

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590988

研究課題名(和文) C型肝炎治療効果を修飾するインターフェロン のメカニズム解明と個別化医療への応用

研究課題名(英文) Role of IFN-Lambda for chronic hepatitis C treatment toward personalized medicine

研究代表者

渡邊 綱正 (WATANABE, Tsunamasa)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20338528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)治療効果予測因子であるIL28B(インターフェロン・ λ (IFN λ)のひとつ)周辺遺伝子多型(SNPs)の意義を明らかにするため、HCV持続感染モデル動物を用いて肝内インターフェロン誘導遺伝子(ISGs)の差異を検討した。その結果、IFN λ 発現量がIL28B SNPsにより異なることを見出した。また、HCV初感染を模倣したリガンド刺激実験から、HCV初感染時のIFN λ s発現量がSNPsにより異なっていた。以上より、IL28B SNPsにより異なるIFN λ 誘導能がHCV制御に重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To analyze the effects of interferon (IFN)- λ , which has received considerable attention in hepatitis C virus (HCV), the induction of antiviral IFN-stimulated genes (ISGs) was investigated using chronically HCV infected model mice. IFN- λ expression levels by treatment of peg-IFN- α and peg-IFN- λ were significantly induced in HCV-infected human hepatocytes harbouring the favourable IL28B genotype. Moreover, IFN- λ responses against 5'-triphosphate single stranded RNA transfection (mimic of HCV infection) were varied from the host polymorphisms near IL28B. Our results suggest that a response of human hepatocytes against HCV infection could be contribute to type III IFN production and the responses might be depended on the genetic feature near IL28B.

研究分野：肝臓病学

 キーワード：C型肝炎ウイルス 遺伝子多型 IL28B インターフェロン誘導遺伝子 自然免疫応答 IFN PEG-IFN
 治療 PEG-IFN 治療

1. 研究開始当初の背景

世界的健康問題である C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染は、肝硬変や肝細胞癌の主因である。これまで HCV 根治を目指した抗ウイルス療法はインターフェロン (IFN) 製剤が基本であったが、2011 年 11 月よりウイルスタンパクを標的とした抗 HCV 薬が登場した。これにより、大幅な治療成績の向上が期待されるが、今後の肝発癌が依然として問題である。肝癌を含めた HCV による病態悪化は、生体の応答を攪乱することにより成立すると考えられる。すなわち、HCV に対する生体反応である免疫応答の機序を理解し、応用することが更なる治療成績向上に必須である。これまでに、ウイルス変異による抗ウイルス薬の効果減弱の他に、HCV の治療効果に最も影響する因子は、2009 年 9 月に我々のグループも含めて世界中からゲノムワイド関連解析により発見された IL28B (インターフェロン・λ (IFN λ) のひとつ) 周辺の遺伝子多型 (SNPs) である。この IFN λ は 2003 年にヒトゲノムシークエンスからクローニングされた新規サイトカインで III 型 IFN ファミリーに分類される。

IFN λ は、腸管や気管支などの上皮系細胞におけるウイルス感染応答に重要な役割を果たすことが徐々に報告されている。HCV 治療に使用される IFN α 製剤による治療効果予測に IL28B の SNPs が影響することから、HCV 感染応答における IFN λ の作用機序解明が必要である。一方、HCV 急性感染患者コホート研究より、約 3 割を占める HCV 自然排除群において PEG-IFN α /RBV 治療効果予測と同一の IL28B 周辺 SNPs が関連することが報告されている。これらの結果は、IL28B 遺伝子多型が HCV 感染応答および I 型 IFN 投与による抗ウイルス活性に影響することを意味し、III 型 IFN (IFN λ) による直接的あるいは間接的な抗ウイルス効果の修飾 (応答性) を示唆する。

2. 研究の目的

IFN λ は特異的なレセプター (IL28RA) に結合後、I 型 IFN である IFN α / β 同様に 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 (ISGs) を誘導し、抗ウイルス効果を発揮することが報告されている。その後、細胞内寄生体であるリステリアや腸管感染をきたすロタウイルスの病原性制御に IFN λ が重要な役割を示すことも報告された。しかし、IFN λ の生物学的機能、特に I 型 IFN との相違は未だ不明な点が多く、現在 IFN λ に関してわかっていることは以下の点である (図 1)。(1) 全組織で発現と受容体が確認される I 型 IFN と異なり、IFN λ の受容体発現は臓器特異性が高く肝臓と上皮系細胞に高発現している。(2) I 型 IFN に比べ ISGs の誘導能は弱いが、その遺伝子発現効果は長時間維持する。(3) I 型 IFN により IFN λ 発現が増強される。これらの知見は IFN α / β と IFN λ の関連性を示唆するものであり、さらに I 型ないし III 型 IFN 独自の特異的

な機能の存在も示唆する。

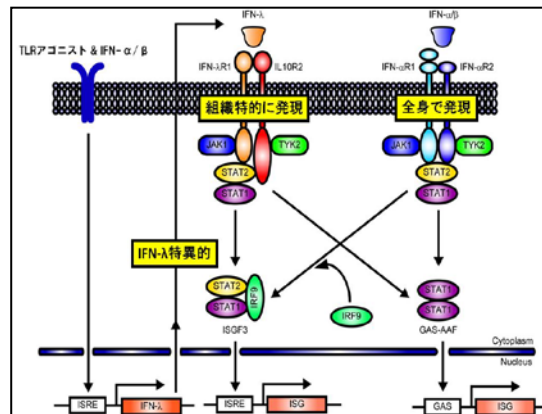


図1. I型IFNとIII型IFNのシグナル伝達・模式図

そこで当該研究では、HCV を含めた抗ウイルス作用に大きく影響すると予測される IFN λ 特異的 ISGs の存在と、I 型 IFN による IFN λ 発現制御を含めた III 型 IFN シグナルへの干渉効果を解析する。

3. 研究の方法

獲得免疫を除去した SCID マウス背景のヒト肝細胞置換キメラマウスを用いて、HCV 感染モデルを作成した。さらに、III 型 IFN による自然免疫応答の差異を解析するために、ヒト肝細胞の IL28B SNPs をメジャー type (MA ; 治療有効群) とヘテロ type (HE ; 治療抵抗群) の 2 系統用意した。これら IL28B SNPs が異なる HCV 持続感染キメラマウスに PEG-IFN α および PEG-IFN λ を 2 週間投与し、血中ウイルス量、および肝内 ISGs と IFN λ 発現を定量し、IL28B SNPs による差異を解析した。

さらに、IL28B SNPs の異なるヒト肝細胞置換キメラマウスから初代ヒト肝細胞 (PHH) をコラゲナーゼ還流により分離し、コラゲンコートした細胞培養用シャーレで培養し、HCV 初感染を模倣したリガンド刺激を行い、その応答性を検討した。

4. 研究成果

T、B 細胞機能不全であるキメラマウスに HCV 持続感染成立後 PEG-IFN α ないし PEG-IFN λ を投与すると、移植した肝細胞 IL28B SNPs の MA、HE による抗 HCV 効果に差は認めなかった。一方、PEG-IFN α 投与と PEG-IFN λ 投与を比較すると、血中 HCV RNA の減少効果は異なり、PEG-IFN α 投与のみ持続的な抗ウイルス効果を示した。抗ウイルス効果に差異が生じる要因としては PEG-IFN α 投与時のみ NK 細胞の細胞障害活性が上昇していたことから、自然免疫担当細胞のひとつである NK 細胞応答による抗ウイルス効果の差であることが類推された。

さらに、PEG-IFN α 初回投与後の肝内 ISGs 定量解析より、抗ウイルス作用を示す MxA、OAS1、PKR、さらにウイルスセンサー分子である TLR-3、RIG-I 発現量は、いずれも IL28B

SNPs による差を認めなかった。しかしながら、肝内 IFN λ s (IL28A, IL28B, IL29) 発現量は MA の方が有意に高値を示した (図 2)。この効果は PEG-IFN λ 初回投与後も同様の結果であった。

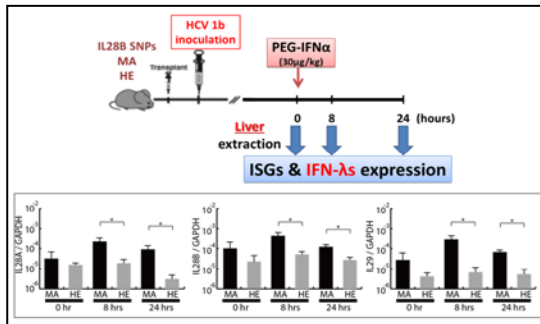


図 2. PEG-IFN α による IFN λ 発現誘導比較

これらの結果から想定すると、治療で投与された IFN α が誘導する肝内 IFN λ による免疫反応が、IL28B SNPs で異なる可能性を見出した。今回の検討により、IL28B SNPs により産生量が異なる IFN λ s を介した肝内免疫細胞が、HCV 排除に大きく影響する可能性が示唆された。

一方、IL28B SNPs の異なる PHH を用いた HCV 感染模倣のリガンド刺激では、TLR のリガンドである Poly(I.C.)ないし RIG-I のリガンドである 5' 三リン酸一本鎖 RNA を行いて IFN 誘導実験を行った。その結果、ともに MA の方が IFN λ s (IL28A, IL28B, IL29) 発現量が高かった。さらに siRNA を用いたノックダウン実験の結果、IFN λ s の誘導に寄与するセンサー分子は RIG-I である可能性が示唆された。

研究成果の新しい点とその意義

HCV 治療は IFN α 製剤が使用されており、肝細胞内 ISGs を介した抗ウイルス作用の増強に主眼が置かれていた。今回の検討から、治療効果予測に最も関与する IL28B SNPs は、肝細胞内の自然免疫応答に寄与するのみでなく、IFN λ (IL28B) 産生量に影響することを明らかとした。また、HCV 感染時応答が SNPs により異なる要因も IFN λ s の産生量に関連する可能性が示唆された。以上のことから、IFN λ のサイトカイン効果 (免疫担当細胞への作用) が HCV 制御に重要である可能性が示唆され (図 3)、新たな治療法への応用が期待される。

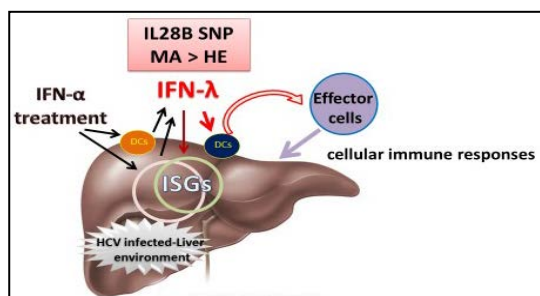


図 3. IFN λ を介した HCV 制御機構

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Iijima S, Matsuura K, Watanabe T, Onomoto K, Fujita T, Ito K, Iio E, Miyaki T, Fujiwara K, Shinkai N, Kusakabe A, Endo M, Nojiri S, Joh T, Tanaka Y. Influence of genes suppressing interferon effects in peripheral blood mononuclear cells during triple antiviral therapy for chronic hepatitis C. PLoS One, 査読有、Vol. 10, 2015, ppe0118000. doi: 10.1371/journal.pone
- ② Watanabe T, Inoue T, Tanoue Y, Maekawa H, Hamada-Tsutsumi S, Yoshiba S, Tanaka Y. Hepatitis C Virus Genotype 2 may not be detected by the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV Test, version 1.0. J Clin Microbiol, 査読有、Vol. 51, 2014, pp4275-4276. doi: 10.1128/JCM.02102-13.
- ③ Matsuura K, Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Fujiwara K, Orito E, Iio E, Endo M, Kusakabe A, Shinkai N, Miyaki T, Nojiri S, Joh T, Tanaka Y. Serum IP-10 concentrations and IL28B genotype associated with responses to pegylated interferon plus ribavirin with and without telaprevir for chronic hepatitis C. Hepatol Res, 査読有、Vol. 44, 2014, pp1208-1216. doi: 10.1111/hepr.12294.
- ④ Matsuura K, Watanabe T, Tanaka Y. Role of IL28B for chronic hepatitis C treatment toward personalized medicine. J Gastroenterol Hepatol, 査読有、Vol. 29, 2014, pp241-249. doi: 10.1111/jgh.12475.
- ⑤ Watanabe T, Hatakeyama H, Matsuda-Yasui C, Sato Y, Sudoh M, Takagi A, Hirata Y, Ohtsuki T, Arai M, Inoue K, Harashima H, Kohara M. In vivo therapeutic potential of Dicer-hunting siRNAs targeting infectious hepatitis C virus. Sci Rep, 査読有、Vol. 23, 2014, pp4750. doi: 10.1038/srep04750.
- ⑥ Matsuura K, Tanaka Y, Watanabe T, Fujiwara K, Orito E, Kurosaki M, Izumi N, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsushashi H, Kusakabe A, Shinkai N, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. ITPA genetic variants influence efficacy of PEG-IFN/RBV therapy in older patients infected with HCV genotype 1 and favourable IL28B type. J Viral Hepat, 査読有、Vol. 21, 2014, pp466-474. doi: 10.1111/jvh.12171.
- ⑦ Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsushashi H, Murakami S,

Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, and Mizokami M, Hepatitis C virus Kinetics by Administration of Pegylated Interferon-alpha in Human and Chimeric Mice Carrying Human Hepatocytes with Variants of IL28B Gene. GUT、査読有、Vol. 62, 2013, pp1340-1346. doi: 10.1136/gut.jnl-2012-302553.

- ⑧ 渡邊綱正、田中靖人、テーラーメイド医療時代の C 型肝炎治療. 日本臨牀. 70(4):681-687, 2012

[学会発表] (計 15 件)

- ① 松波加代子, 渡邊綱正, 飯尾悦子, 松浦健太郎, 新海登, 藤原圭, 野尻俊輔, 城卓志, 田中靖人. C 型肝炎に対する Faldaprevir 3 剤併用療法の治療効果と薬剤耐性変異の検討. 第 18 回日本肝臓学会大会. 2014 年 10 月 23 日~24 日. 神戸国際展示場他 (兵庫県・神戸市).
- ② 渡邊綱正, 堤進, 飯島沙幸, 村上周子, 尾曲克己, 五十川正紀, 田中靖人. C 型肝炎ウイルスに対するインターフェロン応答を規定する IL28B 遺伝子多型の解析. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2014 年 6 月 19 日~20 日. 北海道大学医学部学友会館フラテホール (北海道・札幌市).
- ③ 田中靖人, 渡邊綱正, 五十川正記. 肝炎ウイルス感染と生体応答~C 型肝炎の克服と B 型肝炎の再興. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 2014 年 6 月 19 日~20 日. 北海道大学医学部学友会館フラテホール (北海道・札幌市).
- ④ 飯島沙幸, 松浦健太郎, 渡邊綱正, 飯尾悦子, 村上周子, 林佐奈衣, 五十川正記, 田中靖人. C 型肝炎に対する 3 剤併用療法における薬剤投与直後の PBMC 内 ISG 発現動態. 第 24 回抗ウイルス療法研究会総会. 2014 年 5 月 7 日~9 日. ハイランドリゾートホテル (山梨県・富士吉田市).
- ⑤ 田上靖, 前川久登, 井上貴子, 渡邊綱正, 下田浩輝, 黒田高明, 中野利香, 笹平直樹, 田中靖人, 与芝真彰. コバス TaqMan HCV 定量法偽陰性を示した Genotype2 C 型肝炎 2 症例の経験. 第 40 回日本肝臓学会西部会, 2013 年 12 月 6 日~7 日, 長良川国際会議場他 (岐阜県・岐阜市).
- ⑥ 飯島沙幸, 林佐奈衣, 松浦健太郎, 渡邊綱正, 田中靖人. C 型肝炎に対する 3 剤併用療法における薬剤投与直後の PBMC 内 ISG 発現動態. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10 日~12 日, パシフィコ横浜 (兵庫県・神戸市).
- ⑦ Watanabe T, Inoue T, Tanoue Y, Maekawa H, Iio E, Matsunami K, Yoshiba M, Tanaka Y. Hepatitis C Virus Genotype 2 may not

be detected by the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV Test, version 1.0. 64th Annual Meeting of the AASLD, 2013 年 11 月 1 日~5 日, Washington DC (USA).

- ⑧ Matsuura K, Iijima S, Watanabe T, Iio E, Shinkai N, Fujiwara K, Tanaka Y. Suppressive genes expressions of interferon signaling pathway in peripheral blood mononuclear cells associated with IL28B genetic variants and virological response to PEG-IFN, RBV plus NS3/4 protease inhibitor. 64th Annual Meeting of the AASLD, 2013 年 11 月 1 日~5 日, Washington DC (USA).
- ⑨ 井上貴子, 渡邊綱正, 都築祐二, 新海登, 可児里美, 脇本幸夫, 田中靖人. コバス TaqMan HCV 定量法で偽陰性を呈した C 型肝炎 (genotype2) の 2 症例. 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会, 2013 年 10 月 31 日~11 月 3 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県・神戸市).
- ⑩ 渡邊綱正, 飯島沙幸, 田中靖人. IL28B 遺伝子多型による C 型肝炎ウイルス感染肝内免疫応答の差異. 第 49 回日本肝臓学会総会, 2013 年 6 月 6 日~7 日, 京王プラザホテル (東京都・新宿区).
- ⑪ 飯島沙幸, 渡邊綱正, 田中靖人. C 型肝炎患者における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, 2012 年 11 月 13 日~15 日, グランキューブ大阪 (大阪府・大阪市).
- ⑫ Matsuura K, Tanaka Y, Watanabe T, Shinkai N, Fujiwara K, Mizokami M. IL28B genetic variants and serum IP-10 level associated with virological response to PEG-IFN/RBV and PEG-IFN/RBV/Telaprevir therapy. 63th Annual Meeting of the AASLD, 2012 年 11 月 9 日~13 日, Boston (USA).
- ⑬ 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, 2012 年 10 月 10 日~13 日, 神戸国際展示場他, (兵庫県・神戸市).
- ⑭ 松浦健太郎, 飯尾悦子, 日下部篤宣, 新海登, 藤原圭, 宮木知克, 野尻俊輔, 村上周子, 渡邊綱正, 折戸悦朗, 城卓志, 田中靖人. 2 剤, 3 剤併用療法における、IP-10 の治療前、治療開始早期の推移と治療効果、ウイルス動態に与える影響. 第 16 回日本肝臓学会大会, 2012 年 10 月 10 日~13 日, 神戸国際展示場他 (兵庫県・神戸市).
- ⑮ 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シグナルの解析. 第 48 回日本肝臓

学会総会，2012年6月7日～8日，石川県立音楽堂他（石川県・金沢市）。

〔図書〕（計1件）

- ① 渡邊綱正，田中靖人．HCV感染とIL28B．2012-2013 肝疾患 Review．（小俣政男 編），p96-101，日本メディカルセンター，2012（分担執筆）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 綱正 (WATANABE Tsunamasa)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：20338528

(2) 研究分担者

菅内 文中 (SUGAUCHI Fuminaka)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：23590982
(平成25年3月より研究協力者)