

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461506

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルス感染における自然排除、肝病態進行、治療効果の解明

研究課題名(英文) Spontaneous clearance of Hepatitis C virus infection

研究代表者

古庄 憲浩(Norihiro, Furusyo)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：10346786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)は持続感染率が高率で、慢性肝疾患の主因である。HCV感染において、抗HCV治療の効果を左右するIL28B遺伝子多型は、多数例の日本人一般住民での解析によってHCV自然排除にも関与した。合わせて、人種を超えて、HCV自然排除には、IL28B SNPのみならず、TA repeatも関与した。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis C virus (HCV) infection is a serious global health problem. Genome-wide association studies have revealed several single-nucleotide polymorphisms around interleukin 28B (IL28B) that are strongly associated with HCV clearance by antiviral treatment. Both the favorable IL28B rs8099917 genotype and female sex were associated with the spontaneous clearance of HCV in the Japanese population. A long TA repeat in the promoter region of IL28B was also associated with spontaneous HCV clearance. Although its efficacy may be limited in Japanese population because of its allele distribution, this novel genetic factor will be useful for predicting HCV clearance especially for the African Americans.

研究分野：Infectious diseases

キーワード：Hepatitis C virus Interleukin 28B Spontaneous clearance Japanese population African Americans

## 1. 研究開始当初の背景

HCV 持続感染は、原発性肝細胞癌の原因の約 80% を占め、健康を害する発癌ウイルスで、HCV 持続感染者の感染撲滅が急務である。抗 HCV 療法は、日常診療で広く行われ、近年開発が進み治療効果が上昇している。抗 HCV 療法の中心的薬剤はインターフェロン  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) 注射剤であるが、その治療効果は、第 19 染色体上にある、IFN- $\lambda$  をコードする interleukin 28B (IL28B) 遺伝子多型に左右されることが 2009 年に初めて判明した (Tanaka Y, et al. Nature Medicine 2009)。

私どもの臨床研究で、抗 HCV 療法による HCV 駆除率 (完治率) は、IL28B 遺伝子の一塩基多型 (rs8099917) が、TT で 75%、TG で 25%、GG で 3% と、IL28B 別で大きく効果が異なる (Ogawa E, Furusyo N, et al. Journal of Hepatology 2012)。2012 年 12 月より、抗 HCV 療法は、HCV の増殖を直接阻害する HCV プロテアーゼ阻害剤の内服が併用され、ペグ IFN $\alpha$ ・リバビリンとの 3 剤併用で、より高率な完治率が望めるようになった (Furusyo N, et al. Journal of Hepatology)。しかし、HCV プロテアーゼ阻害剤の治療が主になっても、PEG-IFN $\alpha$  はバックボーンとなる治療薬で、IL28B 遺伝子多型は治療効果を左右する最大の因子である。本研究により、IFN- $\lambda$  活性との種々の関連が判明すれば、今後の臨床現場での治療に広く応用されることが確実である。一方、抗 HCV 療法は、IFN- $\alpha$  を併用しない、経口剤の直接的抗 HCV 薬、HCV プロテアーゼ阻害剤、HCV ポリメラーゼ阻害剤の開発がなされているが、同薬剤だけでは、HCV の薬剤耐性を生じた症例で、未来の治療薬の効果が全くなくなってしまうとう危機感がある。したがって、IFN- $\alpha$  を併用とした治療はまだ治療の主体である。

抗 HCV 療法の治療効果は、IL28B 遺伝子がインターフェロン感受性の多型であっても治療効果がない場合や非感受性であっても治療効果があるという場合など、IL28B 遺伝子多型だけ

では説明できないような乖離現象が認められる。その理由として、IL28B 遺伝子が関与する IFN- $\lambda$  活性が、IL28B 遺伝子周辺のプロモーター領域に関与することが実験的に報告されている (Sugiyama M, ProS One 2009)。したがって、IL28B 遺伝子多型、IFN- $\lambda$  そして治療効果の関連については多数例での研究が必要である。IL28B 遺伝子のプロモーター領域にはチミンアデニンの反復配列 (TA リピート) が存在し、この配列が長いほど転写活性が高くなることが報告された (Sugiyama M, ProS One 2009)。

## 2. 研究の目的

研究 1: HCV 感染高浸淫地区における、HCV 自然排除と IL28B 多型の関連について調査した。

研究 2: TA リピートと HCV 自然排除との関連を検討した。

## 3. 研究の方法

研究 1: 福岡県 H 地区住民検診において、文書で同意を得た、HBs 抗原陽性 51 例を除外した 1056 例 (男性 432 例、女性 624 例、30 歳から 91 歳) を対象とした。九州大学倫理委員会の承認を得て遺伝子採血検体の IL28B 遺伝子の一塩基多型 (rs8099917) の解析と HCV 感染の自然排除および持続感染の関連を解析した。

研究 2: 1060 例の日本人検体および 201 例のアフリカ系アメリカ人検体を用いた。TA リピートの測定方法は、採取された全血から標準的なフェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿法により DNA 検体を抽出した。IL28B は nested PCR で IL28B プロモーター領域の増幅を行った。FAM 蛍光標識したサイズスタンダードとともに電気泳動をして、TA リピート多型を同定した。解析は、ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。

## 4. 研究成果

研究 1: (発表論文 9) インターフェロン高感受性遺伝子多型の IL28B TT は男性 83.3%、女性 82.6% で性差はなく (図 1)、年齢別での差も認められなかった (図 2)。同地区の HCV 抗体陽性率は 29.3% と高率で、HCV 抗体陽性例中の IL28B TT 80.2% は、同抗体陰性例中の 83.8% と差がなかった。HCV 抗体陽性 243 例中、抗 HCV 療法を受けた 57 例を除外した、186 例中 HCV RNA 陽性は 136 例、73.1% であった。HCV 抗体陽性中の解析で、HCV RNA 陽性例の IL28B TT 74.3% は、同陰性の 98.0% に比べ有意に低率であった (表 1)。結論として、インターフェロン治療を左右する IL28B 遺伝子多型は、一般住民での HCV 自然排除においても関与した。

図 1. 福岡県 H 村住民における性別 IL28B 遺伝子多型 (SNPs) (1056 例)

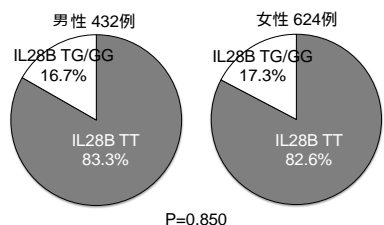


図 2. 福岡県 H 村住民における性別 IL28B 遺伝子多型 (SNPs) (1056 例)

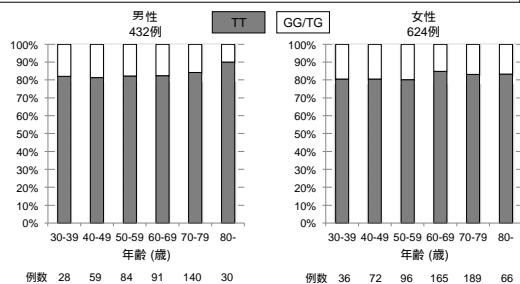


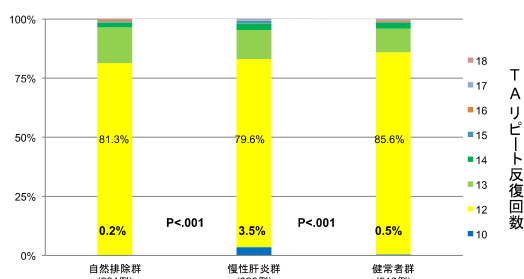
表 1. 福岡県 H 村住民における HCV 抗体陽性 186 例中 HCV RNA 別 IL28B

年齢 (歳)	HCV 抗体陽性					
	HCV RNA 陽性			HCV RNA 陰性		
	TT n (%)	TG/GG n (%)	全体 n (%)	TT n (%)	TG/GG n (%)	全体 n (%)
30-39	0	0	0	0	0	0
40-49	2 (50.0)	2 (50.0)	4 (100)	1 (100)	0	1 (100)
50-59	15 (75.0)	5 (25.0)	20 (100)	6 (100)	0	6 (100)
60-69	25 (78.1)	8 (21.9)	33 (100)	10 (100)	0	10 (100)
70-79	49 (76.5)	15 (23.5)	64 (100)	22 (100)	0	22 (100)
80+	10 (66.7)	5 (33.3)	15 (100)	10 (90.0)	1 (10.0)	11 (100)
全体	101 (74.3)	35 (25.7)	136 (100)	49 (98.0)	1 (2.0)	50 (100)

P=0.0008

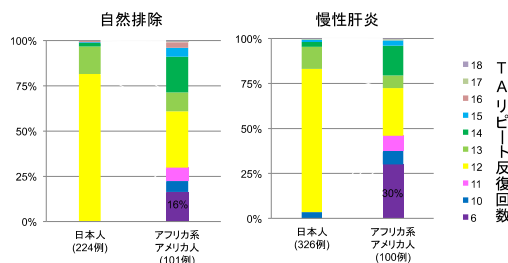
研究 2: (発表論文 15) 日本人の TA リピート多型は、12 回反復がおよそ 80% を占め、反復回数が増えるほど頻度が減っていく分布を示した。10 回反復の TA リピートのアレル頻度は、自然排除群 (0.2%) や健常者群 (0.5%) に比し、慢性肝炎群 (3.5%) で有意に頻度が高かった (図 3)。TA リピートは、年齢、性別、rs8099917 とともに、HCV 自然排除に相関する独立因子として抽出され、10 回反復の TA リピートを持つ者は、HCV 慢性化のリスクが高いと考えられた。

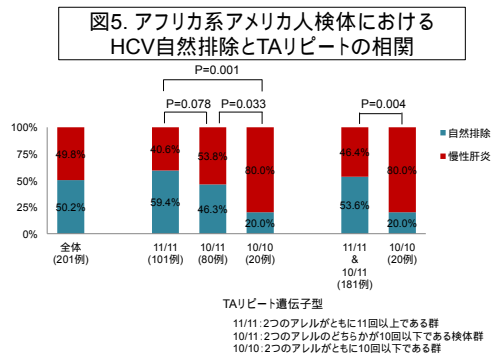
図 3. 日本人検体群での TA リピートの分布



アフリカ系アメリカ人の TA リピートの分布は、12 回反復が 80% を占める日本人とは大きく異なっており、日本人では同定されなかった 6 回反復のアレルが存在した (図 4、図 5)。10 回反復以下のアレル数が多い遺伝子型ほど、自然排除群の割合が小さい傾向があり、10 回反復以下の TA リピートが HCV 慢性化のリスク因子である可能性が示唆された。アフリカ系アメリカ人検体の多変量ロジスティック回帰解析でも、TA リピートは rs12979860 とともに、HCV 自然排除に相関する独立因子として抽出された。

図 4. アフリカ系アメリカ人と日本人の TA リピートの比較





アフリカ系アメリカ人検体の多変量ロジスティック回帰解析でも、TAリピートはrs12979860とともに、HCV自然排除に相関する独立因子として抽出された。結論として、IL28B遺伝子プロモーター領域のTAリピートは、HCV自然排除と有意に相関していた。既知のSNPなどの因子に加えてTAリピートを用いることで、HCV自然排除の予測精度がさらに高まる可能性がある。

#### 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 15 件)

1. Ogawa E, Furusyo N, Murata M, Toyoda K, Hayashi T, Ura K: Potential risk of HBV reactivation in patients with resolved HBV infection undergoing direct-acting antiviral treatment for HCV. *Liver International* (in press).
2. Ogawa E, Furusyo N, Nomura H, Dohmen K, Higashi N, Takahashi K, et al.: NS5A resistance-associated variants undermine the effectiveness of ledipasvir and sofosbuvir for cirrhotic patients infected with HCV genotype 1b. *Journal of Gastroenterology* 2017 (doi.10.1007/s00535-016-1290-1).
3. Ogawa E, Furusyo N, Murata M, Shimizu M, Toyoda K, Hotta T, et al.: Comparison of the Abbott RealTime HCV and Roche COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HCV assays for the monitoring of

sofosbuvir-based therapy. *Antiviral therapy* 22: 61-70, 2017.

4. Ogawa E, Furusyo N, Yamashita N, Kawano A, Takahashi K, Dohmen K, et al.: Effectiveness and safety of daclatasvir plus asunaprevir for HCV genotype 1b patients aged 75 and over with or without cirrhosis. *Hepatology Research* 47(3): E120-E131, 2017.
5. Ogawa E, Furusyo N, Nomura H, Takahashi K, Higashi N, Kawano A, et al.: Effectiveness and safety of sofosbuvir plus ribavirin for HCV genotype 2 patients 65 and over with or without cirrhosis. *Antiviral Research* 136: 37-44, 2016.
6. Hayashi T, Ogawa E, Furusyo N, Murata M, Hayashi J: Influence of insulin resistance on the development of hepatocellular carcinoma after antiviral treatment for non-cirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Infectious Agents and Cancer* 11: 9, 2016.
7. Ogawa E, Furusyo N, Murata M, Hayashi T, Shimizu M, Mukae H, et al.: Impact of HCV kinetics on treatment outcome differs by the type of real-time HCV assay in NS3/4A protease inhibitor-based triple therapy. *Antiviral Research* 126: 35-42, 2016.
8. Ura K, Furusyo N, Ogawa E, Hayashi T, Mukae H, Shimizu M, Toyoda K, Murata M, Hayashi J: Serum WFA+-M2BP is a non-invasive liver fibrosis marker that can predict the efficacy of direct acting antiviral-based triple therapy for chronic hepatitis C. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 43 (1): 114-124, 2016.
9. Ikezaki H, Furusyo N, Hiramane S, Ura K, Mitsumoto-Kaseida F, Takayama K, Shimizu M, Toyoda K, Ogawa E, Kainuma

- M, Murata M, Hayashi J: IL28B rs8099917 genotype and female gender are related to the spontaneous clearance of hepatitis C: A Japanese cross-sectional study. *Archives of Virology* 161 (3): 641-648, 2016.
10. Ikezaki H, Nomura H, Furusyo N, Ogawa E, Kajiwara E, Takahashi K, et al.: Efficacy of interferon-beta plus ribavirin combination treatment on the development of hepatocellular carcinoma by Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatology Research* 46 (3): E174-180, 2016.
  11. Hiramine S, Furusyo N, Ogawa E, Nakamuta M, Kajiwara E, Nomura H, et al.: Importance of virological response in the early stage of telaprevir-based triple therapy. *World Journal of Hepatology* 7 (26): 2688-2695, 2015.
  12. Ogawa E, Furusyo N, Kajiwara E, Nomura H, Kawano A, Takahashi K, et al.: Comparative safety study on severe anemia by simeprevir- versus telaprevir-based triple therapy for chronic hepatitis C. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 30 (8): 1309-1316, 2015.
  13. Ogawa E, Furusyo N, Dohmen K, Kajiwara E, Kawano A, Nomura H, et al.: Effectiveness of triple therapy with simeprevir for chronic hepatitis C genotype 1b patients with prior telaprevir failure. *Journal of Viral Hepatitis* 22 (12): 992-1001, 2015.
  14. Ogawa E, Furusyo N, Dohmen K, Kajiwara E, Kawano A, Nomura H, et al.: Comparative effectiveness and safety study of triple therapy with simeprevir or telaprevir for non-cirrhotic patients with chronic hepatitis C virus genotype 1b infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 30 (12): 1759-1767, 2015.
  15. Hiramine S, Sugiyama M, Furusyo N, Uto H, Ido A, Tsubouchi H, et al.: A thymine-adenine dinucleotide repeat polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Journal of Gastroenterology* 50 (10): 1069-1077, 2015.
- [学会発表] (計 8 件)
1. Furusyo N, Ogawa E, Kajiwara E, Nomura H, Kawano A, Takahashi K, et al.: Simeprevir- and telaprevir-based therapies for non-responders with genotype 1b chronic hepatitis C. The 25th Conference of Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2016, Tokyo, Japan, February 2016.
  2. Furusyo N, Ogawa E, Yamashita N, Kawano A, Takahashi K, Dohmen K, et al.: The safety and efficacy of direct-acting antivirals (DAAs) for genotype 1 chronic hepatitis C with renal impairment. The 51st International Liver Congress 2016, European Association for the Study of the Liver (EASL), Barcelona, Spain, April, 2016.
  3. Furusyo N, Ogawa E, Murata M. Assessing HCV therapies through real-world data: focus on Asia-Pacific The 25th Conference of Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2016, Symposium, Tokyo, Japan, February 2016.
  4. Furusyo N, Ogawa E, Nakamuta M, et al.: Efficacy and tolerability of telaprevir-based triple therapy for advanced fibrosis stage chronic hepatitis C patients: Results of the Kyushu University Liver Disease Study Group: The 50th Annual Meeting of the European Association of the Study for the

Liver (EASL), Vienna, Austria, 22-26th,  
April 2015.

5. **古庄憲浩**、小川栄一、豊田一弘、村田昌之、林 純:一般住民におけるC型肝炎ウイルス(HCV)自然排除の検討、第104回日本消化器病学会九州支部例会、2014年12月、大分市
6. **古庄憲浩**、小川栄一、村田昌之:シンポジウム「変遷するHBV、HCV、HIV感染症の常識と課題」コントロールできるようになったB型肝炎、そして新たな問題点、第61回日本臨床検査医学会、2014年11月、福岡市
7. **古庄憲浩**、林 純:教育講演 ウイルス肝炎治療の新時代、第84回日本感染症学会西日本地方会総会、2014年10月、岡山市
8. 小川栄一、**古庄憲浩**、林 純:シンポジウム「C型肝炎に対するDAAを用いた治療戦略」多施設共同研究によるC型慢性肝炎に対するシメプレビル併用3剤療法の早期ウイルス学的効果と副作用の検討、第50回日本肝臓学会総会、2014年5月、東京都

〔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:

九州大学 (<http://www.kyushu-u.ac.jp/ja/>)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

古庄 憲浩 (FURUSYO, Norihiro)

九州大学 大学院 医学研究院 感染制御医学分野・准教授

研究者番号: 10346786

### (2)研究分担者

村田 昌之 (MURATA, Masayuki)

九州大学病院 総合診療科・講師

研究者番号: 60380622

小川 栄一 (OGAWA, Eiichi)

九州大学 大学院 医学研究院 感染制御医学分野・助教

研究者番号: 70621283

### (3)研究協力者

池崎裕昭 (IKEZAKI, Hiroaki)

平峯 智 (HIRAMINE, Satoshi)

以上