

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 4 月 17 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：21590837

研究課題名（和文） 抗ウイルス効果を規定するC型肝炎ウイルスゲノム領域の機能解明

研究課題名（英文） Analyzing the molecular roles of viral proteins determining the efficacy of anti-viral therapy in hepatitis C virus infection.

研究代表者

前川 伸哉 (MAEKAWA SHINYA)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・講師

研究者番号：70397298

研究成果の概要（和文）：

C型肝炎ウイルス(HCV)のペグインターフェロン+リバビリン併用療法の効果には HCV のコア領域の変異の有無によって大きな違いがある。本研究では培養細胞を用いた検討にてコア蛋白変異の持つ機能的な役割、増殖に与える影響について解析した。さらに実際の多数の臨床検体での解析によりコア蛋白変異と臨床背景因子にはどのような関連があるのか検討を行った。

研究成果の概要（英文）：

It is known that viral response to the pegylated-interferon plus ribavirin therapy is significantly different depending on the mutational status of core amino acid 70 in chronic hepatitis C virus (HCV) infection. In this study, we tried to clarify the influence of core 70 mutations on the innate immune system as well as viral replication. Moreover, we tried to clarify patients' characteristics depending on the presence of those mutations.

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

キーワード：HCV、コア、NS5A、IL28B

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは 1995 年のインターフェロン単独療法時代に世界に先駆けて、C型肝炎ウイルス(HCV)の治療感受性に NS5A の構造が治療効果を規定することを明らかとしていた。一方、新しい治療である PEG-インターフェロン・リバビリン併用療法では、治療抵抗性 NS5A タイプ症例においても、治療効果を認めるものが存在することが示されてい

たが、研究代表者らはこの原因が HCV 全長シークエンسによって HCV コア 70 番 (HCV70aa) の 1 アミノ酸変異がペグインターフェロン・リバビリン治療効果を決定していることを明らかにした。しかしながら、HCV コア蛋白の機能・意義は不明であった。

2. 研究の目的

本研究はこのコアの機能を vitro と vivo の解

析によって明らかとすることである。

3. 研究の方法

HCV 培養細胞系による検討、ならびに臨床検体による検討双方によって HCV コア蛋白変異の意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1) HCV コア単独発現系を用いたコア変異導入による細胞内機能変化の検討

・コア蛋白の細胞内で持つ本来の機能、さらには 70 番変異がその機能をどのように修飾するのか解明するために、genotype-1b 由来の HCV 遺伝子が組み込まれているプラスミドをもとに HCV コア発現プラスミド、さらに site-directed mutagenesis を用いて 70 番変異を導入したプラスミドを構築、ウエスタンブロットにて両コア蛋白の発現を確認した。

・自然免疫系における抗 HCV システムには 2 つの経路が存在することが報告されている。すなわち細胞内における HCV 複製を認識してインターフェロンを産生する第一の系である RIG-I システム、次に細胞外に分泌されたインターフェロンを細胞表面のレセプターが認識し、多様なインターフェロン誘導遺伝子群を発現させる JAK-STAT 系である。我々は培養肝癌細胞株において上記プラスミドを用い、2 つの経路における野生型と変異型コア蛋白の影響を RIG-I 発現プラスミド産生下での ISRE 活性、あるいはインターフェロン培地添加下での ISRE 活性をアウトプットとして検討した。その結果いずれの経路においてもコア蛋白変異の有無によって ISRE の活性に有意な違いは認められないことを明らかとした。

(2) 全長 HCV レプリコン系を用いたコア変異導入によるウイルス複製能、薬剤感受性変化の検討

・細胞内で自律複製する HCV レプリコンの系で、コア蛋白変異を導入し、実際にコア蛋白変異の有無によって細胞内 HCV-RNA 複製ウイルス増殖がどのように変化するかを検討するため、上記と同様に site-directed mutagenesis を用いて 70 番変異を導入した HCV-1b 株由来のレプリコンを作成した。現在は変異によって HCV-RNA 複製活性がどのように変化するか一過性発現系と持続発現系の 2 系統の検討を行っているが、持続発現系における検討ではコアの点変異の導入により HCV-RNA 複製は殆ど不可能となることを示し、コアの変異が細胞内の増殖に HCV レプリコンの系で決定的な役割を果たすことを示した。

(3) HCV レプリコン系を用いた IL28B 蛋白によるウイルス複製能変化の検討

・H21 年にペグインターフェロンとリバビリン変化効果を規定する宿主因子として III 型インターフェロンの一つである IL28B (インターフェロン λ 3) 遺伝子多型の関与が明らかとなった

(NatGenet. 2009;41(10):1100-4. NatGenet. 2009;41(10):1105-9. Nature. 2009;461(7262):399-401.)。興味深いことに臨床的観察から IL28B 遺伝子多型とウイルス遺伝子、とくにコア蛋白の変異には顕著な相関があることを我々は明らかにしているが、一方で、実際に IL28B 多型がどのようなメカニズムで治療効果に關与するのか明らかとなつてはならず、この解明が急務となっている。インターフェロン λ は配列構造の類似した λ 1、2、3 からなるファミリーを形成するが、われわれは HCV レプリコン系を用い、H22 年度において λ 1、2、3 による抗ウイルス効果について検討した。その結果 λ 1、2、3 は 3 種類ともインターフェロン α と同様に、HCV-RNA の細胞内増殖の抑制、あるいは細胞外における粒子の産生を抑えることを明らかとした。また特に λ 3 はインターフェロン α との相乗作用を示すことを明らかとした。一方、 α と λ がは同じようにインターフェロン誘導遺伝子群の発現を上げるものの、タイムコースが両者で異なることをあきらかとした。

(4) 保存血清を用いた検討

・研究代表者は、ペグインターフェロン・リバビリン併用療法を施行し、さまざまな経過を辿った多数症例のデータベースとこれらに対応する血清、一部の症例において宿主ゲノムを有している。このデータベースを用いて H21 年度に引き続いてさらに症例数を積み重ねて詳細な検討を行ったところ、IL28B 遺伝子多型とウイルス遺伝子、とくにコア蛋白の変異には顕著な相関があることを検証した。さらにコア蛋白、IL28B 遺伝子多型、さらに宿主因子である G-GTP の値には密接な関連があることを明らかとした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1) Inhibition of Hepatitis C Virus Replication and Viral Helicase by Ethyl Acetate Extract of the Marine Feather Star *Alloeocomatella polycladia*
Yamashita A, Abdus K, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, and Moriishi K.
Mar. Drugs 2012, 10(4), 744-761. (査読あり)

2) Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C.

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.

Hepatol Int. 2011 Aug 17. (査読あり)

3) Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients.

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 SI, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Enomoto N.

Hepatol Int. 2011 Aug 18. (査読あり)

4) A new method for induced fit docking (GENIUS) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors.

Takaya D, Yamashita A, Kamiyo K, Gomi J, Ito M, Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Watanabe Y, Arai R, Umeyama H, Honma T, Matsumoto T, Yokoyama S.

Bioorg Med Chem. 2011 Nov 15;19(22):6892-905. (査読あり)

5) Analysis of the complete open reading frame of genotype 2b hepatitis C virus in association with the response to peginterferon and ribavirin therapy.

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.

PLoS One. 2011;6(9):e24514. (査読あり)

6) Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy.

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.

Hepatol Int. 2011 Sep;5(3):789-99. (査読あり)

7) Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for

chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. 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.

J Hepatol. 2011 Mar;54(3):439-48. (査読あり)

8) HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy.

Enomoto N, Maekawa S.

Intervirology. 2010;53(1):66-9. (査読あり)

9) Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model.

Itakura J, Kurosaki M, Itakura Y, Maekawa S, Asahina Y, Izumi N, Enomoto N.

Biosystems. 2010 Jan;99(1):70-8. (査読あり)

10) Viral factors influencing the response to the combination therapy of peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C.

Maekawa S, Enomoto N.

J Gastroenterol. 2009;44(10):1009-15. Review. (査読あり)

11) DICKKOPF-4 and -2 genes are upregulated in human colorectal cancer.

Matsui A, Yamaguchi T, Maekawa S, Miyazaki C, Takano S, Uetake T, Inoue T, Otaka M, Otsuka H, Sato T, Yamashita A, Takahashi Y, Enomoto N.

Cancer Sci. 2009 Oct;100(10):1923-30. (査読あり)

12) Two flavonoids extracts from Glycyrrhizae radix inhibit in vitro hepatitis C virus replication.

Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Suda G, Mishima K, Onuki Y, Yamamoto M, Maekawa S, Enomoto N, Kanai T, Tsuchiya K, Watanabe M.

Hepatol Res. 2009 Jan;39(1):60-9. (査読あり)

[学会発表] (計 9 件)

1) 前川伸哉

ウイルスゲノム、および IL28B SNP 解析を用いた HCV 肝病態の検討

第 47 回 日本肝臓学会総会 2011/6/2-3 東京

2) 前川伸哉

HCV 全長解析による IL28B SNP と独立して治療効果を規定するウイルス因子の検討

第 15 回 日本肝臓学会大会 2011/10/20-21 福岡

3) Maekawa S, et al.

Analysis of the response to pegylated-interferon plus ribavirin therapy in chronic HCV-1b infection using comprehensive information of viral and host factors.

45th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL2010). April 14-18, 2010 Vienna, Austria.

4) Shindo H, Maekawa S, et al.

Characterization of protease inhibitor resistance mutations in untreated patients infected with genotype 1b hepatitis c virus.

45th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL2010). April 14-18, 2010 Vienna, Austria.

5) Komase K, Maekawa S, et al

Extensive analysis of Serum Cytokines Associated to The Response in The PEG-IFN+RBV Combination Therapy in Genotype 1b HCV Infection. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses (HCV2010). September 10-14, 2010 Yokohama, Japan.

6) Shindo H, Maekawa S, et al.

Characterization of Protease Inhibitor Resistance Mutations in Untreated Patients Infected with Genotype 1b Hepatitis C Virus.

17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses (HCV2010). September 10-14, 2010 Yokohama, Japan.

7) Miura M, Maekawa S, et al.

Investigation for viral genomic regions associated to hepatocarcinogenesis in hepatitis C.

17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses (HCV2010). September 10-14, 2010 Yokohama, Japan.

8) 前川伸哉

HCV ゲノムは抗ウイルス効果を規定する
第 45 回日本肝臓学会総会ワークショップ
2009 年 6 月 4 日 神戸

9) 前川伸哉

肝炎の進行と治療感受性を規定するウイルス領域の包括的検討
第 13 回日本肝臓学会大会シンポジウム
2009 年 10 月 15 日 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川 伸哉 (MAEKAWA SHINYA)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
講師
研究者番号：70397298

(2) 研究分担者

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