

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 1 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590836

研究課題名（和文）HCVゲノム解析による治療効果予測マーカーの開発

研究課題名（英文）Predictive marker for antiviral therapy using HCV genome analysis

研究代表者

坂本 穰（MINORU SAKAMOTO）

山梨大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60324191

研究成果の概要（和文）：C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン（PEG-IFN）+リバビリン（RBV）併用療法の治療成績はC型肝炎ウイルス（HCV）の遺伝子変異（NS5A-ISDR、-IRRDRやコア領域変異 R70Q、L91M）と、宿主の IFN λ 関連の *IL28B* SNP（1塩基多型）とが独立に関連することを明らかにし、これらが治療予測マーカーとして臨床的にも有用であることを明らかにした。さらに、これらは、近年使用可能となった HCV protease 阻害剤である Telaprevir（TVR）を用いた PEG-IFN+RBV+TVR の3剤併用療法においても有用であることが示された。

研究成果の概要（英文）：We clarified the relation between HCV gene mutations and therapeutic effect of pegylated interferon(PEG-IFN) plus ribavirin(RBV) combination therapy for chronic hepatitis C. Number of mutations in the interferon sensitivity determining region (ISDR) or interferon/ribavirin resistance determining region (IRRDR) in HCV-5A, and amino acid substitution of Core70 and Core 91 were correlated to therapeutic effect. Moreover, single nucleotide polymorphisms (SNPs) located near the *IL28B* gene were strongly associated with a response to PEG-IFN/RBV therapy in genotype 1 patients. In recent years, HCV protease inhibitor, Telaprevir(TVR) became available for HCV, these mutations were also important to predict therapeutic effect in triple therapy of PEG-IFN + RBV + TVR .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 年間3万人以上が死亡する肝臓の主要原因であるC型肝炎ウイルス(hepatitis C virus, HCV)に対するインターフェロン

(Interferon, IFN) 治療効果は一部の患者で認められるに過ぎず、現在最も強力なリバビリン(Ribavirin, RBV) 併用療法においても依然として1/3の患者ではウイルス排除を達成できない。これまでにIFNの効果は、C型肝炎の遺伝子型・ウイルス量・さらに研究代表者らのグループが明らかにしたHCV NS5A 遺伝子変異(New Engl J Med 1996)により規定されることが明らかになり、IFN単独治療の効果予測はある程度可能であった。

(2) 一方、これまで、HCVはヒトおよびチンパンジーの生体肝以外での増殖が不可能であり、その増殖機構の詳細な解析が阻まれてきた。しかしHCVの増殖過程を培養細胞内で再現する画期的システムであるHCVレプリコン系が開発され、抗ウイルス療法耐性の分子機構解明が進み、RBV併用療法においては、HCV NS5A 遺伝子変異以外の変異も治療効果に関連している可能性が示唆されている。

(3) 治療抵抗性を示すHCVゲノムの網羅的解析により、HCV NS5A 遺伝子変異以外の変異が明らかになってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HCVのゲノム解析により、遺伝子変異と臨床成績とを比較することで、簡便な治療効果予測マーカーを開発することにある。とくにこれまでの臨床的知見の集積・基礎的検討を踏まえ、IFN+RBV併用療法において治療効果を規定するHCV遺伝子変異の抽出と、簡便な治療効果予測マーカーの開発を行なう。

3. 研究の方法

(1) HCVのIFN・RBV耐性の遺伝子変異と分子機構の解明

臨床的に、IFN・RBV併用療法が無効であった患者血清から得られたHCVを用いて、このHCV遺伝子をレプリコン化して、*in vitro*での治療反応性を検討、リバビリン抵抗性HCV遺伝子の特徴と機能を明らかにする。

(2) C型肝炎患者のIFN・RBV併用療法による治療成績とHCV遺伝子変異との関連性の臨床疫学的検討

(3) 治療効果予測に重要な遺伝子変異検出による簡便な治療効果予測マーカーの開発

遺伝子変異の検討はこれまでdirect sequence法により行なっていたが、遺伝子変異を特異的に簡便に検出する方法を、特異的プライマーによるPCR法や、特異的配列を認識する制限酵素により切断された断片を検出するRFLP法、モノクローナル抗体を用いた血清学的検出法などを用いて、IFN耐性を示すISDRやR70Qなど今回の研究で見出された新たな変異の検出法を開発する。

HCV genotype, ISDR 遺伝子変異によるインターフェロン感受性判定、そして、本研究課題で明らかとなるリバビリン耐性変異を判定するシステムを構築する。

4. 研究成果

C型肝炎に対するPEG-IFN+RBV併用療法の臨床成績からHCVゲノムのNS5A領域内の-ISDR、-IRRDRやコア領域変異(R70Q)(L91M)や宿主のIFN λ 関連のIL28B SNPと関連することを明らかにした。しかもコア領域のアミノ酸変異は、疾患の進展とともに変異率が変化することや、単一個体でも経時的に変化することを示し、宿主ゲノムのIFN λ 遺伝子近傍のIL28Bとも関連することを明らかにした。すなわちコアアミノ酸変異は宿主のゲノムの表現形として体内で選択されていることを示し、PEG-IFN+RBV併用療法の治療効果や疾患の進展と関連する可能性を提唱した。またレプリコン系による検討でもIL28B変異は重要であり、ウイルス増殖や治療反応性に与える影響についても検討した。一方、近年使用可能となったHCV protease 阻害剤であるTalaprevir (TVR)を用いたPEG-IFN+RBV+TVRの3剤併用療法においてもこれらの変異は重要であり、とくにPEG-IFN+RBV療法での治療効果を予測することで、PEG-IFN+RBV+TVRの3剤併用療法の治療効果も推測できる可能性を示した。すなわちPEG-IFN+RBV療法の無反応例では3剤併用療法でも難治であり、これまでの検討で明らかになったHCVゲノム遺伝子変異は、PEG-IFN+RBVのみならず、PEG-IFN+RBV+TVR 3剤併用療法においても臨床的に有用であることを示した。また、HCV protease 阻害剤については、薬剤耐性が問題となるが、これまでの検討では薬剤耐性に関連した既報の遺伝子変異は、治療開始前からすでに存在するが3剤併用療法においては治療の支障にはならないこと示し、治療予測マーカーとしては必須ではないことが

明らかになった。

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 28 件)

1) Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Sugauchi F, Sakamoto N, Yatsushashi 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. *Antiviral Therapy* 2012; 17: 35-43 査読あり

2) Miura M, Maekawa S, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Ohmori T, Kanayama A, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Kitamura T, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N. Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology Int* 2012; 6: 386-396 査読あり

3) Shindo H, Maekawa S, Komase K, Sueki R, Miura M, Kadokura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Enomoto N. Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. *Hepatology Int* 2012 6: 386-396 査読あり

4) Osada M, Kaneko M, Sakamoto M, Endoh M, Takigawa K, Inoue-Suzuki K, Inoue O, Satoh K, Enomoto N, Yatomi Y, Ozaki Y. Causes of thrombocytopenia in chronic hepatitis C viral infection. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2012; 18:272-280 査読あり

5) 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 Hepatology* 2012,56

6) Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Yatsushashi H, Izumi N. Pretreatment prediction of response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C using data

mining analysis. *J Gastroenterol*; 46: 401-409, 2011 査読あり

7) Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Tamori A, Nakagawa M, Izumi N. Sequences in the Interferin Sensitivity Determining Region and Core Region of Hepatitis C Virus Impact Pretreatment Prediction of Response to Peg-interferon Plus Ribavirin: Data Mining Analysis. *J Med Virol*; 83: 445-452, 2011 査読あり

8) Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugauchi 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 Hepatology* 2011 54: 439-448, 2011 査読あり

9) Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus genotype 2a infection reveals critical site influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatology Int*; 5(3): 789-799, 2011 査読あり

10) Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of genotype 2b hepatitis C virus in association with the response to peginterferon and ribavirin therapy. *Plos One* 2011; 6(9): e24514 査読あり

11) Hiramatsu N, Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Sugauchi F, Tamori A, Matsuura K, Izumi N. Pretreatment prediction of anemia progression by pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C infection: Decision-tree analysis. *J Gastroenterol* 46: 1111-1119, 2011 査読あり

12) 坂本穰、榎本信幸. C型肝炎のウイルス変異と治療効果、総合臨床 60 (1)、19-25、2011 査読なし

13) 坂本穰、榎本信幸. ウイルス変異からみた PEG-IFN+RBV 療法の治療効果予測、肝胆膵 62 (2)、307-313、2011 査読なし

14) 坂本穰、榎本信幸. 硬変化した慢性肝炎の治療をどう考えるか、消化器 Book 04 これでおかる! 慢性肝炎の治療戦略 肝癌を防ぐためのマネジメント (井廻道夫企画)、羊土社、東京、106-112、2011 査読なし

15) 坂本穰、榎本信幸. HCV の NS5A 遺伝子変異 (ISDR・IRRDR) とインターフェロン治療反応性、新時代のウイルス性肝炎学、日本臨床 69 増刊号 4、日本臨床社、大阪、234-238、2011 査読なし

16) 坂本穰、榎本信幸. 肝炎診療に必要な遺伝子検査. C 型肝炎の遺伝子解析と診療への応用、Medical Practice 28 (8)、1383-1388、2011 査読なし

17) 三浦美香、坂本穰、榎本信幸. 最新の検査と臨床 肝炎ウイルスの遺伝子解析—病態・治療効果との関連— C 型肝炎ウイルス (HCV). Medical Practice 27 (1) 65-68. 2010 査読なし

18) 坂本穰、榎本信幸. ウイルス遺伝子から見た C 型肝炎治療、Vita 27 (2) . 32-38, 2010 査読なし

19) 坂本穰、榎本信幸. 遺伝子変異と Adherence からみた peg-IFN+RBV 療法無効例の対策、消化器内科 50 (6) : 575-580, 2010 査読なし

20) 坂本穰、榎本信幸. 肝臓領域における検査法の進歩と臨床応用、日本内科学会雑誌 99: 1959-1964, 2010 査読なし

21) 坂本穰、榎本信幸. HCV ゲノム解析からみた治療方針、最新医学 65(9)、1892-1900, 2010 査読なし

22) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. HCV 全アミノ酸解析を用いた PEG-IFN/RBV 併用療法治療反応性の検討、消化器内科 51 (6) : 642-651, 2010 査読なし

23) 坂本穰、榎本信幸. C 型肝炎難治例の治療の実際—治療効果向上のための工夫をどう行うか—治療効果予測とテーラーメイド治療の可能性. 消化器の臨床: 12 (1) : 68-73. 2009 査読なし

24) 坂本穰、榎本信幸. C 型肝炎ウイルス変異に基づく治療戦略. 医学のあゆみ 229 (1) : 59-63. 2009 査読なし

25) 榎本信幸、坂本穰. C 型肝炎. 薬の選び方・使い方のエッセンス. 治療 91: 962-967. 2009 査読なし

26) 坂本穰、榎本信幸. 遺伝子変異からみた C 型肝炎に対するインターフェロン治療効果予測. 日本消化器病学会雑誌 106 (4) . 485-492. 2009 査読あり

27) 榎本信幸、坂本穰、前川伸哉. PEG-IFN/Riba の治療効果予測. 肝胆膵 58 (5) :635-640. 2009 査読なし

28) 坂本穰、榎本信幸. ウイルス変異からみた C 型肝炎の治療法. 消化器科 49 (1) : 79-84. 2009 査読なし

[学会発表] (計 15 件)

1) 坂本穰、前川伸哉、小松信俊、雨宮史武、進藤邦明、中山康弘、井上泰輔、榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノムからみた C 型肝炎に対するインターフェロン治療効果と将来像、第 97 回日本消化器病学会総会、2011.5.14、東京

2) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノムからみたインターフェロン治療効果と新規治療法への期待、第 47 回日本肝臓学会総会 (パネルディスカッション)、2011.6.3、東京

3) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみた PEG-IFN+RBV 療法と protease 阻害剤の適応の検討、第 15 回日本肝臓学会大会 (JDDW2011)、(シンポジウム)、2011.10.21、福岡

4) 坂本穰. ウイルス遺伝子と宿主因子変異からみた C 型肝炎に対する治療方針と将来展望、第 15 回日本肝臓学会大会 (JDDW2011)、(ブラックファーストセミナー)、2011.10.21、福岡

5) 坂本穰、進藤邦明、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、前川伸哉、岡田俊一、榎本信幸. C 型肝炎の診療ガイドラインの検証と個別化治療の可能性. 第 96 回日本消化器病学会総会、2010.4.24、新潟

6) 坂本穰、前川伸哉、進藤浩子、三浦美香、門倉信、進藤邦明、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、岡田俊一、榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみた C 型肝炎に対するインターフェロン治療効果予測. 第 20 回日本抗ウイルス療法研究会学術講演会、2010.5.20、熊本

7) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノムからみたインターフェロン治療効果と個別化医療の可能性. 第 46 回日本肝臓学会総会(シンポジウム)、2010.5.27、山形

8) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみた C 型肝炎に対する治療戦略. 第 14 回日本肝臓学会大会 (JDDW) (パネルディスカッション)、2010.10.14、横浜

9) 坂本穰. Y-PERS から得られた、ウイルス遺伝子と宿主ゲノム解析による C 型肝炎の治療方針. 第 52 回日本消化器病学会大会 (JDDW) ランチョンセミナー、2010.10.16、横浜

10) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異 (とくに IRRDR) と宿主ゲノム解析からみた C 型肝炎に対する治療戦略. 第 38 回日本肝臓学会東部会(パネルディスカッション)、2010.12.3、東京

- 11) 坂本穰、前川伸哉、井上泰輔、雨宮史武、北村敬利、岡田俊一、榎本信幸. 遺伝子変異から見た C 型慢性肝炎に対する治療方針. 第 95 回日本消化器病学会総会、2009.5.9、札幌
- 12) 坂本穰、井上泰輔、雨宮史武、北村敬利、前川伸哉、岡田俊一、榎本信幸. PEG-IFN/Ribavirin 療法の効果に及ぼすウイルス側因子・宿主因子. 第 45 回日本肝臓学会総会、2009.6.4、神戸
- 13) 坂本穰、井上泰輔、榎本信幸. C 型慢性肝炎に対する治療ガイドラインの検証と個別化治療の可能性. 第 13 回日本肝臓学会大会 (JDDW2009) (シンポジウム)、2009.10.14、京都
- 14) 坂本穰、井上泰輔、榎本信幸. 遺伝子変異と Adherence からみた PEG-IFN+RBV 併用療法無効例に対する方策. 第 13 回日本肝臓学会大会 (JDDW2009) (パネルディスカッション)、2009.10.15、京都
- 15) 坂本穰、柏木賢治、三浦美香、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、前川伸哉、岡田俊一、榎本信幸. インターネットを利用した肝疾患診療支援システムの構築. 第 13 回日本肝臓学会大会 (JDDW2009)、2009.10.14、京都

[図書] (計 6 件)

- 1) 坂本穰、榎本信幸. [C 型肝炎の治療① 初回治療] について、ガイドライン/ガイダンス 慢性肝炎 こう診る・こう考える (泉並木編)、日本医事新報社、20-25、2011
- 2) 坂本穰、榎本信幸. 硬変化した慢性肝炎の治療をどう考えるか、消化器 Book 04 これでわかる! 慢性肝炎の治療戦略 肝癌を防ぐためのマネジメント (井廻道夫企画)、羊土社、106-112、2011
- 3) 三浦美香、前川伸哉、門倉信、末木良太、小馬瀬一樹、進藤浩子、進藤邦明、雨宮史武、中山康弘、植竹智義、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸. 肝発癌に関連する C 型肝炎ウイルス遺伝子領域と IL28B SNP の解析、分子消化器病研究会 第 18 回浜名湖シンポジウム記録集 消化器疾患と幹細胞; その基礎と臨床、アークメディア、171-177、2011
- 4) 坂本穰、榎本信幸. 慢性肝炎の治療 (C 型)、今日の消化器疾患治療指針第 3 版 (幕内雅敏、菅野健太郎、工藤正俊編)、医学書院、585-588、2010
- 5) 坂本穰、榎本信幸. C 型肝炎ウイルス変異と治療反応性. 消化器疾患最新の治療 2009-2010. 南江堂、31-34. 2009
- 6) 坂本穰、榎本信幸. 肝炎ウイルスマーカー. 消化器研修ノート. 診断と治療社、186 - 190. 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 穰 (MINORU SAKAMOTO)
山梨大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：60324191

(2) 研究分担者

榎本信幸 (NOBUYUKI ENOMOTO)
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