

### Real-time RT-PCR analysis

Total cellular RNA was extracted from cultured cells or liver tissue using ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan). Total cellular RNA (2 µg) was used to generate cDNA from each sample using the SuperScript II reverse-transcriptase (Invitrogen). The mRNA expression levels were measured using the Light Cycler PCR and detection system (Roche, Mannheim, Germany) and Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green 1 mix (Roche).

### Luciferase assays

Luciferase activity was measured using a luminometer, Lumat LB9501 (Promega) and the Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega) or the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega).

### Northern and western hybridization

Total cellular RNA was separated by denaturing agarose-formaldehyde gel electrophoresis, and transferred to a nylon membrane. The membrane was hybridized with a digoxigenin-labeled probe specific for the full-length replicon sequence, and subsequently with a probe specific for beta-actin. The signals were detected by chemiluminescence reaction using a Digoxigenin Luminescent Detection Kit (Roche), and visualized by Fluoro-Imager (Roche). For the western blotting, 10 µg of total cell lysate was separated on NuPAGE 4.12% Bis-TrisGel (Invitrogen), and blotted onto an Immobilon PVDF Membrane (Roche). The membrane was incubated with monoclonal antibodies specific for HCV-NS5A (BioDesign, Saco, ME, USA), NS4A (Virogen, Watertown, MA, USA), or beta-actin (Sigma), and detected by a chemiluminescence reaction (BM Chemiluminescence Blotting Substrate; POD, Roche).

### Transient-replication assays

A replicon, pRep-Fluc, was transfected into cells and the luciferase activities of the cell lysates were measured serially. To correct the transfection efficiency, each value was divided by the luciferase activity at 4 h after the transfection.

### Stable colony formation assays

Cells were transfected with a replicon, pRep-BSD, and were cultured in the presence of 150 µg/mL of BSD (Invitrogen). BSD-resistant cell colonies appeared after ~3 weeks of culture, and were counted.

### HCV-JFH1 virus cell culture

An *in-vitro* transcribed HCV-JFH1 RNA<sup>26</sup> was transfected into Huh7.5.1 cells.<sup>27</sup> Naive Huh7.5.1 cells were subsequently infected by the culture supernatant of the JFH1-RNA transfected Huh-7.5.1 cells, and subjected to siRNA or drug treatments. Replication levels of HCV-RNA were quantified by the realtime RT-PCR by using primers that targeted HCV-NS5B region, HCV-JFH1 sense: 5'-TCA GAC AGA GCC TGA GTC CA-3', and HCV-JFH1 anti-sense: 5'-AGT TGC TGG AGG GCT TCT GA-3'.

### Mice and adenovirus infection

Transgenic mice, CN2-29, inducibly express mRNA for the HCV structural proteins (genotype1b, nucleotides 294–3435) by the Cre/*loxP* switching system.<sup>28</sup> The transgene does not contain full-length HCV 5'-UTR, but shares the target sequence of the shRNA-HCV. Although the transgenic mouse CN2 has been previously reported as expressing higher levels of the viral proteins, the expression levels of the viral core protein in the CN2-29 mice are modest and similar to that in the liver of HCV patients. Thus, we chose CN2-29 mice in the present study.

The mice were infected with AxshRNA-HCV or controls (AxshRNA-Control or AxCAw1) in combination with AxCAN-Cre, which expressed Cre recombinase. Three days after the infection, the mice were killed and HCV core protein in the liver was measured as described below. The BALB/c mice were maintained in the Animal Care Facility of Tokyo Medical and Dental University, and transgenic mice were in the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science. Animal care was in accordance with institutional guidelines. The review board of the university approved our experimental animal studies and all experiments were approved by the institutional animal study committees.

### Measurement of HCV core protein in mouse liver

The amounts of HCV core protein in the liver tissue from the mice was measured by a fluorescence enzyme immunoassay (FEIA)<sup>29</sup> with a slight modification. Briefly, the 5F11 monoclonal anti-HCV-core antibody was used as the first antibody on the solid phase, and the 5E3 antibody conjugated with horseradish peroxidase was the second antibody. This FEIA can detect as little as 4 pg/mL of recombinant HCV-core protein. Contents of the HCV core protein in the liver samples were normalized by the total protein contents and expressed as pg/mg total protein.

### Immunohistochemical staining

Liver tissue was frozen with optimal cutting temperature (OTC) compound (Tissue Tek; Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan). The sections (8 µm thick) were fixed with a 1:1 solution of acetone : methanol at -20°C for 10 min and then washed with phosphate-buffered saline (PBS). Subsequently, the sections were incubated with the IgG fraction of an anti-HCV core rabbit polyclonal antibody (RR8)<sup>28</sup> in blocking buffer or antialbumin rabbit polyclonal antibody (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) in PBS overnight at 4°C. The sections were incubated with secondary antibody, Alexa-antirabbit IgG (Invitrogen) or TRITIC-antirabbit IgG (Sigma), for 2 h at room temperature. Fluorescence was observed using a fluorescence microscope.

### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Student's *t*-test; *P*-values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

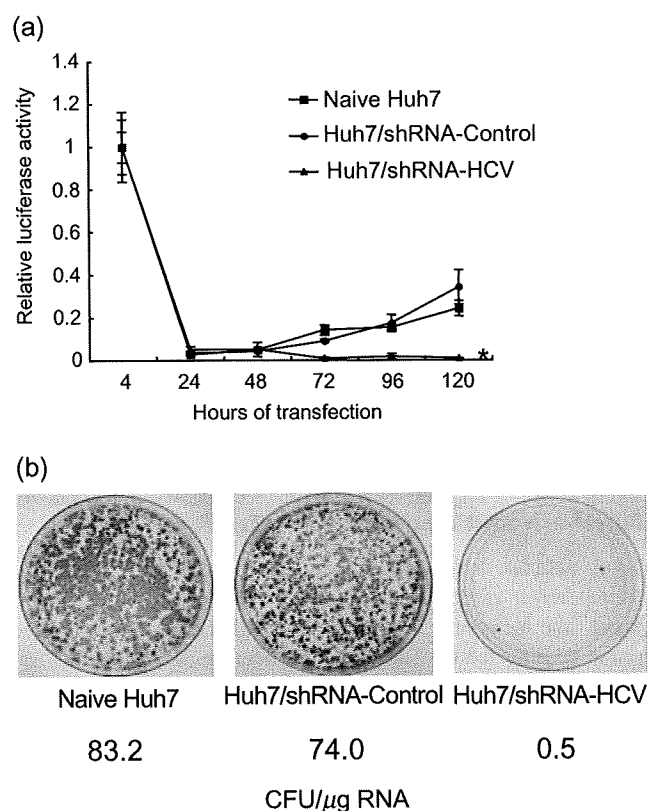
## Results

### Retrovirus transduction of shRNA can protect from HCV replication

Retrovirus vectors propagated from pLNCshRNA-HCV and pLNCshRNA-Control were used to infect Huh7 cells, and cell lines were established that constitutively express shRNA-HCV and shRNA-Control (Huh7/shRNA-HCV and Huh7/shRNA-Control, respectively). There were no differences in the cell morphology or growth rate between shRNA-transduced and non-transduced Huh7 cells (data not shown). The HCV replicon, pRep-Fluc, was transfected into Huh7/shRNA-HCV, Huh7/shRNA-Control and naive Huh7 cells by electroporation. In Huh7/shRNA-Control and naive Huh7 cells, the initial luciferase activity at 4 h decreased temporarily, which represents decay of the transfected replicon RNA, but increased again at 48 h and 72 h, which demonstrate *de novo* synthesis of the HCV replicon RNA. In contrast, transfection into Huh7/shRNA-HCV cells resulted in a decrease in the initial luciferase activity, reaching background by 72 h (Fig. 3a). Similarly, transfection of the replicon, pRep-BSD, into Huh7 cells and BSD selection yielded numerous BSD-resistant colonies in the naive Huh7 (832 colonies) and Huh7/shRNA-Control cell lines (740 colonies), while transfection of Huh7/shRNA-HCV, which expressed shRNA-HCV, yielded obviously fewer colonies (five colonies), indicating reduction of colony forming units by  $\sim 10^2$  (Fig. 3b). There was no difference in shape, growth or viability between cells expressing the shRNA or not. These results indicated that cells expressing HCV-directed shRNA following retrovirus transduction acquired resistance to HCV replication.

### Effect of recombinant adenoviruses expressing shRNA on *in vitro* HCV replication

We investigated subsequently the effects of recombinant adenovirus vectors expressing shRNA. AxshRNA-HCV and AxshRNA-Control were used separately to infect Huh7/pRep-Feo cells, and the internal luciferase activities were measured sequentially (Fig. 4a). AxshRNA-HCV caused continuous suppression of HCV RNA replication. Six days postinfection, the luciferase activities fell to background levels. In contrast, the luciferase activities of the Huh7/pRep-Feo cells infected with AxshRNA-Control did not show any significant changes compared with untreated Huh7/pRep-Feo cells (Fig. 4a). The dimethylthiazol carboxymethoxyphenyl sulfophenyl tetrazolium (MTS) assay showed no significant difference between cells that were infected by recombinant adenovirus and uninfected cells (Fig. 4b). In the northern blotting analysis, the cells were harvested 6 days after infection with the adenovirus at an MOI of 1. Feo-replicon RNA of 9.6 kb, which was detectable in the untreated Huh7/pRep-Feo cells and in the cells infected with AxshRNA-Control, diminished substantially following infection with the AxshRNA-HCV (Fig. 4c). Densitometries showed that the intracellular levels of the replicon RNA in the Huh7/pRep-Feo cells correlated well with the internal luciferase activities. Similarly in the western blotting, cells were harvested 6 days after infection with adenovirus. Levels of the HCV NS4A and NS5A proteins that were translated from the HCV replicon decreased following infection with the AxshRNA-HCV

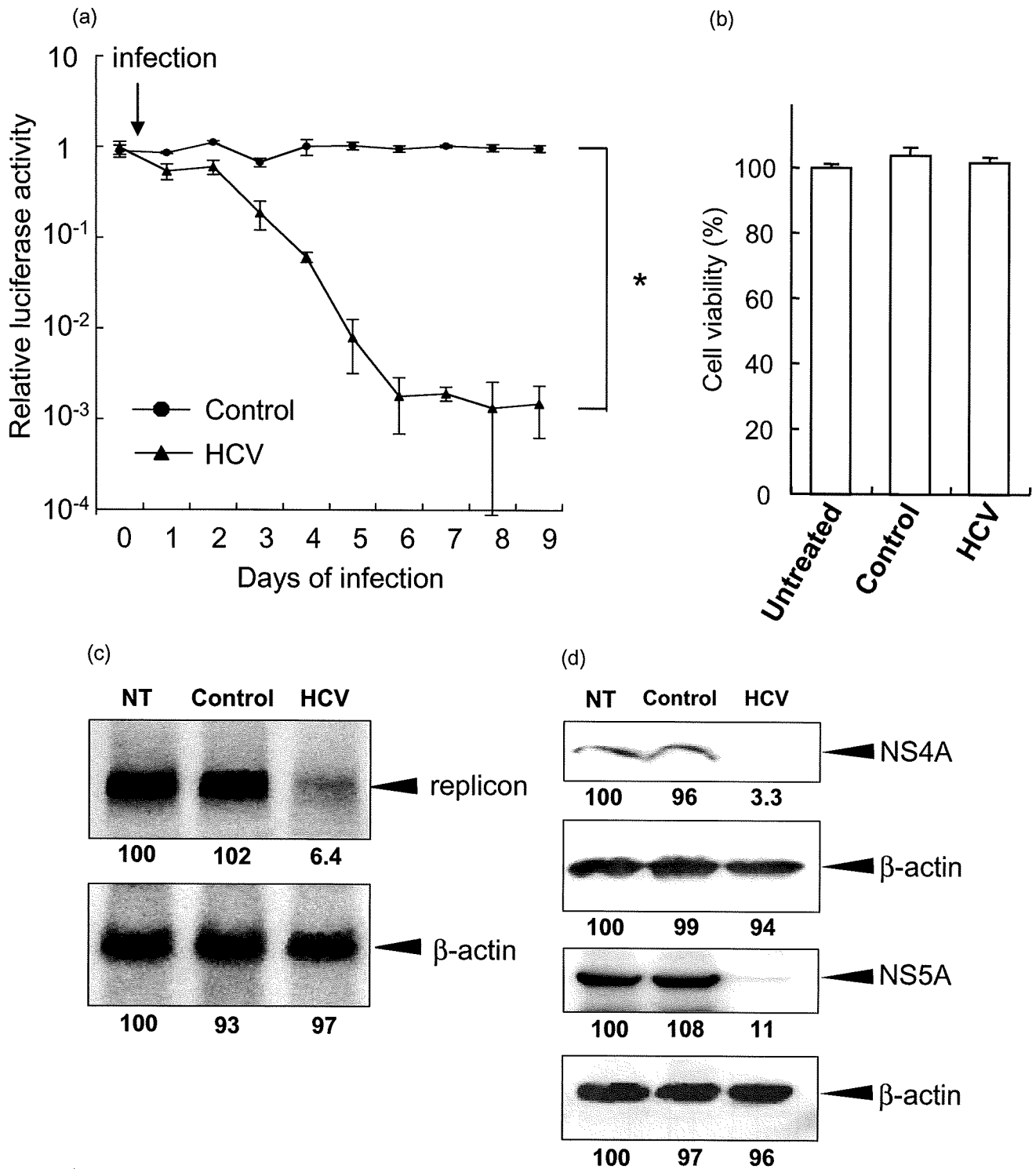


**Figure 3** HCV replication can be inhibited by shRNA-HCV which was stably transfected into cells. Huh7/shRNA-HCV and Huh7/shRNA-Control stably express shRNA-HCV or shRNA-Control, respectively, following retroviral transduction. (a) Transient replication assay. An HCV replicon RNA, pRep-Fluc, was transfected into naive Huh7, Huh7/shRNA-HCV and Huh7/shRNA-Control cells. Luciferase activities of the cell lysates were measured serially at the times indicated, and the values were plotted as ratios relative to luciferase activities at 4 h. The luciferase activities at 4 h represent transfected replicon RNA. The data are mean  $\pm$  SD. An asterisk denotes a *P*-value of less than 0.001 compared with the corresponding value of the naive Huh7 cells. (b) Stable colony formation assay. The HCV replicon, pRep-BSD, was transfected into naive Huh7, Huh7/shRNA-HCV and Huh7/shRNA-Control cells. The cells were cultured in the presence of blasticidin S (BSD) in the medium for  $\sim 3$  weeks, and the BSD-resistant colonies were counted. These assays were repeated twice. The colony-forming units per microgram RNA (CFU/ $\mu$ g RNA) are shown at the bottom.

(Fig. 4d). These results indicated that the decrease in luciferase activities was due to specific suppressive effects of shRNA on expression of HCV genomic RNA and the viral proteins, and not due to non-specific effects caused by the delivery of shRNA or to toxicity of the adenovirus vectors.

### Absence of interferon-stimulated gene responses by siRNA delivery

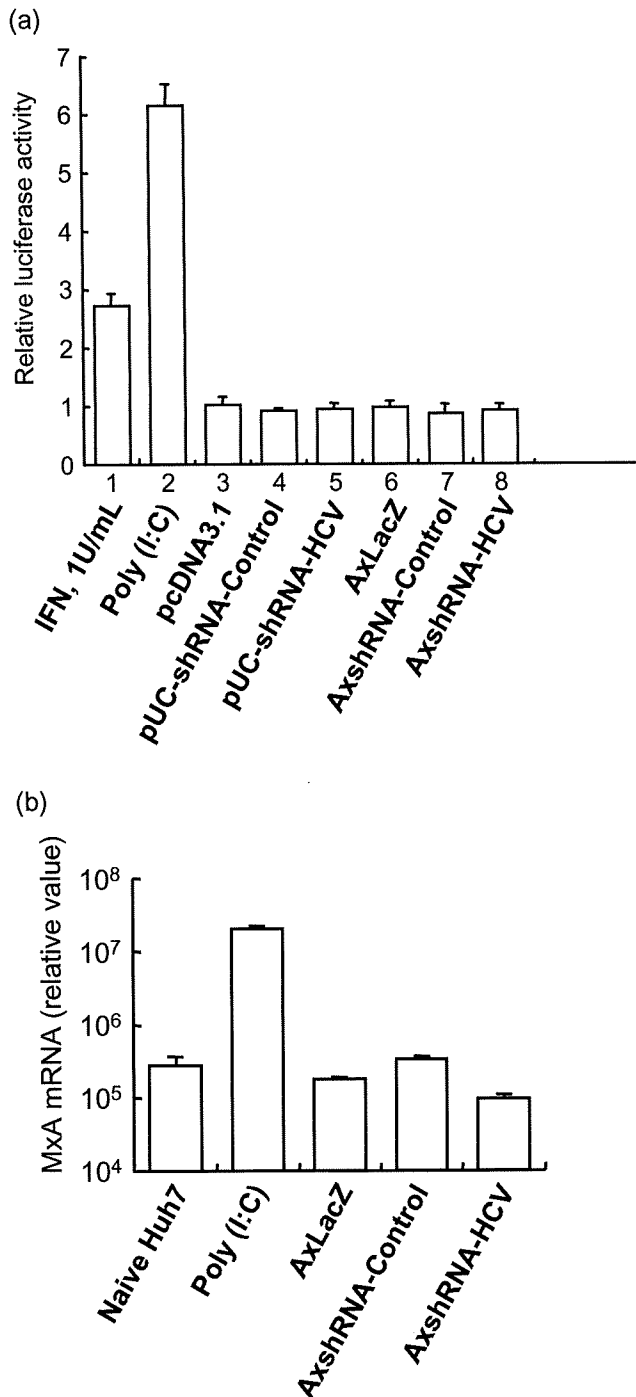
It has been reported that double-stranded RNA may induce interferon-stimulated gene (ISG) responses which cause instability of mRNA, translational suppression of proteins and apoptotic cell



death.<sup>18,30,31</sup> Therefore, we examined the effects of the shRNA-expressing plasmids and adenoviruses on the activation of ISG expression in cells. The ISRE-reporter plasmid, pISRE-TA-Luc, and a control plasmid, pGFPneo, were transfected into Huh7 cells

with plasmid pUC19-shRNA-HCV or pUC19-shRNA-Control, or adenovirus, AxshRNA-HCV or AxshRNA-Control, and the ISRE-mediated luciferase activities were measured. On day 2, the ISRE-luciferase activities did not significantly change in cells in which

**Figure 4** Effect of a recombinant adenovirus expressing shRNA on HCV replicon. (a) Huh7/pRep-Feo cells were infected with AxshRNA-HCV or shRNA-Control at a multiplicity of infection (MOI) of 1. The cells were harvested, and internal luciferase activities were measured on day 0 though day 9 after adenovirus infection. Each assay was done in triplicate, and the value is displayed as a percentage of no treatment and as mean  $\pm$  SD. An asterisk indicates a *P*-value of less than 0.05. (b) Dimethylthiazol carboxymethoxyphenyl sulfophenyl tetrazolium (MTS) assay of Huh7/pRep-Feo cells. Cells were infected with indicated recombinant adenoviruses at an MOI of 1. The assay was done at day 6 of infection. Error bars indicate mean  $\pm$  SD. (c) Northern blotting. The upper panel shows replicon RNA, and the lower panel shows beta-actin mRNA. (d) Western blotting. Total cell lysates were separated on NuPAGE gel, blotted and incubated with monoclonal anti-NS4A or anti-NS5A antibodies. The membrane was re-blotted with antibeta-actin antibodies. NT, untreated Huh7/pRep-Feo cells; Control, cells infected with AxshRNA-Control; HCV, cells treated with AxshRNA-HCV. In panels (b) and (c), cells were harvested on day 6 after adenovirus infection at an MOI of 1.

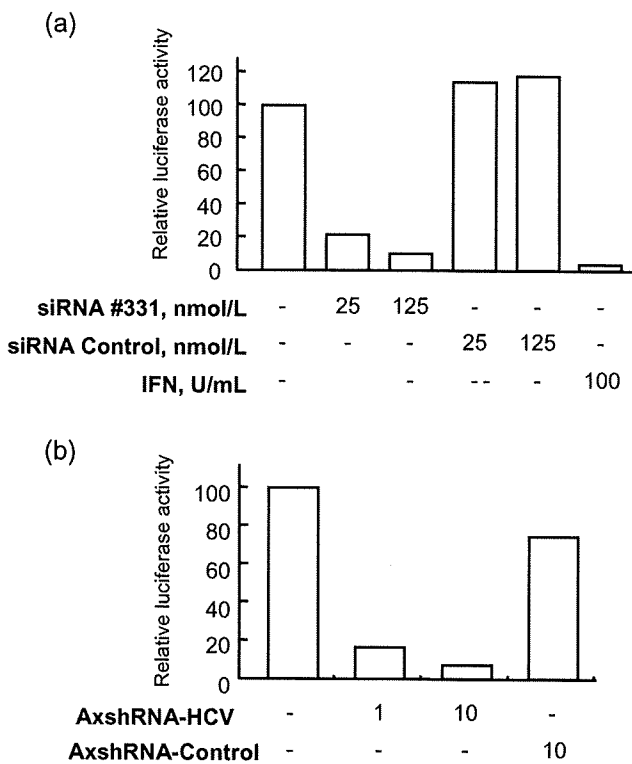


**Figure 5** Interferon-stimulated gene responses by transfection of siRNA vectors. (a) Huh7 cells were seeded at  $5 \times 10^4$  per well in 24-well plates on the day before transfection. As a positive control, 200 ng of pSRE-TA-Luc, or pTA-Luc, 1 ng of pRL-CMV, were transfected into a well using FuGENE-6 Transfection Reagent (Roche), and the cells were cultured with 1 U/mL of interferon (IFN) in the medium (lane 1). Lanes 3–5: 200 ng of pSRE-TA-Luc or pTA-Luc, and 1 ng of pRL-CMV were cotransfected with (lane 2) 300 ng of poly (I : C), or 200 ng of plasmids (lane 3) pcDNA3.1, (lane 4) pUC19-shRNA-Control or (lane 5) pUC19-shRNA-HCV. Lanes 6–8: 200 ng of pSRE-TA-Luc or pTA-Luc, and 1 ng of pRL-CMV were transfected, and MOI = 1 of adenoviruses, (lane 6) AxLacZ, which expressed the beta-galactosidase (LacZ) gene under control of the chicken beta-actin (CAG) promoter as a control, (lane 7) AxshRNA-Control or (lane 8) AxshRNA-HCV were infected. Dual luciferase assays were performed at 48 h after transfection. The Fluc activity of each sample was normalized by the respective Rluc activity, and the respective pTA luciferase activity was subtracted from the pSRE luciferase activity. The experiment was done in triplicate, and the data are displayed as means  $\pm$  SD. (b) Huh7 cells were infected with indicated recombinant adenoviruses, AxLacZ, AxshRNA-Control and AxshRNA-HCV. RNA was extracted from each sample at day 6, and mRNA expression levels of an interferon-inducible MxA protein were quantified by the real-time RT-PCR analysis. Primers used were as follows: human MxA sense, 5'-CGA GGG AGA CAG GAC CAT CG-3'; human MxA antisense, 5'-TCT ATC AGG AAG AAC ATT TT-3'; human beta-actin sense, 5'-ACA ATG AAG ATC AAG ATC ATT GCT CCT CCT-3'; and human beta-actin antisense, 5'-TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC-3'.

negative- or positive-control shRNA plasmids was transfected. (Fig. 5a). Similarly, the expression levels of an interferon-inducible MxA protein did not significantly change by transfection of shRNA-expression vectors (Fig. 5b). These results demonstrate that the shRNA used in the present study lack induction of the ISG responses both in the form of the expression plasmids and the adenovirus vectors.

**Effect of siRNA and shRNA adenoviruses on HCV-JFH1 cell culture**

The effects of HCV-targeted siRNA- and shRNA-expressing adenoviruses were confirmed by using HCV-JFH1 virus cell culture system. Transfection of the siRNA #331<sup>14</sup> into HCV-infected Huh7.5.1 cells resulted in substantial decrease of intracellular HCV RNA, while a control siRNA showed no effect (Fig. 6a). Similarly, infection of AxshRNA-HCV into Huh7.5.1/HCV-JFH1 cells specifically suppressed expression of HCV RNA (Fig. 6b).



**Figure 6** Effects of an siRNA and adenovirus expressing shRNA on HCV-JFH1 cell culture. (a) The siRNA #331, the siRNA-Control<sup>14</sup>, (b) AxshRNA-HCV or AxshRNA-Control were, respectively, transfected or infected onto HV-JFH1-infected Huh7.5.1 cells. Seventy-two hours of the transfection or infection, expression level of HCV-RNA was quantified by real-time RT-PCR. The assays were repeated twice, and consistent results were obtained. IFN, recombinant interferon-alpha 2b.

### Suppression of HCV-IRES-mediated translation *in vivo* by adenovirus expressing shRNA

The effects of the shRNA expression on the expression of the viral structural proteins *in vivo* were investigated using conditional HCV cDNA-transgenic mice, CN2-29.<sup>28</sup> Adenoviruses, AxshRNA-HCV, AxshRNA-Control or AxCAw1 were injected into CN2-29 mice in combination with AxCANCre, an adenovirus expressing *Cre* DNA recombinase. The mice were killed on the fourth day after the injection, and the hepatic expression of the HCV core protein was measured. The expressed amounts of the core protein were  $143.0 \pm 56.2$  pg/mg and  $108.5 \pm 42.4$  pg/mg in AxCAw1 and AxshRNA-Control-infected mice, respectively, and the expressed amount was significantly lower in mice injected with AxshRNA-HCV ( $28.7 \pm 7.0$  pg/mg,  $P < 0.05$ , Fig. 7a). Similarly, the induced expression of HCV core protein was not detectable by immunohistochemistry in AxshRNA-HCV infected liver tissue (Fig. 7c). Staining of a host cellular protein, albumin, was not obviously different between the liver infected with AxCAw1, AxshRNA-HCV and AxshRNA-Control (Fig. 7d). The expression levels of two ISG, IFN-beta and Mx1, in the liver tissue were not significantly different between individuals with

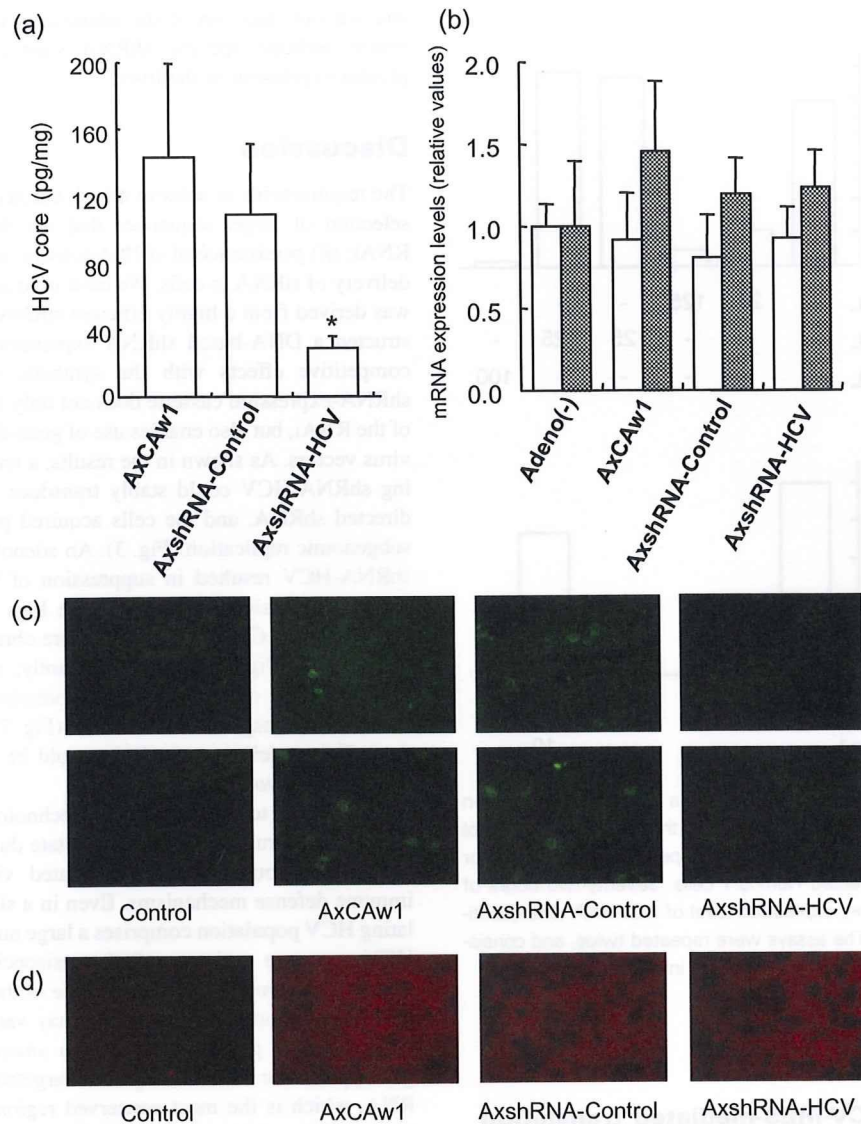
and without injection of the adenovirus vectors (Fig. 7b). These results indicate specific shRNA silencing of HCV structural protein expression in the liver.

### Discussion

The requirements to achieve a high efficiency using RNAi are: (i) selection of target sequences that are the most susceptible to RNAi; (ii) persistence of siRNA activity; and (iii) efficient *in vivo* delivery of siRNA to cells. We have used an shRNA sequence that was derived from a highly efficient siRNA (siRNA331), and constructed a DNA-based shRNA expression cassette that showed competitive effects with the synthetic siRNA (Fig. 2).<sup>14</sup> The shRNA-expression cassette does not only allow extended half-life of the RNAi, but also enables use of gene-delivery vectors, such as virus vectors. As shown in the results, a retrovirus vector expressing shRNA-HCV could stably transduce cells to express HCV-directed shRNA, and the cells acquired protection against HCV subgenomic replication (Fig. 3). An adenovirus vector expressing shRNA-HCV resulted in suppression of HCV subgenomic and protein expression by around three logs to almost background levels (Fig. 4). Consistent results were obtained by using an HCV cell culture (Fig. 6). More importantly, we have demonstrated *in-vivo* effects on viral protein expression in the liver using a conditional transgenic mouse model (Fig. 7). These results suggest that efficient delivery of siRNA could be effective against HCV infection *in vivo*.

An obstacle to applying siRNA technology to treat virus infections is that viruses are prone to mutate during their replication.<sup>32</sup> HCV continuously produces mutated viral strains to escape immune defense mechanisms. Even in a single patient, the circulating HCV population comprises a large number of closely related HCV sequence variants called quasispecies. Therefore, siRNA targeting the protein-coding sequence of the HCV genome, which have been reported by others,<sup>15-19</sup> may vary considerably among different HCV genotypes, and even among strains of the same genotype.<sup>33</sup> Our shRNA sequence targeted the 5'-UTR of HCV RNA, which is the most conserved region among various HCV isolates.<sup>33</sup> In addition, the structural constraints on the 5'-UTR, in terms of its requirement to direct internal ribosome entry and translation of viral proteins, might not permit the evolution of escape mutations. Our preliminary results have shown that the siRNA-HCV suppressed replication of an HCV genotype 2a replicon<sup>34</sup> to the same extent as the HCV 1b replicon.

Although the siRNA techniques rely on a high degree of specificity, several studies report siRNA-induced non-specific effect that may result from induction of ISG responses.<sup>18,31</sup> These effects may be mediated by activation of double-strand RNA-dependent protein kinase, toll-like receptor 3,<sup>35</sup> or possibly by a recently identified RNA helicase, RIG-I.<sup>36</sup> It remains to be determined whether these effects are generally induced by every siRNA construct. Sledz *et al.* have reported that transfection of two siRNA induced cellular interferon responses,<sup>37</sup> while Bridge *et al.* report that shRNA-expressing plasmids induced an interferon response but transfection of synthetic siRNA did not.<sup>31</sup> Speculatively, these effects on the interferon system might be construct dependent. Our shRNA-expression plasmids and adenoviruses did not activate ISG responses *in vitro* (Fig. 5a,b) or *in vivo* (Fig. 7b). We have preliminarily detected phosphorylated PKR (P-PKR) by western



**Figure 7** Effects of a recombinant adenovirus expressing shRNA on HCV core protein expression in CN2-29 transgenic mice. CN2-29 transgenic mice were administered with  $1 \times 10^9$  PFU of AxCANCre combined with  $6.7 \times 10^8$  PFU of AxshRNA-HCV, AxshRNA or AxCaw1. The mice were killed on day 4 after injection. (a) Quantification of HCV core protein in liver. Liver tissues were homogenized and used to determine the amount of HCV core protein. Each assay was done in triplicate, and the values are displayed as mean  $\pm$  SD. Asterisk indicates *P*-value of less than 0.05. (b) Expression levels of mouse interferon-beta (white bars) and Mx1 (shaded bars) mRNA in the mouse liver tissue were quantified by the real-time RT-PCR analyses. Primers used were as follows: mouse interferon-beta sense, 5'-ACA GCC CTC TCC ATC AAC TA-3'; mouse interferon-beta antisense, 5'-CCC TCC AGT AAT AGC TCT TC-3'; mouse Mx1 sense, 5'-AGG AGT GGA GAG GCA AAG TC-3'; mouse Mx1 antisense, 5'-CAC ATT GCT GGG GAC TAC CA-3'; mouse beta-actin sense, 5'-ACT CCT ATG TGG GTG ACG AG-3'; mouse beta-actin antisense, 5'-ATA GCC CTC GTA GAT GGG CA-3'. Adeno (-) denotes mice without adenovirus administration. (c) Immunofluorescence microscopy of HCV core protein in the liver tissue. Liver sections of mice were stained using rabbit anticore polyclonal antibody and normal rabbit IgG as a negative control. The upper photographs were obtained at 400 $\times$  magnification, and the lower photographs were at 1000 $\times$ . (d) Immunofluorescence microscopy of albumin in liver. Liver sections from the mice were fixed and stained using rabbit antialbumin antibody and normal rabbit IgG as a negative control.

blotting, and found no apparent increase of P-PKR (data not shown). These results indicate that these target sequences and structures are of sufficient specificity to silence the target gene without eliciting non-specific interferon responses.

Beside the canonical action of siRNA, a sequence-specific cleavage of target mRNA, the siRNA could act as a micro-RNA

that suppresses translational initiation of mRNA,<sup>38</sup> or it could mediate transcriptional gene silencing.<sup>39</sup> Regarding our *in-vivo* experiments, it was difficult to differentially analyze the effect of siRNA at individual sites of action because post-translational effect of siRNA concomitantly destabilizes target mRNA, which leads to apparent decrease of mRNA transcripts.



Efficiency and safety of gene transfer methods are the key determinants of the clinical success of gene therapy and an unresolved problem. There are several reports of delivery of siRNA or siRNA-expression vectors to cells *in vivo*;<sup>12,40,41</sup> however, gene delivery methods that are safe enough to apply to clinical therapeutics are currently under development. Adenovirus vectors are one of the most commonly used carriers for human gene therapies.<sup>42–44</sup> Our present results demonstrate that the adenoviral delivery of shRNA is effective in blocking HCV replication *in vitro* and virus protein expression *in vivo*. Adenovirus vectors have several advantages of efficient delivery of transgene both *in vitro* and *in vivo* and natural hepatotropism when administered *in vivo*. The AxshRNA-HCV specifically blocked expression of HCV structural proteins in a conditional transgenic mouse expressing those proteins. The current adenovirus vectors may cause inflammatory reactions in the target organ,<sup>45</sup> however, and produce neutralizing antibodies which make repeated administration difficult. These problems may be overcome by the improved constructs of virus vectors with attenuated immunogenicity or by the development of non-viral carriers for gene delivery.<sup>46</sup>

In conclusion, our results demonstrate the effectiveness and feasibility of the siRNA expression system. The efficiency of adenovirus expressing shRNA that target HCV suggests that delivery and expression of siRNA in hepatocytes may eliminate the virus and that this RNA-targeting approach might provide a potentially effective future therapeutic option for HCV infection.

## Acknowledgments

This study was supported by grants from Japan Society for the Promotion of Science, 15590629 and 16590580, and partly supported by a grant from the Viral Hepatitis Research Foundation of Japan.

## References

- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; **26**: 62S–65S.
- Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR *et al.* Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann. Intern. Med.* 2004; **140**: 346–55.
- Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; **19**: 806–11.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; **411**: 494–8.
- Coburn GA, Cullen BR. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J. Virol.* 2002; **76**: 9225–31.
- Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002; **418**: 435–8.
- Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 2002; **418**: 430–4.
- Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; **101**: 8676–81.
- Wang C, Pflugheber J, Sumpter R Jr *et al.* Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 2003; **77**: 3898–912.
- Klein C, Bock CT, Wedemeyer H *et al.* Inhibition of hepatitis B virus replication *in vivo* by nucleoside analogues and siRNA. *Gastroenterology* 2003; **125**: 9–18.
- Konishi M, Wu CH, Wu GY. Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV-producing cell line. *Hepatology* 2003; **38**: 842–50.
- McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002; **418**: 38–9.
- Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003; **37**: 764–70.
- 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.
- Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; **100**: 2014–18.
- Kronke J, Kittler R, Buchholz F *et al.* Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J. Virol.* 2004; **78**: 3436–46.
- Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; **100**: 235–40.
- Seo MY, Abrignani S, Houghton M, Han JH. Letter to the editor: small interfering RNA-mediated inhibition of hepatitis C virus replication in the human hepatoma cell line Huh-7. *J. Virol.* 2003; **77**: 810–12.
- Wilson JA, Jayasena S, Khvorov A *et al.* RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; **100**: 2783–8.
- Guo JT, Bichko VV, Seeger C. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J. Virol.* 2001; **75**: 8516–23.
- 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.
- Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N *et al.* Introduction of NS5A mutations enables subgenomic HCV-replicon derived from chimpanzee-infectious HC-J4 isolate to replicate efficiently in Huh-7 cells. *J. Viral. Hepat.* 2004; **11**: 394–403.
- Miyagishi M, Sumimoto H, Miyoshi H, Kawakami Y, Taira K. Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells. *J. Gene Med.* 2004; **6**: 715–23.
- Li Y, Yokota T, Matsumura R, Taira K, Mizusawa H. Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. *Ann. Neurol.* 2004; **56**: 124–9.
- Kanazawa N, Kurosaki M, Sakamoto N *et al.* Regulation of hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor-1. *J. Virol.* 2004; **78**: 9713–20.
- 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.
- Zhong J, Gastaminza P, Cheng G *et al.* Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; **102**: 9294–9.
- Wakita T, Taya C, Katsume A *et al.* Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 9001–6.
- Kashiwakuma T, Hasegawa A, Kajita T *et al.* Detection of hepatitis C virus specific core protein in serum of patients by a sensitive fluorescence enzyme immunoassay (FEIA). *J. Immunol. Methods* 1996; **28**: 79–89.

- 30 Baglioni C, Nilsen TW. Mechanisms of antiviral action of interferon. *Interferon* 1983; **5**: 23–42.
- 31 Bridge A, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz A, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Genet.* 2003; **34**: 263–4.
- 32 Carmichael GG. Silencing viruses with RNA. *Nature* 2002; **418**: 379–80.
- 33 Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y *et al.* Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J. Gen. Virol.* 1991; **72**: 2697–704.
- 34 Kato T, Date T, Miyamoto M *et al.* Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 2003; **125**: 1808–17.
- 35 Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; **413**: 732–8.
- 36 Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 2004; **5**: 730–7.
- 37 Sledz C, Holko M, de Veer M, Silverman R, Williams, B. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell. Biol.* 2003; **5**: 834–9.
- 38 Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* 2003; **17**: 438–42.
- 39 Morris KV. siRNA-mediated transcriptional gene silencing: the potential mechanism and a possible role in the histone code. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005; **62**: 3057–66.
- 40 Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.* 2002; **20**: 1006–10.
- 41 Zender L, Hutker S, Liedtke C *et al.* Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; **100**: 7797–802.
- 42 Akli S, Caillaud C, Vigne E *et al.* Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nat. Genet.* 1993; **3**: 224–8.
- 43 Bajocchi G, Feldman SH, Crystal RG, Mastrangeli A. Direct in vivo gene transfer to ependymal cells in the central nervous system using recombinant adenovirus vectors. *Nat. Genet.* 1993; **3**: 229–34.
- 44 Davidson BL, Allen ED, Kozarsky KF, Wilson JM, Roessler BJ. A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nat. Genet.* 1993; **3**: 219–23.
- 45 Yang Y, Wilson JM. Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4+ CTLs in vivo. *J. Immunol.* 1995; **155**: 2564–70.
- 46 Fleury S, Driscoll R, Simeoni E *et al.* Helper-dependent adenovirus vectors devoid of all viral genes cause less myocardial inflammation compared with first-generation adenovirus vectors. *Basic Res. Cardiol.* 2004; **99**: 247–56.



コンセンサス

---

# 肝疾患

---

B型肝炎・C型肝炎の治療

---

監修

坪内 博仁

編集

岡上 武 / 小俣 政男

林 紀夫 / 熊田 博光

2007

日本メディカルセンター

## 2 Peg-IFN/ribavirin 併用療法

### 2 ISDR と初期抗ウイルス効果からみた治療効果

坂本 穰, 榎本信幸

#### ポイント

- コンセンサス ■ Peg-IFN/ribavirin 併用療法において、治療効果予測因子は、年齢・性別・肝線維化である。
- 要検討 ■ ISDR 変異は、初期抗ウイルス効果(EVR)と関連し SVR にも関連すると推測される。
- 要検討 ■ ISDR や治療反応性を検討することで、より詳細な治療効果予測が可能となり、個々の症例に応じた治療が可能となる。

わが国における C 型慢性肝炎治療は、1992 年に interferon (IFN) 療法が認可され急速に普及した。しかし、しばらくの間、投与期間が 6 カ月に限られたことからその治療効果は十分なものではなかった。その後、治療期間制限の撤廃やペグ化製剤 (Peg-IFN) や ribavirin の併用療法が進み、治療効果にも改善の兆しがみられている。とくに Peg-IFN / ribavirin 併用療法は世界標準治療であり、現在わが国で行われている IFN をベースとした治療法のなかでは最強のものとなった。しかしながら、この治療法でも、難治とされる genotype 1b 型・高ウイルス量症例の 48 週治療の著効率は、たかだか 50% である<sup>1),2)</sup>。一方、IFN や ribavirin は副作用も多く、C 型慢性肝炎患者が高齢化している現在では、副作用や合併症を減らし、ribavirin を併用しなくとも IFN 単独で治癒可能な症例や、IFN の治療期間の短縮・総投与量の減少がはかれる症例を選別することが重要となっている。

#### I. IFN の治療効果予測因子

IFN による治療効果は、投与終了から少なくとも 6 カ月 HCV が持続陰性化している場合をウイルス学的著効 (sustained virologic response ; SVR) とするのが一般的である。しかしながら、この判定方法では治療終了後 6 カ月しないと効果判定できないため、副作用や合併症の観点あるいは医療経済面から、投与開始前あるい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。

##### 1. HCV 遺伝子型

治療開始前の治療効果予測因子としてはウイルス側因子と宿主側因子があるが、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。とくに bDNA 法の 1 Meq/ml、

Amplior monitor 法の 100 KIU/ml, コア蛋白定量法の 300 fmol/l 以上は, わが国では高ウイルス量症例とされ, 難治である. 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) ではきわめて高い 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>3)</sup>. また, 宿主側因子としては, 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.

## 2. HCV RNA 量の推移(HCV dynamics)

一方, IFN 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 らは数学モデルを用いて IFN 単独療法における抗ウイルス効果を報告している. これによれば 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<sup>4)</sup>. 一方 Herrmann らは, Peg-IFN  $\alpha$ -2b と ribavirin 併用療法において HCV dynamics を検討し, 急峻に HCV 量が減少する第 1 相とこれに引き続く平坦な第 2 相と, これ以降の生体の免疫機構が最終的なウイルス排除に関与する第 3 相が存在することを報告している. これによれば, IFN が関与するのはおもに第 1~2 相で, ribavirin が関与するのはおもに第 2~3 相であるとしている<sup>5)</sup>.

## 3. HCV RNA 陰性化の時期

臨床的には, 治療効果予測因子として, 治療開始 4 週間以内の HCV RNA 陰性化 (HCV RNA <

50 IU/ml) を超早期ウイルス効果 (rapid virologic response ; RVR)<sup>6)</sup>, 12 週以内の陰性化ないしは投与開始前に比較して 2 log copies/ml 以上の低下を初期抗ウイルス効果 (early virologic response ; EVR) とすることが提唱されている<sup>7)</sup>. Fried らの検討では Peg-IFN  $\alpha$ -2a と ribavirin 併用療法 48 週間治療において, 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) にすぎなかったと報告している<sup>2)</sup>.

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>8)</sup>.

## II. ISDR と初期抗ウイルス効果からみた治療効果

以上のような検討をふまえ, われわれは, 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) (表 1) で集積された成績を検討した. 検討症例は 468 例であり, その内訳は Peg-IFN  $\alpha$ -

表 1 Y-PERS 共同研究参加施設(順不同)

山梨大学医学部第 1 内科
〃 肝疾患地域先端医療システム学講座
山梨県立中央病院
市立甲府病院
富士吉田市立病院
社会保険山梨病院
上野原市立病院
山梨厚生病院
市川三郷町立病院
塩山市民病院
共立蒲原総合病院
山梨厚生連健康管理センター
うえむらクリニック
あいのた内科消化器科クリニック



2b / ribavirin 併用が 345 例, IFN  $\alpha$ -2b / ribavirin 併用が 65 例, Peg-IFN  $\alpha$ -2a が 56 例, その他が 2 例であった。患者背景は, 平均年齢  $55.1 \pm 10.0$  (19 ~ 80) 歳, 男性 288 例, 女性 180 例であった。また genotype は 1b が 306 例 (65%), 2a が 92 例 (20%), 2b が 67 例 (14%), 混合型・分類不能型が 3 例 (1%) であった。

### 1. ISDR の型別 SVR 率

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 12 週時点で 65%, 24 週時点で 82% であり, 48 週治療終了時の陰性化率 (end of treatment response ; ETR) は 85% であり, 従来の IFN  $\alpha$ -2b / ribavirin 併用療法 24 週間の治療に比較して, 治療開始早期の効果はやや緩徐であるものの, 治療終了後 24 週における SVR は 41% と従来の治療に比較して良好であった。

Peg-IFN  $\alpha$ -2b / ribavirin 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 1,000 KIU/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

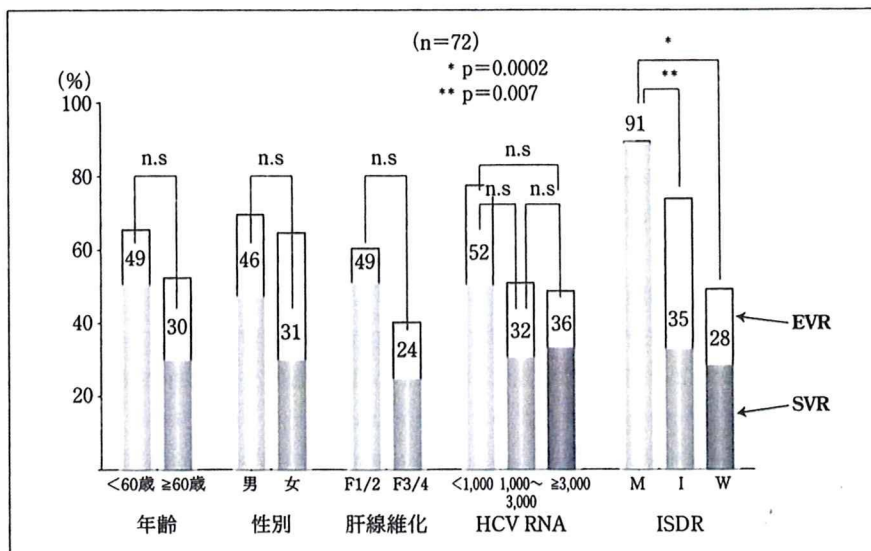


図 1 Peg-IFN  $\alpha$ -2b/ribavirin 療法における EVR と SVR (1b 型)

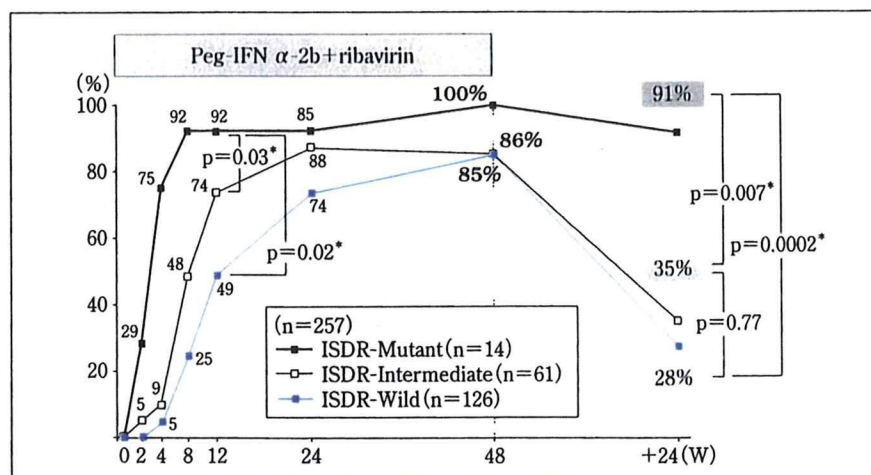


図 2 HCV RNA 陰性化率 (1b 型)

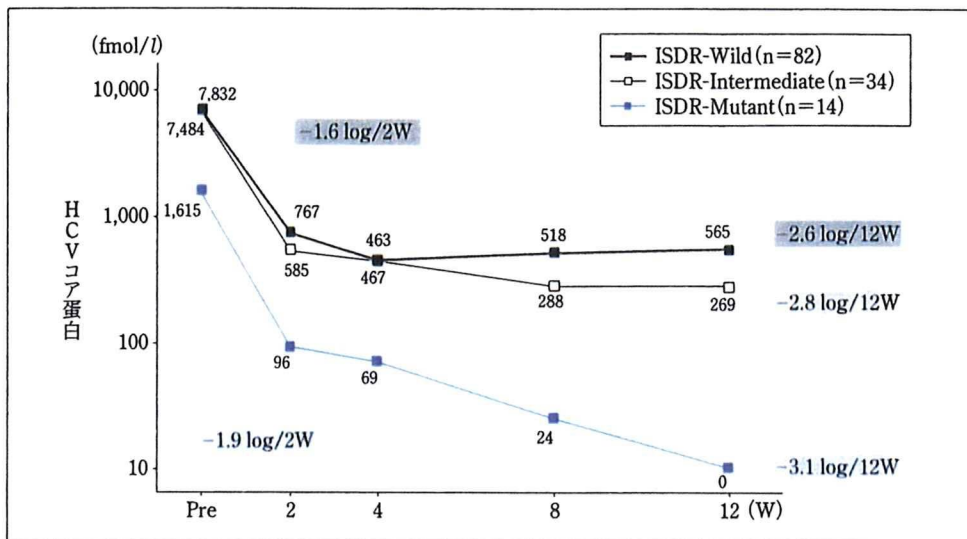


図3 ISDR(genotype 1b型)とIFN初期効果(EVR)

表2 Peg-IFN  $\alpha$ -2b/ribavirin 治療(1b型)のSVRに寄与する因子(n = 72)

	odds ratio (95% CI)	p value
肝線維化	0.121 (0.032 ~ 0.462)	0.0020
ISDR	1.822 (1.184 ~ 2.803)	0.0064

多変量ロジステック回帰分析

化が緩徐で、治療開始12週時点でのウイルス陰性化率(EVR)にも差がみられ、これが最終治療効果(SVR)にも影響を及ぼしていた(図1)。とくにISDRは、野生型、中間型、変異型のEVRはそれぞれ49%、74%、92%で、変異型は中間型・野生型に比較して有意に高率で、SVRもそれぞれ28%、35%、91%であり、変異型が有意差をもってSVR率が高かった(図2)。これは、治療早期ウイルス量の減少率が影響していると考えられ、われわれはこれを連続的に定量できるコア蛋白定量法を用いて検討した。この結果、ISDR変異型は野生型・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、EVRひいてはSVRに影響していることが示唆された(図3)。

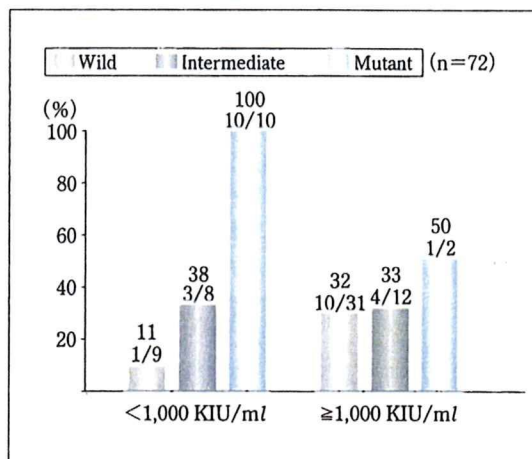


図4 HCV RNA量別にみたISDRとSVRとの関連

## 2. SVRに寄与する因子

さらに、これまでにSVRの判定が可能で、詳細に解析できた72例について多変量ロジステック回帰分析を行うと、抽出された因子は肝線維化(F2以上とそれ以外)とISDR変異数のみであった(表2)。ISDRは治療開始前のHCV RNAと関連し、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1,000 KIU/ml以上と未満に分けて検討すると、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、上記を裏づけているものと思われた(図4)。

また、これら ISDR と年齢・性別・肝線維化の関連についても検討した。全体としては若年であれば 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も SVR にはなり難く、投与前の宿主因子に 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(図5)。

### 3. 治療終了後の再燃

SVRの達成については、上記因子を検討することが重要であるが、さらに治療中のHCV dynamicsの検討も重要である。すなわち、12週までのEVRがSVRには重要であり、さらにはETRも必須条件である。しかし、これらが達成できたとしても治療終了後の再燃が問題となる。これまでの検討では、高齢者・女性・肝線維化進展例・ISDR野生型で再燃が多いことから、これらについては、経時的な治療効果のモニタリング

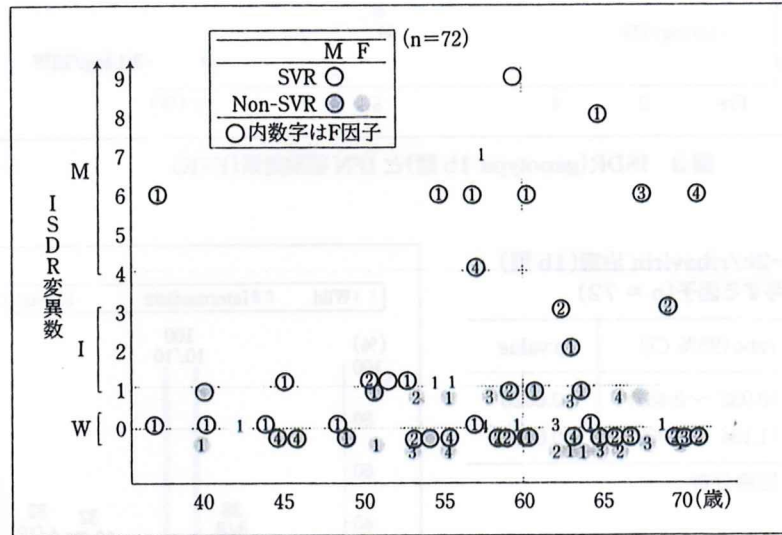


図5 ISDR・年齢・肝線維化とSVRとの関連(1b型)

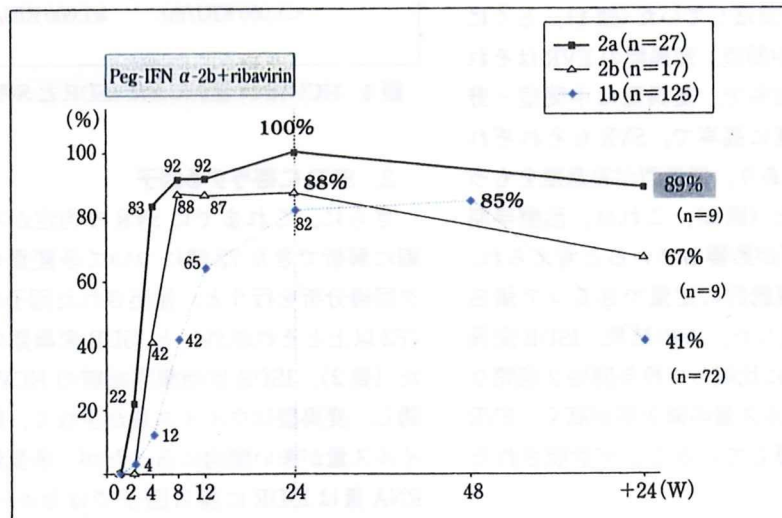


図6 HCV RNA 陰性化率(2a・2b型)



を行ったうえで、その後の治療中止・減量を抑制しつつ、治療完遂することや、治療の延長を考慮することが必要と考えられた。そこで、1b 高ウイルス量症例のうち、原則 EVR が達成できなかった症例の一部について、患者の同意を得たうえで、72 週間投与を行った。この結果は 48 週投与の SVR は 3% (1/40) であったのに対し、72 週投与群では 25% (2/8) であった。とくに、12 週陽性 24 週陰性の slow virologic response の症例では、48 週投与の SVR が 14% (1/7) であるのに対し 72 週では 40% (2/5) であり、slow virologic responder では 72 週間投与により、EVR 症例の 48 週間投与と同等の治療成績が得られる可能性が示唆された。

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 ribavirin 併用療法でも、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みられた (図 6)。

### Ⅲ. C 型慢性肝炎に対する IFN 治療のコンセンサス-ISDR からの検討

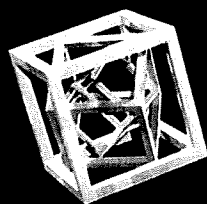
現時点での C 型慢性肝炎治療のコンセンサスは、治療ガイドライン<sup>9)</sup>が示しているように、高ウイルス量症例に対しては、Peg-IFN  $\alpha$ -2b / ribavirin 療法が妥当である。しかしそのなかでも、高齢者・女性・肝線維化の進展例・HCV RNA 高値例では治療効果が劣る可能性がある。また、治療開始早期のウイルス量のモニタリングから、EVR が達成できない症例からは SVR は得られない可能性が高い。したがって、治療前には ISDR を含めた因子を検討し、さらに治療経過を加味したうえで最終的な治療法を検討することが望ましい。とくに ISDR 変異型では、EVR が高いことが予測されるが、ribavirin よりも IFN 効果が高いことが推測され、治療期間の短縮や ribavirin の減量・中止が検討できるし、ISDR 中間型や野生

型は、ribavirin 効果の恩恵にあずかることで、治療効果向上に結びつく可能性が高い。そのうえで実際の薬剤投与中のウイルス反応性を確認し、slow virologic responder では治療期間の延長を考慮するなどが必要となる。

#### 文 献

- 1) Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, 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* 2001 ; 358 : 958-965
- 2) Fried NW, Schffman ML, Reddy KR, et al : Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002 ; 347 : 975-982
- 3) Enomoto N, Sakuma I, Asahana Y, et al : Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996 ; 334 : 77-81
- 4) Neumann AU, Lam NP, Dehari H, et al : Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon alpha therapy. *Science* 1998 ; 282 : 103-107
- 5) Herrmann E, Lee JH, Marinos G, et al : Effect of ribavirin in hepatitis C viral kinetics in patients treated with pegylated interferon. *Hepatology* 2003 ; 37 : 1351-1358
- 6) Jensen DM, Morgan TR, Marcellin P, et al : Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon  $\alpha$ -2a (40 Kd) / ribavirin therapy. *Hepatology* 2006 ; 43 : 954-960
- 7) Davis GL, Wong JB, McHutchison JG, et al : Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003 ; 38 : 645-652
- 8) Berg T, von Wagner M, Nasser S, et al : Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1 : comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 2006 ; 130 : 1086-1097
- 9) 平成 17 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 型および 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研究. 総括・分担研究報告書 9-11, 2006

# 消化器疾患 最新の治療 2007-2008



[編集]

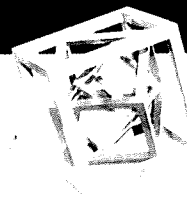
菅野健太郎  
自治医科大学教授

上西紀夫  
東京大学教授

井廻道夫  
昭和大学教授

## 巻頭トピックス

1. わが国のNERD：診断と治療
2. 選択的COX-2阻害薬の安全性と効果
3. 小腸内視鏡治療の進歩
4. B型慢性肝炎に対する新しい抗ウイルス薬
5. HGFを用いた肝再生療法
6. 消化管拡大内視鏡の進歩
7. 大腸癌の鏡視下手術の現状と展望



南江堂

# 5 C型慢性肝炎

坂本 穰, 榎本信幸

## I 疾患の解説

C型慢性肝炎はC型肝炎ウイルス(HCV)の持続感染の結果、宿主の不完全な免疫応答により、炎症が持続することによってもたらされるもので、多くの場合肝硬変・肝細胞癌へと進展する。肝組織の進展は、線維化の程度をF0(線維化なし)、F1(mild fibrosis)、F2(moderate fibrosis)、F3(severe fibrosis)、F4(肝硬変)とすると、0.10~0.13 unit/年と計算されており、感染から肝硬変へは30~40年を要することになる<sup>1)</sup>。しかし、この間は自覚症状に乏しいことも多く、健康診断で偶然にHCV抗体陽性が判明することがある。また、肝線維化の判定には、肝生検による組織学的診断が最も確実であるが、血小板数から肝線維化の程度を推定することが可能であり<sup>2)</sup>、また、発癌のリスクは肝線維化と相

関する(図1)。したがってC型慢性肝炎の治療の目標は、HCVの排除と、これによる肝硬変変への進展抑止、肝発癌の抑止ということになる。

## II 検査と診断

HCV感染のスクリーニングにはHCV抗体を測定する。ただしHCV抗体陽性者には、現在の感染者と既感染者が含まれる。多くの場合、HCVの持続感染があればHCV抗体は高力価を呈するが、感染既往の場合は中等度から低力価となる。現在進められている検診における「C型肝炎ウイルス検査」では、中等度から低力価の場合、HCVコア抗原やHCV-RNA検査を行いウイルス血症の有無を確認することとしている。すなわちHCV抗体が中・低力価でHCV-RNA陰性であれば感染既往である。

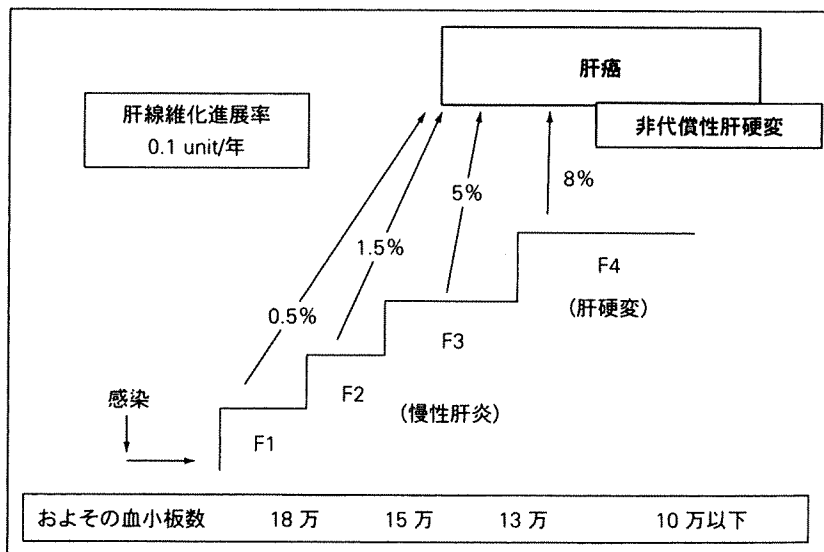


図1 C型肝炎の進展度と血小板、発癌率

(文献2より引用)

さらにインターフェロン (IFN) をはじめとした治療方針の決定には、HCV-RNA 定量検査と HCV 型の判定が必要である。HCV-RNA 定量検査には、現在、分岐 DNA プローブ法、アンプリコアモニター法 (オリジナル法、ハイレンジ法) があり、また HCV コア抗原量検査 (コア蛋白定量) もウイルス量の指標として用いられる。わが国では一般的には、分岐 DNA プローブ法で 1 Meq/ml, アンプリコアモニター法で 100 KIU/ml, コア蛋白定量検査で 300 fmol/l 以上の場合、高ウイルス量とされ、IFN 治療の効果は低ウイルス量に比較して格段に劣る。また、HCV 型分類には、型特異抗体を用いた EIA 法によるグルーピング (血清型) 測定と PCR 法を用いた遺伝子型 (genotype) 測定があり、前者が保険適応である。セロタイプ 1 は genotype 1a と 1b に相当し、セロタイプ 2 は genotype 2a と 2b に相当する。わが国では 1b が 70%, 2a が 20%, 2b が 10% を占める。IFN 効果は genotype 2a, 2b, 1b の順に高い。また HCV の NS5A 領域内の IFN 感受性決定領域 (ISDR) のアミノ酸変異が多いほど治療効果が高く<sup>3)</sup>、治療方針決定の参考になる。

また、慢性肝炎の線維化の程度は、厳密には肝生検によって判定することが望ましいが、大まかには上述の血小板数や、ヒアルロン酸などの肝線維化マーカーなどで判定する。一方肝炎の活動性は、血清トランスアミナーゼ AST, ALT で判定する。血清トランスアミナーゼは肝細胞からの逸脱酵素であるため、肝細胞の破壊の程度を示しており、この値が高いほど肝の炎症の活動度が高く、線維化の進展速度も速くなる。

### Ⅲ 治療の一般方針

#### 1 C 型慢性肝炎の治療の目標

C 型慢性肝炎の治療の第一目標は HCV の排除である。現在 HCV を排除することができる抗ウイルス療法は IFN のみである。しかし、ウイルス排除が困難な場合や IFN 治療が無効の場合は、肝機能を正常化させることで肝炎を沈静化し、肝発癌抑制を目指した治療を行うこととな

る。

#### 2 インターフェロン (IFN)

わが国で用いられる IFN は天然型の IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , 遺伝子組み換え型の IFN $\alpha$ -2a, IFN $\alpha$ -2b およびコンセンサスインターフェロン  $\alpha$ Con-1 と IFN にポリエチレングリコールを結合させることで分子量を増大させ、持続性と効果を増大し抗原性を減弱させた PEG-IFN $\alpha$ -2a, PEG-IFN $\alpha$ -2b とがあるが、このうちリバビリンと併用可能な IFN は 2006 年 12 月現在 IFN $\alpha$ -2b (イントロン) と PEG-IFN $\alpha$ -2b (ペグイントロン) のみである。治療法の選択にあたっては各治療法の特徴・治療成績・副作用などを考慮し、最も効果の得られる治療法を第一選択とし、年齢・性別・肝線維化の程度・合併症など感染者 (宿主) の条件、さらには治療目的 (ウイルス排除か肝発癌抑止か) を加味して決定されるべきである。genotype 1b かつ高ウイルス量症例は、難治例であるが、わが国で認められている PEG-IFN $\alpha$ -2b (ペグイントロン) + リバビリン (レベトール) 併用療法 48 週のウイルス排除率 (sustained viral response: SVR) は約 50% であり<sup>4,5)</sup> 推奨される。一方、genotype 2 ではこの療法を 24 週行えばウイルス量が多くとも十分な SVR が得られ、48 週治療との優劣がみられない<sup>6)</sup>。また、低ウイルス量症例ではリバビリン併用療法とインターフェロン単独療法とに治療成績の差がみられない。このような背景のもと、厚生労働省より「C 型慢性肝炎に対する治療の標準化に関するガイドライン」(表 1)<sup>7)</sup> が示されている。

治療にあたってはガイドラインを参考に開始するが、治療中の治療効果、特に早期の抗ウイルス効果 (early virological response: EVR) は、治療効果予測と治療期間決定の参考になる。すなわち、治療開始 12 週時点で HCV-RNA が陰性化もしくは、治療開始前から 2 log 以上低下しない場合には 48 週治療では SVR とならない可能性が高く<sup>8)</sup>、12 週以降にウイルスが消失した症例では、48 週を超えた治療が望まれる<sup>9)</sup>。

初回投与に関しては、上述の治療成績から、保険適用のある高ウイルス症例に関しては PEG-IFN $\alpha$ -2b + リバビリン併用療法が第一選択とな



75 kg で 100 μg, 76~90 kg で 120 μg, 91~120 kg では 150 μg である。レベトールは 60 kg 以下では 3 カプセル (朝 1 カプセル, タ 2 カプセル), 61 kg を超え 80 kg 以下では 4 カプセル (朝 2 カプセル, タ 2 カプセル), 80 kg を超えるものでは 5 カプセル (朝 2 カプセル, タ 3 カプセル) である。

低ウイルス量症例では, 治療成績もさることながら, わが国では保険適用がないため, PEG-IFNα-2a (ペガシス) を含めたインターフェロン単独療法が推奨されている。

**処方例**

- ①PEG-IFNα-2a (ペガシス) 180 μg 週 1 回皮下注

一方, 再治療に関しては, インターフェロンの初回治療が無効であった原因を検討し, ウイルス排除か肝発癌抑制の治療かの目的を十分考慮し, 治療法を選択することが大原則である。しかしたとえ, リバビリン併用療法が推奨される症例であっても, リバビリンを投与し難い, 高血圧, 糖尿病, 腎機能異常, 貧血合併患者や高齢者などではインターフェロン単独長期療法なども考慮されるべきである。この場合の選択肢には, 自己注射も含めた 2 年間のインターフェロン間歇療法も選択肢となってくる。

**処方例**

- ①IFNα (HLBI) (スミフェロン DS) 600 万単位 週 3 回 筋注または皮下注

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 IU/l であっても慢性肝炎に準じた治療法が推奨され<sup>9,10)</sup>, ALT 30 IU/l 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勧められている (表 2)。

**3 肝庇護薬**

ウイルス排除が困難な場合やインターフェロン治療が適応にならない場合には, C 型慢性肝炎の肝硬変への進展・肝癌抑制の目的で, 肝庇護療法

表 2 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	≥15×10 <sup>4</sup> /μl	<15×10 <sup>4</sup> /μl
ALT ≤30 IU/l	2~4 ヶ月ごとに血清 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。肝生検非施行例は 2~4 ヶ月ごとに血清 ALT 値を測定し, 異常を示した時点で抗ウイルス療法を考慮。
31~40 IU/l	65 歳以下は抗ウイルス治療の適用。	慢性肝炎治療に準ずる。

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

またウイルス排除の可能性が高く, 副作用の素因が軽度な場合には, 通常の慢性肝炎と同様の基準で投与を検討する。

(平成 17 年度厚生労働省 C 型肝炎に対する治療の標準化に関するガイドライン)

を行う。この際は強力ネオミノファーゲンシー (SNMC) およびウルソデオキシコール酸 (UDCA, ウルソ) を用いるが, これらは抗ウイルス効果はなく, ALT の低下を指標として治療を行う。この際の目標値は F1 の慢性肝炎では正常上限の 1.5 倍以内, F2 以上の肝線維化進展例では極力正常値にコントロールすることがよいとされている。

**処方例**

- ①強力ネオミノファーゲンシー (SNMC) 40~60 ml 週 2~3 回 静注  
かつ/または
- ②ウルソデオキシコール酸 (UDCA) (ウルソ) 100 mg) 6 カプセル 分 3 (毎食後)

◀ 文 献 ▶

1) Shiratori Y et al: Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained