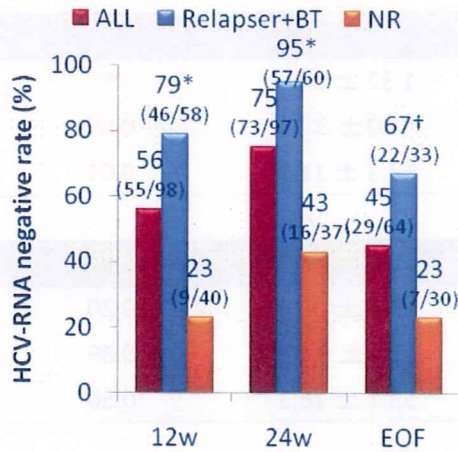
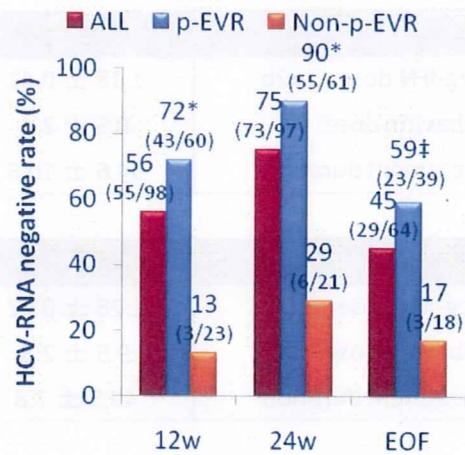


## Peg-IFN/RBV再治療効果 (1型、前治療反応性別、治療期間を考慮せず)

**Relapser+BT / NR**



**p-EVR / Non-p-EVR**



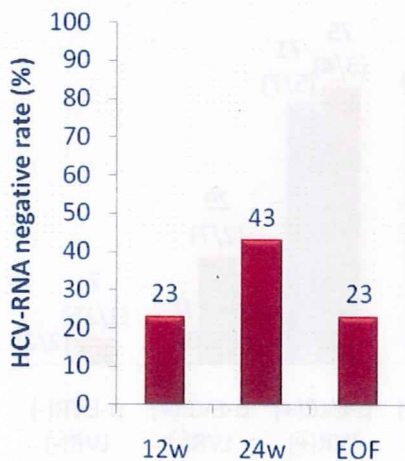
(\* , p<0.0001, † , p<0.001; Chi-square test)

(\* , p<0.0001, ‡ , p<0.01; Chi-square test)

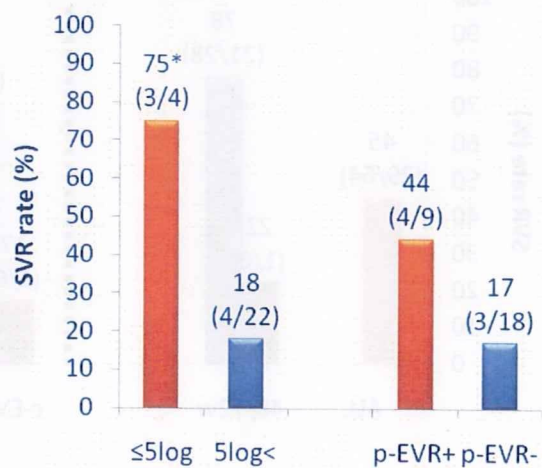
パネル7

## Peg-IFN/RBV再治療効果 —1型、初回NR例(治療期間を考慮せず)—

**経時的陰性化率**



**背景因子別SVR**



(\* , p<0.05; Chi-square test)

パネル8

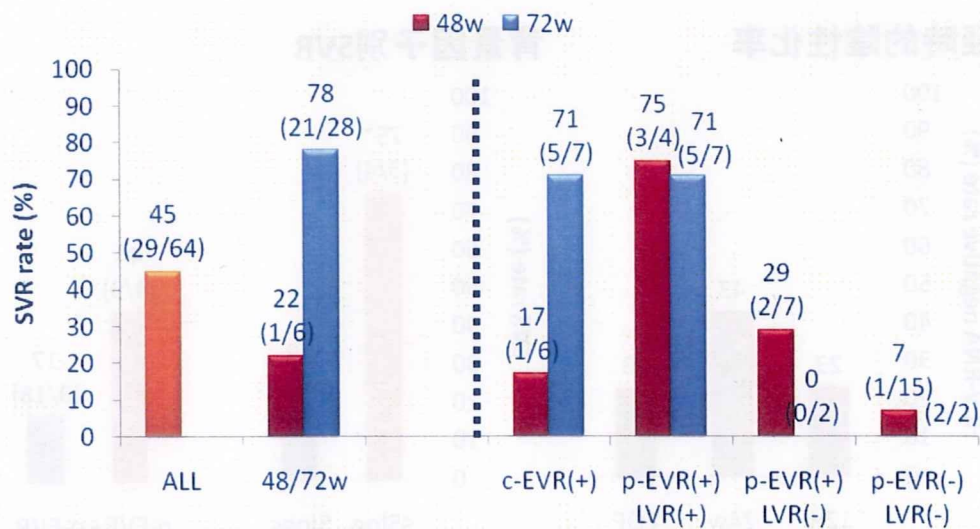
## PEG-IFN/RBV治療非著効例に対する 再治療効果向上への工夫 —1型、初回Relapser+BT例—

SVR例	初回治療	再治療	P-value
Peg-IFN dose $\alpha 2b$	1.18 $\pm$ 0.41	1.32 $\pm$ 0.35	0.05
Ribavirin dose	8.5 $\pm$ 2.4	9.2 $\pm$ 3.2	0.05
Treatment duration	54.6 $\pm$ 10.8	63.3 $\pm$ 11.1	0.01

Non-SVR例	初回治療	再治療	P-value
Peg-IFN dose $\alpha 2b$	1.28 $\pm$ 0.22	1.39 $\pm$ 0.24	0.20
Ribavirin dose	9.5 $\pm$ 2.8	9.4 $\pm$ 3.0	0.89
Treatment duration	49.5 $\pm$ 7.8	53.1 $\pm$ 18.3	0.50

パネル9

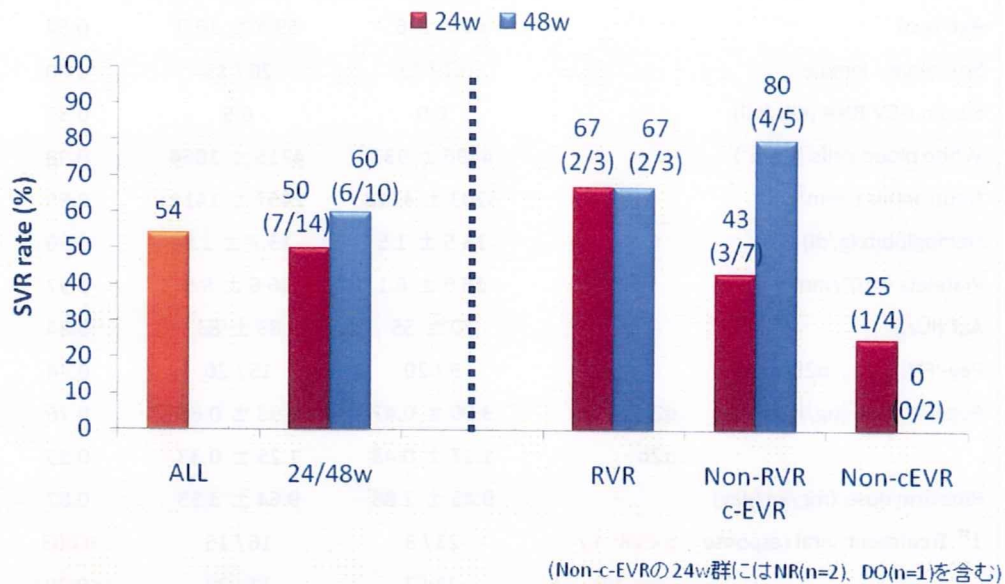
## Peg-IFN/RBV再治療効果 (1型、前治療反応性別、再治療期間別)



(p-EVR(+), LVR(-)の48w群にはNR(n=4)を含む)  
(p-EVR(-), LVR(-)の48w群にはNR(n=14)を含む)

パネル10

## Peg-IFN/RBV再治療効果 (2型、前治療反応性別、再治療期間別)



パネル 1 1

## 初回治療副作用中止例

初回治療副作用中止：28例

中止理由	症例数
発疹	4例
倦怠感	3例
好中球減少	3例
血小板減少	2例
うつ症状	2例
AST/ALT上昇	2例
肺炎	2例
Hb減少、精神症状、関節痛、食欲不振、嘔吐、咳嗽、腹水、注射部反応、肛門周囲膿瘍、RA症状悪化	1例

再治療

HCV serotype: 1型:21例、2型:7例

完遂症例: 25例(89%)

(初回PLT減少:2例→摘脾術施行を含む)

治療効果: SVR:11例 (8/3)  
Relapse:3例 (2/1)  
NR:6例 (6/-)

著効率: 1型:50% (8/16)  
2型:75% (3/4)

中止症例: 3例

中止理由: α2a:RA(初回:発疹)  
α2b:発疹(初回:発疹)  
倦怠感(初回:鬱)

パネル 1 2

## 再治療におけるSVRに關与する因子(単変量解析)

Factor	SVR	Non-SVR	p value
Number	29	35	
Age (y.o)	60.2 ± 6.7	59.4 ± 10.9	0.54
Sex: male / female	17 / 12	20 / 15	1.00
Serum HCV RNA (KIU/ml)	6.0	6.5	0.39
White blood cells (/mm <sup>3</sup> )	4496 ± 937	4715 ± 1864	0.98
Neutrophils (/mm <sup>3</sup> )	3203 ± 4718	2467 ± 1412	0.85
Hemoglobin (g/dl)	13.5 ± 1.5	13.7 ± 1.8	0.56
Platelets (×10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	16.9 ± 6.1	16.6 ± 5.9	0.97
ALT (IU/l)	70 ± 55	83 ± 83	0.84
Peg-IFN: α2a / α2b	9 / 20	15 / 20	0.44
Peg-IFN dose (μg/kg/week) : α2a	3.00 ± 0.47	2.93 ± 0.65	0.76
: α2b	1.27 ± 0.43	1.25 ± 0.33	0.85
Ribavirin dose (mg/kg/day)	9.45 ± 2.88	9.64 ± 3.53	0.87
1 <sup>st</sup> . Treatment viral response : p-EVR; +/-	23 / 3	16 / 15	0.003
: 24w_VR; +/-	22 / 7	11 / 24	<0.001

パネル 1 3

## まとめ

### PEG-IFN/RBV治療非著効例に対する再治療効果

- Serotype1型
  - 初回治療p-EVR達成例では再治療効果が得られやすく、再治療の良い適応であると考えられる。
  - 初回治療再燃例での再治療において、初回治療に比し薬剤投与量が増加し、投与期間が延長した症例では著効が得られやすい。
  - 初回治療無効例での再治療において、再治療開始時ウイルス量が低く、初回治療p-EVR達成例では著効が得られやすい。
- Serotype2型
  - 初回治療c-EVR達成例では再治療効果が得られやすく、再治療期間の延長により、著効が得られやすい傾向にあった。

パネル 1 4

### Ⅲ. 分担研究報告

厚生労働省科学研究費  
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）  
分担研究報告書

血小板減少の肝線維化進展に与える影響の解析

研究代表者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・准教授

研究要旨：C型肝炎に対する Peg-IFN/RBV 治療において血小板数の低下は非奏効に強く関与する因子である。血小板低下は肝線維化の進展とともに Peg-IFN 投与の減量とも関連しており、このことが非奏効に関連する一因になっている。また、血小板数の低下は出血傾向を助長し、C型肝炎からの肝がんの発生に際して、RFA などの内科的治療を行う際の障害になっている。このように血小板数の低下は肝疾患診療上の重要な問題であるが、血小板減少そのものが肝疾患の病態形成にどのような影響を与えるかは十分に理解されていない。そこで、我々は血小板の寿命を制御する分子である Bcl-xL を血小板特異的にノックアウトし、血小板が肝線維化の進展にどのような影響を与えるかを検討した。マウスの胆汁鬱耐性肝障害モデルにおいて、血小板減少は肝障害や肝再生には影響を与えなかったが、肝線維化を有意に増強した。そのメカニズムとして、血小板と肝星細胞の *in vitro* 共培養実験により、血小板が肝星細胞による I 型コラーゲン産生を HGF/Met pathway 依存的に抑制することを明らかにした。血小板減少は門脈圧亢進症に伴う脾臓での破壊により惹起される病態であるが、逆に血小板減少が肝線維化を増悪させることが示された。肝臓の線維化と血小板減少の間には複雑な相互関係があることが明らかとなった。

共同研究者

小玉 尚宏 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

慢性肝炎/肝硬変は肝線維化を病態の中心とする疾患であり、進展すると肝不全や肝細胞がんなどの致死的な疾患を引き起こす。そこで、その進行を阻止することは重要な課題であるが、その為には肝線維化の病態

を解明することが必要である。肝線維化は、肝臓での慢性的な炎症や肝細胞死などによって惹起される肝星細胞・線維芽細胞の活性化と、それに引き続くコラーゲンなどの細胞外マトリックス産生の亢進がその病態の中心と考えられているが、いまだ不明な点も多い。一方、慢性肝炎/肝硬変では、病態の進行に伴い血小板が減少し、肝線維化と血小板数は非常に密接な負の相関関係に

あることが知られている。この血小板減少は、門脈圧亢進に伴う二次性脾機能亢進症により脾臓における血小板破壊が亢進することや、肝臓での TPO (Thrombopoietin) 産生低下に起因しており、つまり肝線維化が進行した結果であると考えられている。しかし逆に、血小板減少が肝線維化に影響を与えるかどうかについての詳細な検討は行われていない。近年、血小板はその生理学的な凝固・止血機能のみならず、組織修復、血管新生など多彩な機能を有していることが明らかにされており、肝臓領域においても炎症や再生に関与することが報告されているが、肝線維化に対する血小板の作用は明らかにされていない。血小板減少の肝線維化に対する影響、また血小板自体の肝線維化に対する役割を検討することは、肝線維化の病態の理解、並びに肝線維化進展抑制の為の新規治療を検討する上で重要であると考えられる。

## B. 研究方法

血小板の生存に重要な役割を果たす Bcl-xL 遺伝子を巨核球・血小板特異的に欠損させることで、血小板減少マウスを作成した。この血小板減少マウスと同腹仔に対して総胆管結紮術 (以下 BDL) を施行し、10 日後にシリウスレッド染色、ハイドロキシプロリン定量法にて肝線維化の評価を行った。また、I 型コラーゲンに関して COL1A1, COL1A2 遺伝子発現を real time RT-PCR 法にて、蛋白発現を WB 法にて検討した。肝臓での炎症、細胞死、肝再生を其々肝組織の HE 染色、TUNEL 染色、BrdU 取り込みにて評価した。肝臓への血小板の集積を、血小板特異的表面抗原である CD41

の WB にて検討した。in vitro において、C57BL/6J マウスから単離した肝星細胞と血小板を共培養し、肝星細胞の I 型コラーゲン遺伝子発現・蛋白発現に与える影響を検討した。in vitro での血小板の活性化を検討するために、血小板の膜表面 CD62p 発現を FACS にて評価し、培養上清中の soluble CD62p を ELISA 法にて測定した。また、培養上清中の HGF 濃度を ELISA 法にて測定し、肝星細胞の Met のリン酸化を WB 法にて検討した。

## C. 研究成果

巨核球・血小板特異的 Bcl-xL 欠損マウスは正常に発育し、著明な血小板減少を呈したが、他の血球系や肝臓に異常を認めなかった。この血小板減少マウスと同腹仔に BDL を施行したところ、肝臓において同程度の胆汁鬱滞、炎症、細胞死、肝再生を認めめた。しかし肝線維化については、Sirius red 染色並びにハイドロキシプロリン定量法ともに、血小板減少マウスにおいて有意に増悪していた。I 型コラーゲンに関しても、COL1A1, COL1A2 の遺伝子発現並びに I 型コラーゲン蛋白発現ともに、血小板減少マウスにおいて有意に増加していた。また BDL 後、同腹仔では血小板が肝臓に集積するのに対し、血小板減少マウスでは集積を認めなかった。これらの結果から、胆汁鬱滞による肝線維化の病態において、血小板が肝内に集積し、肝臓での I 型コラーゲン産生に影響を与えている可能性が考えられた。そこで in vitro において、I 型コラーゲンの主要な産生細胞である肝星細胞と血小板の共培養を行ったところ、血小板濃度依存的に肝星細胞の I 型コラーゲン遺伝子発現、蛋

白発現ともに減弱した。肝星細胞との共培養により、血小板膜表面の CD62p 発現は増強し、培養上清中の soluble CD62p 濃度が増加しており、血小板は肝星細胞と共培養することで活性化することが明らかとなった。マウスから単離した血小板をトロンビンにより人為的に活性化させると、その上清中の HGF 濃度が増加しており、血小板は活性化して HGF を放出することが示された。また、血小板と肝星細胞の共培養を行うと、培養上清中 HGF 濃度が増加し、この際肝星細胞の Met は複数の部位でリン酸化されていた。肝星細胞に Met siRNA を導入すると、肝星細胞中の Met 発現が減弱し、血小板と肝星細胞の共培養により生じた肝星細胞からの I 型コラーゲン遺伝子発現の減弱が消失した。これらのことから血小板は、肝星細胞との共培養により活性化し、HGF を放出して、Met 依存的に肝星細胞の I 型コラーゲン産生を抑制することが示された。そこで、血小板減少マウスでの HGF/Met pathway の関与を検討するために BDL 後のマウス血漿中 HGF 濃度を ELISA 法にて、肝組織での Met のリン酸化を WB 法にて評価したところ、血小板減少マウスでは同腹仔と比し、血漿中 HGF 濃度が低く、肝組織中の Met のリン酸化も減弱していた。これらのマウスに対して、BDL 後組み換え人 HGF を経腹腔内投与したところ、血小板減少マウスで認めた I 型コラーゲン遺伝子発現の増強並びに肝線維化の増悪は消失した。これらの所見から、血小板減少による肝線維化増悪に HGF の低下が関与していることが示された。

#### D. 考察と結論

血小板には、活性化により HGF を放出し、肝星細胞の I 型コラーゲン産生を抑制するという、新規の抗線維化作用が存在することが明らかとなった。また、血小板減少自体が肝線維化を増悪させることが示されたことから、慢性肝炎/肝硬変に併発する血小板減少が、肝線維化の進展抑制の為の新規治療標的となりうる可能性があると考えられた。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

1. Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Li W, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Yin XM, Hennighausen L, Tatsumi T, Hayashi N. Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. *Hepatology* 50: 1217-1226, 2009.
2. Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Ohkawa K, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hennighausen L, Yin XM, Hayashi N. BH3-only protein Bid participates in the Bcl-2 network in healthy liver cells. *Hepatology* 50: 1972-1980, 2009.
3. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Ohkawa K, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. The let-7 family of microRNAs negatively regulates Bcl-xL expression and potentiates



sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* (in press)

4. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Tadokoro S, Ido A, Tsubouchi H, Hayashi N. Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* (in press)

#### 学会発表

The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), 60th Annual Meeting, October 31-November 3, 2009, Boston, MA

#### Parallel

#90 Bcl-xL and Mcl-1 cooperate to maintain integrity of hepatocytes

Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Hayashi N.

#### Presidential Plenary

#97 Thrombocytopenia deteriorates cholestasis-induced liver fibrosis in mice

Kodama T, Takehara T, Shimizu S, Hikita H, Li W, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N.

#### Poster

#1310 let-7 family negatively regulates Bcl-xL expression and induces apoptosis in cooperation with sorafenib in human hepatocellular

carcinoma.

Shimizu S, Takehara T, Kodama T, Hikita H, Yamamoto M, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N.

#### F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

# 厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野） 分担研究報告書

難治性 C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロンとリバビリン併用

療法の無反応(null response)関連因子

研究分担者 泉 並木 武蔵野赤十字病院消化器科部長

研究要旨：難治性 C 型慢性肝炎に対して、ペグインターフェロンとリバビリン併用療法によって治療効果の改善が見られたが、治療中に HCVRNA が陰性化しない難治症例が存在する。Null response に関連する因子を解析し、対策を講じることは今後の適切な治療を選択することや、効果改善対策をたてるうえで重要である。ゲノタイプ 1b 型高 HCVRNA 症例で治療を受けたが 24 週目までに HCVRNA が陰性化しなかった null response 関連因子は、肝線維化と HCV コア 70 番目のアミノ酸が変異型であること、血清クレアチニン低値と  $\gamma$ GTP 高値が関与していた。さらに宿主遺伝子解析を含めると、IL28B 遺伝子多型の関与が最も強かった。宿主を含めた対策が重要な課題である。

## 共同研究者

黒崎雅之 武蔵野赤十字病院消化器科副部長  
朝比奈靖浩 武蔵野赤十字病院消化器科部長

## A. 研究目的

Genotype 1b 型かつ高 HCVRNA 量の難治性 C 型慢性肝炎に対してペグインターフェロン(PEGIFN)とリバビリン(RBV)併用によってウイルス排除(sustained virological response; SVR)率が向上した。しかし約 2 割の症例は治療中に HCVRNA が陰性化しない無反応(null response; NR)である。NR の症例では、治療期間を延長しても SVR が得られないため、他の新たな治療法が開発されるのを待たねばならない。そこで、NR に関与する因子を明らかにすることによって、不要な治療を減らし、新たな治療法を開拓していくことが期待される。これまで PEGIFN と RBV 併用によって治療を受けた症例について、NR に関連する因子について解析した。

## B. 研究方法

- (1) Genotype 1b 型かつ高 HCVRNA 量の C 型慢性肝炎で、PEGIFN  $\alpha$  2b と RBV 併用にて治療を受けた 498 例について、HCV のコア aa70, aa91 や ISDR 変異を含む治療前因子を含んだ解析を行ない、治療中に HCVRNA が陰性化しない NR に関与する因子を解析した。
  - (2) 一部の症例では、患者の末梢血リンパ球から宿主遺伝子の SNIPs 解析を行なった。
  - (3) 治療前の種々の因子についてデータマイニング解析を行い、NR 関連因子について治療前予測アルゴリズムを構築した。
- (倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した(新 GCP に遵守)。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

## C. 研究結果

- (1) PEGIFN  $\alpha$  2b と RBV 治療効果が判明している 292 例について、NVR に関与する因子について解析した。単変量解析では、女性、前治療の IFN に無反応、

中球減少、ヘモグロビン低値、血小板低値、クレアチニン低値、 $\gamma$ GTP 高値、LDL コレステロール低値、肝線維化進展、肝脂肪化とコア aa70 と aa91 両者変異が有意であった。多変量解析すると、クレアチニン低値、 $\gamma$ GTP 高値、肝線維化進展とコア aa70 と aa91 の両者変異が NVR に関与しており、とくにコア aa70 と aa91 両者変異が Odds 比 7.7 倍と高かった。

表 1. NR に関連する因子 (多変量解析)

Variable	Odds 比	95%CI	p 値
クレアチニン	2.0	1.4-2.8	<0.001
$\gamma$ GTP (10 毎)	1.2	1.1-1.4	<0.001
肝線維化 (F3)	3.5	1.5-8.4	0.005
コア aa70aa91 変異	7.7	2.3-26	0.001

- (2) 一部の症例について、末梢血リンパ球を採取し、宿主 genome 解析を行い、SNIPs と NR の関連を検討した。Tanaka らの報告に含まれる症例で、当科の例を解析したところ、IL28B が minor allele であることが独立で有意であった。IL28B が minor allele の症例について、HCV コア aa70 と aa91 変異および ISDR 変異の関連を検討すると、aa70 変異および ISDR 0,1 個の難治ウイルスは IL28B の minor allele の症例に多いことが判明した。全て含んで解析すると、IL28B が minor allele であることが NR に Odds 比 31.75 倍と強く関連していた。

- (3) 治療前因子についてデータマイニング解析を行なうと、IL28B を含むと圧倒的に IL28B が優先選択された。IL28B を除外して解析すると、肝線維化が F3-4 が最も NR に関与していた。線維化進展例ではコア aa70 変異が次に予測効率が良く、線維化軽度群においてもコア aa70 変異が予測効率が良かった。線維化軽度かつコア aa70 変異群ではコア aa91 変異が次に NR 予測効率が良かった。

## D. 考察

- (1) 臨床データだけに基づいて解析すると、血清クレアチニン低値、 $\gamma$ GTP 高値、肝線維化進展、とコア aa70 と aa91 変異が NR に関連していた。クレアチニン値については、IFN や RBV が腎排泄であることと関連している可能性があり、薬剤投与量について検討

する必要がありと考えられる。

(2) 宿主遺伝子多型を含んで解析すると、IL28B が minor allele であることが最も有意な NR 関連因子であった。したがって PEGIFN と RBV に対する反応性は宿主遺伝子によって規定される部分が最も強いと考えられる。しかし、IL28B が minor allele である場合には、コア aa70 及び aa91 変異、ISDR 0,1 変異の難治例が多く、宿主が難治要因である場合にウイルス側も IFN に抵抗性であることが判明し、両者の関連が注目される。

(3) 治療前に NR になる可能性を予測できるかという点について、データマイニング解析を行なってアルゴリズムを構築した。IL28B 遺伝子多型を除いて解析すると NR になる予測因子として肝線維化が最も重要であった。この次にコア aa70 変異が NR 予測因子として重要であった。したがって肝線維化進展とコア aa70 変異を測定して治療するか否かを参考にすることが相応しいと考えられた。

(4) 今回の解析から、PEGIFN と RBV 併用によってウイルスが反応しない症例を予測できることが判明した。今後、これらの難治要素を有する症例について、新規治療法を開発していく必要がある。

#### E. 結論

Genotype 1b 型かつ高 HCVRNA 量の難治性 C 型慢性肝炎に対して、PEGIFN と RBV 併用治療を行った場合に治療中 HCVRNA が陰性化しない無反応に関連する因子を解析し、肝線維化とコア aa70 変異が予測因子であった。宿主遺伝子を含んで解析すると IL28B が有意であった。無反応症例を予測できるため、新たな治療薬開発の対象設定が可能である。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

(1) 板倉潤、朝比奈靖浩、玉城信治、平山慈子、田中智大、安井豊、佐藤光明、細川貴範、上田研、池田裕喜、土谷薫、中西裕之、黒崎雅之、榎本信幸、泉並木。HCV 治療早期ダイナミクスからの治療効果予測を根拠とした治療戦略 第 45 回日本肝臓学会総会一般演題 2009。

(2) 平山慈子、朝比奈靖浩、玉城信治、佐藤光明、田

中智大、安井豊、細川貴範、池田裕喜、上田研、土谷薫、中西裕之、板倉潤、高橋有香、黒崎雅之、泉並木。C 型慢性肝炎への PEG-IFN/RBV 併用療法における難治要因・再燃寄与因子とその対策。第 45 回日本肝臓学会総会一般演題 2009。(3) 朝比奈靖弘、黒崎雅之、泉並木。C 型肝炎治療：ペグインターフェロン・リバビリン併用療法 第 45 回日本肝臓学会総会コンセンサスミーティング 2009。

#### 1. 論文発表

1) Izumi N, Nishiguchi, Hino K, Suzuki F, Kumada K, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M. Management of Hepatitis C: Consensus of Japan Society of Hepatology 2009 Hep Res in press.

2) Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda Tsuchiya K, Nakanishi H, Ikeda H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Higaki M, Enomoto N, Izumi N. A Predictive Model of Response to Peginterferon Ribavirin in Chronic Hepatitis C using Classification and Regression Tree Analysis. Hep Res in press. 3) Itakura J, Kurosaki M, Itakura Y, Maekawa S, Asahina Y, Izumi N, Enomoto N. Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model. Biosystems 2009 12. 4) Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. Gastroenterology. 2008;134:1396-405.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

C型肝炎難治症例の病態解明と抗ウイルス治療に関する研究

研究分担者 伊藤義人 京都府立医科大学医学研究科消化器内科学准教授

研究要旨：

1) ペグインターフェロン・リバビリン (Peg-IFN/Rib) 併用療法の簡便な治療前効果予測式の作成：48週間のPeg-IFN/Rib併用療法を受けた1b高ウイルス量のC型慢性肝炎患者約290例を対象とした。230例 (A群) を著効 (SVR) 例と非SVR例に分類し多変量解析を行い、オッズ比をもとに男性2点+低HCV RNA 量3点+血小板高値1点+低年齢1点とし治療前治療効果 (SVR) 予測式を作成した。SVR率は1点以下23.8% (10/42)、2～5点48.7% (74/152)、6～7点80.6% (29/36)であった。さらに、60例 (B群) で予測式の妥当性を確認した。また、B群でISDRとコアのアミノ酸変異と加味し、男性2点+低HCV RNA 量3点+血小板高値1点+低年齢1点+ISDRアミノ酸変異2個以上2点+コア70のアミノ酸変異野生型2点とする治療前治療効果 (SVR) 予測式を作成するとSVR率は2点以下0% (0/10)、3～6点40% (12/30)、7～11点90% (18/32)であった。

2) 難知性のC型慢性肝炎に対する治療法の検討：1b高ウイルス量のC型慢性肝炎で女性におけるPeg-IFN/Rib併用療法の延長投与の有用性を検証した。Complete EVRの女性のSVR率は48週投与で68.2% (30/44)であり男性の84.5% (60/71)に比して有意に低率であったが、60週投与では75.0% (12/16) (男性80.8% [21/26])、72週投与では100% (7/7) (男性100% [3/3])で男性に匹敵するまで改善した。Partial EVRの女性のSVR率は48週投与で10.5% (2/19)であり男性の28.6% (6/15)に比して有意に低率であったが、72週投与では55.6% (10/18) (男性50.0% [7/14])で男性と同等であった。

A. 研究目的

1. ペグインターフェロン・リバビリン (Peg-IFN/Rib) 併用療法の簡便な治療前効果予測式の作成

我が国では、1b高ウイルス量のC型慢性肝炎患者数が最も多く、また高齢化しており、安全で経済的・効率的な治療指針の樹立が必要である。そのためには、肝臓専門医が利用しやすい簡便な治療前効果予測式で著効が期待される例・難治例を選別することが有用である。我々は約600例の過去のペグインターフェロン・リバビリン (Peg-IFN/Rib) 併用療法の治療成績をもとに、性別、肝組織の

線維化、HCV RNA 量、HCV core や ISDRの変異がPeg-IFN/Rib 併用療法の治療成績に密接に関わることを明らかにしてきた。今回、簡便な治療指針の樹立のため、ウイルス側 (core、ISDRの変異) ・生体側の因子を含んだPeg-IFN/Rib併用療法の簡便な治療前効果予測式を作成し、その妥当性を前向きに検証する。

2. 難知性のC型慢性肝炎に対する治療法の検討

現在、難治性のC型慢性肝炎に対しては、最も有効とされるPeg-IFN/Rib併用療法でも完治例は約半数にしかすぎない。我々の検討では、女性の治癒率が極めて悪くその原因の探求と対策の

樹立が急務である。今回、過去の Peg-IFN/Rib 併用療法の性別の治療成績をもとに、女性に対する Peg-IFN/Rib の長期投与の実態とその有用性を検討した。

## B. 研究方法

京都府立医大消化器内科と関連施設で48週間の Peg-IFN/Rib 併用療法を受け、すでに治療効果判定が終了した1b高ウイルス量のC型慢性肝炎患者約290例を対象とした。まず、A群(230例)を著効(SVR)例と非SVR例に分類し、単変量・多変量解析をもとに治療前治療効果予測式を作成する。次に、B群(60例)で予測式の妥当性を検証する。さらに、C型肝炎ウイルスのISDR・Core70の変異の有無を加えた治療前治療効果予測式を作成する。48週間～72週間の Peg-IFN/Rib 併用療法を行った1b高ウイルス量のC型慢性肝炎患者例を対象に48週間～72週間投与の治療成績を性別に検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は京都府立医科大学医学倫理委員会の承認を得ており、被検者からは文書による同意を得ている。

## C. 研究結果

### 1. Peg-IFN/Rib併用療法の簡便な治療前効果予測式の作成

48週間の Peg-IFN/Rib 併用療法を受けすでに治療効果判定が終了した1b高ウイルス量のC型慢性肝炎患者のうち、A群(230例)を著効(SVR)例と非SVR例に分類し、両群間で有意差のあった項目を多変量解析し、オッズ比をもとにSVR予測スコアを作成した。

性別、年齢、HCV RNA 量、血色素量、血小板値のオッズ比が比較的高く(表1)、男性2点+低HCV RNA 量(1000KIU/ml以下)3点+血小板高値(15万/ $\mu$ l以上)1点+低年齢(60歳以下)1点とした。SVR率は1点以下23.8%(10/42)、2～5点48.7%(74/152)、6～7点80.6%(29/36)であった。B群(60例)でこの予測式の妥当性を検討したところ、SVR率は1点以下0%(0/8)、2～5点50.0%(20/40)、6～7点83.3%(10/12)であった。

さらに、B群(60例)でISDRとコアのアミノ酸変異と加味し、男性2点+低HCV RNA 量(1000KIU/ml以下)3点+血小板高値(15万/ $\mu$ l以上)1点+低年齢(60歳以下)1点+ISDRアミノ酸変異2個以上2点+コア70のアミノ酸変異野生型2点とする式を作成し検討すると、SVR率は2点以下0%(0/10)、3～6点40%(12/30)、7～11点90%(18/32)であった。

### 2. 難知性のC型慢性肝炎に対する治療法の検討

1b高ウイルス量のC型慢性肝炎で女性における Peg-IFN/Rib 併用療法の延長投与の有用性を検証した。Complete EVR の女性のSVR率は48週投与で68.2%(30/44)であり男性の84.5%(60/71)に比して有意に低率であったが、60週投与では75.0%(12/16)(男性80.8% [21/26])、72週投与では100%(7/7)(男性100% [3/3])で男性に匹敵するまで改善した。Partial EVRの女性のSVR率は48週投与で10.5%(2/19)であり男性の28.6%(6/15)に比して有意に低率であったが、72週投与では55.6%(10/18)(男性50.0% [7/14])で男性と同等であった。

## D. 考察

近年、C型慢性肝炎患者は高齢化しており、安全で経済的・効率的な治療指針の樹立が必要である。そのためには、治療前に効果予測を行い、著効例・難治例を選別することが重要である。我々は過去のPeg-IFN/Rib併用療法の治療成績をもとにSVR予測スコアを作成し、その有用性を示した。また、C型肝炎ウイルスのISDR・Core70の変異の有無を加えた治療前治療効果予測式が一層有用であることを示した。最近、IL28BのSNIPがPeg-IFN/Rib併用療法の治療効果予測に有用であるとの報告があり、今後、さらに優れた治療前効果予測式が作成可能となるものと考えられる。

今回、男性に比してPeg-IFN/Rib併用療法の治療効果の悪い女性における治療の延長効果を検討した。現在、HCV RNAの陰性化が治療開始12~36週の間に見られた症例に対する72週間の投薬が望まれるとされているが、女性においては治療開始12週までにHCV RNAの陰性化がみられたcomplete EVRでも60週間の投薬でSVR率が高くなることより、問題となる副作用の発現がなければ、女性に対しては延長投与を行うよう試みる価値があるものと考えられた。

## E. 結論

1. Peg-IFN/Rib 併用療法を受けた 1b 高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者の SVR 予測スコアを作成し、その有用性を示した。
2. 女性においては late responder のみならず、complete EVR でも 60 週の延長投与で SVR 率が高くなり、可能な患者では延長投与を考慮すべきである。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Steatosis and hepatic expression of genes regulating lipid metabolism in Japanese patients infected with hepatitis C virus.

Yasui K, Harano Y, Mitsuyoshi H, Tsuji K, Endo M, Nakajima T, Minami M, Itoh Y, Zen Y, Nakanuma Y, Yoshikawa T, Okanoue T.

J Gastroenterol. 2009 Sep 30. [Epub ahead of print]

2) Predictive values of amino acid sequences of the core and NS5A regions in antiviral therapy for hepatitis C: a Japanese multi-center study.

Okanoue T, Itoh Y, Hashimoto H, Yasui K, Minami M, Takehara T, Tanaka E, Onji M, Toyota J, Chayama K, Yoshioka K, Izumi N, Akuta N, Kumada H.

J Gastroenterol. 2009;44(9):952-63.

3) Defective expression of polarity protein PAR-3 gene (PARD3) in esophageal squamous cell carcinoma.

Zen K, Yasui K, Gen Y, Dohi O, Wakabayashi N, Mitsufuji S, Itoh Y, Zen Y, Nakanuma Y, Taniwaki M, Okanoue T, Yoshikawa T.

Oncogene. 2009 Aug 13;28(32):2910-8.

4) Oxidative stress may enhance the malignant potential of human hepatocellular carcinoma by telomerase activation.

Nishikawa T, Nakajima T, Katagishi T, Okada Y, Jo M, Kagawa K, Okanoue T, Itoh Y, Yoshikawa T.

Liver Int. 2009 Jul;29(6):846-56.

5) Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease.

Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. *Hepatol Res.* 2009 Apr;39(4):366-73.

6) A novel amplification target, ARHGAP5, promotes cell spreading and migration by negatively regulating RhoA in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells.

Gen Y, Yasui K, Zen K, Nakajima T, Tsuji K, Endo M, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Tanaka S, Taniwaki M, Arii S, Okanoue T, Yoshikawa T.

*Cancer Lett.* 2009 Mar 8;275(1):27-34.

7) ERK5 is a target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulating mitotic entry.

Zen K, Yasui K, Nakajima T, Zen Y, Zen K, Gen Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Mitsufuji S, Tanaka S, Itoh Y, Nakanuma Y, Taniwaki M, Arii S, Okanoue T, Yoshikawa T.

*Genes Chromosomes Cancer.* 2009 Feb;48(2):109-20.

8) Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C.

Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. *Nat Genet.* 2009 Oct;41(10):1105-9.

## 2. 学会発表

1) 西村 健、伊藤義人、横溝千尋、新見敏久、橋本宏明、山口寛二、南 祐仁、吉川敏一。Genotype 1b 高ウイルス量の C 型慢

性肝炎に対する Peg-IFNH/Ribavirin 併用療法の治療前効果予測式作成の試み。第 95 回日本消化器病学会総会 2009 年 5 月 8 日 (札幌)

2) 伊藤義人、西村 健、吉川敏一。自然経過と治療適応 (高齢者、PNALT を含む)。コンセンサクミーティング 2、C 型肝炎。第 45 回日本肝臓学会総会 2009 年 6 月 5 日 (神戸)。

3) 西村 健、伊藤義人、吉川敏一。Genotype 1b 高ウイルス量の C 型慢性肝炎に対する Peg-IFNH/Ribavirin 併用療法の早期治療反応別・治療期間別の治療成績。第 13 回日本肝臓学会大会 2009 年 10 月 14 日 (京都)。

4) 西村 健、伊藤義人、吉川敏一。Genotype 1b 高ウイルス量の C 型慢性肝炎における高齢女性に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法の現状とその対策。第 38 回日本肝臓学会西部会 2009 年 12 月 5 日 (米子)。

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

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）  
分担研究報告書（平成 21 年度）

分担研究報告書

研究分担者 金子周一 金沢大学大学院恒常性制御学 教授

分担研究課題: C 型慢性肝炎症例における肝臓の低栄養状態とインターフェロン応答・不応答の解析

研究要旨: C 型慢性肝炎の治療抵抗性には様々な因子が関与し、肝線維化、脂肪化、インスリン抵抗性などの宿主因子が重要な働きを演じている。なかでも肝線維化の進行に伴い治療抵抗性が増強することは、良く知られているがその機序に関して十分に解明されてこなかった。今回、肝の栄養状態に注目して解析を行った。血中アミノグラムの解析から Fischer 比の低下が治療抵抗性と密接に関連することが示唆され、BCAA の低下が重要な因子と考えられた。肝線維化進行例では mTOR シグナルの減弱が起り、インターフェロン応答の低下が起こっていると推察される。培養細胞の実験では、インターフェロン $\alpha$  に BCAA を添加することにより、IRF7 や OAS の発現上昇が起こり、インターフェロン応答の活性化が認められた。

#### A. 研究目的

C 型慢性肝炎の治療抵抗性には様々な因子が関与している。近年 IL28B の遺伝子多型が Peg-IFN+Rib 併用療法の治療反応性を決定する重要な宿主因子であることが報告された。しかしながら、それ以外にも年齢、肝線維化、脂肪化、インスリン抵抗性などの宿主因子をはじめ、ISDR やコア領域変異を代表とするウイルス側因子も治療抵抗性に寄与していると考えられる。本研究では、特に肝臓の低栄養状態の観点からインターフェロン応答・不応答の解析を行った。

#### B. 研究方法

ペグインターフェロン $\alpha$ +レボトル併用療法を行った 168 例を対象とし、全症例において、血中アミノグラム解析を行い各種臨床パラメーターと併せ解析した。肝組織 ISG(interferon stimulated genes)の発現を RTD-PCR 法にて、NS5A-ISDR 変異、コアアミノ酸 70 番、91 番の変位を direct sequencing により測定した。

#### C. 研究結果

168 例の治療効果の内訳は SVR70 例、TR55 例、NR43 例であった。本解析では、SVR70 例、NR43 例に絞り、治療効果と関連する治療前因子を解析した。単変量解析にて、F 因子 ( $p=0.001$ )、肝組織 ISGs ( $p<0.001$ )、AST ( $p=0.022$ )、 $\gamma$ -GTP ( $p<0.001$ ) が有意因子として抽出された。多変量解析では、肝組織 ISGs (Odds=21.6,  $p<0.001$ )、F 因子 (Odds=14.7,  $p<0.001$ )、ISDR 変異 (Odds=11.2,  $p<0.001$ ) が有意因子として抽出された。従

って、宿主因子として肝の線維化は治療抵抗性の独立した因子であることが明らかとなった。SVR70 例、NR43 例の血中アミノグラムの解析では各種アミノ酸濃度と治療効果の関連から Fischer 比が治療効果と関連することが明らかとなった。NR 例は SVR 例に比し有意に Fischer 比の低下を認めた。肝の線維化進行度を併せた解析でも、NR 例では SVR 例に比し有意に Fischer 比が低値であった。

次に BCAA がインターフェロン応答に与える影響について検討した。マウス正常肝細胞にインターフェロン $\alpha$  及びインターフェロン $\alpha$ +BCAA を添加したところ、BCAA 添加により mTOR シグナルが活性化し 4EBP1 のリン酸化が確認され、その状況下において、IRF7 の発現の上昇が認められた。また Huh-7 細胞を用いて同様にインターフェロン $\alpha$ +BCAA を添加すると、インターフェロン $\alpha$  単独比し有意に OAS の発現が上昇した。さらに、その発現上昇は rapamycin によりキャンセルされた。従って、BCAA による mTOR シグナルの活性化によりインターフェロン $\alpha$  応答を活性化させる可能性が示唆された。

#### D. 考察

C 型慢性肝炎の治療抵抗性には様々な因子が関与し、肝線維化、脂肪化、インスリン抵抗性などの宿主因子が重要な働きを演じている。なかでも肝線維化の進行に伴い治療抵抗性が増強することは、異なるゲノタイプでも共通して認められ、その機序に関して十分に解明されてこなかった。肝線維化の進行に伴う治療抵抗性のメカ



ニズムには血流、薬物の delivery など様々な因子が関連する可能性があるが、今回、肝の栄養状態に注目して解析を行った。血中アミノグラムの解析から Fischer 比の低下が治療抵抗性と密接に関連することが示唆され、BCAA の低下が重要な因子と推察された。近年、mTOR シグナルがインターフェロン応答に重要な役割をすることが明らかにされている (Nature. 2008 Mar 20;452(7185):323-8)。肝線維化進行例では mTOR シグナルの減弱が起こり、インターフェロン応答の低下が起こっていると推察された。培養細胞の実験では、インターフェロン $\alpha$  に BCAA を添加することにより、IRF7 や OAS の発現上昇が起こり、インターフェロン応答の活性化が認められた。

#### E. 結論

肝線維化進行例では BCAA の低下が起こりインターフェロン応答の低下が起こっている可能性が示唆された。今後、HCV 感染クローンを用いたウイルス複製制御の有無、肝線維化状態に於いて BCAA 低下を起こす機序について詳しい解析を行う予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma.

Hodo Y, Hashimoto SI, Honda M, Yamashita T, Suzuki Y, Sugano S, Kaneko S, Matsushima K.

Genomics. 2010 Jan 21. [Epub ahead of print]

dUTP pyrophosphatase expression correlates with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma.

Takatori H, Yamashita T, Honda M, Nishino R, Arai K, Yamashita T, Takamura H, Ohta T, Zen Y, Kaneko S.

Liver Int. 2009 Nov 30. [Epub ahead of print]

CD14+monocytes are vulnerable and functionally impaired under ER stress in patients with type 2 diabetes.

Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Matsushima K, Kaneko S.

Diabetes. 2009 Dec 3. [Epub ahead of print]

Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to

hepatocellular carcinoma.

Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S.

Hepatology. 2009 Apr;49(4):1098-112.

EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features.

Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW.

Gastroenterology. 2009 Mar;136(3):1012-24. Epub 2008 Dec 6.

Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma.

Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T, Kaneko S.

J Hepatol. 2009 Jan;50(1):100-10. Epub 2008 Oct 12.

Ootsuji H, Honda H, Kaneko S, Usui S, Okajima M, Okada H, Sakai Y, Takamura T, Horimoto K, Takamura M

Altered Hepatic Gene Expression Profiles Associated with Myocardial Ischemia

Circulation: Cardiovascular Genetics 2010 in press

Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T and Kaneko S.

La protein required for IRES-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication

Journal of Infectious Diseases 2010 in press

##### 2. 学会発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

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）  
分担研究報告書(平成 21 年度)

分担研究報告書

C 型肝炎難治症例の病態解明と抗ウイルス治療に関する研究

研究分担者 坂本 直哉 東京医科歯科大学・分子肝炎制御学講座 准教授

研究要旨：我々は C 型肝炎難治症例の病態解明のため、DNA microarray を用いた HCV 複製増殖に関連する遺伝子および分子間ネットワークの網羅的解析、および HCV コア蛋白変異株培養系を用いた増殖動態、インターフェロン感受性の解析をおこない以下の知見を得た。(1)HCV 高増殖細胞では中性脂肪、コレステロール系の脂質合成促進に働く遺伝子群の発現増強が認められ、PPAR $\alpha$ および $\gamma$ 刺激薬によりそれぞれ HCV 増殖が抑制、亢進した。(2)Core70/91 変異 HCV-JFH1 クローンではウイルス蛋白の細胞内への蓄積傾向が見られ、インターフェロン応答能が低下していた。今後、肝脂肪化がインターフェロン抵抗性につながる分子機構を明らかにしていくとともに、genotype 1b など他のインターフェロン抵抗株へ解析対象を広げ増殖動態、インターフェロン抵抗性の分子機構などについて解析を進める。

A. 研究目的

我々は、独自に開発した HCV 培養増殖系を用い、抗ウイルス薬感受性に関わる宿主蛋白の探索、機能解析を進め、新たな抗ウイルス療法を開発することを目的として研究を遂行している。本年度我々は、HCV 増殖・非増殖細胞における網羅的遺伝子発現及びシグナルパスウェイ解析を行い、HCV 増殖に関する細胞内代謝経路およびシグナル伝達系の解析を行った。

HCV コア領域のアミノ酸 70 番および 91 番の変異は IFN・Ribavirin 治療抵抗性であるが(Akuta, Intervirology 2005)、その分子機構は不明である。今回我々は、HCV-JFH1 培養系を用いてコア 70/91 変異が HCV 増殖・粒子形成・interferon(IFN)感受性に与える影響とその機構を検討した

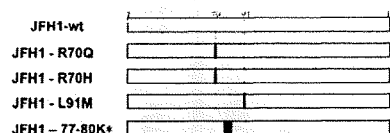
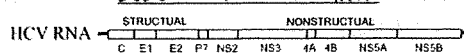
B. 研究方法

(1) HCV 複製増殖に関連する遺伝子および分子間ネットワークの網羅的解析：Naive Huh7、HCV genotype 1b, 2a replicon 細胞、及び cured 細胞の遺伝子発現プロファイルを Gene Chip (Affymetrix)にて解析した。さらに、KEGG pathway database および Reactome (www.reactome.org) を用いて HCV 増殖に関連する分子間ネットワークの解析を行った。

(2) HCV-JFH1 プラスミド pJFH1full (HCV-wild)に in-vitro mutagenesis により core aa70 (R70Q,R70H)、aa91(L91M)変異をそれぞれ導入した。合成 HCV-RNA を Huh7 細胞に導入し培養上清中のコア抗原および上清・細胞内の HCV-RNA・コア蛋白を測定した。HCV-core 野生株、変異株をそれぞれ細胞に導入し、種々の濃

度の IFN- $\alpha$  を添加しコア抗原および HCV-RNA を測定した。また種々のインターフェロン誘導遺伝子(ISG)、SOCS、および ER ストレス関連蛋白を検出・比較した。

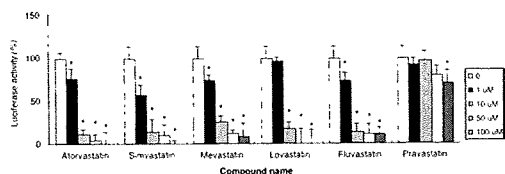
変異HCVクローンの構築



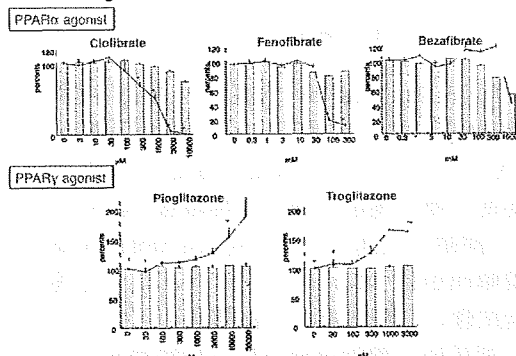
C. 研究結果

(1) HCV replicon 発現細胞およびその Cured 細胞(ウイルス除去細胞)を用いた DNA Microarray 解析により、レプリコン増殖細胞とその除去細胞(cured 細胞)間では、インスリンレセプターシグナル、細胞周期関連遺伝子に加え、コレステロール代謝系に関連する遺伝子群の有意な変動が認められた。cured 細胞では、メバロン酸経路からコレステロール合成に至るパスウェイ上の遺伝子発現の亢進、および脂肪酸合成・代謝関連遺伝子の発現亢進を認め、これらの変化は細胞内でのウイルス増殖に促進的に働くと考えられた。そこで、脂質・糖代謝を制御する PPAR の HCV 増殖への影響を解析したところ、PPAR $\alpha$  agonist (clofibrate, fenofibrate) 投与により replicon 増殖は抑制され、他方 PPAR $\gamma$  agonist (pioglitazone, troglitazone) により HCV

replicon 増殖が増強した。  
Statin 製剤による HCV 増殖抑制効果

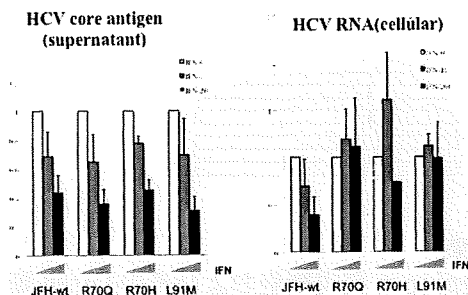


PPAR agonist の HCV 増殖に与える影響



(2) HCV-core 変異株、HCV-R70Q、-R70H および -L91M は、wild 株にくらべ細胞内 HCV-RNA レベルが高い一方で、上清中 HCV 蛋白は HCV-wild に比し低値であった。IFN 添加により、Core 変異株では IFN 抵抗性が認められ、IFN 伝達経路の抑制因子である SOCS-1, SOCS-3 の発現が野生株に比べて増強しており、25-AS や MXA などの ISG は変異株で低下していた。

HCV wt 及びコア変異クローンでの IFN による発現抑制の効果



#### D. 考 察

(1) HCV 増殖細胞では脂質・糖代謝系の機能異常が起こり、それらがさらに HCV 増殖に亢進的に働くことが示唆された。脂質代謝系を標的とする適切な治療が HCV 病態制御につながると考えられた。

(2) Core70/91 アミノ酸変異等を導入した HCV 培養系を用いた解析により、C70/91 変異株は細胞内増殖レベルに比し粒子分泌が低下しており、ウイルス蛋白の蓄積傾向が見られた。C70/91 変異株では SOCS1/3 などの高発現とともにリン酸化 STAT1/2 を始めとしたインターフェロン応答能が低下しており、ウイルスの特定領域のアミノ酸変異がインターフェロン不応性を来り、その機構

に ER ストレスや IFN 伝達経路の抑制因子が関与している可能性が考えられた。

#### E. 来年度以降の研究課題

- (1) 肝脂肪化がインターフェロン抵抗性につながる分子機構を遺伝子発現解析、遺伝子導入解析などでさらに明らかにしていく。
- (2) 他のインターフェロン抵抗株 (1b 型など) へ解析対象を広げ in-vitro および in-vivo における増殖能、インターフェロン抵抗性の分子機構などについて解析を進める。

#### F. 研究発表

##### 英文原著

1. KyeongJin Kim, Kook Hwan Kim, Hye Young Kim, Hyun Kook Cho, Naoya Sakamoto, JaeHun Cheong: Curcumin inhibits hepatitis C virus replication via suppressing the Akt-SREBP-1 pathway. 2010; *EPub*.
2. Mina Nakagawa, Naoya Sakamoto, Mayumi Ueyama, Kaoru Mogushi, Satoshi Nagaie, Yasuhiro Itsui, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Hiroshi Tanaka, Nobuyuki Enomoto, and Mamoru Watanabe: Mutations in the Interferon Sensitivity Determining Region and virological response to combination therapy with Pegylated-interferon alpha2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b infection. *J Gastroenterol, in press*.
3. Yuki Nishimura-Sakurai, Naoya Sakamoto, Kaoru Mogushi, Satoshi Nagaie, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, et al.: Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells. *J Gastroenterol EPub*.
4. Tomokazu Mizui, Shunhei Yamashina, Isei Tanida, Motoki Takashima, Yoshiyuki Takei, Takashi Ueno, Naoya Sakamoto, Kenich Ikejima, Tsuneo Kitamura, Nobuyuki Enomoto, Tatsuo Sakai, Eiki Kominami, Sumio Watanabe: Therapeutic targeting of hepatitis C replication-associated autophagy by chloroquine. *J Gastroenterol, Epub*.
5. Yasuhiro Itsui, Naoya Sakamoto, Sei Kakinuma, Mina Nakagawa, Yuko Sekine-Osajima, Megumi Tasaka-Fujita, Yuki Nishimura-Sakurai, et al.: Antiviral effects of the interferon-induced protein GBP-1 and its interaction with the hepatitis C virus NS5B protein. *Hepatology* 2009; 50:1727-1737.
6. Yasuhito Tanaka, Nao Nishida, Masaya Sugiyama, Masayuki Kurosaki, Kentaro Matsuura, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, et al.: Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genetics* 2009; 41 (10):1105-1109.
7. KyeongJin Kim, Kook Hwan Kim, Eunsin Ha, Jin Young Park, Naoya Sakamoto, JaeHun Cheong: Hepatitis C virus NS5A protein increases hepatic lipid accumulation via induction of activation and

- expression of PPARgamma. *FEBS Letter* 2009;583 (17):2720-2726.
8. Tomita T, Kanai T, Totsuka T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, et al.: IL-7 Is Essential for Lymphopenia-driven Turnover of Colitogenic CD4+ Memory T Cells in Chronic Colitis. *Eur J Immunol* 2009;38 (10):2737-2747.
  9. Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Shinohara T, Sakamoto N, et al.: Long-lived Colitogenic CD4+ Memory T Cells Residing Outside the Intestine Participate in the Perpetuation of Chronic Colitis. *J Immunol* 2009;183 (8):5059- 5068.
  10. Masahiro Ohira, Kohei Ishiyama, Yuka Tanaka, Marlen Dorskali, Yuka Igarashi, Hirota Tashiro, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Naoya Sakamoto, et al.: Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *J Clin Invest* 2009;119(11):3226-35.
  11. Sheng-Yang Wang, Ching-Ping Tseng, Keng-Chang Tsai, Chia-Fan Lin, Ching-Ya Wen, Hsin-Sheng Tsay, Naoya Sakamoto, Chin-Hsiao Tseng, and Ju-Chien Cheng: Bioactivity-guided screening identifies a potent anti-hepatitis C virus compound pheophytin a from *Lonicera hypoglauca* Miq. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385(2):230-235.
  12. Chatterji U, Bobardt M, Selvarajah S, Yang F, Tang H, Sakamoto N, et al.: The isomerase active site of cyclophilin a is critical for HCV replication. *J Biol Chem* 2009; 284(25):16998-17005.
  13. Teruji Totsuka, Takanori Kanai, Yasuhiro Nemoto, Takayuki Tomita, Ryuichi Okamoto, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Naoya Sakamoto, et al.: RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function of CD4+ CD25+ regulatory T cells in chronic colitis. *J Immunol* 2009; 182(19):6079-6087.
  14. Satoshi Toma, Tsuyoshi Yamashiro, Shingo Arakaki, Joji Shiroma, Tatsuji Maeshiro, Kenji Hibiya, Naoya Sakamoto, et al.: Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by nelfinavir and interferon- $\alpha$ . *Journal of Viral Hepatitis* 2009; 16(7):506-512.
  15. Onizawa, Kanai T, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Nagaishi T, Sakamoto N, Watanabe M: Signaling pathway via TNFa/NFkB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296(4):G850-859.
  16. Andrew W. Tai, Yair Benita, Lee F. Peng, Sun-Suk Kim, Naoya Sakamoto, Ramnik J. Xavier, Raymond T. Chung: A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* 2009; 5(3):298-307.
  17. Murayama M, Okamoto R, Tsuchiya K, Akiyama

J, Nakamura T, Sakamoto N, et al.: Musashi-1 suppresses expression of Paneth cell-specific genes in human intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol* 2009;44(3):173-82.

#### 著書

1. 坂本直哉, 横田隆徳: siRNA による C 型肝炎遺伝子治療. *バイオ医薬品の開発技術とシーズ* 2009 年 3 月, シーエムシー出版 p246-251.

#### 総説

1. Sakamoto N, Wu GY: Prospects for future therapy of hepatitis C virus infection. *Future Virology* 2009; 4(5):453-462
2. Sakamoto N, Watanabe M: New therapeutic approaches to HCV. *J Gastroenterol* 2009; 44(7):643-649.
3. 櫻井幸, 坂本直哉, 渡辺守: HCV 増殖に関する糖脂質代謝遺伝子ネットワーク. *肝胆膵* 2009; 59(6):1163-1172.
4. 坂本直哉: HCV 増殖・培養系を用いた抗ウイルス化合物の同定. *医学のあゆみ* 2009; 229(1):107-110.

#### Presentations in International Meetings:

1. Yusuke Funaoka, Naoya Sakamoto, Goki Suda, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Kako Mishima, Yuko Karakama, Machi Yamamoto, et al.: In-vitro replication and interferon sensitivity of core aa 70 and 91 mutant HCV cell culture. 60th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Oct-30-2009, Boston, MA.
2. Goki Suda, Naoya Sakamoto, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, et al.: In-vitro and in-vivo Characterization of a new genotype 2b HCV clone and 2b/JFH1 intergenotypic chimera and analyses of the factor that regulate interferon sensitivity. 60th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Oct-30-2009, Boston, MA.
3. Yasuhiro Itsui, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Yuko Sekine-Osajima, Megumi Tasaka-Fujita, et al.: Antiviral effects of interferon-induced proteins GBP-1 and its interactions with hepatitis C virus NS5B protein. 60th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Oct-30-2009, Boston, MA.
4. Kako Mishima, Naoya Sakamoto, Yuko Sekine-Osajima, Mina Nakagawa, et al.: Establishment and genetic analyses of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by plaque-forming assay. 16th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Oct-3-2009, Nice, France.