

高齢者での臨床効果の低下に關与しているのではないかと考えられた。

SVRおよびNR両方の関連要因がTaqMan法でのHCV RNA量であった。IFN単独療法の際にはRNA量が臨床効果に対する強い影響因子であったが、PEG-IFN/RIBA併用療法の開始以降はアンプリコアモニターのハイレンジ法でも高ウイルス領域でのウイルスの多寡と臨床効果の関連は明確ではなかった。しかし、real time PCR法によるウイルス量の定量が可能となったことにより、ウイルス量と抗ウイルス効果の関連が明らかとなった⁶⁾。今回の成績でもウイルス量が増加するとともにSVR率は低下し、6Log未満と6Log以上に分けてみても明らかな有意差を認めた。

これら多数のSVRおよびNRの関連要因が複雑に臨床効果に影響を与えていると考えられたが、ひとたびPEG-IFN/RIBA併用療法を開始したのちはウイルス減衰が最も強い効果規定因子であった。4週時のHCV RNA量が4Log未満に減衰していた症例では76.3%と高いSVR率が得られ、2Log未満にまで減衰していた42例では1例を除いて全例が12週までにRNAが陰性化するとともにSVR率も97.6%であった。反対に、4Log以上であった症例ではSVR率が10.3%と低下し、4週時も5Log以上と減衰量がわずかであった37例からは1例もSVRが得られなかった。このように、投与開始後のウイルス減衰は最終的な臨床効果ばかりでなく、RNA陰性化時期の予測にも非常に有用と考えられた。

72週延長投与すべき症例の選択にはウイルス陰性化時期がもっとも重要と思われる。8週以内陰性化例からは1例も再燃がみられなかったことから、これらの症例については48週の投与で十分と判断される。また、12週および16週陰性化例からも比較的高いSVRが得られたが再燃例も

少なからず認められており、これら再燃例に対する延長投与の効果はより高いと推察される。12週陰性化例の背景因子と臨床効果との関連をみると高齢者では再燃する傾向が強く、60歳以上では12週で陰性化が得られていても可能であれば延長投与すべきと考えられる。一方、16週陰性化例ではSVRとnon SVRで背景因子に有意な差を認めず、これらの結果から16週以降の陰性化例については厚労省班会議のGuideline通り72週の延長投与が妥当と思われる。

当科での延長投与例についてRNA陰性化時期と臨床効果の関連をみると、16～24週の陰性化例においても15例中10例(66.7%)がSVRとなっており、延長投与により効果が向上しているものと判断される。しかし、24週以降の陰性化例からは9例中1例しかSVRが得られなかった。また、開始時のRNA量が6Log未満と比較的低ウイルスの2例でも再燃がみられたが、いずれも女性で4週までのウイルスの低下量が1Log未満と極めて少なく、ウイルス減衰の勾配が緩やかなために陰性化時期が予想以上に遅延したものと考えられる。これらの症例ではprotease inhibitorやpolymerase inhibitorといった今後開発が予定されている新規薬剤の適用も考慮すべきではないかと考えられた。

おわりに

PEG-IFN/RIBA 72週延長投与はその有効性を向上させるものと思われ、特に16～24週の陰性化例ではSVR率を著明に改善すると期待される。また、現在の厚労省班会議治療Guidelineは極めて妥当と考えられるが、高齢者では12週目陰性化例であっても延長投与を考慮すべきと思われた。

〈文献〉

- 1) Berg T et al : Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1 : comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterol* **130** : 1086-1097, 2006.
- 2) Pearlman BL et al : Treatment extension to 72 weeks of peginterferon and ribavirin in hepatitis c genotype 1-infected slow responders. *Hepatology* **46** : 1688-1694, 2007.
- 3) Akuta N et al : Predictors of viral kinetics of peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients with hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol* **79** : 1686-1695, 2007.
- 4) Romero-Gomez M et al : Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterol* **128** : 636-641, 2005.
- 5) Reiberger T et al : IP-10 correlates with hepatitis C viral load, hepatic inflammation and fibrosis and predicts hepatitis C virus relapse or non-response in HIV-HCV coinfection. *Antivir Ther* **13** : 969-976, 2008.
- 6) 豊田成司 他 : コバスTaqMan HCV「オート」によるC型慢性肝炎抗ウイルス療法時のウイルス動態と効果予測. *肝臓* **49** : 297-306, 2008.

* * *

C型肝炎の自然免疫系遺伝子発現プロファイルと抗ウイルス療法の治療効果

朝比奈 靖浩*

はじめに

わが国において年間約3万4千人が肝臓癌で死亡しており、肝臓癌は死亡原因として重要な位置を占めている。肝細胞癌の75%はC型肝炎が原因であり、わが国における肝細胞癌の撲滅にはC型肝炎ウイルス(HCV)の駆除が極めて重要である。HCVの駆除にはインターフェロン(IFN)治療が最も基本的であるが、わが国のC型慢性肝炎の約70%を占めるHCV genotype 1bはIFNに抵抗性を示すことが知られ、特に高ウイルス量症例やIFN感受性決定領域(Interferon sensitivity determining region ; ISDR)にアミノ酸変異がない症例では、IFN単独24週の治療ではウイルス学的著効(sustained viral response ; SVR)が得られる率はこれまで10%以下であった。

近年、genotype 1b型かつ高ウイルス症例のいわゆる難治性C型慢性肝炎に対して、ペグ・インターフェロン(PEG-IFN)/リバビリン(RBV)併用療法が導入され、約50%の症例でSVRが得られるようになった。しかし、約15%は治療中HCV dynamicsの第2相以降のウイルス減少を認めないいわゆるnull responderで治療抵抗性である¹⁾。これらnull responderに対しては、治療抵抗性の機序を解明し、プロテアーゼ阻害薬などの新薬による治療も視野に入れた対策が必要である。しかし、これら難治例の治療抵抗性の機序は不明であり、またPEG-IFN/RBV併用

療法の治療前にnull responseを予測することは困難である。今回、筆者らはHCVの排除に重要と考えられている宿主の自然免疫機構に注目し、これらの遺伝子発現とPEG-IFN/RBV併用療法の治療効果との関連について検討したので概説する²⁾。

PEG-IFN/RBV併用療法の治療効果に関与する要因

PEG-IFN/RBV併用療法は、承認以来すでに5年近くが経過し、実地臨床における治療成績の実態を多数例で解析することが可能になってきた。そこで、まず当院においてPEG-IFN α -2b/RBV併用療法を施行した561例のうちgenotype 1b型かつ高ウイルス量の473例を対象とし、難治要因に関わる因子を検討した。すでに最終治療効果を判定し得た症例について検討すると、予定投与量の80%以上を投与できた症例におけるSVR率(PP解析)は61%であったが、減量・中止例を含めたITT解析では37%となった。SVRに関与する治療前因子を単変量解析で検討すると、年齢、性別のほか、過去のIFN治療効果、血小板数、ヘモグロビン値、血清クレアチニン値、血清 γ -GTP値、肝線維化が有意な因子として挙げられ、さらに体重、LDLコレステロール値、血糖値、肝脂肪化といった代謝に関連する因子に有意差があった。ウイルス学的には、ウイルス量は有意ではなかったが、ISDR変異とHCV

*武蔵野赤十字病院 消化器科[〒180-8610 東京都武蔵野市境南町1-26-1]

コア70番・91番変異が有意であった。これらについて非SVRに寄与する独立因子を多変量解析を用いて検討すると、①高齢、②女性、③架橋形成を伴う高度線維化、④ISDR野生型、⑤HCVコア変異型の5因子が難治要因として抽出された。

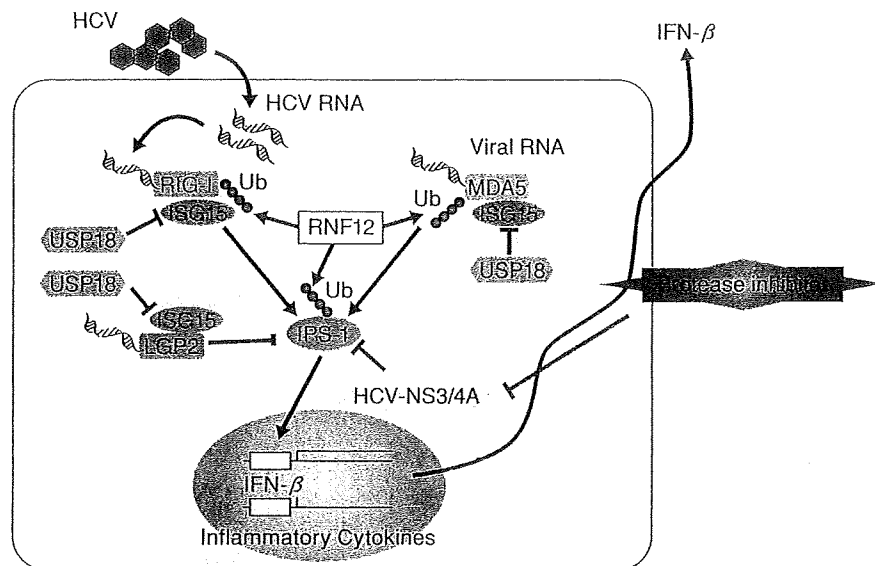
一方、予定投与量の80%以上が投与できているにも関わらず、治療中HCVが陰性化しない nonvirological response (NVR) の症例は、13%に認められた。NVRに関与する治療抵抗因子としては、①HCVコア変異、②架橋形成を伴う高度線維化、③血清 γ -GTP高値、④血清クレアチニン低値が多変量解析により抽出された。したがって、これらの臨床的検討から治療抵抗性に関わる因子としては、ウイルス因子の他に何らかの宿主因子が関与している可能性が考えられた。しかし、その機序の詳細は未だ十分に明らかではなく、宿主因子とウイルス因子の相互の関わり合いについても不明である。

C型肝炎ウイルスと自然免疫

そこで、筆者らは、IFN不応性に関わる宿主側要因として宿主自然免疫系に注目した。すなわち、近年の *in vitro* の研究によるとHCVに対する生体防御には宿主自然免疫が重要とされるが³⁾、この自然免疫系にはIFN系が深く関わっていることから、IFN治療抵抗性には宿主自然免疫が何らかの影響を及ぼしていると考えた。

HCVが細胞に感染すると、まずHCV由来のRNAが細胞内のウイルスセンサーであるRIG-I (retinoic acid inducible gene I) によって探知され、そのシグナルがアダプター分子であるIPS-1 (IFN- β promoter stimulator-1: 別名MAVS, Cardif, VISA) を介して核に伝達されIFN- β が産生される。この自然免疫の作動がHCV感染に際して生体側で起こる最初の防御機構であるとされる(図1)。

図1 HCV感染と宿主自然免疫



Asahina Y et al: *Gastroenterology* 134: 1396-1405, 2008. 改変

RIG-Iは細胞質に存在するヘリカーゼであり、ウイルス由来の5'の三リン酸構造や3'のポリU配列を認識し、形質細胞様樹状細胞以外のほとんどの細胞においてウイルス感染センサーとして必須の役割を担っている⁴⁾。RIG-Iと構造上非常に類似したファミリー分子であるMDA5も同様の機能を有するウイルスセンサー分子であることが示されているが、ピコルナウイルスなどRIG-Iとは違ったウイルス種を認識しているとされる⁵⁾。RIG-IまたはMDA5がウイルス由来RNAを感知するとその三次構造が変化し、下流で機能するアダプター分子であるIPS-1と会合する。IPS-1はミトコンドリアにアンカリングしている蛋白であり、RIG-IやMDA5が感知したウイルス感染シグナルを核に伝えるのに必須である⁶⁾⁻⁹⁾。

これらRIG-I/IPS-1系は、いろいろな宿主分子により制御を受けている可能性が示されている。たとえば、RIG-Iと同様の分子構造をもつRIG-Iファミリー分子のLGP2はIPS-1との結合に必要なCARDドメインを欠くため、シグナルを核に伝達することができずRIG-I/IPS-1系の制御に関与すると報告されている⁵⁾。また、ユビキチン様蛋白であるISG15は、STAT1やJak1と結合しIFNシグナル伝達を修飾する一方、RIG-IやIPS-1などと結合することにより(ISGylation)その機能を修飾していると考えられている¹⁰⁾。そして、ISG15とその結合蛋白とを解離させる特異的プロテアーゼであるUSP18はISGylationに対して抑制的に働くことが報告されている¹¹⁾¹²⁾。さらに、最近このRIG-I/IPS-1系の特異的ユビキチンE3リガーゼであるRNF125が同定され、ubiquitin-proteasome pathwayによりRIG-I, MDA5およびIPS-1を分解し抑制的に調節していることが示されている¹³⁾。

一方、非常に興味深いことにHCVのNS3/4AセリンプロテアーゼはIPS-1をミトコンドリアとアン

カリングしている部分で切断することが示されており、HCVはRIG-I/IPS-1系を標的とすることで巧みに宿主の自然免疫系から逃れている可能性が示唆されている(図1)⁶⁾¹⁴⁾。したがって、これまでの*in vitro*の研究から、RIG-I/IPS-1系は宿主によるHCVの排除およびそれに対するHCVの抵抗性に重要な鍵を握っていることは間違いないと考えられる。しかし、RIG-I/IPS-1系の状態と実際の抗ウイルス療法の治療効果との関連は不明で、ヒトにおける臨床的意義はほとんど解明されていない。そこで筆者らは、臨床検体を用いてこれら自然免疫系分子の遺伝子発現プロファイルとPEG-IFN/RBV併用療法の治療効果との関連を検討した。

自然免疫系遺伝子の肝内発現プロファイルと抗ウイルス効果

PEG-IFN/RBV併用療法を施行した1b高ウイルス量のC型慢性肝炎74例を対象として、治療直前に肝生検を施行し、総RNAを抽出後リアルタイムPCR法を用いて細胞内ウイルスセンサーであるRIG-I, MDA5や修飾・制御系分子であるLGP2, ISG15, USP18, RNF125およびアダプター分子であるIPS-1のmRNAの肝内発現を定量した(図2)²⁾。また、原発性胆汁性肝硬変などの非ウイルス性肝疾患を対照としてその肝内遺伝子発現プロファイルを比較した。

1. C型慢性肝炎と非ウイルス性肝疾患との比較 (図3)

まず、これら自然免疫系分子の肝内遺伝子発現プロファイルをC慢性肝炎患者と非ウイルス性肝疾患患者で比較した。その結果、C型慢性肝炎患者におけるRIG-I, MDA5, LGP2, ISG15, USP18, RNF125の肝内遺伝子発現は非ウイルス

性肝疾患患者に比し有意に高いことが分かり、これらの分子はHCV感染による内因性IFNにより肝内に発現誘導されていることが示唆され

た。それに対して、IPS-1は両者の間で肝内発現量に有意差はなく、比較的constitutiveに発現していると考えられた。

図2 治療プロトコール(上段)と研究方法(下段)

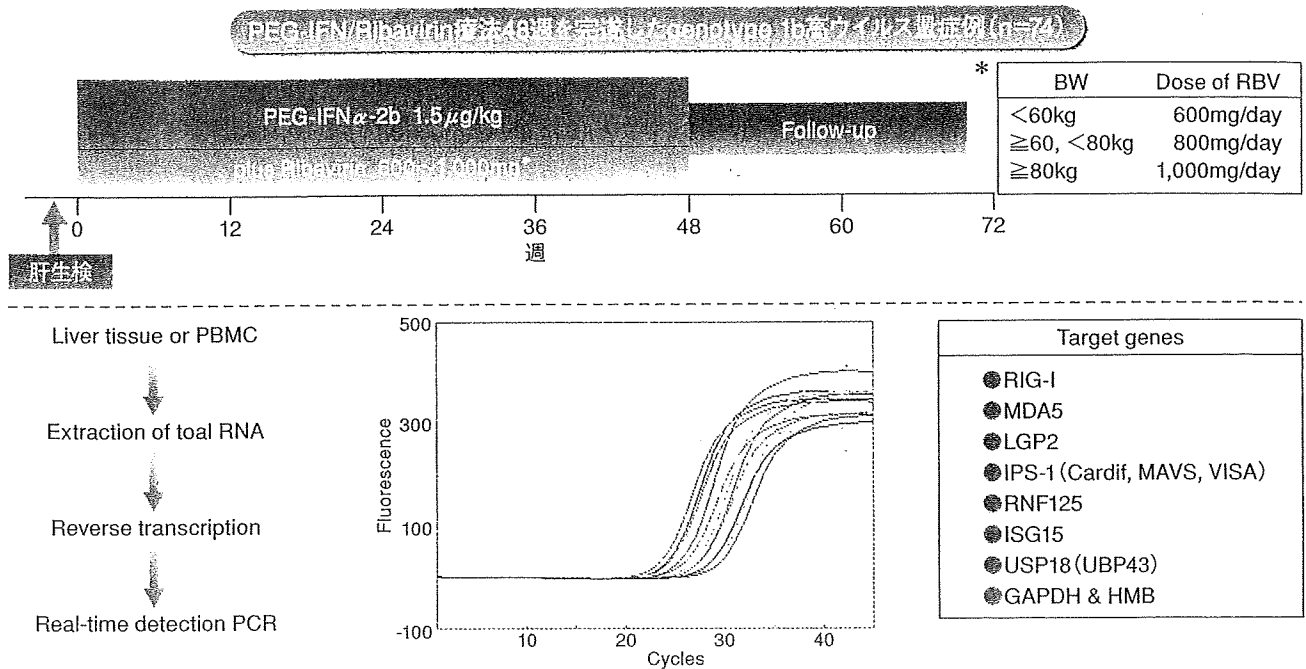
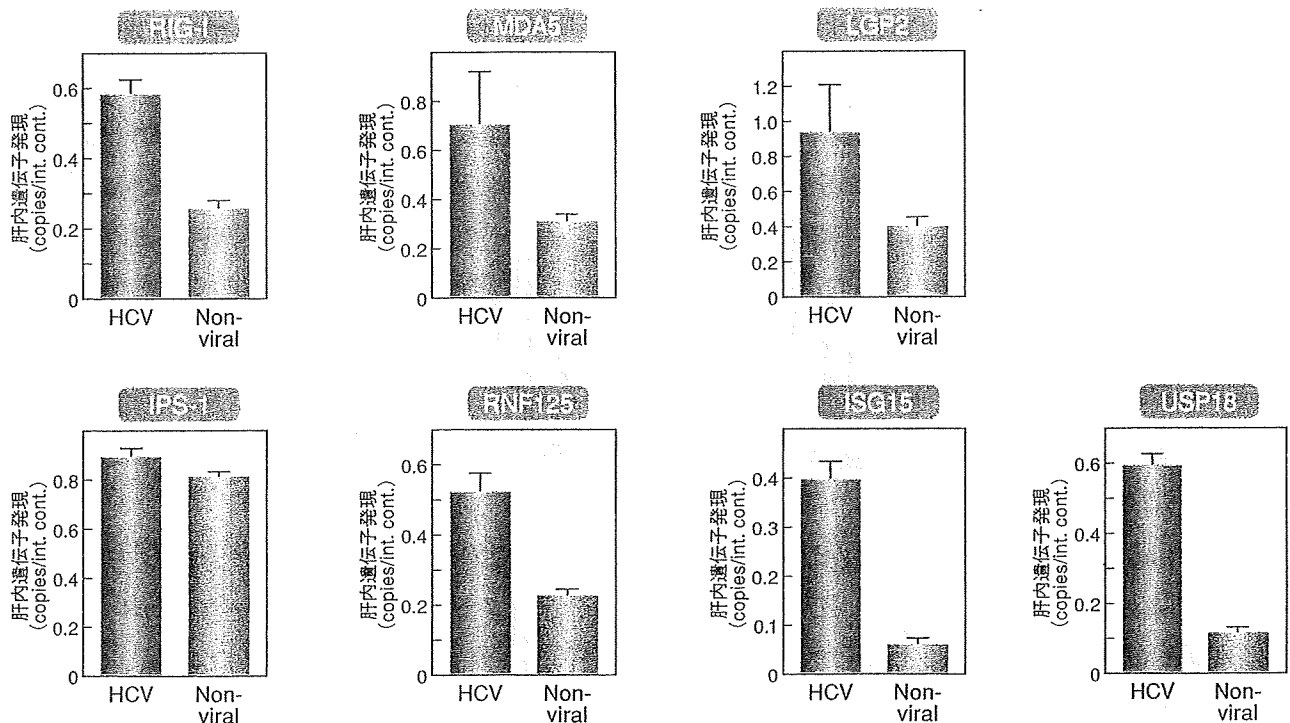


図3 C型慢性肝炎および非ウイルス性肝疾患における自然免疫系分子の肝内遺伝子発現の比較



Asahina Y et al: *Gastroenterology* 134: 1396-1405, 2008. 改変

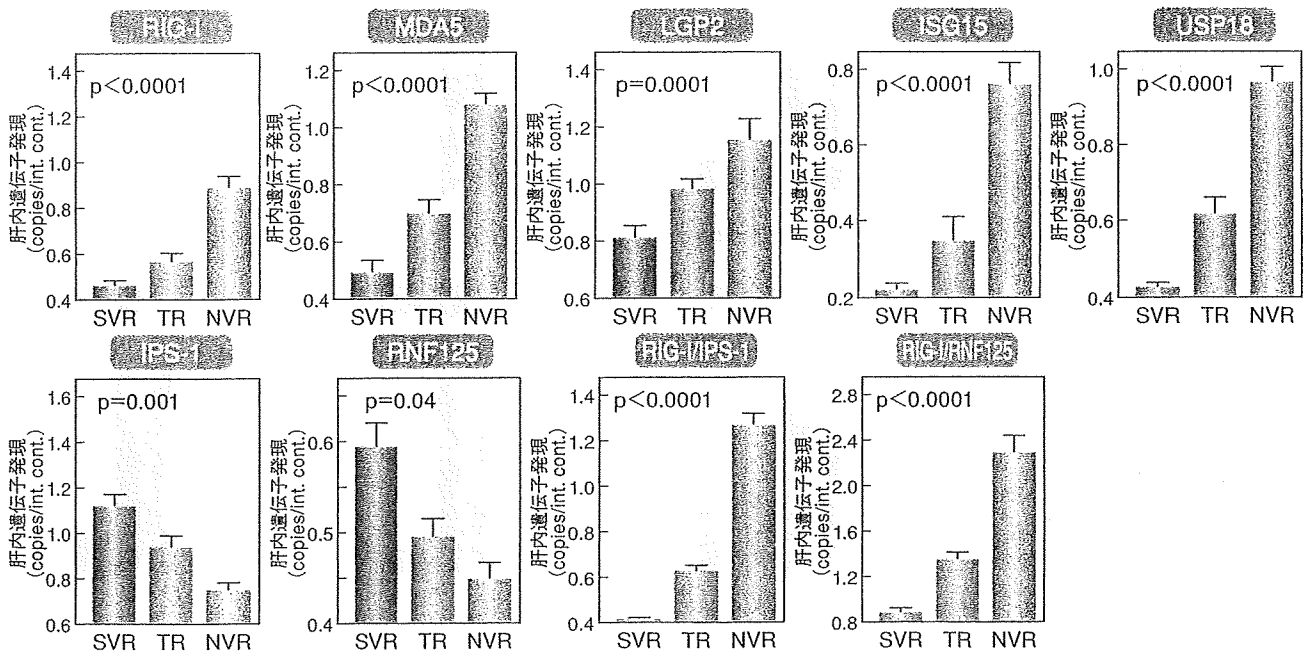
2. 治療前肝内遺伝子発現プロファイルとPEG-IFN/RBV併用療法の治療効果(図4)

次に、PEG-IFN/RBV併用療法を施行した症例を最終的なウイルス学的治療効果により、著効(SVR:n=30)、再燃(TR:n=24)および治療中HCVが全く消失しない無効(NVR:n=20)に分類し、これらの治療効果と治療前における肝内遺伝子発現との関連を解析した。その結果、RIG-I, MDA5, LGP-2, ISG15およびUSP18の肝内遺伝子発現は、治療中HCVが減衰しないNVR群でSVR群に比し有意に1.5~4倍高発現していた。それに対して、IPS-1とRNF125の治療前肝内遺伝子発現はNVR群で有意に低値で、RIG-I/IPS-1比またはRNF125比はNVRで有意に高かった(NVR:SVR=1.3:0.4, 2.3:0.8)。このNVR例におけるIPS-1の発現低下は、ウエスタン・ブロットにより蛋白レベルでも確認された(図5)。しかし、筆者らの検討では、HCVのプロテアーゼにより切断されたと考えられるIPS-1の切断体はウエスタン・ブロットでは検出されなかった。その

原因として、IPS-1の切断体は生体内での安定性が低いため、ウエスタン・ブロットのバンドとして検出されなかった可能性がある。

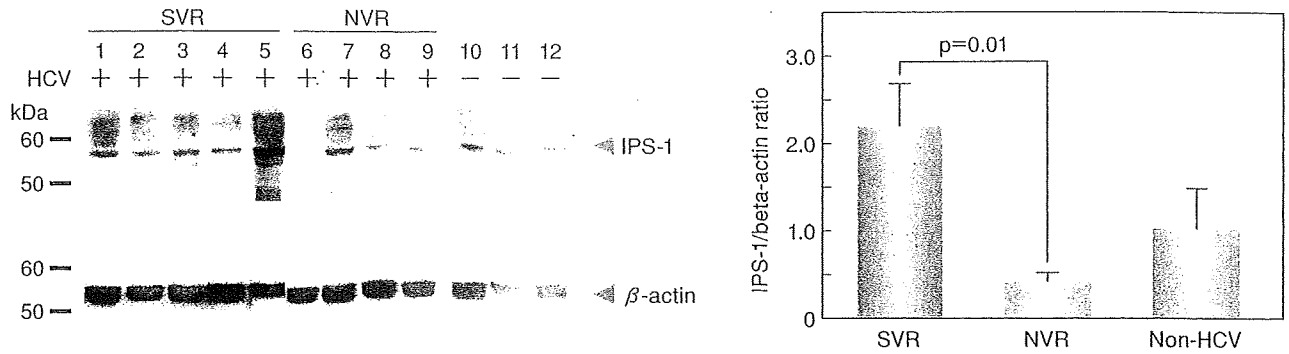
多変量解析でNVRに關与する因子を検討すると、ISG15またはUSP18発現およびRIG-I/IPS-1比と血小板数が独立因子として有意であった。ROC解析ではISG15, USP18発現およびRIG-I/IPS-1比のarea under the curveは0.9以上で、これらの遺伝子の治療前における肝内発現を定量することは、これまで困難とされてきたPEG-IFN/RBV併用療法の最終治療効果を治療前に予測するのに極めて有用と考えられた(図6)。一方、最近PEG-IFN/RBV併用療法のNVRに關与するHCV遺伝子変異としてコア70番および91番変異が報告されているが¹⁵⁾、筆者らの症例ではNVR例ではコア変異の有無に關係なくRIG-I/IPS-1比は高値であり、反対にSVR例では低値であった。多変量解析で検討すると、RIG-I/IPS-1比はこれらHCVコア遺伝子変異とは独立してNVRに關与している可能性が示唆された(表1)。

図4 PEG-IFN/RBV併用療法の最終ウイルス学的治療効果と自然免疫系分子の肝内遺伝子発現



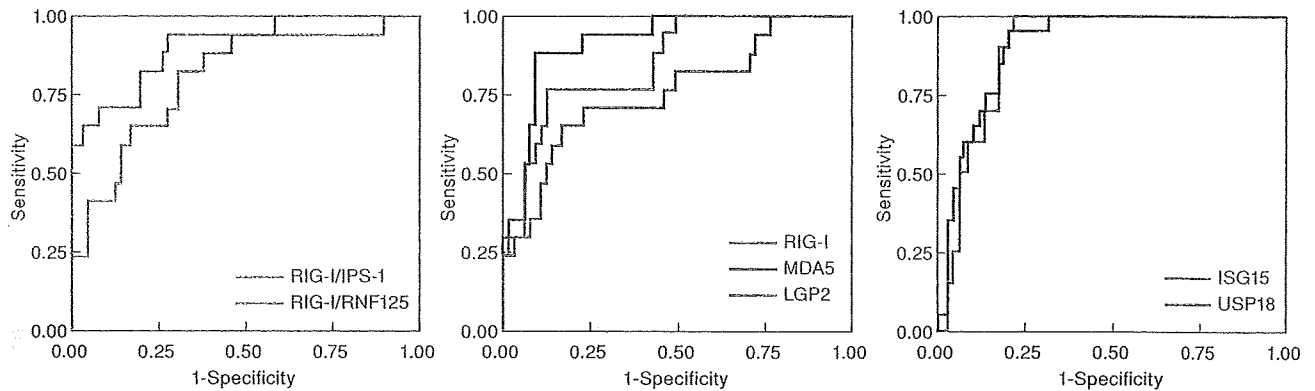
Asahina Y et al: *Gastroenterology* 134: 1396-1405, 2008. 改変

図5 ウェスタン・ブロットによる肝内IPS-1の蛋白発現と最終治療効果



Asahina Y et al : *Gastroenterology* 134 : 1396-1405, 2008. 改変

図6 NVR診断に関わるROC解析



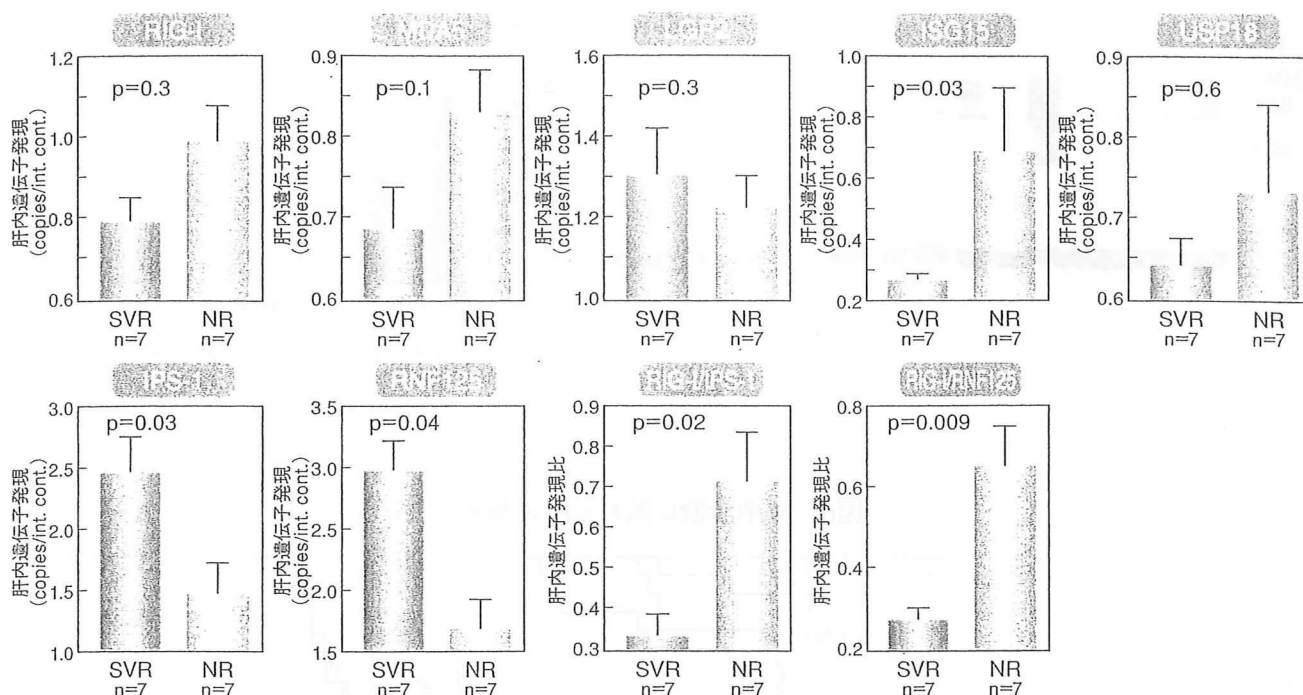
Variables	Az	95% CI	Cut-off	Sensitivity	Specificity	NPV	PPV
RIG-I	0.89	0.78-0.95	0.68	0.80	0.87	0.92	0.70
MDA5	0.92	0.86-0.98	0.84	0.82	0.89	0.93	0.74
LGP2	0.76	0.63-0.90	1.03	0.65	0.72	0.85	0.46
RIG-I/IPS-1	0.91	0.84-0.99	0.88	0.75	0.91	0.91	0.75
RIG-I/RNF125	0.81	0.69-0.93	1.05	0.82	0.62	0.91	0.43
ISG15	0.91	0.85-0.97	0.36	0.90	0.81	0.96	0.64
USP18	0.90	0.84-0.96	0.67	0.90	0.83	0.96	0.67

Asahina Y et al : *Gastroenterology* 134 : 1396-1405, 2008. 改変

表1 NVRに関与する因子(多重ロジスティック解析)

Variables	Odds Ratio	95% CI	p value
RIG-I/ISP-1 ratio (by 0.2↑)	2.6	1.5- 4.5	0.0007
Core 71&91 double mut.	6.7	0.9-45.4	0.05
Platelet count (by 50×10 ³ /μL)	1.8	1.4- 9.6	0.01
Age (by 1 yr.)	1.0	0.9- 1.1	0.55
Gender (Female)	4.1	0.7-25.7	0.12

図7 Genotype 2におけるPEG-IFN/RBV併用療法の最終ウイルス学的治療効果と自然免疫系分子の肝内遺伝子発現



Asahina Y et al: *Gastroenterology* 134: 1396-1405, 2008. 改変

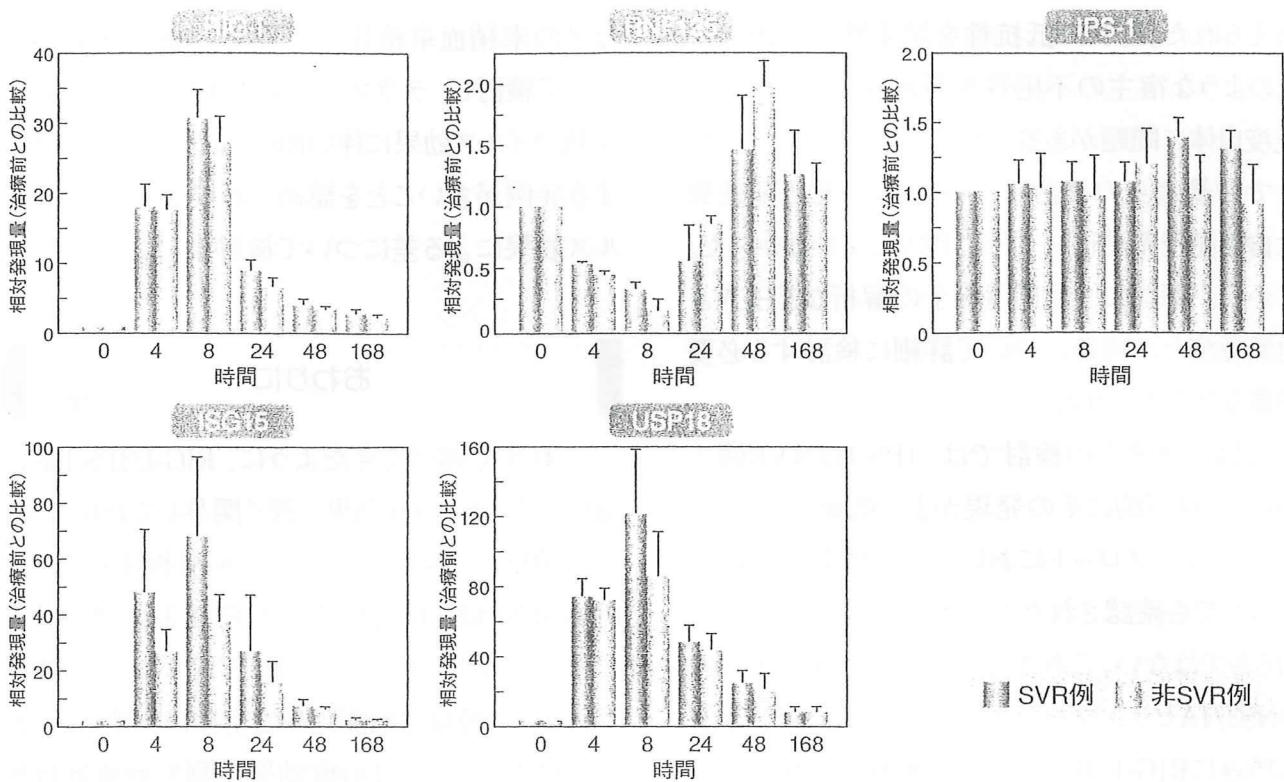
3. Genotype 2における自然免疫系遺伝子発現プロファイルと治療効果

Genotype 2はgenotype 1に比しIFN治療効果が高い。しかし、genotype 2におけるNVR例も極めて少ないが存在し、その機序については不明な点が多い。そこで、筆者らは、genotype 2においてもRIG-I/IPS-1系を中心とする自然免疫系遺伝子の発現状態とPEG-IFN/RBV併用療法の治療効果を検討した。それによると、genotype 2においても、NR例(n=7)ではSVRに比しISG15発現、RIG-I/IPS-1比およびRIG-I/RNF125比は高値であった(図7)。したがって、genotype 1bで認められた自然免疫系遺伝子発現と治療効果との関連は、genotypeにかかわらず認められる現象と考えられた。

自然免疫系遺伝子の経時的発現と治療効果

前述のように、RIG-Iなどの治療前における肝内遺伝子発現は、PEG-IFN/RBV併用療法不応例であるNVRで高発現していることがわかったが、PEG-IFN/RBV投与による反応性はどのようになっているであろうか。そこで、筆者らは、末梢血単核球中における、RIG-I, ISG15, USP18, RNF125およびIPS-1のPEG-IFN/RBV投与前後における経時的遺伝子発現動態を解析した²⁾(図8)。その結果、RIG-I, ISG15, USP18の発現量は、PEG-IFN/RBV投与の8時間後に治療前の30~120倍となり、治療により強く誘導されることがわかった。さらに、この遺伝子誘導は最終的にウイルスが駆除されたSVR例で高い傾向を認め、外因性IFNによる遺伝子の誘導能と治療効果との間に関連があることが示唆された。一方、抑制系遺伝子であるRNF125はRIG-Iの発現動態とは

図8 PEG-IFN/RBV併用療法治療中における自然免疫系遺伝子の発現動態と最終治療効果
[末梢血単核球における検討]



Asahina Y et al: *Gastroenterology* 134: 1396-1405, 2008. 改変

対照的で、PEG-IFN/RBV投与で抑制され投与後8時間で最低値となったが、その後発現が亢進しRIG-Iの発現が最も誘導された投与後48時間後にピークとなり、RIG-Iの発現が抑制されるにしたがって168時間後に治療前値に復した。このように、RNF125は実際の治療状態において、精巧にRIG-I系を制御していると考えられた。これらの分子の発現動態と異なって、IPS-1の発現動態はPEG-IFN/RBV投与により大きく影響は受けないことが観察され、治療中もconstitutiveに発現していることが示唆された。

宿主自然免疫系が治療効果へ関与するメカニズム

宿主自然免疫系が実際のPEG-IFN/RBV併用療法の治療効果にどのように関わるかのメカニズムの詳細については、未だ十分解明されていない。上述したように、筆者らの検討では、RIG-I, ISG15, USP18などのIFN誘導遺伝子はHCV感染による内因性IFNによりC型慢性肝炎患者において高発現しているが、PEG-IFN/RBV併用療法に不応性であるNVR例でより治療前の肝内発現が亢進していることがわかった。反対に、これらの遺伝子のIFN投与による反応性はSVR例でNVR例に比しより良好であることが観察された。このことから、NVR例では治療前に内因性IFNにより自然免疫系がすでにup regulationされているため、治療である外因性IFNに対する

反応性が現弱していることが示唆され、IFNに対する不応性のメカニズムを探る糸口になると考えられた。IFNに抵抗性を示す特定のHCVがこのような宿主の不応性を惹起するのか、宿主免疫自体に問題があるのかは不明であるが、これまでの筆者らの検討ではHCVコア遺伝子変異は自然免疫系遺伝子発現に関与していなかった。しかし、今後HCV全長遺伝子の解析などHCVと自然免疫との関連について詳細に検討する必要があると考えられた。

今回の筆者らの検討では、IPS-1はNVR例でRIG-Iと対照的にその発現がより低値であった。ウエスタン・ブロットにおいてこの低発現は蛋白レベルでも確認されたが、そのメカニズムは十分明らかではない。これまでの報告ではHCVは自身のNS3/4AセリンプロテアーゼによりIPS-1を分解し巧みにRIG-I/IPS-1系から逃避する可能性が示唆されているが¹⁶⁾、HCVが何らかの機序で転写レベルでもIPS-1を抑制している可能性は否定できない。この点については、HCVの治療抵抗性を解明し治療法を開発する上で極めて重要であり、今後のさらなる検討が期待される。

プロテアーゼ阻害薬治療中の 自然免疫系遺伝子発現の経時的変化

現行のPEG-IFN/RBV併用療法に対して不応性であるNVR例に対しては、プロテアーゼ阻害薬などの新薬による治療が期待される。プロテアーゼ阻害薬は、HCVのNS3/4Aセリン・プロテアーゼを阻害することによりHCVの複製を強力に直接抑制することで主に抗ウイルス効果を発揮する。一方、NS3/4Aセリン・プロテアーゼがプロテアーゼ阻害薬により抑制されることにより、RIG-I/IPS-1系を中心とする宿主自然免疫能が改善することもプロテアーゼ阻害薬の効果として想定される。

筆者らは、テラプレビル単独で治療した症例において、治療中のRIG-I, IPS-1, ISG15, RNF125などの末梢血単核球中の経時的遺伝子発現について検討し、テラプレビル単独投与による強力な抗ウイルス効果に伴いRIG-Iなどの発現が低下する症例が多いことを認めており、さらに抗ウイルス効果による差について検討中である。

おわりに

これまで述べてきたように、RIG-I/IPS-1系の遺伝子発現は治療効果に深く関与しており、これらの遺伝子発現プロファイルを解析することはPEG-IFN/RBV併用療法の治療効果予測に有用と考えられた。すなわち、HCV感染により誘導される自然免疫は治療効果と密接に関連し、これらを解析することは治療効果予測や治療抵抗性の機序の解明、さらに自然免疫系を標的とした治療法の開発に有用である。さらに、最近宿主IL28B遺伝子のSNPsがPEG-IFN/RBV併用療法の治療効果に極めて強く関与することが報告された^{17) 18)}。自然免疫系の中心的役割を果たすI型IFNとIL28B遺伝子のコードするIFN- λ との関連などIFN抵抗性の機序に関わる今後の研究が期待される。

〈文献〉

- 1) Zeuzem S, Pawlotsky JM, Lukasiewicz E et al: DITTO-HCV Study Group. International, multi-center, randomized, controlled study comparing dynamically individualized versus standard treatment in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 43 : 250-257, 2005.
- 2) Asahina Y, Izumi N, Hirayama I et al: Potential relevance of cytoplasmic sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology* 134 : 1396-1405, 2008.
- 3) Biron CA: Initial and innate responses to viral infections-pattern setting in immunity or disease. *Curr Opin Microbiol* 2 : 374-381, 1999.
- 4) 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* 5 : 730-737, 2004.
- 5) Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K et al: Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 175 : 2851-2858, 2005.
- 6) Meylan E, Curran J, Hofmann K et al: Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437 : 1167-1172, 2005.
- 7) Kawai T, Takahashi K, Sato S et al: IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6 : 981-988, 2005.
- 8) Seth RB, Sun L, Ea CK et al: Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122 : 669-682, 2005.
- 9) Xu LG, Wang YY, Han KJ et al: VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 19 : 727-740, 2005.
- 10) Zhao C, Denison C, Huibregtse JM et al: Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 10200-10205, 2005.
- 11) Schwer H, Liu LQ, Zhou L et al: Cloning and characterization of a novel human ubiquitin-specific protease, a homologue of murine UBP43 (Usp18). *Genomics* 65 : 44-52, 2000.
- 12) Malakhov MP, Malakhova OA, Kim KI et al: UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *J Biol Chem* 277 : 9976-9981, 2002.
- 13) Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T et al: Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 : 7500-7505, 2007.
- 14) Li XD, Sun L, Seth RB et al: Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 17717-17722, 2005.
- 15) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y et al: Prediction of response to pegylated interferon and ribavirin in hepatitis C by polymorphisms in the viral core protein and very early dynamics of viremia. *Intervirology* 50 : 361-368, 2007.
- 16) Loo YM, Owen DM, Li K et al: Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 6001-6006, 2006.
- 17) Dongliang G, Fellay J, Thompson AJ et al: Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009.
- 18) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M et al: Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009.

* * *

8

C型肝炎ウイルス変異と治療反応性

坂本 穰, 榎本信幸

C型慢性肝炎は、C型肝炎ウイルス(HCV)の持続感染と宿主の不完全な免疫応答の結果、壊死炎症反応が持続することで生じ、多くの場合、肝硬変・肝癌へと進展する。したがって、治療の第一の目標はHCVの排除であるが、現在、これを可能とするのはインターフェロンを用いる抗ウイルス療法のみである。従来のインターフェロン単独療法ではウイルス排除(sustained virological response: SVR)率は30%程度にすぎなかったが、現在の標準療法であるペグインターフェロン+リバビリン併用療法を行えば、約70%の症例でウイルス排除が可能となった。しかし、難治とされる genotype 1b かつ高ウイルス量の慢性肝炎に対する治療成績は、併用療法を48週間行っても、約半数でウイルス排除が可能であるにすぎない。この、インターフェロン治療反応性の違いについては、さまざまな検討がなされてきたが、ウイルス側の要因として、C型肝炎ウイルスの遺伝子型(genotype)をはじめとする、さまざまな遺伝子変異の存在が明らかになってきた。したがって、治療開始前にHCVの遺伝子解析を行うことで、より詳細な治療効果予測が可能となり、治療適応の決定や治療法・治療期間の決定に重要な情報を得ることができるようになった。また、これらに、年齢・性別・肝線維化などの個々の宿主因子を加えれば、さらに詳細な治療効果予測が可能となり、個別化医療にも応用できると考えられる。

I HCV 遺伝子型

HCVは、RNAウイルスであるため遺伝子の修復機構を持たず、約20%の塩基配列が異なる遺伝子型が存在する。世界では少なくとも1~6

の遺伝子型(genotype)が存在することが明らかになっているが、わが国では、ほとんどが、1b, 2a, 2b型であり、1bが70%、2aが20%、2bが10%を占める。遺伝子型測定は、現在健康保険の適応ではないため、日常臨床の現場ではセログループ(serogroup)が用いられ、グループ1は1b、グループ2は2a, 2b型に相当する。

遺伝子型ごとのインターフェロン治療効果は大きく異なるが、感受性が最も高いのは2a型で、2b, 1bの順で感受性が劣る。従来のインターフェロン単独療法の治療成績は2aが70%、2bが50%、1bが20%程度であった。しかし現在のペグインターフェロン+リバビリン併用療法では、2a型ないしは2b型では非常に高いウイルス排除率が期待できるため、遺伝子型が判定できなくとも、セログループ2であれば治療効果は高いと考えられる。一方、インターフェロンの治療効果は、ウイルス量によっても規定され、ウイルス量が少ないと治療効果が高く、多いとウイルス排除率は低い。現在わが国では、初回治療の場合、高ウイルス量症例のみペグインターフェロン+リバビリン併用療法が認められており、標準治療期間も1b型の場合は48週であるが、2a型ないしは2b型(セログループ2)は24週間である。当科および関連施設で組織する共同研究 Yamanashi-PEG-interferon α 2b-Ribavirin Study (Y-PERS)で集積された症例の検討では、高ウイルス量症例に対するペグインターフェロン+リバビリン併用療法のSVR率は、1b型に対する48週治療、2a型および2b型の24週治療で、それぞれ45%(63/140), 77%(17/22), 68%(13/19)であった(図1)。

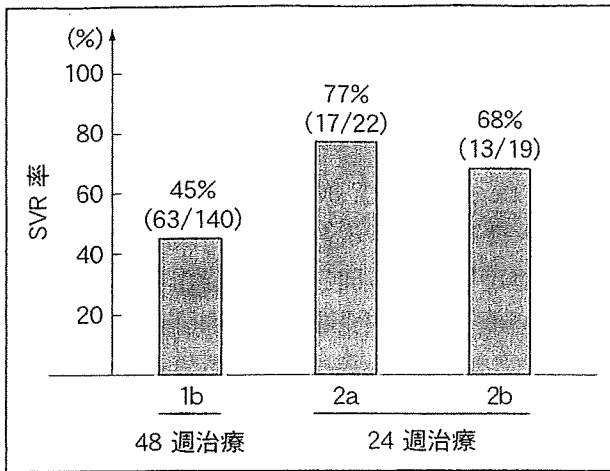


図1 高ウイルス量症例に対するペグインターフェロン+リバビリン併用療法のSVR率

II ISDR(インターフェロン感受性決定領域)

1b型のHCVでは、インターフェロン単独療法において、NS5A領域のC末端よりの40アミノ酸が治療効果と密接に関連することをEnomotoらが明らかにし、この領域はISDRと命名されている¹⁾。インターフェロン単独療法では、この領域に変異のない野生型(wild type)ではSVRとなる可能性が低く、4個以上の変異がある変異型(mutant type)では極めて高い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率を示すことが明らかになっている。同様に、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法において検討すると、治療効果予測因子として、宿主因子を含めて多変量解析を行うと、ISDR変異2個以上が最も重要な因子であることが明らかになった²⁾(表1)。この結果は、ISDR変異は治療効果に関与する重要な因

子であることを示すほか、インターフェロン単独療法では4個以上の変異がSVRを得るために必要であったが、治療効果の高いペグインターフェロン+リバビリン併用療法では、2個以上の変異があればSVRが期待できるということを意味する。

また、ISDRはウイルス量とも関連し、ISDRに変異がみられる場合にはウイルス量が低くなる傾向がある。しかし、実際にはISDRに変異が少なくてもウイルス量の低い症例も存在し、この症例は治療抵抗性を示す。一方、ウイルス量が多くてもISDRに変異が多ければ治療感受性であり、高い治癒率が得られる。また、わが国で難治とされる高齢・女性ではISDRに変異のみられる症例が少ないことから、この群で治療効果が劣る理由のひとつと考えられる。さらに、ISDR解析は2a/2b型においてもISDRはインターフェロン感受性と関連しており、変異数が多いほど治療効果は高いことが明らかになっている。また、2a型の多くの症例はISDR変異が多く、2b型の多くはISDR変異が少ないことから、2a型が2b型に比して治癒しやすい理由である可能性がある。

III コア遺伝子領域

しかし、ISDR変異数が同じであっても治療反応性が異なる症例が存在することは事実であり、とくに、ISDR変異数0ないしは1の症例でも、約30%はSVRとなるが、約25%の症例では、ほとんどウイルス量が減少しない高度抵抗性を示す。そこでわれわれは、ISDR変異数0ないしは1の症例で、他のウイルス学的条件と臨床的条件がそろった症例で、4週投与でウイルス量の減少

表1 ペグインターフェロン/リバビリン併用療法(1b)のSVRに寄与する因子(多変量解析)(n=140)

	オッズ比(95%CI)	p値
年齢(<60歳/≥60歳)	0.453(0.191~1.073)	0.0719
肝線維化(F1/F2~4)	0.356(0.152~0.833)	0.0173
HCVコア蛋白量	0.454(0.196~1.055)	
ISDR(変異数<2/≥2)	5.125(1.590~16.520)	0.0062

多変量ロジスティック回帰分析

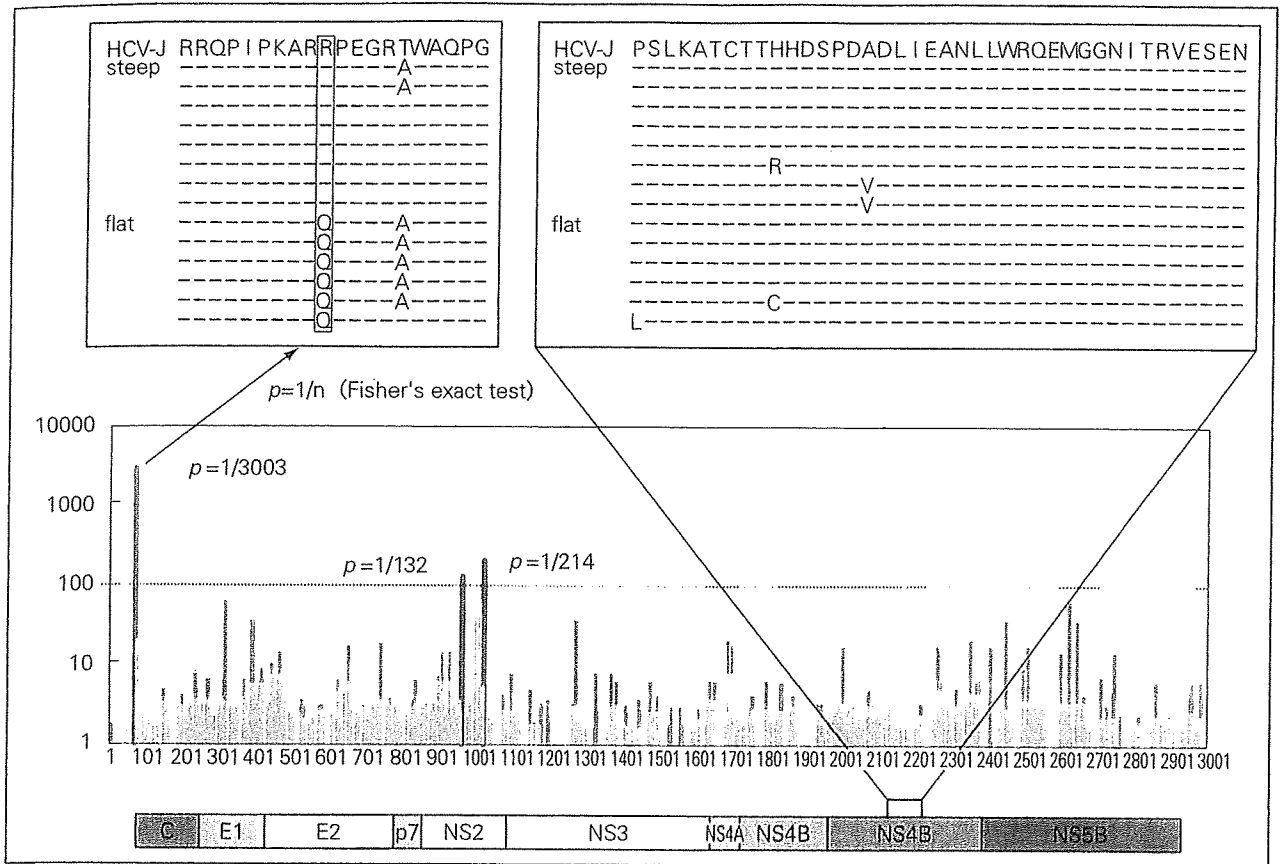


図2 ISDR0~1症例のHCV全長解析：各アミノ酸部位での反応の差
steep viral responder ($n=8$) vs. flat viral responder ($n=6$)

が1 log未達の平坦反応群と、4週投与でウイルス量が2 log以上減少する急峻反応群について、HCVの全遺伝子配列を決定し、HCV蛋白のすべてのアミノ酸部位についてその残基の相違を解析した。その結果、両者に相違がみられたのは、コア領域とNS2領域のアミノ酸であり、統計学的に有意な差がみられたのはコア領域の70番目のアミノ酸のみであった(図2)。すなわち急峻反応群では、この領域はすべての症例でアルギニン(R)であるのに対して、平坦反応群ではすべてグルタミン(Q)であった。さらにこの領域に注目してretrospectiveに、インターフェロン治療効果とこのアミノ酸変異との関連を検討すると、ISDRが0ないしは1の難治が予測される症例であっても、このアミノ酸がRであれば高率にSVRが期待できるものの、Qに変異しているとインターフェロン治療反応性が極めて悪いため治療中断例や、治療完遂してもSVRにならない症例が多数を占めていた。すなわち、ISDR変異

数0.1かつコア70番がQでは18例全例で治療効果が不良のため治療中止されており、最終的に1例もSVRが得られなかった。一方、ISDR0.1でコア70番がRであれば63%がSVRとなっていた。とくに、治療4週までにウイルス消失したrapid viral response(RVR)の症例では14例全例、12週までにウイルス消失したearly viral response(EVR)の症例16例中13例(81%)でSVRとなっていた(図3)。一方、コア70番がQの難治例であっても、治療早期にウイルスが消失した症例では、治療期間を72週に延長することでSVRが得られており、ウイルス学的に難治例であっても、治療法の工夫をすればウイルス排除が可能であった。また、ISDR変異が2個以上あるインターフェロン感受性HCVでは、コア70番がRの場合とQの場合があるが、これにかわりなく高い頻度で著効となる。しかし、まれにISDR変異型でもペグインターフェロン+リビリン併用療法で著効とならない症例があるがこの

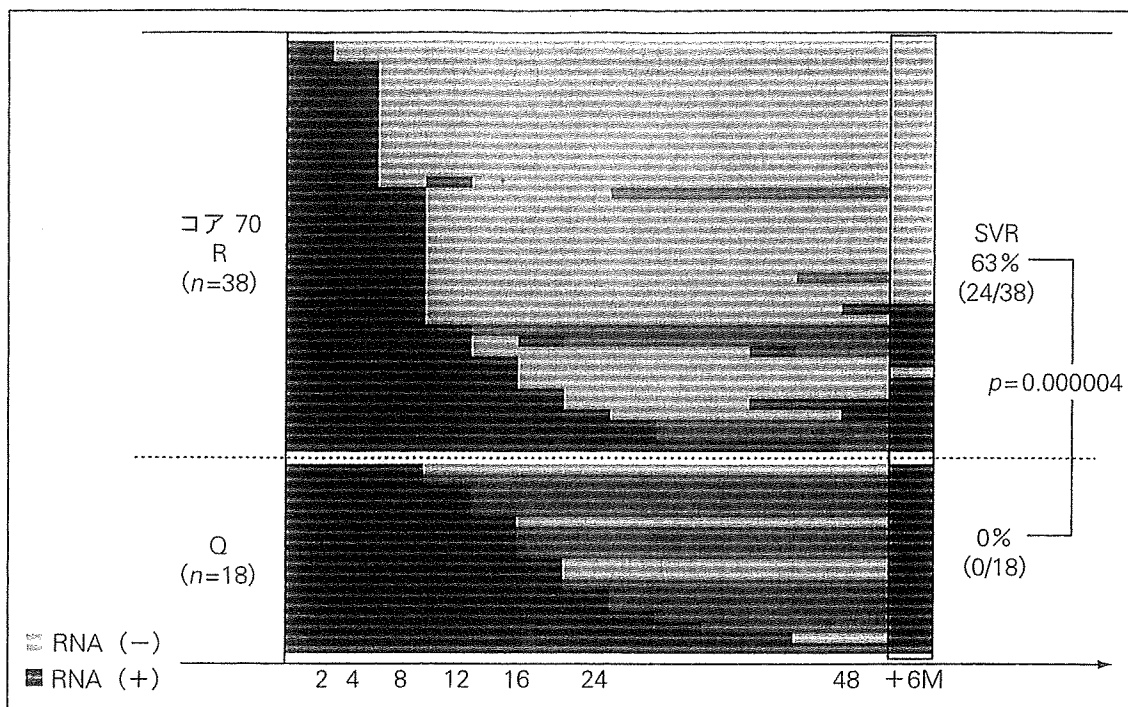


図3 コア蛋白変異とウイルス消失時期, SVR(1b-ISDR 0・1)

場合コア70番はQである。コア領域のアミノ酸置換がインターフェロン+リバビリン療法の治療効果と関連するとの報告はDonlinよりなされており³⁾, また, Akutaらも, 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, とくに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⁴⁾。コア蛋白70番のアミノ酸変異がペグインターフェロン+リバビリン併用療法の効果に影響を与える機序は今のところまったくわかっていない。しかし, コア蛋白の機能解析により, SOCS活性化によるSTATおよびIRS分解からインターフェロン抵抗性およびインスリン抵抗性を惹起するという仮説が提唱されている。コア70番変異によりこれらのコア蛋白機能が変化すれば, この仮説が裏づけられることとなり今後の研究の焦点となっている。

IV HCV 遺伝子解析と個別化医療の可能性

C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効

果は, 遺伝子型, ISDR, コア70番変異の3つの遺伝子因子によって規定されることが明らかになり, これらの遺伝子解析により治療効果を事前に予測することはもはや不可能ではなくなった。今後, ウイルスの感受性を分析したうえで, 宿主因子も加えて個々に治療方針を決定する, 個別化医療の実現する日も近いと考えられる。

文献

- 1) 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: 77-81, 1996
- 2) 坂本 穰, 榎本信幸: ウイルス性慢性肝炎—診断と治療の進歩. *日内会誌* 97: 57-63, 2008
- 3) Donlin M et al: Pretreatment sequence diversity differences in the full-length hepatitis C virus open reading frame correlate with early response to therapy. *J Virol* 81: 8211-8224, 2007
- 4) Akuta N et al: Predictors of viral kinetics to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol* 79: 1686-1695, 2007

最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC 62 (別刷)

アルコール性肝障害

第4章 アルコール性肝障害の診断と治療

ウイルス性肝炎へのアルコールの影響

井上泰輔 坂本 穰 榎本信幸

最新医学社

第4章

アルコール性肝障害の診断と治療

ウイルス性肝炎へのアルコールの影響

要旨

飲酒の影響によりウイルス性肝炎の進行は速められ、予後は短縮する。しかし、禁酒が徹底できれば、C型慢性肝炎に対する Peg-IFN α 2b-リバビリン併用療法で非飲酒者と比較し遜色ない治療効果が期待できる。そのため、ウイルス性肝炎患者での常習飲酒者へは適切な禁酒指導が必要で、禁酒可能な症例では積極的なインターフェロン (IFN) 治療が勧められる。

はじめに

我が国の慢性肝疾患患者はウイルス性、特にC型肝炎ウイルス感染によるものが最多を占めるが、これらウイルス性肝炎患者群においても常習飲酒者が存在する。そして、両者の合併により慢性肝疾患の進行は速められ、また抗ウイルス治療に対してのウイルス学的効果や治療への受け入れ、継続に対しての問題などが予想される。本稿ではウイルス性肝炎への飲酒によるアルコールの影響を、C型肝炎ウイルス (HCV) 感染例を中心に山梨大学医学部附属病院消化器内科における経験を含めて述べる。

ウイルス性肝炎合併アルコール性肝障害患者の疫学

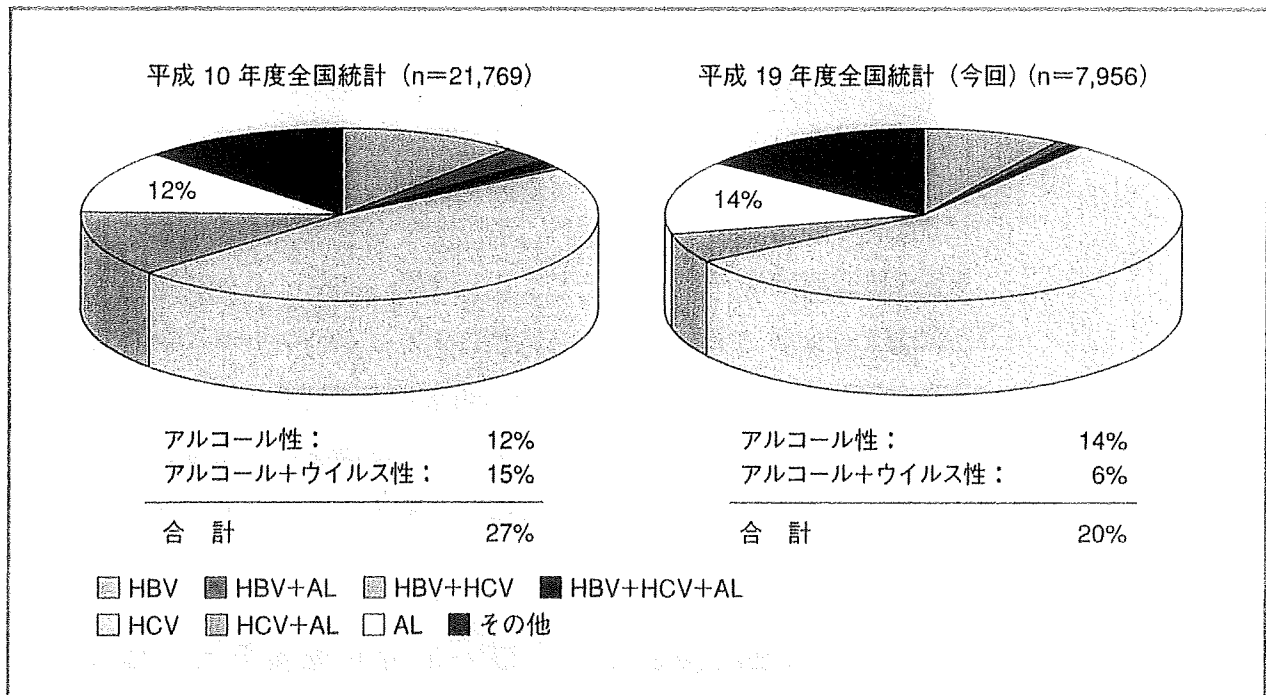
平成 19 年度に報告された、全国の日本消化器病学会認定施設、関連施設を対象としたアルコール性肝障害患者のアンケート調査において、アルコール性肝障害患者の肝硬変患者に占める割合は 20.1% であり、このうちアルコール単独によるものは 13.9%、B型肝炎ウイルス (HBV) との合併例は 0.9%、HCV との合併は 5.2%、HBV と HCV を加えたウイルス性肝炎合併例は 6.2% であった (表1)¹⁾。これをウイルス性肝炎側からみると、HBV 患者に占めるアルコール例

● キーワード

ウイルス性肝炎
アルコール
C型慢性肝炎
B型慢性肝炎
インターフェロン療法

表1 我が国における肝硬変の成因 (文献¹⁾より引用)

	総数 (%)	男 (%)	女 (%)
B型肝炎	756 (9.5%)	586 (11.5%)	170 (5.9%)
うちアルコール性	72 (0.9%)	69 (1.4%)	3 (0.1%)
C型肝炎	4,835 (61.4%)	2,941 (57.8%)	1,894 (65.9%)
うちアルコール性	414 (5.2%)	364 (7.2%)	50 (1.7%)
B+C型肝炎	82 (1.0%)	55 (1.1%)	27 (0.9%)
うちアルコール性	11 (0.1%)	11 (0.2%)	0 (0%)
アルコール性	1,106 (13.9%)	984 (19.3%)	122 (4.2%)
その他	1,177 (14.7%)	518 (10.2%)	659 (22.9%)
合計	7,956	5,084	2,872
うちアルコール性	1,603 (20.1%)	1,428 (28.1%)	175 (6.1%)

図1 肝硬変の成因 (全国調査) (文献¹⁾より引用)

は 9.5%, HCV では 8.6%, 両者を加えるとウイルス性肝硬変患者の 8.8% にアルコール性肝障害を合併していた。この結果を平成 10 年度における同様の検討と比較すると、アルコール単独例は 12.1% から 14% へと増加しており、ウイルス性肝炎合併例は 15% から 6.2% へと減少していた (図 1)。この変化の要因としては、インターフェロン (IFN) 治療を中心としたウイルス性肝炎への治療法の進歩に

よりウイルス性肝炎由来の肝硬変例の割合が減少したことや、肝炎ウイルス感染者での医療機関従事者からの節酒、禁酒指導の効果により合併例における常習飲酒者が減少したためと推察される。しかし、アルコール性肝障害の疫学には国内においても、地域や病院規模、大学病院と市中病院での違いなどが大きく関与しており、依然として合併例の多い施設も存在し、今後とも医療機関受診や禁酒指導の徹底は重要と思われる。

アルコールによるウイルス性肝炎の進行

ウイルス性肝炎での免疫応答による肝細胞障害とアルコールによる肝障害は、それぞれ慢性肝疾患を進行させる要因であるが、両者の合併により進行速度が速められ、結果としてより若年で肝硬変、肝癌へ進行すると考えられている。Otani ら²⁾は HCV コアタンパクとアルコール代謝酵素であるシトクロム P450 2E1 の共存により、ミトコンドリアにおいて活性酸素が産生され、肝細胞障害が亢進するとしている。また、飲酒によりウイルス性肝炎の線維化の進行や肝硬変完成までの期間、さらには生命予後が早められるという報告が数多くなされている。Poynard ら³⁾は 1,157 例の C 型慢性肝炎症例を 1 日飲酒量で 50 g 以上、50 g 未満、0 g と 3 群に分けて年率の肝組織線維化進行速度を検討したところ、F0 線維化なしから F4 肝硬変までの進行はそれぞれ 1 年で 0.167 単位、0.143 単位、0.125 単位と飲酒量に応じて速まり、この速度から推定される肝硬変完成までの期間はそれぞれ平均 24 年、28 年、32 年と飲酒量が増えるに従って短期間であると報告している。Marcellin らの報告⁴⁾では 331 例の HCV 関連死亡例中、週 350g 以上の飲酒例は 35% 存在し、飲酒例と非飲酒例での平均死亡時年齢は 58 歳と 70 歳であり飲酒例で有意に若年であった。同論文での 86 例の HBV 関連死亡例でも同様に 52 歳と 64 歳で、飲酒例において有意に若年であった。

アルコールによるウイルス性肝疾患の進行への影響を検討するため、当科での肝硬変患者における入院時年齢を飲酒歴に応じて分類し比較した。1997～2007 年の間に当科に入院した肝硬変患者 583 例を成因別に分類すると、C 型 368 例 (63.2%) 平均 66.8 ± 9.7 歳、B 型 68 例 (11.7%) 平均 54.3 ± 11.6 歳、アルコール性 48 例 (8.2%) 平