

## E. 結論

CHBにおいては、急性肝炎と同様の状態で急性増悪時に増加し、重症化を防いでいると考えられた。

CHCにおいては肝組織における制御性T細胞はインターフェロン治療効果の指標となる可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Migita K, Maeda Y, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Miyazoe S, Nakao K, Yatsuhashi H, Eguchi K, Ishibashi H: Polymorphisms of interleukin-18 in Japanese patients with hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 46:381-386, 2007
- 2) Nagayama Y, Hase W, Motoyoshi Y, Saitoh O, Sogawa R, Nakao K: Distinct responses of two hepatocellular carcinoma cell lines of a similar origin to immunotherapies targeting regulatory or effector T cells. *Oncol Rep* 17:1269-1273, 2007
- 3) Kusaba M, Nakao K, Goto T, Nishimura D, Kawashimo H, Shibata H, Motoyoshi Y, Taura N, Ichikawa T, Hamasaki K, Eguchi K: Abrogation of constitutive STAT3 activity sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-mediated apoptosis. *J Hepatol* 47:546-555, 2007
- 4) Ichikawa T, Nakao K, Hamasaki K, Furukawa R, Tsuruta S, Ueda Y, Taura N, Shibata H, Fujimoto M, Toriyama K, Eguchi K: Role of growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor-binding protein 3 in development of non-alcoholic fatty liver disease. *Hep Intl* 1:287-294, 2007
- 5) Miyaaki H, Ichikawa T, Nakao K, Yatsuhashi H, Furukawa R, Ohba K, Omagari K, Kusumoto Y, Yanagi K, Inoue O,

Kinoshita N, Ishibashi H, Yano M, Eguchi K: Clinicopathological study of nonalcoholic fatty liver disease in Japan: The risk factor for fibrosis. *Liver Int* 2007 in press

6) Hirano K, Ichikawa T, Nakao K, Matsumoto A, Miyaaki H, Shibata H, Eguchi S, Takatsuki M, Ikeda M, Yamasaki H, Kato N, Kanematsu T, Ishii N, Eguchi K: Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporine A, on interferon induced anti-viral protein in human hepatocyte cell. *Liver Transplant* 2007 in press

### 2. 学会発表

- 1) 柴田英貴、市川辰樹、中尾一彦、本吉康英、藤本真澄、川下 浩、宮明寿光、大津留晶、細田洋司、江口勝美. 肝脂肪沈着における Ghrelin-GH axis の検討. 第104回日本内科学会講演会
- 2) 宮明寿光、中尾一彦、江口勝美. NAFLDの線維化進行の危険群の検討～メタボリックシンドロームとの関連を中心に. 第93回日本消化器病学会総会
- 3) 柴田英貴、市川辰樹、中尾一彦、秋山祖久、三馬 聡、本吉康英、楠本浩一郎、藤本真澄、川下 浩、宮明寿光、江口勝美. 糖負荷が過酸化水素誘導性肝細胞死に与える影響. 第43回日本肝臓学会総会 ワークショップ(炎症・細胞死の分子機構からの肝病態へのアプローチ)
- 4) 藤本真澄、市川辰樹、中尾一彦、宮明寿光、川下 浩、江口勝美、曾山明彦、江口晋、兼松隆之、長岡進矢、八橋 弘. B型肝炎関連生体肝移植 recipient における HBV core-related Antigen (crAg) の意義. 第43回日本肝臓学会総会
- 5) 宮明寿光、市川辰樹、中尾一彦、柴田英貴、三馬 聡、秋山祖久、本吉康英、楠本浩一郎、藤本真澄、川下 浩、江口勝美. 慢性C型肝炎の肝組織における制御性T細胞の検討. 第43回日本肝臓学会総会

6) 市川辰樹、中尾一彦、宮明寿光、藤本真澄、柴田英貴、秋山祖久、三馬 聡、濱崎圭輔、鳥山 寛、江口勝美. NAFLD 治療における Metformin + Pioglitazon 併用療法の位置づけ. 第43回日本肝臓学会総会

7) 宮明寿光、中尾一彦、江口勝美. 門脈血栓を有し、治療に難渋したアルコール性肝硬変の1例. 第11・74回日本肝臓学会大会・日本消化器内視鏡学会総会 (門脈圧亢進症: どうするこの症例)

8) 三馬 聡、柴田英貴、秋山祖久、本吉康英、藤本真澄、川下 浩、宮明寿光、田浦直太、市川辰樹、中尾一彦、江口勝美. 肝細胞癌の予後と空腹時血清インスリン、アディポネクチン値の関連. 第11回日本肝臓学会大会

9) 市川辰樹、中尾一彦、宮明寿光、山口 泉、江口 晋、高槻光寿、兼松隆之、江口勝美. 生体肝移植後に発症した白質脳症を伴わないカルシニューリン阻害剤関連小脳失調症の一例. 第43回日本移植学会総会

10) 村上英美、宮明寿光、中尾一彦、市川辰樹、藤本真澄、秋山祖久、小澤栄介、三馬 聡、柴田英貴、竹下茂之、江口勝美、兼松隆之、田島義証. 難治性胸腹水治療における Denver shunt の有用性の検討. 第37回日本肝臓学会西部会

11) 柴田英貴、市川辰樹、中尾一彦、秋山祖久、三馬 聡、藤本真澄、宮明寿光、木下直江、林 徳眞吉、高槻光寿、江口 晋、奥平定之、兼松隆之、江口勝美. 急激な肝萎縮による肝不全に対し生体肝移植術を施行した非硬変性門脈圧亢進症の一例. 第37回日本肝臓学会西部会

12) 小澤栄介、阿比留正剛、福田実可、斐 成寛、立山雅邦、長岡進矢、田浦直太、大畑一幸、小森敦正、矢野公士、八橋 弘、石橋大海、市川辰樹、中尾一彦、江口勝美. 急性肝不全におけるマクロファージ活性化マーカー (フェリチン、ヘムオキシゲナーゼ-1) 測定の定義. 第37回日本肝臓学会西部会

13) 秋山祖久、竹下茂之、小澤栄介、三馬 聡、宮明寿光、柴田英貴、藤本真澄、市川辰樹、

中尾一彦、江口勝美、小林圭子、佐伯武頼. 成人発症2型シトルリン血症に対し、内科的治療を施行中の1例. 第37回日本肝臓学会西部会

14) Shibata H, Ichikawa T, Nakao K, Akiyama M, Miuma S, Motoyoshi Y, Kusumoto K, Fujimoto M, Kawashimo H, Miyaaki H, Eguchi K. Hyper-glycemia accelerates cell death induced by hydrogen peroxide in human hepatocytes. 17th Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL)

15) Miyaaki H, Ichikawa T, Nakao K, Yatsushashi H, Furukawa R, Kusumoto Y, Ohba K, Omagari K, Inoue O, Kinoshita N, Ishibashi H, Yano M, Eguchi K. Clinicopathological study of nonalcoholic fatty liver disease: Risk factor for fibrosis 17th Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL)

16) Nakao K, Kusaba M, Ichikawa T, Miyaaki H, Motoyoshi Y, Shibata H, Eguchi K. Abrogation of constitutive STAT3 activity sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-mediated apoptosis. 58th The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)

17) Miyaaki H, Ichikawa T, Nakao K, Shibata H, Akiyama M, Miuma S, Motoyoshi Y, Fujimoto M, Eguchi K. Differential role of liver-targeted regulatory T cell to hepatitis B and C virus in chronically infected patients. 58th The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

肝硬変に対する治療に関する研究

ヒト肝細胞癌におけるインターフェロン- $\alpha$ 誘導性アポトーシス関連遺伝子の発現

分担研究者 矢野 博久 久留米大学医学部病理学 教授

**研究要旨** 肝癌細胞株HAK-1Bにおいてペグインターフェロン (PEG-IFN)- $\alpha$  2bの作用により変化するアポトーシス及び細胞周期に関連した遺伝子を網羅的にマイクロアレイ法を用いて解析した。その結果、22種類のアポトーシス関連遺伝子と29種類の細胞周期関連遺伝子の発現上昇あるいは低下が確認された。これらの分子のうち、ミトコンドリア系のアポトーシス誘導分子のNoxa、BNIP-3、XAF-1、そしてXAF-1の標的分子でアポトーシスを阻害するXIAP、Death receptorのTRAIL-R1、TRAIL-R2とそのリガンドである TRAILの発現に関して13種類の肝癌細胞株を用いて検討した。その結果、PEG-IFN- $\alpha$  2b処理によりXAF-1のmRNAの発現上昇が全ての細胞株で見られたが、Noxa、BNIP-3、XIAPに関しては、3株ずつで2倍以上の発現上昇を認めたのみであった。蛋白レベルでは、XAF-1とXIAPの発現はPEG-IFN- $\alpha$  2b処理により大部分で逆に低下した。XAF-1が低下しない細胞株は比較的PEG-IFN- $\alpha$  2b誘導性アポトーシス抵抗性であった。XAF-1は、肝癌組織ではmRNAの発現は低下しており、蛋白レベルでは特に低分化型肝癌で低下しており、肝癌細胞のアポトーシス出現と相関が見られた。TRAILのmRNAの発現上昇を11株で、TRAIL-R1、-R2の発現上昇を4株、3株で認めた。蛋白レベルでもTRAILとTRAIL-Rの発現上昇をいくつかの細胞株で認めたが、必ずしもPEG-IFN- $\alpha$  2bのアポトーシス誘導性と関連しなかった。肝癌細胞株の多くは、rTRAILによりアポトーシスが誘導され、PEG-IFN- $\alpha$  2bの前処置によりその感受性が上昇した。HAK-1B株では、TRAIL特異的siRNAを用いた実験によりPEG-IFN- $\alpha$  2bによるアポトーシスがTRAIL/TRAIL-Rを介して誘導されることが証明された。結論として、XAF-1は肝癌細胞のアポトーシス誘導に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、PEG-IFN- $\alpha$  2bによるアポトーシス誘導にTRAIL/TRAIL-R系やその他のメカニズムの関与が示唆された。

A. 研究目的

これまでの我々の検討によりPEG-IFN- $\alpha$  2bを含めた各種IFN製剤によるヒト肝癌細胞株の増殖抑制の機序として、アポトーシス誘導と細胞周期の進行停止を確認している。しかしながら、実際にどのような遺伝子

がこれらの作用発現に関連しているか詳細な検討を行っていない。今回は、ヒト肝癌細胞株HAK-1Bを使用して、cDNA microarray法を用いて、関連する遺伝子を網羅的に解析し、更に、いくつかの関係の深い遺伝子に関して詳細な検討を行った。

## B. 研究方法

① HAK-1B 肝癌細胞を 1,000 IU/mL の PEG-IFN- $\alpha$  2b 添加あるいは非添加で 6、24、48 時間培養し、mRNA を抽出後 cDNA microarray 法により PEG-IFN- $\alpha$  2b 処理により発現上昇あるいは低下したアポトーシス及び細胞周期関連遺伝子を検索した。

② 変化を示した遺伝子のうち、ミトコンドリア系のアポトーシス誘導分子の Noxa、BNIP-3、XAF-1、そして XAF-1 の標的蛋白でアポトーシスを阻害する XIAP、Death receptor の TRAIL-R1、TRAIL-R2 とそのリガンドである TRAIL の発現に関して 13 種類の肝癌細胞株を用いて検討した。すなわち細胞を 1,000 IU/mL の PEG-IFN- $\alpha$  2b 添加あるいは非添加で 72 時間培養し検討を行った。mRNA レベルの検討は、real time PCR で全ての細胞株で行った。蛋白レベルの検討は、SAF-1、XIAP、TRAIL、TRAIL-R1、-R2 に関して FACSscan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) で解析した。

③ ヒト肝癌組織及び非癌部の Noxa、BNIP-3、XAF-1、XIAP の発現を mRNA レベルで real time PCR を用いて検討した。

④ 肝癌及び非癌部組織における XIAP と XAF-1 の発現を免疫組織化学的に検討し、肝癌組織におけるアポトーシスとの関連性について検討した。

⑤ 13 種類の肝癌細胞を、250、1,000 あるいは 4,000 IU/mL の PEG-IFN- $\alpha$  2b 添加あるいは非添加で 48 時間培養し 0.39-100 ng/mL の recombinant TRAIL (rTRAIL) を添加培地と交換し 24 時間後に MTT assay により生細胞数を測定した。

⑥ TRAIL 特異的な siRNA とランダム siRNA を PEG-IFN- $\alpha$  2b 添加あるいは非添加で培養している HAK-1B 細胞に導入し、TRAIL の発現とアポトーシスの出現 (Annexin-V の発現) を FACSscan で検討した。

## C. 研究結果

① 22 種類のアポトーシス関連遺伝子と 29 種類の細胞周期関連遺伝子の発現上昇あるいは発現低下が確認された。5 倍以上の発現上昇を示したのは、TRAIL、XAF-1、p16 であった。1-2 倍の上昇を TRAIL-R1、-R2、Bak、caspase-3、-8、Smac/DIABLO 等、2-4 倍の上昇を Noxa、BNIP-3、caspase-7 等に認めた。

② 上記の①の遺伝子のうちミトコンドリア系のアポトーシス誘導経路の関連分子である Noxa、BNIP-3、XAF-1、そして XAF-1 の標的分子でアポトーシスを阻害する XIAP についてまず検討を行った。PEG-IFN- $\alpha$  2b 処理により XAF-1 の mRNA の発現上昇が全ての細胞株で見られたが、Noxa、BNIP-3、XIAP に関しては、3 株ずつで 2 倍以上の発現上昇を認めたのみであった。蛋白レベルでは、XAF-1 と XIAP の発現は PEG-IFN- $\alpha$  2b 処理によりそれぞれ 8 株と 11 株で低下したが、XAF-1 が低下しない細胞株、及び XAF-1 が低下しても XIAP の発現が上昇した細胞株は、PEG-IFN- $\alpha$  2b 誘導性アポトーシスに比較的抵抗性であった。

③ ヒト肝癌組織は、非癌部に比べ XIAP、XAF-1、Noxa、BNIP-3 すべて発現が低下していたが、Noxa が最も低く、XAF-1、XIAP、BNIP-3 の順であった。

④ ヒト肝癌組織及びその非癌部組織の XIAP と XAF-1 の発現検討では、非癌部・癌部ともにいずれの分子も発現を認めた。XAF-1 は、門脈域のアポトーシスが生じる部分で特に発現が強く見られた。癌部での発現に関しては、XIAP は、肝癌の分化度に関係なく一定の発現を認めたが、XAF-1 は、低分化型肝癌で発現の低下を認めた。ヒト肝癌組織のアポトーシスは、分化度の低下とともに減少し、XAF-1 の発現と有意な相関性を示した。

⑤ TRAIL の mRNA の発現上昇を 11 株で

認め、TRAIL-R1、-R2の発現上昇を4株、3株で認めた。蛋白レベルでもTRAILの発現上昇を9株で、TRAIL-R1、-R2の発現上昇を10と6株で認めたが、必ずしもPEG-IFN- $\alpha$  2bのアポトーシス誘導性と関連しなかった。

⑥肝癌細胞株の6株は、rTRAILによるアポトーシス誘導作用に感受性が高く、5株では、PEG-IFN- $\alpha$  2bの前処置により感受性となった。また、11株でPEG-IFN- $\alpha$  2bの前処置により感受性が上昇したが、2株は比較的感受性が乏しかった。

⑦HAK-1B株では、TRAIL特異的siRNAを用いた実験によりPEG-IFN- $\alpha$  2bによるTRAILの発現抑制とそれに伴うアポトーシスの減少が認められ、HAK-1B株におけるPEG-IFN- $\alpha$  2bによるアポトーシスはTRAIL/TRAIL-Rを介して誘導されることが証明された。

#### D. 考察

PEG-IFN- $\alpha$  2bは、HAK-1B株のみではなく多くの肝癌細胞株でXAF-1とTRAILの発現を上昇させることが明らかになった。しかし、XAF-1やその標的分子であるXIAPに関して蛋白レベルでは、PEG-IFN- $\alpha$  2bは多くの肝癌細胞株で発現の低下が見られた。その意義とPEG-IFN- $\alpha$  2b誘導性アポトーシスの関連性に関しては今後更なる検討が必要であろう。XAF-1は、肝癌組織、特に低分化型肝癌組織で発現が低下しており、肝癌細胞のアポトーシス出現に重要な作用をしている可能性が明らかになった。今後治療的な観点からも更なる検討が望まれる。

肝癌細胞株の大部分は、TRAILに対して感受性が高く、また、PEG-IFN- $\alpha$  2b誘導性アポトーシスの中には、TRAIL/TRAIL-R系を介して誘導される細胞があることが明らかとなった。しかし、他のアポトーシス誘導メカニズムの存在が疑われ、更なる検討が必要である。また、rTRAILが今後の肝癌の治

療に応用可能かどうかその点に関しても検討が必要であろう。

#### E. 結論

XAF-1は肝癌細胞のアポトーシス誘導に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、PEG-IFN- $\alpha$  2bによるアポトーシス誘導にTRAIL/TRAIL-R系やその他のメカニズムの関与が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Sakemi, R, Yano H, Ogasawara S, Akiba J, Nakashima O, Fukahori S, Michio S, and Kojiro M. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and XIAP-associated factor-1 expression and their relationship to apoptosis in human hepatocellular carcinoma and non-carcinomatous liver tissues *Oncology Reports* 18:65-70, 2007.

2) Ogasawara S, Yano H, Momosaki S, Akiba J, Nishida N, Kojiro S, Moriya F, Ishizaki H, Kuratomi K, Kojiro M. Growth inhibitory effects of IFN- $\beta$  on human liver cancer cells *in vitro* and *in vivo* *Journal of Interferon & Cytokine Research* 27:507-516, 2007.

3) Oie S, Ono M, Fukushima H, Hosoi F, Yano H, Maruyama Y, Kojiro M, Terada T, Hirano K, Kuwano M, Yamada Y. Alteration of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by IFN- $\alpha$  affects the antiproliferative effects of 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma cells *Mol Cancer Ther* 6: 2310-8, 2007.

##### 2. 学会発表

なし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝硬変に対する治療に関する研究

平成19年度

総括研究報告書  
分担研究報告書  
(2/2)

論 文 集

主任研究者

八 橋 弘

平成 20(2008)年 3 月

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
八橋 弘 中尾瑠美子, 福田実可, 田浦直太, 矢野公士, 阿比留正剛, 石橋大海	HCV-肝硬変への治療-, C型肝硬変と抗ウイルス療法	犬山シンポジウム記録刊行会	B型, C型肝炎治療における新たな問題点	メディカル・ジャーナル社	東京	2008	130-136

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyaaki H, Ichikawa T, Nakao K, Yatsuhashi H, Furukawa R, Ohba K, Omagari K, Kusumto Y, Yanagi K, Inoue O, Kinoshita N, Ishibashi H, Yano M, Eguchi K	Clinicopathological study of nonalcoholic fatty liver disease in Japan: the risk factor for fibrosis	Liver Int	28(4)	519-24	2008
Takii Y, Abiru S, Fujioka H, Nakamura M, Komori A, Ito M, Taniguchi K, Daikoku M, Meda Y, Ohata K, Yano K, Shimoda S, Yatsuhashi H, Ishibashi H, Migita K.	Expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human hepatocellular carcinoma.	Liver Int.	27(7)	989-96	2007
Shinkai N, Tanaka Y, Ito K, Mukaide M, Hasegawa I, Asahina Y, Izumi N, Yatsuhashi H, Orito E, Joh T, Mizokami M.	Influence of hepatitis B virus X and core promoter mutations on hepatocellular carcinoma among patients infected with subgenotype C2.	J Clin Microbiol.	45(10)	3191-7	2007
Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, Okanoue T, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Suzuki F, Kobayashi M, Chayama K, Imamura M, Yotsuyanagi H, Nakaoka S, Maki N, Kawata S, Kumada H, Iino S, Kiyosawa K.	Low serum level of hepatitis B core-related antigen indicates unlikely reactivation of hepatitis after cessation of lamivudine therapy.	Hepatol Res.	37(8)	661-6	2007
Tanikawa K, Kage M, Komuta M, Nakashima O, Yano H, Yatsuhashi H, Kojiro M.	Pathological analysis of oxyphilic granular hepatocytes and hepatocellular mitochondria in chronic hepatitis C.	Hepatol Res.	37(6)	425-32	2007
Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Nakamura M, Yatsuhashi H, Kimura H, Ishibashi H, Eguchi K.	Toll-like receptor expression in lupus peripheral blood mononuclear cells.	J Rheumatol.	34(3)	493-500	2007
八橋 弘	肝癌撲滅をめざしたウイルス肝炎の治療戦略	Medical Practice	24(4)	594-601	2007

八橋 弘, 浜田るみこ, 福田実可, 矢野公士, 阿比留正剛	C型肝炎ウイルス抗体キット『Eテスト「TOSOH」II (HCVAb)』の基礎的および臨床的検討	医学と薬学	58(3)	459-466	2007
八橋 弘, 長岡進矢	特集/B型肝炎の新たな治療展開, B型肝炎の自然史・病態理解, B型肝炎の自然経過	内科	100(4)	635-638	2007
八橋 弘, 長岡進矢, 阿比留正剛	HBVの自然経過と治療方針について	日本消化器病学会雑誌	104(10)	1450-1458	2007
西浦哲哉, 渡辺秀明, 河野義彦, 伊東正博, 長岡進矢, 大畑一幸, 矢野公士, 藤本俊史, 八橋 弘, 松岡陽治郎, 石橋大海	B型肝炎ウイルス関連慢性肝疾患における肝USスコアを用いた肝癌発生率の推定	肝臓	48(6)	264-271	2007
熊田博光, 清澤研道, 小林万利子, 小山富子, 田中榮司, 中尾瑠美子, 松本晶博, 安田清美, 八橋 弘, 吉澤浩司, 飯野四郎	高感度HCV抗原測定用試薬「ARCHITECT HCV Ag」の基礎的・臨床的評価	消化器科	45(4)	454-466	2007
八橋 弘	肝癌進展抑制を目的とした病診連携の重要性—高齢化する患者とその発癌率	日医雑誌	136(10)	CM II 13-16	2008
Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kotoh K, Kato M, Takayanagi R, Nakamuta M.	NIM811, a nonimmunosuppressive cyclosporine analogue, suppresses collagen production and enhances collagenase activity in hepatic stellate cells.	Liver Int.	27(9)	1273-81	2007
Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Kohjima M, Aishima S, Nakamuta M, Fukui Y, Takayanagi R, Enjoji M.	Methylprednisolone injection via the portal vein suppresses inflammation in acute liver failure induced in rats by lipopolysaccharide and d-galactosamine.	Liver Int.	27(10)	1342-8	2007
Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, Yada M, Yada R, Harada N, Takayanagi R, Nakamuta M.	Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease.	Int J Mol Med.	20(3)	351-8	2007
Nakamuta M, Kotoh K, Enjoji M, Kajiwara E, Shimono J, Masumoto A, Maruyama T, Furusyo N, Nomura H, Sakai H, Takahashi K, Azuma K, Shimoda S, Tanabe Y, Hayashi J.	Effects of lamivudine on serum albumin levels correlate with pretreatment HBV-DNA levels in cirrhotic patients	Comp Hepatol.	6:3		2007
Kotoh K, Nakamuta M, Fukushima M, Morizono S, Enjoji M, Nawata H.	Fertile females with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) have higher levels of ALT than postmenopausal females: implications for the influence of fertility on NAFLD.	Hepatogastroenterology.	54(73)	224-8	2007



Yoshimoto T, Kotoh K, Horikawa Y, Kohjima M, Morizono S, Yamashita S, Enjoji M, <u>Nakamuta M.</u>	Decreased portal flow volume increases the area of necrosis caused by radio frequency ablation in pigs.	Liver Int.	27(3)	368-72	2007
Tanaka Y, Mukaide M, Orito E, Yuen MF, Ito K, Kubanov F, Sugauchi F, Asahina Y, Izumi N, <u>Kato M.</u> Lai CL, Ueda R, Mizokami M.	Specific mutations in enhancer II/core promoter of hepatitis B virus subgenotypes C1/C2 increase the risk of hepatocellular carcinoma.	J Hepatol	45	646-653	2006
Itose I, Kanto T, Inoue M, Miyazaki M, Miyatake H, Sakakibara M, Yakushijin T, Oze T, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Katayama K, <u>Kato M.</u> Hayashi N.	Involvement of dendritic cell frequency and function in virological relapse in pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients.	J Med Virol	79	511-521	2007
Koike K, Kikuchi Y, <u>Kato M.</u> Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H.	Prevalence of hepatitis B virus infection in Japanese patients with HIV.	Hepatol Res	38(3)	310-4	2008
Kurashige N, Hiramatsu N, Ohkawa K, Oze T, Inoue Y, Kurokawa M, Yakushijin T, Igura T, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Tamura S, Kasahara A, Oshita M, Hijioka T, Katayama K, Yoshihara H, Hayashi E, Imai Y, <u>Kato M.</u> Hayashi N.	Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine.	Hepatol Res			In press
Kanda A, Takehara T, Ohkawa K, <u>Kato M.</u> Tatsumi T, Miyagi T, Sakamori R, Yamaguchi S, Uemura A, Kohga K, Sasakawa A, Hikita H, Kawamura K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N.	Early emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus in a patient with hepatitis B virus/human immunodeficiency virus coinfection	Hepatol Res			In press
<u>加藤道夫</u>	B型慢性肝炎に対するインターフェロン治療 現況と今後の展望	医学のあゆみ	223(2)	153-156	2007
Ito K, Tanaka Y, <u>Kato M.</u> Fujiwara K, Sugauchi F, Sakamoto T, Shinkai N, Orito E, Mizokami M.	Comparison of complete sequences of hepatitis B virus genotype C between inactive carriers and hepatocellular carcinoma patients before and after seroconversion.	J Gastroenterol.	42(10)	837-844	2007

熊田博光、豊田成司、泉並木、岡上武、伊藤義人、加藤道夫、飯野四郎	HCV RNA定量キット コバスタqManHCV「オート」の検討   コバスタqManHCV「オート」に関する共同研究：中間報告	医学と薬学	58(4)	595-605	2007
Hiramatsu N, Kurashige N, Oze T, Takehara T, Tamura S, Kasahara A, Oshita M, Katayama K, Yoshihara H, Imai Y, <u>Kato M</u> , Kawata S, Tsubouchi H, Kumada H, Okanou T, Kakumu S, Hayashi N.	Early decline of hemoglobin can predict progression of hemolytic anemia during pegylated interferon and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C.	Hepatol Res.	38(1)	52-59	2008
加藤道夫	HBe抗原陽性例に対する治療	Expert Opinion on Hepatitis B	12	10-13	2007
矢倉道泰、田中晃久、井利雅信、上司裕史	肝細胞癌の年代別発生傾向	肝臓	48	598-603	2007
T. Hatakeyama, C. Noguchi, N. Hiraga, N. Mori, M. Tsuge, M. Imamura, S. Takahashi, Y. Kawakami, Y. Fujimoto, H. Ochi, H. Abe, T. Maekawa, H. Kawakami, H. Yatsuji, Y. Aisaka, <u>H. Kohno</u> , S. Aimitsu, K. Chayama	Serum HBV RNA is a Predictor of Early Emergence of the YMDD Mutant in Patients Treated with Lamivudine	Hepatology	45	1179-1186	2007
Satoh T, Masumoto A.	Accordion Index: A new tool for the prediction of the efficacy of peg-interferon-alpha-2b and ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C.	Hepatol Res.	38	315-318	2008
Nagayama Y, Hase W, Motoyoshi Y, Saitoh O, Sogawa R, <u>Nakao K</u>	Distinct responses of two hepatocellular carcinoma cell lines of a similar origin to immunotherapies targeting regulatory or effector T cells	Oncol Rep	17(5)	1269-1273	2007
Ichikawa T, <u>Nakao K</u> , Hamasaki K, Honda T, Shibata H, Akahoshi M, Eguchi S, Takatsuki M, Kanematsu T, Eguchi K	Clearance of hepatitis C virus after living-donor liver transplantation in spite of residual viremia on end date of interferon therapy before transplantation	World J Gastroenterol	13(30)	4149-4151	2007
Kusaba M, <u>Nakao K</u> , Goto T, Nishimura D, Kawashimo H, Shibata H, Motoyoshi Y, Taura N, Ichikawa T, Hamasaki K, Eguchi K	Abrogation of constitutive STAT3 activity sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-mediated apoptosis	J Hepatol	47(4)	546-555	2007
Ichikawa T, <u>Nakao K</u> , Hamasaki K, Furukawa R, Tsuruta S, Ueda Y, Taura N, Shibata H, Fujimoto M, Toriyama K, Eguchi K	Role of growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor-binding protein 3 in development of non-alcoholic fatty liver disease	Hepatol Int	1(2)	287-294	2007

Yamaguchi I, Ichikawa T, <u>Nakao K</u> , Hamasaki K, Hirano K, Eguchi S, Takatsuki M, Kawasita Y, Kanematsu T, Eguchi K	Cerebellar ataxia in a patient receiving calcineurin inhibitors after living donor liver transplantation: A case report	Transplant Proc	39(10)	3495-3497	2007
Hirano K, Ichikawa T, <u>Nakao K</u> , Matsumoto A, Miyaaki H, Shibata H, Eguchi S, Takatsuki M, Ikeda M, Yamasaki H, Kato N, Kanematsu T, Ishii N, Eguchi K	Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporine A, on interferon induced anti-viral protein in human hepatocyte cell	Liver Transpl.	14(3)	292-8	2008
Sakemi R, <u>Yano H</u> , Ogasawara S, Akiba J, Nakashima O, Fukahori S, Sata M, Kojiro M.	X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and XIAP-associated factor-1 expressions and their relationship to apoptosis in human hepatocellular carcinoma and non-cancerous liver tissues.	Oncol Rep	18	65-70	2007
Ogasawara S, <u>Yano H</u> , Momosaki S, Akiba J, Nishida N, Kojiro S, Moriya F, Ishizaki H, Kuratomi K, Kojiro M.	Growth Inhibitory Effects of IFN- $\beta$ on Human Liver Cancer Cells In Vitro and In Vivo.	J Interferon Cytokine Res	27	507-16	2007
Oie S, Ono M, Fukushima H, Hosoi F, <u>Yano H</u> , Maruyama Y, Kojiro M, Terada T, Hirano K, Kuwano M, Yamada Y.	Alteration of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by IFN- $\alpha$ affects the antiproliferative effects of 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma cells	Mol Cancer Ther	6	2310-8	2007
<u>Yano H</u> , Basaki Y, Oie S, Ogasawara S, Momosaki S, Akiba J, Nishida N, Kojiro S, Ishizaki H, Moriya F, Kuratomi K, Fukahori S, Kuwano M, Kojiro M	Effects of IFN- $\alpha$ on $\alpha$ -fetoprotein expressions in hepatocellular carcinoma cells.	J Interferon Cytokine Res	27	231-238	2007
Ishizaki H, <u>Yano H</u> , Tsuneoka M, Ogasawara S, Akiba J, Nishida N, Kojiro S, Fukahori S, Moriya F, Matsuoka K, Kojiro M.	Overexpression of the myc target gene Mina53 in advanced renal cell carcinoma.	Pathol Int	57	672-80	2007
Fukahori, S, <u>Yano H</u> , Tsuneoka M, Tanaka Y, Yagi M, Kuwano M, Tajiri T, Taguchi T, Tsuneyoshi M, and Kojiro M	Immunohistochemical expressions of Cap43 and Mina53 protein in neuroblastoma.	J Ped Surg	42	1831-1840	2007
矢野博久、神代正道	インターフェロンによる肝発癌抑制機序に関する基礎的研究	久留米医学会誌	70	109-117	2007
矢野博久、神代正道	肝細胞癌に対するインターフェロンの効果-基礎的検討から	日本消化器病学会雑誌	104	644-653	2007

# 1. C型肝硬変と抗ウイルス療法

国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター

八橋 弘, 中尾留美子, 福田 実可, 田浦 直太, 矢野 公士, 阿比留正剛, 石橋 大海

## 成績

### 1. C型慢性肝炎, 肝硬変に対するペグインターフェロン (PegIFN) とリバビリン (RBV) 併用療法治療成績

厚生労働科学研究費補助金 (肝炎等克服緊急対策研究事業) 肝硬変に対する治療に関する研究班 (主任研究者: 八橋 弘: 長崎医療センター) では PegIFN と RBV 併用療法の治療成績, 治療効果に関わる因子, 治療効果予測に関する解析を行っている。本研究班登録症例の現時点での成績を紹介

する。

2004年12月から2006年12月までの期間, 26の国立病院機構肝疾患専門医療施設にて1,098例 (HCV I型 822例, II型 261例) のC型慢性肝炎症例 (肝硬変例を含む) にPegIFNとRBV併用療法が導入された (図1)。I型822例の平均年齢は56.6歳 (17~79歳), 性別では男性456例 (55%), 女性366例 (45%)。治療前に肝生検が施行された618例中, F0-2は計426例 (69%), F3-4は192例 (31%)であった。HCV II型 261例の平均年齢は52.2歳 (22~77歳), 性別では男性127例

施設名	合計
大阪医療	228
長崎医療	111
九州医療	99
呉医療	66
京都医療	64
小倉	51
大阪南医療	46
東京	45
金沢医療	43
大分医療	42
災害医療	35
国際医療	35
横浜医療	34
熊本医療	31
仙台医療	26
西埼玉中央	26
名古屋医療	26
相模原	20
中信松本	18
東京医療	16
埼玉医療	11
岡山医療	7
米子医療	6
西札幌	4
善通寺	4
別府医療	4
合計	1,098

I型 (n=822): 男性 456 (55%), 女性 366 平均年齢 56.6 (17-79) F0-2: 426, F3-4: 192 (31%)  
 II型 (n=261): 男性 127 (49%), 女性 134 平均年齢 52.2 (22-77) F0-2: 123, F3-4: 44 (26%)

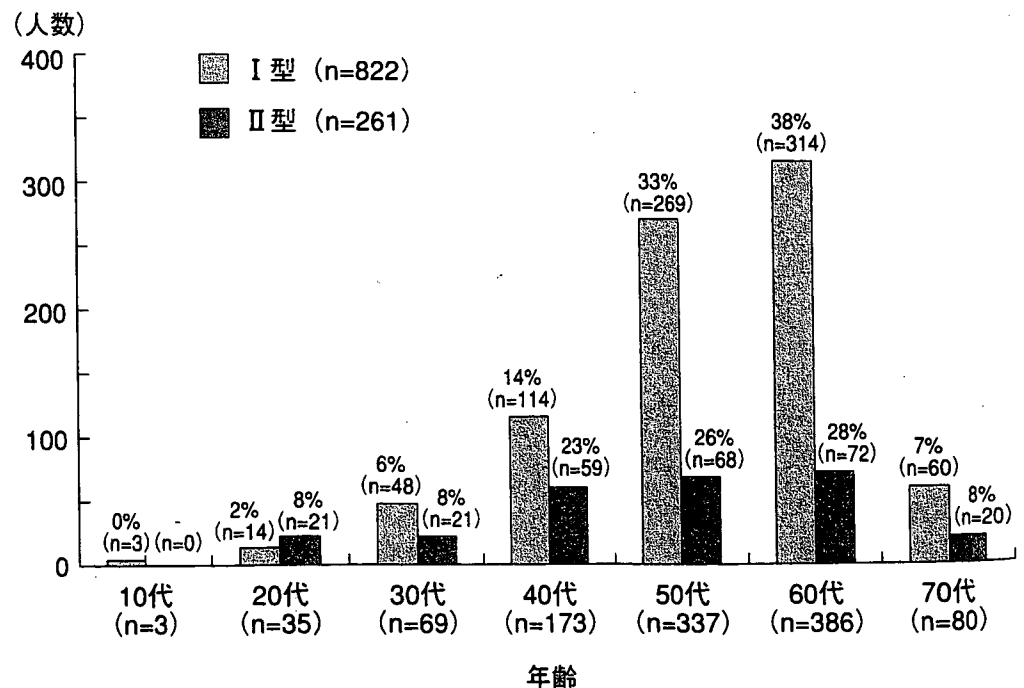


図1 Peg-IFN + RBV 治療例の年齢分布 (genotype別) (2004年12月~2006年12月導入症例, n=1,083)

		SVR率	24週未満で 治療中止	24週以上48週未満 で治療中止	48週以上の 治療
A群：	全症例 に対して	167/450 (37%)	0/85 (0%)	+ 19/96 (20%)	+ 148/269 (55%)
B群：	24週以上投与 例に対して	167/365 (46%)		19/96 (20%)	+ 148/269 (55%)
C群：	48週以上投与 例に対して	148/269 (55%)			148/269 (55%)

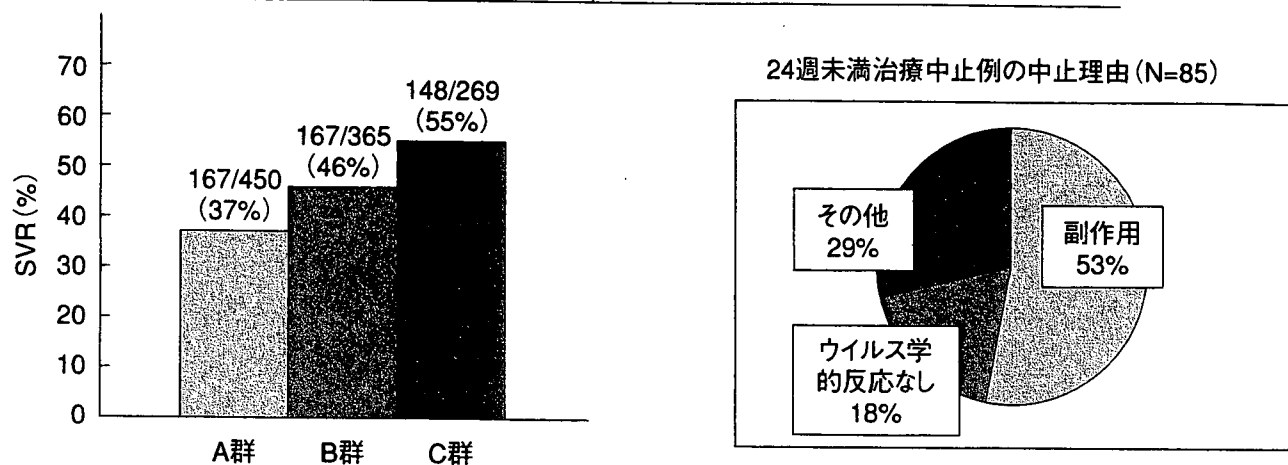


図2 I型・high Peg-IFN+PBV治療例のSVR率 (PP解析) と24未満治療中止例での中止理由

(49%), 女性134例 (51%)。治療前に肝生検が施行された167例中, F0-2は計123例 (74%), F3-4は44例 (26%)であった。

I型822症例中, 治療前ウイルス量が100 KIU/ml以上の高ウイルス症例で, なおかつ2007年1月の時点で治療効果判定が可能であった450例で解析を行った。450例中, 24週間未満に治療を中断した85例では Sustained Virological Response (SVR) は1例もなく, 24週間以上48週間未満に治療を中断した96例中19例 (20%) がSVRと, とともに低いSVR率であったが, 48週間以上治療を行った269例中148例 (55%) がSVRとなった。

治療終了後24週経過した450例でのSVR (Sustained Viral Response) 率を計算すると, 450例全体 (A群) ではその中の167例 (37%) がSVRに, 450例のうち24週間未満に治療を中断した85例を除いた365例 (B群) 中167例 (46%) がSVRに, 450例から24週間未満に治療を中断した85例と24週間以上48週間未満に治療を中止し

た96例を合わせて除外した48週以上投与した269例 (C群) 中148例 (55%) がSVRとなった (図2)。24週間未満に治療を中断した8例での治療中断の理由は, 副作用が53%, ウイルス学的な反応がない18%, その他の理由29%であった。

代表的な治療効果予測因子と治療効果 (SVR) との関連 (図3, 4) に関する検討では, 性差, 治療前HCV Core抗原量ではSVR率に差は認められなかったが, 年齢, 治療中の効果予測因子であるEVR (Early Viral Response: 治療12週目の血中HCV-RNA陰性化) の有り無し, 肝線維化の程度ではSVR率で有意差を認めた。

SVRに關与する因子の検討では, 宿主因子 (年齢, 性別, 体重, 白血球数, 好中球数, Hb値, 血小板数, ALT値, 初回再治療の有無, 肝硬変の有無), ウイルス因子 (HCV-RNA量: アンブコアハイレンジ法), 薬剤因子 (治療期間, Peg-IFN  $\alpha$  2b (m/kg) の開始量, Ribavirin (mg/kg) の開始量) を変数として用いて単変量, 多変量解析を行ったところ, 単変量解析では, 年齢, 白血球

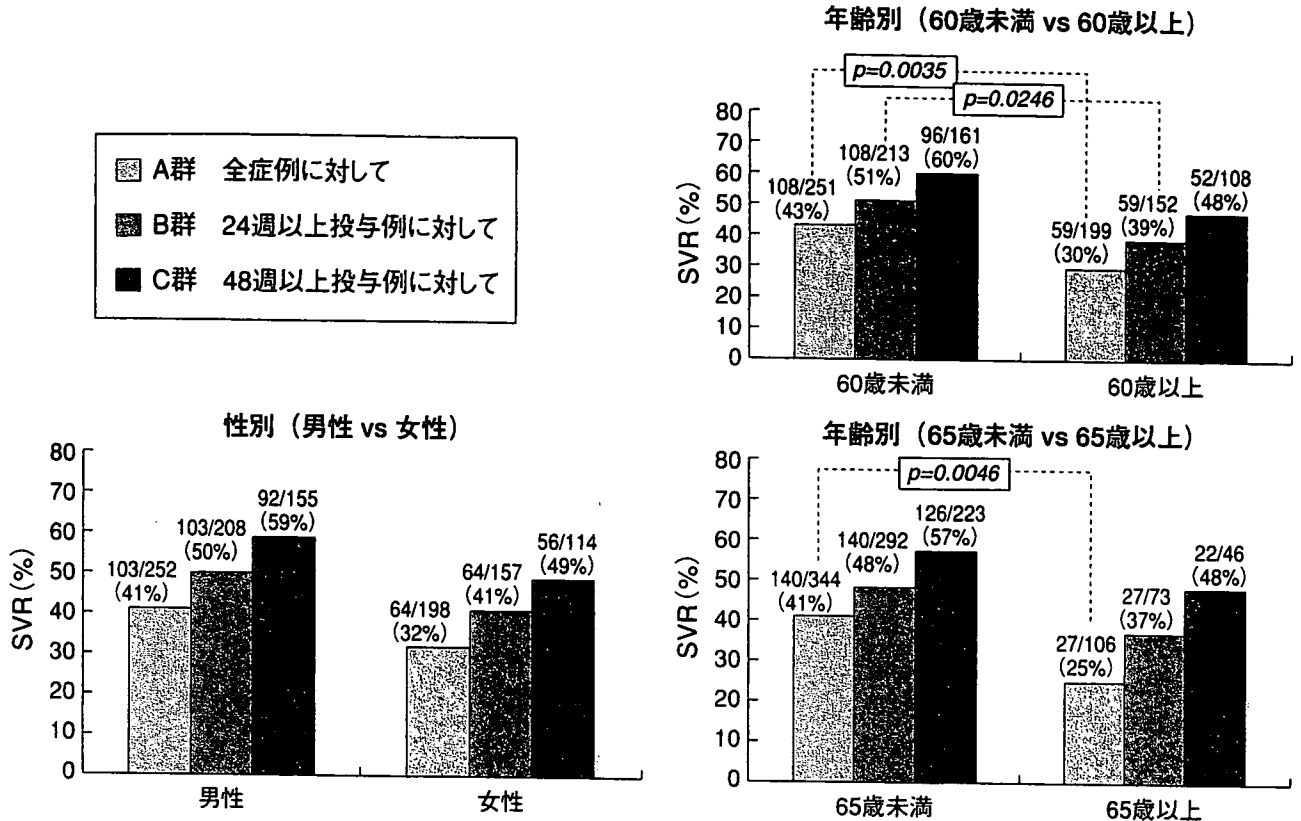


図3 I型・high Peg-IFN + RBV治療例SVR率 (PP解析)

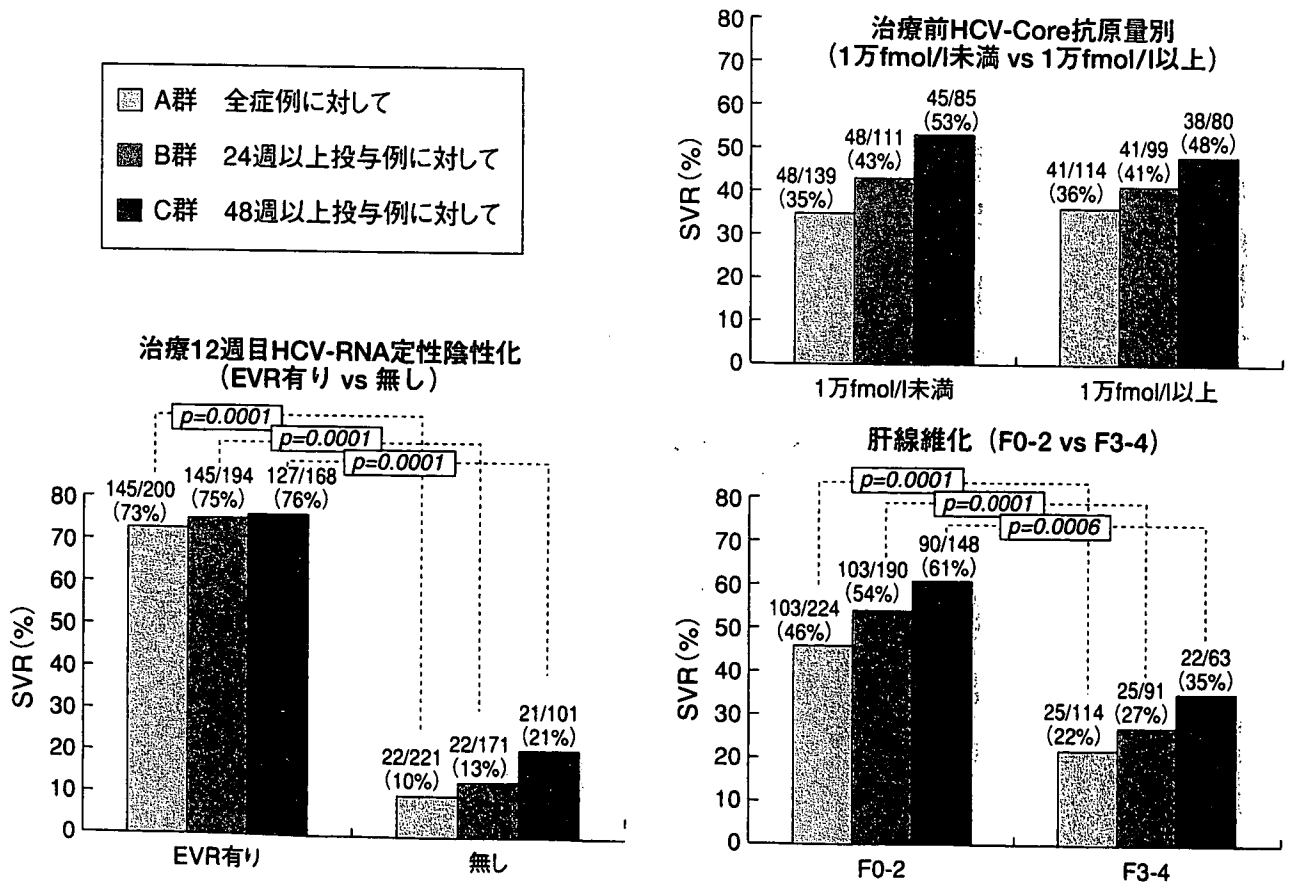


図4 I型・high Peg-IFN + RBV治療例SVR率 (PP解析)

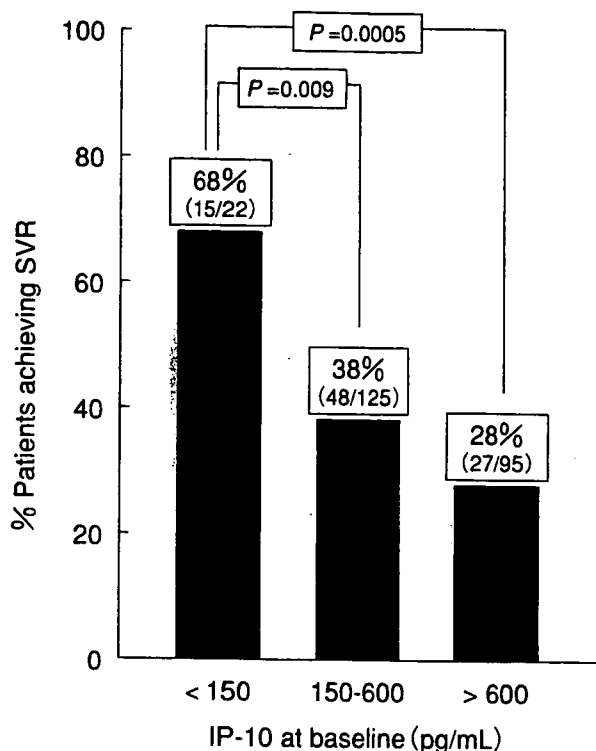


図5 治療前血中IP-10値と治療効果との関係

肝硬変に対する治療研究班登録症例 Peg-IFN/RBV併用療法を施行した242例

数、血小板数、肝硬変の有無、治療期間、Peg-IFN  $\alpha$  2b (m/kg) の開始量、Ribavirin (mg/kg) の開始量、の7因子が有意となった。さらに、その7因子で多変量解析を行ったところ、治療期間、血小板数、肝硬変の有無の3つが有意な因子として抽出された。

以上まとめると、HCV I型高ウイルス例でのPeg-IFNとRBV併用療法の治療成績には、1) 治療期間、2) 血小板数、3) 肝硬変の有無が大きく関与していると考えられる。血小板数と肝硬変の因子は、ともに肝線維化が高度に進展していることを意味している。HCV I型高ウイルス症例に対するPeg-IFNとRBV併用療法においても肝線維化進展例は難治例と考えられた。また、治療期間によって、SVR率の歴然とした差を認めたことから、HCV I型高ウイルス症例に対する本治療では、十分な治療期間が必要であることをあらためて再確認した。

## 2. HCV I型の高ウイルス症例に対するPeg-IFNとRBV併用療法の治療効果と血中IP-10値に

### 関する検討—IFNシグナルとの関連—

IP-10は、IFN  $\gamma$  によって誘導されるケモカイン (CXCL10) であり、健常者に比較してC型慢性肝炎患者において有意に高いことが知られている。2006年、C型慢性肝炎に対するPeg-IFNとRBV併用療法の治療効果と血中IP-10値には密接な関係があることが欧米で相次いで報告され注目されている<sup>1-3)</sup>。

今回、日本人を対象として、血中IP-10 (CXCL10) 濃度とPeg-IFNとRBV併用療法の治療効果との関連について検討した。健常者40名とHCV 1b感染者92名でのIP-10値の平均値 (±SD) は、前者が97.9 (±24.9) pg/ml、後者では、543.9 (±297.4) pg/mlであり、HCV 1b感染者では非感染者に比較して有意に高値であった ( $p < 0.0001$ )。Peg-IFNとRBV併用療法の治療効果と血中IP-10値との関連について242例 (SVR 90例、Non-SVR 152例) で検討した。SVR例での中央値は、417 (197~752) pg/ml、Non-SVR例では565 (293~565) pg/mlと、SVR例ではNon-SVR例に比して有意に低い値 ( $p = 0.018$ ) であっ

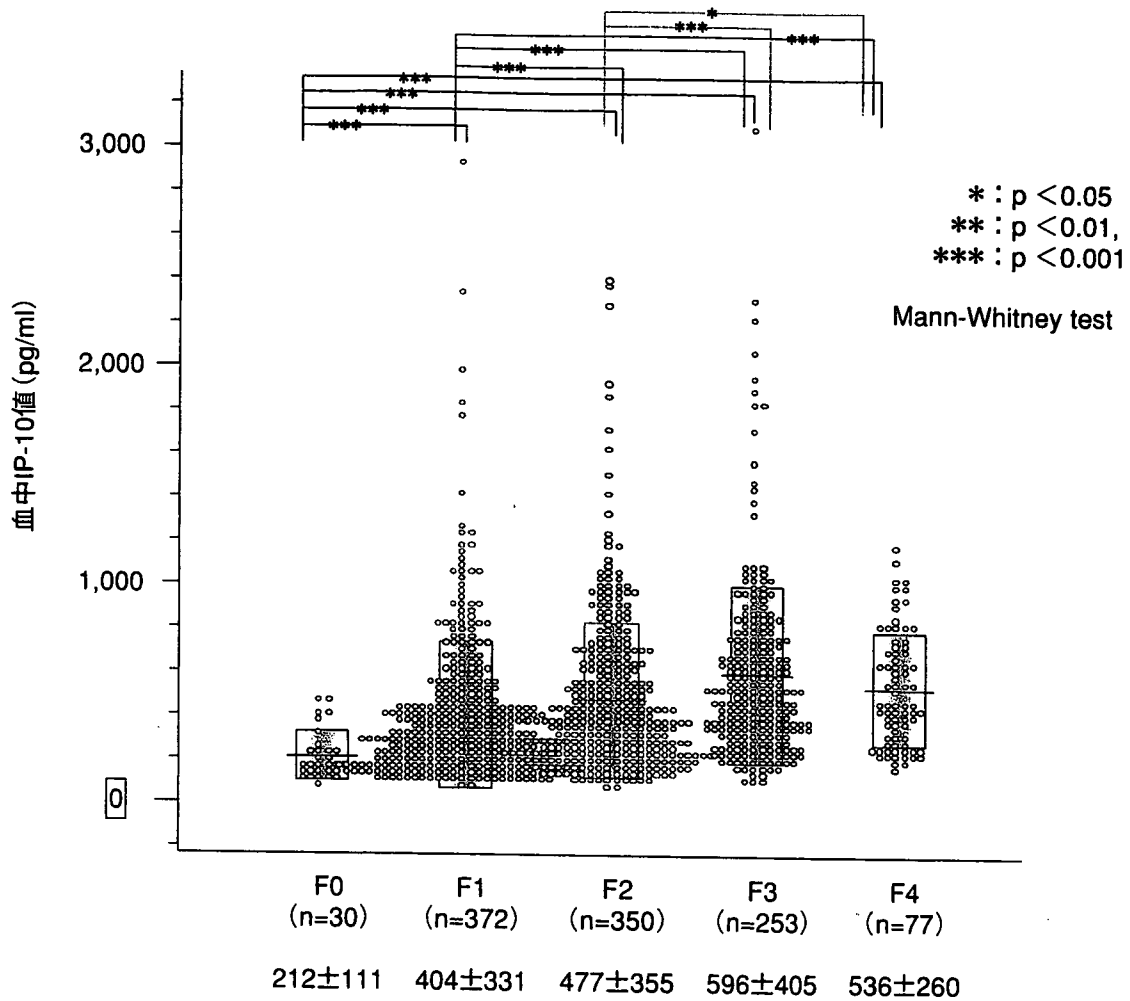


図6 治療前血中IP-10値と肝線維化 (F0-4) との関係  
肝硬変に対する治療研究班登録症例，肝生検後にIFN治療を施行した1,082例

た。血中IP-10濃度の層別解析では，血中IP-10濃度が150 pg/ml未満では68%，150～600 pg/mlでは38%，600 pg/ml以上では28%のSVR率であり，600 pg/ml以上では有意に低いSVR率(68% vs. 28% : p=0.0005)を示した(図5)。さらに肝線維化の進展度とIP-10値との関係では，肝線維化の進展とともに，IP-10値は上昇した(図6)。

Peg-IFNとRBV併用療法中のIP-10値の推移では，Non-SVR例では，治療初期にはその値は一度上昇したあとに低下するのに対し，SVR例では上昇することなく持続的に低下する例が多く，治療効果とIP10の推移には差が認められた。

Peg-IFNとRBV併用療法中のIFN誘導関連遺伝子 (IP-10, IFNAR2, IRF1, IRF, PKR, MxA) の動きを，PBMCを用いてReal-time PCR法で定

量を行ったところ，Peg-IFNとRBV投与によってmRNAレベルでIFNAR2, IRF1, IRF2の値は，治療前に比して有意にその発現が低下するも，MxA, PKRは有意にその発現が増強していた。治療効果との関連では，治療前のmRNAレベルのIP-10, IFNAR2, IRF1, IRF, PKR, MxA因子の発現量に関してはNon-EVR群，EVR群との間に差は見いだせなかったが，Peg-IFNとRBV投与後の推移に関しては，治療2週目の時点で，IP10とPKRの発現量は，Non-EVR群ではEVR群に比して，有意に上昇した。今回のPeg-IFNとRBV投与後のIFN誘導関連遺伝子の検討からは，治療抵抗例においてIFN誘導関連遺伝子発現が低下している，IFN刺激に反応しない，ないし反応不良といった現象は確認されず，むしろ治療初期の反応は



表1 C型肝炎IFN治療効果に影響を及ぼす因子 (J. Heatecote 2007)

Viral Factors that Influence Response to Therapy	Host Factors that Influence Response to Therapy
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genotype 2&gt;3&gt;4&gt;1</li> <li>• Baseline viral load (HVL v LVL)</li> <li>• Viral load decline (RVR v SVR)</li> <li>• Co-infection (HIV/HBV)</li> <li>• Quasispecies development</li> <li>• Virus interferes with function of crucial genes in several antiviral pathways               <ul style="list-style-type: none"> <li>- ? Host dependent</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ethnicity (Blacks&lt;Caucasians&lt;Asians) (genes governing immune response)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- eg: IP-10 level</li> <li>- IL polymorphisms</li> <li>- MHC</li> </ul> </li> <li>• Steatosis/ high BMI / insulin resistance</li> <li>• Cirrhosis</li> <li>• 'Gene signature' - pre-treatment interferon pathway already upregulated (liver tissue)</li> </ul>

逆に、Non-EVR群ではEVR群よりもIFNによる反応は良好であった。

欧米<sup>4~6)</sup>からも、治療抵抗例でこそ、よりIFN誘導関連遺伝子が過剰発現しているという報告が、いくつか散見される(表1)。われわれの検討結果からは、Peg-IFNとRBV併用療法治療抵抗例では、IFNシグナルのある部分が障害されて伝達障害が発生しているというメカニズムよりも、むしろC型肝炎の炎症や線維化に伴い内因性のIFN関連シグナルが過剰発現することで、何らかのメカニズムでフィードバック機構が作動し、その結果、外因性のIFN関連シグナルが抑制されるというメカニズムが想定された。

## 結 論

1. 肝硬変であること、肝線維化が進展していることは、Peg-IFNとRBV併用療法での重要な治療抵抗性因子である。
2. 治療抵抗例では、IFNシグナルの発現低下や反応性の低下は認められず、むしろ過剰発現していた。
3. 肝硬変症例の多くの例では、現行の治療法を駆使しても確実にSVRとすることが困難であることから、Peg-IFNとRBV併用療法途中でSVRが困難と判断した時点、もしくは治療開始時点から、ウイルス駆除を目指さないIFN少量長期投与でのALT値の安定化ないしAFPの低下を治療目標とし

た発癌抑制療法を選択すべきである。

平成18年度 厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)肝硬変に対する治療に関する研究班

主任研究者：八橋 弘 (長崎医療センター)

分担研究者：石橋大海 (長崎医療センター)、古賀満明 (嬉野医療センター)、小林正和 (中信松本病院)、林 茂樹 (災害医療センター)、酒井浩徳 (別府医療センター)、加藤道夫 (大阪医療センター)、矢倉道泰 (東京病院)、竹崎英一 (呉医療センター)、脇岡泰三 (大阪南医療センター)、室 豊吉 (大分医療センター)、小松達司 (横浜医療センター)、正木尚彦 (国立国際医療センター)、足立浩司 (金沢医療センター)、増本陽秀 (小倉病院)、山東剛裕 (京都医療センター)、中尾一彦 (長崎大学)、矢野博久 (久留米大学)

研究協力者：大原行雄 (西札幌病院)、千田信之 (仙台医療センター)、森本日出雄 (金沢医療センター)、三田英治 (大阪医療センター)、結城暢一 (大阪医療センター)、山下晴弘 (岡山医療センター)、小田修治 (善通寺病院)、佐藤丈顕 (小倉病院)、中牟田誠 (九州医療センター)、西秀徳 (九州医療センター)、本田浩一 (大分医療センター)、島田昌明 (名古屋医療センター)、米田俊貴 (京都医療センター)、渡部幸夫 (相模原病院)、中村陽子 (相模原病院)、重川 稔 (大阪南医療センター)、竿代丈夫 (西埼玉中央病院)、

齋藤 晃 (西埼玉中央病院), 山田真和 (災害医療センター), 田中 伸 (東京医療センター), 山本哲夫 (米子医療センター), 杉 和洋 (熊本医療センター), 坂口栄樹 (関門医療センター), 阿比留正剛 (長崎医療センター), 矢野公士 (長崎医療センター), 田浦直太 (長崎医療センター), 長岡進矢 (長崎医療センター), 宮里 賢 (長崎医療センター)

●文 献

- 1) Romero AI, Lagging M, Westin J et al: Interferon (IFN)  $\gamma$  inducible protein-10 association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN- $\alpha$ 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2006;194:895-903.
- 2) Lagging M, Romero AI, Westin J et al: IP-10 predicts viral response and therapeutics

outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology* 2006;44:1617-1625.

- 3) Diano M, Castellano G, Garcia-Samaniego J et al: Association of pretreatment serum interferon  $\gamma$  inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2005;55:374-379.
- 4) Chen L, Borozan I, Feld J, et al: Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology* 2005;128:1437-44.
- 5) Giannelli G, Guadagnino G, Dentico P, et al: MxA and PKR expression in chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24:659-63.
- 6) Gerotto M, Dal Pero F, Bortoletto G, et al: PKR gene expression and response to pegylated interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 2004;9:763-70.

\* \* \*

## Short Communication

## Low serum level of hepatitis B core-related antigen indicates unlikely reactivation of hepatitis after cessation of lamivudine therapy

Akihiro Matsumoto,<sup>1</sup> Eiji Tanaka,<sup>1</sup> Masahito Minami,<sup>2</sup> Takeshi Okanoue,<sup>2</sup> Hiroshi Yatsunami,<sup>3</sup> Shinya Nagaoka,<sup>3</sup> Fumitaka Suzuki,<sup>4</sup> Mariko Kobayashi,<sup>4</sup> Kazuaki Chayama,<sup>5</sup> Michio Imamura,<sup>5</sup> Hiroshi Yotsuyanagi,<sup>6</sup> Shigeru Nakaoka,<sup>7</sup> Noboru Maki,<sup>8</sup> Sumio Kawata,<sup>9</sup> Hiromitsu Kumada,<sup>4</sup> Shiro Iino<sup>10</sup> and Kendo Kiyosawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicine, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, <sup>2</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, <sup>3</sup>Clinical Research Center, National Nagasaki Medical Center, Omura, <sup>4</sup>Department of Research Institute for Hepatology, Toranomon Hospital, Tokyo, <sup>5</sup>Department of Medicine and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, <sup>6</sup>Department of Internal Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, <sup>7</sup>Fujirebio, Inc., Tokyo, <sup>8</sup>Advanced Life Science Institute, Inc., Wako, <sup>9</sup>Department of Gastroenterology, School of Medicine, Yamagata University, Yamagata and <sup>10</sup>Kiyokawa Hospital, Tokyo, Japan

**Aim:** The clinical significance of hepatitis B virus (HBV) core-related antigen (HBcrAg) in predicting the reactivation of hepatitis after halting lamivudine administration was analyzed.

**Methods:** A total of 34 patients with chronic hepatitis B were enrolled. Lamivudine was administered for at least 6 months before cessation, and reactivation of hepatitis was defined as elevation of alanine aminotransferase levels to more than 80 IU/L within 12 months of cessation.

**Results:** In total, 20 (59%) patients experienced hepatitis reactivation. Although concentrations of HBV DNA and HBcrAg in serum did not differ between the two groups of patients at the onset of lamivudine administration, HBcrAg serum levels were significantly higher ( $P = 0.009$ ) in the reactivation patients (median 4.9, 25–75% range 4.7–5.9 log unit/mL) than the non-reactivation patients (median 3.2, 25–75% range <3.0–4.5 log unit/mL) post-lamivudine

treatment. The concentration of HBV DNA did not differ between the two groups (median <3.7, 25–75% range <3.7–<3.7 log copy/mL in the reactivation group vs. median <3.7, 25–75% range <3.7–<3.7 log copy/mL in the non-reactivation group). Receiver operating characteristic analysis of HBcrAg concentration showed an area under the curve of 0.764 in predicting patients without reactivation of hepatitis.

**Conclusion:** HBcrAg can be a useful marker to identify patients who are not at risk of reactivation of severe hepatitis after discontinuation of lamivudine administration.

**Key words:** chronic hepatitis B, hepatitis B virus core-related antigen, hepatitis B virus DNA, hepatitis reactivation, lamivudine

## INTRODUCTION

LAMIVUDINE, A NUCLEOSIDE analog that inhibits reverse transcriptase, has been found to inhibit the replication of hepatitis B virus (HBV), reduce hepatitis, and improve histological findings of the liver in long-

term treatment.<sup>1,2</sup> Furthermore, it has been shown that lamivudine treatment improves the long-term outcome of patients with chronic hepatitis B.<sup>3,4</sup> However, there are a number of problems with lamivudine therapy, including hepatitis relapse due to the appearance of YMDD mutant viruses and the reactivation of hepatitis after its discontinuation.<sup>5,6</sup>

During lamivudine administration, the concentration of serum HBV DNA decreases, and usually becomes undetectable to even high sensitivity HBV DNA assays. However, this undetectable level is an inadequate indicator for safely discontinuing lamivudine

Correspondence: Dr Eiji Tanaka, Department of Medicine, Shinshu University School of Medicine, Asahi 3-1-1, Matsumoto 390-8621, Japan. Email: etanaka@hsp.md.shinshu-u.ac.jp

Received 17 September 2006; revision 20 February 2007; accepted 25 February 2007.

administration as active hepatitis often recurs in patients post-treatment.

Previously, a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) was developed by our laboratory to detect of hepatitis B core-related antigen (HBcrAg).<sup>7,8</sup> This HBcrAg CLEIA simultaneously measures the serum levels of hepatitis B core (HBc) and e (HBe) antigens using monoclonal antibodies, which recognize common epitopes of these two denatured antigens because both proteins are transcribed from the precore/core gene and their first 149 amino acids are identical.<sup>9–11</sup> Although this assay reflects the viral load of HBV in a similar manner to HBV DNA assays during disease progression, HBcrAg CLEIA shows characteristics different from HBV DNA assays under lamivudine administration since HBcrAg levels decrease more slowly than HBV DNA after treatment begins.<sup>12</sup> In the present study, we analyzed the clinical significance of the HBcrAg assay in predicting the likelihood of non-reactivation of hepatitis after discontinuing lamivudine administration in HBV treatment.

## METHODS

### Patients

A TOTAL OF 34 patients with chronic hepatitis B who were treated with lamivudine for at least 6 months were enrolled in the present study. The patients comprised 20 men and 14 women with a median age of 46 years (range 23–65 years), and were selected retrospectively from five medical institutions in Japan (Shinshu University Hospital, Kyoto Prefectural University Hospital, National Nagasaki Medical Center, Toranomon Hospital, and Hiroshima University Hospital). Written informed consent was obtained from each patient.

Of the 27 patients whose HBV genotype was determined, 25 (93%) were genotype C and the remaining two (7%) were genotype B. Serum HBV DNA was detectable in all patients, and HBe antigen was positive in 16 (47%) of the 34 patients before lamivudine administration.

For treatment of HBV infection, daily doses of 100 mg lamivudine were administered for at least 6 months. Lamivudine administration was stopped when alanine aminotransferase (ALT) levels were reduced to 40 IU/L or less in at least three separate tests. Serum samples were taken at several time points during and after lamivudine administration, and patients were seen at least once a month for at least 12 months after cessation of lamivudine. Estimated duration of HBV DNA

level <3.7 log copy/mL before stopping lamivudine was a median 10 months (range 0–29 months).

Reactivation of hepatitis was defined as elevation of ALT to more than 80 IU/L within 12 months of stopping lamivudine treatment.

### Serological markers for HBV

Serum hepatitis B surface antigen, HBe antigen, and anti-HBe antibody were measured by commercially available CLEIA kits (Fujirebio, Tokyo, Japan). Six major genotypes (A–F) of HBV are detectable using the method reported by Mizokami *et al.*<sup>13</sup> in which the surface gene sequence is amplified by polymerase chain reaction (PCR) and analyzed by restriction fragment length polymorphism. Serum concentration of HBV DNA was determined using a transcription mediated amplification (TMA) assay kit (Chugai Diagnostics Science, Tokyo, Japan) which has a quantitative range of 3.7–8.7 log copy/mL.

Serum concentration of HBcrAg was measured using a CLEIA developed by Fujirebio, as described previously.<sup>7</sup> Briefly, 150  $\mu$ L of serum was incubated with 150  $\mu$ L of pretreatment solution containing 15% sodium dodecylsulfate at 60°C for 30 min. After incubation, 120  $\mu$ L of pretreated specimen was added to a ferrite microparticle solution in an assay tube. Ferrite microparticles were coated with monoclonal antibodies (HB44, HB61, HB114) against denatured HBc and HBe antigens. After washing, two other monoclonal antibodies against denatured HBcAg and HBeAg (HB91 and HB110) labeled with alkaline phosphatase were added as secondary antibodies. After further washing, 200  $\mu$ L of AMPPD (3-(2'-spiroadamantan)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy) phenyl-1, 2-dioxetane disodium salt; Applied Biosystems, Bedford, MA) solution was added as substrate, and the assay tube was incubated for 5 min at 37°C.

From this, the relative chemiluminescence intensity was measured, and HBcrAg concentration was determined by comparison with a standard curve generated using recombinant pro-HBe antigen (amino acids, 10–183 of the precore/core gene product). The HBcrAg concentration was expressed as units/mL (U/mL) and a immunoreactivity of recombinant pro-HBe antigen of 10 fg/mL was defined as 1 U/mL. In the present study, the cutoff value of HBcrAg concentration was set at 3.0 log U/mL.

### Statistical analysis

The Mann–Whitney *U*-test was used to analyze quantitative data, and Fisher's exact test was used for