

200831024A

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

データマイニング手法を用いた効果的な
C型肝炎治療法に関する研究

平成 20 年度 総括研究報告書

研究代表者 泉 並木

平成 21 (2009) 年 3 月

【主任研究者】

泉 並木 武蔵野赤十字病院 消化器科

【分担研究者】

- | | | | |
|-----|-------|------------|-------------|
| I | 岩崎 学 | 成蹊大学理工学部 | 情報学科 |
| II | 黒崎 雅之 | 武蔵野赤十字病院 | 消化器科 |
| III | 坂本 直哉 | 東京医科歯科大学 | 大学院医歯学総合研究科 |
| IV | 坂本 穰 | 山梨大学大学院 | 医学工学総合研究部 |
| V | 菅内 文中 | 名古屋市立大学大学院 | 医学研究科 |
| VI | 鈴木 義之 | 虎の門病院 | 肝臓センター |
| VII | 平松 直樹 | 大阪大学大学院 | 医学系研究科 |

泉 並木

武蔵野赤十字病院 消化器科

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

データマイニング手法を用いた効果的なC型肝炎治療法に関する研究

難治性C型肝炎（ゲノタイプ1b、高HCV RNA量例）に対するペグインターフェロン・リバビリン併用による治療アルゴリズムの構築

研究代表者 泉 並木 武蔵野赤十字病院副院長・消化器科部長

研究要旨:PEG-IFN・RBV併用療法の効果予測は困難であり、また個々の患者状態に応じた最適治療法は確立していない。そこで、ウイルス側要因、宿主側要因、治療要因を統合的に組み入れた治療効果予測、および個別化治療アルゴリズムをデータマイニング解析により構築した。血小板、年齢、性別、HCV RNA量に加えてAFP、GGT、LDL-Cholesterolなど従来は注目されなかった因子が治療効果と関連することが明らかとなり、一般検査からでも治療効果予測が可能であることを示した。HCV陰性化時期とHCV遺伝子解析により、より精密な予測が可能となり、特にNS5A-ISDRはSVR、Core70、91はNVR、および12週以降にHCVが陰性化する症例でのSVRにおいて大きなインパクトを有することを示した。HCV陰性化が遅れた場合には延長投与も含めて十分な薬剤投与量を確保することが必要であり、特にCore野生型は延長治療によるSVR率の向上が期待できることを示した。これらの知見はEBMに基づく治療効果予測と、それに基づく治療計画において重要な情報を示し、肝臓非専門医ならびに専門医向けの適切な治療アルゴリズムの基盤となる。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)持続感染者は高率に肝臓を発症し、わが国では年間3万人を超える死亡がみられ社会問題となっている。治療によるウイルス排除率の向上は、肝臓による死亡の大幅な減少に寄与すると期待される。ペグインターフェロン・リバビリン併用療法により、C型肝炎患者の半数でウイルス排除が可能となった。しかし、治療前の効果予測は困難であり、また個々の患者状態に応じた最適治療法は確立していない。従来の統計手法では、治療効果に関連するウイルス、生体、治療の要因に重み付けをして治療アルゴリズムを構築することが困難である。本研究ではペグインターフェロン・リバビリン併用療法において、HCV遺伝子変異を含めたウイルス側要因、宿主側要因、薬剤投与量や治療期間などの治療要因を網羅的に解析し、これらを統合的に組み入れた治療効果予測、および個別化治療アルゴリズムを確立することを目的とした。

B. 研究方法

班員施設からペグインターフェロン・リバビリン併用療法を行なったC型肝炎患者のデータを収集した。収集したすべての臨床データを説明変数とし、ウイルス学的著効(SVR)、ウイルス学的無効(NVR)などの治療効果、および治療中の高度貧血などの副作用発現を目的変数としてSPSS Clementineソフトウェアを用いてデータマイニング解析を行ない、目的変数を効率的に判別する説明変数を情報理論に基づき逐次的に探索し、判別アルゴリズムを構築した。

(1) 一般検査成績によるSVR予測アルゴリズム:肝臓非専門の一般臨床医が使用可能なアルゴリズムを構築するために、保険外検査であるHCV遺伝子解析(NS5A-ISDR変異、Core70、91アミノ酸置換)や、肝生検を要する肝組織所見(activity、fibrosis、steatosis)を説明変数から除外し、一般検査成績、患者臨床情報を説明因子とした解析を行なった。

(2) 遺伝子変異検査、肝生検を加味したSVR予測アルゴリズム:肝臓専門医による臨床応用を目標とし、肝生検やHCV遺伝子解析を含めた解析を行なった。

(3) 治療反応性を含めたSVR予測アルゴリズム:治療前因子に加え、治療開始後のHCV減少、陰性化時期など治療に対する反応性を説明変数に加えた解析を行い、治療反応性に基づく、より精密な治療効果予測をおこなうためのアルゴリズムを作成した。

(4) 一般検査成績によるNVR予測アルゴリズム:治療中にHCVが陰性化しないNVRを予測する因子について、一般検査成績、患者臨床情報を説明因子とした解析を行なった。

(5) 遺伝子変異検査、肝生検を加味したウイルス学的無効(NVR)予測アルゴリズム:NVRを予測する因子について、肝生検やHCV遺伝子解析を含めた解析を行なった。

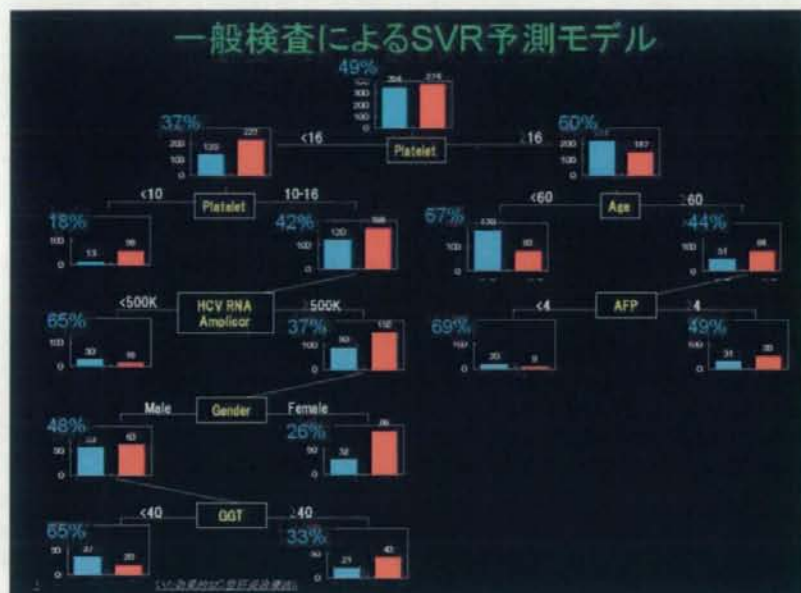
(倫理面への配慮)

ヒトの遺伝子(DNA)に係わる実験・解析は行わない。臨床データのデータベース構築においては、氏名、年齢など個人情報を連結可能匿名化する。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の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い同意を得たうえで臨床試験を遂行した(新GCPに遵守)。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて同意書を得ている。本研究の遂行においては各研究施設において必要な申請を行い、各種倫理規定を遵守した。

C. 研究結果

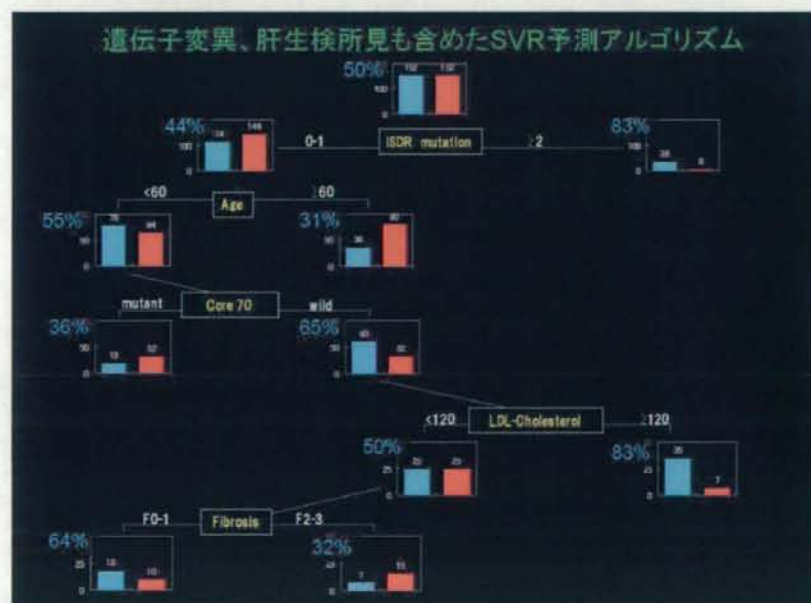
(1)一般検査成績によるSVR予測アルゴリズム:血小板、年齢、HCVRNA量、性別、AFP、GGTが予測因子として同定された。これらの因子の組み合わせにより、予測著効率が18-69%の8グループが同定された(図1)。全体のSVR率は48%であったが、以下の4グループにおいてはSVR率が6

0%以上であった。①血小板が16万以上で60歳未満、②血小板が16万以上で60歳以上だがAFPが4未満、③血小板が10-16万でHCVRNAが500KIU/ml未満、④血小板が10-16万でHCVRNAが500KIU/ml以上だが男性でGGT40



(2)遺伝子変異検査、肝生検を加味したSVR予測アルゴリズム:NS5A-ISDR変異数、Core70変異、年齢、LDL-CholがSVR規定因子として選択された。これらの因子の組み合わせにより、予測著効率が31-83%の5グループが同定され

た。以下の2グループにおいてはSVR率が60%以上であった①NS5A-ISDR変異数が2個以上、②NS5A-ISDR変異数が0-1でも、年齢が60歳未満、Core70野生型、LDL-cholesterol120以上。



(3)治療反応性を含めたSVR予測アルゴリズム:一般検査を用いた解析では、HCV陰性化時期、HCV2log低下時期、年齢、薬剤投与量、治療期間が有意な説明因子として抽出された。これらの因子の組み合わせにより予測著効率が8-81%の6グループが同定された。12週以内にHCVが陰性化した症例のSVR81%に対し、非陰性化ではSVR21%

であったが、12週以内にHCVが100分の1に低下し、ペグインターフェロン投与量が平均1.3ug/kg以上であればSVRが40%であった。また48週までのペグインターフェロン投与量が平均1.3ug/kg未満でも48週超の延長治療を行なうことによりSVRは16%から35%に向上した。

治療反応性に基づくSVR予測モデル



遺伝子変異検査を含めた解析では、12週以内にHCVが陰性化しない症例では、Core70、91が変異型の症例ではSVRが得られた症例はないのに対し、Core70野生型では

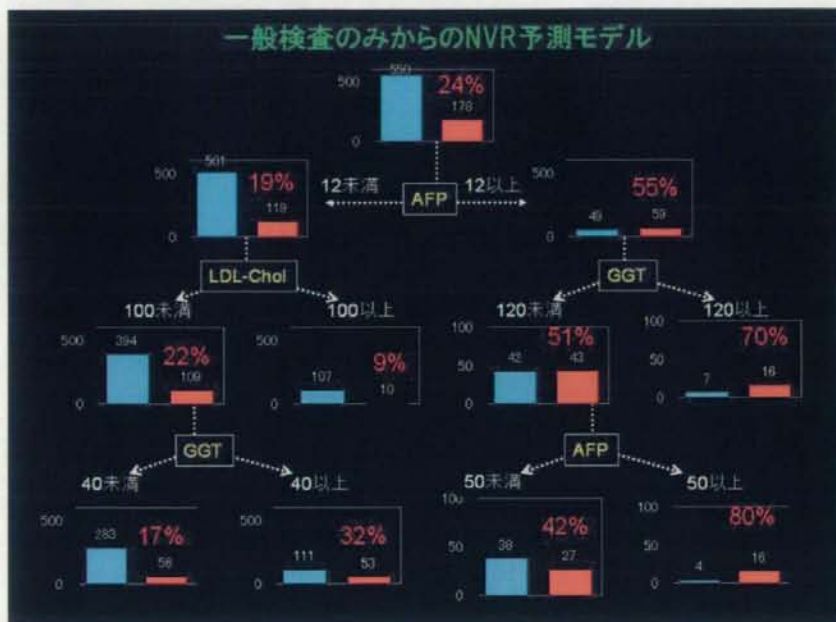
22%、Core70変異型でもCore91 野生型であれば25%がSVRとなり、さらに48週超の延長治療によりCore91 野生型のSVRは41%に向上した。

専門医向けの治療反応性に基づくSVR予測モデル



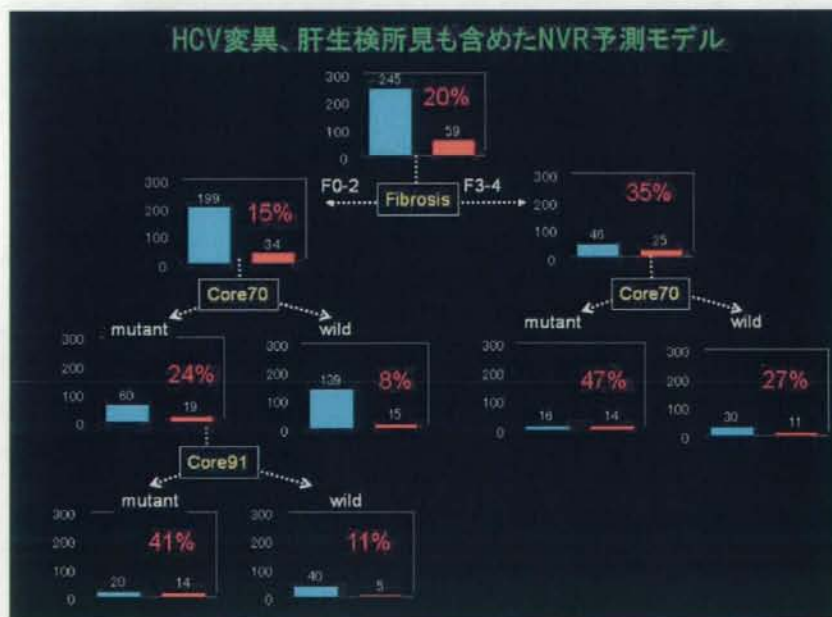
(4) 一般検査成績によるNVR予測アルゴリズム:AFP、LDL-cholesterol、GGTが説明因子として同定された。これらの因子の組み合わせにより予測NVR率が9-80%の6グループ

ブが同定された。全体のNVR率は24%であるが、以下の2グループでは70%以上であった①AFP12以上でGGT120以上②GGT120未満だがAFP50以上。



(5) 遺伝子変異検査、肝生検を加味したウイルス学的無効(NVR)予測アルゴリズム:肝線維化stage、Core70変異、Core91変異が有意因子として抽出され、これらの組み合わせにより予測NVR率が8-47%の5グループが同定された。

肝線維化stageがF3-4のNVRは全体では35%だがCore70変異型であると47%と高率であった。F0-1のNVR率は全体尾では15%と低い、Core70変異型かつCore91変異型では41%と高率であった。



D. 考察

本解析により、従来は注目されなかった AFP、GGT、LDL-Cholesterol が治療効果と密接に関連することが明らかとなり、これらを測定することで一般検査からでも治療効果を予測することが可能であることを示した。さらに HCV 遺伝子解析を加味することにより、より精密な予測が可能となり、特に NS5A-ISDR は SVR、Core70、91 は 12 週以降に HCV が陰性化する症例での治療効果、および NVR において大きなインパクトを有することを示した。SVR の確率を予測するとともに、治療効果が得られない可能性が高い患者を予測することは、治療の費用対効果、および患者が治療を選択する上での EBM に基づくインフォームドコンセントにおいて重要である。

さらに、本解析により薬剤投与量、投与期間が治療効果に密接に関連することを示し、ウイルス陰性化が遅れた場合でも薬剤投与量が十分であれば 30-40%でウイルス学的著効が得られ、また 48 週時点での薬剤投与量が少ない症例でも延長治療により著効率が 20 ポイント上昇することを示した。Core 野生型では延長治療により著効率が向上することが明らかとなり、HCV 遺伝子解析を行なうことにより、延長治療を必要とする症例の絞り込みが可能となることも示した。

E. 結論

データマイニング解析により、治療開始前に SVR、NVR を予測することが可能である。HCV 陰性化時期と HCV 遺伝子解析を加味することにより、さらに精密な予測が可能であり、HCV 陰性化が遅れた場合には延長投与も含めて十分な薬剤投与量を確保することが必要であり、特に Core 野生型は延長治療による SVR 率の向上が期待できることが示された。これらの知見は EBM に基づく治療効果予測と、それに基づく治療計画において重要な情報を示し、肝臓非専門医ならびに専門医向けの適切な治療アルゴリズムの基盤となる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Asahina Y, Izumi N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Doi F, Thuchiya K, Nakanishi H, Matsunaga K, Kitamura T, Kurosaki M, Uchihara M, Higaki M, Miyake S. Pharmacokinetics and enhanced PKR response in patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin/ J Viral Hepat 2007;14:396-403. 2) Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Miyake S, Enomoto N, Izumi N. The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase level are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy. J Hepatol 2008;48:736-42. 3) Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S. Potential relevance of

cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. Gastroenterology 2008; 134:1396-405.

2. 学会発表

1) 黒崎雅之他.第 44 回日本肝臓学会総会一般演題(優秀演題)長期予後改善を目標とした B 型慢性肝炎の治療:発癌リスク因子のデータマイニング解析および核酸アナログ治療効果の検討 2008. 2) 朝比奈靖浩他.第 44 回日本肝臓学会総会シンポジウム C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/Ribavirin 併用療法における治療成績と難治の要因の検討 2008.3) 朝比奈靖浩他.第 43 回日本肝臓学会総会シンポジウム C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/Ribavirin 併用療法における難治要因の検討とその対策 2007. 4) 平山慈子他.リアルタイム PCR 法とアンプリコア法によるウイルス陰性化時期の差異と治療効果予測.第 44 回日本肝臓学会総会一般演題. 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

Medical Practice

2008 vol. 25 no. 10

究極の目標

—抗ウイルス治療による発癌イベント発生率の抑制効果とその問題点—
ウイルス制御可能症例での発癌イベントの抑制効果とその盲点

泉 並木

東京 文光堂 本郷

究極の目標

—抗ウイルス治療による発癌イベント発生率の抑制効果とその問題点—
 ウイルス制御可能症例での発癌イベントの抑制効果とその盲点
 泉 並木

武蔵野赤十字病院消化器科/いずみ・なみき

はじめに●

C型慢性肝炎では新しい抗ウイルス療法の進歩によって、ウイルスが排除可能な症例が飛躍的に増加した。しかしながら、ウイルス排除が得られた後でも少数ではあるが肝癌の発症がみられるため、早期発見が必要となる。ウイルスが排除された後に肝発癌をきたす症例の特徴を把握し、その対策をたてておくことが重要である。

インターフェロン(IFN)による
 ウイルス排除で得られる肝発癌抑制効果●

1992年よりC型慢性肝炎に対してIFNによる治療がわが国で行われ、多くの患者が治療を受けた。全体として約3割の患者でウイルス排除(sustained virological response: SVR)が得られた。実際にはゲノタイプ1b型ではSVR率は20%前後であったのに対して、ゲノタイプ2a型では70%、2b型では50%のSVR率である。このIFN単独治療によってSVRが得られた場合には、肝癌の発生が抑止されることが認められている¹⁻³⁾。

さらに1999年末よりリバビリン内服をIFNと併用し、2003年よりベグIFNが使用されるようになるにSVRが達成される例が増加した。さらに2004年末よりベグIFN注射とリバビリン内服を併用することによってSVRが達成される率が上昇し、ゲノタイプ1b型では約半数、それ以外では約80%の症例でSVRが得られるようになった。

われわれの施設でこれらのIFNを行った症例について、治療後の肝発癌率を解析した。1,289例のIFN治療後の経過を詳細に解析できた症例で検討すると、SVRが得られなかった症例での肝発癌率が3年2.7%、5年5.3%、10年14.0%であったのに対して、SVR達成例では3年2.1%、

表1 IFN治療後の肝発癌率—SVRと非SVR例の比較

	3年	5年	10年
SVR (n=423)	2.1%	2.9%	4.0%
non-SVR (n=866)	2.7%	5.3%	14.0%

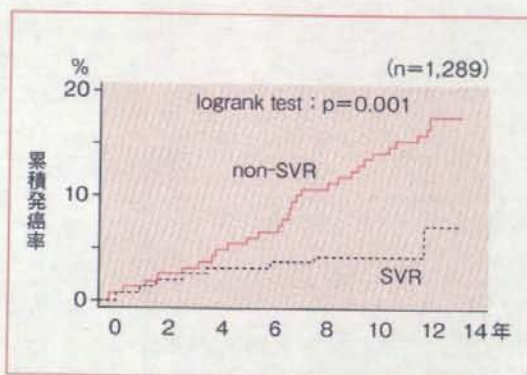


図1 IFN治療後の肝発癌率
 SVR例と非SVR例の比較(Kaplan-Meier法)。

5年2.9%、10年4.0%であった(表1)。したがって長期的にはSVRを達成することによって、肝発癌率が低下することがわかる。

特にKaplan-Meier法で解析するとSVR後3年までは非SVR例と肝発癌率は差が認められないが、3年目以降でその差が顕著になる(図1)。しかしながらSVR後6年、8年、11年後の肝癌の発生がみられた症例もあり、このような症例の特徴を解析して経過観察の留意点を把握しておくことが臨床的に重要な課題となる。

SVR後の肝発癌例の特徴●

東京の臨床肝臓カンファレンスに所属する10病院のSVR後の肝発癌症例アンケート調査を行った。全体で35例が集計された⁴⁾。このSVR

- C型肝炎ウイルス排除(SVR)が達成されれば3年目以降の肝発癌率が低下する。
- SVR後に発癌した例では、肝癌が進行してから発見された例が多い。

表2 IFN治療によってSVRを達成した後に肝発癌がみられた35例と、通常のC型肝炎からの肝発癌例の背景因子の比較

variable	IFN 著効後の HCC (多施設, n=35)	HCV-HCC 全体(初発例) (武蔵野赤十字病院, n=392)	p value
age (発癌時 y.o.)	65 ± 7	67 ± 13	0.3
gender (M/F)	31/4	198/128	0.0004
albumin (g/dl)	4.0 ± 0.4	2.9 ± 1.4	< 0.0001
AFP	3,440 ± 18,844	1,372 ± 10,388	0.3
AFP-L3 (%)	12 ± 29	11 ± 19	0.8
DCP	2,127 ± 9,375	2,030 ± 12,627	0.9
tumor size (mm)	27 ± 16	29 ± 19	0.7
number of nodule	27/6/2	223/87/66	0.09
stage (I/II/III/IV)	14/13/2/5	74/183/102/24	0.001
liver damage (A/B/C)	31/4/0	270/108/6	0.07
JIS score (0/1/2/3/4)	14/11/3/5/1	31/82/68/26/7	0.002
pathology (well/moder./pol.)	4/17/3	38/53/2	0.01
therapy	18/9/1/6/17	10/263/9/93/2	< 0.0001
response to initial Tx for HCC (CR/NCR)	25/4	49/17	0.2
mean survival (yrs.)	5.2 ± 3.1	1.9 ± 5.6	0.003
duration until recurrence (yrs.)	3.3 ± 3.5	1.0 ± 5.6	0.05

後の肝発癌例の特徴を解析するため、当院のC型肝炎からの肝発癌392例と比較検討した。

年齢は差がみられなかったが、男性の比率が高く35例中31例を占めていた。肝発癌時のアルブミン値はSVR例のほうが有意に高かった。しかし腫瘍個数や大きさには差が認められなかったものの、腫瘍進展度はSVR例のほうが進行していた。すなわちSVR例では超音波などの肝発癌早期発見のための画像検査が十分行われていない例が多いため、やや進行してから肝癌が発見された例が多いと考えられる。腫瘍マーカーには両者に差が認められなかった。さらにSVR後の肝発癌例では手術やラジオ波焼灼術など確実な治療が行われていた症例が多く、SVRを反映して肝予備能がよいことが成因と考えられた。

さらにSVR後の肝発癌例では、治療後の生存率がよく、再発までの期間が長いことも指摘できた(表2)。

SVRを達成してから肝機能の推移を解析するとアルブミン、ALT、血小板数はいずれも有意に改善しており、ウイルスは確実に消失し慢性肝炎自体は改善していたと考えられる。したがってこの点からはSVR後に発癌するか否かを予測することは困難である。γGTPはIFN治療前と肝発癌時では差がみられなかったが、治療前からγGTPは正常であった例が多く、飲酒歴のある例は少ないことを示している。SVRを達成した後に飲酒を開始した傾向がみられる例も少なかった(図2)。

しかし肝生検を施行しえた症例で検討すると、

- SVR 後の発癌は男性、肝線維化進展例が多い。
- 脂肪化や鉄沈着は SVR 後の肝発癌とは関連しない。

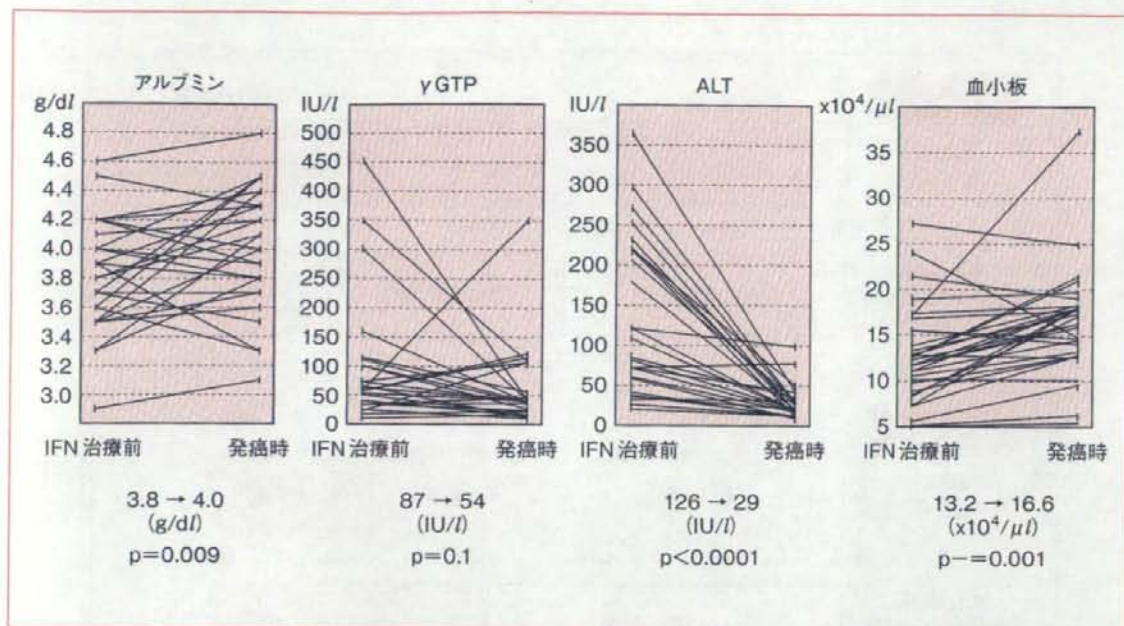


図2 SVR後に肝発癌をきたした症例でのIFN治療前と肝発癌時のアルブミン、γGTP、ALT、血小板数の比較

SVRからの発癌例では、非SVR例よりも有意に肝線維化進展例が多かった。活動性については両者で差がみられなかった(図3)。したがって、SVRが達成されたにもかかわらず、肝発癌する症例の特徴として、肝線維化進展例であることが指摘される。一方、肝組織内の脂肪化や鉄沈着も解析したが、有意の差は認められず、これらの因子が肝発癌に関与することを示唆する所見は得られなかった。

以上よりSVRが達成されたにもかかわらず肝発癌した症例は、男性と肝線維化進展例であるという特徴が指摘できる。そこで、男性で線維化進展例においては、SVRが達成されても肝癌を発症するリスクがあるため、腹部超音波や造影CTスキャンによる肝細胞癌早期発見のための画像診

断を定期的に施行していく必要があると考えられる⁴⁾。

SVR後の肝発癌例の経過の特徴●

SVR後の肝発癌例についての予後を知っておくことも重要である。そこで2008年に厚生労働省の肝硬変を含むB型・C型ウイルス性肝炎治療の標準化班会議(熊田博光班長)でSVR後の肝発癌例の多施設共同研究が行われ、99例のSVR後の肝発癌例が集計された。この中で91例において切除やラジオ波焼灼術などの根治的治療が行われた。根治的治療が施行できた症例は、全例定期的な腹部超音波やCTスキャンなどの画像診断が行われた例であった。しかし、αフェトプロテインやPIVKA-IIなどの腫瘍マーカーの上昇や、

- SVR後に腹部超音波やCTスキャンが施行されていた例では、肝癌が早期発見でき、根治的治療が行える。
- SVR後の肝発癌例では根治できても、肝内再発が多い。

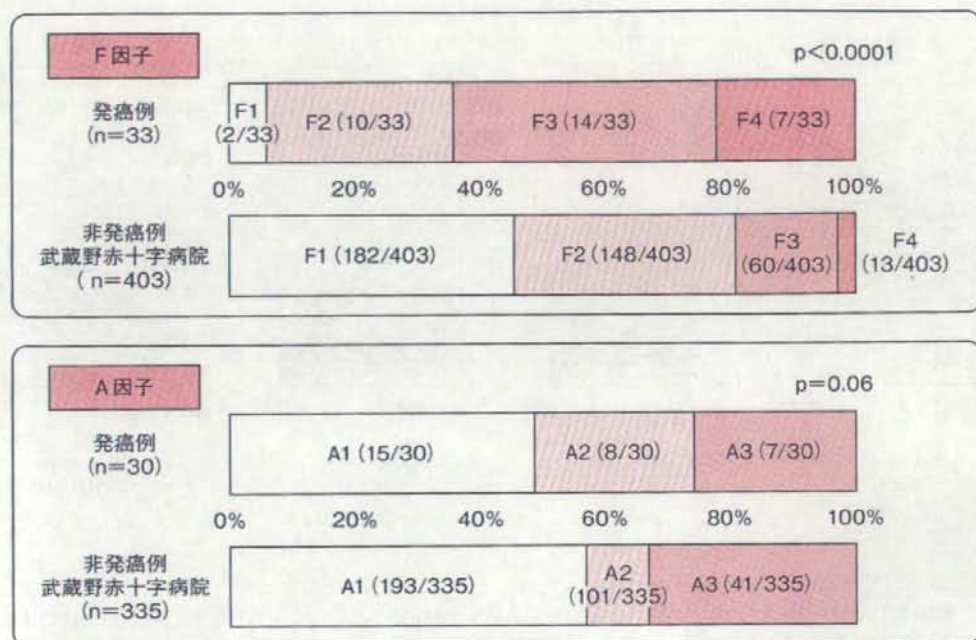


図3 SVRと非SVRの発癌例の治療前の肝生検組織所見の比較



図4 SVR後の肝発癌例についての再発率

91例で根治治療が行えたが、32例で2年以内に肝内再発がみられ、13例で2年以降に再発が認められた。

症状出現によって診断された症例では根治的治療が行えなかった例が多かった。肝癌に対して根治的治療が行えた症例の予後を解析した。

SVR後の発癌で肝癌に対して根治的治療が行われた例は91例であった。これらの症例において、2年以内に再発した症例は32例みられ、さらに2年以降に再発した例が13例であった。観察期間内に再発がみられていない症例は46例と約半数であった(図4)。Kaplan-Meier法で検討すると25.4%、3年後で43.9%の症例が肝内再発がみられていた。すなわちSVRを達成できても、いったん肝癌を発症した例では肝内再発のリスクが高いことを意味している。しかし、非

●SVR後の肝発癌例は生命予後が良好である。

SVR例の肝内再発は1年38.5%、3年78.8%であり、SVR例のほうが低い傾向であった。したがってSVR例では再発は高頻度にみられるものの、非SVR例よりも低下していた。

さらに生命予後の解析を行ったところ、SVR後の発癌例で根治的治療が行えた症例の3年生存率は84.7%、5年生存率は75%と良好であった。コントロールの通常のC型肝炎からの発癌例の生存率は3年75.5%、5年51%であったため、SVRからの肝発癌例は根治的治療が行えた場合には生命予後は良好であるといえる。

●まとめ

IFNによってウイルス制御を行え、SVRが得られた症例においても肝発癌が少なからず認められた。その症例の特徴は男性と肝線維化進展という特徴があった。定期的な腹部超音波やCTスキャンによる画像診断が行われていた症例では、肝癌に対する根治的治療が行われていたが、腫瘍マーカーや症状で肝癌が発見された例では根治的治療が行えていないため、SVR後も定期的な画像診断が必要である。さらにSVR後に肝発癌し

た症例において、肝内再発率を検討すると3年間で4割を超える例で肝内再発が認められており、SVRが得られてもいったん肝癌を発症した例では再発のリスクがある。しかし、生命予後はウイルス非排除例よりも良好であることが示された。

文 献

- 1) Ikeda, K., Saitoh, S., Arase, Y. et al.: Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: A long-term observation study of 1,643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. *Hepatology* 29: 1124-1132, 1999
- 2) Kasahara, A., Hayashi, N., Mochizuki, K. et al.: Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 27: 1394, 1998
- 3) Imai, Y., Kawata, S., Tamura, S. et al.: Relation of interferon therapy and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. Osaka Hepatocellular Carcinoma Prevention Study Group. *Ann Intern Med* 129: 94, 1998
- 4) 朝比奈靖浩, 泉 並木, 鈴木文孝ほか: C型慢性肝炎におけるinterferon治療著効後の発癌例の検討. *医学と薬学* 56: 692, 2006

肝炎ウイルスマーカー・
肝機能検査法の選択基準

肝炎ウイルスマーカー・肝機能検査法の選択基準

編集●日本消化器病学会関連研究会肝機能研究班

❖肝疾患の発見・診断に現時点で最も望ましいと考えられる、肝炎ウイルスマーカー、肝機能検査法の選択基準を、日本消化器病学会関連研究会消化器科医肝機能研究班での検討に基づきまとめた、実地診療医、消化器科医必携の1冊。

●B5判・40頁・2色刷／定価1,260円(本体1,200円+税5%) ISBN978-4-8306-1870-3

好評
発売中!

文光堂

<http://www.bunkodo.co.jp> 〒113-0033 東京都文京区本郷7-2-7 tel.03-3813-5478/fax.03-3813-7241

Potential Relevance of Cytoplasmic Viral Sensors and Related Regulators Involving Innate Immunity in Antiviral Response

YASUHIRO ASAHINA,* NAMIKI IZUMI,* ITSUKO HIRAYAMA,* TOMOHIRO TANAKA,* MITSUAKI SATO,*[†] YUTAKA YASUI,* NOBUTOSHI KOMATSU,*[‡] NAOKI UMEDA,* TAKANORI HOSOKAWA,* KEN UEDA,* KAORU TSUCHIYA,* HIROYUKI NAKANISHI,* JUN ITAKURA,* MASAYUKI KUROSAKI,* NOBUYUKI ENOMOTO,[‡] MEGUMI TASAKA,[§] NAOYA SAKAMOTO,[§] and SHOZO MIYAKE*

*Department of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, Tokyo; [†]First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Yamanashi, Yamanashi; and [‡]Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Background & Aims: Clinical significance of molecules involving innate immunity in treatment response remains unclear. The aim is to elucidate the mechanisms underlying resistance to antiviral therapy and predictive usefulness of gene quantification in chronic hepatitis C (CH-C). **Methods:** We conducted a human study in 74 CH-C patients treated with pegylated interferon α -2b and ribavirin and 5 nonviral control patients. Expression of viral sensors, adaptor molecule, related ubiquitin E3-ligase, and modulators were quantified. **Results:** Hepatic RIG-I, MDA5, LGP2, ISG15, and USP18 in CH-C patients were up-regulated at 2- to 8-fold compared with non-hepatitis C virus patients with a relatively constitutive Cardif. Hepatic RIG-I, MDA5, and LGP2 were significantly up-regulated in nonvirologic responders (NVR) compared with transient (TR) or sustained virologic responders (SVR). Cardif and RNF125 were negatively correlated with RIG-I and significantly suppressed in NVR. Differences among clinical responses in RIG-I/Cardif and RIG-I/RNF125 ratios were conspicuous (NVR/TR/SVR = 1.3:0.6:0.4 and 2.3:1.3:0.8, respectively). Like viral sensors, ISG15 and USP18 were significantly up-regulated in NVR (4-fold and 2.3-fold, respectively). Multivariate and receiver operator characteristic analyses revealed higher RIG-I/Cardif ratio, ISG15, and USP18 predicted NVR. Lower Cardif in NVR was confirmed by its protein level in Western blot. Also, transcriptional responses in peripheral blood mononuclear cells to the therapy were rapid and strong except for Cardif in not only a positive (RIG-I, ISG15, and USP18) but also in a negative regulatory manner (RNF125). **Conclusions:** NVR may have adopted a different equilibrium in their innate immune response. High RIG-I/Cardif and RIG-I/RNF125 ratios and ISG15 and USP18 are useful in identifying NVR.

Infection with hepatitis C virus (HCV) is a common cause of chronic hepatitis, which progresses to cirrhosis and hepatocellular carcinoma in many patients.¹ Al-

though combination therapy with pegylated interferon (PEG-IFN) α and ribavirin is now established as the standard treatment for chronic HCV infection genotype 1b, the sustained virologic response rate in these patients is still around 50%.²⁻⁴ Moreover, physicians have also found that 20% of patients are nonvirologic responders (NVR; those whose HCV-RNA does not become negative during 48 weeks of combination therapy).⁵ Prediction of NVR status is of clinical importance because these patients have no chance of achieving a sustained virologic response even after prolonged combination therapy.⁶ However, mechanisms involving resistance to PEG-IFN- α and ribavirin have not been fully elucidated, and it is difficult to predict treatment responses before initiation of PEG-IFN- α and ribavirin combination therapy.

In vitro studies have suggested that an innate immune response in viral infection is an essential part of the host antiviral defense system.⁷ HCV evades the host immune response through a complex combination of processes that include signaling interference, effector modulation, and continual viral genetic variation.⁸ We hypothesized that liver tissue would show a consistent difference between responders and nonresponders in expression levels of the gene involved in innate immunity and IFN signal transduction. These differences could be used to predict treatment outcomes.

The retinoic acid-inducible gene I (RIG-I), a cytoplasmic RNA helicase, and the related melanoma differentia-

Abbreviations used in this paper: CARD, Caspase-recruiting domain; Cardif, caspase-recruiting domain adaptor inducing IFN- β ; G3PDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HCV, hepatitis C virus; IPS-1, IFN- β promoter stimulator 1; ISG15, IFN-stimulated gene 15; PEG-IFN, pegylated interferon; MDA5, melanoma differentiation associated gene 5; MAVS, mitochondrial antiviral signaling protein; NVR, nonvirologic responders; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; RIG-I, retinoic acid-inducible gene I; RNF125, ring-finger protein 125; ROC, receiver operator characteristic; SVR, sustained viral responder; TR, transient responder; UBP43, ubiquitin-specific protease 43; USP18, ubiquitin-specific protease 18; VISA, virus-induced signaling adaptor.

© 2008 by the AGA Institute
0016-5085/08/\$34.00
doi:10.1053/j.gastro.2008.02.019

Table 1. Patient Characteristics at Baseline According to Final Virologic Response

	SVR n = 30	TR n = 24	NVR n = 20	P value
Age (y)	52 ± 13	60 ± 8.7	60 ± 10	.04 ^a
Female % (M/F)	47% (16/14)	63% (9/15)	60% (8/12)	.5 ^b
Naïve & Relapser ^c /Non-responder ^c	26/4	20/4	14/6	.3 ^b
BMI	24.6 ± 3.0	24.9 ± 4.4	24.0 ± 2.1	.6 ^a
ALT (IU/L)	75 ± 57	65 ± 35	68 ± 41	1.0 ^a
Hemoglobin (g/dL)	14.3 ± 1.6	14.1 ± 1.1	14.5 ± 1.7	.6 ^a
Platelet count (×10 ³ /μL)	182 ± 62	169 ± 48	140 ± 39	.04 ^a
Liver histology				
A1/A2/A3	19/8/3	14/8/1	10/10/0	.3 ^b
F1/F2/F3	14/9/7	11/7/5	7/5/8	.7 ^b
Viral load (×10 ⁶ IU/mL)	1.6 ± 1.2	1.8 ± 1.1	1.6 ± 1.1	.8 ^a
Viral decline rate (log ₁₀ /day)				
First phase	2.1 ± 0.9	1.5 ± 0.6	0.7 ± 0.5	<.0001 ^a
Second phase	0.05 ± 0.05	0.04 ± 0.02	0.006 ± 0.008	<.0001 ^a

ALT, alanine aminotransferase; BMI, body mass index.

^aP values were determined by Kruskal-Wallis test.

^bP values were determined by chi-square test.

^cResponse to previous IFN treatment.

tion-associated gene 5 (MDA5) play essential roles in initiating the host antiviral response by detecting intracellular viral dsRNA.^{9,10} Caspase-recruiting domain (CARD) adaptor inducing IFN-β (Cardif), also called IFN-β promoter stimulator 1 (IPS-1), mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS), and virus-induced signaling adaptor (VISA), is an adaptor molecule. Cardif connects RIG-I sensing to downstream signaling, resulting in IFN-β gene activation.¹¹⁻¹⁴ On the other hand, RIG-I sensing has been shown to be negatively regulated in a dominant-negative manner by LGP2,^{10,15} a helicase related to RIG-I and MDA5 lacking CARD. Interestingly, the ubiquitin ligase ring-finger protein 125 (RNF125) has been recently shown to conjugate ubiquitin to RIG-I, MDA5 as well as Cardif, which results in suppressing the functions of these proteins.¹⁶ Furthermore, these molecules are conjugated (ISGylated) by IFN-stimulated gene 15 (ISG15), a ubiquitin-like protein,¹⁷ and ISG15 is specifically removed from ISGylated protein by ubiquitin-specific protease 18 (USP18), also called ubiquitin-specific protease 43 (UBP43).^{18,19} Moreover, the NS3/4A protease of HCV specifically cleaves Cardif as part of its immune evasion strategy.^{11,20} Therefore, the RIG-I/Cardif system and its regulatory systems have essential key functions in the innate antiviral response (see Supplementary Figure 1 online at www.gastrojournal.org). However, the clinical significance of these innate immune systems, especially in relevance to the treatment response, is unclear because findings in this field have been mainly obtained by *in vitro* experiments using cell lines.

The aims of this study were to elucidate the mechanisms underlying resistance to antiviral therapy in the clinical setting and to determine whether quantification of transcripts of positive and negative cytoplasmic viral sensors and related regulatory molecules involving innate immune system is useful in predicting responses to PEG-IFN-α and ribavirin combination therapy.

Patients and Methods

Patients

Among patients with biopsy-proven chronic hepatitis C hospitalized at the Musashino Red Cross Hospital, 74 patients of HCV genotype 1b with a high viral load (>100,000 IU/mL by Amplicor-HCV Monitor Assay; Roche Molecular Diagnostics Co, Tokyo, Japan) were included in the present study (Table 1). Patients with cirrhosis, autoimmune hepatitis, or alcoholic liver injury were excluded. No patient was positive for hepatitis B virus-associated antigen/antibody or anti-human immunodeficiency virus antibody. No patient received immunomodulatory therapy prior to the enrollment. Written informed consent was obtained from all the patients, and this study was approved by the Ethical Committee of Musashino Red Cross Hospital in accordance with the Helsinki Declaration. Five patients with nonviral liver disease (2 had autoimmune hepatitis and 3 had primary biliary cirrhosis) were included in the present study as controls.

Treatment Protocol

The patients were treated for 48 weeks with subcutaneous injections of PEG-IFN-α-2b (PegIntron; Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ) at a dose of 1.5 μg·kg⁻¹·week⁻¹. Ribavirin (Rebetol; Schering-Plough Corporation) was administered concomitantly over the 48-week period, given orally twice daily at a total daily dose of 600 mg for the patients who weighed less than 60 kg and 800 mg for the patients who weighed between 60 and 80 kg. The dose of PEG-IFN-α-2b was reduced to 0.75 μg·kg⁻¹·week⁻¹ when either the neutrophil count was <750/mm³ or the platelet count was <80 × 10³/mm³. The dose of ribavirin was reduced to 600 mg/day when the hemoglobin concentration decreased to <10 g/dL.

Measurement of Gene Expression in the Liver

Liver biopsy was performed immediately before starting the therapy. After extraction of total RNA from liver biopsy specimens, the messenger RNA (mRNA) expression of positive and negative cytoplasmic viral sensors (RIG-I, MDA5, and LGP2), the adaptor molecule (Cardif), related ubiquitin E3-ligase (RNF125), and the modulators of these molecules (ISG15 and USP18) was quantified by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) using primers specific for target genes. In brief, total RNA was extracted by the acid-guanidinium-phenol-chloroform method using Isogen (Nippon Gene Co Ltd, Toyama, Japan) from the liver biopsy specimen, which was 0.2–0.4 cm in length and 13 gauge in diameter. Complementary DNA (cDNA) was transcribed from 2 μ g total RNA template in a 140- μ L reaction mixture using a SYBR RT-PCR Kit (Takara Bio Co Ltd, Otsu, Japan) with random hexamer. Real-time quantitative PCR was performed using Smart Cycler version II (Takara Bio Co Ltd) with the SYBR RT-PCR Kit (Takara Bio Co Ltd) according to the manufacturer's instructions, and intercalating SYBR Green I (Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon) was detected. Assays were performed in duplicate, and the expression levels of target genes were normalized to expression of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) gene and hydroxymethylbilane synthase, which is stable in the liver, as quantified using real-time quantitative PCR as internal controls. For accurate normalization, a set of 2 housekeeping genes was used in the present study. Sequences of primer sets were as follows: RIG-I: 5'-AAAGCATGCATGGTGTCCAGA-3', 5'-TCATTCGTGCATGCTCACTGATAA-3'; MDA5: 5'-ACATAACAGCAACATGGGCAGTG-3', 5'-TTTGGTAAGGCCTGAGCTGGAG-3'; LGP2: 5'-ACAGCCTTGCAAACAGTACAACCTC-3', 5'-GTCCCAAATTTCCGGCTCAAC-3'; Cardif: 5'-GGTGCCTCCAAAGTGCCTACTA-3', 5'-CAGCAGCCAGGCTTACTCA-3'; RNF125: 5'-AGGCA-CATATTCGGACTTGTC-3', 5'-CGGGTATTAACG-GCAAAGTGG-3'; ISG15: 5'-AGCGAATCATCTTTGCCAGTACA-3', 5'-CAGCTCTGACACCGACATGGA-3'; USP18: 5'-TGGTTCTGCTTCAATGACTCCAATA-3', 5'-TTTGGGCATTTCATTAGCACTC-3'; GAPDH: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 5'-TGGTGGTGAA-GACGCCAGT-3'. hydroxymethylbilane synthase: 5'-AAGCGGAGCCATGTCTGGTAAC-3', 5'-GTACCCA-CGCGAATCACTCTCA-3'.

Sequential Measurement of Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells Before and During Therapy

To understand transcriptional response of the genes to PEG-IFN- α -2b and ribavirin therapy, serial expression of RIG-I, RNF125, Cardif, ISG15, and USP18 were determined before and during treatment in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in 14 patients (7 were sustained viral responders [SVR] and 7 were NVR). PBMC was obtained from whole blood samples collected

before and at 4, 8, 24, 48, and 168 hours after the initiation of PEG-IFN- α -2b and ribavirin combination therapy. After extraction of total RNA from the PBMC, the expression of mRNA was quantified at each specified time point using real-time quantitative PCR as described above. Gene expression levels at each time point during treatment were calculated relative to baseline expression levels measured prior to IFN treatment.

Western Blotting

Western blotting was carried out in 9 patients (5 were SVR and 4 were NVR) and 3 non-HCV control subjects as described previously.²¹ Liver biopsy specimen of ~10 mg was homogenized in 100 μ L Complete Lysis-M (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Twenty micrograms of the homogenates were separated by SDS-PAGE and blotted onto a polyvinylidene difluoride Western blotting membrane. The membrane was incubated with the primary antibodies followed by a peroxidase-labeled anti-IgG antibody and visualized by chemiluminescence using the ECL Western blotting Analysis System (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, United Kingdom). The anti-VISA mouse monoclonal antibody (BioDesign, Saco, ME) and anti- β -actin antibody (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) were used.

HCV Dynamics in Serum

To analyze the viral dynamics, HCV RNA was quantified just before and at 4, 8, and 24 hours and 2, 7, 14, 28, 56, and 84 days after the initiation of PEG-IFN- α -2b and ribavirin combination therapy, using real-time detection PCR, as reported previously.²² For each patient, the viral decline curve was plotted on a semilogarithmic scale, and the slopes of the exponential viral declines were calculated for each viral decline phase with a straight-line fit of the data.

Definitions of Response to Therapy

A patient negative for serum HCV RNA during the first 6 months after the completion of PEG-IFN- α -2b and ribavirin combination therapy was defined as an SVR, and a patient for whom HCV RNA became negative at the end of therapy and reappeared after completion of therapy was defined as a transient responder (TR). A patient who was positive for HCV RNA even during the course of therapy was defined as an NVR. HCV RNA was determined with the Amplicor qualitative assay (Roche Molecular Diagnostics Co, Tokyo, Japan). The detection sensitivity of this assay is approximately 50 IU/mL.

Statistical Analysis

Categorical data were compared by the χ^2 test and Fisher exact test. Distributions of continuous variables were analyzed by Mann-Whitney *U* test for 2 groups. Kruskal-Wallis test was used for multiple group comparisons. All tests of significance were 2-tailed, and *P* values < .05 were considered statistically significant.

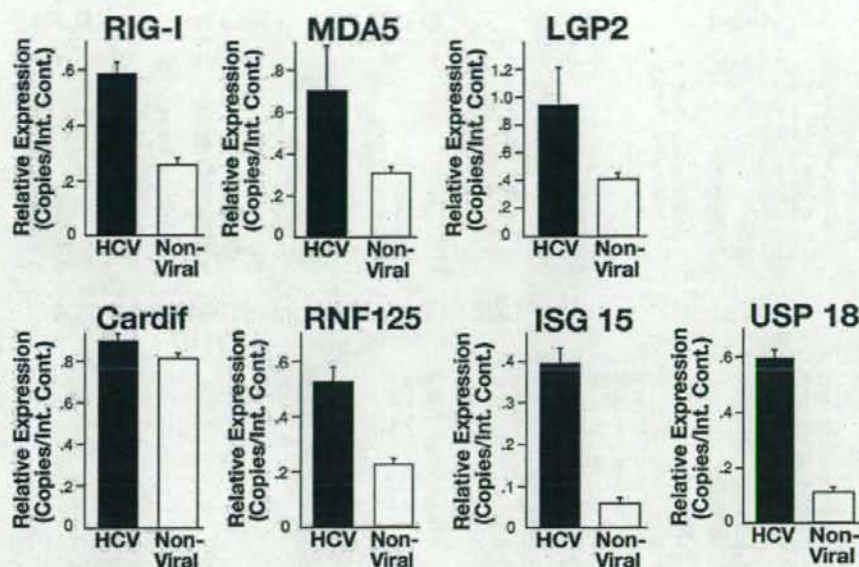


Figure 1. Comparison of hepatic gene expression levels between chronic hepatitis C patients ($n = 74$) and nonviral liver disease patients ($n = 5$). Expression levels of RIG-I, MDA5, LGP2, Cardif, RNF125, ISG15, and USP18 are shown. Error bars indicate the standard error. Upon HCV infection, expression of these genes except Cardif was stimulated. The P values determined by Mann-Whitney U test between 2 groups were as follows: RIG-I, $P .02$; MDA5, $P .01$; LGP2, $P .005$; Cardif, $P .7$; RNF125, $P .06$; ISG15, $P .007$; USP18, $P .004$.

Results

Patient Characteristics

According to the final virologic response, patients were classified into 3 groups: 30 were SVR, 24 were TR, and the remaining 20 were NVR, as shown in Table 1. Viral decline rates in NVR were significantly lower in both the first and second phases of HCV dynamics. It should be noted that most NVR patients exhibited no second-phase viral decline.

Data on factors that were available before starting the treatment were compared according to virologic response by univariate analysis. As shown in Table 1, only age and platelet count were associated with viral response, and no other clinical factors were predictive of NVR before initiation of the therapy.

Gene Expression Involving Innate Immunity in the Liver

First, we compared basal hepatic gene expression between the chronic hepatitis C patients ($n = 74$) and the nonviral liver disease patients ($n = 5$). As shown in Figure 1, levels of RIG-I, MDA5, LGP2, ISG15, and USP18 expression were significantly higher in the chronic hepatitis C patients than in the nonviral liver disease patients. However, there was no significant difference in levels of Cardif expression between the chronic hepatitis C and nonviral-related liver disease patients.

Next, to assess the relationship between baseline hepatic gene expression and treatment efficacy, levels of gene ex-

pression were compared based on the final virologic response. As shown in Figure 2, the hepatic expression levels of RIG-I, MDA5, and LGP2 were significantly higher in NVR than in SVR and TR. In marked contrast, hepatic Cardif expression was significantly lower in the NVR group. The hepatic expression of RNF125, which is specific E3-ubiquitin ligase for RIG-I, MDA5, and Cardif, was also significantly lower in the NVR group. Because negative correlation was found between RIG-I and Cardif or RNF125 expression, we calculated the ratio of RIG-I to Cardif or RNF125 expression levels. As shown in Figure 2, the difference among the groups was conspicuous when comparison was made with the RIG-I/Cardif ratio or RIG-I/RNF125 ratio. Moreover, the RIG-I/Cardif expression ratio before treatment was negatively and significantly correlated with the exponential viral decline rate in both the first and the second phases of HCV dynamics (first phase, $r = -0.4$, $P < .0005$; second phase, $r = -0.5$, $P < .0001$). Similar correlation was found between RIG-I/RNF125 ratio and viral decline rate (first phase, $r = -0.4$, $P = .004$; second phase, $r = -0.2$, $P = .09$, data not shown).

Like RIG-I and MDA5, intrahepatic expression levels of ISG15 and USP18 were significantly higher in NVR than in SVR and TR (Figure 2). When we assessed the correlation of these 2 genes in individual patients, we found a strong and significant correlation between ISG15 and USP18 ($r^2 = 0.88$, $P < .0001$). Levels of ISG15 and USP18 expression before treatment were negatively correlated with the exponential viral decline rates calculated from

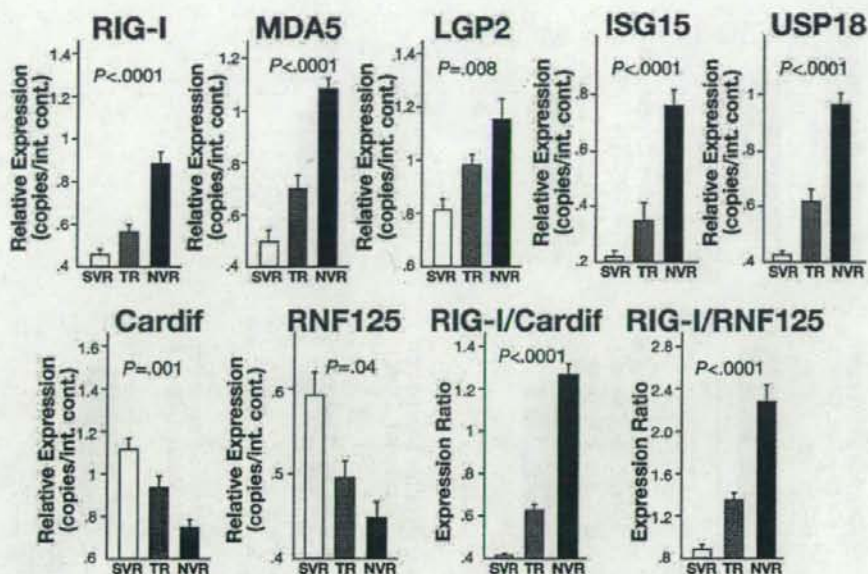


Figure 2. Comparison of hepatic gene expression levels according to final virologic outcome. Expression levels of RIG-I, MDA5, LGP2, ISG15, USP18, Cardif, RNF125, RIG-I/Cardif ratio, and RIG-I/RNF125 ratio are shown. Open columns indicate SVR ($n = 30$), shaded columns indicate TR ($n = 24$), and solid columns indicate NVR ($n = 20$). Error bars indicate the standard error. The P values were analyzed by the Kruskal-Wallis test.

the first and the second phases of HCV dynamics (ISG15, first phase, $r = -0.5$, $P < .0001$; ISG15, second phase, $r = -0.3$, $P = .02$; USP18, first phase, $r = -0.5$, $P < .0001$; USP18, second phase, $r = -0.3$, $P = .01$).

Receiver Operator Characteristic Analysis

To determine the usefulness of these gene quantifications as predictors, receiver operator characteristic (ROC) analysis was conducted (Figure 3). The area under the ROC curve for the RIG-I/Cardif ratio, ISG15, and USP18 was 0.91, 0.90, and 0.91, respectively, suggesting that quantification of these gene transcripts is of use for the prediction of NVR (Table 2). In addition, this analysis also suggested that RIG-I/Cardif ratio would be more

specific for prediction of NVR, whereas ISG15 and USP18 would be more sensitive (Table 2).

Multivariate Analysis

Multivariate analysis for factors that were available before initiating therapy indicated that a higher ratio of RIG-I/Cardif and higher expression of ISG15 were independent factors that were associated with NVR (Table 3). In this analysis, USP18 was excluded because of its strong correlation with ISG15.

Protein Levels of Cardif in the Liver

Because hepatic expression of Cardif mRNA was significantly lower in NVR patients than in SVR patients,

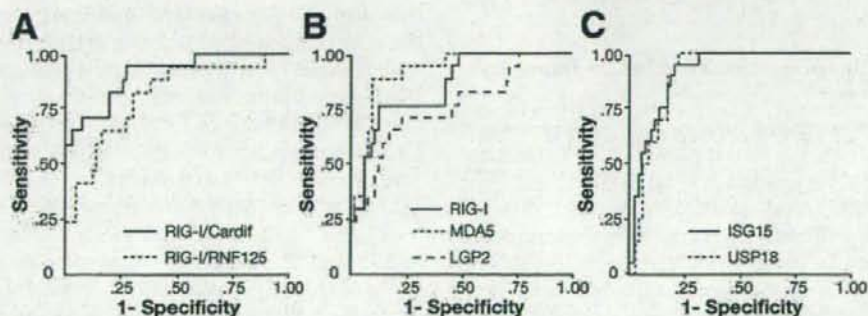


Figure 3. Receiver operator characteristic (ROC) curve for prediction of nonvirologic response. ROC curves were generated to compare (A) RIG-I/Cardif ratio (solid line) and RIG-I/RNF125 ratio (shaded line); (B) RIG-I (solid line), MDA5 (shaded line), and LGP2 (dotted line); and (C) ISG15 (solid line) and USP18 (shaded line).

Table 2. Area Under the ROC Curves, Sensitivity, Specificity, and Negative and Positive Predictive Values of Non-Virologic Responses

Variables	Az	95% CI	Cut-off	Sensitivity	Specificity	NPV ^a	PPV ^b
RIG-I	0.89	0.78–0.95	0.68	0.80	0.87	0.92	0.70
MDA5	0.92	0.86–0.98	0.84	0.82	0.89	0.93	0.74
LGP2	0.76	0.63–0.90	1.03	0.65	0.72	0.85	0.46
RIG-I/Cardif	0.91	0.84–0.99	0.88	0.75	0.91	0.91	0.75
RIG-I/RNF125	0.81	0.69–0.93	1.05	0.82	0.62	0.91	0.43
ISG15	0.91	0.85–0.97	0.36	0.90	0.81	0.96	0.64
USP18	0.90	0.84–0.96	0.67	0.90	0.83	0.96	0.67

^aNPV, negative predictive value.

^bPPV, positive predictive value.

we determined the basal protein expression levels of Cardif in the liver in NVR and SVR patients. Western blot analysis demonstrated a single Cardif product in all samples (Figure 4A). Similar to Cardif mRNA expression, mean Cardif expression in NVR patients was significantly lower than that in SVR (Figure 4B, $P = .01$). The cleavage product of Cardif, which has been reported by Loo et al,²³ was not detected in our analyses.

Transcriptional Responses to PEG-IFN- α -2b and Ribavirin Therapy in PBMC

Sequential analysis in response to PEG-IFN- α -2b and ribavirin demonstrated a rapid and strong induction of RIG-I, ISG15, and USP18 mRNA expression, which peaked 8 hours after PEG-IFN- α -2b administration (Figure 5). A greater fold change of these peak inductions was observed in SVR patients compared with NVR patients, although statistical significance was not achieved. In marked contrast, RNF125 expression profile in response to PEG-IFN- α -2b was triphasic, and consisted of (1) rapid and strong suppression peaked at 8 hours after administration, (2) increased 1.5- to 2-fold above baseline level during 24–48 hours after the administration, and (3) gradually decreased to baseline level (Figure 5). The rapid suppression and subsequent increase following PEG-IFN- α -2b administration tended to have a greater fold change in NVR patients compared with those in SVR patients. In contrast from RIG-I, ISG15, USP18, and RNF125, Cardif expression profile was relatively constitutive, and transcriptional response to PEG-IFN was weak (Figure 5).

Discussion

In the present study, we found that baseline expression levels of intrahepatic viral sensors and related

Table 3. Multivariate Analysis for the Factors Associated With Non-Virologic Response

Variable	Odds ratio	95% CI	P value
RIG-I/Cardif Ratio (by 0.1)	1.5	1.1–2.1	.008
RIG-I/RNF125 Ratio (by 0.1)	1.2	1.0–2.5	.1
ISG15 (by 0.1/internal control)	1.5	1.1–2.0	.01
Age (by 1 y)	1.0	0.9–1.1	.6
Platelet count (by $1 \times 10^4/\mu\text{L}$)	1.2	0.9–1.5	.07

regulatory molecules were significantly associated with the final virologic outcome in patients with chronic hepatitis C who were treated with PEG-IFN- α -2b and ribavirin combination therapy: up-regulation of RIG-I, MDA5, LGP2, ISG15, and USP18 and lower expression of Cardif and RNF125 could predict nonresponse to subsequent treatment with PEG-IFN- α -2b and ribavirin. The positive predictive value of a high ratio of expression of RIG-I to Cardif (>0.88) for NVR was the highest at a value of 0.75, and the negative predictive values of high expression of ISG15 (>0.36 /internal control) and USP18 (>0.67 /internal control) were the highest at values of both 0.96. These data may be of use in predicting clinical responses to the PEG-IFN- α and ribavirin combination before initiating therapy.

Previously, large randomized controlled trials identified several pretreatment factors associated with the final virologic outcome, such as genotype, HCV RNA level, degree of fibrosis, age, body weight, ethnicity, and steatosis.²⁴ However, these findings lead us to believe that predicting the final virologic response before initiating PEG-IFN- α and ribavirin is difficult. Indeed, only age and platelet count were associated with the outcome in our patients with genotype 1b and a high viral load. Currently, the final response can be gauged only after treatment has been initiated. Although an early viral response at 12 weeks suggests the eventual outcome with 60%–90% accuracy,²⁵ a 12-week regimen is associated with adverse effects and is expensive. Therefore, this study investigated the baseline expression of genes involving innate immunity that may have significant effects on clinical outcomes.

In the present study, we demonstrated that RIG-I and MDA5 were inducible upon HCV infection and that expression of these intrahepatic positive viral sensors was up-regulated in NVR. In vitro studies have suggested that RIG-I and MDA5 play a pivotal role in the regulation of IFN production and augment the production of IFN via an amplification circuit. These results suggest that expression of RIG-I and MDA5 and related amplification system may be up-regulated by endogenous IFN at a higher baseline level in NVR patients. However, HCV elimination by subsequent exogenous IFN is insufficient