably predict the efficacy of Peg-IFN/RBV treatment rather than genetic variation of IL28B. We also demonstrated that human BDCA3+dendritic cells recognize hepatitis C virus and produce IFN-lambda3 through toll-like receptor 3 pathway.

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：インターフェロンラムダ 転写 シグナル伝達 進化 受容体

1. 研究開始当初の背景

インターフェロンラムダ(IFN- λ)は、1(IL-29)、2(IL-28A)、3(IL-28B)から構成され、クラス3サイトカインのタイプIFNとして分類されている。これまでも免疫学的研究が行われており、受容体発現の組織特異性・サイトカイン産生細胞の同定等が進められてきた。しかしながら、その発現量が低値であることや発現制御機構が複雑であることから、今までに生体内での固有の機能は見出されおらず、IFN- λ の低活性体という位置づけとなっている。特に、IFN-2と3のcDNAは98%の相同性を持つため、それらを分離・解析することが困難であり、相同性の高さからほぼ同一の遺伝子として扱われてきた。

このように、特にIFN-2と3に関する研究は停滞していたが、申請者らの研究成果により個々のIFN- λ が固有の性質を有していることが示された(*Nat Genet*, 2009)。C型慢性肝炎患者の標準治療法であるPegylated IFN- λ (Peg-IFN)とリバビリン(RBV)の併用療法を施行した場合、C型肝炎ウイルス(HCV)の排除の有無で個人差があることが知られていた。申請者らはこの原因を宿主因子から探索するために、治療完遂群と治療不応群間でSNPsを利用した全ゲノム関連解析(GWAS)を実施した。その結果、IFN-3遺伝子周囲のSNPsが治療不応に強い関連を示すことを見出した。最も有意なSNPsはrs8099917であり($p = 2.68 \times 10^{-32}$, オッズ比 = 27.1倍)、これがマイナーアレルのGを持つと治療不応となることを明らかとした。このSNPsからIFN-3までは強い連鎖不平衡が成立しており、この連鎖ブロック内に同様の有意差を示す多数のSNPsを同定した。一方で、隣接するIFN-2遺伝子周囲にはそのような関連は認められなかったため、Peg-IFNとRBV併用療法の選択圧下では、IFN-2と3の機能差が顕著に現れていることが示された。

このIFN-3領域のSNPsがマイナーアレルとなる患者では、80%以上の確率で治療不応性となり治療効果を高率に予測出来

るものであるが、連鎖ブロック内に複数あるSNPsのどれがもっとも重要な役割を持っているかは不明のままである。また、興味深いことにIFN-3内のSNPsがマイナーアレルとなった場合、その塩基はIFN-2と同じ塩基配列となる。このことは、進化学的にIFN-2と3がIFN-1よりも比較的近い年代まで協調的に進化してきたこと、また、各機能に相同性もしくは相違性があることを示唆するものである。

2. 研究の目的

申請者らは、一塩基多型(SNPs)を利用した全ゲノム関連解析でC型慢性肝炎の治療効果を規定する因子としてインターフェロンラムダ3(IFN-3)遺伝子周囲のSNPsを同定した(Tanaka Y., Mizokami M. *et al. Nat Genet*, 2009)。IFN-3はIFN-2と相同性が高いため、現在も生体内での正確な役割は不明で、この2遺伝子は同じ機能を持つと想定された研究が進められていた。しかし、申請者らの研究成果によりIFN-2/3に個別の機能が存在することが示唆されたため、これらを区別した検出系の確立と、新しい視点での研究推進が必要となってきた。本研究では、分子生物学的手法に加えて、進化学的解析を行うことで、各IFN- λ が種を超えて保存されている意義と生体内での働きについて明らかとする。

3. 研究の方法

本研究では、3種類あるIFN- λ の個々の機能と発現機構について感染防御の観点から解析を実施する。HCV感染やIFN- λ 治療の効果を左右する点に焦点を合わせ、各IFN- λ の発現動態や転写制御機構の違いについて比較解析を実施する。研究体制としては、検出系の確立、進化学的解析、転写制御機構の解析という3系統のアプローチを取る。各種細胞株と臨床検体を使用し、基礎データの蓄積を主たる目的とする。手法としては、IFN- λ 間の進化学的解析による主要部位の同定と機能解析、ウイルス感染下での各IFN- λ 遺伝子のGain of Function・Loss of Functionによるトランスクリプトーム解析、外来病原因子に対する個々のIFN- λ の発現動態の経時的定量解析、IFN-2とIFN-3のシグナル伝達経路の比較を行う。

4. 研究成果

C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン/リバビリン併用療法(Peg-IFN/RBV)の治療効果予測としてIL28B遺伝子多型は

非常に重要な宿主因子である。IL28B 遺伝子がコードする蛋白 IFN- λ 3 の定量系を独自開発した。本法は非常に感度が高く、かつ相同性の高い IFN- λ 2 も明瞭に区別することが可能で特異度も高い assay 系ある。本法を用いて患者末梢血単核球を ex vivo で刺激し、その上清中の IFN- λ 3 を測定したところ、その産生能に比例して Peg-IFN/RBV 治療効果予測が可能で、かつ IL28B 遺伝子多型による遺伝子診断よりも高い診断率を認めた。また、C 型慢性肝炎患者の血清中 IFN- λ 3 を測定したところ、その多寡によっても Peg-IFN/RBV 治療効果予測が可能であった。本法は測定が容易で、かつ安価であることから、direct acting antivirals が経済状況上、使用できないアジアを中心とした地域で臨床、かつ医療経済上有用であると考えられる。

さらに我々は、IFN- λ 3 の主な産生細胞は樹状細胞のうち、BDCA3 および BDCA4 分画であることを証明し、BDCA3 陽性樹状細胞は宿主に感染した C 型肝炎ウイルスを認識し、toll-like receptor 3 を介して IFN- λ 3 を産生することを証明した。

また、IL28B 近傍の遺伝子、IFN- λ 4 は日本人においては IL28B と強い連鎖不平衡を認めるため、Peg-IFN/RBV 治療効果予測における IFN- λ 4 の追加効果はなかった。しかし、ウズベキスタンにおける C 型慢性肝炎患者の遺伝子多型と治療効果を解析したところ、IFN- λ 4 を IL28B に追加解析することによって治療効果予測はさらに良好となり、遺伝子解析における人種差の重要性を指摘した。

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)

1. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol* 2011;54: 439-448.(doi:10.1016/j.jhep.2010.07.037)
2. Sugiyama M, Tanaka Y, Nakanishi M, Mizokami M. Novel findings for the development of drug therapy for various liver diseases: Genetic variation in IL-28B is associated with response to the therapy for chronic hepatitis C. *J Pharmacol Sci*. 2011;115(3):263-9.
3. Ito K, Higami K, Masaki N, Sugiyama M, Mukaide M, Saito H, Aoki Y, Sato Y, Imamura M, Murata K, Nomura H, Hige S, Adachi H, Hino K, Yatsushashi H, Orito E, Kani S, Tanaka Y, Mizokami M. The rs8099917 polymorphism, when determined by a suitable genotyping method, is a better predictor for response to pegylated alpha interferon/ribavirin therapy in Japanese patients than other single nucleotide polymorphisms associated with interleukin-28B. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1853-60. (doi: 10.1128/JCM.02139-10)
4. Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic variation of the IL-28B promoter affecting gene expression. *PLoS One*. 2011;6(10):e26620. (doi: 10.1371/journal.pone.0026620)
5. Mizokami M. Discovery of critical host factor, IL-28B, associated with response to hepatitis C virus treatment. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 ;27(3):425-9. (doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.07054.x)
6. Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*. 2012 ;56:1448-56. (doi: 10.1002/hep.25815)
7. Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S. Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res*. 2012;42(10):958-65. (doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01013.x)
8. Kani S, Tanaka Y, Matsuura K, Watanabe T, Yatsushashi H, Orito E, Inose K, Motojuku N, Wakimoto Y, Mizokami M. Development of new IL28B genotyping method using Invader Plus assay. *Microbiol Immunol*. 2012;56:318-23. (doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00439.x)
9. Sugiyama M, Kimura T, Naito S, Mukaide M, Shinauchi T, Ueno M, Ito K, Murata K, Mizokami M. Development of specific and quantitative real-time detection PCR and immunoassays for λ 3-interferon. *Hepatol Res*. 2012;42(11):1089-99. (doi:

- 10.1111/j.1872-034X.2012.01032.x)
10. Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsushashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, **Sugiyama M**, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, **Mizokami M**. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut*. 2013;62:1340-6. (doi: 10.1136/gutjnl-2012-302553)
 11. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, **Sugiyama M**, **Murata K**, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, **Mizokami M**, Takehara T. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology*. 2013;57:1705-15. (doi: 10.1002/hep.26182)
 12. Nakagawa S, Hirata Y, Kameyama T, Tokunaga Y, Nishito Y, Hirabayashi K, Yano J, Ochiya T, Tateno C, Tanaka Y, **Mizokami M**, Tsukiyama-Kohara K, Inoue K, Yoshiba M, Takaoka A, Kohara M. Targeted induction of interferon- λ in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. *PLoS One*. 2013;8:e59611. (doi: 10.1371/journal.pone.0059611)
 13. **Murata K**, **Sugiyama M**, Kimura T, Yoshio S, Kanto T, Kirikae I, Saito H, Aoki Y, Hiramine S, Matsui T, Ito K, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, **Mizokami M**. Ex vivo induction of IFN- λ 3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/ ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol*. 2014; 49(1):126-37. (doi: 10.1007/s00535-013-0814-1)
 14. Khudayberganova D, **Sugiyama M**, Masaki N, Nishida N, Mukaide M, Sekler D, Latipov R, Nataliya K, Dildora S, Sharapov S, Usmanova G, Raxmanov M, Musabaev E, **Mizokami M**. IL28B polymorphisms and clinical implications for hepatitis C virus infection in Uzbekistan. *PLoS One*. 2014; 24;9:e93011. (doi: 10.1371/journal.pone.0093011)
- 〔雑誌論文〕(計 件)
1. 正木尚彦, 伊藤清顕, **溝上雅史**. 話題の疾患と治療 HCV治療の有効性とIL28B(インターフェロン λ). *感染・炎症・免疫* 2011 2011.01;40 (4): 380-383
 2. 伊藤清顕, **溝上雅史**. 【ウイルス肝炎診療の変貌 近づく疾患克服】 C型肝炎 治療効果予測とオーダーメイド治療 SNPが決定する治療効果 IL28BおよびITPA SNPs. *肝・胆・膵* 2011 2011.02;62 (2): 315-324
 3. **杉山真也**, **溝上雅史**. 【新時代のウイルス性肝炎学 基礎・臨床研究の進歩】 C型肝炎 C型肝炎ウイルス研究の進歩 C型肝炎ウイルス研究技術の進歩 ゲノムワイド関連解析とその応用. *日本臨床* 2011 2011.05;69 (増刊4 新時代のウイルス性肝炎学): 80-85
 4. 西田奈央, **溝上雅史**. 【Genome Wide Association Studyは肝胆膵診療をいかに変えるか?】 GWAS研究の進め方. *肝・胆・膵* 2011 2011.05;62 (5): 879-886
 5. **杉山真也**, **溝上雅史**. ゲノミクスの手法に基づくHCV感染者のIFN治療効果の研究. *ウイルス* 2011.06;61 (1): 15-24
 6. **杉山真也**, **溝上雅史**. PEG-IFN& RBV 併用療法の治療効果に寄与するヒト遺伝子多型. *肝・胆・膵* 2011 2011.07;61 (増刊号): 68-75
 7. **村田一素**, 伊藤清顕, **溝上雅史**. 【遺伝子多型による消化器疾患の理解】 遺伝子多型はHCV肝炎の病態、薬剤の効果にどう影響するのか. *分子消化器病* 2011 2011.09;8 (3): 227-232
 8. 平峯智, 林純, **溝上雅史**. C型肝炎の治療効果に影響する遺伝子 IL28B. *Medical Practice* 2011 2011.10;28 (10): 1880-1882
 9. **溝上雅史**. C型慢性肝炎に対するインターフェロン α /リバビリン治療効果を規定する宿主因子の発見とその臨床的意義. *肝臓フォーラム記録集* 2012. 2012.03;2011 7-23
 10. **溝上雅史**. おくすり情報+ α C型肝炎の薬. *きょうの健康* 2012 2012.05.12;6 (291): 89-95
 11. **杉山真也**, **溝上雅史**. 【IL-20以降の新しい

インターロイキンの機能と関連疾患】

IL-28A/B、IL-29と疾患. 細胞工学 2012
2012.06;31 (7): 782-786

12. **溝上雅史**. 急展開するC型肝炎ウイルスの研究と臨床 GWASにより発見されたIL28Bを中心に. 小児感染免疫 2012.
2012.07;24 (2): 207-213
13. 伊藤清顕, **溝上雅史**. 【C型肝炎個別化医療のための宿主因子、ウイルス因子】 C型慢性肝炎に対するPEG-IFN/RBV48週および72週投与の治療効果に関連するIL28BおよびITPA遺伝子多型の解析. 消化器内科 2012 2012.08;55 (2): 222-227
14. 杉山真也, **溝上雅史**. 【C型肝炎個別化医療のための宿主因子、ウイルス因子】 IL-28B遺伝子周囲に存在するSNPsの機能解析. 消化器内科 2012 2012.08;55 (2): 263-270

〔学会発表〕(計 11件)

1. **Mizokami M**. Geographic and Genetic Diversity of Hepatitis B Virus (keynote lecture), APASL 2011, Bangkok Thailand (2011.02.17-20)
2. **Mizokami M**. Optimizing Treatment for Chronic Hepatitis C -Incorporating Pharmacogenetics into Clinical Practice Integrated Science and Technology Clinical Gastroenterology Singapore Plenary lecture Okuda Award 受賞講演 (2011.10.2)
3. **Mizokami M**. Identification of interferon- λ and its clinical importance for hepatitis C virus infection. Avison Biomedical Symposium 2012. Seoul, Korea (2012.02.03)
4. **Mizokami M**. What interferon- λ has taught us in hepatitis C virus and host genomics ? Avison Biomedical Symposium 2012 "Virus and Human Disease". Seoul, Korea (2013.02.03)
5. Tanaka Y, **Mizokami M**. Host genetic factors on the treatment of chronic hepatitis C APASL2012 : 22nd conference of the Asian Pacific association for the study of the liver. Taipei, Taiwan (2012.02.16)
6. **Mizokami M**. How did interferon- λ identify and work for treatment for chronic hepatitis C? 2nd Xiamen winter symposium Xiamen, China (2012.02.23-26)
7. **Mizokami M**. How should we treat HCV with the genetic characteristics of the virus and the human body ? Research to practice conference : new techniques in viral infection diagnosis, treatment and prevention Bukhara, Uzbekistan seminar (2013.03.30)
8. **Mizokami M**. IL28B and other genetic targets for HBV therapy. APASL Liver Week Singapore (2013.03.09)
9. **Mizokami M**. Solved and Unsolved Issues of Anti- HBV or Anti-HCV Therapy in Japan -On the road to HCC prevention- Seminar on Infectious Diseases: Networking for the Promoting One World, One Health for a Better Tomorrow; Prevention and Treatment using Natural Products, Vaccines and Antivirals Surabaya, Indonesia (2013.10.17)
10. **Mizokami M**. Development of IFN λ 3 Quantification in the Serum and Its Clinical Significance - Genome-wide Association Study and Clinical Application in Hepatitis -. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: Molecular basis and Clinical Links. Marsala Italy (2013.10.20-21)
11. **Mizokami M**. Development of IFN λ 3 Quantification in the Serum and Its Clinical Significance- Genome-wide Association Study and Clinical Application in Hepatitis-.Japan-Russia International

Workshop 2013 (JRIW2013) 東京
(2013.10.27)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：インターフェロン治療効果予測方法
発明者：溝上雅史、杉山真也、村田一素、木村達
治、内藤成子
権利者：同上
種類：特許
番号：2013-228369
出願年月日：2013 年 11 月 1 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝上雅史 (MIZOKAMI Masashi)
国立国際医療研究センター
肝炎・免疫研究センター・センター長
研究者番号：40166038

(2) 研究分担者

杉山真也 (SUGIYAMA Masaya)
国立国際医療研究センター
肝炎・免疫研究センター・上級研究員
研究者番号：20612427

村田一素 (MURATA Kazumoto)
国立国際医療研究センター
肝炎・免疫研究センター・室長
研究者番号：40345971

鈴木善幸 (SUZUKI Yoshiyuki)
名古屋市立大学
大学院システム自然科学研究科・教授
研究者番号：70353430