

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590769

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルス治療抵抗性における自然免疫の関与と難治要因の病態解明

研究課題名(英文) Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in *IL28B* with antiviral response

研究代表者

朝比奈 靖浩 (ASAHINA YASUHIRO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：00422692

研究成果の概要(和文)：

【背景と目的】HCV 1b型におけるPEG-interferon(IFN)/ribavirin(RBV)併用療法の約20%はnull responderで抵抗性を示す。しかし、本治療開始前における効果予測は困難で、また治療抵抗性の機序も不明である。HCV排除には自然免疫が重要であるとされる。また、最近genotype 1bに対するPEG-IFN/RBV併用48週治療における治療抵抗性に宿主のIL28Bの遺伝子多型(SNPs)が関与していることが報告されたが、宿主自然免疫とIL28B遺伝子の関連は明らかではない。そこで本研究の目的は、これらの関連を解明することとする。

【方法】α型PEG-IFN/RBV施行例を対象とし、治療前肝組織における自然免疫系に係わる遺伝子発現を解析し、IL28B SNPと治療効果との関連を検討した。

【成績】IL28B minor例の自然免疫系遺伝子のRIG-I、ISG15の発現はmajorに比し有意に高値であったが、アダプター分子のIPS-1及び抑制系遺伝子のRNF125はIL28B minorで低かった。治療効果別では、不応例では治療中ウイルス反応(VR)が得られた症例に比し有意にRIG-I、ISG15の遺伝子発現が高値、IL28B minorに限っても不応例ではVR例に比し有意に高値で、多変量解析ではRIG-I高発現が不応例に独立して関与していた。

【結論】自然免疫系はPEG-IFN/RBV併用療法における治療抵抗性にウイルス因子と独立して関与していた。

研究成果の概要(英文)：

Innate immunity plays an important role in host antiviral response to hepatitis C viral (HCV) infection. Recently, single nucleotide polymorphism (SNP) of *IL28B* and host response to pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV) were shown to be strongly associated. We aimed to determine the gene expression involving innate immunity in *IL28B* genotypes and elucidate its relation to response to antiviral treatment. We genotyped *IL28B* SNPs (rs8099917 and rs12979860) in 88 chronic hepatitis C patients treated with PEG-IFN-2b/RBV and quantified expressions of viral sensors (*RIG-I*, *MDA5*, and *LGP2*), adaptor molecule (*IPS-1*), related ubiquitin E3-ligase (*RNF125*), modulators (*ISG15* and *USP18*), and *IL28* (*IFN*). Both *IL28B* SNPs were 100% identical; 54 patients possessed rs8099917 TT/rs12979860 CC (*IL28B* major patients) and 34 possessed rs8099917 TG/rs12979860 CT (*IL28B* minor patients). Hepatic expressions of viral sensors and modulators in *IL28B* minor patients were significantly up-regulated compared with that in *IL28B* major patients (~3.3 fold, $p < 0.001$). However, expression of *IPS-1* was significantly lower in *IL28B* minor patients (1.2 fold, $p = 0.028$). Hepatic expressions of viral sensors and modulators were significantly higher in non-virological responders (NVR) than that in others despite stratification by *IL28B* genotype (~2.6 fold, $p < 0.001$). Multivariate and ROC analyses indicated that higher *RIG-I* and *ISG15* expressions and *RIG-I/IPS-1* expression ratio were independent factors for NVR. **Conclusion:** Gene expression involving innate immunity is strongly associated with *IL28B* genotype and response to PEG-IFN/RBV. Both *IL28B* minor allele and higher *RIG-I* and *ISG15* expressions and *RIG-I/IPS-1* ratio are independent factors for NVR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：C型肝炎、自然免疫、RIG-I、IPS-1、IL28B、インターフェロン、リバビリン、テラプレビル

1. 研究開始当初の背景

HCV 1b 型における

PEG-interferon (IFN)/ribavirin (RBV) 併用療法の約 20% は null responder で抵抗性を示す。しかし、本治療開始前における効果予測は困難で、また治療抵抗性の機序も不明である。これまでの in vitro の検討から HCV 排除には自然免疫系、特に RIG-I/IPS-1 系の関与が重要と考えられ、申請者らは実際に治療を行っている genotype 1b の臨床例での RIG-I/IPS-1 系の重要性を報告した (Asahina Y, Izumi N and Enomoto N et al. Gastroenterology 2008)。一方、この系における興味深い点は、HCV が自らの NS3/4A 蛋白を用いて RIG-I/IPS-1 系を標的として、宿主の自然免疫機構から回避していることが示唆されていることである。近年 HCV の NS3/4A に対する阻害剤が開発され、新規抗ウイルス療法としての臨床応用が目前である。しかし、新規 NS3/4A 阻害剤を投与したときの宿主自然免疫の関与は明らかではない。また、最近 genotype 1b に対する PEG-IFN/RBV 併用 48 週治療における治療効果、特に治療抵抗性に宿主の IL28B の遺伝子多型 (SNPs) が関与していることが報告されたが、宿主自然免疫と IL28B 遺伝子の関連は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、①HCV の NS3/4A を抑制するプロテアーゼ阻害薬を投与した場合の RIG-I/IPS-1 系の発現動態、②RIG-I/IPS-1 系の発現プロファイルと IL28B の SNPs および PEG-IFN/RBV 併用療法の治療効果、を解明することとする。

3. 研究の方法

α 型 PEG-IFN/RBV 施行例を対象とし、細胞内ウイルスセンサー (RIG-I)、IFN 誘導遺伝子

(ISG15)、アダプター分子 (IPS-1)、抑制系遺伝子 (RNF125) 及び IFN λ (IL28) の治療前肝組織における遺伝子発現を解析し、IL28B SNP と治療効果との関連を検討した。また TVR 単独投与例 (n=5) で、治療前・中における HCV 動態を経時的に解析し、さらに PBMC 中の遺伝子発現プロファイルをリアルタイム PCR および DNA マイクロアレイを用い 25,000 の遺伝子発現について網羅的に解析した。

4. 研究成果

IL28B minor 例の RIG-I、ISG15 の遺伝子発現は major に比し有意に高値であったが、IPS-1 及び RNF125 は IL28B minor で低かった。一方、IFN λ 遺伝子の肝内発現には IL28B SNP 別に有意差がなかった。治療効果別では、NVR 例では治療中ウイルス反応 (VR) が得られた症例に比し有意に RIG-I、ISG15 の遺伝子発現が高値、IL28B minor に限っても NVR 例では VR 例に比し有意に高値で、多変量解析では RIG-I 高発現が NVR に独立して関与していた。DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析において、発現変化量 >1.2 かつ $p < 0.01$ を条件とした 599 プローブのパスウェイ解析では、TVR 投与により抗原提示、NK 細胞および Toll-like receptor シグナル伝達に関わる遺伝子群の発現の低下を認めた ($p=1.2 \times 10^{-4}$, 5.6×10^{-3} , 2.3×10^{-3})。

【結論】RIG-I/IPS-1 系は PEG-IFN/RBV 併用療法における NVR にウイルス因子と独立して関与していた。TVR 投与により自然免疫系遺伝子の発現プロファイルは動的に変化し、TVR による HCV 抑制に自然免疫系は密接に関与していることが示唆された。IFN λ (IL28) の肝内発現は IL28B SNP や α 型 PEG-IFN を用いた治療効果との関連が乏しく、今後 IL28B minor 症例における λ 型 IFN による治療反応性が期待される。

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 8 件)

1. Itakura J, Kurosaki M, Itakura Y, Maekawa S, Asahina Y, Izumi N, Enomoto N: Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model. **Biosystems** 99: 70-78, 2010. 査読有
2. Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Ikeda H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Higaki M, Enomoto N, Izumi N: A predictive model of response to peginterferon ribavirin in chronic hepatitis C using classification and regression tree analysis. **Hepatol Res** 40: 251-260, 2010. 査読有
3. Namiki I, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M: Management of hepatitis C; Report of the Consensus Meeting at the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009). **Hepatol Res** 40: 347-368, 2010. 査読有
4. Asahina Y, Tsuchiya K, Tamaki N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N: Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology** 52: 518-527, 2010. 査読有
5. Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M. Predictors of virological response to a combination therapy with pegylated interferon plus ribavirin including virus and host factors. **Hepat Res Treat** 2010: 703602, 2010. 査読有
6. Kurosaki M, Hosokawa T, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Ueda K, Tsuchiya K, Kuzuya

T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Enomoto N, Izumi N: Hepatic steatosis in chronic hepatitis C is a significant risk factor for developing hepatocellular carcinoma independent of age, sex, obesity, fibrosis stage and response to interferon therapy. **Hepatol Res** 40: 870-877, 2010 査読有

7. Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Komatsu N, Ueda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Miyake S, Enomoto N, Izumi N: The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase levels are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy. **J Hepatol** 48: 736-742, 2008. 査読有
8. Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Ueda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S: Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. **Gastroenterology** 134:1396-1405, 2008. 査読有

[学会発表] (計 16 件)

1. Asahina Y, Suzuki Y, Tamaki N, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Izumi N. Association between gene expression involving innate immunity and genetic variation in IL28B in antiviral treatment response. The 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses (HCV 2010), Tokyo, September 11, 2010.
2. Asahina Y, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka T, Katoh T, Tanaka T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J,

- Takahashi Y, Kurosaki M, Izumi N. Gene expression involving innate immunity and IL28B variation: its association with antiviral response in chronic hepatitis C. The 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2010), Boston, USA, October 30, 2010.
3. 朝比奈靖浩, 田中博, 泉並木. シンポジウム C 型肝炎-ウイルス感染の分子免疫機構. PEG-IFN/RBV および Telaprevir 投与中の自然免疫系遺伝子発現プロファイルと治療効果. 第 96 回日本消化器病学会大会, 新潟, 2010 年 4 月 22 日
 4. 中西裕之, 朝比奈靖浩, 泉並木. パネルディスカッション 消化器病領域の診療ガイドラインは日常臨床にどう影響を与えたか. 肝硬変も含めた C 型肝炎の包括的ガイドラインの有用性の検討. 第 96 回日本消化器病学会大会, 新潟, 2010 年 4 月 22 日.
 5. 朝比奈靖浩, 田中博, 泉並木. シンポジウム C 型肝炎における抗ウイルス療法の近未来. PEG-IFN/RBV 併用療法およびプロテアーゼ阻害薬投与中の自然免疫系遺伝子発現プロファイルと治療効果. 第 46 回日本肝臓学会総会, 山形, 2010 年 5 月 27 日.
 6. 朝比奈靖浩, 泉並木. パネルディスカッション C 型肝炎に対する新たな治療戦略. PEG-IFN/RBV 併用療法における難治要因と新規抗ウイルス薬の治療効果. 第 14 回日本肝臓学会大会, 横浜, 2010 年 10 月 14 日.
 7. Asahina Y, Hirayama I, Tamaki N, Yasui Y, Tanaka T, Sato M, Ueda K, Kuzuya T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Izumi N. Dynamic response of innate immunity induced by telaprevir and PEG-IFN/RBV treatment and its association with virological response and HCV variants. The 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2009), Boston, USA, October 31, 2009.
 8. 朝比奈靖浩, 黒崎雅之, 泉並木. コンセンサス・ミーティング C 型肝炎治療. ペグインターフェロン・リバビリン併用療法. 第 45 回日本肝臓学会総会, 2009, 神戸.
 9. 朝比奈靖浩, 平山慈子, 泉並木. シンポジウム C 型肝炎における宿主とウイルスの interaction. C 型肝炎の難治要因とテラプレビル抗ウイルス効果および自然免疫に与える影響. 第 45 回日本肝臓学会総会, 神戸, 2009 年 6 月 4 日.
 10. 朝比奈靖浩, 平山慈子, 泉並木. シンポジウム C 型肝炎の長期予後と治療成績から見たガイドラインの妥当性の検討. 第 51 回日本消化器病学会大会, 京都, 2009 年 10 月 15 日.
 11. 朝比奈靖浩, 平山慈子, 泉並木. シンポジウム 肝炎ウイルス治療ガイドラインの検証. C 型肝炎の長期予後と治療成績から見たガイドラインの妥当性の検討. 第 13 回日本肝臓学会大会, 京都, 2009 年 10 月 15 日.
 12. 平山慈子, 朝比奈靖浩, 泉並木. パネルディスカッション C 型肝炎に対する peg-IFN+RBV 併用無効例に対する方策. PEG-IFN/RBV 療法の NVR 寄与因子とその対策. 第 13 回日本肝臓学会大会, 京都, 2009 年 10 月 15 日.
 13. Asahina Y, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Ueda N, Hosokawa T, Ueda K, Ikeda H, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Maekawa S, Enomoto M, Izumi N. Gene expression involving innate immunity and hepatitis C virus mutation in resistance to peginterferon alfa-2b plus ribavirin treatment. The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2008), San Francisco, USA, October 31, 2008.
 14. 朝比奈靖浩, 泉並木, 三宅祥三. シンポジウム C 型肝炎に対する PEG-IFN/Ribavirin 併用療法における治療成績と難治要因の検討. 第 44 回日本肝臓学会総会, 松山, 2008 年 6 月 4 日.
 15. 朝比奈靖浩, 泉並木. シンポジウム 肝炎ウイルス感染と免疫. 自然免疫系分子の治療前および治療中の経時的遺伝子発現と PEG-IFN/ribavirin 併用療法の

治療効果. 第12回肝臓学会大会, 東京,
2008年10月2日.

16. 朝比奈靖浩, 板倉潤, 泉並木. シンポジウム C 型肝炎. PEG-Riba 治療のコンセンサス. C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/Ribavirin 併用療法における治療成績と難治例に対する対策. 第 50 回日本消化器病学会大会, 東京, 2008 年 10 月 2 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝比奈 靖浩 (ASAHINA YASUHIRO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学
研究員

研究者番号: 00422692

(2) 研究分担者

泉 並木 (IZUMI NAMIKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学
研究員

研究者番号: 20397300

黒崎 雅之 (KUROSAKI MASAYUKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学
研究員

研究者番号: 10280976

榎本 信幸 (ENOMOTO NOBUYUKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
研究者番号: 20251530

(3) 連携研究者

なし