

図 1

肝癌28症例—治療前の肝組織所見

Stage Grade	F0	F1	F2	F3	F4
A0					
A1		3			
A2		1	8	2	
A3			3	7	4

図 2

肝癌19症例—非癌部肝組織所見

Stage Grade	F0	F1	F2	F3	F4
A0	2	1	1		1
A1		3	6		1
A2			1	3	
A3					

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究班事業）
分担研究報告書

C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療の肝細胞癌発生、
肝臓病死に及ぼす影響に関する研究

研究協力者 笠原彰紀 大阪大学大学院医学系研究科
生体機能調節医学（総合診療部）

研究要旨 C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療は肝細胞癌発生を抑制するのみならず肝臓病死を減少させ、長期予後を改善することが明らかとなった

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対するインターフェロン（IFN）治療の有無、治療効果が肝細胞癌発生、死亡原因、長期予後に与える影響を検討した。

B. 研究方法

IFN治療が行われた3024例及びIFN治療未施行の271例の組織学的に診断されたC型慢性肝炎を対象とし、肝細胞癌発生、肝臓病死（肝細胞癌死、肝不全死、消化管出血死）の危険因子をCox比例ハザードモデルを用いて解析後、補正累積肝細胞癌発生率、補正累積生存率を算出した。上記研究計画はヘルシンキ宣言に沿っており、大阪大学大学院医学系研究科倫理委員会にて承認済みである。

C. 研究結果

肝細胞癌発生の危険因子は年齢、性別、肝線維化の程度及びIFN治療の有無であり、年齢が1歳高齢となれば1.08倍、肝線維化のスコアが1進展すれば2.21倍肝細胞癌発生のリスクは上昇していた。他方、肝細胞癌発生のリスクは女性では男性に比し56%、IFN未治療群に比しIFN治療群では38%低下していた。IFN群、未治療群における補

正累積肝細胞癌発生率は、肝生検施行5年後にそれぞれ3.3%、5.2%、10年後にそれぞれ12.4%、19.1%、と推測され、IFN治療群で未治療群に比し有意に低率であった。

ALTの推移より判定したIFNの生化学的治療効果（著効群：IFN投与中にALTが正常化し、終了後6ヶ月以上ALTの正常化が持続する群、この内85%以上はHCVの排除が認められる、再燃群：IFN投与中はALTの正常化は認められるが、終了後ALTの再上昇が認められる群、無効群：IFN投与にてALTの正常化の認められない群）と肝細胞癌発生との関係を検討すると、肝細胞癌発生のリスクは未治療例に比し著効例で1/6、再燃例で1/2に低下していたが、無効例では差はみられなかった。

IFN治療効果別に補正累積肝細胞癌発生率を検討すると、著効群、再燃群、無効群における累積肝細胞癌発生率は5年後にそれぞれ0.9%、3.0%、5.0%、10年後にそれぞれ3.5%、11.3%、18.2%と推測され、未治療群、無効群に比し著効群、再燃群で有意に低率であった。

線維化の程度別に肝細胞癌の発生に関与する因子を解析すると、F2、F3症例において肝細胞癌発生の危険率はIFN治療例で未治療例に比し34%低下

し、F0、F1、F4 症例でも低下する傾向が認められた。F2、F3 の線維化の段階では、IFN 治療群および未治療群の補正累積肝細胞癌発生率は肝生検 5 年後でそれぞれ 5.2%、7.9%、10 年後でそれぞれ 21.5%、30.8%と推測された。また、IFN 治療効果と肝細胞癌発生との関係を各肝線維化の段階別に検討すると、いずれの線維化の段階でも著効例で無効例に比し肝細胞癌発生のリスクは有意に低下していたが、F2、F3 症例では再燃例でも低下がみられた。

IFN 治療は肝臓病死のリスクを 56% 減少させた。肝生検後 5 年の補正累積生存率は IFN 群、未治療群でそれぞれ 99.5%、98.6%、10 年後 96.3%、90.7% であり、5 年間の補正累積生存率には両群間で差は認められなかったが、5 年以降未治療群の補正累積生存率は低下し、IFN 治療群に比し有意に低率であった。

IFN 治療効果と肝臓病死との関係を検討すると、肝臓病死の危険率は未治療例に比し著効例で 1/50、再燃例で 1/8 に低下していたが、無効例とは差はみられなかった。また、IFN 治療は肝臓病死のリスクを F0、F1 例で 87%、F2、F3 例で 63%、F4 例で 62% 低下させた。F2、F3 症例では著効例及び再燃例において無効例に比し有意に肝臓病死のリスクは低下していたが、他の線維化の段階では IFN 治療効果と肝臓病死との間に有意の関係は認められなかった。

D. 考察

IFN 治療にて肝生検施行後 10 年目に肝細胞癌発生率は 6.7% 低下していたことより、number needed to treat (NNT) は 15 と計算され、全体で見ると IFN 治療により 15 人に 1 人肝発癌を

阻止できることが示された。また、IFN 治療により著効、再燃となれば 10 年後に肝細胞癌発生率は無効群に比しそれぞれ 14.7%、6.9% 低下することも明らかにされた。さらに、IFN 治療効果と肝細胞癌発生との関係を各肝線維化の段階別に検討した結果より、ウイルスの排除または持続的な肝機能の正常化を IFN 治療によりもたらすことができれば、いずれの線維化の段階においても肝細胞癌発生は阻止できるが、F2、F3 症例ではウイルスの排除のみならず肝機能が IFN 治療終了時に一時的にでも正常化すれば 10 年程度の経過観察期間において肝発癌は阻止しうることが示された。他方、肝細胞癌発生の阻止という観点にたつて IFN 治療を行う場合、F1、F2 の線維化の軽度な例や F4 の肝硬変症例ではウイルスの排除を目指す必要があることも明らかとなった。

C 型慢性肝疾患に対する IFN 治療後の長期予後を検討した報告は少ない。代償性の C 型肝硬変では 2 つの無作為比較試験と 2 つのコホート研究が、C 型慢性肝炎ではそれぞれ 1 つの前向き及び後ろ向きコホート研究が報告されているが、1 つの報告を除く他の報告では IFN 治療にて長期予後が改善することが示されている。今回の我々の検討でも肝生検施行 10 年後に IFN 治療群で未治療群に比し肝臓病死による補正累積生存率は 5.6% 高率であることが示された。さらに、著効、再燃群の補正累積生存率は同等で、無効、未治療群に比し有意に高率であったことより、IFN 治療にて著効、再燃をもたらすことができれば長期予後も改善する可能性が示唆された。

さらに、いずれの線維化の段階でも IFN 治療群で未治療群に比し肝臓病死のリスクが低下していたことは興味深

い。IFN 治療が肝細胞癌発生を阻止するのみならず肝病変の進展をも抑止した結果、肝臓病死のリスクが低下したと考えられ、その効果は F2、F3 の線維化の段階の著効、再燃例で顕著であることも示された。

以上、C 型慢性肝炎に対する IFN 治療は、肝細胞癌併発を抑制するのみならず肝臓病死を減少させ、長期予後を改善することが明らかとなった。

E. 結論

C 型慢性肝炎に対する IFN 治療は肝細胞癌発生を抑制するのみならず肝臓病死を減少させ、長期予後を改善するが、その効果は F2、F3 症例の Biochemical responder で最も顕著であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ito A., Kanto T., Kuzushita N., Tatsumi T., Sugimoto Y., Miyagi T., Takehara T., Katayama K., Mochizuki K., Hiramatsu N., Kasahara A., Yoshiya I., Sasaki Y., Hori M., Hayashi N. : Generation of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes from healthy individuals with peptide-pulsed dendritic cells. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 16: 309-316, 2001

2) Katayama K., Kasahara A., Sasaki Y., Kashiwagi T., Naito M., Masuzawa M., Katoh M., Yoshihara H., Mukuda T., Hijioka T., Hori M., Hayashi N. : Immunological response to interferon- γ priming prior to interferon- α in refractory chronic hepatitis C in relation to viral clearance. *J Viral Hepatitis* 8:

180-185, 2001

3) Ohkawa K., Hiramatsu N., Mochizuki K., Mita E., Yoshihara H., Kato M., Masuzawa M., Kasahara A., Sasaki Y., Hori M., Hayashi N. : Significance of serum soluble Fas antigen level in chronic hepatitis C patients treated with interferon: Relationship to the therapeutic response. *J Gastroenterol Hepatol* 16: 1009-1014, 2001

4) Tatsumi T., Takehara T., Kanto T., Miyagi T., Kuzushita N., Sugimoto Y., Jinushi M., Kasahara A., Sasaki Y., Hori M., Hyashi N. : Administration of interleukin-12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 61: 7563-7567, 2001

2. 学会発表

1) 平松直樹, 笠原彰紀, 林 紀夫 : C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療は肝発癌を抑制しうるか?, シンポジウム「消化器疾患診療における最先端 肝胆臓」, 第 75 回日本消化器病学会近畿支部例会, 大阪, 2001

2) 笠原彰紀, 林 紀夫 : C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療の肝細胞癌発生・長期予後に及ぼす影響, シンポジウム「ウイルス・細菌感染とがん」, 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001

3) 笠原彰紀 : 治療 1. IFN 治療, 「コンセンサス C 型肝炎 ①病態、診断法、予後 ②治療」, 第 5 回日本肝臓学会大会パネルディスカッション, 京都, 2001

厚生労働省新興再興感染症研究班
分担研究報告書

難治性 C 型慢性肝炎治療時の抗ウイルス蛋白質遺伝子の誘導とウイルス動態
に関する研究

研究協力者 武蔵野赤十字病院消化器科 泉 並木
共同研究者 朝比奈靖浩

研究要旨 C 型慢性肝炎に対して臨床的にインターフェロン(IFN)などの抗ウイルス療法
の機序を明らかにすることが、今後の新たな治療法の開発に重要である。HCV
動態のモニターは有用な解析方法である。また末梢血リンパ球中の IFN 誘導物質の
遺伝子発現の解析によって投与方法や併用療法の作用機序を検討することが可能であ
る。β型 IFN の 1 日 2 分割投与によって PKR や MxA 蛋白質遺伝子の高い誘導の維持
がみられた。またリバビリン・IFN 併用療法によって HCV 動態が異なることが
観察された。

A.研究目的

C 型慢性肝炎に対してインターフェロン (IFN) 単剤による治療が広く行われてきたが、ウイルス排除は約 30% の例にみられるのみである。このウイルス排除に関与する因子として、C 型肝炎ウイルス (HCV) の遺伝子型 (ゲノタイプ) やウイルス量¹⁾ が関与することが知られている。さらにゲノタイプ 1b 型の例においては HCV 遺伝子の NS5A 領域に存在する Interferon sensitivity determining region (ISDR) のアミノ酸変異が関与する²⁾ ことが知られている。

一方、宿主側の因子に関しては肝線維化の進展が関与すること以外に十分な検討はなされていない。最近 IFN によ

て誘導される抗ウイルス物質の遺伝子発現の測定が可能となった³⁾。しかし実際の臨床例においてその遺伝子発現が検討された報告は少なく、IFN の投与方法による発現の相違についての検討はなされていない。

最近 IFN 等の抗ウイルス物質を投与した際の HCV の動態 (ダイナミクス) を解析することによってその作用機序が数学モデルを用いて推測し得ることが報告された⁴⁾。実際にこの方法を用いて HCV 動態と抗ウイルス

作用の関連が検討されている⁵⁾。また最近わが国でもリバビリン併用 IFN 療法が可能になったが併用療法がなぜ抗ウイルス活性が高くなるのかについての作用

機序は充分解明されていない。

これらのことをふまえて、C型慢性肝炎患者に対して抗ウイルス療法を施行した際のIFN誘導蛋白の遺伝子発現およびHCV動態を同時に測定し作用機序を解明することを目的とした。さらにリバビリンとIFN併用療法時のHCV動態を検討しその作用機序を推定することにより、より効果的な治療法を開発していくことが可能になると推測される⁶⁾。

B.研究方法

対象は1999年8月より2000年11月までに当科に入院し、インターフェロン治療を受けた140例とした。これらの患者のうちゲノタイプ1b型が88例、2a型が44例、2b型が8例である。各ゲノタイプ毎にランダム化して初期2週間はβ型IFNを1日3MUを2分割投与群と6MU1回投与群とした。続く2週間はいずれの群も3MU2分割投与とし、さらに20週間はα型IFN10MUを週3回で20週間の投与を行った。これらの症例に対して、0、4、8、24、48、96時間、8、15、28、56、84日目に採血し、血中HCVRNA量をreal time detection PCR法によって測定した。さらに同時にリンパ球を採血し、RNAを抽出した後、real time PCR法によってPKRとMxA蛋白のmRNAの発現量を定量した。すべての患者から文書による同意を得た。

これとは別に、ゲノタイプ1b型で

HCVRNA量が100KIU/mL以上の高ウイルス量の例だけについて、α2b型IFNを6MU連日投与後、週3回22週間投与した10例と、リバビリン1日800mgの内服とα2b型IFN1日6MUを2週間連日+週3回間歇で22週間投与した10例について、HCV動態を同様のreal time PCR法で測定して解析し、その差を比較検討した。

C.研究結果

HCVの動態を検討したところ、いずれの症例もIFNの投与後、第1相と呼ばれる急峻なHCVRNA量の減少に引き続いて、第2相と呼ばれる緩徐な低下が認められた。この第2相はHCVの産生や放出に加えて感染肝細胞の排除に関連しているため、臨床的には第2相をモニターすることが抗ウイルス作用の機序を解明するのに重要である。β型IFNの初期2週間投与で、1日6MUの1回投与と3MUの2分割投与を比較したところ、第1相には差はみられなかった。しかし、第2相では3MUの2分割投与の方が有意にHCVRNAの低下が亢進しているのが観察された。

IFNによって誘導される抗ウイルス蛋白のうち、PKRとMxAのリンパ球での発現を経時的に観察した。いずれもIFN投与4時間後で最高値に達し、その後低下するものの、投与前よりも高い値が維持された。β型IFN1日6MU1回投与では3MU投与に比較して投与4

時間目の最高値が約2倍の値であり、投与前に比較して18倍の発現がみられた。しかし、その後8時間目から8日目までの間、β型 IFN3MU の1日2分割投与の方が、6MU 1日1回投与よりも約2倍の高い値が維持されているのが、PKR, MxA いずれにも観察された。

ゲノタイプ 1b 型で高ウイルス量の難治例で IFN 単独療法とリバビリンと IFN 併用療法の HCV 動態を比較検討したところ、第1相には差がみられなかったが、第2相はリバビリン併用療法の方が有意に高いことが観察された。この第2相の低下は 96 日まで有意差が認められた。しかし、第2相の低下は極めて個人差が大きいことが判明した。

D. 考察

ゲノタイプ 1b 型で高ウイルス量の C 型慢性肝炎例は従来の IFN 単独療法では、3~5%にのみウイルス排除がみられるのみであり、極めて難治である。しかし、リバビリンの併用によって6ヵ月の治療で著効となる例が20%にみられる。リバビリン併用によってなぜ抗ウイルス作用が増強されるかについては解明されていないが、リバビリンによる免疫増強作用、ウイルス RNA の変異促進のほか抗ウイルス蛋白の発現増強などが想定される。これらの機序を詳細に解明していくことによって、より効果的な治療法を開発していくことが可能になると考えられる。特に抗ウイルス蛋白の発現状態

と、それに対するウイルス側の抵抗性の相互作用の解明は、今後さらに有効な治療法を開発していくうえで重要な鍵となりうると考えられる。

E. 結論

β型 IFN の2分割投与では HCV 動態の第2相の低下の亢進がみられ、PKR や MxA 蛋白遺伝子発現が高い状態が維持されていた。リバビリンと IFN 併用では難治性の例でも HCV 動態第2相の改善がみられたが、個人差が大きかった。

D. 知的財産権の出願登録状況：なし

E. 文献

1) Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, et al. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992;16:293-9.

2) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996;334:77-81.3) Meurs E, Chong K, Galabru J, et al. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated

protein kinase induced by interferon. *Cell* 1990;62:379-390.

4)Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998;282:103-107.

5)Zeuzem S, Schmidt JM, Lee JH, et al. Effect of interferon alfa on the dynamics of hepatitis C virus turnover in vivo. *Hepatology*

1996;23:366-371.

6)Asahina Y, Izumi N, Uchihara M, et al. A potent antiviral effect on hepatitis C viral dynamics in serum and peripheral blood mononuclear cells during combination therapy with high-dose daily interferon alfa plus ribavirin and intravenous twice-daily treatment with interferon beta. *Hepatology* 2001;34:377-384.

C型慢性肝炎におけるIFN治療の効果予測因子としての肝組織・末梢血単核球細胞内IFN receptorの
意義に関する研究

分担研究者 沖田 極 山口大学医学部第一内科

研究要旨

Type I IFN receptor は2つのサブユニット、IFNAR1 とIFNAR2 よりなる。これまでにわれわれはC型慢性肝炎患者の肝組織内IFNAR1 とIFNAR2 の発現がよく相関すること、ならびに肝組織と末梢血単核球（PBMC）のIFNAR2 発現が相関することを報告してきた。そこで、C型慢性肝炎患者のPBMCにおけるIFNAR2 の発現がIFN治療の効果予測因子となりうるか否かについて prospective に検討した。IFNAR2 発現量はIFNAR2 mRNA を competitive PCR 法により半定量的に測定した。6ヶ月間のIFN- α 治療を行った52例のC型慢性肝炎患者のうち300MU以上のIFNが投与され、同日に肝生検組織とPBMCの採取が可能であった36例について解析を行った。IFNAR2 mRNA量はPBMCに比べて肝組織で有意に高かった。17例の著効群は非著効群に比べて血清中のウイルス量が低く（ $p=0.017$ ）、肝組織中のIFNAR2 mRNA量が高かった（ $p=0.007$ ）が、PBMC中のIFNAR2 mRNA量に差を認めなかった。これら2つの因子は多変量解析においてもIFN治療効果に関連を認めた。以上より、C型慢性肝炎患者の肝組織内IFNAR2発現量はIFN治療効果予測因子となりうるが、PBMC内のIFNAR2発現量をもって代用することはできないことが明らかとなった。

A. 研究目的

IFNとribavirin併用によりC型慢性肝炎患者に対するIFN治療成績は向上したが、それでも難治例での著効率は約50%である。したがって、cost-performanceの点からもIFN治療効果予測因子を明らかにしていくことは重要な課題である。これまでもウイルス量、遺伝子型、肝線維化進展度などの治療効果予測因子が明らかにされているが、最近肝組織内のIFN receptor量が治療効果予測因子となることが報告されているが prospective に検討されたものはない。一方、われわれはこれまでにC型慢性肝炎患者の肝組織内IFNAR1 とIFNAR2 の発現がよく相関すること、ならびに肝組織と末梢血単核球（PBMC）のIFNAR2 発現が相関することを報告してきた。そこで、C型慢性肝炎患者のPBMCにおけるIFNAR2 の発現がIFN治療の効果予測因子となりうるか否かについて prospective に検討した。

B. 研究方法

肝硬変やHCV以外の肝疾患の原因が除外された52例のC型慢性肝炎患者が登録され、IFN治療はIFN- α 2bを6～9 MU/day、2～4週連日投与後、22～24

週隔日投与することとした。治療開始前に施行された肝生検組織の一部と同日に採取されたPBMCからRNAを抽出し、competitive PCR法によりIFNAR2 mRNA量を半定量化した。

倫理面の配慮

研究登録、肝生検、IFN治療に関してはいずれも患者のinformed consentを得たうえで行った。

C. 研究結果

52名の登録患者のうち49名にIFN治療が行われ、うち41名の患者より肝生検組織とPBMCが得られた。7名の患者がIFN副作用のため、治療の中断ないし中止を余儀なくされたが、最終的に総投与量が300MU以上の38名を解析対象とした。IFNAR2 mRNA量はPBMCに比べて肝組

織で有意に高く ($p=0.016$)、両組織における IFNAR2 発現量は弱いながらも有意な相関関係を示した ($r=0.35$, $p=0.032$)。17 例の著効群は非著効群に比べて血清中のウイルス量が低く ($p=0.017$)、肝組織中の IFNAR2 mRNA 量が高かった ($p=0.007$) が、PBMC 中の IFNAR mRNA 量に差を認めなかった。これら 2 つの因子は多変量解析においても IFN 治療効果に関連を認めた (HCV RNA 量 ; odds ratio 0.23, 95% CI 0.038-0.864, $p=0.057$, IFNAR2 発現量 ; odds ratio 1.12, 95% CI 1.015-1.227, $p=0.023$)。しかし、両群間において PBMC 中の IFNAR mRNA 量に差を認めなかった。

D. 考察

今回用いた competitive PCR 法については HepG2 細胞からの IFNAR2 cDNA をコントロールとしてその定量性については確認した。また、肝組織全体からの RNA の抽出による IFNAR2 mRNA の定量がはたして肝細胞における IFNAR2 の発現を反映しているかという点に関しては、抗 IFNAR2 抗体を用いた免疫染色による陽性細胞の labeling index と competitive PCR 法による mRNA 量が相関することを確認した。したがって、本研究の IFNAR2 mRNA 量の評価は定量的と考えられる。IFNAR2 発現量は肝組織が PBMC に比べて有意に高く、また両組織での IFNAR2 発現量の相関関係が極めて弱かった点、さらに HCV の主たる増殖部位が肝細胞であることを考慮すると、PBMC でなく肝組織の IFNAR2 発現量が治療効果予想因子となった今回の結果は reasonable と考えられた。

E. 結論

今回の prospective study の結果から、肝組織中の IFNAR2 発現量は C 型慢性肝炎に対する IFN 治療の効果予測因子となりうるが、PBMC 中の IFNAR2 では予測しえないことが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hino K, Kitase A, Satoh Y, Fujiwara D, Yamaguchi Y, Korenaga M, Shingai Y, Konishi T, Yamashita S, Uchida K, Mori K, Hanada H, Kodama T, Nukui K, Okita K. Interferon retreatment reduces or delays the incidence of hepatocellular carcinoma in

patients with chronic hepatitis C. J Viral Hepat (in press).

2. Hino K, Korenaga M, Orito E, Katoh Y, Yamaguchi Y, Ren F, Kitase A, Satoh Y, Fujiwara D, Okita K. Constrained genomic and conformational variability of the hypervariable region 1 of hepatitis C virus in chronically infected patients. J Viral Hepat (in press).

3. Yamaguchi Y, Hino K, Fujiwara D, Ren F, Katoh Y, Satoh Y, Okita K. The expression of type I interferon receptor in liver and peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis C patients. Dig Dis Sci (in press).

4. Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horiike N, Hino K, Okita K, Okanoue T, Iino S, Tanaka E, Suzuki K, Watanabe H, Hige S, Mizokami M. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. Hepatology 2001;34:590-594.

5. Korenaga M, Hino K, Katoh Y, Yamaguchi Y, Okuda M, Yoshioka K, Okita K. A possible role of hypervariable region 1 quasispecies in escape of hepatitis C virus particles from neutralization. J Viral Hepat 2001;8:331-340.

6. Hino K, Katoh Y, Vardas E, Sim J, Okita K, Carman WF. The effect of introduction of universal childhood hepatitis B immunization in South Africa on the prevalence of serologically negative hepatitis B virus infection and the selection of immune escape variants. Vaccine 2001;19:3912-3918.

7. Shiraishi K, Okita K, Sasaki K, et al. A comparison of DNA copy number changes detected by comparative genomic hybridization in malignancies of the liver, biliary tract and pancreas. Oncology 2001;60:151-161.

8. Shiraishi K, Okita K, Harada T, Kusano N, Furui T, Kondoh S, Oga A, Kawachi S, Fukumoto Y, Sasaki K. Comparative genomic hybridization analysis of genetic aberrations associated with development and progression of biliary tract carcinomas. Cancer 2001;91:570-577.

9. Yamasaki T, Korokawa F, Shirahashi H,

Kusano N, Hironaka K, Okita K. Percutaneous radiofrequency ablation therapy with combined angiography and computed tomography assistance for patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2001;91:1342-1348.

10. Suzuki C, Kayano K, Uchida K, Sakaida I, Okita K. Characteristics of the cell proliferation profile of activated rat hepatic stellate cells in vitro in contrast to their fibrogenesis activity. *J Gastroenterol* 2001;36:323-329.

11. Takeo S, Arai H, Kusano N, Harada T, Furuya T, Kawauchi S, Oga A, Hirano T, Yoshida T, Okita K, Sasaki K. Examination of oncogene amplification by genomic DNA microarray in hepatocellular carcinomas: comparison with comparative genomic hybridization analysis. *Cancer Genet Cytogen* 2001;130:127-132

12. Maruyama S, Nagasue N, Dhar DK, Yamanoi A, El-Assal ON, Satoh K, Okita K. Preventive effect of FK143, a 5 α -reductase inhibitor, on chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Clin Cancer Res* 2001;7:2196-2104

2. 学会発表

第5回日本肝臓学会大会 プレナリーセッション

C型慢性肝炎に対するIFN治療効果予測因子としてのIFN receptorの検討：A prospective study

藤原大輔、日野啓輔、久保善嗣、任 粉玉、是永匡紹、山下智省、小西知己、花田 浩、森健治、内田耕一、沖田 極

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

IFN 投与前後のミトコンドリア DNA 変異の変化に関する研究

分担研究者 西口修平 大阪市立大学大学院医学研究科 肝胆膵病態内科 助教授

共同研究者 西川 学 同 分子病態学 研究員
井上正康 同 分子病態学 教授
木岡清英 大阪市立総合医療センター 消化器内科 副部長

研究要旨： C型慢性肝炎の IFN 投与前後の肝組織について、ミトコンドリア DNA の D-loop 領域の塩基変異数を解析した。その結果、IFN 投与によってミトコンドリア DNA の変異数が減少した。この結果は、IFN 投与による組織学的な炎症所見の低下と関連性が認められた。IFN の著効例の一例について、ミトコンドリア DNA の全配列を解析した。本例では、IFN 終了後塩基変異数が減少したが、その後飲酒によって変異数のわずかな増加が生じていた。今後、慢性炎症の程度の指標として、ミトコンドリア DNA の塩基変異数の臨床的な有用性の検討を行いたい。

目的

我々は、肝臓切除例において、癌部と非癌部のミトコンドリア DNA を検索し、癌部のみならず非癌部にも多数のミトコンドリア DNA 塩基変異が存在することを報告している (1)。非癌部でのミトコンドリア DNA の変異集積は慢性炎症と関連すると推測された。今回、C 型慢性肝炎の肝ミトコンドリア DNA 塩基変異を解析し、IFN 投与が本変異に対してどのように作用するかを解析した。

方法

大阪市立総合医療センターにて IFN- α の投与前と投与直後に経皮的肝生検を実施した C 型慢性肝炎 26 例を対象とした。研究の遂行にあたってはヘルシンキ宣言を遵守し、対象者には事前に研究目的と内容について説明を行い同意を得た。肝組織から DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA に対する特異的なプライマーを用いて PCR にて増幅し、direct sequence 法にて PCR 産物の塩基配列

を決定した。著効(CR)の 1 症例に関して、IFN 投与前・直後・3 年後に全配列を決定し、その他の症例は投与前・直後でミトコンドリア DNA の D-loop 領域の塩基配列を解析した。

結果

IFN 投与直後の肝組織における炎症の活動度 (HAI score の grading) は投与前に比し、その後の IFN の治療効果に関わらず概ね低下していた (図 1・縦軸)。ミトコンドリア DNA の D-loop 領域の塩基変異数は 0 から 6 カ所に存在したが、肝がん症例の非癌部に比し低頻度であった。IFN 投与前後を比較すると、塩基変異の箇所は共通しており、新たな変異の集積は認められなかった。ミトコンドリア変異の減少数 (図 1・横軸) は肝組織の活動性の低下と相関していた。

CR の 1 例について、ミトコンドリア遺伝子の全配列を解析したところ、IFN 投与前の組織で 26 箇所存在した変異が IFN 投与後は 14 箇所に減少した (図 2)。3 年後に解析

したところ、変異数が若干増加していた。本症例は、HCV が消失した著効例であるが、IFN 終了後も 3 合以上の飲酒を継続し、ALT 異常が継続している症例であった。

考察

慢性肝炎において、炎症の継続によってミトコンドリア DNA に塩基変異が蓄積すると推測されている。今回の検討で、肝組織のミトコンドリア DNA の塩基変異は IFN 投与直後では投与前に比し減少していることが判明した。本現象は、IFN による組織学的な炎症の活動度の低下と相関しており、IFN 投与によって、両者とも比較的短期間に変化しうることが明らかとなった。

ミトコンドリア遺伝子全配列を検討した症例では、IFN 投与直後では、変異数が約半数に減少していた。本現象の分子機構の解析は今後の課題であるが、IFN 投与期間中に変異数の多い肝細胞が排除された可能性が考えられる。事実、HCV は肝細胞のミトコンドリア内に存在し、肝細胞のアポトーシスの制御と関連していることや、IFN がミトコンドリア遺伝子の転写を抑制することが分かっており、変異の多いミトコンドリアを持つ細胞はその負荷に耐えきれず IFN によってアポトーシスに陥る可能性がある。IFN によって肝発癌が抑制されること (2) は周知の事実であり、組織学的な炎症の活動度の低下は、その後の肝がんの発症抑制に関連すると考えられている。ミトコンドリア遺伝子変異が肝組織の炎症所見とも関連し、発癌過程にも関係していることから、本遺伝子の解析は IFN の発癌抑制に対する客観的な指標となる可能性もある。現時点では、個々の症例における発癌のリスクを評価する指標はなく、ミトコンドリア遺伝子の変異数の臨床的意義について解析することが必要である。

論文発表

1. Nishikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S et al. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. **Cancer Res.** 2001; 61: 1843-1845.
2. Nishiguchi S, Shiomi S, Nakatani S et al. Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. **Lancet** 2001; 357: 196-197.

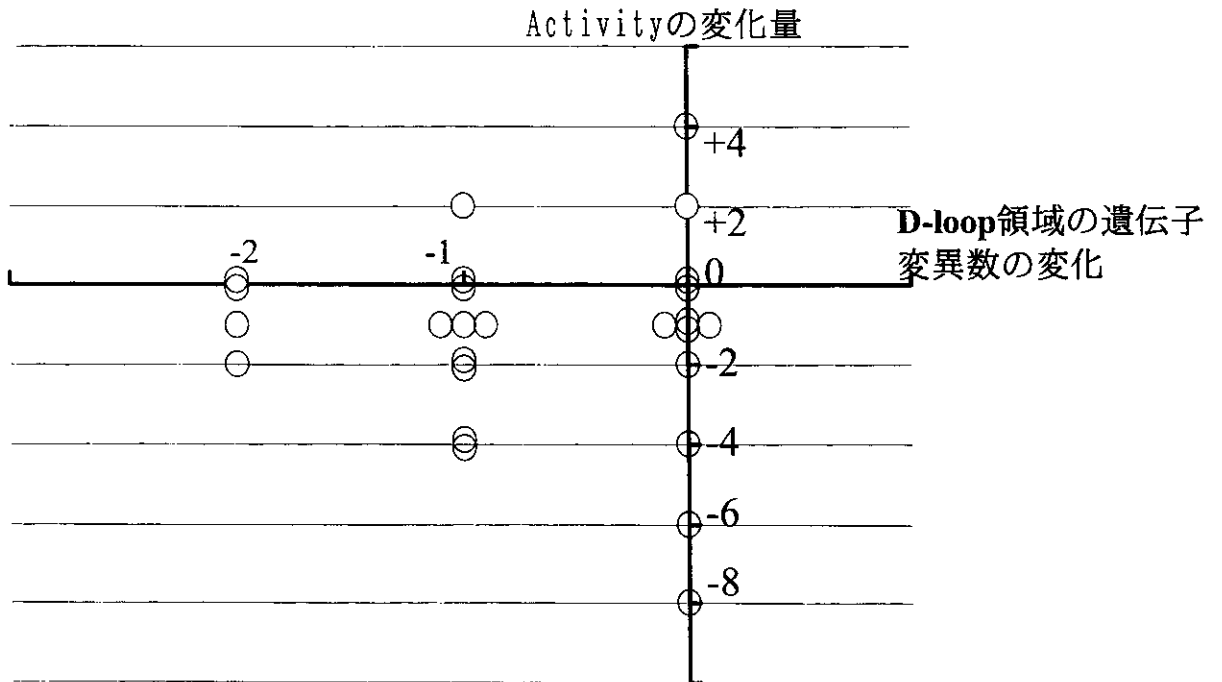


図1 IFN投与前後の組織学的活動性の変化とミトコンドリア遺伝子変異数 (D-loop領域) の変化の関係

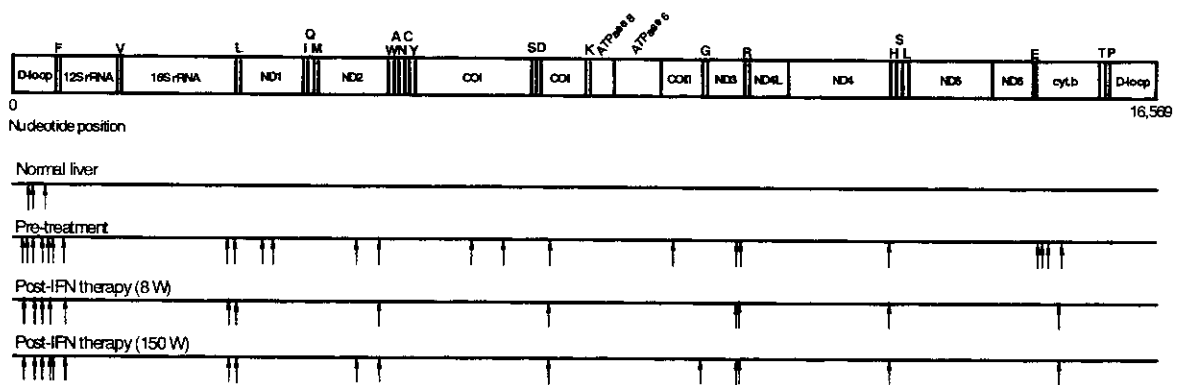


図2 IFN投与によるミトコンドリア遺伝子変異の変化

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

NO によるミトコンドリア遺伝子変異の集積

分担研究者 西口修平 大阪市立大学大学院医学研究科 肝胆膵病態内科 助教授

共同研究者	田守昭博 同	肝胆膵病態内科学	助手
	西川 学 同	分子病態学	研究員
	井上正康 同	分子病態学	教授

研究の要旨： 活性酸素によってミトコンドリア DNA に傷害が生じることを明らかにするために、HepG2 に NO 産生剤である NOC18 を添加し、培養 72 時間後の D-loop 領域の塩基配列を投与前の配列と比較した。NO 産生刺激により、4 箇所新たな塩基変異が生じた。本研究より、慢性炎症により活性酸素が生じ、ミトコンドリア DNA の変異が比較的短期間に生じることが明らかになった。

目的

発癌過程における遺伝子異常は核の染色体 DNA を中心に検討されており、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変化が発癌のメカニズムであると考えられている。我々は、肝癌において多数のミトコンドリア DNA 塩基変異が存在するのみならず非癌部でも既に多数の変異が集積していることを報告しており (1)、発癌過程におけるミトコンドリア DNA の変異の関与は非常に興味深い。炎症局所では、一酸化窒素をはじめとする大量の活性酸素種が産生されている。ミトコンドリア DNA は、核 DNA と異なりヒストンを持たず修復機構も不完全であるため、このような場では傷害を受けやすいと考えられる。今回、活性酸素種によるミトコンドリア DNA の変化を解析するため、培養細胞に一酸化窒素を作用させて培養細胞のミトコンドリア DNA に塩基変異が生じ

るのか検討した。

方法

DMEM にて HepG2 を培養し、NO 供与体 (NOC18: 1 mM) を添加して 72 時間後に細胞を回収した。添加前後の細胞より DNA を抽出して、ミトコンドリア DNA に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、増幅産物を ABI シーケンサーで塩基配列を決定した。

結果

D-loop 部分のミトコンドリア遺伝子配列を解析したところ、NOC18 添加前は 4 箇所であった変異が、新たに 4 箇所加わり 8 箇所になった (図 1)。変異が新たに生じた箇所は全て C であり、C→T あるいは C→G の変異であった (図 2)。

考察

一酸化窒素は、ミトコンドリアの電子伝達系において終末のシトクローム C オキシダーゼを可逆的に阻害することにより電子伝達を阻止し、その結果ミトコンドリアから電子が漏出しやすくなる (2)。漏出した電子は酸素と結合してスーパーオキシドラジカルとなる。本ラジカルは SOD の存在のもと、また不均化反応により過酸化水素となる。過酸化水素は、鉄などの遷移金属の存在下にヒドロキシラジカルとなる。本分子は極めて強い DNA 傷害分子である。ミトコンドリア DNA は電子伝達系タンパクのサブユニットをコードしている。今回の検討で、一酸化窒素がミトコンドリア遺伝子変異を引き起こすことが判明した。炎症局所では、炎症性細胞により大量の一酸化窒素が産生されているため、慢性肝炎では肝組織で同様の反応が起こっていると考えられる。傷害されたミトコンドリア DNA から合成される電子伝達系タンパクはその機能が不完全であるため、さらに電子を漏出しやすくなり、前述のような反応を経てより強く DNA を傷つけることになる。以上の

ように、ミトコンドリア遺伝子が傷害されると、そのミトコンドリア自身が活性酸素種の産生源となってしまうため、細胞内の酸化ストレスが増強して核 DNA をも傷害してしまうものと考えられる。炎症によるミトコンドリア DNA 変異が発癌に直接関与するかどうかは現段階では不明であるが、細胞内酸化ストレスを増強して DNA 傷害を増悪することは事実である。

論文発表

1. Nishikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S et al. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. **Cancer Res.** 2001; 61: 1843-1845.
2. Nishikawa M, Sato E, Utsumi K et al. Oxygen-dependent regulation of energy metabolism in ascites tumor cells by nitric oxide. **Cancer Res.** 1996; 56: 4535-4540.

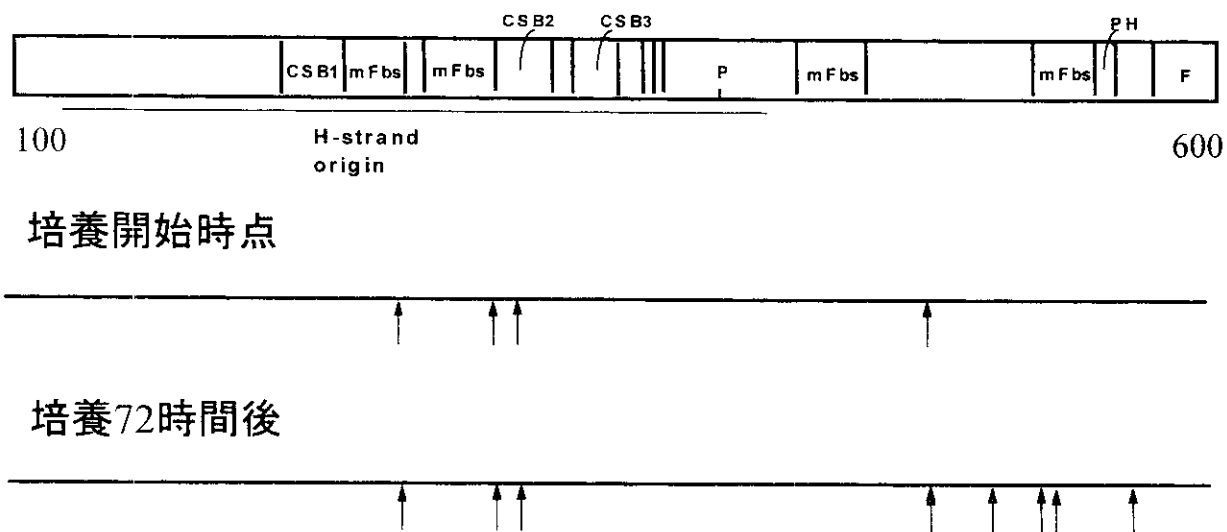


図1 NOC18添加培養によるHepG2のミトコンドリアDNAの変異の集積

Pretreatment	NOC18添加72h後
263 A→G	263 A→G
303 C→CC	303 C→CC
311 C→CC	311 C→CC
499 G→A	499 G→A
	514 C→T
	527 C→G
	530 C→G
	587 C→T

図2 一酸化窒素によるミトコンドリアDNA塩基の変化

HCV core 蛋白による酸化ストレスの誘導に関する研究
分担研究者 沖田極 山口大学医学部第一内科

研究要旨

C型慢性肝炎に対する肝細胞障害は、主として宿主の免疫応答によると考えられ、C型肝炎ウイルス（HCV）による直接の肝細胞障害機序は明らかではない。そこで本研究ではHCV core 蛋白発現細胞を用い、core 蛋白が酸化ストレスを誘導するか否かについての実験を行い、HCV core 蛋白が肝細胞障害に関与しているかについての検討を行った。core 蛋白発現細胞では活性酸素、脂質過酸化物の産生増加が著明であった。またこの活性酸素はミトコンドリア由来と考えられ、ミトコンドリアとcore 蛋白の局在の一致を一部に認めたことから、C型慢性肝炎の肝細胞障害機序のひとつにcore 蛋白によるミトコンドリア障害が重要と考えた。

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対するHCVによる直接の肝細胞障害機序を検討するため、これまでC型慢性肝炎との関連が報告されている酸化ストレスに着目しHCV core 蛋白発現細胞を用い、core 蛋白が酸化ストレスを誘導するか否かについての検討を行った。

B. 研究方法

core 蛋白発現細胞は、Tet-off 遺伝子発現システムを用いcore 蛋白の発現が調節可能なHuh-7細胞とHeLa細胞およびstableにcore/E1/E2またはE1/E2蛋白のみを発現するCHO-K1細胞を用いた。酸化ストレスの指標として、活性酸素は蛍光プローブ(chloromethyl-dichlorodihydrofluorescein, CM-DCF)を2時間細胞に添加後、蛍光顕微鏡と画像解析装置を用い個々の細胞について測定し、過酸化脂質産物(4-hydroxyalkenalsとmalondialdehyde)の測定はcolorimetric assayを用いて行った。またcore 蛋白とミトコンドリアの局在を蛍光および共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて検討した。

C. 研究結果

活性酸素の産生は、core 蛋白発現Huh-7細胞、HeLa細胞およびcore/E1/E2蛋白発現CHO-K1細胞それぞれにおいて高い活性酸素の

産生を認めたが($p < 0.001$)、E1/E2蛋白のみを発現している細胞では活性酸素の産生を認めなかった。過酸化脂質産物は、core 蛋白発現Huh-7およびHeLa細胞ともに非発現細胞に比べそれぞれ高値を示した($p < 0.05$)。以上から、core 蛋白により酸化ストレスが誘導されることが明らかとなった。次にこの活性酸素の産生部位を明らかにするため、ミトコンドリアの呼吸鎖(Complex I)阻害剤であるDiphenyl iodoniumを細胞に添加し活性酸素の産生が抑制されるか否かについての検討を行った。core 蛋白発現Huh-7細胞における活性酸素の産生は著明に抑制され、このことから活性酸素はミトコンドリア由来と考えた。また、core 蛋白とミトコンドリアの局在の一致を一部に認めた。

D. 考察

HCV core 蛋白が、ミトコンドリア由来の活性酸素産生や過酸化脂質産物の産生を増加させ、core 蛋白とミトコンドリアの局在が一部で一致することが明らかになった。このことはcore 蛋白により誘導されたミトコンドリア由来の活性酸素が、さらにミトコンドリア障害を助長し、ミトコンドリアでの脂肪酸の酸化障害に由来する脂肪肝の発症を、またこの活性酸素によるミトコンドリアおよび染色体DNAの障害、われわれの用いたcore 蛋白発現細胞(Huh-7)にアポトーシスが認められなかった事実から考えると肝発癌に関

与している可能性も考えられ、core 蛋白発現細胞におけるミトコンドリア機能の解析は、core 蛋白による直接の肝細胞障害機序の解明に重要と考えられた。

E. 結論

core 蛋白が直接ミトコンドリアの機能に影響を与え酸化ストレスを誘導し、さらにはC型慢性肝炎における肝細胞障害に関与することが示唆された。

F. 研究発表

2. 学会発表

第37回日本肝臓学会総会 シンポジウム
C型肝炎ウイルス core 蛋白による酸化ストレスの誘導
奥田道有、沖田 極、Steven A. Weinman

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

厚生労働省 新興・再興感染症研究事業 分担研究報告書

C型肝炎ウイルスの感染者に対する治療の標準化に関する臨床的研究

分担研究者 熊田博光 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 消化器科部長

研究要旨：HCV genotype 1b かつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎に対する Interferon α -2b+Ribavirin 併用療法において、初回単回投与と複数回最終投与における両薬剤の血中薬物動態試験を行った。複数回最終投与における Ribavirin の Cmax 及び AUC (0-12hr) が完全著効例において有意に高値を示した。また血清 Ribavirin 濃度は治療開始後 4-8 週で plateau に達し、その濃度が完全著効例において有意に高値であった。“難治性” C 型慢性肝炎に対する Interferon α -2b+Ribavirin 併用療法において、血清 Ribavirin 濃度の測定は治療効果を予測するうえで有用であり、今後の治療法の改善に参考になる可能性が示唆された。

共同研究者

坪田昭人	虎の門病院 消化器科 医員
鈴木文孝	虎の門病院 消化器科 医員
池田健次	虎の門病院 消化器科 医長

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した。

A. 研究目的

従来の Interferon (IFN) 単独療法に難治性とされる HCV genotype 1b かつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎に対する IFN α -2b + Ribavirin 併用療法において、両薬剤の血中薬物動態と血中 HCV 動態を詳細に検討するとともに、薬物動態が治療の有効性と安全性に及ぼす影響についても検討を加えた。

B. 研究方法

精査・治療目的で当院に通院している HCV genotype 1b かつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者 14 例を対象とした。対象は 39-58 歳 (中央値 50 歳)、男性:女性 = 13:1、肝生検病理組織病期 (新犬山分類) F1:F2 = 11:3、比体重 Ribavirin 投与量 10.3-13.5 mg/kg (中央値 12.0 mg/kg)、治療前 Hb 値 13.7-17.4 g/dL (中央値 15.1 g/dL)、治療前 ALT 値 52-247 IU/L (中央値 115 IU/L)、IFN 治療歴の有無 = 9:5、治療前血清 HCV RNA 量 1.2-56.0 MEq/mL (中央値 21.0 MEq/mL)、NS5A/ISDR (アミノ酸変異数による分類) Wild/Intermediate/Mutant/Mixed type = 7/2/0/5 であった。投与方法は IFN α -2b 6MU/日・筋注を開始 2 週間は週 6 日 (連日中は 24 時間間隔)、その後週 3 回を 22 週間とした。一方、Ribavirin は 400 mg 経口投与後 48hr の薬物動態試験を施行、その後は 800 mg/分 2/日・連日投与とした。初回単回投与の薬物動態試験は 0,1,3,6,12,24,36,48 hr と時系列に血清を採取、その後 1,4,8,12,16,20,24 週、そして複数回最終投与の薬物動態は 0,1,3,6,12,24,48hr、及び治療終了後 1,2,3,4 週に血清を採取し両薬剤の濃度を測定した。測定で得られた濃度を基に薬物動態学的指標を算出した。また同時に血清 HCV RNA も測定 (分岐鎖 probe 法及び Ampli-cor 法) し推移を観察した。治療効果判定基準は厚生労働省の基準に準じ、上記の動態と治療効果の関連性を検討した。

(倫理面への配慮)

C. 研究結果

完全著効例は 2 例、不完全著効例は 6 例 (1 例は治療中血清 HCV RNA 非陰性化例)、再燃例は 6 例 (4 例は治療中血清 HCV RNA 陰性化例、2 例は非陰性化例) であった。完全著効例の治療前血清 HCV RNA 量 (NS5A/ISDR のアミノ酸変異数) は各々 48.0 MEq/mL (0=wild type)、2.6 MEq/mL (1=intermediate type) であり、これらの HCV 関連因子と治療反応性との間に有意な関連性は認められなかった。

Ribavirin 初回投与の薬物動態: Tmax は 1-6 hr (中央値 3 hr)、Cmax は 402-880 ng/mL (中央値 560 ng/mL)、AUC (0-12hr) は 2.65-5.10 μ g \cdot hr/mL (中央値 3.74 μ g \cdot hr/mL)、T1/2 は 4.8-12.7 hr (中央値 8.4 hr) であり、治療効果との有意な関連性は全く認められなかった。Ribavirin 複数回最終投与の薬物動態: Tmax は 1-6 hr (中央値 3 hr)、Cmax は 2,184-4,278 ng/mL (中央値 2,846 ng/mL)、AUC (0-12hr) は 23.5-44.4 μ g \cdot hr/mL (中央値 29.2 μ g \cdot hr/mL)、T1/2 は 211-339 hr (中央値 284 hr) であり、完全著効例における Cmax 及び AUC (0-12hr) が他症例に比し有意に高値を示した。RAUC は 5.18-10.8 (中央値 7.24) を示し、完全著効例で高値を示した。治療中の時系列濃度は 4-8 週間で plateau に達し 8 週以降はほぼ一定値を推移し、その濃度は完全著効例で有意に高値を示した。

IFN α -2b 初回投与の薬物動態: Tmax は 3-12 hr (中央値 6 hr)、Cmax は 18.2-72.0 IU/mL (中央値 33.3 IU/mL)、AUC (0-12hr) は 169-610 IU \cdot hr/mL (中央値 286 IU \cdot hr/mL)、T1/2 は 4.8-12.7 hr (中央値 8.4 hr)、IFN α -2b 複数回最終投与の薬物動態: Tmax は 1-6 hr (中央値 3 hr)、Cmax は 40.2-116 IU/mL (中央値 62.7 IU/mL)、AUC (0-12hr) は 375-1,175 IU \cdot hr/mL (中央値 583 IU \cdot hr/mL)、T1/2 は 5.3-19.8 hr (中央値 8.1 hr) であり、治療効果との有意な関連性は全く認められなかった。1-24 週の血清濃度は患