

**Figure 1.** The sphingomyelin synthesis pathway. Serine palmitoyltransferase catalyzes the first committed step of sphingomyelin biosynthesis from serine and palmitoyl-coenzyme A (CoA). Myriocin inhibits the catalyzing activity of serine palmitoyltransferase. Phytosphingosine is known to work as a precursor of ceramide in both mammalian and fungal cells.

**Statistical analyses.** Statistical analyses were performed using Student's *t* test; statistically significant differences were defined as those for which  $P < .05$ .

## RESULTS

**Specific suppression of the replication of a subgenomic HCV-1b replicon by an inhibitor of sphingomyelin synthesis.** To clarify the role played by the sphingomyelin synthesis pathway in HCV replication, we added myriocin, a specific inhibitor of SPT that catalyzes the first committed step of sphingomyelin biosynthesis (figure 1), to the medium of Huh7/Rep-Feo cells. The luciferase activity, reflecting replication of the subgenomic HCV-1b replicon, dropped to 37% and 21% of the control at myriocin concentrations of 100 and 1000 nmol/L, respectively (figure 2A, upper panel), but myriocin did not cause toxicity to the cultured cells (figure 2A, lower panel). The result indicates that the decrease in HCV replication is due to a specific suppressive effect of myriocin and not to the cytotoxicity of myriocin. Northern hybridization analysis also demonstrated a substantial reduction of the subgenomic HCV replicon RNA in Huh7/Rep-Feo cells treated with myriocin in a dose-dependent manner (figure 2B). Similarly, Western blot analysis demonstrated a decrease in HCV NS5A after treatment with myriocin (figure 2C).

**No enhancement of ISRE promoter activity after myriocin treatment.** To determine whether the effect of myriocin in suppressing the subgenomic HCV replicon was associated with the activation of IFN-stimulated genes, the ISRE-*Renilla* luciferase plasmid was transfected into Huh7/Rep-Feo cells, and these cells were cultured with various concentrations of myriocin. As a positive control for the enhancement of ISRE reporter

activity, the ISRE-*Renilla* luciferase-transfected cells were cultured with IFN. Myriocin had no significant effect on ISRE promoter activity, whereas IFN significantly up-regulated ISRE activity (figure 2D, upper panel). In contrast, firefly luciferase activity in the Huh7/Rep-Feo cells, reflecting HCV replication, was inhibited by both IFN and myriocin in a dose-dependent manner (figure 2D, lower panel). These results demonstrate that the action of myriocin on HCV replication is independent of the IFN pathway.

**Decrease in the sphingomyelin content of Huh7 cells after myriocin treatment.** To clarify whether myriocin really inhibits the biosynthesis of sphingomyelin in Huh7 cells, we treated Huh7 cells with 100 nmol/L myriocin and analyzed the change in the cellular phospholipid composition by TLC. As demonstrated in figure 2E, the cellular sphingomyelin content decreased after myriocin treatment, but no significant change was observed in other cellular phospholipids.

**Restoration of HCV replication by addition of phytosphingosine.** To confirm that suppression of HCV RNA replication was due to depletion of sphingomyelin, we incubated replicon cells with phytosphingosine, a precursor of ceramide in mammalian and fungal cells, in the presence of myriocin. Treatment with phytosphingosine restored HCV replication in a dose-dependent manner (figure 2F, upper panel). On the other hand, phytosphingosine by itself did not have any effect on HCV replication (figure 2F, lower panel). This result indicates that inhibition of HCV replication was the direct result of depletion of sphingomyelin.

**Suppression of HCV replication by knocking down SPT with siRNA.** Next, we determined whether inhibition of SPT expression suppresses HCV replication by knocking down SPT with siRNA. As demonstrated in the upper panel of

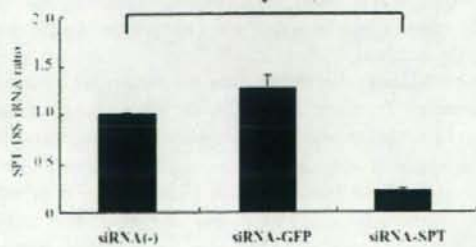
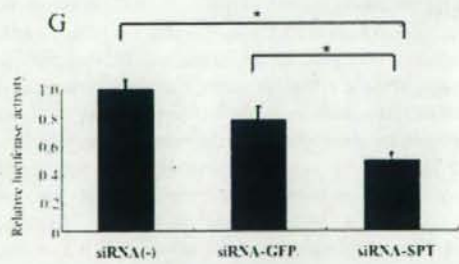
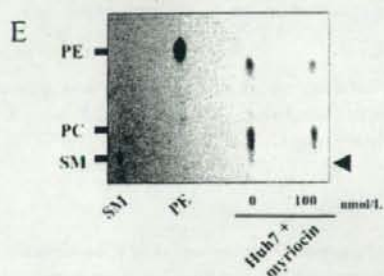
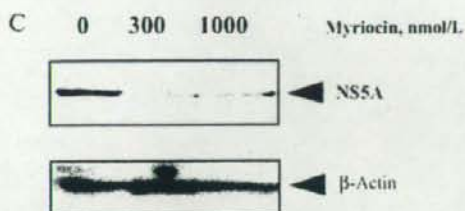
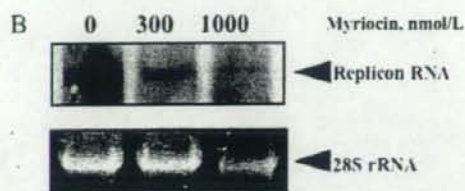
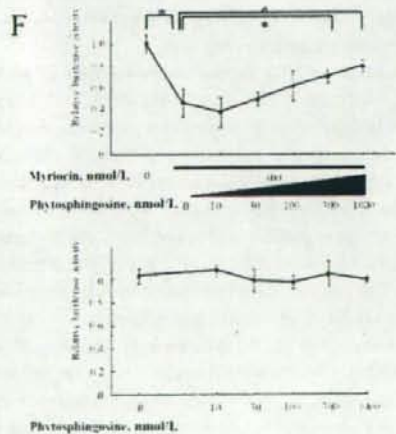
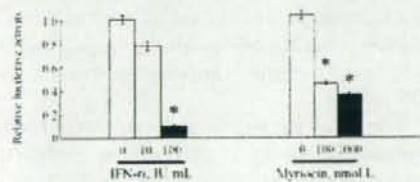
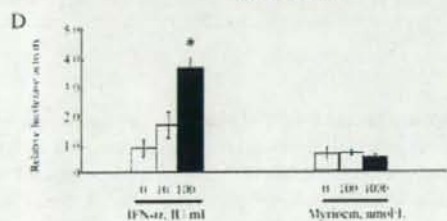
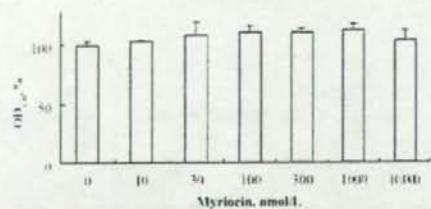
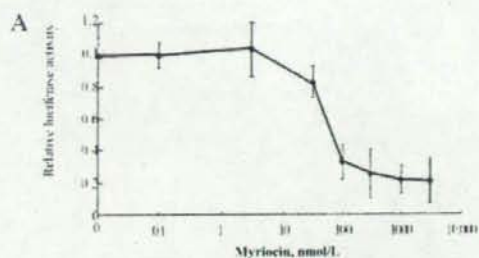


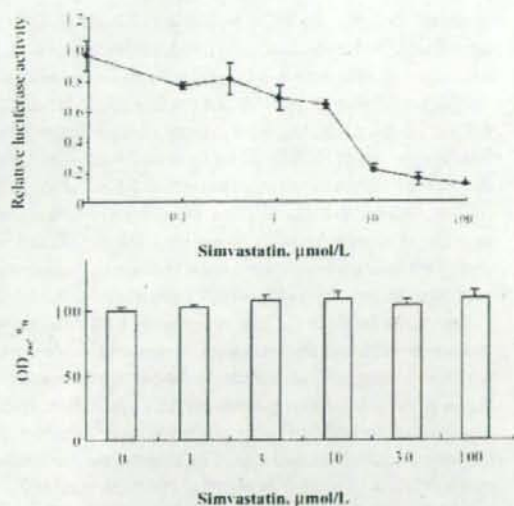
figure 2G, HCV replication was suppressed significantly by siRNA targeting SPT compared with no siRNA or siRNA targeting GFP (negative control). We confirmed with real-time PCR that the siRNA targeting SPT significantly decreased expression of SPT mRNA (figure 2G, lower panel). This result indicates that the SPT enzyme plays an important role in HCV replication.

**Inhibition of the replication of a subgenomic HCV-1b replicon by an HMG-CoA reductase inhibitor (simvastatin).** HMG-CoA reductase inhibitors have been reported to suppress replication of subgenomic and genomic HCV-1b replicons [15, 16]. Because cholesterol is another important component of lipid rafts, it may be speculated that depletion of cholesterol by HMG-CoA reductase inhibitors disrupts the lipid raft, affecting the ability of the HCV replicon to replicate in Huh7 cells. To confirm the effect of HMG-CoA reductase inhibitors on the subgenomic HCV-1b replicon, we examined the effect of simvastatin by means of Huh7/Rep-Feo cells. Cultures of Huh7/Rep-Feo cells with simvastatin at concentrations of 0–100  $\mu\text{mol/L}$  showed a dose-dependent reduction of the subgenomic HCV-1b replicon (figure 3, upper panel). The MTS assay showed that treatment with simvastatin had no toxic effect on Huh7/Rep-Feo cells in the dose range used (figure 3, lower panel). These results demonstrated that simvastatin specifically suppressed replication of a subgenomic HCV-1b replicon. However, because recent studies showed that statins suppress HCV replication through inhibition of geranylgeranylation of certain proteins rather than inhibition of cholesterol synthesis [15], we also

examined the effect on HCV replication of 2-HP- $\beta$ -CyD, an agent known to deplete cholesterol directly from membranes. As demonstrated in figure 4A, 2-HP- $\beta$ -CyD also suppressed HCV replication without cytotoxicity. To confirm that 2-HP- $\beta$ -CyD did not inhibit firefly luciferase activity nonspecifically rather than by suppressing HCV RNA, we incubated recombinant firefly luciferase with various concentrations of 2-HP- $\beta$ -CyD in the culture medium, and the medium was subjected to luciferase analysis. As demonstrated in figure 4B, 2-HP- $\beta$ -CyD did not affect luciferase activity. These results indicate that cholesterol itself plays an important role in HCV replication.

**Synergistic inhibitory effects of myriocin with IFN, simvastatin with IFN, and myriocin with simvastatin.** We carried out the following assay to determine whether myriocin and IFN have a synergistic inhibitory effect on HCV replication. Huh7/Rep-Feo cells were treated with combinations of myriocin and IFN at various concentrations. The relative dose-inhibition curves of IFN were plotted for each fixed concentration of myriocin (0, 30, 100, and 300 nmol/L). As demonstrated in the upper panel of figure 5A, the curves shifted to the left with increasing concentrations of myriocin, demonstrating the synergy of the 2 drugs against the subgenomic HCV-1b replicon. Isobologram analysis also confirmed the synergy (figure 5A, lower panel). To determine whether this synergistic effect was associated with up-regulation of the IFN-stimulated gene responses, we investigated the combined effect of myriocin and IFN on ISRE activity. As demonstrated in figure 5B (upper panel, right), myriocin did not enhance the ISRE–Renilla luciferase activity induced by IFN, but

**Figure 2.** Specific inhibition of the replication of a subgenomic hepatitis C virus (HCV) genotype 1b replicon by myriocin. **A**, Inhibition of HCV replicon replication by myriocin. By use of Huh7/Rep-Feo cells expressing a selectable chimeric luciferase reporter Feo gene, the intracellular replication level of an HCV replicon was quantified on the basis of luciferase activity [22, 25]. Huh7/Rep-Feo cells were cultured with various concentrations of myriocin. After 96 h of treatment, the luciferase assay was performed, as described in Materials and Methods (upper panel). In the dimethylthiazol carboxymethoxyphenyl sulfonylphenyl tetrazolium (MTS) assay, Huh7/Rep-Feo cells were cultured with various concentrations of myriocin for 96 h (lower panel). Data are means  $\pm$  SDs of triplicates from 2 independent experiments. **B**, Northern hybridization. Huh7/Rep-Feo cells were cultured with various concentrations of myriocin and harvested at 96 h after administration. Ten micrograms of total cellular RNA was electrophoresed in each lane. The membrane containing the HCV replicon RNA was hybridized using a digoxigenin-labeled probe specific for the replicon sequence (upper panel), and 28S human ribosomal RNA (rRNA) was used as an internal control (lower panel). Lane 1, no myriocin; lane 2, 300 nmol/L myriocin; lane 3, 1000 nmol/L myriocin. **C**, Western blotting. Ten micrograms of total cellular protein was electrophoresed in each lane. Anti-NSSA monoclonal antibody was used as the primary antibody to detect HCV proteins (upper panel), and  $\beta$ -actin was used as an internal control (lower panel). Lane 1, no myriocin; lane 2, 300 nmol/L myriocin; and lane 3, 1000 nmol/L myriocin. **D**, No enhancement of interferon (IFN)-stimulated response element (ISRE) promoter activity by myriocin. To investigate whether the effect of myriocin was associated with the activation of IFN-stimulated genes, the ISRE–Renilla luciferase plasmid was transfected into Huh7/Rep-Feo cells in the presence of myriocin. The upper panel demonstrates the ISRE–Renilla luciferase activity at 48 h after transfection. The lower panel demonstrates the firefly luciferase activity of the Huh7/Rep-Feo cells, reflecting HCV replication. Data are means  $\pm$  SDs of triplicates from 2 independent experiments. \* $P < .05$ . **E**, Decrease in the sphingomyelin (SM) content of Huh7 cells after myriocin treatment. The change in the cellular phospholipid content was analyzed by thin-layer chromatography. Huh7 cells were cultured alone or with 100 nmol/L myriocin for 96 h. PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine. **F**, Restoration of the HCV replication that was suppressed by myriocin after the addition of phytosphingosine. Huh7/Rep-Feo cells were cultured with myriocin alone or with various concentrations of phytosphingosine. The luciferase assay was performed after 72 h of treatment (upper panel). Huh7/Rep-Feo cells were also cultured with phytosphingosine alone as indicated for 72 h (lower panel). Data are means  $\pm$  SDs of triplicates from 2 independent experiments. \* $P < .05$ . **G**, Suppression of HCV replication by knocking down of serine palmitoyltransferase (SPT) with short interfering RNA (siRNA). Huh7/Rep-Feo cells were transfected with 10 nmol/L siRNA oligonucleotides targeting the LCB1 subunit of SPT or control siRNA targeting green fluorescent protein (GFP). The luciferase activity of the HCV replicon was measured 72 h after transfection (upper panel). SPT mRNA expression at 72 h after siRNA transfection was analyzed by real-time polymerase chain reaction. The SPT mRNA level was measured relative to 18S rRNA (lower panel). Values are shown as ratios to negative control levels and as the means  $\pm$  SDs of triplicates from 2 independent experiments. siRNA(–), no siRNA. \* $P < .05$ .

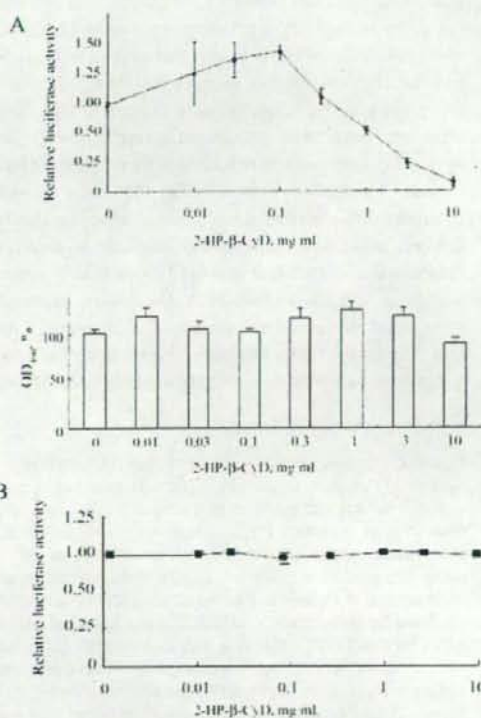


**Figure 3.** Inhibition of replication of a subgenomic hepatitis C virus genotype 1b replicon by simvastatin. Huh7/Rep-Feo cells were cultured with various concentrations of simvastatin, and the luciferase assay was performed after 48 h of treatment (*upper panel*). The dimethylthiazol carboxymethoxyphenyl sulfophenyl tetrazolium assay was performed after Huh7/Rep-Feo cells were cultured with various concentrations of simvastatin for 48 h (*lower panel*). Data are means  $\pm$  SDs of triplicates from 2 independent experiments.

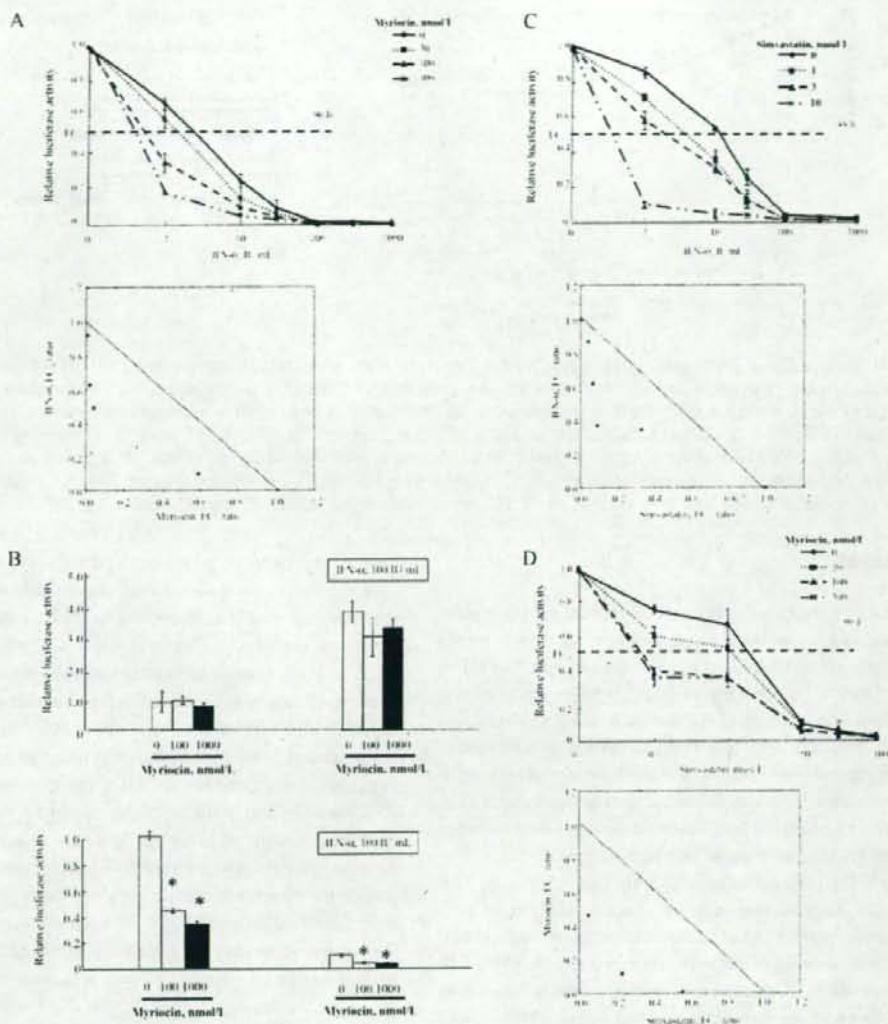
it significantly enhanced IFN-induced suppression of the firefly luciferase activity reflecting HCV replication (*lower panel, right*). This demonstrated that the synergistic effect was not caused by up-regulation of the IFN-stimulated genes. We also assessed the synergy of simvastatin with IFN and of myriocin with simvastatin. In each case, the 2 drugs showed synergistic effects at the concentrations indicated (figure 5C and 5D). In all cases, the MTS reduction values at the drug concentrations used in this assay did not show any significant decrease (data not shown). These results indicate that the synergistic effects on HCV replication of IFN with myriocin, IFN with simvastatin, and myriocin with simvastatin were exerted through their pharmacological effects and were not due to the augmentation of cytotoxicity.

**Suppression of JFH-1 HCV replication by myriocin and simvastatin.** The experiments described thus far were done using the subgenomic HCV-1b replicon system. Recently, Wakita et al. [19] established an infectious HCV model in cultured cells. This system, known as the JFH-1 system and based on genotype 2a HCV, secretes viral particles into the medium, and the medium is infectious for chimpanzees. This JFH-1 system completely mimics HCV infection *in vivo* and is considered more suitable for analyzing the effect of drugs. Therefore, we

examined the effect of myriocin and simvastatin using the JFH-1 system. Huh7.5.1/JFH-1 HCV cells were cultured for 96 h with 1000 nmol/L myriocin, 10  $\mu$ mol/L simvastatin, 1000 IU/mL IFN, and a combination of 1000 nmol/L myriocin and 10  $\mu$ mol/L simvastatin. The intracellular JFH-1 HCV RNA titer was analyzed using real-time RT-PCR. As demonstrated in figure 6A, intracellular JFH-1 HCV RNA treated with myriocin or simvastatin decreased to 60% of control in 96 h, demonstrating that the inhibitory effect of myriocin and simvastatin on replication was not restricted to the subgenomic HCV-1b replicon. When both agents were used in combination, JFH-1 HCV RNA also



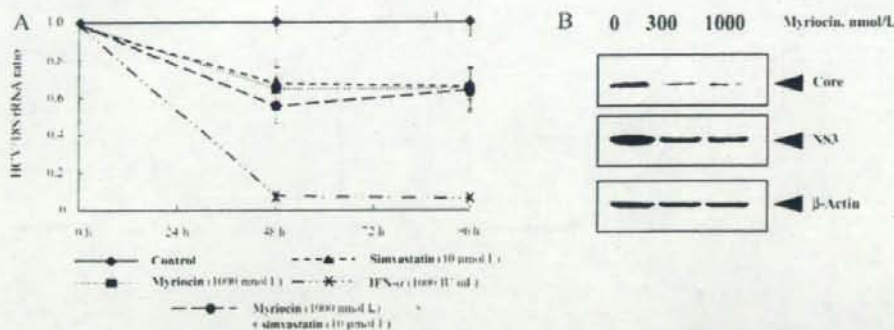
**Figure 4.** Inhibition of replication of a subgenomic hepatitis C virus genotype 1b replicon by 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (2-HP- $\beta$ -CyD). A, Huh7/Rep-Feo cells cultured with various concentrations of 2-HP- $\beta$ -CyD for 48 h. The luciferase assay was performed after 48 h of treatment (*upper panel*). The dimethylthiazol carboxymethoxyphenyl sulfophenyl tetrazolium assay was performed after Huh7/Rep-Feo cells were cultured with various concentrations of 2-HP- $\beta$ -CyD for 48 h (*lower panel*). Data are means  $\pm$  SDs of triplicates from 2 independent experiments. B, Recombinant firefly luciferase incubated with various concentrations of 2-HP- $\beta$ -CyD in the culture medium at 37°C for 48 h. The medium was collected and subjected to luciferase analysis. Data are means  $\pm$  SDs of triplicates from 2 independent experiments.



**Figure 5.** Synergistic inhibitory effects of myriocin with interferon (IFN), simvastatin with IFN, and myriocin with simvastatin. *A*, Synergistic inhibitory effect of myriocin with IFN on hepatitis C virus replication. Huh7/Rep-Feo cells were treated with combinations of myriocin and IFN at various concentrations. The upper panel shows the relative dose-inhibition curves of IFN plotted for each fixed concentration of myriocin (0, 30, 100, and 300 nmol/L). The lower panel shows the isobologram analysis for the combination of myriocin with IFN. *B*, IFN-stimulated response element (ISRE) promoter activity induced by a combination of myriocin with IFN. Huh7/Rep-Feo cells transfected with ISRE-*Renilla* luciferase were cultured with various concentrations of myriocin alone (*left*) or with 100 IU/mL IFN (*right*). The upper panel demonstrates the ISRE-*Renilla* luciferase activity at 48 h after transfection. The lower panel demonstrates the firefly luciferase activity of the Huh7/Rep-Feo cells, reflecting hepatitis C virus (HCV). Data are means  $\pm$  SDs of triplicates from 2 independent experiments. \* $P < .05$ . *C*, Synergistic inhibitory effect of simvastatin with IFN on HCV replication. *D*, Synergistic inhibitory effect of simvastatin and myriocin on HCV replication.

decreased to almost 60% of the control at 48 and 96 h after treatment. However, no evident synergistic inhibitory effect was observed (figure 6A). To clarify the inhibitory effect of myriocin on JFH-1 HCV, we performed Western blot analysis for JFH-1

HCV proteins. As demonstrated in figure 6B, a substantial decrease in the core and NS3 proteins of JFH-1 HCV was observed 96 h after treatment with myriocin, confirming the RT-PCR results (figure 6B).



**Figure 6.** Suppression of JFH-1 hepatitis C virus (HCV) replication by myriocin and simvastatin. **A**, Cells containing JFH-1 HCV treated for 96 h with 1000 nmol/L myriocin, 10 μmol/L simvastatin, 1000 IU/mL IFN, or a combination of 1000 nmol/L myriocin and 10 μmol/L simvastatin. The cells were collected at 48 and 96 h, and the JFH-1 HCV RNA level relative to 18S rRNA was analyzed by real-time polymerase chain reaction. Values are shown as the ratios to negative control values (cells receiving no treatment) and as means ± SDs. **B**, Western blotting. Cells containing JFH-1 HCV were treated with 300 or 1000 nmol/L of myriocin and harvested at 96 h after administration. Ten micrograms of total cellular protein was electrophoresed in each lane. Anti-core monoclonal antibody (MAb) and anti-NS3 MAb were used as the primary antibodies to detect JFH-1 HCV proteins. β-Actin was detected as an internal control. Lane 1, no myriocin; lane 2, 300 nmol/L myriocin; and lane 3, 1000 nmol/L myriocin.

## DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that the sphingomyelin synthesis inhibitor myriocin suppressed not only replication of a subgenomic HCV-1b replicon but also replication of the JFH-1 strain of infectious genotype 2a HCV. We also demonstrated that simvastatin suppressed replication of both a subgenomic HCV-1b replicon and JFH-1 HCV. When a subgenomic HCV-1b replicon was used, the anti-HCV activity of both myriocin and simvastatin was enhanced synergistically with IFN. Moreover, when myriocin and simvastatin were used together, their anti-HCV activity was enhanced synergistically.

What is the mechanism by which myriocin suppresses viral replication? Because myriocin is a specific inhibitor of SPT, which catalyzes the first committed step of sphingomyelin biosynthesis, we speculated that myriocin exerts its action by inhibiting production of downstream substrates, especially sphingomyelin. The findings that siRNA targeted against SPT decreased HCV replication and that HCV replication was restored by addition of phytosphingosine, a precursor of sphingomyelin, demonstrated that the effect was specific to SPT activity. Moreover, the fact that treatment of Huh7 cells with myriocin did not enhance the ISRE promoter activity indicated that the inhibitory effects of myriocin were independent of those of IFN. It is known that intracellular replication of most RNA viruses occurs on certain membrane structures—including the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus, endosomes, and lysosomes—by making replication complexes at these sites [5–7]. For HCV, it has been reported by several groups that *in vitro* replication activity is located in the membrane fractions of cultured cells [26–28]. In addition, newly synthesized HCV RNA and the nonstructural proteins in replicon cells were colocalized in detergent-resistant

membrane structures, most likely lipid rafts [18]. Caveolin-2, a lipid raft protein, was also shown to colocalize with the non-structural proteins [18]. According to these findings, the HCV replication complex machinery is considered to form on a lipid raft. Therefore, because sphingomyelin is the major component of the lipid raft, it is plausible to speculate that myriocin disrupted lipid raft formation and inhibited HCV replication.

Cholesterol is another major component of lipid rafts and might also be targeted for anti-HCV therapy. Because cholesterol is synthesized in the mevalonate pathway, an inhibitor of the pathway might act to disrupt lipid rafts. In accordance with this concept, statins, which are HMG-CoA reductase inhibitors, already have been reported to suppress the replication of genomic and subgenomic HCV-1b replicons [15, 16]. In the present study, we also confirmed that simvastatin suppressed replication of a subgenomic HCV-1b replicon without toxicity. Moreover, we showed for the first time that the suppressive effect was also observed in an infectious HCV-2a model of JFH-1 HCV. Meanwhile, recent studies found that the effect of statins was attributable to inhibition of geranylgeranylation rather than depletion of cholesterol, because addition of geranylgeraniol rescued HCV suppression induced by statins [15]. However, although geranylgeranylation might play a role in HCV regulation, the importance of cholesterol itself has not yet been determined. To clarify further the role played by cholesterol in HCV replication, we investigated the effect of 2-HP-β-CyD, which is known to deplete cholesterol directly from cells. As demonstrated in figure 4, specific suppression of HCV replication by 2-HP-β-CyD indicated the importance of cholesterol itself for HCV replication. It is unlikely that these agents suppressed replication of the subgenomic replicon through inhibi-

tion of encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site (EMCV-IRES) activity, because they also significantly suppressed replication of a full-length genomic HCV (JFH-1 HCV) that does not include EMCV-IRES (figure 6A; data for 2-HP- $\beta$ -CyD not shown).

Although we observed an inhibitory effect of myriocin and simvastatin on both the subgenomic HCV-1b replicon and JFH-1 HCV, there was a difference in efficacy between the 2 HCV systems; the subgenomic HCV-1b replicon was more sensitive to and was more strongly inhibited by either agent alone or in combination, compared with JFH-1 HCV. This result was unexpected, because we had speculated that these agents might be effective irrespective of the viral isolate if these agents targeted not the virus itself but rather host factors, such as lipid rafts. However, there are several differences between these 2 systems, and we cannot directly compare the results. In particular, the subgenomic HCV replicon lacks viral structural proteins and has only an HCV RNA intracellular replication step, whereas JFH-1 HCV includes all steps of the HCV life cycle. We do not know the precise target of the agents, and further studies are still needed.

Is it really possible to use these agents in clinical HCV treatment? Especially because statins have been used in the treatment of hyperlipidemia for many years worldwide with proven safety, it would be ideal if we could use statins as one therapeutic application for anti-HCV therapy. Most recently, O'Leary et al. [29] undertook a human pilot study and treated 10 patients with atorvastatin for 12 weeks; they reported that there was no statistically significant change in HCV RNA levels compared with pretreatment levels. The reason for the discrepancy between *in vitro* and *in vivo* findings is unknown. However, as also discussed by O'Leary et al., the most plausible explanation for this discrepancy is that the plasma concentrations of atorvastatin after a conventionally approved dose were unlikely to reach those found to be effective in cell culture medium. According to their calculations, to inhibit HCV RNA replication the plasma atorvastatin concentration should be 3 logs higher than that achieved by a conventional dose. However, even though it would be difficult to inhibit HCV RNA replication with statins alone, a clinical antiviral effect might be still achieved if statins were used in combination with IFN (or myriocin), because a synergistic effect was observed in our *in vitro* study. To determine the synergistic effect *in vivo*, however, further clinical trials are needed. On the other hand, although promising *in vitro*, myriocin has not yet been used for human clinical diseases, and its safety has not been established. However, in chimeric mice, the plasma myriocin concentration equivalent to culture medium effectively inhibited HCV RNA replication, and drug toxicity was not observed at this concentration [30]. This finding suggested the possibility that myriocin could be used *in vivo*, although further studies are needed.

In conclusion, we have demonstrated that inhibition of the sphingomyelin synthesis pathway and the mevalonate pathway

both effectively suppressed HCV replication *in vitro*, indicating that lipid metabolism could be an important target for new anti-HCV therapies.

## References

1. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat* 1999; 6:35-47.
2. Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997; 26:155-205.
3. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: 535-46.
4. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975-82.
5. Wengler G, Nowak T, Castle E. Description of a procedure which allows isolation of viral nonstructural proteins from BHK vertebrate cells infected with the West Nile flavivirus in a state which allows their direct chemical characterization. *Virology* 1990; 177:795-801.
6. Shi ST, Schiller JJ, Kanjanahaluethai A, Baker SC, Oh JW, Lai MM. Colocalization and membrane association of murine hepatitis virus gene 1 products and de novo-synthesized viral RNA in infected cells. *J Virol* 1999; 73:5957-69.
7. van der Meer Y, Snijder EJ, Dobbe JC, et al. Localization of mouse hepatitis virus nonstructural proteins and RNA synthesis indicates a role for late endosomes in viral replication. *J Virol* 1999; 73:7641-57.
8. Ahlquist P, Noueiry AO, Lee WM, Kushner DB, Dye BT. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* 2003; 77:8181-6.
9. Egger D, Wolk B, Gosert R, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002; 76:5974-84.
10. Moradpour D, Gosert R, Egger D, Penin F, Blum HE, Bienz K. Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res* 2003; 60:103-9.
11. Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* 2004; 78: 3480-8.
12. Aizaki H, Lee KJ, Sung VM, Ishiko H, Lai MM. Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 2004; 324:450-61.
13. Mannova P, Fang R, Wang H, et al. Modification of host lipid raft proteome upon hepatitis C virus replication. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 2319-25.
14. Leu GZ, Lin TY, Hsu JT. Anti-HCV activities of selective polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318:275-80.
15. Kapadia SB, Chisari FV. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:2561-6.
16. Ikeda M, Abe K, Yamada M, Dansako H, Naka K, Kato N. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* 2006; 44:117-25.
17. Sakamoto H, Okamoto K, Aoki M, et al. Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol* 2005; 1:333-7.
18. Shi ST, Lee KJ, Aizaki H, Hwang SB, Lai MM. Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *J Virol* 2003; 77:4160-8.
19. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11:791-6.
20. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, et al. Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:9294-9.

21. Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N, et al. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313:42-7.
22. Tanabe Y, Sakamoto N, Enomoto N, et al. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- $\alpha$ . *J Infect Dis* 2004; 189:1129-39.
23. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37:911-7.
24. Martell M, Gomez J, Esteban JL, et al. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 1999; 37:327-32.
25. Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, et al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2003; 4:602-8.
26. Schmidt-Mende J, Bieck E, Hugle T, et al. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 2001; 276:44052-63.
27. Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 2001; 75:1252-64.
28. Lai VC, Dempsey S, Lau JY, Hong Z, Zhong W. In vitro RNA replication directed by replicase complexes isolated from the subgenomic replicon cells of hepatitis C virus. *J Virol* 2003; 77:2295-300.
29. O'Leary JG, Chan JL, McMahon CM, Chung RT. Atorvastatin does not exhibit antiviral activity against HCV at conventional doses: a pilot clinical trial. *Hepatology* 2007; 45:895-8.
30. Umehara T, Sudoh M, Yasui F, et al. Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346:67-73.



---

---

ウイルス性慢性肝炎：診断と治療の進歩

---

---

IV. C型慢性肝炎の抗ウイルス療法

1. インターフェロン療法の現況：標準治療のエビデンス

坂本 稔 櫻本 信幸

日本内科学会雑誌 第97巻 第1号別刷

2008年1月10日

## 1. C型慢性肝炎に対する治療の目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は、感染すると自然に排除される可能性は低く、その多く(70%程度)が持続感染する。宿主は、HCVを排除しようと免疫応答をおこすが、多くの場合不完全でHCVは排除されることなく、壊死炎症反応が持続する。この結果が慢性肝炎であり、壊死炎症の継続の結果、線維化は進展し肝硬変へと移行する。この間の線維化ステージを、新犬山分類によりF0(線維化なし)、F1(mild fibrosis)、F2(moderate fibrosis)、F3(severe fibrosis)、F4(肝硬変)に分けて評価すると、線維化の進展度は0.10~0.13 unit/年と計算されており、約10年で1ステージ進行することになる。また、この線維化ステージは肝発癌と密接に関連しており、わが国ではF0~1では0~0.5%、F2では1~2%の発癌率であるのに対し、F3では4~5%、F4では6~7%の発癌率であるとされている。すなわち肝線維化が軽度の場合の発癌率は低いものの、線維化が進行すると発癌率が上昇し肝細胞癌の高リスク状態になる。また、わが国の肝細胞癌による死亡者数は、年間約3万人に達し、悪性新生物による死亡の第3位を占め、このうち72%はHCV感染を背景としている。一方、治療介入によりHCVが排除されると、肝細胞癌の発癌率が低下することが報告されており、肝発癌抑制にはウイルス排除と肝線維化の進展予防が重要であると考えられている。したがって、C型肝炎に対する治療の目的は、HCVの排除と、これによる肝機能の正常化、肝硬変への進展予防と、これによってもたらされる肝発癌の抑制である。すなわち、HCVの排除が第1目標であり、これができない場合は、C型肝炎の進展予防と発癌抑制が次の目標となる。HCV排除を目的とした治療では、治療効果予測因子は、ウイルス側の因子として、遺伝子型(genotype)、ウイルス量、HCV遺伝子変異(ISDR:interferon

sensitivity determining region、コア領域変異)が、宿主側の因子としては、年齢、性別、肝線維化の程度、肝脂肪化の程度、BMI(body mass index)、LDL(low density lipoprotein)コレステロール値などがあげられている。

## 2. C型慢性肝炎に対する治療ガイドライン

C型肝炎に対する診療ガイドラインは、米国においては2002年に国立衛生研究所(NIH)、2004年に肝臓学会(AASLD)から示されているが、わが国においては、厚生労働省の研究事業として、「C型及びB型肝炎治療の標準化に関するガイドライン」(表1)として、初回投与(治療)と再治療とにわけてまとめられている<sup>1)</sup>。わが国ではHCV RNA量が100KIU/mlまたは1Meq/mlまたは300fmol/l以上を高ウイルス量とし、初回治療のgenotype 1かつ高ウイルス量症例では、PEG-IFN $\alpha$ 2b(ペグイントロン<sup>®</sup>)+ribavirin(レベトール<sup>®</sup>)併用療法(48週間)ないしはPEG-IFN $\alpha$ 2a(ペガシス<sup>®</sup>)+ribavirin(コペガス<sup>®</sup>)併用療法(48週間)、genotype 2かつ高ウイルス量症例ではPEG-IFN $\alpha$ 2b+ribavirin併用療法(24週間)を治療の基本としている。一方、低ウイルス量症例では、IFN単独療法とribavirin併用療法では治療効果にほとんど差がないことから、副作用が比較的少ないIFN単独療法が推奨されている。すなわちgenotype 1かつ低ウイルス量症例ではIFN単独療法(24週間)またはPEG-IFN $\alpha$ 2a(24~48週間)、genotype 2かつ低ウイルス量症例ではIFN単独療法(8~24週間)またはPEG-IFN $\alpha$ 2a(24~48週間)を基本としている。また、genotype 1かつ高ウイルス量以外の代償性肝硬変ではIFN- $\beta$ (フェロン<sup>®</sup>)を選択することを原則としている。さらに、ガイドラインの補足として、高ウイルス量症例、再投与例で、リバビリンの非推奨例ではIFN長期投与が必要であるとされ、治療中にHCV RNAの陰性化が得られない

## 1. C型慢性肝炎に対する治療の目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は、感染すると自然に排除される可能性は低く、その多く(70%程度)が持続感染する。宿主は、HCVを排除しようと免疫応答をおこなすが、多くの場合不完全でHCVは排除されることがなく、壊死炎症反応が持続する。この結果が慢性肝炎であり、壊死炎症の継続の結果、線維化は進展し肝硬変へと移行する。この間の線維化ステージを、新犬山分類によりF0(線維化なし)、F1(mild fibrosis)、F2(moderate fibrosis)、F3(severe fibrosis)、F4(肝硬変)に分けて評価すると、線維化の進展度は0.10~0.13 unit/年と計算されており、約10年で1ステージ進行することになる。また、この線維化ステージは肝発癌と密接に関連しており、わが国ではF0~1では0~0.5%、F2では1~2%の発癌率であるのに対し、F3では4~5%、F4では6~7%の発癌率であるとされている。すなわち肝線維化が軽度の場合の発癌率は低いものの、線維化が進行すると発癌率が上昇し肝細胞癌の高リスク状態になる。また、わが国の肝細胞癌による死亡者数は、年間約3万人に達し、悪性新生物による死亡の第3位を占め、このうち72%はHCV感染を背景としている。一方、治療介入によりHCVが排除されると、肝細胞癌の発癌率が低下することが報告されており、肝発癌抑制にはウイルス排除と肝線維化の進展予防が重要であると考えられている。したがって、C型慢性肝炎に対する治療の目的は、HCVの排除と、これによる肝機能の正常化、肝硬変への進展予防と、これによってもたらされる肝発癌の抑制である。すなわち、HCVの排除が第1目標であり、これができない場合は、C型肝炎の進展予防と発癌抑制が次の目標となる。HCV排除を目的とした治療では、治療効果予測因子は、ウイルス側の因子として、遺伝子型(genotype)、ウイルス量、HCV遺伝子変異(ISDR:interferon

sensitivity determining region, コア領域変異)が、宿主側の因子としては、年齢、性別、肝線維化の程度、肝脂肪化の程度、BMI(body mass index)、LDL(low density lipoprotein)コレステロール値などがあげられている。

## 2. C型慢性肝炎に対する治療ガイドライン

C型慢性肝炎に対する診療ガイドラインは、米国においては2002年に国立衛生研究所(NIH)、2004年に肝臓学会(AASLD)から示されているが、わが国においては、厚生労働省の研究事業として、「C型及びB型肝炎治療の標準化に関するガイドライン」(表1)として、初回投与(治療)と再治療とにわけてまとめられている<sup>1)</sup>。わが国ではHCV RNA量が $100\text{KIU/ml}$ または $1\text{Meq/ml}$ または $300\text{fmol/l}$ 以上を高ウイルス量とし、初回治療のgenotype 1かつ高ウイルス量症例では、PEG-IFN $\alpha$ 2b(ペグイントロン<sup>®</sup>) + ribavirin(レベトール<sup>®</sup>)併用療法(48週間)ないしはPEG-IFN $\alpha$ 2a(ペガシス<sup>®</sup>) + ribavirin(コペガス<sup>®</sup>)併用療法(48週間)、genotype 2かつ高ウイルス量症例ではPEG-IFN $\alpha$ 2b + ribavirin併用療法(24週間)を治療の基本としている。一方、低ウイルス量症例では、IFN単独療法とribavirin併用療法では治療効果にほとんど差がないことから、副作用が比較的少ないIFN単独療法が推奨されている。すなわちgenotype 1かつ低ウイルス量症例ではIFN単独療法(24週間)またはPEG-IFN $\alpha$ 2a(24~48週間)、genotype 2かつ低ウイルス量症例ではIFN単独療法(8~24週間)またはPEG-IFN $\alpha$ 2a(24~48週間)を基本としている。また、genotype 1かつ高ウイルス量以外の代償性肝硬変ではIFN- $\beta$ (フェロン<sup>®</sup>)を選択することを原則としている。さらに、ガイドラインの補足として、高ウイルス量症例、再投与例で、リバビリンの非推奨例ではIFN長期投与が必要であるとされ、治療中にHCV RNAの陰性化が得られない

表 1. C 型慢性肝炎の治療ガイドライン 初回投与

初回投与	Genotype 1	Genotype 2
高ウイルス量 1Meq/mL 100KIU/mL 300fmol/L 以上	Peg-IFN $\alpha$ 2b + Ribavirin (48 週間) Peg-IFN $\alpha$ 2a + Ribavirin (48 週間)	Peg-IFN $\alpha$ 2b + Ribavirin (24 週間)
低ウイルス量 1Meq/mL 100KIU/mL 300fmol/L 未満	IFN (24 週間) Peg-IFN $\alpha$ 2a (24 ~ 48 週間)	IFN (8 ~ 24 週間) Peg-IFN $\alpha$ 2a (24 ~ 48 週間)

Genotype 1, 高ウイルス量以外の代償性肝硬変には IFN- $\beta$ : Feron の投与を原則とする

#### C 型慢性肝炎の治療 (ガイドラインの補足)

1. 初回投与の高ウイルス量症例, 再投与例ではインターフェロンとリバビリンの併用療法が, 治療の基本である。
2. 高ウイルス量症例, 再投与症例でリバビリンの非推奨例ではインターフェロンの長期投与が必要である。
3. インターフェロン治療中に HCV-RNA の陰性化が得られない症例では, 肝機能正常化または発癌予防を目指した治療も検討する。

#### Genotype 1・高ウイルス量症例に対する Peg-IFN + リバビリン併用療法のガイドライン (補足)

- ① 12 週以内に RNA 陰性化例  
48 週併用療法で SVR を期待
- ② 13 週から 24 週までに RNA 陰性化例  
72 週の併用療法長期継続で SVR を目指す
- ③ 高齢, 合併症併存, Hb-WBC 低値例など通常量での治療では副作用中止が予測される症例  
減量開始, あるいは, 早期に減量して (48 週 ~ 72 週) 完遂を目指す
- ④ 24 週目で RNA 陽性かつ ALT 正常化例  
48 週の治療継続により長期 ALT 正常化維持を目指す

#### C 型慢性肝炎に対する再投与ガイドライン

##### インターフェロン再投与の原則

C 型慢性肝炎に対してインターフェロンの再投与は初回治療の無効の要因を検討し, 治療目的の治療か, 進展予防 (発癌予防) の少量長期療法を選択すべきである。

#### 血清 ALT 正常 C 型肝炎例への抗ウイルス治療ガイドライン

	血小板数 $\geq$ 15 万	血小板数 < 15 万
ALT $\leq$ 30IU/L	2 ~ 4 カ月毎に血清 ALT 値フォロー, ALT 異常を呈した時点で完治の可能性, 発癌リスクを評価し, 抗ウイルス療法を考慮。	線維化進展例がかなり存在する。可能なら肝生検を施行し F2A2 以上の例に抗ウイルス療法を考慮。
ALT 31 ~ 40IU/L	抗ウイルス療法の適応。	慢性肝炎治療に準じる。

遺伝子型, ウイルス量, 年齢などを考慮し, 通常の C 型肝炎治療に準じて, 治療法を選択する。

症例では肝機能正常化または肝発癌予防を目指した治療も検討することが明記されている。

一方, C 型慢性肝炎に再治療をおこなう場合には, 初回治療で無効となった要因 (副作用, 効

果, 投与期間等) を十分検討・考慮したうえでウイルス排除 (治療) 目的の治療あるいは, 進展予防 (発癌予防) の IFN 単独少量長期療法を選択することが原則とされている。また, 最近で

はHCV RNA陽性でALT正常のいわゆる「無症候性C型慢性肝炎ウイルスキャリア」に関しても、肝線維化の指標となる血小板が15万以下であると、肝線維化が進展している症例がかなり存在することから、ALTが31~40であっても慢性肝炎に準じた治療法が推奨され、ALT 30以下の症例でも肝生検で肝線維化の進展例や炎症が中等度以上の場合(F2A2以上)では抗ウイルス療法を考慮するよう薦められている。

### 3. 標準治療のエビデンス

#### 1) 海外における標準治療のエビデンス

欧米では、C型慢性肝炎に対する標準治療として、はやくからPEG-IFN+ribavirin併用48週間の治療が推奨されており、多くのエビデンスが得られている。このうちMannsらは、初回治療の1,530例を従来型のIFN $\alpha$ 2b+ribavirin併用群(IFN $\alpha$ 2b 3MU 週3回、ribavirin 1,000~1,200mg 連日)と、高用量PEG-IFN $\alpha$ 2b+ribavirin併用群(PEG-IFN $\alpha$ 2b 1.5 $\mu$ g/kg週1回、ribavirin 800mg 連日)、低用量PEG-IFN $\alpha$ 2b+ribavirin併用群(PEG-IFN $\alpha$ 2b 1.5 $\mu$ g/kg週1回4週間のうち、PEG-IFN $\alpha$ 2b 0.5 $\mu$ g/kg週1回44週、ribavirin 800mg)に無作為に割付けた成績を報告している。これによればgenotype 1のSVR率はそれぞれ33%、42%、34%であり、高用量のPEG-IFN $\alpha$ 2b+ribavirin療法の優位性を示している。また、ribavirinの投与量は10.6mg/kg/日以上で治療効果が高かったと報告している<sup>2)</sup>。また、Friedらは、初回治療1,121例をPEG-IFN $\alpha$ 2a+ribavirin併用群(IFN $\alpha$ 2a 180 $\mu$ g+ribavirin 1,000~1,200mg)、PEG-IFN $\alpha$ 2a+プラセボ群(IFN $\alpha$ 2a 180 $\mu$ g)、IFN $\alpha$ 2a+ribavirin(IFN $\alpha$ 2a 3MU週3回+ribavirin 1,000~1,200mg)の3群間に無作為に割付けた試験の成績を示している。これによればgenotype 1のSVR率はそれぞれ46%、21%、36%であった<sup>3)</sup>。

#### 2) わが国における標準治療のエビデンス

わが国においても、genotype 1かつ高ウイルス量症例に対して、48週間のPEG-IFN $\alpha$ 2b (1.5 $\mu$ g週1回)+ribavirin併用療法と24週間のIFN $\alpha$ 2b+ribavirin併用療法の無作為比較試験がおこなわれた。ribavirinの投与量はMannsらの報告に基づき、体重60kg以下は600mg/日、60kgを超え80kg以下は800mg/日、80kgを超えた場合は1,000mg/日とされた。これによれば、患者背景としてIFN抵抗性の要因を有する症例が広く分布していたのに関わらず、PEG-IFN+ribavirin併用療法のSVR率は47.6% (121/254)であり、従来のIFN $\alpha$ 2b+ribavirin療法のSVR率44.8% (113/252)を凌ぐ結果であった<sup>4)</sup>。さらに、後におこなわれた全国20施設による臨床試験では、SVR率が全体で57.8% (67/116)の成績であった。しかも治療完遂例では65.2% (60/92)のSVR率であるのに対し、投与中止例では29.1% (7/24)のSVR率にとどまることが報告され<sup>5)</sup>、副作用により中止・減量をさけつつ治療完遂することが好成績につながることを示している。また、PEG-IFN $\alpha$ 2a+ribavirin療法においても初回治療例200例を対象とした臨床試験がおこなわれた。これによればPEG $\alpha$ 2a (180 $\mu$ g、週1回)+ribavirin (600~1,000mg/日、連日)48週のSVR率は61% (60/99)で、PEG-IFN $\alpha$ 2a単独48週間治療のSVR率26% (26/101)に比較して良好な成績が得られている<sup>6)</sup>。

一方、genotype 1かつ高ウイルス量以外の症例に対するPEG-IFN $\alpha$ 2b+ribavirinの臨床試験(いわゆるOthers試験)もおこなわれている。この試験では、海外でのgenotype 2/3では短期間での治療でも十分であるとの報告にもとづき、24週間のPEG- $\alpha$ 2b (1.5 $\mu$ g/kg、週1回)+ribavirin (600~1,000mg/日、連日)治療とIFN $\alpha$ 2b+ribavirin療法との比較でおこなわれた。これによれば、SVR率は前者が87.3% (55/63)で後者の77.0% (47/61)に比較しての同等もしくは優位性(非劣性)が確認された<sup>7)</sup>。またPEG-IFN $\alpha$ 2a単独療

法 (180 $\mu$ g週1回48週)の成績は, genotype 2a/2bでは71%であった。

### 3) 治療効果規定因子

IFNによるウイルス学的治療効果は, 投与終了から少なくとも6カ月間HCVが持続陰性化していることをSVRとするのが一般的であるが, この方法では治療終了6カ月しないと効果判定ができないため, 副作用や合併症予防の観点や医療経済面から, 治療開始前もしくは投与開始早期に治療効果を予測することが重要である。治療開始前の治療効果予測因子としてはウイルス学的因子と宿主因子があるが, このうちウイルス側因子は重要かつ明白であり, HCVの遺伝子型(genotype)の2a, 2b, 1bの順に効きやすく, ウイルス量が多いほど効きにくいことはよく知られている。さらに, 1b型のなかでは, HCVのNS5A領域の40アミノ酸が, IFN単独療法の治療効果と密接に関連することがEnomotoらにより明らかにされ, この領域はISDR (interferon sensitivity determinant region)と命名されている。すなわち, この領域に変異のない野生型(wild type)ではIFN単独療法でSVRとなる可能性はきわめて低く, 4個以上変異のある変異型(mutant type)では極めて高いSVR率を示し, 1~3個変異のある中間型(intermediate type)ではこの中間のSVR率を示す<sup>8)</sup>。また, 宿主因子としては, 年齢・性・肝線維化などが治療成績に関連することが指摘されている。

一方, インターフェロン開始後の治療効果予測因子は, HCV RNA量の推移(HCV dynamics)により検討され, ウイルス陰性化時期と治療効果が相関することが知られている。Neumannらによれば, HCV dynamicsにはIFN投与24時間以内に急峻にHCV量が減少する第1相と, これに引き続き, 緩徐にウイルス量が減少する第2相とがあり, 第1相はIFNによるHCV感染肝細胞からのHCV産生・分泌抑制を示し, 第2相は感染肝細胞の排除とウイルス増殖抑制を表しているとされる<sup>9)</sup>。とくにPEG-IFNとribavirin併用

療法においては, 第2相のHCV減少率が最終的なSVRに関係することが報告され, 初期の治療反応性が最終的な治療効果予測に重要であるとされている。臨床的には, 治療開始4週間以内のHCV RNA陰性化(HCV RNA<50IU/ml)を超早期ウイルス効果 (rapid virologic response: RVR), 12週以内の陰性化ないしは投与開始前に比較して2log以上の低下を早期抗ウイルス効果 (early virologic response: EVR)とすることが提唱されている。Friedらの検討ではPEG-IFN $\alpha$ 2aとribavirin併用療法48週治療において, EVRが得られた症例の65% (253/390)がSVRとなったのに対し, 非EVR例ではSVRは3% (2/63)に過ぎなかったと報告している。一方, 治療開始12週目でHCV RNA陽性かつ24週で陰性化している症例 (slow virologic response) では, 72週間治療により48週間治療よりも投与終了後の再燃率が低く抑えられ (40%対64%), SVR率は17%から29%に向上したことがBergらにより報告されている<sup>10)</sup>。

### 4) Y-PERS共同研究参加施設の治療成績<sup>11)</sup>

以上のような検討の結果をふまえ, 当科および関連施設で組織する共同研究Y-PERS (Yamanashi-PEG-interferon $\alpha$ 2b-Ribavirin Study)で集積された成績を検討した。検討症例は523例であり, その内訳はPEG-IFN $\alpha$ 2b+リバビリン併用が393例, IFN $\alpha$ 2b+リバビリン併用が65例, PEG-IFN $\alpha$ 2aが55例, その他が12例であった。治療法の選択は原則としてわが国のガイドラインに従い, 個別の判断は各主治医による。患者背景は, 平均年齢55.4 $\pm$ 10.3 (19~80歳), 男性321例, 女性202例でありgenotypeは1bが341例 (65%), 2aが107例 (20%), 2bが72例 (14%), 混合型・分類不能型が3例 (1%)であった。

1bかつ高ウイルス量症例の検討では, PEG-IFN $\alpha$ 2b+ribavirin併用療法によるHCV RNA陰性化率は, 治療開始4週時点で10%, 治療開始12週時点で50%, 24週時点で76%であり,

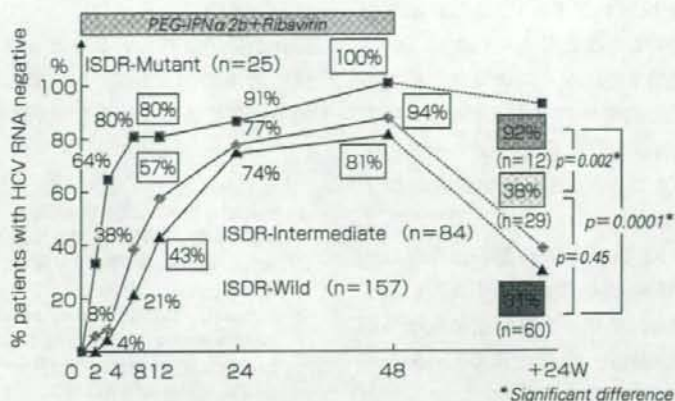


図 1b 症例のウイルス陰性化率 (1b 症例 n = 281)

表 2. PEG/Riba 治療 (1b) の SVR に寄与する因子 (多変量解析)

	odds ratio (95% CI)	p value
年齢 (< 60 歳/≥ 60 歳)	0.422 (0.148 ~ 1.203)	0.1066
肝線維化 (F1/F2 ~ 4)	0.317 (0.113 ~ 0.888)	0.0288
ISDR (変異数 < 2/≥ 2)	12.611 (2.764 ~ 57.536)	0.0011

(n = 100)

多変量ロジスティック回帰分析

48 週治療終了時の陰性化率 (ETR: end of treatment response) は 85% であり, SVR 率は 40% であった. PEG-IFN $\alpha$ 2b+リビラビン併用療法においては, 1) 60 歳以上, 2) 女性, 3) 肝線維化が F3/F4, 4) 投与前ウイルス量が 1,000KIU/ml 以上, 5) ISDR が野生型ないしは中間型の症例でウイルス陰性化が緩徐で, EVR にも差が見られ, これが最終的な治療効果 (SVR 率) にも影響していた. とくに, ISDR の野生型, 中間型, 変異型の SVR 率は, それぞれ 31%, 38%, 92% で変異型は他に比較して有意に SVR 率が高かった (図). これは, 治療早期のウイルス量の減少率に関係していると考えられ, コア蛋白定量法を用いて検討すると ISDR 変異型は野生型・中間型に比較して投与前開始 2 週間ないしは 4 週間のウイルス量の減少率が高く, 最終的な SVR に影響していることが示唆された. さらに, SVR に寄

与する因子について多変量ロジスティック回帰分析をおこなうと, 抽出された因子は年齢, 肝線維化 (F2 以上とそれ以外) と ISDR 変異数 (2 未満と 2 以上のみ) であり, このなかでも ISDR がもっとも強い因子であった (表 2). また, ISDR は治療開始前の HCV RNA と相関すること知られており, 変異型はウイルス量が少なく野生型はウイルス量が多い傾向にあったが, 多変量解析では RNA 量は ISDR に勝る因子ではなかった. さらに投与前のウイルス量を 1,000KIU 以上と未満に分けて検討しても, 同等のウイルス量群のなかでも, 変異型の効果が高いことが判明し上記を裏付けているものと思われた. また, これら ISDR と年齢・性別・肝線維化の関連について検討すると, 若年であれば ISDR が野生型でも SVR になるが, 高齢では ISDR が変異型ないしは中間型でないと SVR にはなり難く, 投与前の宿主因

子に加えISDRを検討することで、より詳細な治療効果が予測可能であると考えられた。

また、治療開始後の抗ウイルス効果とSVRの関連では、RVR達成例のSVR率は100%、EVR達成例では60%であったが、非EVR達成例のSVR率は8%に過ぎなかった。またRVR達成例の67%はISDR変異型であった。

また、genotype 2aおよび2b型の治療では、IFN $\alpha$ 2b、PEG-IFN $\alpha$ 2bいずれのIFNを用いたりバビリン療法でも、早期から良好な治療効果が得られ、HCV RNA陰性化率は、12週で89~94%、24週(ETR)で80~95%であった。しかし、2aと2bとを分けて考えると、若干ではあるが2b型では2a型に比較して治療効果が劣る傾向が見られた。

#### おわりに

C型肝炎は、年余にわたる病期の進行により肝細胞癌を高率に発症する。しかも肝硬変例は高齢者に多く発症率が高いうえにIFN治療効果も乏しい。したがって慢性肝炎のうちにウイルスを排除し確実にC型慢性肝炎をコントロールすることが重要である。とくに現在標準治療とされるPEG-IFN + ribavirin併用療法では、その治療成績が飛躍的に向上し70%がウイルス学的に治癒可能とされている。しかし、現在のIFNを中心とした抗ウイルス療法には限界があることも事実で、わが国に多いgenotype 1型感染者や高齢者や女性において治療成績が劣っている。しかもこれら症例では副作用が問題となることが多い。したがって現時点では、個々の症例に応じて、より治療効果の高い治療法を選択し、治療完遂をめざして投与方法や投与期間の微調整をおこなう

ことが重要である。今後は、すでに一部で臨床試験が開始されている、まったく新しい機序の抗HCV薬の開発が進み、臨床応用によって治療効果が高まることが期待される。

#### 文 献

- 1) 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(肝炎分野)。B型及びC型肝炎ウイルスの感染者に対する治療の標準化に関する臨床的研究総括分担報告書
- 2) Manns MP, et al: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358 (9286): 958-965, 2001.
- 3) Fried NW, et al: Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347(13): 975-982, 2002.
- 4) 飯野四郎, 他: Genotype 1 かつ高ウイルス量のC型慢性肝炎に対するPEG-インターフェロン $\alpha$ -2bとリバビリン48週併用療法の有効性. *肝胆膵* 49: 1121, 2004.
- 5) 平松直樹, 他: ウイルス遺伝子型の違いによる治療法の実際. Genotype 1 かつ高ウイルス量症例—臨床薬理試験から. *肝胆膵* 53: 9-14, 2006.
- 6) 堺 隆弘: ベガシスとリバビリンの併用療法. *肝胆膵* 52: 75-84, 2006.
- 7) 熊田博光, 他: Genotype 1 低ウイルス量, あるいはgenotype 2 のC型慢性肝炎に対するPEG-インターフェロン $\alpha$ -2bとリバビリン24週併用療法との比較. *肝胆膵* 52: 645-663, 2006.
- 8) Enomoto N, et al: Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334(2): 77-81, 1996.
- 9) Neumann AU, et al: Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon alpha therapy. *Science* 282: 103-107, 1998.
- 10) Berg T, et al: Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 130: 1086-1097, 2006.
- 11) 坂本 稔, 榎本信幸: ISDRと初期抗ウイルス効果からみた治療効果. *コンセンサス肝疾患2007 B型肝炎・C型肝炎*. 坪内博仁監修, 岡上 武, 他編. 日本メディカルセンター東京, 2007, 96-101.



## C型肝炎治療 up to date

# C型慢性肝炎

## — HCV 遺伝子変異と治療効果 —

坂本 穰 (山梨大学肝疾患地域先端医療システム学講座講師)

榎本信幸 (山梨大学医学部第1内科教授)

### Point

- インターフェロンは単独ないしはリバビリン併用で用いられるが、その治療効果はHCVの遺伝子型、ウイルス量と関連し、治療効果と関連した遺伝子変異も存在することが明らかになっている。
- インターフェロン単独療法に1b型においては、NS5A領域の40アミノ酸が治療効果と密接に関連することがEnomotoらにより明らかにされ、この領域はISDRと命名された。ISDRはウイルス量によらず、独立した因子として治療効果を規定していた。
- Akutaらは、コア領域の70番目と91番目のアミノ酸に変異がみられるとインターフェロン治療効果が劣り、特に50歳以上の女性ではその傾向が顕著であることを報告している。
- コア蛋白は、ゲノムと結合しヌクレオカプシドを形成するほか、細胞内シグナル伝達や、ウイルス粒子の形成にも関与すると考えられており、今後の研究が待たれる。

C型肝炎ウイルスは、遺伝子変異に富むウイルスであり、数多くの遺伝子型が存在し、インターフェロン治療効果が異なっている。このほかウイルスの複製・増殖と関連した遺伝子変異が

明らかになっているほか、臨床的に用いられるインターフェロン治療効果と関連した遺伝子変異が明らかになっている。

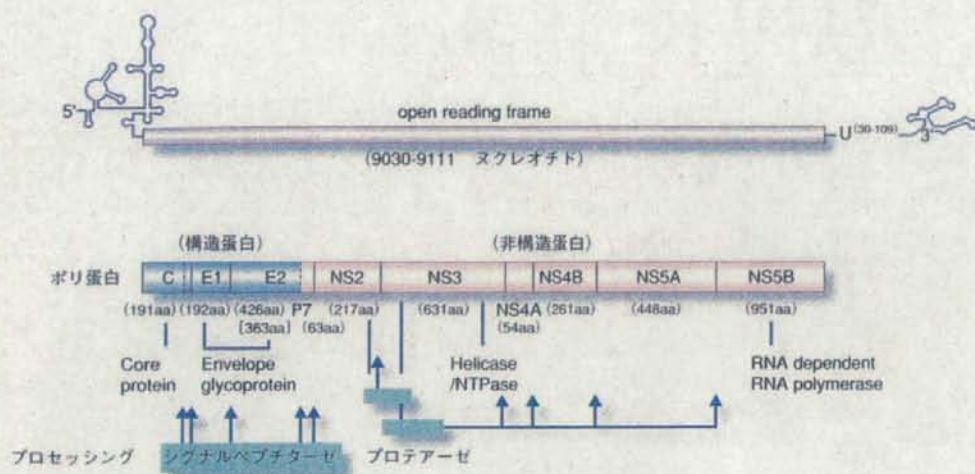


図1 HCVの遺伝子構造 (雨宮史武, 榎本信幸, C型肝炎ウイルス, ウイルス肝炎update, 白鳥康史, 編, 東京: 中外医学社; 2005, p179, より引用)

## C型肝炎ウイルスの 遺伝子構造

C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) は、Flavivirus 科の Hepacivirus 属の約9,500塩基対よりなる+鎖1本鎖のRNAウイルスである。ゲノムの5'末端と3'末端には短い非翻訳領域 (untranslated region; UTR) があり、中央部には約3,010個のアミノ酸からなる1本のポリ蛋白前駆体をコードする領域 (open reading region) が存在している。5'-UTRは翻訳開始機構を担い、3'-UTRは遺伝子複製を制御している。中央部の領域には3種のウイルスの主要な構成蛋白 (Core、Envelope-1、Envelope-2) をコードする領域と、ウイルス増殖に必要な7種の非構造蛋白をコードする領域 (p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、

NS5B) が存在する (図1)。

HCVはRNAウイルスで、誤って取り込んだ塩基を修正する機構をもたないため、遺伝子変異速度が速く、その変異率は $1.44 \sim 1.92 \times 10^{-3}$ 塩基/年と算定されている<sup>1)</sup>。すなわちHCV全塩基のうち10個近くが毎年置き換わるということである。この遺伝的多様性のため、遺伝子型が多数存在し、全塩基配列がそれぞれ20%程度異なる genotype 1~6に分類され、さらに subtype (a、b、c...) に細分化されている。この異なる遺伝子型のHCVの分布は地域ごとに大きく異なるが、世界に広く分布するのは1a、1b、2a、2b、3aのみであり、わが国では1bは約70%、2aが約20%、2bが約10%を占めている<sup>2)</sup>。

また、同一遺伝子型のHCV内でも、きわめて変異に富む超可変領域

(hypervariable region; HVR) とよばれる領域が存在し、その変異速度はHCV全体に比べ10倍程度と推測されている。この領域はウイルス粒子の表面のアミノ酸をコードし、細胞傷害性T細胞や特異抗体などの宿主免疫応答から逃避するために存在していると考えられている。また、感染した同一個体内でも、異なる変異を有するHCVが種々存在する“quasispecies”とよばれる集合体を形成しており、持続感染の成立やインターフェロンの治療効果に関与していると考えられている<sup>3,4)</sup>。

## インターフェロン治療 効果に関与する遺伝子 変異

インターフェロンは宿主の免疫応答に関与するさまざまな遺伝子を誘導し

遺伝子型genotype	1b	2a	2b
ウイルス量			
1Meqまたは100KIU/mL以上	8% (6/87)	53% (10/19)	69% (9/13)
1Meqまたは100KIU/mL未満	38% (29/77)	90% (27/30)	53% (9/17)

表1 C型慢性肝炎におけるIFN単独療法  
のSVR率(n=243)(山梨大学第1内科)

てHCVを排除する。現在、インターフェロンは単独ないしはリバビリン(Ribavirin)併用で用いられるが、その治療効果はHCVの遺伝子型、ウイルス量と関連し、治療効果と関連した遺伝子変異も存在することが明らかになっている。

遺伝子型では、わが国においては2a型が最も感受性が高く、2b、1bの順に感受性が低下し、ウイルス量は少ないほど治療効果が高い。従来の、インターフェロン単独6ヵ月間治療のウイルス排除率(sustained virologic response; SVR)は、最も治療効果の高い2a型かつ低ウイルス量症例で90%、最も治療効果の低い1b型かつ高ウイルス量(100KIU/mLまたは1Meq/mL)症例ではわずか8%であった(表1)。最近、高ウイルス量症例ではリバビリンを併用し、ポリエチレンコールを共有結合して半減期を延長したペグインターフェロン(PEG-IFN)の使用が第一選択となり、治療効果も格段に向上したが、最も難治の1b型かつ高ウイルス量症例では、SVR率は50%に満たない。

治療効果に関連した遺伝子変異は、インターフェロン単独療法に1b型においては、NS5A領域の40アミノ酸が治療効果と密接に関連することがEnomotoらにより明らかにされ、この

領域はISDR(interferon sensitivity determining region)と命名された。すなわち、この領域に変異のない野生型(wild type)ではIFN単独療法ではSVRとなる可能性はきわめて低く、4個以上の変異がある変異型(mutant type)ではきわめて高いSVR率を示し、1~3個の変異がある中間型(intermediate type)ではこの中間のSVR率を示す<sup>5,6)</sup>。このISDRはdouble strand RNA-active protein kinase(PKR)-binding domainのN末端側に位置し、ウイルス増殖にも関与している部位と考えられる。臨床的には、野生型では、ウイルス量が多く、変異型ではウイルス量は低く、ISDRの変異数が増すほどウイルス量は減少する。また、しかし、治療効果についてこれら因子を加えて多変量解析を行なうと、ISDRはウイルス量によらず、独立した因子として治療効果を規定していた。

### ペグインターフェロン/ リバビリン併用療法における 治療効果と遺伝子変異

以上のような検討をふまえ、われわれは、ペグインターフェロン/リバビリン併用療法における治療効果と遺伝子変異について、当科および関連施設で組織する当科および関連施設で組織す

る共同研究Y-PERS(Yamanashi-PEG-interferon α 2b-Ribavirin Study)で集積された症例で検討した。現在ペグインターフェロン/リバビリン併用療法は初回治療の場合、高ウイルス量のみに限られるが、1b型に対する48週治療、2a型および2b型の24週治療のSVR率はそれぞれ45%(63/140)、77%(17/22)、68%(13/19)であった(図2)。ISDR別の治療効果は、この領域のアミノ酸変異がまったくない野生型では37%(29/78)であるのに対し、1~3個の変異がある中間型では44%(19/43)、4個以上の変異がある変異型では80%(12/15)であり、変異型が中間型や野生型に比して有意にSVR率が高かった(図3)。この理由は、ISDRが治療早期のウイルス量の減少と関係しているためと考えられている。これを、コア蛋白定量法を用いて検討すると、ISDR変異型では野生型・中間型に比較して投与開始2週間ないしは4週間のウイルス量の減少率が高く、12週以内のウイルス消失(early virologic response; EVR)に影響していた。臨床的には治療開始早期のウイルス消失ないしは減少速度と最終治療効果は相関し、4週以内のウイルス消失(rapid virologic response; RVR)やEVRは、治療効果(SVR)予測する重要な因子とされている。すなわち1b型

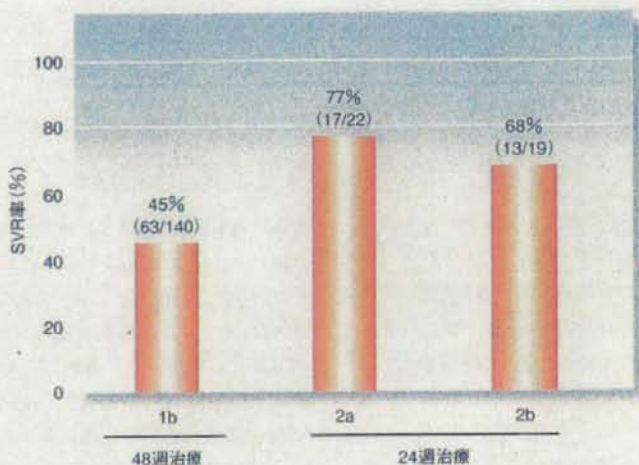


図2 ベグインターフェロン/リバビリン併用療法におけるgenotypeとSVR率(いずれも高ウイルス量のみ)

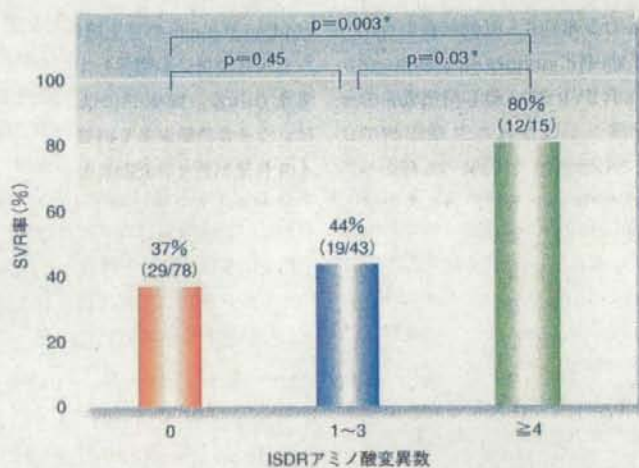


図3 ベグインターフェロン/リバビリン併用療法におけるISDRとSVR率(1b症例 n=140)

\*: 有意差あり。

高ウイルス量症例ではEVRが得られた症例では48週間の治療により高率にSVRとなるが、それ以外の症例ではSVRは期待できない。したがってHCVのインターフェロン反応性はウイルス

ダイナミクスにより判定することが可能であるが、これは、ISDRとも強く関連しているということである。さらにSVRに寄与する因子について宿主側の因子を含めて、多変量ロジスティック

回帰分析を行うと、抽出された因子は年齢、肝線維化(F2以上とそれ以外)、HCVコア蛋白量とISDR変異数(2未満と2以上のみ)のみであり、このなかでもISDRが最も強い因子であった(表2)。