

IFN Receptor and IFN Signals

Hiroshi Yatsuhashi

Clinical Research Center, National Nagasaki Medical Center, WHO Collaborating Center for Reference and Research on Viral Hepatitis, Nagasaki, Japan

Summary. Our experience on the study of IFN receptor and signals associated with the response in the treatment of chronic hepatitis C (CHC) was described. We had developed a quantitative immunohistochemical method to analyses hepatic IFN receptor expression. Our results demonstrated that the expression level of hepatic IFN receptor correlated with the response to IFN therapy in patients with CHC. We also examined mRNA level of IFN signals by molecular techniques. We could confirm that the mRNA levels of IFN receptor are closely correlated with response to IFN. The resistance to IFN therapy might be due to low levels of hepatic IFN receptor.

Key words. Interferon, Chronic hepatitis C, IFN receptor, IFN signals, IFNAR1, IFNAR2, JAB

Introduction

Interferon (IFN) is an effective antiviral agent that results in viral eradication and marked biochemical and histological improvement in patients with chronic hepatitis C (CHC). However, only about half of patients respond to IFN, and relapse is common when treatment is stopped. Several factors associated with a high likelihood of a long-term therapeutic response to IFN, such as age of patients, duration of the disease, viral genotype and HCV-RNA levels. Although the analysis of the IFN system appears to be important to establish the strategy for viral hepatitis treatment for patients with persistent HBV or HCV infection, studies on this system in association with IFN response has been limited. Therefore we studied IFN receptor and signals associated with IFN response in the IFN treatment of chronic hepatitis C.

IFN Receptor

IFN- α and IFN- β are classified as type I IFN whereas the mitogen-induced interferon gamma (IFN- γ) is a type II IFN. Type I IFNs are a family of homologous cytokines, which potently elicit an anti-viral and anti-proliferative state in cells. All human type I IFNs bind to a cell surface receptor consisting of two transmembrane protein, IFNAR1 [1] and IFNAR2 [2], which associate upon binding (Fig. 1).

IFNAR1, responding mainly to IFN- $\alpha\beta$, has been cloned from human cells by Uze et al. in 1990 [1]. However, the response of this receptor to other human IFN- α subtypes and to human IFN- β was very low. IFNAR1 displays low affinity for most human IFN- α isoforms and appears to be primarily a signal transducing subunit.

The ligand binding components of type I receptor was cloned by Novick et al. in 1994 [2]. This component (IFNAR2) responds equally well to IFN- β and to almost all IFN- α subtypes and is regarded as the major receptor to type I IFN. A soluble form of human IFNAR2 was first purified as an IFN- α binding protein from urine (IFNAR2a). Its identification led to the cloning of its own cDNA and those of two membrane-associated forms, human IFNAR2b and human IFNAR2c. Although all three forms bind type I IFN, only the long form (IFNAR2c) participates in signal transduction [3]. The functions of human IFNAR2a (extracellular soluble form) and human IFNAR2b, which possesses only a short intracellular domain, remain unclear. IFNAR2b is usually expressed at lower levels than IFNAR2c and may exert a dominant negative effect on IFN- α signaling [4].

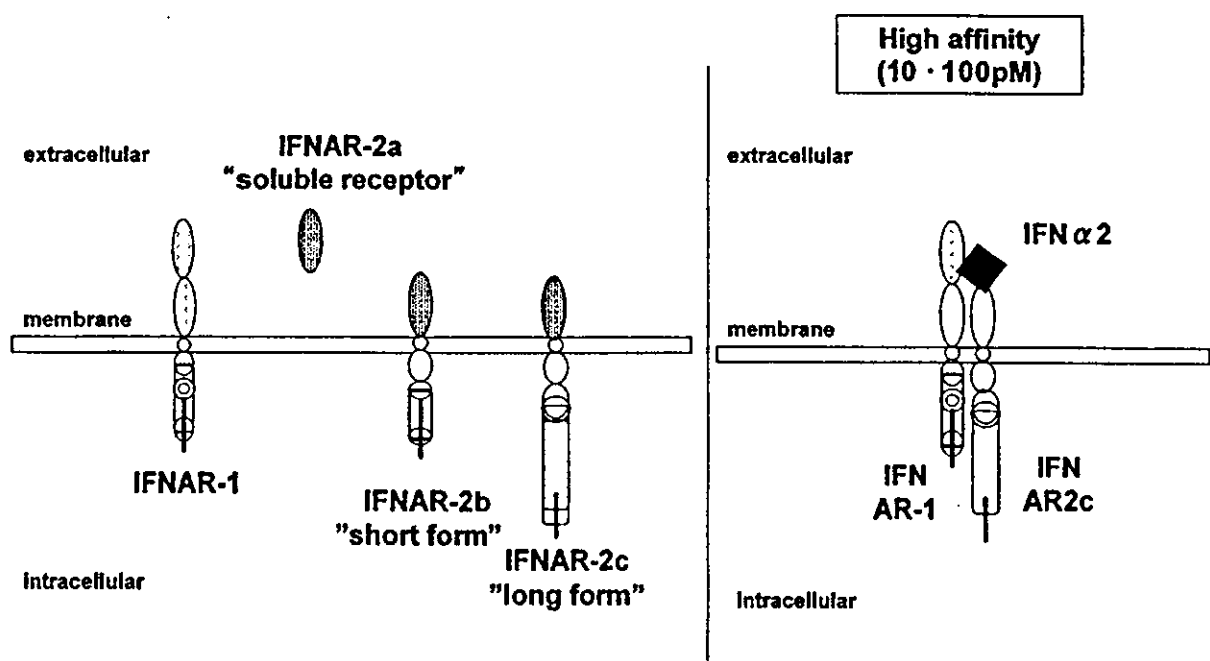


Fig. 1. Schematic representation of type I IFN receptors. IFNAR1 and three kinds of IFNAR2 (IFNAR2a: soluble form, IFNAR2b: short form, IFNAR2c: long form).

IFNAR2a (extracellular soluble form) is generally believed to be an antagonist for IFN signaling. Soluble forms of cytokine membrane receptors usually are produced either by proteolytic cleavage from a membrane form or by alternative splicing of mRNA precursor. Since these soluble forms often can bind ligand, they initially were proposed to be antagonists, blocking or, at the very least, reducing cytokine potency by competing with their membrane-anchored form for common ligands. As a result, recombinant extracellular portions of some receptors are being used to therapeutically reduce inflammatory, autoimmune, and other pathological events mediated by cytokine [5]. Another potential function for soluble receptor forms is to protect ligand from degradation or excretion. A soluble receptor subunit also may convert a ligand-resistant target into a sensitive one by substituting for an absent endogenous binding subunit. Recently, another new functional possibility was reported that the soluble extracellular domains of receptor subunits can mimic the activity of a cytokine even when the cytokine itself is absent [6].

Analysis of Hepatic IFNAR2 Expression by Immunohistochemical Techniques

We had developed quantitative analysis of hepatic IFNAR2 expression using immunohistochemical techniques [7]. We compared IFNAR2 expression in patients between viral and non-viral liver disease and found out the relationship between IFNAR2 expression and response to IFN. Liver biopsy samples were evaluated using an indirect immunoperoxidase staining technique. For this purpose, we used the specimens embedded in paraffin. The indirect immunoperoxidase method was employed with IgG class anti-IFNAR2 monoclonal antibody (mAb) developed by Muraguchi and Ohmoto (Cellular Technology Institute, Ohtsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japan) and horseradish peroxidase-labeled anti-mouse rabbit IgG Fab fragments (MBL Co., Nagoya, Japan), as reported previously. Immunostaining was performed on streptavidin-biotin (Histofine SAB-PO (M) kit, Nichirei, Tokyo) stained sections. Computer-image quantitative analysis was performed in the following manner on specimens stained with SAB method. The staining intensity in each image (x400) was quantified by densitometry using an image analysis software. The expression intensity in one normal control sample was defined as 1 Unit (U).

Comparison of Hepatic IFNAR2 Levels in Viral and Non Viral Liver Disease

A diffuse staining of IFNAR2 was observed in hepatocytes, with a strong staining in the cytoplasm but weak staining in the cell membrane. A weak expression of IFNAR2 was detected in lymphocytes present in the portal area, compared with

that of hepatocytes. This is the first report of immunohistochemical analysis of hepatic IFNAR2 expression in patients with CHC. With regard to in situ distribution of IFNAR2 in hepatocytes, this staining pattern with a diffuse strong staining in the cytoplasm could be a subject to various interpretations. The main explanation is that the cytoplasmic pattern of hepatocellular reactivity might indicate receptor synthesis in hepatocytes or reflect internalization of this receptor. Similar results were reported by Navarro et al. [8] in the study of the expression of IFNAR1 and by Volpes et al. [9] in the study of IFN- γ .

The mean expression level of hepatic IFNAR2 in patients with acute hepatitis A (3.1 ± 1.1 U, $n=9$) was significantly ($P < 0.01$) higher than in chronic HCV infection (1.9 ± 1.2 U, $n=55$) or control subjects (1.3 ± 0.4 U, $n=9$). There was no significant difference in the mean expression level of hepatic IFNAR2 in patients with CHC infection and control subjects. These results demonstrated a significantly high expression of hepatic IFNAR2 in patients with acute hepatitis A compared with controls. Although there was no significant difference in hepatic IFNAR2 expression between patients with CHC and controls, the level of expression was higher in CHC than controls. Based on these results, we believe that hepatitis viral infection induces an increase in the expression of hepatic IFNAR2 and acute viral infection may result in a strong up-regulation of hepatic IFNAR2 compared with chronic viral infection. Although the precise stimulus responsible for enhanced hepatic IFNAR2 expression in hepatitis viral infection was not defined, such increase is compatible with the human protective system against viral infection. Our results are similar to those of previous studies showing a diffuse expression of IFN- γ receptor throughout the liver parenchyma and strong cytoplasmic as well as membranous and perinuclear reactivity in acute hepatitis [9].

Patients with chronic HCV infection were divided into four groups based on the degree of liver fibrosis (F 0-3). The mean expression level of hepatic IFNAR2 was 2.06 ± 1.15 U in 14 patients with F 0, 2.00 ± 1.16 U in 26 patients with F 1, 1.85 ± 1.38 U, in 8 patients with F 2 and 0.89 ± 0.38 U in 5 patients with F 3. Severe liver fibrosis was associated with a significant decrease in IFNAR2 levels (F0 vs F 3, $P < 0.01$. F 1 vs F 3, $P < 0.05$). Our results also demonstrated a close relationship between the expression of hepatic IFNAR2 and the extent of liver fibrosis in patients with CHC. These results are compatible with those of previous reports showing that the therapeutic effectiveness of IFN diminishes with the progression of histopathological abnormalities, and that a sustained response to IFN therapy in patients with CHC is influenced by the extent of hepatic fibrosis. In this regard, Ishimura et al. [10] also reported that the absence of IFN- α receptor mRNA was associated with severe fibrosis of the liver. Other investigators also identified IFNAR2 sites on hepatocytes in patients with chronic hepatitis C with and without cirrhosis [11]. In these studies, fewer IFNAR2 sites were identified on hepatocytes of patients with HCV-related liver cirrhosis than in chronic hepatitis C, using light microscopic autoradiography with radiolabeled HLBI. Combined together, these results suggest that a low expression of hepatic IFNAR2 might be partially responsible for the poor IFN response in liver cirrhosis.

Correlation Between Level of Hepatic IFNAR2 Levels and Response to IFN Therapy

We also examined the correlation between the outcome of IFN treatment and the level of hepatic IFNAR2 in 55 patients with chronic HCV infection [7]. Fifteen of 55 (27%) patients, whose post-treatment level of serum HCV-RNA diminished to undetectable levels on RT-PCR, were judged as sustained viral responders (SVR). In contrast, serum HCV-RNA was still detectable after treatment in the remaining 40 (73%) non-sustained viral responders (Non-SVR) (Fig. 2).

The mean level of hepatic IFNAR2 in SVR (2.7 ± 1.1 U, $n=15$) was higher than that of Non-SVR (1.6 ± 1.1 U, $n=40$) ($P < 0.001$). Univariable and multivariable logistic regression analysis were also performed to evaluate the various factors influencing the efficacy of IFN therapy, such as the hepatic IFNAR2 level (IFN-R level), serum HCV-RNA level, HCV serotype, ALT level, age, gender, degree of fibrosis and inflammatory activity of the liver. Univariable logistic regression analysis showed that IFN-R level, HCV-RNA level, HCV serotype and degree of inflammatory activity of the liver achieved statistical significance and they were subjected to multiple logistic regression. Multivariate analysis was performed using these four factors. Among these factors, both IFN-R level ($P=0.0056$) and HCV-RNA level ($P=0.0097$) were important factors influencing the efficacy of IFN therapy in this study (Table 1).

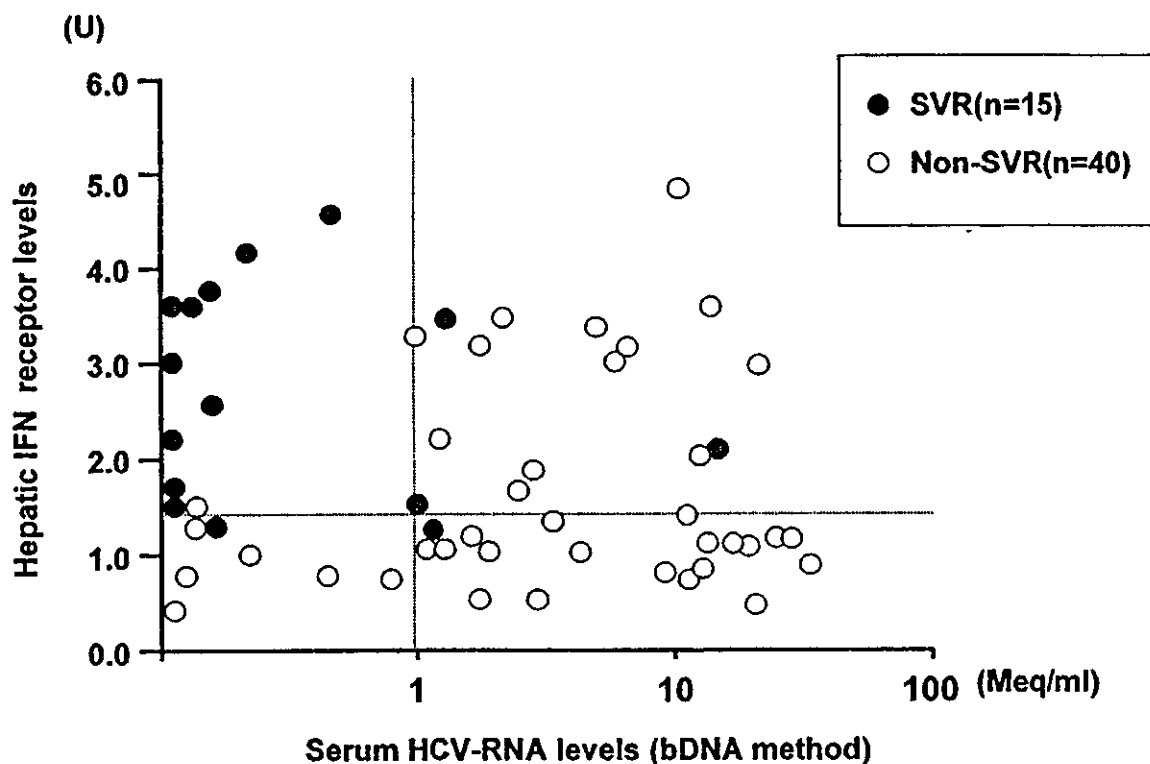


Fig. 2. Relationship between response to IFN therapy, level of expression of hepatic IFNAR2 and serum HCV-RNA levels in 55 patients with chronic hepatitis C. SVR Sustained Responders ($n=15$), Non-SVR ($n=40$).

Table1. Predictive factors of the effectiveness of IFN monotherapy in patients (n=55) with chronic hepatitis C by multivariable logistic regression analysis

Predictor	Estimate	S.E.	P-value
IFN-AR2 level	-1.4578	0.5266	0.0056
HCV-RNA level	0.3403	0.1316	0.0097
Activity (liver biopsy)	-1.3815	0.7018	0.0490
HCV-genotype	-1.2536	1.0601	0.2370

We observed a clear relationship between response to IFN therapy and the level of expression of hepatic IFNAR2. Notwithstanding the wide experience in the use of IFN treatment in CHC, little is known about the host mechanisms that influence the response, or the lack of response, to this agent in individual cases. Because the receptor is a key element in the IFN response, we examined the usefulness of a monoclonal antibody that recognizes IFNAR2 in monitoring the expression of type I IFN receptor in patients with liver disease. In our study, pretreatment levels of hepatic IFNAR2 expression were significantly higher in patients with SVR than Non-SVR, suggesting that a poor response to IFN might be due to a deficient expression of hepatic IFNAR2 in CHC.

In confirmation of the results of previous studies, SR in the current study had low pretreatment serum HCV RNA levels than NR, and the frequency of a sustained response in patients infected with HCV genotype 1b (serotype 1) was less than in those infected with other HCV genotypes (serotype 2). Both serum HCV RNA levels and HCV genotypes are considered as strong predictors of sustained response. Interestingly, our results showed that among patients with low level viremia or HCV serotype 2 who were expected to have SVR, hepatic IFNAR2 in these patients were significantly higher than in Non-SVR. To explain the reason of IFN resistance in patients with favorable virus-related factors on the response to IFN therapy, the level of hepatic IFN receptor should be considered as an important patient-related factor influencing the response to IFN therapy (Fig. 2). Logistic analysis in this study also demonstrated that the level of hepatic IFN receptor was an important predictor of IFN therapy. Furthermore, the monitoring of expression of type I IFN receptor in patients before IFN therapy may help to predict treatment outcome. Indeed, this approach would provide a better management of IFN therapy by deciding the time of IFN treatment.

In conclusion, we demonstrated that the expression level of hepatic IFNAR2 correlated with the response to IFN therapy in patients with CHC and that measurement of hepatic IFNAR2 levels might be useful in predicting the response to IFN therapy. Resistance to IFN treatment in patients with CHC might be due to low levels of hepatic IFNAR2. Further studies are necessary to understand the role of IFNAR2 and to allow the discovery of new therapies for patients resistance to treatment with IFN.

IFN Signals

As both the type I and type II IFN receptors lack intrinsic kinase domains, they require the association with a family of non-receptor tyrosine kinases known as Janus-Kinases (JAKs) to facilitate the tyrosine phosphorylation of STAT proteins. IFN exert their signals through receptor-associated Janus-Kinases (JAKs) and signal transducers by phosphorylation of STAT1 and STAT2. After binding to receptors, IFNs initiate gene activation through phosphorylation of intermediary proteins. The receptor-associated kinase Tyk2, JAK1 and JAK2, phosphorylate STAT1 and STAT2 (Fig. 3) [12].

Type I IFN (IFN- α and IFN- β) induces the formation of a heterotrimeric transcription factor complex, interferon-stimulated gene factor 3 (ISGF3), which consists of signal transducers and activators of transcription 1 and 2 (STAT1 and STAT2) and p48 (ISGF3 γ), after binding to its receptor. ISGF3 translocates into the nucleus and binds to a specific gene sequence termed the IFN-stimulated response element (ISRE), characterized by a conserved 15 base pair element. The ISRE has a consensus sequence GAAN(N)GAAA (N=any nucleotide) to a specific gene sequence termed the IFN-stimulated response element (ISRE), characterized by a conserved 15 base pair element. The ISRE has a consensus sequence GAAN(N)GAAA (N=any nucleotide). The ISRE is a necessary and sufficient component of the induction of many genes by IFN [13].

IFN- γ binds a different receptor and activates STAT1, which, as a homodimer, activates a related but distinct nucleotide sequence resulting in transcription of

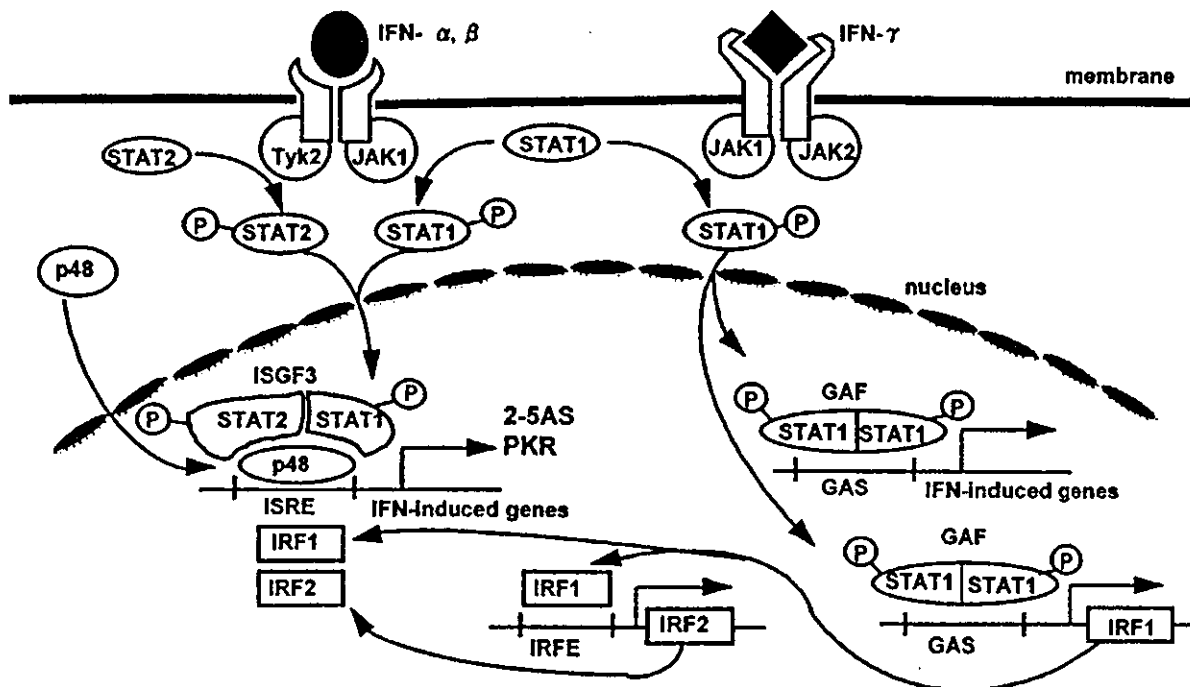


Fig. 3. The signal transduction pathway for IFNs

different genes and synthesis of a different set of proteins. An IFN- γ activation site (GAS) is composed of the consensus nucleotide sequence AANNNNNTT (N=any nucleotide) and confers responsiveness to IFN- γ after binding of a. STAT-1a homodimer [13].

Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) is another important factor induced by type I and II IFNs. Since the sequence of IRF-1 binding site termed IRF-E overlaps with ISRE, IRF-1 also binds to ISRE sequence and activates the interferon-inducible gene transcription. p48 and IRF-1 show a homology within their amino-terminal regions and are members of the IRF family together with other IRFs [14].

IFN induces some interferon-inducible genes such as 2,5 oligo-adenylate synthetase (2-5AS) and double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR), inhibit the post-transcriptional stages of viral replication. The 2-5AS are a family of enzymes that convert ATP into unusual 2,5-oligo-adenylates (2-5A), which in turn activate a dominant ribonuclease, RnaseL, to degrade viral RNAs. The other antiviral enzyme, PKR, inhibits viral protein synthesis. It is activated by autophosphorylation of serine/threonine residues in the presence of dsRNA. Activated PKR phosphorylates eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF-2 α). Phosphorylated eIF-2 α cannot participate in protein synthesis. Therefore, inhibition of PKR is essential for viral replication [15].

Recently it has been reported that JAB (JAK-binding protein), as a new molecule, strongly inhibits IFN-signaling by blocking JAK activity through directly binding to its kinase domain, and the loss of responsiveness to the antiviral effect of IFN- β in NIH-3T3 fibroblasts ectopically expressed JAB. It has been suggested that JAB might provide the influence on unresponsiveness and resistance to the IFN-therapy in some patients with viral disease [16].

Correlation Between Level of Hepatic IFN-Related Molecules and Response to IFN Therapy in Patients with Chronic Hepatitis C

Recently A. Katsume and M. Kohara, in the Department of Microbiol & Cell Biology in Tokyo Metro Institute Medical Science, developed quantitative method of IFN signals using real time detection polymerase chain reaction (RTD-PCR) based on Taq-Man chemistry. We examined IFN signals in liver tissue obtained from 22 patients with chronic hepatitis C later treated with IFN. According to viremia status after treatment, we divided into two groups: Sustained viral responders (SVR:n=9) and Non-sustained viral responders (Non-SVR:n=13). We examined mRNA level (expressed as Unit:U) of IFN receptor (IFN-R), double strand RNA-activated protein kinase (PKR), 2, 5 oligo-adenylate synthetase (2-5AS), interferon regulatory factor1(IRF1), IRF2, JAK-binding protein (JAB) and cytokine-inducible SH2 protein3 (CIS3) in liver tissue. It was shown that the mean levels of both IFN-R (1.195 ± 0.311 U) and JAB (3.911 ± 3.284 U) in SVR were

significantly ($P < 0.01$) higher than in NR (IFN-R: 0.822 ± 0.173 U, JAB: 1.471 ± 0.619). There was no difference of hepatic mRNA levels of PKR, 2-5AS, IRF1, IRF2 and CIS3 between SVR and Non-SVR (Table 2). This study also confirm that the levels of IFN-R are closely correlated with response to IFN therapy. But the expression levels of hepatic JAB mRNA, whose function was a strong inhibition of IFN-signaling by blocking JAK activity, were unexpectedly decreased in patients with Non-SVR group compared with SVR group. This paradoxical phenomenon may reflect the failure in IFN signal transduction in IFN resistant patients, because the expression of JAB is induced by IFN stimulation.

The action of IFN network such as IFN-R and JAB can contribute on the efficacy of IFN response. The resistance to IFN therapy might be due to low levels of hepatic IFN-R. A thorough understanding of intracellular IFN network that govern the IFN response will lay the foundation to identify the mechanisms that alter these effects in treatment of chronic hepatitis C.

Table 2. mRNA levels of several IFN related signals and IFN response in patients (n=22) with chronic hepatitis C

	SVR (n=9)	Non-SVR(n=13)	P-value
HCV-RNA	0.296 ± 0.610	6.204 ± 8.101	0.0424
IFN-R	1.195 ± 0.311	0.822 ± 0.173	0.0017
2-5AS	3.654 ± 1.553	4.271 ± 2.773	0.5539
PKR	1.507 ± 0.637	1.272 ± 0.621	0.3934
JAB	3.911 ± 3.284	1.471 ± 0.619	0.0157
CIS3	0.763 ± 0.474	0.450 ± 0.258	0.058
IRF1	4.648 ± 1.343	3.595 ± 1.530	0.1115
IRF2	3.633 ± 0.953	3.062 ± 0.674	0.1140

References

1. Uze G, Lutfalla G, Gresser. Genetic transfer of a functional human interferon $-\alpha$ receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell* 1990;60:225-234.
2. Novick D, Cohen B, Rubinstein M. The human interferon- α/β receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 1994;77:391-400.
3. Domanski P, Witte M, Kellum M, Rubinstein M, Hackett R, Pitha P, Colamonici OR. Cloning and expression of a long form of the beta subunit of the interferon alpha beta receptor that is required for signaling. *J Biol Chem* 1995;270:21606-11.
4. Pfeffer LM, Basu L, Pfeffer SR, Yang CH, Murti A, Russell-Harde D, Croze E. The short form of the interferon alpha/beta receptor chain 2 acts as a dominant negative for type I interferon action. *J Biol Chem* 1997;272:11002-5.
5. Mizukoshi E, Kaneko S, Kaji K, Terasaki S, Matsushita E, Muraguchi M, Ohmoto Y,

- Kobayashi K. Serum levels of soluble interferon Alfa/Beta receptor as an inhibitory factor of interferon in the patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1999;30:1325-31.
6. Han CS, Chen Y, Ezashi T, Roberts RM. Antiviral activities of the soluble extracellular domains of type I interferon receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6138-43.
 7. Yatsushashi H, Fujino T, Matsumoto T, Inoue O, Koga M, Yano M. Immunohistochemical analysis of hepatic interferon alpha-beta receptor level: Relationship between receptor expression and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999;30:995-1003.
 8. Navarro S, Colamonici OR, Llombart-Bosch A. Immunohistochemical detection of the type I interferon receptor in human fetal, adult, and neoplastic tissues. *Mod Pathol* 1996;9:150-156.
 9. Volpes R, van den Oord JJ, De Vos R, Depla E, De Ley M, Desmet VJ. Expression of interferon-gamma receptor in normal and pathological human liver tissue. *J Hepatol* 1991;12:195-202.
 10. Ishimura N, Fukuda R, Fukumoto S. Relationship between intrahepatic expression of interferon-a receptor mRNA and the histological progress of hepatitis C virus-associated chronic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:712-717.
 11. Miyajima I, Sata M, Gondo K, Suzuki H, Tanigawa K. Interferon accumulation in cirrhotic rat liver. *J Vir Hepat* 1996;3:23-27.
 12. David M. Signal transduction by type I interferons. *Biotechniques* 2002;Suppl:58-65.
 13. Borden EC. Gene regulation and clinical roles for interferons in neoplastic diseases. *Oncologist* 1998;3:198-203.
 14. Harada H, Taniguchi T, Tanaka N. The role of interferon regulatory factors in the interferon system and cell growth control. *Biochimie* 1998;80:641-50.
 15. Kalvakolanu DV. Virus interception of cytokine-regulated pathways. *Trends Microbiol* 1999;7:166-71.
 16. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN, Yoshimura A. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 1999;18:1309-20.

信頼性の高い治験を迅速に実施するための 東大病院の取り組み

金井文彦, 荒川義弘, 小俣政男 東京大学医学部附属病院 臨床試験部

〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1, E-mail : kanaif-int@h.u-tokyo.ac.jp

1 はじめに

ゲノム創薬による新薬の開発と個人の特性にあったテーラーメイド医療の確立が進むことが期待されている。一方で、グローバルな競争の激化、不十分な創薬環境、医療保険財政悪化等の影響から、日本の医薬品産業の国際競争力が低下することが懸念されている。これに対し、厚生労働省は、質の高い医薬品を提供するための医薬品開発の国際競争力の強化を目指して医薬品産業ビジョンを策定し、治験推進のための施策を打ち出している。具体的には、全国治験活性化3カ年計画治験推進事業として、大規模治験ネットワーク事業、治験コーディネーター養成事業、EBMのための臨床研究やトランスレーショナルリサーチの推進、治験施設整備、医師主導の治験を含む薬事法の改正等を進めている。

企業主導の治験については、ブリッジング試験から多国間治験への変革といったグローバル化が進む一方で、地域ネットワークやSMOを活用した治験など新たな展開が見られている。「遅い、高い、質が悪い」といわれた日本の治験は、新GCPの導入、医療機関における治験支援組織の整備、および関係者の意識改革等により、少なくとも「質」についてはかなり改善されたといわれている。しかし、「遅い」「高い」という問題については日本の医療環境を鑑みると解決は容易ではなく、国際治験を実施するうえで致命的問題となっている。また、「医師主導の治験」でも企業主導の治験と同レベルの「質」が要求され、医療機関の治験審査委員会の機能の充実や、実施状況管理体制の整備が必要となっている。このよう

な治験を取り巻く状況変化に対応できるかで、治験を着実に実施する医師・医療機関が選別される時代がやってきた。本稿では、質の高い治験を迅速に推進するための東大病院の最近の取り組みを紹介したい。

2 東大病院の治験支援体制

2.1 臨床試験部の沿革と組織

東大病院においては治験の円滑な実施を支援するために、臨床試験部が治験審査委員会事務局として審査支援を行うと共に、治験事務局としての実施支援を行っている。臨床試験部は、平成13年4月従来からの治験に加えて、研究者主導臨床試験（当院では自主臨床試験と称している）をも支援する組織として、群馬大学と共に全国に先駆けて文部科学省から正式に許可された。平成14年4月には自主臨床試験実施支援を本格的に行うためのコンサルテーション部門を新設し、同年5月には後ほど述べるピアレビューシステムを導入し、現在に至っている（沿革は図1参照）。臨床試験部は病院長の直轄組織で、部長、副部長のもとに事務部門、治験薬・情報管理部門、コーディネーター部門、コンサルテーション部門の4部門からなっている（図2）。臨床試験部は上部の会議として「臨床試験部運営委員会」と「治験審査委員会」（Institutional Review Board : IRB）を有している。

昨今の治験をめぐる状況の変化に対応すべく、臨床試験部は病院長、臨床試験部運営委員会、治験審査委員

会とともに治験を含む臨床試験の実施支援体制の改革を進めてきた。すなわち、臨床試験部は審査組織ではなく支援組織であるという立場を明確にする必要があり、また、「遅い」という問題を少しでも解決するために申請から承認までのプロセスを高い質を保持しつつ迅速に遂行する必要があった。実際に、これらの改革や支援を開始したのは平成14年4月からである。折しも、国内で多国間の治験や研究者主導臨床試験が一部ではあるが開始されたことや、また、厚生労働省による「医師主導の治験制度」の制定や各種の臨床研究の指針等の告示、また治験推進政策の動きは、我々の目指すところと一致していた。

平成6年3月	薬剤部に「治験管理室」を設置 治験の一元管理を開始
平成10年9月	治験管理センターが発足(院内措置) 医師、薬剤師、看護師、事務職員よりなる組織
平成13年4月	臨床試験部発足(文部科学省より予算化) 自主臨床試験をも支援する組織として定員化
平成14年4月	自主臨床試験支援開始
平成14年5月	ピアレビューシステム運用開始

図1 臨床試験部の沿革

2.2 治験実施支援の目指すところ

支援体制の見直しにあたっては、世界に通用する治験と質の高い自主臨床試験の支援を目指して、キーワードを Quality & Speed とした(図3)。国際治験にも耐えうるスピードを確保するために、迅速な審査体制と実施体制の構築を目指している。このため、専任スタッフの増員とピアレビューシステムの導入を行った。

また、「医師主導の治験」では各医療機関のIRBに課せられた役割は大きく、「治験実施計画書」の科学性・倫理性・実施可能性の評価能力が今まで以上に問われている。また、新たにモニタリングとはじめとする実施状況管理や信頼性保証の機能を果たさなければならないこととなっている。臨床試験部としては、前者に対してはIRBの審査基準や実施上の諸問題を十分理解しピアレビュー機能のさらなる充実を図るとともに、後者に対しては、実施状況管理等の新たな試行を開始している。また、医師主導の治験の計画・実施に関するコンサルテーションも開始している。以下、支援体制の見直しを行った点についてより具体的に述べることとする。

<p>キーワードは Quality & Speed</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 「医師主導の治験」導入に向けたIRB機能の充実 2. 「国際治験」にも通用する迅速な審査・実施体制 3. 専任スタッフによる充実した支援 4. 高い品質・実施率
--

図3 治験支援体制の目指すところ

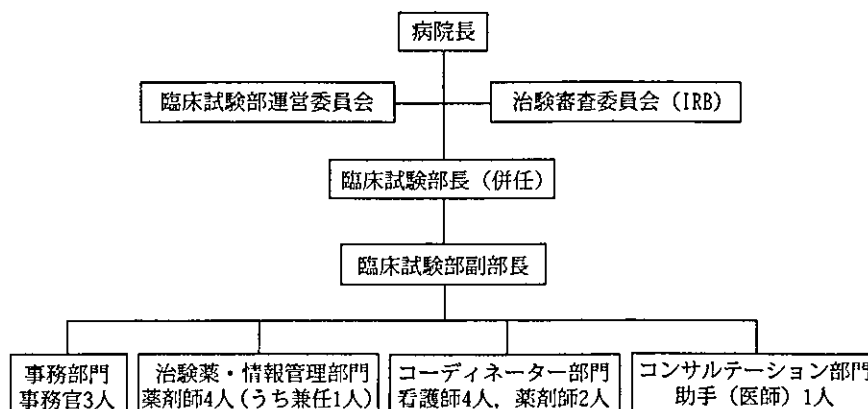


図2 臨床試験部の組織

3 審査・申請支援体制の見直し

臨床試験部は IRB 事務局として事前のヒアリングを行い、問題点を明らかにするという審査支援を行う一方、申請者に対しては、IRB から迅速な承認を得るために必要なアドバイスをを行うことで申請を支援している。

3.1 ピアレビューシステムの導入

臨床試験部では、治験審査委員会の審査内容を充実させ、また、治験を円滑に実施するための問題点を明らかにするために、従来事前審査を行ってきたが、昨今の治験をめぐる状況の変化を踏まえ、審査体制の見直しを行った。高質かつ迅速に審査を支援するために平成 14 年 5 月よりピアレビューシステムと呼ばれる審査・申請支援体制を導入した¹⁾。以前より、当院においては毎月の事前審査委員会や IRB 委員による事前書類審査を行うことで密度の高い審査に努めてきた。ピアレビューシステムではそれらのよいところを継承しつつも、臨床試験部が主催するピアレビュー会議と IRB の位置づけを見直した。すなわち、ピアレビュー会議は申請の支援を行

うものとして両者の機能分担を明確にするとともに、ピアレビュー会議において残された問題点を報告書としてまとめ、IRB に提議することとした。図 4 に IRB 申請までの流れを示す。

ピアレビュー会議は、治験依頼者、登録医師・薬剤師・看護師、および臨床試験部のスタッフより構成され、随時開催されている(図 5)。ピアレビュー登録医師数は、フレキシブルな会議の開催と専門性を確保するため、平成 14 年度に倍増し、平成 15 年 12 月現在 76 名となっている。各診療科(部)より 1~3 名の推薦を受け、診療上の専門領域および研究上の専門領域と共に登録し、毎年更新することとしている。その他、登録薬剤師は 4 名、登録看護師が 4 名となっている。ピアレビューの開催にあたっては、申請者とは異なる診療科(部)から、専門領域とピアレビューへの出席依頼回数を考慮して、申請ごとに登録医師 2~4 名、登録薬剤師 1 名、登録看護師 1 名に臨床試験部から出席を依頼している。また、臨床試験部は部長、副部長以下、各部門の代表者、ピアレビュー担当者、担当 CRC が出席することとしている。

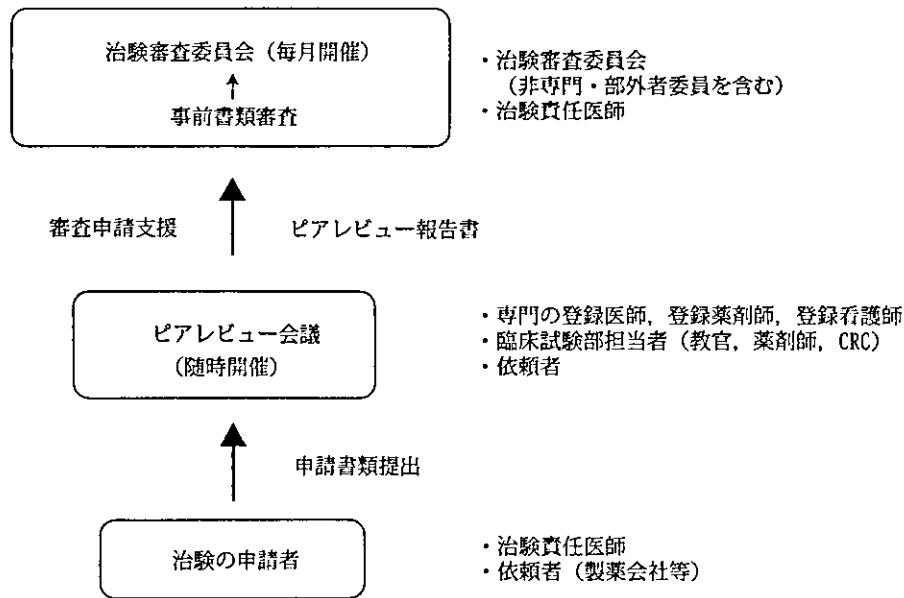


図4 申請から治験審査委員会へのながれ

ピアレビュー会議では、治験依頼者側の開発担当者から10分ほどで治験の概要の説明を受け、その後、まず臨床試験部内の事前検討会で作成したメモにもとづいて数件質問を行い、続いて各出席者からの質疑を行っている。会議は申請1件当たり45分までとし、効率的な進行につとめている。ピアレビュー会議後、会議で新たに質疑された事項をメモに追加し依頼者に送付し、依頼者にはQ&Aを作成してもらっている。臨床試験部では、このQ&Aをもとに、ピアレビュー会議での主な質疑事項と、残された問題点をピアレビュー報告書として作成し、Q&Aと共にIRBに上程している。このピアレビュー報告書およびQ&Aは、IRB委員による事前の書類審査の参考資料となるのみならず、実施上の問題点を予め解決することや、実施計画書、治験薬概要書および同意説明文書の疑問点の説明を補うものとしても役立っている。毎月1回行われるIRBは、医学・薬学以外の領域の非医療系委員の参画により、一貫した審査基準に基づく、より高度な倫理的および科学的判断を行う場となっている。

審査を極力減らすべく支援に努めることとした。ピアレビュー導入初年度の平成14年度は7件に1件の割合で再審査となっていた。そこで、IRB委員による事前書類審査の指摘事項をIRB前に治験責任医師に伝え、IRBの席上で回答してもらうこととした。即決を目指すこの方法を取り入れたことにより、平成15年度は、11月までの審査26件で再審査となった申請はなく、順調に推移している。条件付き承認となった場合には、申請者に回答書の提出を求め、回答書をIRB委員長が確認することで承認扱いとしている。契約はIRB承認から打ち合わせをすることが可能であり、IRB後2週間での契約（納入告知書の発行）が可能となっている。図6にピアレビュー資料提出からIRB承認を経て、契約にいたるまでの流れの標準的な所要日数を示す。このような審査手続きの見直しにより、再審査とならなければ資料提出からIRB承認までが約35日となり、当院の以前の所要日数からは、大幅な改善が図られている。

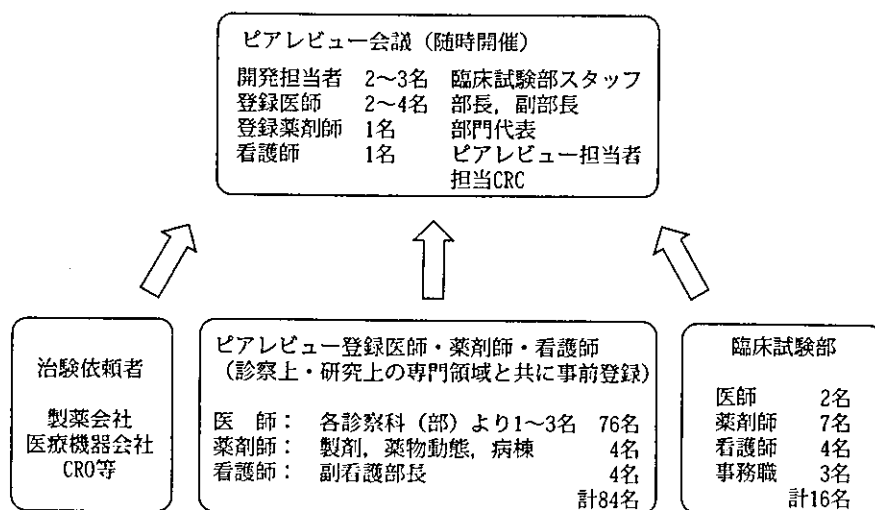


図5 ピアレビュー会議の構成メンバー

3.2 申請から契約までの短縮

スピードという観点からは、審査に関わる手続きの短縮を図った。期間短縮のため、まず臨床試験部では再

4 実施支援体制の強化

当院臨床試験部では、医師、薬剤師、看護師、事務職員からなる14名の専任スタッフと2名の兼任スタッフ

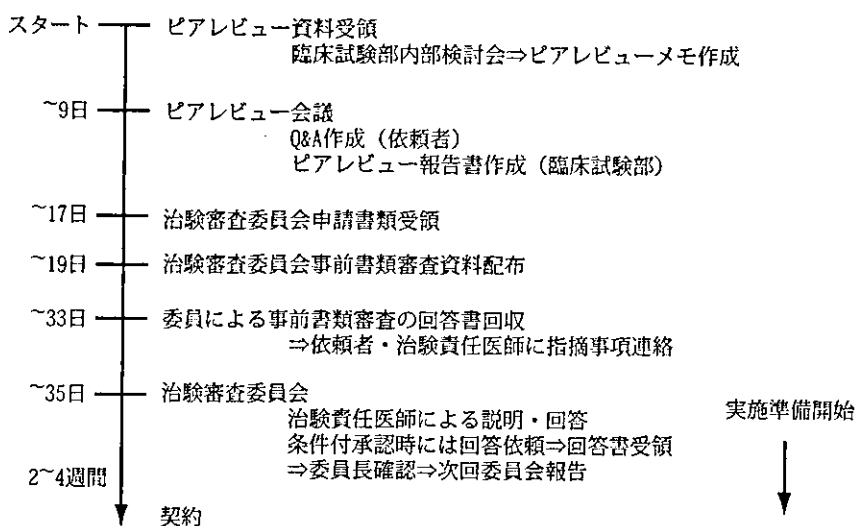


図6 契約までの流れ

<p>(1) 事務部門</p> <ul style="list-style-type: none"> ・治験審査委員会およびピアレビュー会議の開催準備 ・各種申請の案内・受付 ・通知文書の作成・発送 ・必須文書の保管 ・被験者負担軽減費の取りまとめ ・モニタリング・監査の日程調整と準備 ・その他連絡調整等の事務業務 	<p>(3) コーディネーター部門</p> <ul style="list-style-type: none"> ・スタートアップミーティングの開催 ・他部門との調整 ・同意説明補助 ・被験者スケジュール管理 ・症例報告書作成支援 ・モニタリング・監査対応 ・被験者ケア・治験相談窓口対応
<p>(2) 治験薬管理・情報管理部門</p> <ul style="list-style-type: none"> ・治験薬(試験薬)の管理・調剤 ・併用薬の確認・服薬指導 ・治験薬(試験薬)処方箋の発行 ・安全性情報の一次評価・管理 ・ホームページ・データベースの管理 ・実施率等進捗管理 	<p>(4) コンサルテーション部門</p> <ul style="list-style-type: none"> ・自主臨床試験のプロトコル等の作成支援 ・未承認薬等の臨床使用における申請支援 ・試験薬のマスク(コード)化 ・セミナー・講習会の企画 ・その他のコンサルテーション業務

図7 各部門の業務内容

フが、関連部署と連携して、治験の円滑な実施を支援している。臨床試験部は4部門からなるが(図2および7)、実施体制強化のために各部署の業務の見直し、SOPの整備を行ってきた。

事務部門は3名よりなり治験審査委員会およびピアレビュー会議の開催準備、各種申請の案内・受付、通知文書の作成・発送、必須文書の管理、被験者負担軽減費のとりまとめ、モニタリング・監査の日程調整と準備、その他連絡調整等の事務業務を行っている。大学病院は

医師の異動が多いことから、医師が保管すべき必須文書の保管状況に問題があるケースがあったため、これらの必須文書や症例報告書の控え等の保管を開始した。

治験薬管理・情報管理部門は専任3名、兼任1名の薬剤師からなり、治験薬(試験薬)の管理・調剤、併用薬の確認・服薬指導、治験薬(試験薬)処方箋の発行、安全性情報の一次評価・管理、ホームページ・データベースの管理、実施率等進捗管理などを行っている。ホームページには治験の新規・継続申請、安全性情報報告、

モニタリング・監査申し込み等の具体的手順が掲載されており、各種申請書類がダウンロード可能である。

コーディネーター部門は看護師4名、薬剤師2名で構成されている。治験コーディネーター (Clinical Research Coordinator: CRC) は医薬品および医療機器の治験のすべてに配置されている。業務の主なものは、スタートアップミーティングの開催、他診療部門との調整、同意説明補助、被験者スケジュール管理、症例報告書作成支援、モニタリング・監査対応、被験者ケア・治験相談窓口などである。特に、GCPおよびプロトコルの遵守を確認し、逸脱を防止するために、モニタリングに迅速に対応して品質管理につとめている。当院への新規の治験申請数はここ数年大きな増減はないが(図8)、モニタリング対応件数は年毎に増加しており、スペースの拡大および対応人員の増加を図っている。

いるが、当院では自主臨床試験に対してもグローバルスタンダードであるICH-GCPを準用して実施支援を開始した。詳しくは臨床試験部ホームページ (<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/gcp/home/index.htm>)をごらんいただきたい。なお、ピアレビュー会議およびIRBでの審査については、部全体で支援することとしている。

5 被験者への啓蒙活動と情報提供

被験者の啓蒙と被験者募集のための情報提供としては、当院では以前より治験相談窓口を設けるとともに、治験依頼者からの院内ポスターの掲示と治験に関する啓蒙用のチラシの配布を行ってきた。今年度から、さらに治験啓蒙を目的とした院内掲示板を外来受付近くに設置した。また、募集中の治験情報も含めた病院独自のパ

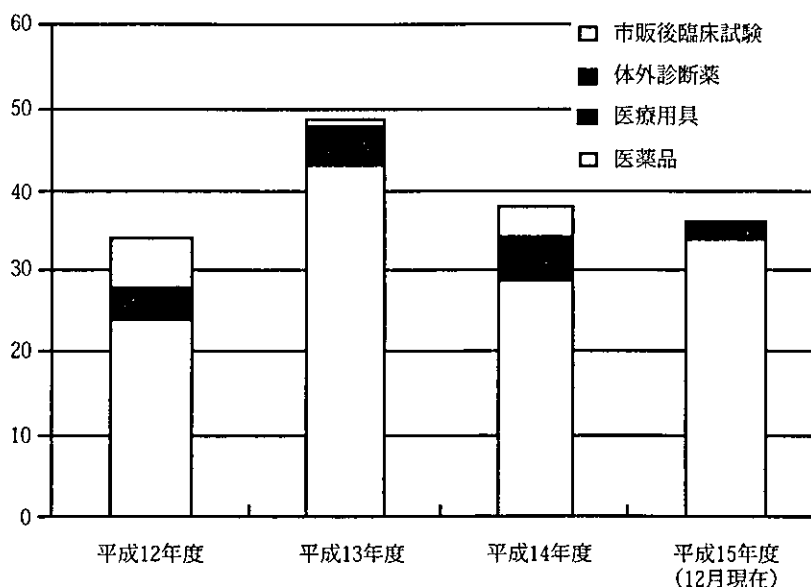


図8 当院における治験新規申請年度別推移

平成14年4月に新設されたコンサルテーション部門は医師1名と副部長からなり、自主臨床試験のプロトコル作成支援、未承認薬等の臨床使用における申請支援、試験薬のマスク(コード)化、セミナー・講習会の企画、その他の臨床試験に関わるコンサルテーション業務を行っている。自主臨床試験の重要性は益々高まって

ンフレットを作成し、各診療科外来での配布を開始している。院外の被験者募集については、当院では対応が遅れていたが、全国治験活性化3カ年計画の「国民理解の浸透と患者の権利の尊重」および「患者の治験参加を支援する施策」をうけて、平成15年9月よりホームページ (<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/gcp/home/index.htm>)

で治験情報提供を開始した。被験者からの問い合わせには、原則として臨床試験部が対応している。契約症例数を責任もって実施するためにも、病院から積極的に情報発信を行うことが重要と考え、可能な限り早い段階より公開内容、方法等の情報提供のあり方について治験依頼者と協議するようにしている。これら情報提供の取り組みに対する効果は、被験者からの問い合わせ、実施率などから客観的に評価することで業務改善に生かすよう努めている。

6 教育

質の高い治験・臨床試験を行うにあたっては、医師および協力者の養成が非常に重要である。当院では自主臨床試験に関する指針、手順書、手引き等を整備し、臨床試験に関するセミナーと医師等申請者向けの講習会を行っている。

6.1 セミナー

臨床試験部が主催で、臨床試験に関わるものの教育および情報交換の場として、平成12年より「臨床試験セミナー」を開催している。第1回が「東大病院における臨床試験のあるべき姿を探る」、第2回は「臨床研究のすすめ」、また、第3回は「グローバル化時代の治験・臨床試験」と題し、学外からは厚生労働省、製薬企業、医療機関等から講師を招いて実施している。以前、対象者は学内外の臨床試験に関わる医師、治験協力者であったが、平成14年度から製薬企業にも広げたため、多数の応募があった。会場の都合で、全員に参加いただけなかったが、全国から約300名にお集まりいただいた。出席者にはアンケート調査にご協力いただき、業務改善に役立てている。

一方、東京大学大学院医学系研究科では、新設されたクリニカルバイオインフォマティクス研究ユニットにより、平成15年度より学内外を対象に臨床試験に関する講義を開始しており、学内からも多くの人が受講している。

6.2 医師のための講習会

臨床試験セミナーが毎年テーマを決めて学内外の治験・臨床試験関係者全般を対象として実施しているのに対して、学内の治験および臨床試験の実施者を対象として倫理的な事項や手続きに関する講習会「東大研究倫理セミナー」を、IRB、医学部倫理委員会、ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会、病院企画情報運営部、病院総合研修センターとの共催で平成15年度より年4回開催することを始めている。ここでは、ヘルシンキ宣言、臨床試験に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針をはじめとする厚生労働省の各種指針、院内の臨床試験に関わる各種規則、臨床試験申請の手続き方法など、治験・臨床試験実施にあたり最低限理解しておくべき事項を取り上げ、講義を行っている。治験や自主臨床試験を含めたすべての臨床試験の新規申請においては、平成16年度分より申請時に分担医師や共同研究者も含めて、講習会を受講していることを条件としている。さらに、既申請者についても、平成15年度中に受講することを義務化している。これらのセミナー・講習会を通して、医師が治験・臨床試験に対する理解を深めることで、質の高い臨床試験の実施が可能となると考えている。

7 治験の実績

新規性のない薬の開発中止、外国データの受け入れ、ブリッジング試験の導入、国内製薬企業の海外先行開発等により国内の治験が減少していることが問題となっている。当院における平成12年度以降の新規の治験申請の年度別推移を図8に示すが、平成12年度が34件、平成13年度が49件、平成14年度が38件、平成15年度(12月までの9ヶ月間)は36件であり、当院においても治験の停滞・空洞化の影響を受け、平成9年の新GCP導入以降は治験の新規申請は必ずしも増えていない。平成15年12月現在、当院では新規・継続を合わせて約80余りの治験が行われており、その内容は多岐にわたっている。契約症例に対する実施率はここ数年約70%で推移している。実施率をさらに向上させるために、実施率をリアルタイムに把握し、毎月IRBに報告

すると共に、治験責任医師にも通知し、注意を喚起することを平成15年より開始した。

8 おわりに

治験の国際化や医師主導の治験の導入にも対応できるように、Quality & Speedをキーワードに支援体制の見直しを行ってきた。また、被験者に対する治験・臨床試験の啓蒙や治験情報の提供の拡大、実施率をさらに向上させるための進捗管理、治験・臨床試験の計画実施者に対する教育研修についても順次進めてきた。

治験の電子システム化は、品質確保とデータ管理の点で優れており、治験の質の向上と業務の効率化に非常に有用であることから、導入を図る必要がある。各種データの取り扱い、情報を伝えるインターフェイス、バリデーションの方法など様々な面での標準化が急がれるところであるが、当院においても、治験の電子システム化へ向けて取り組みを開始した。

また、臨床試験部では自主臨床試験についてもGCPを可能な限り準用し、質の高い研究実施の支援を行ってきたが^{1,2)}、医師主導の治験へも対応すべく準備を進めている。

当院においては、治験の導入についてもコンサルテーションを実施しているので、当院への申請を考慮される場合にはご利用いただきたい。なお、本稿に記載した内容は当院臨床試験部、臨床試験部運営委員会、治験審査委員会が主体となり、医学部倫理委員会等と連携して進めてきたものである。医師主導の臨床試験の指針や手順書等の作成に当たっては、学内外の多くの方から貴重な意見をいただいた。ここに謝辞を申し上げる。

参考文献

- 1) 荒川義弘, 小俣政男 支持組織としての東大病院臨床試験部 一世界に通用する高質・迅速な臨床試験を目指して— 臨床評価 2003 ; 30 : 303-309
- 2) 金井文彦, 荒川義弘, 小俣政男 自主臨床試験の実施計画書作成の手引き (東京大学医学部附属病院版) について 臨床薬理 2003 ; 34 : 101-102

V. 臨床的事項

薬物による耐糖能障害

インターフェロン

Glucose intolerance caused by interferon therapy

金井文彦 小俣政男

Key words : インターフェロン, ウイルス肝炎, インスリン抵抗性, 耐糖能障害, 糖尿病

はじめに

1992年にC型慢性肝炎の治療薬として、インターフェロン α および β が保険適用となり、以来多くの患者に投与されてきた。2001年12月からはリバビリンとインターフェロンの併用療法が保険適用となり、2003年12月には、週1回の投与で治療可能なペグインターフェロンも認可され、従来のインターフェロン単剤治療と比較して奏効率が高まっている。世界標準であるペグインターフェロンとリバビリンの併用療法も、我が国で間もなく承認予定である。また、2002年2月には、インターフェロンの投与回数制限や再投与基準が見直され、6カ月であったインターフェロン投与期限が廃止された。一方、B型肝炎の治療薬として2000年から逆転写酵素阻害剤ラミブジンが保険適用となり、その強力な抗ウイルス作用によりB型肝炎治療の主軸となったが、インターフェロンはいまだ重要な治療の選択肢である。このように、特にC型肝炎に対するインターフェロン療法は、近年、急速な進歩を遂げたわけであるが、より多くの症例に長期間投与されることで、様々な副作用が報告されてきている。

本稿では、ウイルス肝炎に対してインターフェロンを投与する場合、頻度は低いですが、ときに

重篤化する耐糖能障害について述べてみたい。

1. C型肝炎ウイルスと糖尿病

血糖制御における肝臓の役割は重要であり、慢性肝疾患が糖尿病の原因となり得ることは古くより知られている。インスリンには、①筋肉・脂肪組織・肝臓での糖取り込み促進、②肝臓でのグリコーゲン分解と糖新生による糖産生抑制、の働きがある。①の糖取り込み低下は食後血糖の上昇をもたらし、②の抑制不全は空腹時血糖の上昇を招く。慢性肝疾患では、食後血糖値が高値となる場合が多く、①に関してインスリン抵抗性が生じていると考えられる。慢性肝疾患における糖尿病では、一般的に血中のインスリンやCペプチドが高値であるが、①インスリン抵抗性を補うため多量のインスリンが分泌、②肝臓でのインスリン分解の抑制、③門脈圧亢進症によるシャント、が原因として考えられる。Cペプチドは肝臓での分解を受けないため、Cペプチド：インスリンモル比が低下するのも一つの特徴である^{1,2)}。

最近、特にC型肝炎と2型糖尿病の関連が注目されている。Caroniaらによる1,332人の肝硬変患者を対象とした大規模調査では、HCV感染者の23.6%、HBV感染者の9.4%に2型糖尿病が認められた³⁾。我が国の866人の肝炎・肝硬変

¹Fumihiko Kanai, Masao Omata: Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo 東京大学大学院医学系研究科消化器内科

表 1 インターフェロン副作用調査

副作用	発症例数(%)
精神症状(躁うつ病, 分裂病, 痴呆など)	113(1.28)
神経症状(意識消失, 知覚異常, 顔面神経麻痺など)	18(0.20)
間質性肺炎	16(0.18)
甲状腺機能異常(機能亢進, 低下など)	75(0.85)
自己免疫疾患(関節リウマチ, 自己免疫性肝炎など)	22(0.25)
糖尿病あるいはその悪化	23(0.26)
心血管系疾患(ショック, 不整脈など)	11(0.12)
腎障害(ネフローゼ症候群, 急性腎不全など)	6(0.07)
眼疾患(眼底出血, 眼痛など)	30(0.34)
感染症(肺炎, ヘルペス, 膀胱炎など)	7(0.08)
皮膚症状(発疹など)	13(0.15)
その他	2(0.02)
調査症例数	8,810

患者を対象とした調査でも, HCV 感染者の 20.9%, HBV 感染者の 11.9% に 2 型糖尿病が認められた⁴⁾. C 型慢性肝炎では B 型慢性肝炎などその他の炎症を起こす肝炎と比べ, 肝細胞の脂肪化をしばしば伴うことが知られているが, HCV コア蛋白のトランスジェニックマウスでは肝細胞に脂肪沈着が起こることから, HCV 蛋白の直接作用の可能性が示唆されている. C 型肝炎における肝細胞の脂肪化とインスリン抵抗性は, NASH(非アルコール性脂肪性肝炎)と共通の特徴であり, これらの代謝異常が 2 つの疾患の病態と密接に関連している⁵⁾. HCV によるインスリン抵抗性発現の機序として, HCV のコア蛋白が IRS-1/PI3K を介したインスリンシグナル伝達経路をブロックする可能性も最近報告されている^{6,7)}.

2. インターフェロンによる耐糖能障害の発症頻度

インターフェロンによる耐糖能障害の正確な発症頻度は明らかではない. 慢性肝疾患による潜在性糖代謝異常をもつ対象にインターフェロンが投与されていることが, 発症頻度の解析を困難にしている. 最近, 様々なインターフェロン製剤が開発され使用されてきているが, 耐糖能障害の発症頻度が少ないため, 製剤間や併用療法による耐糖能障害の頻度に差があるかは今

のところ不明である.

インターフェロンの副作用の発症頻度を調べた厚生省難治性肝炎調査研究班は, インフルエンザ症状や脱毛など頻度の高い副作用を除く特殊な副作用を報告しているが, インターフェロンを用いた治療により糖尿病が発症したり, 悪化したりする頻度は, 8,810 例中 23 例と 0.26% であった(表 1)⁸⁾. すべての症例で血糖検査が行われていなかったことから, 実際の頻度はこの数字よりも高いと考えられている. 慢性肝炎に対してインターフェロンが使用された場合の海外の報告では, 糖尿病の発症頻度は 0.09-0.7% と幅がある⁹⁾.

これらの耐糖能障害出現報告症例をみると, 肝疾患に耐糖能障害を合併していた症例ではインターフェロン投与後比較的早期に血糖の上昇が起こるのに対し, 耐糖能障害のない症例ではインターフェロン投与後, 数カ月以降に発症するものが多い.

3. インターフェロンによる耐糖能障害発症のメカニズム

a. インスリン抵抗性の増大

健常人にインターフェロンを投与し, 経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)や経静脈的ブドウ糖負荷試験(IVGTT)を行った検討では, 血中インスリンと血糖値の上昇を認めたことから, インタ