

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590958

研究課題名(和文) インターロイキン6を基軸としたC型慢性肝炎の治療抵抗性機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of IL-6-mediated drug-resistance of hepatitis C virus infection

## 研究代表者

中川 美奈 (Nakagawa, Mina)

東京医科歯科大学・医歯学融合教育支援センター・准教授

研究者番号：30401342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：HCVコア70変異株(2a株)を用いた検討では、IL-6、ERストレス蛋白と治療抵抗性に相関があったが、1b株で検討するためpTPF1-M170T(GenBank: LC011929)をもとにコアアミノ酸変異株を作成した。1b株を安定して培養できたことは一定の成果だが、コア変異株でインターフェロン感受性の差が確認できず、樹立困難とされた1b株特有の複製機構に要因があると思われた。テラプレビル3剤治療患者血清の検討では治癒例では治療後一過性にIL6が上昇し速やかに低下し持続低値、再燃例では持続高値を示す傾向が得られ、DAA製剤治療でもIL-6が治療抵抗に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Our previous study described the association of serum IL-6 levels and ER stress and drug-resistance using JFH1 genotype 2a cell culture system. Based on the pTPF1-M170T (LC011929), we constructed full-length 1b clones that expressed core mutant viruses which were clinically resistant to IFN. Although TPF1-M170T clones are not currently allowed in drug-screening tests, perhaps this unique character can assist in establishing the molecular mechanism of HCV replication. We conducted a cohort study to investigate whether serum IL-6 levels influenced treatment outcomes of TVR/PEG-IFN/RBV triple therapy. Our results suggest that baseline low levels of IL-6, as well as their transient increase and decline during early stage of treatment, are correlated to good response to treatment, whereas sustained high levels of serum IL-6 are correlated to treatment resistance in most cases. Taken together, serum IL-6 levels correlate with resistance to treatment also with DAA combination therapy.

研究分野：肝臓病学

キーワード：治療抵抗性機序 C型慢性肝炎 インターロイキン6

## 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は国内に150万人以上の感染者が存在し、日本における慢性肝疾患・肝癌の主因である。近年治療薬の開発・改良により治療成績が向上したが、抗ウイルス療法の主軸はインターフェロン(IFN)であり、IFN 応答性の悪い症例で著効(SVR)が得られる確率はわずか30-40%と、いまだ十分な治療効果とはいえない。このような状況の中で、IFN 治療抵抗性に関わる分子の特定は、治療効果の事前予測に利用できる可能性があると同時に、現行の治療では治癒が期待できない難治症例に対する新規薬剤の開発につながる可能性があった。

Interleukin-6 (インターロキン6: 以下IL-6)は生体防御反応や免疫機能制御を担う多機能サイトカインで、感染や組織障害、炎症に伴ってマクロファージやリンパ球をはじめ各種細胞より産生されウイルス性肝炎やアルコール性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis: NASH)、劇症肝炎などで血清IL-6値が高値となることが種々報告されている。また、IL-6はウイルス陰性化を妨げる要因となるインスリン抵抗性(糖尿病や肥満)や鉄代謝異常とも密接に関連しているとされ、近年肝細胞癌(HCC)との関与も報告されており(Naugler Science 2007)、IL-6がエストロゲンによって抑制されることがHCC発現頻度の男女差の一因とされている。治療抵抗株であるHCVコア変異株およびJFH1株ともにIL-6が上昇していることや過去の報告を総合的に考えるとIL-6が治療抵抗性の機序に深く関わっている可能性が十分あると考えられた。

## 2. 研究の目的

上記のような理由から、本研究では、IL-6やERストレスがIFN治療抵抗性にどのように関与しているのか検討することで、現在不十分なものとどまっているHCV感染症に対する新たな抗ウイルス療法について洞察し、治療抵抗性との関与が十分明らかにされていないIL-6を軸とした治療抵抗機序の解明を、HCVレプリコン・システムを用いた基礎実験及び臨床検体を用いた統計学的解析により明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

以下の方法により治療抵抗性に関連するIFNシグナル系を介したウイルス増殖制御機構とそのキーとなる蛋白について基礎的解析を行うと同時に、実際の臨床検体を用いて検討した。

- (1) 変異HCV株培養系を用いたウイルス感染・増殖能・インターフェロン感受性の解析
- (2) 臨床検体を用いたIL-6および関連遺伝子と治療抵抗性機序の関連についての解析、ほか検討を行った。

## 4. 研究成果

- (1) HCVコア70変異株を用いた培養細胞系の検討では、IL-6、SOCS3の発現亢進、ISG抑制がみられ、コア変異株ではウイルス粒子形成、分泌ともに低下し、小胞体(ER)ストレス蛋白の発現誘導をみたが、用いたJFH1株は臨床的にはインターフェロン感受性が比較的高い遺伝子型での解析であったことから、臨床的に治療抵抗性であるGenotype1b株で同様の検討を行い、治療抵抗性、発癌関連因子が惹起されているか確認することとした。新たに樹立された1bウイルス全長ゲノムを含むpTPF1-M170T(GenBank Accession Number: LC011929)の供与を受け研究に着手し、当初安定した系を得る事が困難だったが、各種条件を調整することで実験系も安定し、全長1b株での安定した細胞培養系を得た。これをもとにコアアミノ酸変異株R70Q、L91M、R70Q/L91M株の4種を作成した。従来作成が困難とされた1b株を安定して培養できたことは一定の成果であるが、薬剤添付実験の結果では、各株間にインターフェロン薬物感受性の差が確認できず、1b株特有の複製機構に要因がある事が示唆された。
- (2) 当院にて2009年以降、慢性肝疾患の精査加療で通院された患者180例の凍結検体を用いて、疾患および臨床背景別にIL-6を比較検討し、肝細胞癌(HCC)に関与する因子について解析したところ、発癌寄与因子として、多変量解析では年齢、性別、HL、喫煙が抽出されたが、血清IL-6(P=0.269)は抽出されなかった。当院データでも血清IL-6は、閉経後の女性や、男性で高く、発癌率の年齢差・性差に関与する可能性が示唆されたが、非常にバラツキが大きく、飲酒や感冒などで容易にデータが変動する事が明らかになった。また、テラプレビル併用3剤治療経過中の患者保存血清を用いてIL-6、コア変異、IL28Bなどのウイルスおよび宿主因子とHCVRNAを含めた各種臨床パラメーターを経時的に測定、検討したところ早期および治療後もウイルス陰性化が得られた症例では治療開始1週後に一過性にIL6が上昇し、その後速やかに低下し持続低値、再燃例では高値を示す傾向が得られた。また、当院肝細胞癌患者370例の年齢分布をみると、従来肝細胞癌のリスクが低いとされた女性も閉経後徐々に増え高齢女性は男性とほぼ同数であった。エストロゲンを介したIL-6制御機構の破綻が閉経後女性の肝細胞癌リスク上昇に関連してい

る事が示唆された

## 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)

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kusano-Kitazume A, Watanabe T, Kawai-Kitahata F, Otani S, Taniguchi M, Goto F, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired induction of interleukin 28B and expression of interferon  $\lambda$  4 associated with nonresponse to interferon-based therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jun;30(6):1075-84. doi: 10.1111/jgh.12902. PMID: 25611696 (査読有り)
2. Etsuko Iio, Kentaro Matsuura, Nao Nishida, Shinya Maekawa, Nobuyuki Enomoto, Mina Nakagawa, Naoya Sakamoto, Hiroshi Yatsuhashi, Masayuki Kurosaki, Namiki Izumi, Yoichi Hiasa, Naohiko Masaki, Tatsuya Ide, Keisuke Hino, Akihiro Tamori, Masao Honda, Shuichi Kaneko, Satoshi Mochida, Hideyuki Nomura, Shuhei Nishiguchi, Chiaki Okuse, Yoshito Itoh, Hitoshi Yoshiji, Isao Sakaida, Kazuhide Yamamoto, Hisayoshi Watanabe, Shuhei Hige, Akihiro Matsumoto, Eiji Tanaka, Katsushi Tokunaga, Yasuhito Tanaka. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hum Genet*. 2015 Mar;134(3):279-89. doi: 10.1007/s00439-014-1520-7. (査読有り)
3. Kano Y, Kakinuma S, Goto F, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Nakagawa M, Kudo A, Tanabe M, Kirimura S, Amano T, Ito T, Akashi T, Asahina Y, Watanabe M. Primary hepatic neuroendocrine carcinoma with a cholangiocellular carcinoma component in one nodule. *Clin J Gastroenterol* 7:449-454, 2014 DOI 10.1007/s12328-014-0521-3 (査読有り)
4. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Yoshimichi C, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terasita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuzuka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N; NORTE Study Group. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions. *Hepatol Res*. 2014 Sep 11. doi: 10.1111/hepr.12421. Epub (査読有り)
5. Yasuhiro Asahina, Kaoru Tsuchiya, Takashi Nishimura, Masaru Muraoka, Yuichiro Suzuki, Nobuharu Tamaki, Yutaka Yasui, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Hiroyuki Nakanishi, Jun Itakura, Yuka Takahashi, Masayuki Kurosaki, Nobuyuki Enomoto, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Mamoru Watanabe and Namiki Izumi: Genetic variation near interleukin 28B and

- the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Gastroenterology* 2013; 58:1253-62, doi: 10.1002/hep.26442. (査読有り)
6. Yasuhiro Asahina, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Mamoru Watanabe: Polymorphism near the interleukin 28B gene and anti-hepatitis C viral response. *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 2013 (査読有り)
  7. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N.  $\alpha$ -fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2013;58:1253-62, Epub, doi: 10.1002/hep.26442. (査読有り)
  8. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fijiki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, and Watanabe M. Wnt5a Signaling Mediates Biliary Differentiation of Fetal Hepatic Stem/Progenitor Cells. *Hepatology* 2013;57:2502-13. doi: 10.1002/hep.26293. (査読有り)
  9. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M: Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology*; 2013; 57:46-58, doi: 10.1002/hep.26017. (査読有り)
  10. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Izumi N: Data mining model using simple and readily available factors could identify patients at high risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2012;56:602-608. doi: 10.1016/j.jhep.2011.09.011. (査読有り)
  11. Mina Nakagawa, Naoya Sakamoto, Takako Watanabe, Yuki Nishimura-Sakurai, Izumi Onozuka, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Sayuri Nitta, Kei Kiyohashi, Akiko Kusano-Kitazume, Miyako Murakawa, Kohei Yoshino, Yasuhiro Itsui, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Mamoru Watanabe, the Ochanomizu-Liver Conference Study Group. Association of ITPA gene variation and serum ribavirin concentration with a decline in blood cell concentrations during pegylated interferon-alpha plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Int*. 2012, 7: 153-161, doi: 10.1007/s12072-012-9363-6. (査読有り)
  12. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S,

Kiyohashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M. Identification of Novel N-(Morpholine-4-Carboxyloxy) Amidine Compounds as Potent Inhibitors against Hepatitis C Virus Replication. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:1315-23. doi: 10.1128/AAC.05764-11. (査読有り)

13. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Yatsuhashi H, Izumi N. Age and total ribavirin dose are independent predictors of relapse after interferon therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. *Antivir Ther*. 2012;17:35-43. doi: 10.3851/IMP1923. (査読有り)

〔学会発表〕(計 23 件)

1. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺守: 治療前 RAVs(resistant associated variants)が難治性 C型慢性肝炎の治療効果に与える影響の解析, PD4-11 追加発言; 第51回日本肝臓学会総会 2015年5月22日 熊本

2. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺守: C型慢性肝炎に対するDAAs併用療法の治療効果と耐性変異の検討, PD6-8;第101回日本消化器病学会総会2015年4月23日仙台国際センター(仙台)

3. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺守: S1-2; 難治性C型慢性肝炎に対するプロテアーゼ3剤併用療法の治療効果とDAA耐性変異の検討; 第40回日本肝臓学会東部会 2014年11月27日 京王プラザホテル(東京)

4. Mina Nakagawa, Yasuhiro Asahina, Miki Taniguchi, Takako Watanabe, Yuki Nishimura-Sakurai, Yasuhiro Itsui, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Yujiro Tanaka, Mamoru Watanabe; Impact of host and therapeutic factors and resistant associated variants on response to interferon based-direct acting antiviral treatment in difficult-to-treat chronic hepatitis C patients. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-9-2014, Boston, MA. (Poster #965)

5. Fukiko Kawai-Kitahata, Yasuhiro Asahina, Syun Kaneko, Hiroko Nagata, Fumio Goto, Satoshi Otani, Miki Taniguchi, Miyako Murakawa, Sayuri Nitta, Takako Watanabe, Megumi Tasaka-Fujita, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Nobuyuki Enomoto, Mamoru Watanabe; Gene alterations in  $\beta$ -catenin and p53/ cell cycle control pathway are closely associated with development and prognosis of hepatocellular carcinoma: Comprehensive analyses by next generation sequencing technology. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver

Diseases, Nov-9-2014, Boston, MA. ( USA ) (Oral #130)

6. M. Murakawa, Y. Asahina, M. Nakagawa, S. Nitta, F. Kawai-Kitahata, M. Taniguchi, T. Watanabe, Y. Itsui, S. Kakinuma, M. Watanabe; Expression of IFN $\lambda$ 4 in liver and PBMC is closely associated with higher basal expression of ISGs and impaired induction of IL28B by interferon treatment in chronic hepatitis C non-responder patients American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-11-2014, Boston, MA. ( USA ) (Poster #1800)

7. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺守: C型慢性肝炎に対するインターフェロンをベースとしたプロテアーゼ3剤併用療法の治療効果とDAA耐性変異の検討, PD1-12; 第18回日本肝臓学会大会 2014年10月23日神戸

8. 朝比奈靖浩, 中川美奈, 渡辺守: NS3およびNS5A阻害剤耐性変異とシメプレビルおよびテラプレビル3剤併用療法の治療効果, SY1-5; 第50回日本肝臓学会総会 2014年5月29日ホテルニューオータニ(東京)

9. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺守: インターフェロン治療後の線維化マーカーの推移と発癌リスクの検討, WS6-12; 第50回日本肝臓学会総会 2014年5月29日ホテルニューオータニ(東京)

10. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺守: 次世代プロテアーゼ阻害剤併用3剤治療の適応症例の検討 WS10-13; 第100回日本消化器病学会総会 2014年4月24日東京国際フォーラム(東京)

11. 朝比奈靖浩, 中川美奈, 渡辺守: 発癌リスクを考慮したテラプレビル3剤併用療法の適応と治療効果 S7-7; 第17回日本肝臓学会大会 2013年10月10日グランドプリンスホテル新高輪(品川)

12. 村川美也子, 朝比奈靖浩, 中川美奈, 大谷賢志, 河合富貴子, 谷口未樹, 新田沙由梨, 北詰晶子, 渡辺貴子, 櫻井幸, 柿沼晴, 坂本直哉, 渡辺守: C型慢性肝炎治療におけるIFN不応性に関わるIFN $\lambda$ の機能解析肝臓 P-38; 第17回日本肝臓大会 2013年10月10日グランドプリンスホテル新高輪(品川)

13. 渡辺貴子, 中川美奈ほか; 次世代シークエンサーを用いたプロテアーゼ阻害薬耐性変異株の解析と治療予後の関連についての検討(P-161)第49回日本肝臓学会総会 2013年6月7日京王プラザホテル(東京)

14. 朝比奈靖浩, 中川美奈, 渡辺守: 難治性C型慢性肝炎におけるテラプレビル3剤併用療法の有用性の検討 SY1-4; 第49回日本肝臓学会総会 2013年6月6日京王プラザホテル(東京)

15. 村川美也子, 朝比奈靖浩, 中川美奈, 河合富貴子, 藤木純子, 大谷賢志, 山中秀人, 谷口未樹, 新田沙由梨, 北詰晶子, 渡辺貴子,

櫻井幸、柿沼晴、坂本直哉、渡辺守; IL28B 産生能と C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療応答性および遺伝子多型(SNP)との関連(WS3-2); 第 49 回日本肝臓学会総会 2013 年 6 月 6 日京王プラザホテル(東京)

16. 谷口未樹、中川美奈ほか; 慢性肝疾患における肝細胞癌と IL-6 の関連(O-88)第 49 回日本肝臓学会総会 2013 年 6 月 6 日京王プラザホテル(東京)

17. 朝比奈靖浩、中川美奈、渡辺守; 難治性 C 型慢性肝炎におけるテラプレビル 3 剤併用療法の効果と安全性の検討。(シンポジウム 1) 第 99 回日本消化器病学会総会 2013 年 3 月 22 日城山観光ホテル(鹿児島)

18. 中川美奈、坂本直哉、朝比奈靖浩; 難治性 C 型慢性肝炎における IFN 応答性に関する要因とテラプレビル 3 剤併用療法の効果(シンポジウム 2-10) 第 16 回日本肝臓学会大会 2012.10.10 神戸国際展示場(神戸)

19. 中川美奈、坂本直哉、朝比奈靖浩; C 型肝疾患コホートにおける宿主遺伝子多型および HCV 遺伝子構造と予後との関連(ポスター P305) 第 16 回日本肝臓学会大会 2012.10.10 神戸国際展示場(神戸)

20. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守; 宿主遺伝子情報に基づいた C 型慢性肝炎の最適な治療法の選択 WS3-4 第 48 回日本肝臓学会総会, 2012 年 6 月 7 日石川県立音楽堂(金沢)

21. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守; 慢性肝疾患における肝細胞癌と IL-6 の関連オープンワークショップ 18 第 48 回日本肝臓学会総会, 2012 年 6 月 7 日石川県立音楽堂(金沢)

22. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守; 宿主遺伝子情報に基づいた C 型慢性肝炎治療の効果・安全性の最適化(シンポジウム 6 ゲノムワイド検索(GWAS)と消化器疾患) 第 98 回日本消化器病学会総会 2012 年 4 月 20 日京王プラザホテル(東京)

23. 坂本直哉、中川美奈、渡辺守; IL-6 を介した C 型慢性肝炎のインターフェロン治療抵抗性機構(シンポジウム 3 C 型慢性肝炎の新たな治療展開) 第 98 回日本消化器病学会総会 2012 年 4 月 20 日京王プラザホテル(東京)

〔図書〕(計 2 件)

1. 中川美奈、坂本直哉; C 型肝炎治療における治療効果予測と副作用対策 特集 / C 型肝炎—新時代の治療戦略: 消化器の臨床 2012;15(3): 278-284 ヴァンメディカル

2. 中川美奈、坂本直哉; HCV 治療抵抗性関連遺伝子の同定と治療展開 特集 / ゲノムワイド関連解析からみえてきた消化器疾患: G.I.Research 2012; 6: 17-21

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等;  
東京医科歯科大学消化器内科  
<http://www.tmd.ac.jp/grad/gast/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 美奈 (NAKAGAWA, Mina)  
東京医科歯科大学・医歯学融合教育支援センター・准教授  
研究者番号: 30401342

### (2) 研究分担者

朝比奈 靖浩 (ASAHINA, Yasuhiro)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教授  
研究者番号: 00422692

渡辺 守 (WATANABE, Mamoru)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 10175127

### (3) 連携研究者

坂本 直哉 (SAKAMOTO, Naoya)  
北海道大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 10334418