

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790502

研究課題名（和文） HCV 患者における IL28B 遺伝子多型と IFN 治療感受性の相関メカニズムの解析

研究課題名（英文） Mechanistic analysis about the association of IL28B genetic polymorphism with IFN sensitivity in HCV infected patients

研究代表者

福原 崇介（FUKUHARA TAKASUKE）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：70598739

研究成果の概要（和文）：

本研究では肝移植患者における再発 C 型肝炎に対する抗ウイルス治療の感受性と IL28B 遺伝子多型の相関を解析し、ドナーおよびレシピエント両者の IL28B 遺伝子多型が IFN 治療感受性と相関することを明らかにした。この結果から、肝細胞および肝臓に浸潤した免疫担当細胞のクロストークによって、IFN 治療感受性が規定されていることが示唆された。さらに、人工ヌクレアーゼを用いて、IL28B の Allele 特異的なノックアウト Huh7 細胞を樹立した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we evaluated the importance of IL28B genetic polymorphism in IFN sensitivity for recurrent hepatitis C after liver transplantation. Interestingly, genetic variability in both recipients and donors was significantly associated with IFN sensitivity, suggesting crosstalk between lymphocyte and HCV-infected hepatocyte participates in the IFN sensitivity. In addition, we established allele-specific IL28B knockout Huh7 cells by using chimeric nucleases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス、肝臓移植、IL28B、IFN 感受性

1. 研究開始当初の背景

本邦において C 型肝炎ウイルス(HCV)感染は原発性肝細胞癌の最も多い成因であり、C 型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療として Peg-Interferon(IFN)と Ribavirin(RBV)による併用療法を行いウイルス消失により病態の進行を抑えるのが一般的であるが、その治療効果は不十分であり、Genotype1 型、高ウイルス量の症例では著効率(Sustained Viral Response: SVR)は約 50%に留まっている。C 型肝炎ウイルス感染に伴い発症した末期肝硬変や切除不能な肝細胞癌に対する根治的治療法は肝臓移植のみである。現在、本邦で肝臓移植の最も

多い適応疾患は HCV 感染関連疾患であるが、移植後の C 型肝炎再発は必発であるため、移植後にも抗ウイルス治療を行うのが標準的である。しかし、その治療効果は慢性肝炎に比べてさらに不良であり、SVR 率は 30-40%程度と報告されている。さらに移植後の IFN 治療における副作用の発生率は移植前と比して有意に高く、慢性拒絶等の致命的な副作用も経験されるため、その治療効果の予測が重要と考えられている。これまでに一般的な慢性肝炎において治療効果予測因子として、HCV-RNA の Core 領域(アミノ酸 70 番の変異)(Akuta et al. J Med Virol. 2007)、NS5A 領域の変異が

IFN による抗ウイルス治療効果と強く相関することが報告されてきた(Enomoto et al. *N Engl J Med* 1996)。また、肝臓内における IFN 刺激により誘導される遺伝子群(Interferon Stimulated Genes; ISGs)の誘導が IFN 治療効果の応答性と強く相関することが報告された(Asahina et al. *Gastroenterology* 2008)。さらに、より強い治療効果予測因子として IL28B(IFN λ) 遺伝子周辺の一塩基多型(SNP)が同定され(Tanaka et al. *Nature Genetics* 2009)、これらの遺伝子変異解析は慢性肝炎の治療計画を立てる上で、すでに臨床応用されている。

2. 研究の目的

肝移植後の抗ウイルス治療の効果予測における IL28B の意義を明らかにする。さらに、人工ヌクレアーゼを用いて、IL28B の Allele 特異的なノックアウト Huh7 を作製し、HCV の感染性や IFN 感受性における IL28B の遺伝子多型の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

肝移植症例 67 例のドナーおよびレシピエントの IL28B の遺伝子多型を解析し、移植後再発 C 型肝炎に対する抗ウイルス治療における IL28B の遺伝子多型の意義を明らかにする。また、In vitro の系では、人工ヌクレアーゼを用いて、IL28B の Allele 特異的なノックアウト Huh7 細胞を作製する。

4. 研究成果

レシピエントの IL28B の遺伝子多型が Minor である症例では、IFN 治療感受性が有意に低いことが判明した。興味深いことに、ドナーにおいても Minor genotype の症例では IFN 治療感受性が低いことが明らかになった。ドナーおよびレシピエントのどちらかに Minor allele が存在すると、IFN 治療感受性が有意に低下することを明らかにした。このことから、ドナー由来の肝細胞およびレシピエント由来の免疫担当細胞のクロストークが IFN による抗ウイルス活性に寄与していることが示唆された。(Fukuhara et al. *Gastroenterology* 2010)

また、C 型末期肝硬変に対する Dual Graft を用いた肝移植の症例の組織および血清を用いた解析を行った。興味深いことに、Dual Graft は Major Genotype と Minor Genotype の肝臓が移植されており、移植後 4 年の肝生検の組織学的な評価では Minor Genotype の方が有意に肝線維化が進んでおり、さらに高い HCV-RNA 量を保持していた。このことから、IL28B の遺伝子多型は肝移植後の HCV の感染性や病態進展にも関与している可能性が考えられた。(Am J Transpl. Motomura and

Fukuhara et al.)

次に、In vitro の解析を試みた。HCV が感染しうる唯一の細胞株である Huh7 細胞は Minor genotype であり、Major allele と Minor allele の両方を保持していることが明らかになった。そこで、標的遺伝子を切断する活性を持つ Zinc Finger Nuclease によって、Allele 特異的な IL28B ノックアウト Huh7 細胞の作製を行った。In vitro で合成した人工ヌクレアーゼをコードする mRNA を Huh7 に導入し、遺伝子変異が導入されていることを Survayor assay で確認した後、Single Cell Isolation によって、細胞のクローンを 200 個程度単離した。それぞれのクローンの遺伝子変異がどの Allele に導入されているかを確認し、最終的に Major allele および Minor allele 特異的なノックアウト Huh7 を作製した。これらの細胞に HCVcc を感染させたが、HCVcc の感染性に有意差を認めなかった。現在、免疫応答におけるそれぞれの Allele の役割を解析中である。(未発表)

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 12 件)

- 1) **Fukuhara T**, et al (2 人中 1 番目). Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection. *J Gastroenterol.* (2012) in press.
- 2) **Fukuhara T**, et al (10 人中 1 人目). Expression of microRNA miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with hepatitis C virus. *J Virol.* (2012) 86: 7918-7933. doi: 10.1128/JVI.00567-12. (査読有り)
- 3) Kambara H, **Fukuhara T** (Equally contributed to this work), et al (7 人中 2 番目). Establishment of a novel permissive cell line for the propagation of hepatitis C virus by expression of microRNA miR122. *J Virol.* (2012) 86: 1382-1393. doi: 10.1128/JVI.06242-11. (査読有り)
- 4) Abe T, **Fukuhara T**, et al (10 人中 2 番目). CD44 participates in IP-10 induction in cells in which hepatitis C virus RNA is replicating, through an interaction with Toll-like receptor 2 and hyaluronan. *J Virol.* (2012) 86: 6159-6170. doi: 10.1128/JVI.06872-11. (査読有り)
- 5) Kataoka C, Kaname Y, Taguwa S, Abe

- T, **Fukuhara T**, et al (8人中5番目). Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells. **J Virol.** (2012) 86: 2610-2620. doi: 10.1128/JVI.06704-11. (査読有り)
- 6) Motomura T, Shirabe K, Mano Y, Muto J, Toshima T, Umemoto Y, **Fukuhara T**, et al (12人中7番目). Neutrophil-lymphocyte ratio reflects hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation via inflammatory microenvironment. **J Hepatol.** (2012) in press.
- 7) Toshima T, Taketomi A, Ikegami T, **Fukuhara T**, et al (9人中4番目). V5-drainage-preserved right lobe grafts improve graft congestion for living donor liver transplantation. **Transplantation.** (2012) 15: 929-935. doi: 10.1097/TP.0b013e3182488bd8. (査読有り)
- 8) Motomura T, Koga E, Taketomi A, **Fukuhara T**, et al (12人中4番目). Efficacy of splenectomy in preventing anemia in patients with recurrent hepatitis C following liver transplantation is not dependent on inosine triphosphate pyrophosphatase genotype. **Hepatol Res.** (2012) 42: 288-295. doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00927.x. (査読有り)
- 9) **Fukuhara T**, et al. (9人中1番目). Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus. **Microbes Infect.** (2011) 13: 405-412. doi: 10.1016/j.micinf.2011.01.005. (査読有り)
- 10) Katoh H, Mori Y, Kambara H, Abe T, **Fukuhara T**, et al (9人中5番目). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through an interaction with viral proteins and RNA. **J Virol.** (2011) 85: 10976-10988. doi: 10.1128/JVI.00846-11. (査読有り)
- 11) Motomura T, Taketomi A, **Fukuhara T**, et al (13人中3番目). The impact of IL28B genetic variants on recurrent hepatitis C in liver transplantation: significant lessons from a dual graft case. **Am J Transplant.** (2011) 11: 1325-1329. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03537.x. (査読有り)
- 12) Kambara H, Tani H, Mori Y, Abe T, Katoh H, **Fukuhara T**, et al (9人中6番目). Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. **Virology.** (2011) 30: 211-219. doi: 10.1016/j.virol.2011.01.011. (査読有り)
- [学会発表] (計 12 件)
- 1 Kouwaki T, Pham DN, **Fukuhara T**, Okamoto T, and Matsuura Y. Identification of Host Factors Interact with Hepatitis B virus X Protein. 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月 11 日-14 日, 2012.
- 2 **Fukuhara T**, Motomura T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Okamoto T, Shirabe K, Maehara Y, and Matsuura Y. Quasispecies Plays an Important Role in Cell Tropism of Hepatitis C Virus. 同上
- 3 Shiokawa M, **Fukuhara T**, Ono C, Okamoto T, and Matsuura Y. Involvement of Human Liver-specific Factors in a Complete Propagation of Hepatitis C Virus. 同上
- 4 Ono C, **Fukuhara T**, Shiokawa M, Okamoto T, and Matsuura Y. Establishment of Mouse Liver Cell Lines Susceptible to Hepatitis C Virus Infection. 同上
- 5 福原崇介、塩川舞、小野慎子、山本聡美、寒原裕登、加藤大志、岡本徹、奥崎大介、松浦善治: 一般講演: HCV 感染の肝細胞指向性は miR-122 の発現と脂質代謝によって規定される: 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11 月 13 日, 2012.
- 6 塩川舞、福原崇介、小野慎子、山本聡美、岡本徹、松浦善治: 一般講演: C 型肝炎ウイルスの粒子産生に関与するヒト肝細胞特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立: 同上
- 7 小野慎子、福原崇介、塩川舞、岡本徹、松浦善治: 一般講演: C 型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臓細胞株の樹立: 同上
- 8 伊藤昌彦、鈴木亮介、福原崇介、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗: 一般講演: HuH-7

由来オーバル様細胞における HCV 感受性の解析：同上

- 9 福原崇介、本村貴志、松浦善治: パネルディスカッション: HCV の非肝臓系細胞株に対する感染培養システムの確立と肝外病変成立に関わる宿主因子の同定: JDDW、神戸、10月11日, 2012.
- 10 Fukuhara T, Shiokawa M, Arimoto M, Ono C, Katoh H, Kambara H, Okamoto T, and Matsuura Y. MiR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of HCV infection. 19th International Meeting on HCV and Related Viruses, Venice, Italy, October, 5-9, 2012.
- 11 福原崇介: 一般講演: C型肝炎ウイルスの肝細胞指向性における miR-122 と脂質代謝の役割: 第11回 Hepatitis Expert Meeting、東京、8月25日, 2012.
- 12 Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Kato H, Okamoto T, and Matsuura Y. miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus infection. The American Society for Virology, 31th Annual Meeting, University of Wisconsin-Madison, July 20-26, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福原 崇介 (FUKUHARA TAKASUKE)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号: 70598739