

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23790804

研究課題名（和文） C型肝炎治療に関わるインターフェロンλの機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of INFλ on hepatitis C therapy.

研究代表者

飯島 沙幸 (IIJIMA SAYUKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00416273

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルス(HCV)慢性感染患者に対するペグインターフェロン・リバビリン(Peg-IFN α +RBV)治療効果を規定する遺伝要因として IL28B (IFN λ 3) の遺伝子多型が報告されているがその機能メカニズムは詳細が不明である。今回、Peg-IFN α +RBV 療法(2剤療法)、さらに Peg-IFN α +RBV +プロテアーゼ阻害剤療法(3剤療法)患者に対し、薬剤投与直後の ISG 発現誘導と IL28B SNP の関連性を検討した。SNP 間で比較したところ、3剤治療患者における IL28B SNP HE/MI の患者では治療開始直後の発現誘導で遺伝子発現抑制効果を持つ ISG の発現が高い傾向が認められた。これらの結果と治療効果との関連性の検証を進めている。

研究成果の概要（英文）：Polymorphisms of IL28B (IFN λ 3) have been reported as genetic factors that it associated with the response to pegylated IFN-alpha (PEG-IFN α) + ribavirin (RBV) treatment in chronic hepatitis C patients. However, details of IL28B functions are unknown. In this study, we examined the relevance of IL28B SNP and ISG induction by drug administration. Our subjects were the patients of Peg-IFN α + RBV therapy (dual therapy) or Peg-IFN α + RBV + protease inhibitor therapy (three-drug therapy). In the gene-expression of inhibitor factors, the result of HE/MI patients tended to be higher than the gene expression of MA patients immediately after a medical treatment start. We will also verify the relevance of the therapeutic effect to the ISG expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：C型肝炎、IFN λ , ISG

1. 研究開始当初の背景

2009年9月、C型肝炎ウイルス(HCV)慢性

感染患者に対するペグインターフェロン・リ
 バビリン (Peg-IFN α +RBV) 治療効果を規定す
 る遺伝要因として IL28B (IFN λ 3) の遺伝子
 多型が日本 (Tanaka Y, et al. Nature
 Genetics 2009)、欧米で同時に報告された。
 HCV genotype 1 高ウイルス量で
 Peg-IFN α +RBV 無効例の多くは、IL28B の産
 生不十分な Minor 遺伝子型 (ヘテロ (HE)・マ
 イナーホモ (MI)) であることを見出し、無効
 となる危険率は Major 遺伝子型 (メジャーホ
 モ:MA) をもつ患者に比して 30 倍 ($P= \sim 1.00$
 $\times 10^{-32}$) であった。同じく IFN λ の IL29 (λ 1)
 はすでに臨床試験が開始され、副作用が少な
 く、その有効性が期待されている。しかし
 IL28B 遺伝子の詳細な機能は不明であった。
 ヒトゲノムシーケンスから 2003 年にクロ
 ーニングされた IFN- λ は、III 型 IFN ファミリ
 ーに分類され、構造の似た三つの分子
 IL28A (IFN- λ 2)、IL28B (IFN- λ 3) および
 IL29 (IFN- λ 1) が存在する。IFN λ は特異的な
 レセプター (IL28RA) に結合後、JaK-STAT 系シ
 グナル経路を介してインターフェロン誘導
 遺伝子群 (ISGs) の発現レベルを向上させ、
 抗ウイルス活性を発揮する (Sheppard et al,
 Nat Immunol 2003)。しかし IFN λ 特異的な
 機能は不明な点が多い。関連する知見として
 は

(1) ISGs 誘導: I 型 IFN と比較すると IFN
 λ の ISGs 誘導能は弱く、その一方で遺伝子
 発現効果は長時間持続される (Marcello et
 al, Gastroenterology 2006)。また IFN λ 特
 異的に誘導される ISG も特定されておらず、
 抗ウイルス活性の詳細は明らかでない。

(2) 産生細胞: IFN λ の産生細胞としてマ

クロファージや樹状細胞 (DC) が上がってい
 るが、まだ特定に至っていない。I 型 IFN に
 より IFN λ 発現が増強される (Siren et al, J
 Immunol 2005) 事は報告されており、I 型 IFN
 と IFN- λ の機能発現の上での関連性が示唆
 される。

(3) 遺伝子多型の影響: HCV 感染患者由来
 の末梢血単核球 (PBMC) 中では Minor 型で
 IFN λ の発現が低く (Tanaka et al, Nature
 genetics 2009)、肝臓内での ISGs は高いと
 報告されているが (Honda, Tanaka et.al
 Gastroenterology 2010)、その詳細は不明であ
 る。

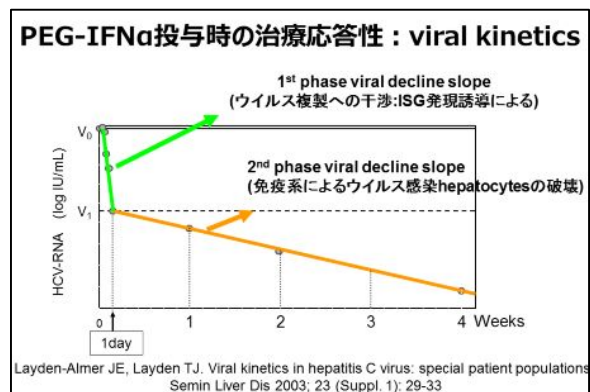


図1 PEG-IFN α 投与と抗ウイルス効果

Peg-IFN α 投与による抗ウイルス効果は投
 与後 1st phase, 2nd phase の二期に大きく
 分けられるとされ、投与直後 (1st phase) の
 ウイルス複製への干渉効果は主に ISG 発現誘
 導により生じ、一日後からの 2nd phase の抗
 ウイルス効果は主に免疫系機能に依存する
 (図 1)。1st phase は短時間であるが抗ウイ
 ルス効果は大きく、ISG 誘導の重要性が推測
 できる。

2. 研究の目的

慢性 C 型肝炎患者に対する Peg-IFN α +RBV
 治療において、治療効果予測に対する IL28B
 SNP の有効性発揮のメカニズム解明をめざし、

解析をスタートした。上記の背景から、薬剤投与初期(1st phase)の ISG 誘導と IL28B SNP 関連性に注目し、研究を進めた。

3. 研究の方法

IL28B 遺伝子多型の異なる HCV 感染患者において、I 型 IFN による ISGs 誘導を検証する。Peg-IFN α +RBV (2 剤) 投与患者の①投与前②投与後 8 時間③投与後 24 時間における PBMC から RNA を回収し、(1)マイクロアレイによる ISG 発現解析(2) (1)の再現性をリアルタイム PCR による測定で確認した。また、2011 年から難治患者に対し 3 剤治療 (Peg-IFN α +RBV+ protease inhibitor) がスタートされたが、こちらの 3 剤投与患者に対しても同様に ISG 解析を行い、難治患者における ISG 誘導と IL28B 遺伝子多型の関連性を検証した。

4. 研究成果

(1) 2 剤(Peg-IFN α +RBV) 投与患者における投与直後の ISG 発現変動解析

IL28B SNP MA6 名、HE4 名のサンプルに対し自然免疫系に関与する 208 遺伝子をチップに搭載したマイクロアレイによる解析で PBMC 中の ISG 発現解析を行ったところ、遺伝子全体の傾向として①投与後 8 時間では HE の方が高発現の遺伝子が多い②24 時間では逆に MA の方が高発現の遺伝子が多い結果となった。また各遺伝子の比較の結果、①転写因子②遺伝子発現抑制に関わる因子③サイトカイン等のグループに含まれる遺伝子が IL28B SNP 型の差異と関連する因子として抽出された。これらの結果の再現性をリアルタイム PCR で確認し、そのデータを元に遺伝子の絞り込みを行った。

リアルタイム PCR の結果、ISG15, Mx 等の発現誘導のかかる ISG は 8 時間後に MA, HE 双方で強く発現誘導されており、二つのグル

ープに有意差は無かった。一方 A20 遺伝子(転写因子 NF κ B, IRF3 の抑制因子)や SOCS3 (I 型 IFN シグナル伝達系の抑制因子)では発現誘導に有意差が確認され、いずれも MA で高発現であった。しかし、治療効果判定との関連性を検証したところ使用した症例はほぼ全て良好な治療効果を得ており、ISG 発現誘導と IL28B SNP、治療効果の三つの間には関連性が認められなかった。

(2) 3 剤(Peg-IFN α +RBV+PI) 投与患者における投与直後の ISG 発現変動解析

(1)と同様、計 50 名の患者から薬剤投与前、投与後 8 時間、24 時間の PBMC 内の ISG 変動をリアルタイム PCR で測定した。絞り込んだ ISG のうち MA, HE 間で発現誘導に有意差があったのは遺伝子発現抑制系因子といくつかのサイトカインであった。

これらの遺伝子は免疫系に関わる遺伝子の発現に影響を及ぼすため、治療経過の 2nd phase に何らかの変動が生じている可能性が推測された。その点を検討するため現在各患者の血清中サイトカインの測定を進めており、preliminary data であるが IL28B SNP 依存的な差異を検出している。また、これらの結果と治療効果との関連性も検討しており、近日中にまとめる予定である。

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 1 件)

①飯島沙幸, 田中靖人「ウイルス肝炎研究における GWAS の意義」化学療法の領域 28 巻増刊, 「ウイルス肝炎のすべて」医薬ジャーナル社, pp955-965, 2012.

https://www.iyaku-j.com/index.php?main_page=index&cPath=5_1_16_3741

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 渡邊綱正, 飯島沙幸, 村上周子, 田中靖人: C型肝炎治療効果を修飾するインターフェロンλのメカニズム解明, 分子消化器病学会浜名湖シンポジウム, 12月23-24, 2012, 浜名湖.
- ② 飯島沙幸, 渡邊綱正, 田中靖人: C型慢性肝炎患者インターフェロン投与直後の遺伝子発現変動. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 11月13日-15日, 2012, 大阪.
- ③ 飯島沙幸, 渡邊綱正, 松浦健太郎, 飯尾悦子, 新海登, 村上周子, 田中靖人: 末梢血単核球を用いたC型慢性肝炎患者PEG-IFN/RBV投与直後のISG挙動. 第16回日本肝臓学会大会, 10月10-13日, 2012, 神戸
- ④ 渡邊綱正, 飯島沙幸, 田中靖人: C型肝炎治療効果を修飾するインターフェロンλシグナルの解析. 第48回日本肝臓学会総会, 6月7-8日, 2012, 金沢.
- ⑤ 渡邊綱正, 飯島沙幸, 村上周子, 田中靖人: C型肝炎治療効果を修飾するインターフェロンλのメカニズム解明, 分子消化器病学会浜名湖シンポジウム, 12月22-23日, 2011, 浜名湖.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 沙幸 (IIJIMA SAYUKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 00416273

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し

(4) 研究協力者

田中 靖人 (TANAKA YASUHITO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 90336694

渡邊 綱正 (WATANABE TSUNAMASA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 20338528

松浦 健太郎 (MATSUURA KENTAROU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医

研究者番号: 30580576

飯尾 悦子 (IIO ETSUKO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・大学院生

研究者番号: 無し

北條 真弓 (HOJO MAYUMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・技術員

研究者番号: 無し