

- with NAFLD. Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. *Gut*. 2009;58: 1566-1567
5. Add-on combination therapy with adefovir dipivoxil induces renal impairment in patients with lamivudine-refractory hepatitis B virus. Tamori A, Enomoto M, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Sakaguchi H, Habu D, Shiomi S, Imanishi Y, Kawada N. *J Viral Hepat*. 2010;17: 123-129
6. A randomized pilot trial of oral branched-chain amino acids in early cirrhosis: validation using prognostic markers for pre-liver transplant status. Kawamura E, Habu D, Morikawa H, Enomoto M, Kawabe J, Tamori A, Sakaguchi H, Saeki S, Kawada N, Shiomi S. *Liver Transpl*. 2009;15:790-797.
7. Development of pouchitis with combination therapy with peg-interferon alpha-2b and ribavirin for chronic hepatitis C in a patient with ulcerative colitis who underwent pouch surgery. Morimoto K, Yamagami H, Hosomi S, Ohira M, Suekane T, Kamata N, Sogawa M, Watanabe K, Tominaga K, Watanabe T, Fujiwara Y, Tamori A, Oshitani N, Arakawa T. *Am J Gastroenterol*. 2009; 104: 1609-1610.
8. Noninvasive laboratory tests proposed for predicting cirrhosis in patients with chronic hepatitis C are also useful in patients with non-alcoholic steatohepatitis. Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Ohfuji S, Mori M, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Ikura Y, Ueda M, Kawada N. *J Gastroenterol*. 2009; 44: 608-614.
9. Frequent detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma of patients with sustained virologic response for hepatitis C virus. Tamori A, Hayashi T, Shinzaki M, Kobayashi S, Iwai S, Enomoto M, Morikawa H, Sakaguchi H, Shiomi S, Takemura S, Kubo S, Kawada N. *J Med Virology* 2009; 81: 1009-1014
10. Hepatocellular carcinoma (HCC) recurring 10 years after clearance of hepatitis B surface antigen and 20 years after resection of hepatitis B virus-related HCC. Shinkawa H, Nakai T, Tamori A, Tanaka H, Takemura S, Ohba K, Uenishi T, Ogawa M, Yamamoto S, Hai S, Ichikawa T, Kodai S, Hirohashi K, Wakasa K, Kubo S. *Int J Clin Oncol*. 2008; 13:562-566.
11. Sildenafil-induced severe cholestatic hepatotoxicity. Enomoto M, Sakaguchi H, Ominami M, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:254-255.
12. Entecavir to treat hepatitis B-associated cryoglobulinemic vasculitis. Enomoto M, Nakamishi T, Ishii M, Tamori A, Kawada N. *Ann Intern Med*. 2008;149:912-913.
13. Platelet-associated IgG for the diagnosis of immune thrombocytopenic purpura during peginterferon alpha and ribavirin treatment for chronic hepatitis C. Enomoto M, Yamane T, Hino M, Ohnishi M, Tamori A, Kawada N. *Liver Int*. 2008;28:1314-1315.
14. Does a late evening meal reduce the risk of hepatocellular carcinoma among patients with chronic hepatitis C? Ohfuji S, Fukushima W, Tanaka T, Habu D, Takeda T, Tamori A, Sakaguchi H, Seki S, Kawada N, Nishiguchi S, Shiomi S, Hirota Y. *Hepatol Res*. 2008; 38:860-868.
15. Optimal duration of additional therapy after biochemical and virological responses to lamivudine in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: a randomized trial. Enomoto M, Tamori A, Kohmoto MT, Hayashi T, Morikawa H, Jomura H, Sakaguchi H, Habu D, Kawada N, Shiomi S, Nishiguchi S. *Hepatol Res*. 2008; 38:954-959.
16. Differences in molecular alterations of

hepatocellular carcinoma between patients with a sustained virological response and those with hepatitis C virus infection. Hayashi T, Tamori A, Nishikawa M, Morikawa H, Enomoto M, Sakaguchi H, Habu D, Kawada N, Kubo S, Nishiguchi S, Shiomi S. *Liver Int.* 2009; 29:126-132.

17. Serial changes in expression of functionally clustered genes in progression of liver fibrosis in hepatitis C patients. Takahara Y, Takahashi M, Zhang QW, Wagatsuma H, Mori M, Tamori A, Shiomi S, Nishiguchi S. *World J Gastroenterol.* 2008; 14:2010-2022.

18. PTPRC (CD45) variation and disease association studied using single nucleotide polymorphism tagging. Hennig BJ, Fry AE, Hirai K, Tahara H, Tamori A, Moller M, Hopkin J, Hill AV, Bodmer W, Beverley P, Tchilian E. *Tissue Antigens.* 2008; 71:458-463.

19. 大阪市におけるC型肝炎ウイルス検診と肝炎フォローアップ事業の検討. 松本健二、高橋峰子、田守昭博、西口修平. *日本公衆衛生学会* 2008; 7: 35-39.

20. 遡及調査にて判明した輸血後B型肝炎ウイルス感染の1例. 田守昭博、藤野恵三、尾島成子、武田和弘、河田則文、日野雅之、西口修平. *日本輸血細胞治療学会誌.* 2008; 54: 393-397

学会発表

1. コンセンサスメETING 2 C型肝炎 ペグインターフェロンあるいはインターフェロン単独療法の位置づけ. 田守昭博、河田則文. *肝臓* 2009;50:Supp. 1 Page A42

2. 難治性C型肝炎利枝に対するペグインターフェロン (Peg-IFN)・リバビリン再治療による抗ウイルス効果. 田守昭博, 小林佐和子, 岩井秀司, 森川浩安, 榎本大, 坂口浩樹, 木岡清英, 岡 博子, 河田則文. *日消誌* 2009;106:Supp. Page A214

3. C型慢性肝炎に対するペグIFN・リバビリン治療の投

与期間と抗ウイルス効果. 田守昭博, 榎本大, 遠山まどか, 安田隆弘, 藤井英樹, 小林佐和子, 岩井秀司, 森川浩安, 坂口浩樹, 羽生大記, 河田則文. *肝臓* 2008;49:Suppl.1 Page A328

4. C型慢性肝炎に対するペグIFN・リバビリン療法のHCV遺伝子多型と抗ウイルス効果. 田守昭博, 榎本大, 森川浩安, 岩井秀司, 小林佐和子, 藤井英樹, 安田隆弘, 坂口浩樹, 羽生大記, 塩見進, 河田則文. *肝臓* 2008;49:Suppl.1 Page A213.

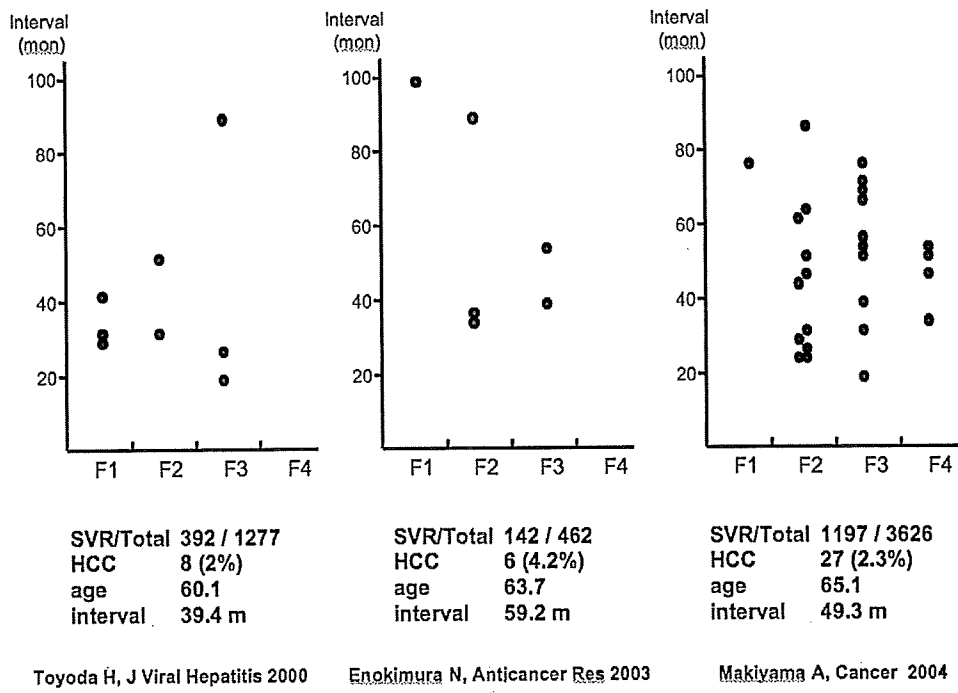


図1. 我が国におけるSVR肝癌の報告

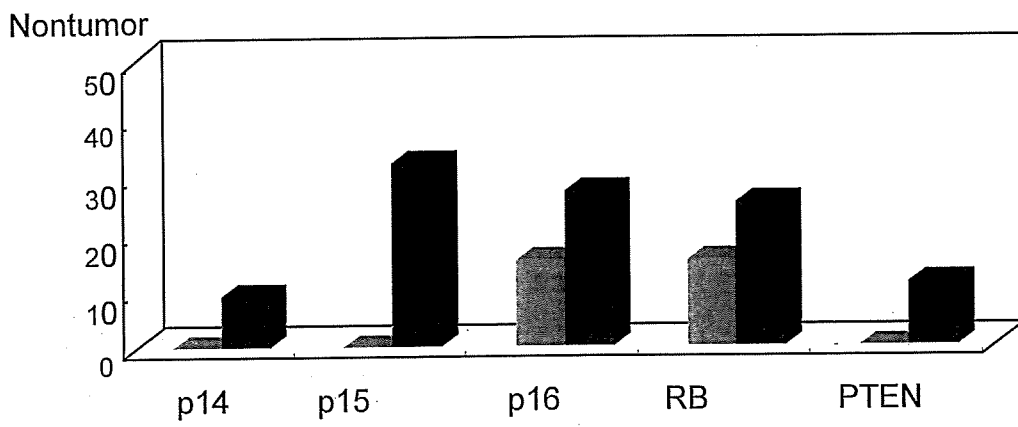
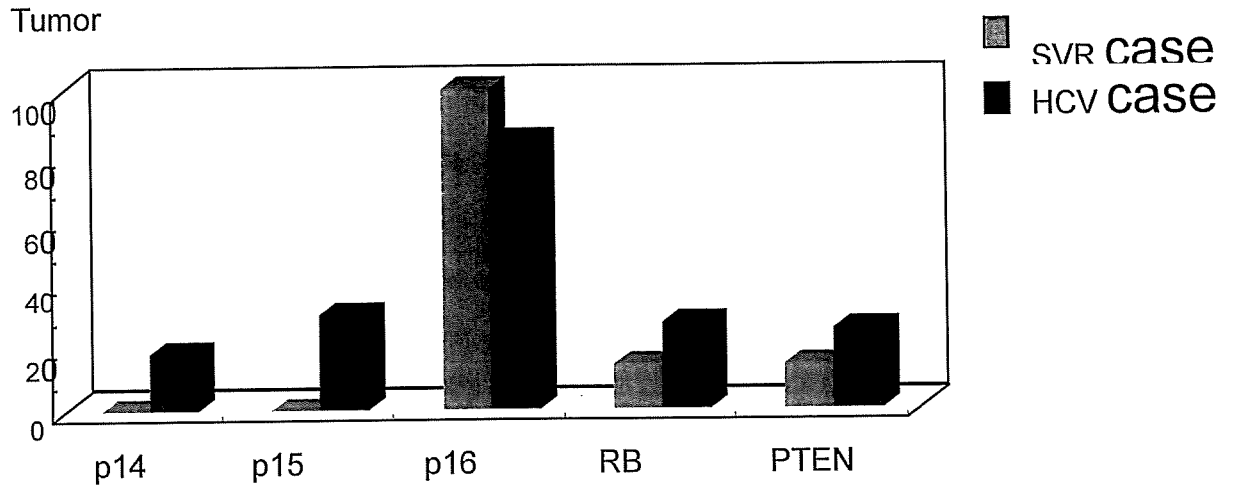


図 2. SVR肝癌とHCV肝癌における遺伝子メチル化の頻度。

研究要旨：遺伝子型 1b の C 型慢性肝炎の患者を対象に、ペグインターフェロン（PEG-IFN）とリバビリン併用療法前の肝生検組織において microRNA 発現の網羅的解析を行なった。肝線維化進行例（stage 3-4）では 7 種の microRNA 発現が有意に低下（fold change, 0.59~0.83）し、17 種の発現が有意に亢進（fold change, 1.21~2.59）していた。またウイルス学的著効例では 11 種の発現が有意に低下（fold change, 0.69~0.90）し、2 種の発現が有意に亢進（fold change, 1.03~1.80）していた。今後、これらの microRNA より絞込みを行い、肝線維化や治療抵抗性の機序を明らかにすることによって、新たな治療薬の開発など治療成績の向上に繋がることが期待される。

A. 研究目的

本邦における肝癌による死亡は年間約 35,000 人と推定され、悪性新生物による死亡の第 4 位となっている。その約 80% は C 型肝炎ウイルス（HCV）感染によると考えられ、その対策は急務である。C 型慢性肝炎では 10~20 年以上の経過で肝線維化が進展し、肝硬変を母地として肝癌が発生することが知られている。肝線維化は星細胞と筋線維芽細胞が関与する I 型コラーゲンの蓄積症候であるが、その分子機構には不明な点が多く残されている。

C 型慢性肝炎に対してはペグインターフェロン（PEG-IFN）とリバビリン併用療法が標準治療となっているが、本邦の C 型慢性肝炎のおよそ 7 割を占める遺伝子型 1b の患者においてウイルス学的著効（SVR）が得られるのは約半数にとどまっている。また遺伝子型に関わらず肝線維化進行例での SVR 率は低く、治療抵抗性の機序はウイルス側因子のみでは説明できない。そこで microRNA など肝組織中における遺伝子発現を制御する宿主側の因子を解析することにより肝線維化や治療効果を規定する要因が明らかになれば、新しい抗ウイルス療法・抗線維化療法の端緒となる可能性がある。

本研究では、マイクロアレイを用いて肝組織内の microRNA の発現を網羅的に解析し、(1)肝線維化進行例

に特異的な肝内 microRNA 発現の変化を同定するとともに、(2)遺伝子型 1b の C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN・リバビリン併用療法の治療抵抗性の機序を明らかにすることによって、新たな治療薬の開発など治療成績の向上に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

遺伝子型 1b の C 型慢性肝炎の患者を対象に、研究に関する説明と同意を取得した上で、肝生検組織において microRNA 発現の網羅的解析を行なった。すなわち病理学検査に必要な肝組織が十二分に採取された場合の余剰の肝組織の一部より mirVana miRNA isolation kit（Applied Biosystems）を用いて microRNA を抽出し 3D-Gene Human miRNA Oligo chip v10.1（東レ）を用いた網羅的解析を行なった。

- 1) まず肝線維化軽度群（stage 1-2）と肝線維化進行群（stage 3-4）との比較を行い肝線維化の進展に伴って特異的に変動する microRNA の同定を試みた。
- 2) 次に PEG-IFN- α 2b 1.5 μ g/kg（または PEG-IFN- α 2a 180 μ g）週 1 回とリバビリン 600~1,000 mg 連日を 48 週間投与し、治療終了 6 ヶ月後に血中 HCV RNA 陰性のものを SVR と判定した。SVR が得られた患者と得られなかった患者の比較により、治療効果

を規定する microRNA の同定を試みた。また正常肝細胞として、転移性肝癌切除例 4 例の非癌部を対照に用いた。

B. 研究結果

- 1) 肝線維化軽度群 (stage 1-2) と肝線維化進行群 (stage 3-4) の間で肝内microRNA発現を網羅的に解析した結果、肝線維化進行例では7種の発現が有意に低下 (fold change, 0.59~0.83) し、17種の発現が有意に亢進 (fold change, 1.21~2.59) していた。有意に低下したもののうち、miR-422aについては、 $p < 0.01$ であった。有意に亢進したもののうち、miR-222、miR-214、miR-199a-3p (miR-199b-3p)、miR-199a-5pについては、 $p < 0.01$ であった (図1)。
- 2) SVRが得られた症例と得られなかった症例の間で肝内microRNA発現を網羅的に解析した結果、SVR症例において11種の発現が有意に低下 (fold change, 0.69~0.90) し、2種の発現が有意に亢進 (fold change, 1.03~1.80) していた。有意に低下したもののうち、miR-660、miR-324-5p、miR-532-5pについては、 $p < 0.01$ であった (図2)。

D. 考察

近年、特定の遺伝子の発現を調節する因子として microRNA の働きが注目されている。肝癌細胞株 Huh7 やヒト初代培養肝細胞においてマイクロアレイを用いた *in vitro* の検討では、IFN 処理により約 30 個の microRNA が変動することが示されている (Pederson et al. *Nature* 2007;449:919-22)。そこで *in vivo* の C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN・リバビリン療法においても、microRNA が特定の遺伝子の発現を調節することによって、治療効果に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

本研究によって予想される結果として、第一に microRNA が PEG-IFN・リバビリン療法の治療効果を予測出来るマーカーとなり得る可能性が考えられる。IFN の効果を予測することは、無効例において副作用を伴う治

療を避けるためにも、医療経済的な見地からも非常に重要である。第二に肝線維化の進展や治療抵抗性に関する microRNA が同定出来れば、microRNA に作用し得る低分子物質のスクリーニングを行ない、究極的には新たな治療薬の開発に繋がる可能性がある。近年、患者の高齢化が進む中、副作用の問題から IFN などの抗ウイルス治療が使用出来ない症例が増えている。安全で長期間服用可能な肝線維症予防薬の開発は、このような社会的なニーズにも貢献出来ることが期待される。

現在、これまでの研究で候補に挙げられた microRNA が肝線維化に関連することを検証するため、リアルタイム PCR による定量的解析を行っている。また選択された microRNA のターゲット分子の検索を、miRBase 等のデータベースを用いて行っている。

E. 結論

遺伝子型 1b の C 型慢性肝炎において肝線維化や PEG-IFN・リバビリン治療効果を規定する microRNA の候補を同定した。microRNA という分子生物学の新領域を利用しつつ肝線維化の進展や治療抵抗性の機序を解明することにより、創薬開発、検査薬開発とそれらの商品化へと続く可能性が期待される。

F. 研究発表

論文発表

1. Optimal duration of additional therapy after biochemical and virological responses to lamivudine in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: a randomized trial. Enomoto M, Tamori A, Kohmoto MT, Hayashi T, Morikawa H, Jomura H, Sakaguchi H, Habu D, Kawada N, Shiomi S, Nishiguchi S. *Hepatol Res.* 2008;38:954-9.
2. Platelet-associated IgG for the diagnosis of immune thrombocytopenic purpura during peginterferon alpha and ribavirin treatment for chronic hepatitis C. Enomoto M, Yamane T, Hino

- M, Ohnishi M, Tamori A, Kawada N. *Liver Int.* 2008;28:1314-5.
3. Entecavir to treat hepatitis B-associated cryoglobulinemic vasculitis. Enomoto M, Nakamishi T, Ishii M, Tamori A, Kawada N. *Ann Intern Med.* 2008;149:912-3.
 4. Sildenafil-induced severe cholestatic hepatotoxicity. Enomoto M, Sakaguchi H, Ominami M, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:254-5.
 5. Noninvasive laboratory tests proposed for predicting cirrhosis in patients with chronic hepatitis C are also useful in patients with non-alcoholic steatohepatitis. Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Ohfuji S, Mori M, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Ikura Y, Ueda M, Kawada N. *J Gastroenterol* 2009;44:608-14.
 6. Applicability of BARD score to Japanese patients with NAFLD. Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. *Gut* 2009;58:1566-7.
 7. Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus. Enomoto M, Tamori A, Kawada N. *Rev Recent Clin Trials* 2009;4:179-84.
 8. Usefulness of transient elastography for assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B: regression of liver stiffness during entecavir therapy. Enomoto M, Mori M, Ogawa T, Fujii H, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Sawada A, Takeda S, Habu D, Shiomi S, Kawada N. *Hepatol Res.* 2010, in press.
 1. 第12回日本肝臓学会大会シンポジウム10「胆管&肝の自己免疫性あるいは薬物性病態形成:基礎と臨床の最新展開」薬物性肝障害から進展したと考えられる自己免疫性肝炎症例の検討(会議録). 小林佐和子, 榎本大, 河田則文. 肝臓 49 卷 Suppl.2 PageA434 (2008.09)
 2. 第12回日本肝臓学会大会シンポジウム19「B型肝炎の今日的標準治療と理想的近未来治療への挑戦」B型慢性肝炎における核酸誘導体の中止について(会議録). 榎本大, 田守昭博, 河田則文. 肝臓 49 卷 Suppl.2 PageA443 (2008.09)
 3. 第95回日本消化器病学会総会パネルディスカッション5「B型肝炎治療の最前線」B型慢性肝疾患に対するエンテカビルの治療効果～特に肝線維化改善効果について(会議録). 榎本大, 森真美, 河田則文. 日本消化器病学会雑誌 106 卷臨増総会 PageA76 (2009.03)
 4. 第13回日本肝臓学会大会シンポジウム10「B型慢性肝炎難治例への対策」エンテカビル効果不良のB型慢性肝疾患の特徴とその対策(会議録). 榎本大, 田守昭博, 河田則文. 肝臓 50 卷 Suppl.2 PageA440 (2009.09)
 5. 第38回日本肝臓学会西部会 HBV 関連クリオグロブリン血症における抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体の意義(会議録). 榎本大, 根来伸夫, 林健博, 藤井英樹, 黒岡浩子, 小林佐和子, 岩井秀司, 森川浩安, 田守昭博, 坂口浩樹, 河田則文. 肝臓 50 卷 Suppl.3 PageA679 (2009.10)
 6. 第96回日本消化器病学会総会シンポジウム3「B型肝炎治療の最新戦略」HBeAg陽性B型慢性肝炎に対する核酸誘導体/IFN sequential 療法の有用性とその限界(会議録). 榎本大, 西口修平, 河田則文. 日本消化器病学会雑誌 107 卷臨増総会 PageA86 (2010.03)

学会発表

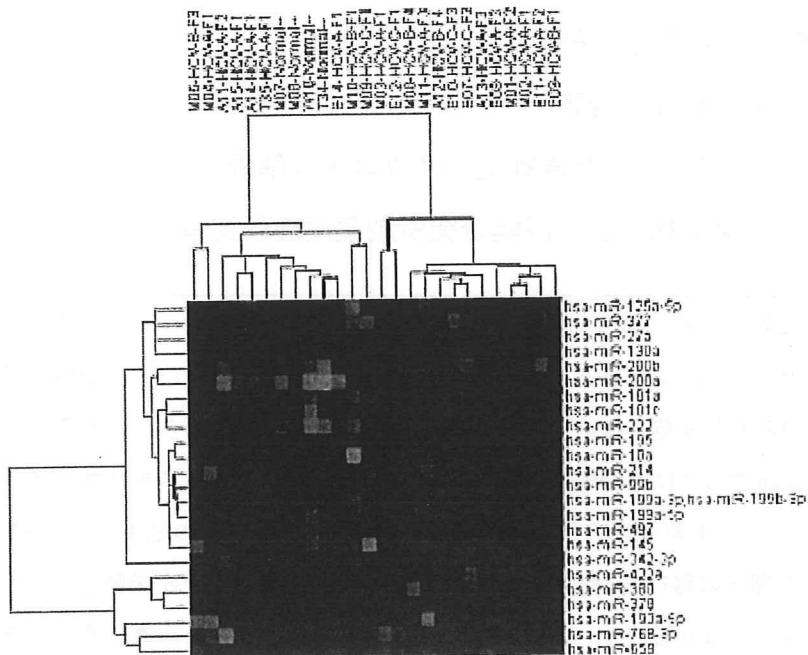


図1. 肝線維化軽度群 (stage 1-2) と肝線維化進行群 (stage 3-4) における肝内 microRNA 発現の比較

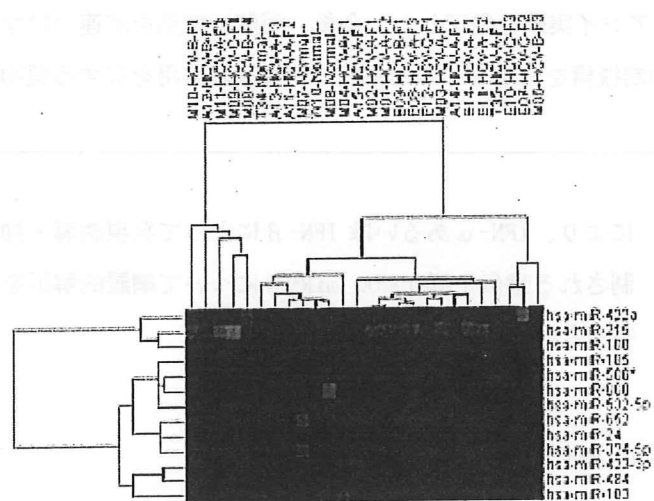


図2. SVR が得られた症例と得られなかった症例における肝内 microRNA 発現の比較

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）

インターフェロンの抗肝線維化分子機構の解明とその応用

分担研究報告書

インターフェロンの抗肝星細胞・抗肝線維化のメカニズム解析

分担研究者 鈴木 知比古 東レ株式会社医薬研究所創薬薬理研究室

研究要旨：C型慢性肝炎やC型代償性肝硬変に対するインターフェロン（interferon, IFN）治療において、ウイルス駆除に至らなくとも、肝線維化の進展や肝癌の発症が抑えられることが示されているが、その詳細な分子機構は不明である。肝線維化に重要な役割を果たしている肝星細胞（HSC）に対するIFNの直接的作用を明らかにすることを目的として、本年度はまず、細胞増殖・細胞周期および細胞外基質分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ（Matrix metalloproteinase, MMP）の産生に対するI型IFNの作用に着目して検討を行った。その結果、I型IFNはヒトHSCに対し、①細胞周期のG1期からS期への移行を抑制し、細胞増殖抑制作用を示すことを確認した。そのメカニズムの一つとして、I型IFNがサイクリン依存性キナーゼ（CDK）阻害因子であるp21を誘導することを明らかにした。②MMP-1産生を濃度依存的に増加させること、またTGF- β 処置によるMMP-1産生の低下に対し、I型IFNがその産生を正常レベルにまで回復させることを確認した。またTGF- β シグナルの抑制を示唆する、Smad2のリン酸化抑制ならびにSmad7遺伝子の発現上昇がメカニズムの一部として明らかとなった。一方、I型IFN処置したHSCにおける網羅的miRNAおよびmRNAアレイ実験を完了した。今後、両解析結果を関連づけながら詳細な解析を進め、得られた情報からIFNの線維化抑制機構を分子レベルで解明し、類似の作用を有する薬物の探索方を提案する。

A. 研究目的

インターフェロン（IFN） $-\alpha$ 、IFN $-\beta$ に代表されるI型IFNは、その抗ウイルス作用とは独立して、慢性肝炎患者における肝線維化の進展を抑制することが示されているが、その詳細な作用メカニズムは未だ明らかになっていない。本研究では、肝線維化に重要な役割を果たしている、活性化した肝星細胞（HSC）に対するI型IFNの作用を検討し、その抗肝線維化作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ヒトの活性化HSC株を用いて、ヒトIFN $-\alpha$ あるいはIFN $-\beta$ の細胞増殖に対する作用、細胞周期に対する作用、細胞周期関連タンパク質発現に対する作用を、それぞれMTS法、フローサイトメトリー法、ウェスタンブロット法にて検討した。さらに、マイクロアレイ法

により、IFN $-\alpha$ あるいはIFN $-\beta$ によって発現誘導・抑制される遺伝子群（mRNA, miRNA）について網羅的解析を行った。

C. 研究結果

IFN $-\alpha$ あるいはIFN $-\beta$ を活性化HSC株に処置すると、①細胞増殖が抑制され（図1）、かつ②IFN未処置の細胞と比較して、細胞周期における4倍体細胞の割合が低下していた（図2）。同じ生物活性濃度で処置した場合、それらの作用はIFN $-\alpha$ よりもIFN $-\beta$ で顕著であった（図3）。また、③サイクリン依存性キナーゼ（CDK）阻害因子p21はIFN $-\beta$ 処置によってそのタンパク質発現が亢進したが、IFN $-\alpha$ 処置では、同様の発現亢進は検出されなかった（図4）。さらに、マイクロアレイ遺伝子（mRNA）発現解析により、④肝細胞癌株Huh-7においてIFN $-\alpha$ とIFN $-\beta$ 処置で多種多様な遺伝子発現変動

が観察されたものの、両社に顕著な違いは検出されなかった。一方、HSC株ではIFN- α と比べてIFN- β 処置でダイナミックな遺伝子の変動が検出され(図5)、また、⑤p21以外にもIFN- β 特異的に発現制御されている細胞周期関連遺伝子が複数同定された(図6)。なお、miRNAの発現は今回の処置条件ではほとんど変化が認められなかった(data not shown)。

D. 考察

I型IFNは、活性化HSCにおいて、細胞周期G1期からS期への移行を抑制する、細胞周期停止作用を有することが明らかとなった。I型IFNのなかでもIFN- β は、特定の細胞周期関連遺伝子の発現を調節し、IFN- α と比較して優位な細胞周期停止作用、およびそれに伴う細胞増殖抑制作用を有すると考えられた。またIFN- β による抗肝線維化作用の一つは、活性化HSCに対する増殖抑制作用によって説明されることが明らかとなった。また、その作用メカニズムは、CDK阻害因子p21をはじめとする細胞周期関連分子の発現制御による、細胞周期S期への移行抑制であることが示唆された。

F. 研究発表

論文発表

1. I型インターフェロンの肝線維化改善メカニズム。
西村和美、鈴木知比古。細胞 2009;41:35-38

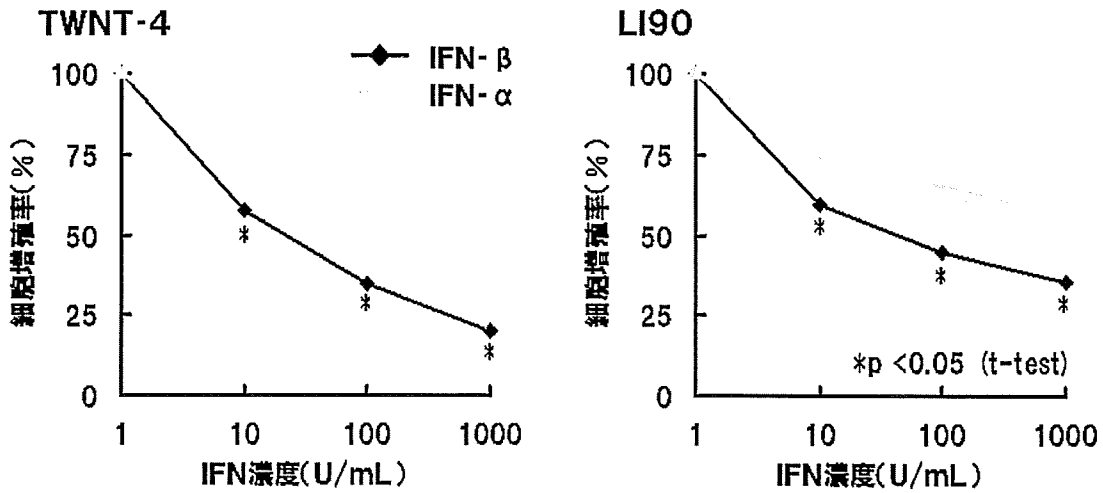


図1 細胞増殖抑制試験 (ヒト肝星細胞株TWNT-4・LI90)

ヒト肝星細胞株TWNT-4およびLI90において、IFN-βおよびIFN-αによる増殖抑制作用が検出された。また、IFN-αと比較してIFN-βのほうが顕著な抑制作用を示した。

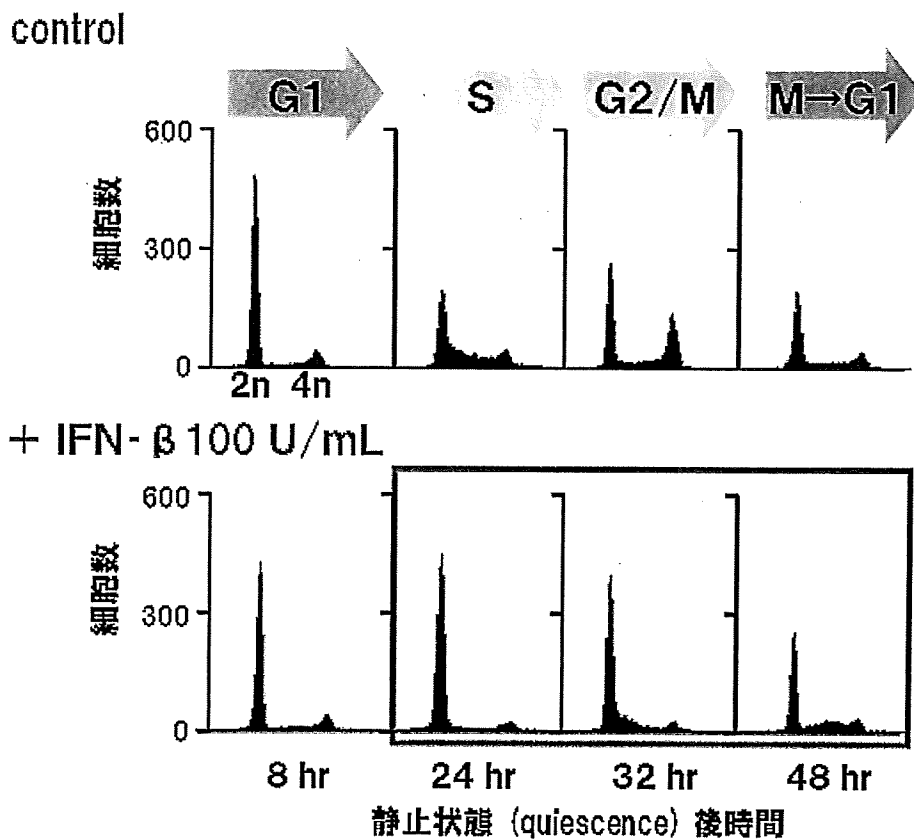


図2 IFN-βによるHSC細胞周期抑制作用

ヒト肝星細胞株TWNT-4にIFN-βを処置すると、G1期からS期への移行が抑制された。

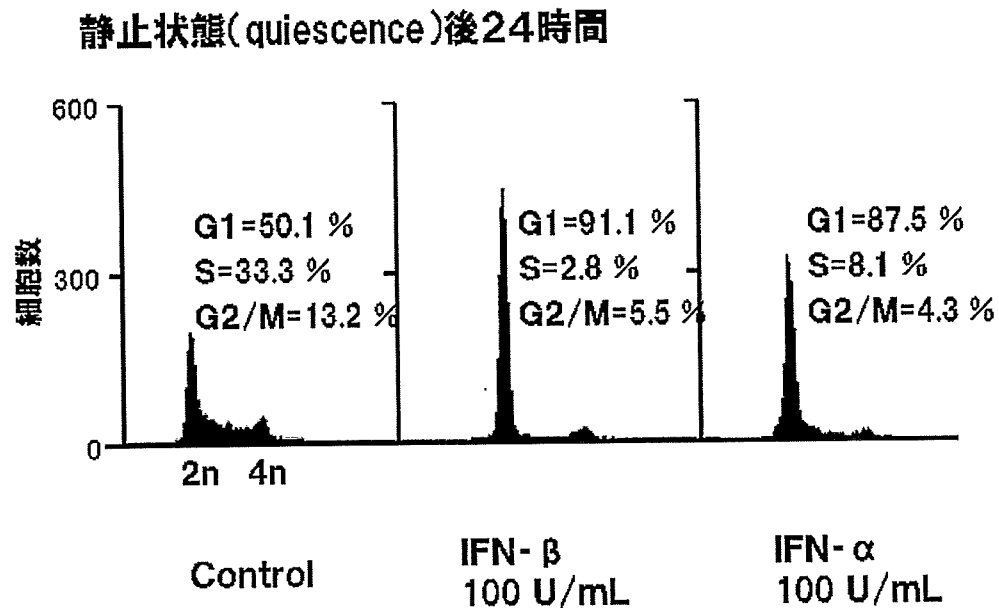


図3 フローサイトメトリー解析によるIFN-βまたはIFN-αのHSC細胞周期抑制作用の比較～ (ヒト肝星細胞株TWNT-4)

ヒト肝星細胞株TWNT-4に対するS期移行抑制作用は、IFN-αと比較してIFN-βのほうが顕著であった。

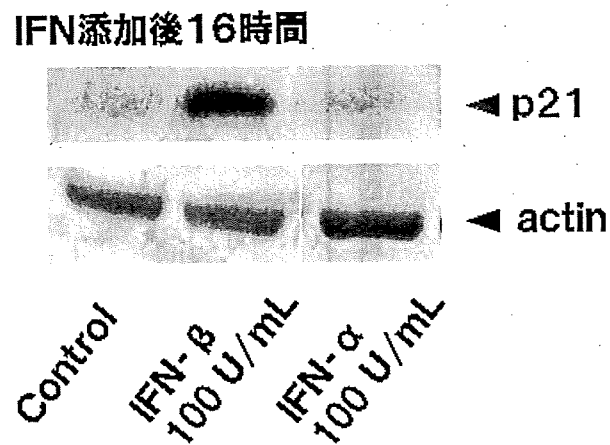


図4 IFN-βによるCDK阻害因子p21誘導 ウェスタンブロット解析 (ヒト肝星細胞株TWNT-4)

IFN-βはヒト肝星細胞株TWNT-4において、CDK阻害因子p21の発現を誘導した。一方、IFN-αにはp21発現誘導作用は検出されなかった。

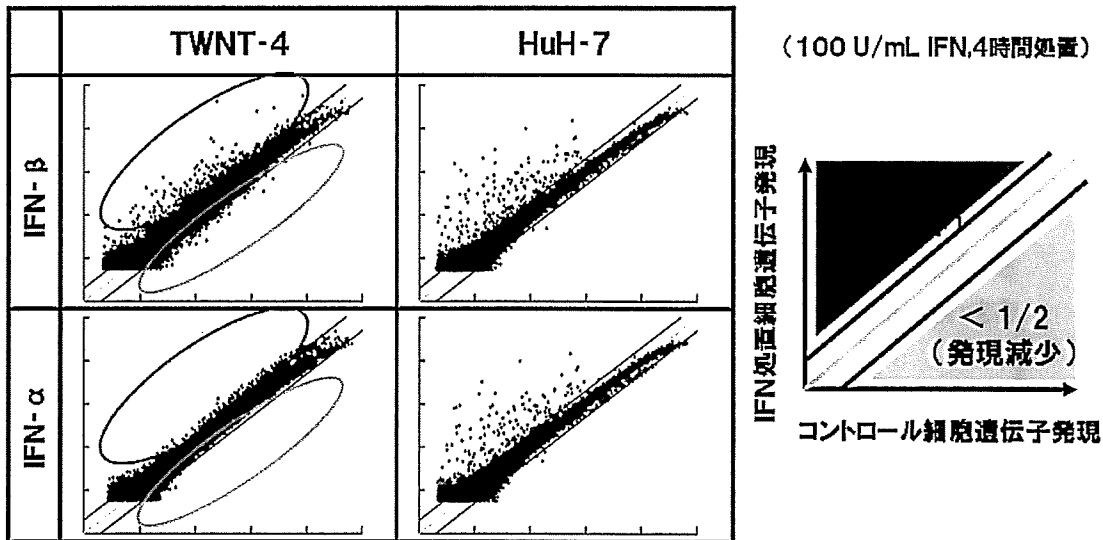


図5 マイクロアレイ遺伝子発現解析 (ヒト肝星細胞株TWNT-4・ヒト肝細胞癌由来細胞株: HuH-7)
 マイクロアレイ遺伝子発現解析の結果、特にヒト肝星細胞株TWNT-4においてIFN-β特異的に発現誘導・抑制される遺伝子が多数同定された。

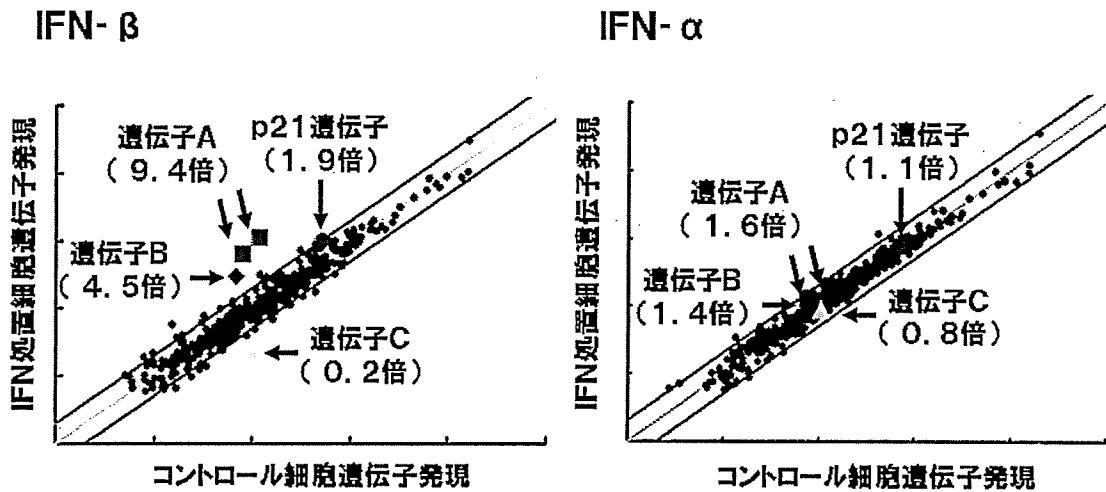


図6 Gene Ontology 解析により cell cycle に分類される遺伝子群の I 型 IFN による発現変動 (ヒト肝星細胞株 TWNT-4)

ヒト肝星細胞株 TWNT-4 において、p21 遺伝子の IFN-β 特異的な発現誘導が確認された。他にも IFN-β 特異的に発現誘導される細胞周期抑制遺伝子 A、B、および IFN-β 特異的に発現抑制される細胞周期促進遺伝子 C が同定された。

研究成果の刊行に関する一覧表

河田則文

書籍：

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
河田則文	肝臓の線維化研究の進展	林紀夫、日比紀文、西紀夫、瀬川徹	Annual Review of消化器	中外医学社	東京	2010	158-164

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Enomoto M, Tamori A, Kawada N.	Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus.	Rev Recent Clin Trials.	4	179-84	2009
Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N.	Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells.	Biochem Biophys Res Commun.	391	316-21	2010
Ogawa T, Kawada K, Ikeda K	Effect of natural interferon alpha on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells.	Hepatology Int.		in press	2009
Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N	Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis	Hepatology Int.	3	378-83	2009
Smedsrød B, LeCouteur D, Ikejima K, Jaeschke H, Kawada N, Naito M, Knolle P, Nagy L, Senoo H, Vidal-Vanaclocha F, Yamaguchi N	Hepatic sinusoidal cells in health and disease: update from the 14th International Symposium.	Liver Int.	29	490-501	2009
河田則文	肝臓線維化研究の現状。	Frontiers in Gastroenterology	10	11-20	2010
田守昭博, 河田則文	occult HBV感染とは何か。	Medicina	47	484-485	2010

池田一雄

書籍 なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N	Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells.	Biochem Biophys Res Commun	391(1)	316-21	2010
Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N	Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis	Hepatology Int	3(2)	378-83	2009

小川智弘

書籍：なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogawa T, Fujii H, Yoshizato K, Kawada N	A human-type non-alcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits	Am J Pathol.		in press	2010
Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N	Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells	Biochem Biophys Res Commun	391	316-21	2010
Mu YP, Ogawa T, Kawada N	Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet	Laboratory Investigation	90	245-56	2010
Ogawa T, Kawada K, Ikeda K	Effect of natural interferon on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells	Hepatology Int.		in press	2009
Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N	Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis	Hepatology Int.	3	378-383	2009

書籍：なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Namiki I, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M.	Management of hepatitis C; Report of the Consensus Meeting at the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009).	Hepatol Res	40	347-68.	2010
Tamori A, Enomoto M, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Sakaguchi H, Habu D, Shiomi S, Imanishi Y, Kawada N.	Add-on combination therapy with adefovir dipivoxil induces renal impairment in patients with lamivudine-refractory hepatitis B virus.	J Viral Hepat.	17	123-9	2010
Habu D, Nishiguchi S, Nakatani S, Lee C, Enomoto M, Tamori A, Takeda T, Ohfuji S, Fukushima W, Tanaka T, Kawamura E, Shiomi S.	Comparison of the effect of BCAA granules on between decompensated and compensated cirrhosis.	Hepatogastroenterology	56	1719-23	2009
Enomoto M, Tamori A, Kawada N.	Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus.	Rev Recent Clin Trials.	4	179-84	2009
Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N.	Applicability of BARD score to Japanese patients with NAFLD.	Gut	58	1566-7	2009
Kawamura E, Habu D, Morikawa H, Enomoto M, Kawabe J, Tamori A, Sakaguchi H, Saeki S, Kawada N, Shiomi S.	A randomized pilot trial of oral branched-chain amino acids in early cirrhosis: validation using prognostic markers for pre-liver transplant status.	Liver Transpl.	15	790-7	2009
Morimoto K, Yamagami H, Hosomi S, Ohira M, Suekane T, Kamata N, Sogawa M, Watanabe K, Tominaga K, Watanabe T, Fujiwara Y, Tamori A, Oshitani N, Arakawa T.	Development of pouchitis with combination therapy with peg-interferon alpha-2b and ribavirin for chronic hepatitis C in a patient with ulcerative colitis who underwent pouch surgery.	Am J Gastroenterol.	104	1609-10	2009

Tamori A, Hayashi T, Shinzaki M, Kobayashi S, Iwai S, Enomoto M, Morikawa H, Sakaguchi H, Shiomi S, Takemura S, Kubo S, Kawada N	Frequent detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma of patients with sustained virologic response for hepatitis C virus	J Med Virol	81	698-14	2009
--	---	-------------	----	--------	------

榎本 大

書籍：なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Enomoto M, Tamori A, Kohmoto T, Hayashi T, Morikawa H, Jomura H, Sakaguchi H, Habu D, Kawada N, Shiomi S, Nishiguchi S	Optimal duration of additional therapy after biochemical and virological responses to lamivudine in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: a randomized trial	Hepatol Res	38	954-9	2008
Enomoto M, Yamane T, Hino M, Ohnishi M, Tamori A, Kawada N	Platelet-associated IgG for the diagnosis of immune thrombocytopaenic purpura during peginterferon alpha and ribavirin treatment for chronic hepatitis C	Liver Int	28	1314-5	2008
Enomoto M, Nakanishi T, Ishii M, Tamori A, Kawada N	Entecavir to treat hepatitis B-associated cryoglobulinemic vasculitis	Ann Intern Med	149	912-3	2008
Enomoto M, Sakaguchi H, Ominami M, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Kawada N	Sildenafil-induced severe cholestatic hepatotoxicity	Am J Gastroenterol	104	254-5	2009
Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Ohfujii S, Mori M, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Ikura Y, Ueda M, Kawada N	Noninvasive laboratory tests proposed for predicting cirrhosis in patients with chronic hepatitis C are also useful in patients with non-alcoholic steatohepatitis	J Gastroenterol	44	608-14	2009

Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. Applicability of BARD score to Japanese patients with NAFLD	Applicability of BARD score to Japanese patients with NAFLD	Gut	58	1566-7	2009
Enomoto M, Tamori A, Kawada N	Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus	Rev Recent Clin Trials	4	179-84	2009

鈴木知比古

書籍：なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌：なし

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
西村和美、鈴木知比古	I型インターフェロンの肝線維化改善メカニズム	細胞	41	35-38	2009

研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

Emerging Antiviral Drugs for Hepatitis C Virus

Masaru Enomoto, Akihiro Tamori and Norifumi Kawada*

Department of Hepatology, Osaka City University Medical School, Osaka, Japan

Abstract: Infection with hepatitis C virus (HCV) is a global health problem that affects approximately 170 million people worldwide. The current standard therapy with peginterferon alpha plus ribavirin for 48 weeks results in a sustained virologic response in less than 50% of patients with chronic hepatitis C genotype 1—the most prevalent type of HCV in North America and Europe. Development of new antiviral medicines has been hampered by the lack of an effective cell culture system and small-animal model. Herein we review recent progress in the development of new treatments under investigation in clinical trials, including specifically targeted antiviral therapy for HCV such as NS3/4A protease and NS5B polymerase inhibitors.

Keywords: Hepatitis C virus, interferon, polymerase inhibitor, protease inhibitor, ribavirin, STAT-C.

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV), a member of the family *Flaviviridae*, infects approximately 170 million people worldwide and is an important health care problem [1]. Persistent infection with HCV often progresses to chronic hepatitis, liver cirrhosis, and possibly hepatocellular carcinoma over the course of several decades. The current standard therapy with peginterferon alpha and ribavirin for 48 weeks results in a sustained virologic response (SVR), defined as undetectable HCV RNA levels 24 weeks after the end of therapy, in less than 50% of patients with chronic hepatitis C genotype 1—the most prevalent type of HCV in North America and Europe [2, 3]. No effective alternative treatment is currently available for non-responders.

Until recently, development of new antiviral medicines has been hampered by the lack of an effective cell culture system and small-animal model. In 1999, Lohmann *et al.* reported selection of the first functional subgenomic replicons in cell culture [4]. In 2005, Wakita *et al.* showed that the full-length JFH-1 genome, a genotype 2a HCV isolate obtained from a patient in Japan with fulminant hepatitis, produces infectious particles in cell culture [5]. On the other hand, a chimeric mouse model for human liver diseases has been established by transplanting normal human hepatocytes into severe combined immunodeficiency mice carrying a plasminogen activator transgene [6]. These experimental systems provide important tools for evaluating potential antiviral compounds.

As shown in Fig. (1), the HCV genome consists of a 9.6-kb uncapped linear single-stranded RNA with positive polarity [7]. It contains 5' and 3' untranslated regions including control elements required for translation and replication. The untranslated regions flank an uninterrupted open reading frame encoding a single polyprotein of 3,010 amino acids, which is processed into structural (C, E1, E2, and p7) and nonstructural (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B)

subunits. The HCV NS3/4A serine protease or NS5B RNA-dependent RNA polymerase is essential for viral replication and can be specific targets of new antiviral agents. In fact, these agents have shown a potent antiviral effect, but monotherapy has been complicated by rapid virologic breakthrough due to the selection of drug-resistant mutants [8,9]. The efficacy of most specifically targeted antiviral therapies for HCV (STAT-C) is therefore focused on a combination of peginterferon alpha and ribavirin. *In vitro* resistance profiles for point mutations within the HCV NS3 protease and NS5B polymerase are shown in Fig. (2). Drug-resistant mutations limit subsequent treatment options because of cross-resistance.

We herein review recent progress in the development of new treatments under investigation in clinical trials, including STAT-C agents such as NS3/4A protease and NS5B polymerase inhibitors.

INTERFERON FORMULATION

Interferon alpha is a key drug for the treatment of chronic HCV infection. It initiates the Janus kinase/signal transducer and activates the transcription signaling cascade, which leads to the transcriptional induction of interferon-stimulated genes and subsequently establishes a non-specific antiviral state within the cell [10]. The attachment of a polyethyleneglycol moiety to interferon alpha produces a biologically active molecule with a long half-life and favorable pharmacokinetics. Peginterferon alpha is administered weekly as a current standard of care in combination with ribavirin [2, 3].

Albinterferon alpha-2b is a novel 85.7-kDa recombinant polypeptide consisting of interferon alpha-2b that is genetically fused to human serum albumin. The albumin-fusion platform takes advantage of the long half-life of human albumin to provide a new treatment approach that allows a reduction in the dosing frequency of interferon alpha [11]. The Phase IIa study examined the use of two subcutaneous injections of albinterferon alpha-2b 14 days apart, at doses ranging from 200 to 1,200 µg, and showed that the median terminal half-life extended to 141 h, that is longer than half-life of peginterferon alpha (approximately 40–80 h) [12]. Albinterferon alpha-2b was well tolerated at doses up to 1,200 µg, and the mean reduction in HCV RNA at week 4 in

*Address Correspondence to this author at the Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University Medical School, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan; Tel: 81-6-6645-3811; Fax: 81-6-6645-3813; E-mail: kawadanori@med.osaka-cu.ac.jp

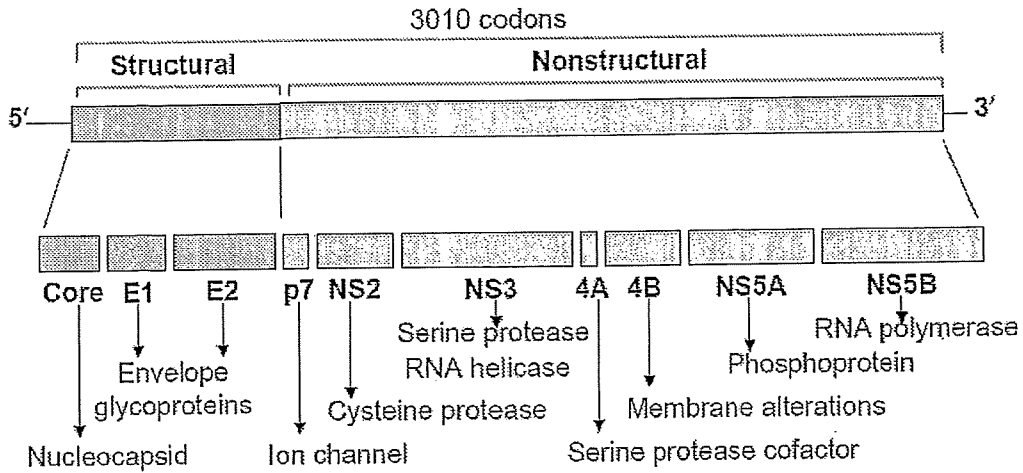


Fig. (1). Structure of the HCV genome. It consists of approximately 9,600 nucleotides in positive, single-stranded RNA, including the long open reading frame, encoding a single polyprotein of 3,010 amino acids which is processed into structural (C, E1, E2, and p7) and nonstructural (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B) subunits, and 5' and 3' untranslated regions.

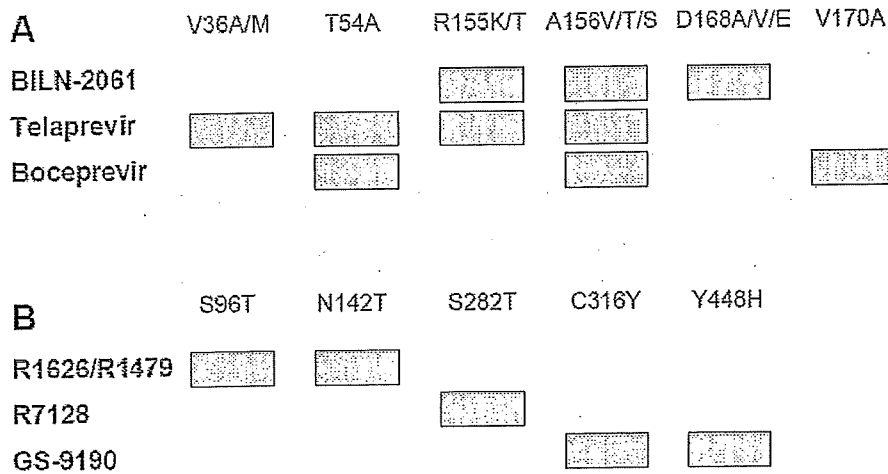


Fig. (2). *In vitro* resistance profiles for point mutations within the HCV NS3 protease (A) and NS5B polymerase (B). The list does not contain all identified variants.

those given the higher doses of 900 or 1,200 µg was 3.2 log₁₀ IU/mL. In the Phase IIb study, previously untreated (naïve) patients with genotype 1 chronic hepatitis C were randomly assigned to a 48-week treatment with 180 µg peginterferon alpha-2a once per week, 900 or 1,200 µg albinterferon alpha-2b once every 2 weeks, or 1,200 µg albinterferon alpha-2b once every 4 weeks plus weight-based ribavirin [13]. The rates of SVR by intention-to-treat analysis ranged from 51% to 59% in the 3 albinterferon groups treated at 2- or 4-week intervals compared with 58% in the weekly peginterferon group (*P* = 0.64 for overall test).

RIBAVIRIN DERIVATIVE

Ribavirin is a synthetic guanosine nucleoside analogue that inhibits the replication of various RNA and DNA viruses. Although the exact mechanisms by which ribavirin

could act in HCV infection remains uncertain, some mechanisms have been proposed, including immunomodulation promoting T helper cell type 1 over type 2 phenotype, inosine monophosphate dehydrogenase inhibition leading to GTP depletion, direct inhibition of HCV RNA polymerase, and mutagenesis resulting in reduced virion infectivity [10]. Monotherapy with ribavirin was associated with improvements in aminotransferase levels in at least half of the patients with chronic hepatitis C, but not with a significant decrease in serum HCV RNA levels. However, the addition of ribavirin to interferon results in a substantially higher rate of SVR than does interferon alone [14, 15].

Hemolytic anemia is the most common reason for reducing the dose and discontinuing ribavirin, which can lower the efficacy of treatment [16]. Administration of erythropoietin can improve anemia caused by ribavirin, but is associated