

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590544

研究課題名(和文) 宿主遺伝子多型が抗HCV剤感受性に及ぼす機構の解明

研究課題名(英文) Analysis for the IL28B SNPs and IFN sensitivity using HCV cell culture models

研究代表者

池田 正徳 (Masanori, Ikeda)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：30315767

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)：C型慢性肝炎に対するPEG-IFN/RBV併用量法に対する治療予測因子としてIL28B領域のSNPsが報告されたがその機序は明らかになっていない。本研究では培養細胞モデルの開発にあたり、ヒト肝細胞株のIL28B SNPsを検討した。HCVの増殖が可能なLi23およびHuH-7細胞のIL28B SNPsはそれぞれ、IFN反応型と抵抗型であった。Li23とHuH-7細胞におけるIFN- α の感受性は両細胞間で有意な差は認められなかったが、Li23細胞においてIFN- α はHuH-7細胞よりも100倍高い抗HCV活性を示した。本研究でIL28B SNPsとHCVの研究に有用な培養細胞モデルを開発した。

研究成果の概要(英文)：The current standard therapy for chronic hepatitis C is based on pegylated-interferon (PEG-IFN)/ribavirin (RBV). In 2011, HCV protease inhibitor entered the clinical stage. The new treatment with protease inhibitor is also based on a combination of PEG-IFN/RBV. In 2009, SNPs upstream from the IL28B gene has been reported as strong predictive host factors of the effect of PEG-IFN/RBV. However, the precise mechanism underlying this influence is unclear. Therefore, we examined the IL28B genotypes for human hepatocyte cell lines in order to develop a cell culture model. HCV permissive Li23 and HuH-7 cells are exhibited IFN-sensitive and -resistant IL28B SNPs, respectively. The sensitivities to IFN- α are not significantly different in HCV harboring Li23 and HuH-7 cells. However, IFN- α exhibited 100 times higher inhibitory effect on HCV RNA replication in Li23 cells than in HuH-7 cells. These HCV cell culture systems are useful tools for the study of IL28B SNPs and HCV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HCV IL28B SNPs HuH-7 Li23 IFN- α IFN- β

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (HCV)感染は、高頻度で慢性肝炎に移行して致死的な肝硬変、肝がんの原因となる。HCV感染者は国内で約200万人、世界で約2億人と推定されており、人類にとって克服すべきもっとも重要な感染症の一つである。ペグインターフェロン (PEG-IFN)/リバビリン (RBV)併用療法はHCVに対する標準的な治療法で、そのウイルス排除に対する有効率は約50%である。HCVに対する治療応答性にはウイルス側の因子と宿主側の因子に関連する報告がなされている。ウイルス側の因子としてはHCVのCoreとNS5AにIFN感受性に関わる遺伝子領域が知られている。また、宿主側の因子としては、性別、年齢やIFN応答に関わる一塩基多型 (SNP)などがある。しかしながら、その機構解明については不明な点が多い。最近では、PEG-IFN/RBVにHCV蛋白質を標的としたDirectacting Antivirals (DAA)を加えた3剤併用療法が臨床応用されている。3剤併用療法でもウイルス側および宿主側の治療応答性に関わる因子は臨床の場で重要な判断材料となっている。

2. 研究の目的

PEG-IFN/RBV併用療法の効果を予想する宿主因子としてIL28B (IFN- λ 3ともいう)遺伝子近傍のSNPが報告された(Ge et al. Nature 2009; Tanaka et al. Nature Genetics 2009)。しかしながら、IL28BのSNPが治療効果にどのように寄与しているかについてはこれまで明らかにされていない。2011年より、HCV蛋白質のセリンプロテアーゼに対する阻害剤であるテラプレビルが臨床応用されている。テラプレビルもPEG-IFN/RBVと併用されるために、新しい三剤併用療法でもIL28B SNPsが治療の予測因子であることが報告されている (Akuta et al. Hepatology 2010)。新しい治療法においても、IL28B SNPsの違いにより、IFN応答が異なる機序を明らかにする本研究の目的は重要な意義を有するものと思われる。

本研究ではIL28BのSNPがHCVの排除に寄与するメカニズムについて、ヒト培養肝臓細胞モデルを用いて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

HCV RNA複製が可能なHuH-7、Li23以外にLi21、Li22、Li24、HuH-6、HepG2、PH5CH8、NKNT3、PLC、OUMS29、HLE、HLFの11種類を加えた計13種類の肝細胞株のIL28B領域のSNPをダイレクトシーケンシング法にて決定する。対象とするIL28BのSNPは日米のグループから最も治療効果予測と関連することが報告されているrs8099917およびrs12979860について検討する。

IFN- λ 、 λ 等で刺激をした時、IL28B SNPの違いによりIFN応答が異なるか検討する。また、メジャーアリル、マイナーアリルのIL28B SNPを有する肝細胞にIFN- λ 、 λ を添加し誘導される遺伝子の違いをマイクロアレイで解析する。

メジャーアリル、マイナーアリルのIL28B SNPを有する肝細胞を用いてHCVサブゲノムレプリコンを作製し、IFN応答、感受性について検討する。はじめに、genome-length HCV RNA複製細胞よりも、可能性の高いsubgenome HCV RNA複製細胞の樹立を実施する。新しい、細胞ではHCV RNA複製効率が低いことが予想されるので、HCV RNAの複製を増強するような適応変異を導入したHCV遺伝子を用いてレプリコン細胞の樹立を目指す。

4. 研究成果

13種類の肝細胞株のIL28B領域のSNP(rs8099917)についてdirect sequencing法で決定した。Li21、Li22、Li23、Li24、PLC、OUMS29、PH5CH8、及びHepG2の8種類の細胞ではメジャー型(IFN反応型)を、NKNT3、HuH-6、およびHuH-7の3種類の細胞ではヘテロ型(IFN抵抗型)を、そして、HLEおよびHLFの2種類の細胞ではマイナー型(IFN抵抗型)の遺伝子型を示した。次に、IFN応答性に関わる他のIL28B SNP (rs12979860)についても同様にdirect sequencing法を実施したところ、HepG2細胞ではrs8099917ではIFN反応型、rs12979860ではIFN抵抗型の遺伝子型と乖離する結果となった。

HCV RNA複製細胞を用いた研究では、IL28B領域のSNPsが異なるHuH-7とLi23細胞を用いて、IFN- λ に対する感受性の検討を実施した。IFN抵抗型のSNPを有するHuH-7細胞に比べて、IFN反応型のSNPを有するLi23細胞ではIFN- λ に対する感受性が100倍高いことを明らかにすることができた。一方、IFN- λ に対する感受性は両細胞間で有意な差は認められなかった。

培養細胞のSNPsを検討においてrs8099917とrs12979860の遺伝子型が乖離する例(HepG2)が見出されたことを受けて、現在、臨床例においてもSNPs間で遺伝子型が乖離する症例がないかどうか検討する準備を進めている。

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27件)

1. Matsuno K, Ueda Y, Fukuda M, Onoda K, Waki M, Ikeda M, Kato N, Miyachi H. Synthesis and inhibitory activity on hepatitis C virus RNA replication of 4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxy-2-propyl)aniline analogs. Bioorg Med Chem Lett.,

査読有 24(17):4276-80 (2014)

2. Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets. *Virology*, 査読有 462-463:166-74 (2014)

3. Kato N, Sejima H, Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M. Genetic characterization of hepatitis C virus in long-term RNA replication using Li23 cell culture systems. *PLoS ONE*, 査読有 9(3):e91156 (2014)

4. Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Biochem Biophys Res Commun.*, in press 査読有 447:341-5(2014)

5. Tanaka T, Kuroda K, Ikeda M, Wakita T, Kato N, Makishima M. Hepatitis C virus NS4B targets lipid droplets through hydrophobic residues in the amphipathic helices. *J. Lipid Res.*, 査読有 54:881-892 (2013)

6. Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有 430:592-597 (2013)

7. Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Adenosine kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin. *Hepatology*, 査読有 58(4):1236-44 (2013)

8. Shinohara Y, Imajo K, Yoneda M, Tomeno W, Ogawa Y, Kirikoshi H, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Nakajima A, Saito S. Unfolded protein response pathways regulate Hepatitis C virus replication via modulation of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有 432:326-332 (2013)

9. Tanaka T, Kuroda K, Ikeda M, Kato N, Shimizu K, Makishima M. Direct targeting of proteins to lipid droplets demonstrated by time-lapse live cell imaging. *J Bioscience and Bioengineering*, 査読有 116(5):620-623 (2013)

10. Shinohara Y, Imajo K, Yoneda M,

Tomeno W, Ogawa Y, Fujita K, Kirikoshi H, Takahashi J, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Nakajima A, Saito S. Hepatic triglyceride lipase plays an essential role in changing the lipid metabolism in genotype 1b hepatitis C virus replicon cells and hepatitis C patients. *Hepatol. Res.*, 査読有 43(11):1190-8 (2013)

11. Sato A, Saito Y, Sugiyama K, Sakasegawa N, Muramatsu T, Fukuda S, Yoneya M, Kimura M, Ebinuma H, Hibi T, Ikeda M, Kato N, Saito H. Suppressing effect of the histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), on hepatitis C virus replication via epigenetic changes in host cells. *J. Cell. Biochem.*, 査読有 114(9):1987-1996 (2013)

12. Ueda Y, Takeda M, Mori K, Dansako H, Wakita T, Kim HS, Sato A, Wataya Y, Ikeda M, Kato N. New preclinical antimalarial drugs potently inhibit hepatitis C virus genotype 1b RNA replication. *PLoS ONE*, 査読有 8(8):e72519 (2013)

13. Ban S, Ueda Y, Ohashi M, Matsuno K, Ikeda M, Kato N, Miyachi H. Peroxisome proliferator-activated receptor delta antagonists inhibit hepatitis C virus RNA replication. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 査読有 23(17):4774-4778 (2013)

14. Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Shindo H, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, Moriishi K. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus. *PLoS ONE*, 査読有 8(12):e82299 (2013)

15. Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Amphimedon* sp. *PLoS One*, 査読有 7:e48685 (2012)

16. Takeda M, Ikeda M, Mori K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication. *FEBS Open Bio.*, 査読有 2:279-283 (2012)

17. Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Virus Genes*, 査読有 44(3):374-81, 2012.

18. Iikura M, Furihata T, Mizuguchi M, Nagai M, Ikeda M, Kato N, Tsubota A, Chiba K. ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 査読有 56(3):1407-13, 2012.

19. Takeshita S, Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H, Matsuzaki T, Otani M, Muraoka T, Akiyama M, Miuma S, Ozawa E, Ikeda M, Kato N, Isomoto H, Takeshima F, Nakao K. Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells. *J. Gastroenterol.*, 査読有 47(2):195-202, 2012.

20. Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Development of hepatitis C virus production reporter assay systems using two different hepatoma cell lines. *J. Gen. Virol.*, 査読有 93 (7):1422-1431, 2012.

21. Yamashita A, Salam KA, 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, Moriishi K. Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Mar. Drugs*, 査読有 10:744-761, 2012.

22. Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. *Virus Res.*, 査読有 167(1):74-85, 2012.

23. Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J. Virol.*, 査読有 85(14):6882-92, 2011.

24. Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and hepatitis C virus strains are required for the objective evaluation of anti-hepatitis C virus

reagents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有 409(4):663-8, 2011.

25. Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe KI, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer Agent Teprenone Inhibits Hepatitis C Virus Replication: Potential Treatment for Hepatitis C. *Liver Int.*, 査読有 31(6):871-80, 2011.

26. Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Mechanism of action of Ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. *Virus Res.*, 査読有 151(1):61-70, 2011.

27. Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT System Is Required for Hepatitis C Virus Production. 査読有 PLoS ONE, 6(1): e14517, 2011.

〔学会発表〕(計 26 件)

1. Ueda Y, Kim HS, Dansako H, Satoh S, Ikeda M, Doi H, Wataya Y, Kato N. Characterization of anti-HCV activity of N-251, a preclinical antimalarial drug, and its combination effect with DAA. 21st international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Banff, Canada, 2014 Sep.

2. Sejima H, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Analysis on Transcriptional Regulatory Mechanisms of Genes whose Expressions were Reduced during Long-term Intracellular HCV-RNA Replication. 21st international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Banff, Canada, 2014 Sep.

3. Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Human Hepatoma HuH-7 Cell Line-derived RSc cells Show Higher Viral Productivity in Response to Infection with HCV-JFH-1 than Huh7.5 Cells. 21st international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Banff, Canada, 2014 Sep.

4. 武田 緑、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之 小胞輸送蛋白質 Rab13 は HCV 感染に必要な宿主因子である 第 18 回日本肝臓学会大会、神戸、2014 年 10 月

5. 上田 優輝、金 恵淑、團迫 浩方、佐藤 伸哉、池田 正徳、土居弘幸、綿矢 有佑、加藤 宣之 抗マラリア薬候補で強い抗 HCV 活性を示

す N-251 の臨床応用に向けた研究と DAA との併用効果 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

6. 武田 緑、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之 HCV ライフサイクルにおける小胞輸送蛋白質 Rab13 の役割 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

7. 武田 緑、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之 C 型肝炎ウイルスのライフサイクルにおける Rab13 の重要性 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月

8. Takeda M, Ikeda M, Mori K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication. 20th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Melbourne, 12. Australia, 2013 Oct.

9. 武田 緑、池田 正徳、森 京子、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之 骨粗鬆症治療剤であるラロキシフェンの抗 HCV 活性機構について 第 49 回日本肝臓学会総会、東京、2013 年 6 月

10. 武田 緑、池田 正徳、森 京子、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之 遺伝子型の異なる HCV 培養細胞システムを用いたラロキシフェンの抗 HCV 活性の検討 第 61 回日本ウイルス学会学術総会、神戸、2013 年 11 月

11. 佐藤 伸哉、森 京子、上田 優輝、瀬島 寛恵、團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之 リバビリン耐性全長 HCV-RNA 複製細胞株の樹立 第 61 回日本ウイルス学会学術総会、神戸、2013 年 11 月

12. 武田 緑、池田 正徳、森 京子、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之 骨粗鬆症治療剤ラロキシフェンは C 型肝炎ウイルスの増殖を抑制する 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月

13. Ikeda M, Takeda M, Korenaga M, Ariumi Y, Hino K, Kato N. New IL28B single nucleotide polymorphism compensates rs8099917 in the response to therapy for chronic Hepatitis C. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9:

Venice, Italy

14. Hara Y, Yanatori I, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Ikeda M, Kishi F, Kato N, Hino K. Hepatitis C virus protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy

15. Kasai H, Kawakami K, Yamashita Y, Ikeda M, Kato N, Enomoto N, Matsuura Y, Kusunoki M, Moriishi K. FKBP6 plays an important role in HCV replication through binding to HCV NS5A. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy

16. Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijilata M, Maki M, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-Body and stress granule components around lipid droplets. In : 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2011 Sept 8-12: Seattle, U.S.A.

17. Ariumi Y, Kuroki M, Inoue M, Hijikata M, Ikeda M, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. Dynamic Regulation of cytoplasmic mRNA-containing bodies in HCV systems. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy

18. Takeda M, Ikeda M, Airumi Y, Wakita T, Kato N. Development of HCV reporter-assay systems using two hepatoma cell lines and analysis of the factors determining sensitivity to HCV infection. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy

19. 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆字、加藤 宣之 Li23 細胞を用いた新しい JFH-1 株 HCV 感染レポーターアッセイ系の開発と感受性を規定する因子の検討 第 16 回日本肝臓学会大会、神戸、2012 年 10 月

20. 池田 正徳、是永 匡紹、武田 緑、有海 康雄、日野 啓輔、加藤 宣之 IL28B SNPs の制限酵素法による判定法と比較 第 16 回日本肝臓学会大会、神戸、2012 年 10 月

21. 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆
字、加藤 宣之 2 種類の肝細胞株 (HuH-7 と
Li23) を用いた JFH-1 株 HCV 感染レポーターア
ッセイシステムの開発と感染効率を規定する
宿主因子の検討 第 60 回日本ウイルス学会学
術集会、大阪、2012 年 11 月

22. 池田 正徳、是永 匡紹、武田 緑、有海 康
雄、日野 啓輔、加藤 宣之 新規 IL28B
SNP(rs8113007) の HCV に対する IFN 応答性の
検討 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大
阪、2012 年 11 月

23. 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆
字、加藤 宣之 異なる 2 種類のヒト肝癌細胞
株を用いた HCV 感染レポーターアッセイ系の
開発と HCV 感染への感受性を規定する因子の
検討
第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012
年 12 月

24. Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Waikita T,
Kato N. Development of HCV JFH-1 reporter
assay systems using different human
hepatoma cell lines. Meetings of the Three
Divisions of the International Union of
Microbiological Societies 2011 Sapporo,
Japan, 2011 Sep.

25. 池田 正徳、武田 緑、加藤 宣之 メバロ
ン酸経路を標的とした新しい抗 HCV 剤開発の
基礎 第 47 回日本肝臓学会総会、東京、2011
年 6 月

26. 上田 優輝、森 京子、池田 正徳、有海 康
雄、加藤 宣之 抗 HCV 剤の活性評価には複数
の細胞株由来のアッセイ系が必要である 第
47 回日本肝臓学会総会、東京、2011 年 6 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<https://sites.google.com/site/bunshiuirusukansenkyubunya/home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 正徳 (MASANORI Ikeda)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科
・教授

研究者番号 : 30315767

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし