

- 127 Russo MW, Goldsweig CD, Jacobson IM, Brown RS Jr. Interferon monotherapy for dialysis patients with chronic hepatitis C: an analysis of the literature on efficacy and safety. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1610–5.
- 128 Fabrizi F, Dixit V, Messa P, Martin P. Interferon monotherapy of chronic hepatitis C in dialysis patients: meta-analysis of clinical trials. *J Viral Hepat* 2008; 15: 79–88.
- 129 Kamar N, Ribes D, Izopet J, Rostaing L. Treatment of hepatitis C virus infection (HCV) after renal transplantation: implications for HCV-positive dialysis patients awaiting a kidney transplant. *Transplantation* 2006; 82: 853–6.
- 130 KDIGO clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, evaluation, and treatment of hepatitis C in chronic kidney disease. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int Suppl* 2008; 109: S1–99.
- 131 Micallef JM, Kaldor JM, Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat* 2006; 13: 34–41.
- 132 Ikeda K, Arase Y, Kawamura Y *et al.* Necessities of Interferon Therapy in Elderly Patients with Chronic Hepatitis C. *Am J Med* 2009; 122: 479–86.
- 133 Ikeda K, Arase Y, Saitoh S *et al.* Interferon beta prevents recurrence of hepatocellular carcinoma after complete resection or ablation of the primary tumor—A prospective randomized study of hepatitis C virus-related liver cancer. *Hepatology* 2000; 32: 228–32.
- 134 Kubo S, Nishiguchi S, Hirohashi K *et al.* Effects of long-term postoperative interferon-alpha therapy on intrahepatic recurrence after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2001; 134: 963–7.
- 135 Shiratori Y, Shiina S, Teratani T *et al.* Interferon therapy after tumor ablation improves prognosis in patients with hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 2003; 138: 299–306.
- 136 Mazzaferro V, Romito R, Schiavo M *et al.* Prevention of hepatocellular carcinoma recurrence with alpha-interferon after liver resection in HCV cirrhosis. *Hepatology* 2006; 44: 1543–54.
- 137 Kubo S, Nishiguchi S, Hirohashi K, Tanaka H, Shuto T, Kinoshita H. Randomized clinical trial of long-term outcome after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma by postoperative interferon therapy. *Br J Surg* 2002; 89: 418–22.
- 138 Shiratori Y, Ito Y, Yokosuka O *et al.* Antiviral therapy for cirrhotic hepatitis C: association with reduced hepatocellular carcinoma development and improved survival. *Ann Intern Med* 2005; 142: 105–14.
- 139 Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S *et al.* Randomised trial of effects of interferon-alpha on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. *Lancet* 1995; 346: 1051–5.
- 140 Ikeda K, Saitoh S, Arase Y *et al.* Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: a long-term observation study of 1,643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. *Hepatology* 1999; 29: 1124–30.
- 141 Imai Y, Kawata S, Tamura S *et al.* Relation of interferon therapy and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. Osaka Hepatocellular Carcinoma Prevention Study Group. *Ann Intern Med* 1998; 129: 94–9.
- 142 Arase Y, Ikeda K, Suzuki F *et al.* Prolonged-interferon therapy reduces hepatocarcinogenesis in aged-patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2007; 79: 1095–102.
- 143 Nomura H, Kashiwagi Y, Hirano R *et al.* Efficacy of low dose long-term interferon monotherapy in aged patients with chronic hepatitis C genotype 1 and its relation to alpha-fetoprotein: A pilot study. *Hepatol Res* 2007; 37: 490–7.
- 144 Shiffman ML, Hofmann CM, Contos MJ *et al.* A randomized, controlled trial of maintenance interferon therapy for patients with chronic hepatitis C virus and persistent viremia. *Gastroenterology* 1999; 117: 1164–72.
- 145 Saito Y, Saito H, Tada S *et al.* Effect of long-term interferon therapy for refractory chronic hepatitis c: preventive effect on hepatocarcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1491–6.
- 146 Arase Y, Ikeda K, Suzuki F *et al.* Interferon-induced prolonged biochemical response reduces hepatocarcinogenesis in hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2007; 79: 1485–90.
- 147 Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y *et al.* Efficacy of low-dose intermittent interferon-alpha monotherapy in patients infected with hepatitis C virus genotype 1b who were predicted or failed to respond to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy. *J Med Virol* 2008; 80: 1363–9.
- 148 Imai Y, Kasahara A, Tanaka H *et al.* Interferon therapy for aged patients with chronic hepatitis C: improved survival in patients exhibiting a biochemical response. *J Gastroenterol* 2004; 39: 1069–77.
- 149 Iwasaki Y, Ikeda H, Araki Y *et al.* Limitation of combination therapy of interferon and ribavirin for older patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2006; 43: 54–63.
- 150 Hiramatsu N, Oze T, Tsuda N *et al.* Should aged patients with chronic hepatitis C be treated with interferon and ribavirin combination therapy? *Hepatol Res* 2006; 35: 185–9.
- 151 Davis GL, Wong JB, McHutchison JG, Manns MP, Harvey J, Albrecht J. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 645–52.
- 152 McHutchison JG, Manns M, Patel K *et al.* Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 123: 1061–9.

- 153 Shiffman ML, Ghany MG, Morgan TR *et al.* Impact of reducing peginterferon alfa-2a and ribavirin dose during retreatment in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2007; 132: 103–12.
- 154 Reddy KR, Shiffman ML, Morgan TR *et al.* Impact of ribavirin dose reductions in hepatitis C virus genotype 1 patients completing peginterferon alfa-2a/ribavirin treatment. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 124–9.
- 155 Shiffman ML, Salvatore J, Hubbard S *et al.* Treatment of chronic hepatitis C virus genotype 1 with peginterferon, ribavirin, and epoetin alpha. *Hepatology* 2007; 46: 371–9.
- 156 Oze T *et al.* Pegylated interferon alpha-2b affects early virologic response dose-dependently in patients with chronic hepatitis C genotype 1 during treatment with Peg-IFN alpha-2b plus ribavirin. *J Viral Hepat* 2009; 16: 578–85.
- 157 Hiramatsu N *et al.* Ribavirin dose reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with hepatitis C responding to pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin. *J Viral Hepat* 2009; 16: 586–94.
- 158 Weiland O, Hollamder A, Mattsson L *et al.* Lower-than standard dose peg-IFN alfa-2a for chronic hepatitis C caused by genotype 2 and 3 is sufficient when given in combination with weight-based ribavirin. *J Viral Hepat* 2008; 15: 641–5.
- 159 Inoue Y, Hiramatsu N, Oze T *et al.* Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses. *J Viral Hepat* (in press).
- 160 Omata M, Yoshida H, Toyota J *et al.* A large-scale, multicentre, double-blind trial of ursodeoxycholic acid in patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2007; 56: 1747–53.
- 161 Suzuki H, Ohta Y, Takino T *et al.* Effects of glycyrrhizin on biochemical tests in patients with chronic hepatitis. Double blind trial. *Asian Med J* 1983; 26: 423–38.
- 162 Wildhirt E. Experience in Germany with glycyrrhizic acid for the treatment of chronic viral hepatitis. In: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Tokyo, Springer-Verlag, 1994; 658–61.
- 163 Arase Y, Ikeda K, Murashima N *et al.* The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. *Cancer* 1997; 79: 1494–500.
- 164 Ikeda K, Arase Y, Kobayashi M *et al.* A long-term glycyrrhizin injection therapy reduces hepatocellular carcinogenesis rate in patients with interferon-resistant active chronic hepatitis C: a cohort study of 1249 patients. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 603–9.
- 165 Piperno A, Sampietro M, D’Alba R *et al.* Iron stores, response to alpha-interferon therapy and effects of iron depletion in chronic hepatitis C. *Liver* 1996; 16: 248–54.
- 166 Fong TL, Han SH, Tsai NC *et al.* A pilot randomized, controlled trial of the effect of iron depletion on long-term response to alpha-interferon in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998; 28: 369–74.
- 167 Herrera JL. Iron depletion is not effective in inducing a virologic response in patients with chronic hepatitis C who failed to respond to interferon therapy. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3571–5.
- 168 Fontana RJ, Israel J, LeClair P *et al.* Iron reduction before and during interferon therapy of chronic hepatitis C: results of a multicenter, randomized, controlled trial. *Hepatology* 2000; 31: 730–6.
- 169 Di Bisceglie AM, Bonkovsky HL, Chopra S *et al.* Iron reduction as an adjuvant to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C who previously not responded to interferon: a multicenter, prospective randomized, controlled trial. *Hepatology* 2000; 32: 135–8.
- 170 Yano M, Hayashi H, Yoshioka K *et al.* A significant reduction in serum alanine aminotransferase levels after 3-month iron reduction therapy for chronic hepatitis C: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial in Japan. *J Gastroenterol* 2004; 39: 570–4.
- 171 Marchesini G, Bianchi G, Merli M *et al.* Nutritional supplementation with branched-chain amino acids in advanced cirrhosis: a double-blind, randomized trial. *Gastroenterology* 2003; 124: 1792–801.
- 172 McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC *et al.* Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2009; 360: 1827–38.

## 今月のテーマ ● B型慢性肝炎に対する最新の治療

### 核酸アナログ/IFN sequential 治療の有用性とその限界

榎本 大田 守昭 博<sup>1)</sup> 西口 修平<sup>2)</sup>  
河田 則文<sup>1)</sup>

**要旨:** B型慢性肝炎に対する核酸アナログ治療では中止による肝炎の再燃と長期投与による耐性が問題となる。一方、インターフェロン (IFN) の治療効果も限定的である。Serfatyらは、IFNの前にラミブジンを先行投与するいわゆる sequential 治療の良好な成績を報告した。その後、多くの施設で追試が行われたが、特に genotype Cが多数を占める本邦での成績は芳しくない。一方、若年例、急性増悪例、ラミブジン投与中のウイルスの低下が良好な症例では著効も期待できることが明らかになってきた。今後、エンテカビルや PEG-IFNの使用も含め、sequential 治療の位置づけについて更なる検討が必要である。

**索引用語:** 核酸アナログ, ラミブジン, エンテカビル, インターフェロン, sequential 治療

#### はじめに

B型慢性肝疾患に対して、本邦では3種類の核酸アナログとインターフェロン (IFN) が使用可能である<sup>1)</sup>。核酸アナログのうちではラミブジン、アデフォビル、エンテカビルの順に薬剤耐性変異の出現頻度が高く、核酸アナログ未治療の患者にはエンテカビルが第一選択薬として用いられている。またポリメラーゼ領域のいわゆる YMDDモチーフに変異を有するラミブジン耐性の症例に対しては、ラミブジンとアデフォビルの併用療法が推奨されている。

核酸アナログはB型肝炎ウイルス (HBV) 増殖過程の逆転写を阻害し、またチェーンターミネーターとして DNA 鎖伸長を停止させることにより、直接的な抗ウイルス作用を発揮する。経口薬であるためコンプライアンスが良く、自覚的な

副作用もほとんど認めず、短期的には医療経済的にも優れる。ところが、中止後には高率に再燃がおきるため投与は長期に及び、長期投与による耐性が問題となる<sup>2)~4)</sup>。一方、IFNは抗ウイルス作用以外に免疫調整作用を併せ持ち、効果が得られた場合は投与終了後も持続することが多いが、著効が得られる症例は主に若年者で20~30%に限られる<sup>5)</sup>。

機序の異なる核酸アナログとIFNを併用することは、お互いの短所を補い相乗効果が得られる期待もあり、多くの臨床試験が行われてきた。本項では、そのうち特に sequential 治療について、これまでの国内外の報告を概説する。またわれわれの成績も紹介し、sequential 治療の意義について考えてみたい。

1) 大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学 2) 兵庫医科大学内科 (肝・胆・膵科)  
Sequential therapy with a nucleos(t)ide analogue and interferon in patients with chronic hepatitis B: efficacy and limitations

Masaru ENOMOTO, Akihiro TAMORI<sup>1)</sup>, Shuhei NISHIGUCHI<sup>2)</sup> and Norifumi KAWADA<sup>1)</sup>

1) Department of Hepatology, Osaka City University Graduate School of Medicine, 2) Division of Hepatobiliary and Pancreatic Medicine, Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine

Corresponding author: 榎本 大 (enomoto-m@med.osaka-cu.ac.jp)

Table 1. 核酸アナログとIFNの同時併用の報告

報告者 (報告年)	HBeAg	n (genotype)	年齢	男性 (%)	プロトコール	BR (%)	VR (%)	結論/備考
Mutimer <sup>6)</sup> (1998)	+	20 (N.D.)	39±11*	95	LAM+IFN 12～16週	0	5	
Barbaro <sup>7)</sup> (2001)	+	76 (N.D.)	42 (33～50)†	84	LAM+IFN 24週	37	33	LAM単独よりVR良好
Tatulli <sup>8)</sup> (2001)	-	29 (N.D.)	44 (27～64)†	90	LAM+IFN 52週	14	14	LAM耐性は少ない
Marcellin <sup>9)</sup> (2004)	-	179 (N.D.)	41±11*	82	LAM+PEG 48週	60	44	PEG単独と変わらない
Janssen <sup>10)</sup> (2005)	+	130 (A43/B11/ C18/D52)	34±12*	75	LAM+PEG 48週	35	32	PEG単独と変わらない
Lau <sup>11)</sup> (2005)	+	271 (A18/B82/ C156/D11)	32±10*	77	LAM+PEG 48週	39	28	PEG単独と変わらない

BR: biochemical response, VR: virologic response, LAM: ラミブジン, IFN: インターフェロン, PEG: ペグインターフェロン, N.D.: 記載なし.

\*平均値±標準偏差, †中央値(最小値～最大値).

### I 核酸アナログとIFNの同時併用の成績

まずB型慢性肝炎に対する核酸アナログとIFNの同時併用の報告を表に示す(Table 1). ただし試験によって効果判定の方法が異なり, 対象の年齢, 性別, genotypeなどによっても治療反応性は異なるため, これらの成績の単純な比較は困難である.

Mutimerらの報告は最初のものと思われるが, ここでは安全性を検証する目的もあり併用期間が12～16週と短期であったことから, 著効はほとんど見られなかった<sup>6)</sup>. Barbaroらはランダム化比較試験によって, 24週併用群はラミブジン52週単独群よりウイルス学的効果が良好であることを示した<sup>7)</sup>. ところが本邦では核酸アナログを短期に使用することはほとんどないので, この結論には奇異な印象を受ける. 加えてIFN単独との比較がないので, IFNにラミブジンを併用することの意義は不明であった. また, Tatulliらの報告<sup>8)</sup>のように併用療法による著効率は低いものの, ラミブジン単独と比較して耐性変異の出現は低率であることを示したものがいくつかある.

その後, ペグインターフェロン(PEG-IFN)のランダム化大規模試験によって, IFNにラミブ

ジンを併用する意義は乏しいことが示された. すなわちMarcellinら<sup>9)</sup>の報告はHBe抗原陰性例が, Janssenら<sup>10)</sup>やLauら<sup>11)</sup>の報告はHBe抗原陽性例が対象であるが, いずれの試験においても48週併用群はPEG-IFN 48週単独群と比較して治療中のウイルスの低下が良好であるものの, 最終的な治療効果に差を認めなかった. Marcellinら<sup>9)</sup>やLauら<sup>11)</sup>の報告ではラミブジン48週単独群も設定されているが, PEG-IFN投与はラミブジン併用の有無にかかわらず, ラミブジン短期投与より終了後の治療効果の持続が良好であった. これらはいずれも大規模である上, 世界中で行われた試験であるため, あらゆるgenotypeを対象としており信頼のおける結果といえる. また, Janssenらの報告では, genotype AまたはBはgenotype CまたはDと比較してIFNに対する反応性が良好であることも明確に示された<sup>10)</sup>.

### II 核酸アナログ/IFN sequential 治療: 海外の成績

2001年, フランスのSerfatyらは, ラミブジン/IFN sequential 治療のプロトコールを考案し報告した<sup>12)</sup>(Table 2). 彼らはラミブジンを20週投与した後, 4週間IFNを併用して中止し, その後IFNを24週単独投与した. これにはラミブ

Table 2. 核酸アナログ/IFN sequential 治療の報告 (海外の成績)

報告者 (報告年)	HBeAg	n (genotype)	年齢 (中央値)	男性 (%)	プロトコール	BR (%)	VR (%)	結論/備考
Serfaty <sup>12)</sup> (2001)	+/-	14 (A6/C1/ D4/G3)	40 (30 ~ 57)	100	LAM 20 週→ LAM+IFN 4 週 → IFN 24 週	57	57	
Manesis <sup>15)</sup> (2006)	-	36 (D?)	55 (46 ~ 66)	69	LAM 6 カ月→ LAM+IFN 6 カ月 → IFN 6 カ月	39	22	IFN 単独と変わらない
Shi <sup>16)</sup> (2006)	-	64 (B/C?)	35 (21 ~ 56)	60	LAM 20 週→ LAM+IFN 4 週 → IFN 24 週	53	14	LAM 単独より BR 良好 LAM 耐性は少ない
Vassiliadis <sup>17)</sup> (2007)	-	18 (D?)	42 (19 ~ 63)	83	LAM 3 カ月→ LAM+PEG 3 カ月 → PEG 9 カ月	72	17	LAM 単独より BR 良好 LAM 耐性は少ない
Moucari <sup>18)</sup> (2010)	-	20 (A5/B3/C1/ D9/E2)	44 (41 ~ 52)	85	ADV 20 週→ ADV+PEG 4 週 → PEG 44 週	50	50	

BR: biochemical response, VR: virologic response, LAM: ラミブジン, ADV: アデフォビル, IFN: インターフェロン, PEG: ペグインターフェロン.

ジンにより HBV DNA 量を低下させることにより IFN の効果を増強させる目的と, IFN により ラミブジン中止後の再燃を防ぐ狙いがあると思われる. また基礎研究においても HBV 高ウイルス血症は T 細胞の反応を低下させることや<sup>13)</sup>, ラミブジンによるウイルス量の低下によって T 細胞の反応が回復することが示されている<sup>14)</sup>.

Serfaty らの対象は B 型慢性肝疾患 14 例 (全例男性, 年齢中央値 40 歳, HBe 抗原陽性 11 例/陰性 3 例, genotype A 6 例/C 1 例/D 4 例/G 3 例, 肝硬変 5 例, 全例 IFN 投与歴あり) である. 結果として治療終了 24 週の時点で, 14 例中 8 例 (57%) に ALT 正常化, 14 例中 8 例 (57%) に HBV DNA 陰性化 (DNA プローブ法), 11 例中 5 例 (45%) に HBe 抗原のセロコンバージョン, 14 例中 3 例 (21%) に HBs 抗原のセロコンバージョンを認め, 大きなインパクトを与えた. しかし, 症例数が少ないこと, シングルアームの試験であること, IFN 反応性の良い genotype A の症例が半数近くを占めることが問題として残された.

その後, プロトコールが若干異なるものも含め, 多くの施設で追試が行われた (Table 2). ギリシャの Manesis ら<sup>15)</sup>の対象は HBe 抗原陰性例で, genotype D が多くを占めると思われ, 比較

的高齢の難治の集団である. 結果は芳しいものでなく, 年齢, 性別をマッチさせた IFN 投与コントロール群に対して成績の向上は見られていない. 中国の Shi ら<sup>16)</sup>の報告もギリシャの Vassiliadis ら<sup>17)</sup>の報告も HBe 抗原陰性例が対象で, 前者は genotype B または C が, 後者は genotype D が多くを占めると思われる. いずれの報告もラミブジン単独投与と比較して最終観察時点での ALT 正常化率が高いと結論しているが, この結果は IFN 単独でも得られた可能性がある. またラミブジン単独投与より耐性変異の出現率が低いと述べているが, ラミブジン投与期間が異なることを考えると当然の結果ともいえる.

最近, Moucari らによってアデフォビルを用いた IFN sequential 治療の成績も報告された<sup>18)</sup>. 対象は HBe 抗原陰性例であるが成績は比較的良好で, これはアデフォビルを用いたこと, または PEG-IFN を比較的長期に用いたことによるものかも知れない. ただし症例数が少ないこと, 比較試験でないこと, IFN 反応性が良好な genotype A または B の割合が高いこともあり, 更なる検討が必要である.

### III 核酸アナログ/IFN sequential 治療:

#### 本邦での成績とその位置づけ

Serfaty らの報告<sup>12)</sup>以来, 本邦でも多くの施設

Table 3. 核酸アナログ/IFN sequential 治療の報告 (国内の成績)

報告者 (報告年)	HBeAg	n (genotype)	年齢 (平均)	男性 (%)	プロトコール	BR (%)	VR (%)	結論/備考
Minami <sup>21)</sup> (2007)	+/-	37 (C?)	N.D.	N.D.	LAM 20 週→ LAM+IFN 4 週 → IFN 20 週	46	35	IFN 単独と変わらない
Okuse <sup>23)</sup> (2010)	+/-	12 (C)	32±8	83	LAM 20 週→ LAM+IFN 4 週 → IFN 20 週	92	58	急性増悪例では効果良好
Enomoto <sup>24)</sup> (2007)	+	24 (C)	37±11	88	LAM 16~32 週→ LAM+IFN 4 週 → IFN 20 週	46	29	

BR: biochemical response, VR: virologic response, LAM: ラミブジン, IFN: インターフェロン, N.D.: 記載なし.

で sequential 治療が試みられているが、一般的にその効果は限定的である (Table 3)。これは本邦の B 型慢性肝疾患のほとんどが母子感染例であることや、genotype C が約 85% を占める<sup>19)20)</sup> など、IFN 抵抗性の要因を持った患者が多いためと思われる。

Minami らは多施設の成績をまとめて報告している<sup>21)</sup>。それによると sequential 治療による著効率は、ヒストリカルコントロールにおける IFN 単独療法による著効率より高かったが、有意差は認めていない。ただし、著効例のほとんどはラミブジン投与中に HBe 抗原が陰性化した症例であることを示し、著効が期待できる患者の特徴を明らかにした。この成績は後で述べるわれわれの成績とも合致する。

Minami らの多施設研究の結果を踏まえ、平成 22 年の厚生労働省研究班によるウイルス性肝疾患の治療ガイドライン<sup>22)</sup>では、「IFN・sequential 治療とは、核酸アナログ治療で e 抗原が陰性化した (または陰性症例) 症例で drug free にするため、IFN と核酸アナログを 1 ヶ月間併用しトータル IFN 6 ヶ月使用し治療を中断する治療」と定義している。また、この治療ガイドラインでは sequential 治療を 35 歳未満の HBe 抗原陰性、高ウイルス ( $\geq 7 \log$  copies/mL) 症例に対する第一選択として、また 35 歳以上の HBe 抗原陽性、高ウイルス症例に対するエンテカビルに次ぐ第二選択として位置づけている。前者は症例数の少ないグループでありエビデンスは十分でないが、IFN

単独投与では効果の乏しい集団である。後者はエンテカビル投与が長期に及んだ場合に耐性変異の出現が最も危惧される集団であり、sequential 治療により drug free に持ち込めればメリットは大きいと考えられる。

Okuse らは少数例の検討ではあるが、急性増悪例において sequential 治療の効果が良好であることを報告している<sup>23)</sup>。対象の平均年齢は 32 歳であるが、このように 35 歳未満の比較的若い集団であっても急性増悪の状態では IFN を導入することにリスクをとめない、sequential 治療は有効な手段であると考えられる。また、この報告においてもラミブジン投与中に HBe 抗原陰性化が得られた患者では最終治療効果も良好であった。

#### IV 核酸アナログ/IFN sequential 治療： われわれの成績

われわれも 2002 年以来、Serfaty らのグループに準じたプロトコールでラミブジン/IFN sequential 治療を行い、2007 年にその成績を報告した<sup>24)</sup>。対象は HBe 抗原陽性 B 型慢性肝炎 24 例 (全例 genotype C) である。ラミブジンを約 6 カ月投与した後、1 カ月 IFN を併用して中止し、その後 IFN を 5 カ月間単独投与したところ、治療終了 6 カ月に HBe 抗原陰性化かつ HBV DNA  $< 4.0 \log$  copies/mL への低下を示したのは、7 例 (29%) であった。

2006 年 9 月にエンテカビルが承認されてからは、エンテカビルを約 12 カ月投与した後、1 カ

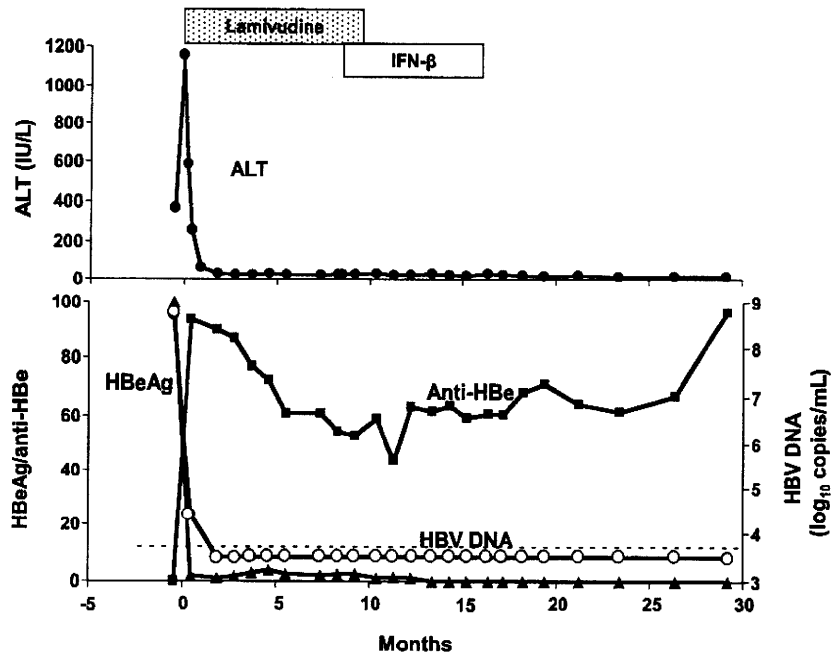


Figure 1. 症例1 (26歳男性, HBe抗原陽性, genotype C, プレコア野生型, コアプロモーター変異型, 肝組織A3F3)の臨床経過. 急性増悪の時期にラミブジン/IFN sequential治療を導入したところ, HBe抗原セロコンバージョンが得られ, 現在に至るまで経過良好である.

月 IFN を併用して中止し, その後 IFN を 5 カ月 単独投与するプロトコールに変更した<sup>25)</sup>. エンテカピルの投与期間をラミブジンより長期に設定した理由は, (1) ラミブジンは 6 カ月以上単独投与すると耐性変異の出現が危惧されたが, エンテカピルは少なくとも 2 年以内は耐性が生じないことが当初からわかっていたからと, (2) ラミブジン/IFN sequential 治療ではラミブジン投与中の HBe 抗原, HBV DNA の低下が良好な症例, すなわち IFN 開始時のウイルス量が低値の症例ほど最終的な治療効果が良かったからである.

現在まで sequential 治療を行った HBe 抗原陽性 B 型慢性肝炎 40 例 (男性 37 例, 38 ± 10 歳, genotype C 35 例, ラミブジン使用 28 例/エンテカピル使用 12 例) について解析を行った. 効果判定については, ALT 正常化かつ HBe 抗原陰性化かつ HBV DNA < 4.0 log copies/mL を著効とした. 核酸アナログ終了時, ラミブジン群で 28 例中 13 例 (46%), エンテカピル群で 12 例中 10 例

(83%) に HBV DNA 陰性化 (< 2.6 log copies/mL) が得られた (p = 0.041). 核酸アナログ投与中に耐性ウイルスの出現は認めず, 核酸アナログ中止後の急性増悪が 37 例中 5 例 (14%) に見られたが, 黄疸や肝不全をきたしたものはなかった. 治療終了 6 カ月の著効はラミブジン群 28 例中 9 例 (32%), エンテカピル群 9 例中 2 例 (22%) であり, 最終的な治療効果について差を認めていない. そこでラミブジン群とエンテカピル群をまとめて解析すると, 著効持続 11 例は 31 ± 8 歳と有意に若く (p = 0.0075), 核酸アナログ投与中の HBe 抗原陰性化率が 11 例中 7 例 (64%) と有意に高く (p = 0.028), IFN 開始時の HBV DNA が 3.0 ± 0.5 log copies/mL と有意に低く (p = 0.015), 治療終了 3 ~ 12 カ月後の HB コア関連抗原の低下が -1.7 log U/mL と有意に良好であった (p = 0.0006).

症例を 2 例呈示する. 症例 1 (Figure 1) は 26 歳男性, HBe 抗原陽性, genotype C, プレコア

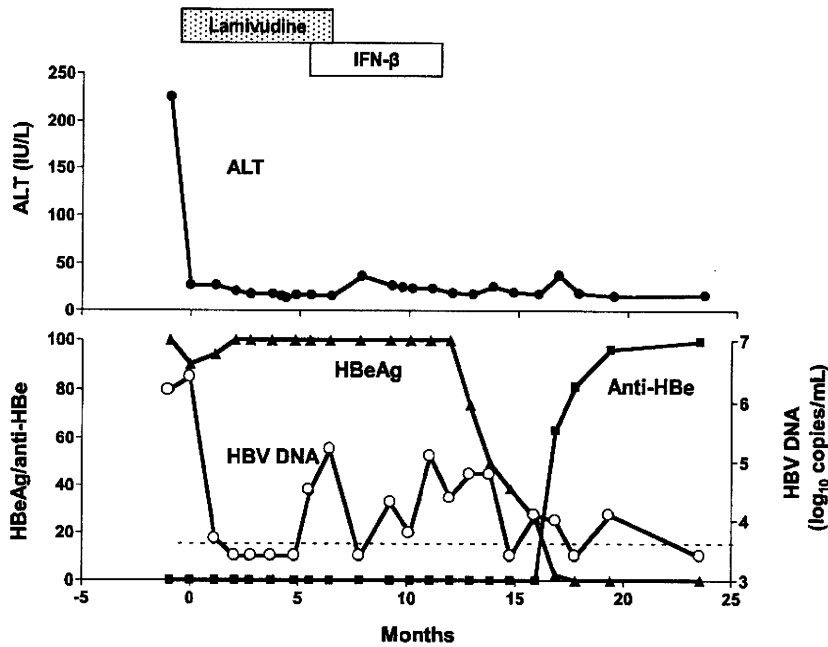


Figure 2. 症例2 (30歳男性, HBe抗原陽性, genotype C, プレコア野生型, コアプロモーター混合型)の臨床経過. ラミブジン/IFN sequential治療後にHBe抗原セロコンバージョンが得られ, 現在まで drug free を維持している.

野生型, コアプロモーター変異型, 肝組織は A3F3 であった. ALT が 1158 IU/L と著明に上昇した急性増悪の時期にラミブジンを導入したところ, ALT は速やかに低下し重症化せず, HBe 抗原のセロコンバージョンも得られた. その効果は IFN に切り替え治療中止後も持続し, drug free に持ち込めた. 症例2 (Figure 2) は30歳男性, HBe 抗原陽性, genotype C, プレコア野生型, コアプロモーター混合型であった. ラミブジン開始後, ALT と HBV DNA が順調に低下したが, 治療中に HBe 抗原の低下は見られなかった. ところが治療後にセロコンバージョンが得られ, 現在まで drug free を維持している.

結論として, (1) sequential 治療により 30% に著効持続が得られた. エンテカビル群では投与中の HBV DNA 陰性化率が有意に高かったが, 今のところラミブジン群に対して長期成績の向上を認めていない, (2) 若年で核酸アナログによるウイルス学的効果が得られた症例では, sequential 治療により長期の寛解も期待できる, (3) 核

酸アナログによるウイルス学的効果が不良の症例でも, 比較的 safely に核酸アナログを中止することができた.

#### おわりに

核酸アナログ/IFN sequential 治療には, 大きく 2 通りの目的が考えられる. まず, (1) 核酸アナログの中止を目的とするものが挙げられる. 核酸アナログで HBe 抗原が陰性化した (または陰性) 症例では, 治療ガイドライン<sup>22)</sup> に準拠して sequential 治療を考慮する. ところが核酸アナログ導入例は, 35 歳以上の IFN 反応性の不良例や肝線維化進行例が多く, 実際には HBV DNA の持続的陰性化を目指し核酸アナログを継続することが多い. 一方, 症例2のように核酸アナログで HBe 抗原陰性化が得られなくても IFN により著効が得られるものも存在し, 若年で核酸アナログを導入した症例では HBe 抗原の有無にかかわらず sequential 治療を考慮して良いと考える. 次に, (2) IFN の効果増強を目的とするものが挙げられる. 35 歳未満で過去の IFN 単独療法に反



応しなかった症例や、35歳以上でもIFN投与歴のない症例にはsequential治療を考慮して良いと考える。これ以外に、(3)35歳未満の若年であるがIFN導入が困難な場合も、sequential治療の適応となり得る。すなわち症例1のような急性増悪例はsequential治療の良い適応と考える。また、肝線維化進行例でIFN導入が困難な場合でも、核酸アナログ投与中に血小板数などの改善が得られればsequential治療を考慮して良いと考える。

本邦におけるB型慢性肝炎に対するIFNの保険適用は、HBe抗原陽性例に対して24週投与に限られている。現在、PEG-IFNの治験が進行中であるが、近い将来、諸外国と同様にPEG-IFN 48週投与が承認されれば治療成績の向上が期待される。今後、エンテカビルとPEG-IFN 48週投与の組み合わせによるsequential治療の有効性についても検討が必要である。

謝辞：稿を終えるにあたり、神戸朝日病院の金守良先生をはじめ共同研究施設の先生方に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 溝上雅史, 田中榮司, 茶山一彰, 他: 日本肝臓学会コンセンサス神戸2009: B型肝炎の診断と治療. 肝臓 51; 243-260: 2010
- 2) Lok AS, McMahon BJ: Chronic hepatitis B: update 2009. Hepatology 50; 661-662: 2009
- 3) European Association For The Study Of The Liver: EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. J Hepatol 50; 227-242: 2009
- 4) Liaw YF, Leung N, Kao JH, et al: Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. Hepatol Int 2; 263-283: 2008
- 5) Suzuki F, Arase Y, Akuta N, et al: Efficacy of 6-month interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection in Japan. J Gastroenterol 39; 969-974: 2004
- 6) Mutimer D, Naoumov N, Honkoop P, et al: Combination alpha-interferon and lamivudine therapy for alpha-interferon-resistant chronic hepatitis B infection: results of a pilot study. J Hepatol 28; 923-929: 1998
- 7) Barbaro G, Zechini F, Pellicelli AM, et al: Long-term efficacy of interferon alpha-2b and lamivudine in combination compared to lamivudine monotherapy in patients with chronic hepatitis B. An Italian multicenter, randomized trial. J Hepatol 35; 406-411: 2001
- 8) Tatulli I, Francavilla R, Rizzo GL, et al: Lamivudine and alpha-interferon in combination long term for precore mutant chronic hepatitis B. J Hepatol 35; 805-810: 2001
- 9) Marcellin P, Lau GK, Bonino F, et al: Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. N Engl J Med 351; 1206-1217: 2004
- 10) Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, et al: Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. Lancet 365; 123-129: 2005
- 11) Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, et al: Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. N Engl J Med 352; 2682-2695: 2005
- 12) Serfaty L, Thabut D, Zoulim F, et al: Sequential treatment with lamivudine and interferon monotherapies in patients with chronic hepatitis B not responding to interferon alone: results of a pilot study. Hepatology 34; 573-577: 2001
- 13) Chisari FV, Ferrari C: Hepatitis B virus immunopathogenesis. Annu Rev Immunol 13; 29-60: 1995
- 14) Boni C, Bertoletti A, Penna A, et al: Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B. J Clin Invest 102; 968-975: 1998
- 15) Manesis EK, Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ: A partially overlapping treatment course with lamivudine and interferon in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. Aliment Pharmacol Ther 23; 99-106: 2006
- 16) Shi M, Wang RS, Zhang H, et al: Sequential treatment with lamivudine and interferon-alpha monotherapies in hepatitis B e antigen-negative Chinese patients and its suppression of lamivudine-resistant mutations. J Antimicrob Chemother 58; 1031-1035: 2006
- 17) Vassiliadis T, Tziomalos K, Patsiaoura K, et al: Lamivudine/pegylated interferon alfa-2b sequential combination therapy compared with lamivudine monotherapy in HBeAg-negative chronic hepatitis B. J Gastroenterol Hepatol 22; 1582-1588: 2007
- 18) Moucari R, Boyer N, Ripault MP, et al: Sequential

- therapy with adefovir dipivoxil and pegylated Interferon Alfa-2a for HBeAg-negative patients. *J Viral Hepat* 2010[Epub ahead of print]
- 19) Orito E, Ichida T, Sakugawa H, et al: Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 34; 590-594: 2001
- 20) Enomoto M, Tamori A, Nishiguchi S: Hepatitis B virus genotypes and response to antiviral therapy. *Clin Lab* 52; 43-47: 2006
- 21) Minami M, Okanoue T: Management of HBV infection in Japan. *Hepatol Res* 37; S79-S82: 2007
- 22) 熊田博光: 肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究. 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)平成21年度総括研究報告書, 1-15: 2010
- 23) Okuse C, Yotsuyanagi H, Yamada N, et al: Effect of nucleoside analog-interferon sequential therapy on patients with acute exacerbation of chronic hepatitis B. *Hepatol Res* 40; 461-469: 2010
- 24) Enomoto M, Tamori A, Kohmoto MT, et al: Lamivudine and IFN-beta sequential therapy in HBe antigen-positive patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection. *J Interferon Cytokine Res* 27; 201-207: 2007
- 25) Enomoto M, Tamori A, Kobayashi S, et al: Sequential therapy with nucleoside analogues and interferon for Japanese patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gut* 59 (suppl III); A43: 2010

(論文受領, 平成22年11月5日)  
受理, 平成22年11月12日)

## &lt;短 報&gt;

## 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

榎本 大<sup>1)</sup> 根来 伸夫<sup>2)</sup> 藤井 英樹<sup>1)</sup> 小林佐和子<sup>1)</sup>  
 岩井 秀司<sup>1)</sup> 森川 浩安<sup>1)</sup> 田守 昭博<sup>1)</sup> 坂口 浩樹<sup>1)</sup>  
 羽生 大記<sup>3)</sup> 塩見 進<sup>4)</sup> 河田 則文<sup>1)\*</sup>

はじめに：クリオグロブリンとは、低温にて可逆性の沈殿を生じる異常な免疫グロブリン分子および免疫複合体である。クリオグロブリンが血液中に異常に増加した状態のうち、原因不明のものを本態性、血液疾患・肝疾患・感染症などによるものを続発性クリオグロブリン血症という。続発性クリオグロブリン血症の原因としてC型肝炎ウイルス感染が重要であるが、B型肝炎ウイルス (HBV) によるものの報告も散見される。我々は以前にエンテカビルが著効した HBV 関連クリオグロブリン血管炎の一例を報告した<sup>1)</sup>。また HBV 関連クリオグロブリン血症の発症に、抗リン脂質抗体の一種である抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体 (anti-PS/PT) が関与するという報告がある<sup>2)</sup>。

今回、我々は以前報告した HBV 関連クリオグロブリン血管炎症例において、エンテカビル投与中の anti-PS/PT 抗体価の変化を検討した。また他の HBV 感染者 20 例においても anti-PS/PT を測定し、陽性者と陰性者の臨床背景を比較した。

対象と方法：対象 1) 57 歳、女性。血栓症の既往なし。両下肢に腫脹と紫斑を認めたため皮膚科を受診した。血清クリオグロブリン陽性で、皮膚生検でも白血球破碎性血管炎と、病理学的にクリオグロブリン血管炎に矛盾しない結果であった。AST 143 IU/L, ALT

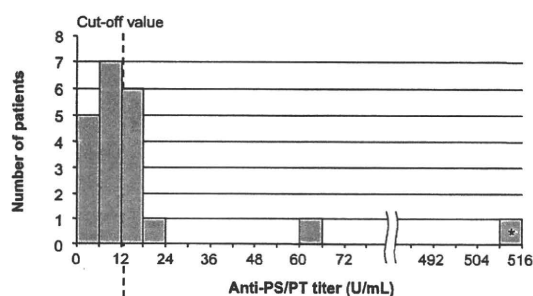


Fig. 1 The titer of antiphosphatidylserine-prothrombin complex antibody (anti-PS/PT) in patients with chronic hepatitis B. The antibody was detected above the cutoff level (12 U/mL) in 8 (40%) of 20 patients without extrahepatic manifestations, although the titers were low. In the 57-year-old woman with HBV-associated cryoglobulinemic vasculitis (\*), the anti-PS/PT level was very high (510 U/mL).

119 IU/L,  $\gamma$ -GTP 27 IU/L, 総ビリルビン 1.7 mg/dL, アルブミン 3.2 g/dL, クレアチニン 0.50 mg/dL, 血小板 6.3 万/ $\mu$ L, HBs 抗原陽性, HBe 抗原陰性, HBe 抗体陽性, HBV DNA 6.4 log<sub>10</sub> copies, HBV genotype B, プレコア変異型, コアプロモーター野生型, HCV 抗体陰性, 抗好中球細胞質抗体陰性, ループス抗凝固因子陰性, 抗カルジオリピン・ $\beta$ 2 グリコプロテイン I 複合体抗体陰性。肝生検では慢性活動性肝炎 (A2F3) であった。

対象 2) 肝外病変を認めない B 型慢性肝疾患 20 例 (男性 16 例/女性 4 例, 50 $\pm$ 13 歳, HBV genotype B 2 例/C 18 例)。anti-PS/PT は保存血清において、ELISA 法 (MBL) により測定した (基準値：<12 U/mL)。

1) 大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学

2) 大阪市立大学大学院医学研究科腎臓病態内科学

3) 大阪市立大学大学院生活科学研究科栄養医学

4) 大阪市立大学大学院医学研究科核医学

\*Corresponding author: kawadanori@med.osaka-cu.ac.jp

<受付日2010年5月23日><採択日2010年6月30日>

**Table 1** Characteristics of patients having chronic hepatitis B with and without anti-PS/PT

	Anti-PS/PT-positive (n=9)	Anti-PS/PT-negative (n=12)	P value
Age (years)	49 ± 11	51 ± 15	0.78
Male gender (%)	8 (89%)	7 (58%)	0.18
ALT (IU/L)	111 (35-215)	115 (77-186)	0.57
Platelet ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	155 ± 71	157 ± 52	0.76
HBeAg-positive (%)	4 (44%)	6 (50%)	0.99
HBV-DNA ( $\log_{10}$ copies/mL)	6.5 ± 1.9	6.9 ± 1.1	0.78
HBV genotype (B/C)	1/8	2/10	0.99
Grade (A1/A2/A3)	1/6/1	7/4/0	0.062
Stage (F1/F2/F3/F4)	2/3/2/1	6/3/2/1	0.74

Anti-PS/PT, antiphosphatidylserine-prothrombin complex antibody

結果：対象1) に対してエンテカビルを投与したところ HBV DNA は6週目に陰性 ( $< 2.6 \log_{10}$  copies) となり、ALT は12週目に正常化が得られた。anti-PS/PT は治療8週前 390 U/mL, 治療直前 510 U/mL と異常高値であったが、治療開始8週目に 180 U/mL, 24週目に 69 U/mL まで低下した。クリオグロブリンも20週目に陰性化し、それに伴って紫斑も徐々に消失した。

対象2) では8例(40%)にanti-PS/PT陽性であったが、いずれも軽度の上昇(12~60 U/mL)であった(Fig. 1)。またanti-PS/PT陽性例と陰性例の間に臨床的な差異を認めなかった(Table 1)。

考察：抗リン脂質抗体症候群は、抗リン脂質抗体の出現によって動脈血栓症、習慣流産・胎児死亡などを来す自己免疫疾患であるが、関連自己抗体としてループス抗凝固因子と抗カルジオリピン抗体が想定されている。前者の責任抗体は、ホスファチジルセリンの存在下でプロトロンビンに結合するanti-PS/PTであることが示唆されており、anti-PS/PT陽性者の95%においてはループス抗凝固因子も陽性である<sup>3)</sup>。2006年に改訂された抗リン脂質抗体症候群の分類基準において、anti-PS/PTの採用は見送られたが、国際血栓止血学会のコンセンサス・ステートメントでは、その有用性や将来性が認められている<sup>3)</sup>。KawakamiらはHBV関連クリオグロブリン血管炎の一例において、血清を冷却して沈殿させたクリオグロブリン分画に、anti-PS/PT抗体が非常に高力価で検出されたことを報告した<sup>2)</sup>。彼らは、HBV感染による肝細胞傷害により細胞膜成分であるホスファチジルセリンが血中に露出し、これがanti-PS/PTの産生を惹起しクリオグロブリンの形成に関与

したと考察している。また、抗カルジオリピン抗体はHBV感染者の14~20%、C型肝炎感染者の21~44%に検出されるが、一般に低力価であり臨床的な意義は乏しいと考えられている<sup>4)5)</sup>。

我々の検討で、anti-PS/PTも肝外病変を認めないHBV感染者の40%と比較的高頻度に検出されたが、多くは低力価であった。一方、HBV関連クリオグロブリン血管炎の一例においてはanti-PS/PTが高力価で検出され、エンテカビル投与中にクリオグロブリンの陰性化、紫斑の消失とともに、その抗体価は低下した。Kawakamiらの報告<sup>2)</sup>と併せると、HBV関連クリオグロブリン血症の成立にanti-PS/PTが関与している可能性が考えられ興味深い。

索引用語：クリオグロブリン、  
抗ホスファチジルセリン・  
プロトロンビン複合体抗体、  
B型肝炎

文献：1) Enomoto M, Nakanishi T, Ishii M, et al. Ann Intern Med 2008; 149: 912—913 2) Kawakami T, Ooka S, Mizoguchi M, et al. Ann Intern Med 2008; 149: 911—912 3) Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. J Thromb Haemost 2006; 4: 295—306 4) Sthoeger ZM, Fogel M, Smirov A, et al. Ann Rheum Dis 2000; 59: 483—486 5) Zachou K, Liaskos C, Christodoulou DK, et al. Eur J Clin Invest 2003; 33: 161—168

## 英文要旨

Hepatitis B-Associated Cryoglobulinemia  
and Antiphospholipid Antibodies

Masaru Enomoto<sup>1)</sup>, Nobuo Negoro<sup>2)</sup>,  
Hideki Fujii<sup>1)</sup>, Sawako Kobayashi<sup>1)</sup>,  
Shuji Iwai<sup>1)</sup>, Hiroyasu Morikawa<sup>1)</sup>,  
Akihiro Tamori<sup>1)</sup>, Hiroki Sakaguchi<sup>1)</sup>,  
Daiki Habu<sup>3)</sup>, Susumu Shiomi<sup>4)</sup>,  
Norifumi Kawada<sup>1)\*</sup>

A 57-year-old woman presented with a purpuric rash. Cryoglobulins were detected, and a skin biopsy showed leukocytoclastic vasculitis. The alanine aminotransferase level was 119 IU/L, and the platelet count 63,000/mm<sup>3</sup>. The hepatitis B virus (HBV) DNA was 6.4 log<sub>10</sub> copies/mL and became negative by week 6 of entecavir therapy. The antiphosphatidylserine-prothrombin complex antibody (anti-PS/PT) was 390-510 U/mL, and decreased to 69 U/mL at week 24, after cryoglobulin had become negative and the rash resolved. Among 20 HBV-infected patients without extrahepatic manifestations, low titers of anti-PS/PT

were detected in 8 (40%). Clinical characteristics were similar in patients with or without anti-PS/PT. Low titers of anti-PS/PT in chronic hepatitis B have little clinical significance, whereas high titers may promote cryoprecipitate formation.

**Key words:** cryoglobulin,  
antiphosphatidylserine-prothrombin  
complex antibody,  
hepatitis B

Kanzo 2010; 51: 454—456

- 1) Department of Hepatology, Osaka City University Graduate School of Medicine
- 2) Department of Clinical Immunology, Osaka City University Graduate School of Medicine
- 3) Department of Medical Nutrition, Osaka City University Graduate School of Life Science
- 4) Department of Nuclear Medicine, Osaka City University Graduate School of Medicine

\*Corresponding author: kawadanori@med.osaka-cu.ac.jp

## IL-1 $\beta$ とその内在性アンタゴニストIL-1Raの バランスから考えるI型インターフェロンの作用の違い

The difference between Type I Interferons in the balance of IL-1beta and IL-1Ra

東レ株式会社  
医薬研究所  
木綿しのぶ・鈴木 知比古

Key words  
Interferon,  
depression IL-1 beta,  
IL-1 receptor antagonist

### 要 約

C型慢性肝炎のインターフェロン (IFN) 治療では、抑うつ等の精神神経症状が治療中断に至る副作用として問題となることがある。IFN投与による精神神経症状の発現頻度はIFN- $\alpha$ とIFN- $\beta$ で異なることが臨床的報告により示唆されているものの、その違いを説明する詳細なメカニズムは明らかにされていない。炎症性サイトカインが精神神経症状の発現に関与することが報告されていることから、我々はIL-1 $\beta$ に着目し、その内因性アンタゴニストであるIL-1レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) との発現バランス (IL-1 $\beta$ /IL-1Raバランス) に対するIFN- $\alpha$ およびIFN- $\beta$ の影響を比較検討した。その結果、IFN- $\beta$ は末梢血細胞と中枢由来細胞株のいずれにおいてもIL-1 $\beta$ /IL-1RaのバランスをIL-1Ra側 (抗炎症) にシフトさせ、その程度はIFN- $\alpha$ よりも強いことが示された。I型IFNsの精神神経症状発現頻度の違いを考察可能な一つのメカニズムであると考えられた。

### はじめに

C型慢性肝炎のIFN治療では、抑うつや不眠等の精神神経症状が治療中断に至る副作用として問題となることがあるが、その発現頻度はIFN- $\alpha$ とIFN- $\beta$ で異なることが臨床報告により示唆されている<sup>1)</sup>。精神神経症状とサイトカインとの関連についてはこれまでに多くの報告があり<sup>2), 3), 4), 5)</sup>、最近では、C型慢性肝炎患者 (IFN未治療) のうつ症状が血中IL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ 濃度と相関することが報告された<sup>6)</sup>。また、ラットへのIFN- $\alpha$ 持続静注により、海馬歯状回 (DG) のIL-1 $\beta$ たん白発現が増加し、海馬の神経新生を阻害することも報告されてい

### 略記号

IFN	: Interferon
IL-1 $\beta$	: Interleukin-1 $\beta$
IL-1R	: Interleukin-1 receptor
IL-1Ra	: Interleukin-1 receptor antagonist
TNF- $\alpha$	: tumor necrosis factor-alpha

る<sup>7)</sup>。近年、ストレスによる海馬の神経新生阻害がうつ等の発症に関与する可能性があることはよく報告されているところである<sup>8)</sup>。一方、I型IFNsによるIL-1レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) の発現増加に関しても古くから報告があり、IFN- $\beta$ による多発性硬化症治療における作用機序として、IL-1Raの増加を示唆する報告もある<sup>9)</sup>。IL-1Raは、IL-1レセプター (IL-1R) 結合においてIL-1 $\beta$ と競合することによりIL-1 $\beta$ 拮抗作用を示すIL-1 $\beta$ の内在性アンタゴニストである。これまでに、IL-1 $\beta$ とIL-1Raのバランスが崩れ、IL-1RaがIL-1 $\beta$ に比して不足することが炎症性疾患を惹起する (増悪させる) という説が提唱されており、例えば、炎症性腸疾患患者の大腸生検からのex vivo実験や、ライム関節炎患者の関節液を用いた実験により、その症状とIL-1 $\beta$ とIL-1Raのバランスが相関することが報告されている<sup>10), 11)</sup>。そこで、IL-1 $\beta$ の発現増加がひとつの要因であると考えられる精神神経症状の発現に、末梢および (または) 中枢におけるIL-1 $\beta$ とIL-1Raのバランスが関与するという仮説をもとに、I型IFNsによるIL-1 $\beta$ /IL-1Raバランスへの影響をヒ

Momen Shinobu, Tomohiko Suzuki : Toray Industries, Inc. Pharmaceutical Research Laboratory  
〒248-8555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10-1  
TEL:0467-32-2111 FAX:0467-32-2135

表 IL-1 $\beta$ /IL-1Ra バランスにおける I 型 IFNs 単独または IL-1 $\beta$  共処置の影響

	細胞名	IFN type	IFN 単独		IFN+IL-1 $\beta$				
			IL-1Ra 遺伝子 発現変化(a) (無処置群と比較)		IL-1Ra 遺伝子 発現変化(a) (IL-1 $\beta$ 単独処置群と比較)		IL-1 $\beta$ 遺伝子 発現変化(b) (IL-1 $\beta$ 単独処置群と比較)	(a)/(b)	
末梢血由来細胞(株)	THP-1	$\beta$	↑	7.1 倍	↑	7.3 倍	↓	0.4 倍	-
		$\alpha$	↑	3.2 倍	↑	2.5 倍	↓	0.5 倍	-
	PBMC	$\beta$	↑	115 倍	↑	52 倍	↓	0.02 倍	-
		$\alpha$	↑	52 倍	↑	27 倍	↓	0.03 倍	-
グリオーマ細胞株	U-251 MG	$\beta$	↑	4.5 倍	↑	23 倍	↑	2.1 倍	11
		$\alpha$	↑	3.3 倍	↑	6.8 倍	↑	2.0 倍	3.4
	A-172	$\beta$	↑	14 倍	↑	41 倍	↑	15 倍	2.7
		$\alpha$	↑	8.7 倍	↑	14 倍	↑	13 倍	1.1

THP-1は100 U/mL、その他は1000 U/mLの天然型IFN- $\beta$ または天然型IFN- $\alpha$ にて12時間処置し、IL-1 $\beta$ の共処置は10ng/mLにてIFNと同時にを行った。定法によりtotal RNAを抽出し、逆転写によりcDNAを作製し、IL-1RaおよびIL-1 $\beta$ 遺伝子発現レベルをリアルタイムPCR法により解析した。解析にはハウスキーピング遺伝子(GAPDH)の発現量により目的遺伝子の発現量を標準化し、相対定量する $\Delta$ Ct法を用いた。IFN単独処置群は未処置群を、IL-1 $\beta$ との共処置群はIL-1 $\beta$ 単独処置群を対象群として発現変化を算出した。さらにIL-1 $\beta$ とIL-1Ra遺伝子の発現バランスを考察するため、IL-1 $\beta$ 共処置群に関してはさらに各遺伝子の発現変化の比を算出した。

ト末梢血細胞およびヒト神経膠(芽)腫細胞株(グリオーマ細胞株)を用いて検討した。また、C型慢性肝炎罹患状態は炎症状態にあるととらえ、炎症性サイトカインの一つであるIL-1 $\beta$ 共処置時のIFNの影響についても検討した。

### 1. IL-1 $\beta$ /IL-1Ra バランスにおける IFN 単独または IL-1 $\beta$ 共処置の影響 (表)

これまで I 型 IFNs による IL-1Ra 産生の検討によく用いられてきた THP-1 細胞<sup>12)</sup>および PBMC<sup>13)</sup>を末梢血由来細胞として、また先述の IFN- $\alpha$  による中枢での IL-1 $\beta$  産生細胞がアストログリアであるとされていたこと<sup>7)</sup>、ヒト中枢での IFN による IL-1Ra 産生細胞はミクログリアであるとの報告があることから<sup>14)</sup>、ヒトグリオーマ細胞株である U-251 MG 細胞および A-172 細胞を中枢由来の細胞として用いた。各細胞における I 型 IFNs 単独または IL-1 $\beta$  共処置による IL-1 $\beta$  および IL-1Ra 遺伝子発現変化をリアルタイム PCR 法にて解析し、それぞれの対象群に対する発現変化を表に示した。IFN- $\alpha$  または IFN- $\beta$  の単独あるいは IL-1 $\beta$  共処置により、IL-1Ra 遺伝子の発現は増加し、その程度はいずれの細胞においても IFN- $\alpha$  より IFN- $\beta$  の方が大きかった。なお、この IL-1Ra 遺伝子発現変化は IFN の濃度依存的であった(データ非提示)。興味深いことに、U-251 MG および A-172 細胞では、IFN 単独に比べて IL-1 $\beta$  存在

下において、より IL-1Ra 遺伝子の発現増加が増強される傾向が認められ、さらにその増強の程度は IFN- $\beta$  によってそれぞれ 5 倍および 3 倍、IFN- $\alpha$  によってそれぞれ約 2 倍と、IFN- $\beta$  の方が大きかった。すなわち、I 型 IFNs、特に IFN- $\beta$  は特定の細胞では炎症下でより抗炎症作用を発揮する可能性が考えられた。

一方、IL-1 $\beta$  処置により autocrine に増加した IL-1 $\beta$  遺伝子発現は(データ非提示)、IFN 処置により末梢血由来細胞では抑制され、グリオーマ細胞では増加した。そこで IL-1 $\beta$  と IL-1Ra 遺伝子の発現バランスを考察するため、グリオーマ細胞における IL-1 $\beta$  共処置時の各遺伝子の発現変化の比を算出したところ、IFN- $\alpha$  も IFN- $\beta$  も IL-1Ra 遺伝子の発現増加の方が IL-1 $\beta$  の発現増加より優っていた。更にその比は IFN- $\beta$  処置の方が大きかったため、IFN- $\beta$  は IFN- $\alpha$  よりも IL-1 $\beta$ /IL-1Ra バランスを IL-1Ra 側(抗炎症)に傾ける作用が強いことが推察された。

### 2. I 型 IFNs による IL-1 $\beta$ および IL-1Ra 遺伝子発現の経時的変化と IL-1Ra たん白産生レベル (図 1)

血球由来細胞を用いて、IL-1 $\beta$  存在下における I 型 IFNs による IL-1 $\beta$  および IL-1Ra 遺伝子発現変化の経時的変化を検討した。THP-1 細胞において、IFN- $\beta$  および IFN- $\alpha$  による IL-1Ra 遺伝子発現増加

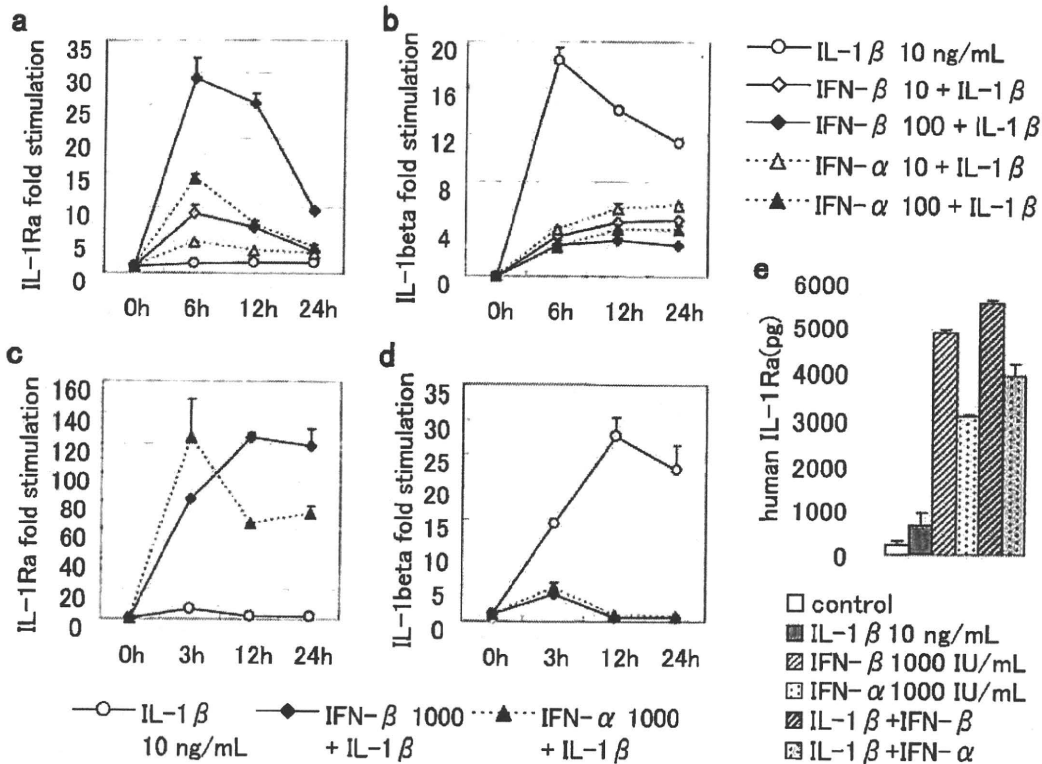


図1 I型IFNsによるIL-1 $\beta$ およびIL-1Ra遺伝子発現の経時的変化とIL-1Raたん白産生レベル  
 THP-1細胞 (a, b) およびヒトPBMC (c, d, e) は $1.5 \times 10^6$  cells/mLにて播種し, THP-1細胞は10または100 U/mL, PBMCは1000 U/mLの天然型IFN- $\beta$ または天然型IFN- $\alpha$ にて所定時間処置した。IL-1 $\beta$ の共処置は10ng/mLにてIFNと同時にを行った。遺伝子発現レベルはリアルタイムPCR法にて解析し, 各ポイントの無処置群の $\Delta$ Ct値に対する発現比で示した (a, b, c, d)。a, b:THP-1細胞におけるIL-1RaおよびIL-1 $\beta$ 遺伝子発現の経時変化, c, d:PBMCにおけるIL-1RaおよびIL-1 $\beta$ 遺伝子発現の経時変化, e:24時間処置したPBMCの培養上清中IL-1Raたん白濃度をELISAにて測定。

は6時間でもっとも高く, 発現の程度はいずれの測定ポイントでもIFN- $\alpha$ よりIFN- $\beta$ の方が強かった。また, 6時間後と比べ, 12時間後のIL-1Ra 遺伝子発現レベルはIFN- $\beta$ よりもIFN- $\alpha$ の方が顕著に低下していた (図1a)。IL-1 $\beta$ 処置によるIL-1 $\beta$  遺伝子発現は処置後6時間でもっとも高く, IFN- $\beta$ およびIFN- $\alpha$ は濃度依存的にその発現を抑制する傾向を示した (図1b)。ヒトPBMCにおいては, IFN- $\beta$ によるIL-1Ra 遺伝子発現増加は24時間まで低下せず, IFN- $\alpha$ では3時間をピークに低下した (図1c)。そのため, 12時間以降のIL-1Ra 遺伝子発現はIFN- $\alpha$ よりもIFN- $\beta$ の方が高かった。また24時間処置後の培養上清中IL-1Raたん白濃度は, IFN単独およびIL-1 $\beta$ 存在下ともにIFN- $\alpha$ よりもIFN- $\beta$ の方が高く, 遺伝子発現の結果と相関していた (図1e)。一方, IL-1 $\beta$ 処置によるIL-1 $\beta$  遺伝子の発現増加は処置後12時間でもっとも高く, IFN- $\beta$ およびIFN- $\alpha$ は12時間後以降その発現を完全に抑制した (図

1d)。これらのことから, IL-1Ra遺伝子発現レベルにおけるIFN- $\beta$ とIFN- $\alpha$ の違いには, その発現強度だけでなく, 発現亢進の持続性も関与すると考えられる。

#### おわりに

今回得られた結果をもとに, 炎症時 (IL-1 $\beta$ 存在下) におけるIL-1 $\beta$ /IL-1Ra発現バランスにI型IFNが与える影響を推定図として示した (図2)。末梢 (血球由来細胞) では, IL-1 $\beta$ 過多により炎症へとバランスが傾くが, I型IFNsはIL-1 $\beta$ の産生を抑制し, さらに内在性アンタゴニストであるIL-1Raの産生を亢進することによって抗炎症作用を示すと考えられる。また, 中枢 (グリオーマ細胞株) では, I型IFNsはいずれもIL-1 $\beta$ の産生を増加させるが, IL-1 $\beta$ 存在下でより増強されるIL-1Raの産生亢進によって, 同じく抗炎症作用を発揮することが考えられる。精神神経症状とサイトカインレベルの相関に



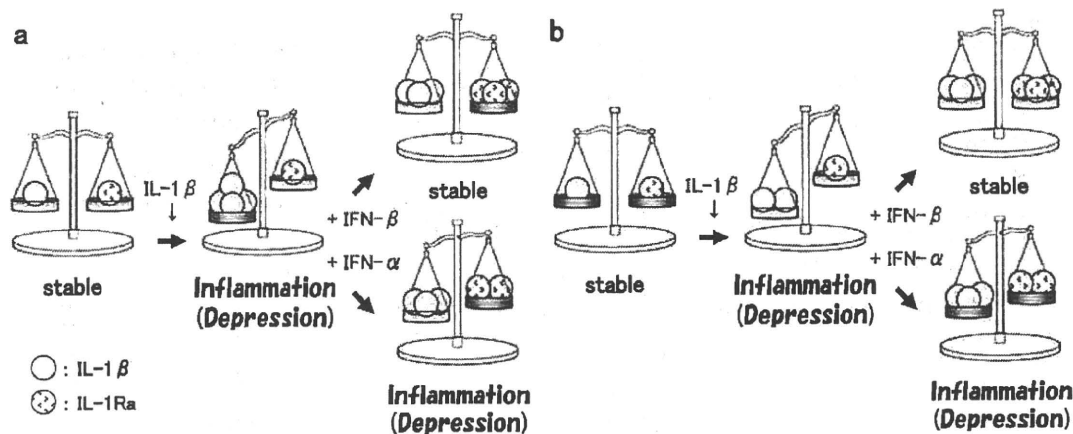


図2 血球系細胞 (a) およびグリオーマ細胞 (b) におけるIL-1β/IL-1RaバランスへのI型IFNの影響推定図

#### 文 献

については、末梢と中枢のいずれの報告もあり<sup>15), 16)</sup>、どちらが主であるのか、または両者が重要であるのかまだ不明であるが、IFN-βによるIL-1Raの産生亢進がいずれにおいてもIFN-αに比べて強いことが精神神経症状発現頻度の違い<sup>17)</sup>に關与する可能性が考えられた。現在C型慢性肝炎のIFN治療は、血中動態を改善させたポリエチレングリコール化(PEG化)IFNによる週一回の投与が標準となっている。我々は、PEG化したIFN-βとPEG化IFN-αの比較においても、PEG化IFN-βの方がIL-1Ra遺伝子発現の増強作用が強いという結果を得ており、この違いは普遍的なIFN-α/βの違いである可能性が高いと思われた。同じIFN受容体に作用するにもかかわらずIFN-αとIFN-βが生体内に存在する生物学的意義としても注目していきたい。

精神神経症状への他のサイトカインの關与としては、血漿中のIL-6やTNF-α濃度の増加を示唆する報告も多くみられることから<sup>6)</sup>、IFN-βおよびIFN-αによるそれらへの影響とその比較についても興味を持たれるところである。また、IFN-αによる精神神経症状の発現機序については、セロトニントランスポーターの活性化<sup>18)</sup>や、トリプトファン代謝酵素であるindoleamine 2, 3-dioxygenaseの活性化と血中トリプトファンの減少<sup>19)</sup>、直接的なオピオイド作用<sup>20)</sup>などの仮説も提唱されており、今後これらを多角的に検証していくこともIFN-βとIFN-αの精神神経症状をはじめとする薬理作用の差の機序解明に重要であるとと思われる。

- 1) 荒瀬康司. 日本臨床. 2004;62: (Suppl 7):519-22.
- 2) Koonsman JP, Parnet P, Dantzer R., Trends Neurosci. 2002;25:154-9.
- 3) Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M., Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2005;29:201-17.
- 4) Maes M., Neuro Endocrinol Lett. 2008;29:287-91.
- 5) Bluthé RM, Michaud B, Poli V, Dantzer R., Physiol Behav. 2000;70:367-73.
- 6) Loftis JM, Huckans M, Ruimy S, Hinrichs DJ, Hauser P., Neurosci Lett. 2008;430:264-8.
- 7) Kaneko N, Kudo K, Mabuchi T, Takemoto K, Fujimaki K, Wati H, Iguchi H, Tezuka H, Kanba S., Neuropsychopharmacology. 2006;31:2619-26.
- 8) Hayley S, Poulter MO, Merali Z, Anisman H., Neuroscience. 2005;135:659-78.
- 9) Nicoletti F, Patti F, DiMarco R, Zaccone P, Nicoletti A, Meroni P, Reggio A., Cytokine. 1996;8:395-400.
- 10) Dionne S, D'Agata ID, Hiscott J, Vanounou T, Seidman EG., Clin Exp Immunol. 1998;112:435-42.
- 11) Miller LC, Lynch EA, Isa S, Logan JW, Dinarello CA, Steere AC., Lancet. 1993;341:146-8.
- 12) Kline JN, Fisher PA, Monick MM, Hunninghake GW., Am J Physiol. 1995;269:L92-8.
- 13) Coclet-Ninin J, Dayer JM, Burger D., Eur Cytokine Netw. 1997;8:345-9.
- 14) Liu JS, Amaral TD, Brosnan CF, Lee SC., J Immunol. 1998;161:1989-96.
- 15) Vollmer-Conna U, Fazou C, Cameron B, Li H, Brennan C, Luck L, Davenport T, Wakefield D, Hickie I, Lloyd A., Psychol Med. 2004;34:1289-97.
- 16) Li S, Wang C, Wang W, Dong H, Hou P, Tang Y., Life Sci. 2008;82:934-42.
- 17) Morikawa O, Sakai N, Obara H, Saito N., Eur J Pharmacol. 1998;349:317-24.
- 18) Zignego AL, Cozzi A, Carpenedo R, Giannini C, Rosselli M, Biagioli T, Aldinucci A, Laffi G, Moroni F. Dig Liver Dis. 2007;39(Suppl 1):S107-11.
- 19) Makino M, Kitano Y, Komiyama C, Hirohashi M, Takasuna K. Br J Pharmacol. 2000;130:1269-74.

# The Progression of Liver Fibrosis Is Related with Overexpression of the miR-199 and 200 Families

Yoshiki Murakami<sup>1\*</sup>, Hidenori Toyoda<sup>2</sup>, Masami Tanaka<sup>3</sup>, Masahiko Kuroda<sup>3</sup>, Yoshinori Harada<sup>4</sup>, Fumihiko Matsuda<sup>1</sup>, Atsushi Tajima<sup>5</sup>, Nobuyoshi Kosaka<sup>6</sup>, Takahiro Ochiya<sup>6</sup>, Kunitada Shimotohno<sup>7</sup>

**1** Center for Genomic Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan, **2** Department of Gastroenterology, Ogaki Municipal Hospital, Ogaki, Japan, **3** Department of Molecular Pathology, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan, **4** Department of Pathology and Cell Regulation, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan, **5** Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan, **6** Division of Molecular and Cellular Medicine, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan, **7** Research Institute, Chiba Institute of Technology, Narashino, Japan

## Abstract

**Background:** Chronic hepatitis C (CH) can develop into liver cirrhosis (LC) and hepatocellular carcinoma (HCC). Liver fibrosis and HCC development are strongly correlated, but there is no effective treatment against fibrosis because the critical mechanism of progression of liver fibrosis is not fully understood. microRNAs (miRNAs) are now essential to the molecular mechanisms of several biological processes. In order to clarify how the aberrant expression of miRNAs participates in development of the liver fibrosis, we analyzed the liver fibrosis in mouse liver fibrosis model and human clinical samples.

**Methodology:** In a CCL<sub>4</sub>-induced mouse liver fibrosis model, we compared the miRNA expression profile from CCL<sub>4</sub> and olive oil administrated liver specimens on 4, 6, and 8 weeks. We also measured expression profiles of human miRNAs in the liver biopsy specimens from 105 CH type C patients without a history of anti-viral therapy.

**Principle Findings:** Eleven mouse miRNAs were significantly elevated in progressed liver fibrosis relative to control. By using a large amount of human material in CH analysis, we determined the miRNA expression pattern according to the grade of liver fibrosis. We detected several human miRNAs whose expression levels were correlated with the degree of progression of liver fibrosis. In both the mouse and human studies, the expression levels of miR-199a, 199a\*, 200a, and 200b were positively and significantly correlated to the progressed liver fibrosis. The expression level of fibrosis related genes in hepatic stellate cells (HSC), were significantly increased by overexpression of these miRNAs.

**Conclusion:** Four miRNAs are tightly related to the grade of liver fibrosis in both human and mouse was shown. This information may uncover the critical mechanism of progression of liver fibrosis. miRNA expression profiling has potential for diagnostic and therapeutic applications.

**Citation:** Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, et al. (2011) The Progression of Liver Fibrosis Is Related with Overexpression of the miR-199 and 200 Families. PLoS ONE 6(1): e16081. doi:10.1371/journal.pone.0016081

**Editor:** Chad Creighton, Baylor College of Medicine, United States of America

**Received:** September 15, 2010; **Accepted:** December 6, 2010; **Published:** January 24, 2011

**Copyright:** © 2011 Murakami et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare (Y.M. and K.S.). This work was also supported by the 'Strategic Research-Based Support' Project for private universities; with matching funds from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (M.K.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: ymurakami@genome.med.kyoto-u.ac.jp

‡ Current address: Department of Human Genetics and Public Health, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan

## Introduction

Chronic viral hepatitis is a major risk factor for hepatocellular carcinoma (HCC) [1]. Worldwide 120–170 million persons are currently chronically Hepatitis C Virus (HCV) infected [2]. Due to repetitive and continuous inflammation, these patients are at increased risk of developing cirrhosis, subsequent liver decompensation and/or hepatocellular carcinoma. However, the current standard of care; pegylated interferon and ribavirin combination therapy is unsatisfied in the patients with high titre of HCV RNA and genotype 1b. Activated human liver stellate cells (HSC) with chronic viral infection, can play a pivotal role in the progression of liver fibrosis [3]. Activated HSC produce a number of profibrotic cytokines and growth factors that perpetuate the fibrotic process through paracrine and autocrine effects.

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous small non-coding RNAs that control gene expression by degrading target mRNA or suppressing their translation [4]. There are currently 940 identifiable human miRNAs (The miRBase Sequence Database - Release ver. 15.0). miRNAs can recognize hundreds of target genes with incomplete complementarity; over one third of human genes appear to be conserved miRNA targets [5][6]. miRNA is associated several pathophysiologic events as well as fundamental cellular processes such as cell proliferation and differentiation. Aberrant expression of miRNA can be associated with the liver diseases [7][8][9][10]. Recently reported miRNAs can regulate the activation of HSCs and thereby regulate liver fibrosis. miR-29b, a negative regulator for the type I collagen and SP1, is a key regulator of liver fibrosis [11]. miR-27a and 27b allowed culture-activated rat HSCs to switch to a more quiescent HSC phenotype,

with restored cytoplasmic lipid droplets and decreased cell proliferation [12].

In this study, we aimed to reveal the association between miRNA expression patterns and the progression of liver fibrosis by using a chronic liver inflammation model in mouse. We also sought to identify the miRNA expression profile in chronic hepatitis (CH) C patients according to the degree of liver fibrosis, and to clarify how miRNAs contribute to the progression of liver fibrosis. We observed a characteristic miRNA expression profile common to both human liver biopsy specimens and mouse CCL<sub>4</sub> specimens, comprising the key miRNAs which are associated with the liver fibrosis. This information is expected to uncover the mechanism of liver fibrosis and to provide a clearer biomarker for diagnosis of liver fibrosis as well as to aid in the development of more effective and safer therapeutic strategies for liver fibrosis.

## Results

### The expression level of several mouse miRNAs was increased by introducing mouse liver fibrosis

In order to identify changes in the miRNA expression profile between advanced liver fibrosis and non-fibrotic liver, we intraperitoneally administered CCL<sub>4</sub> in olive oil or olive oil alone twice a week for 4 weeks and then once a week for the next 4 weeks. Mice were sacrificed at 4, 6, or 8 weeks and then the degree of mouse liver fibrosis was determined by microscopy (Figure S1). miRNA expression analysis was performed from the liver tissue collected at the same time. Histological examination revealed that the degree of liver fibrosis progressed in mice that received CCL<sub>4</sub> relative to mice receiving olive oil alone (Figure 1A). Microarray analysis revealed that in CCL<sub>4</sub> mice, the expression level of 11 miRNAs was consistently higher than that in control mice (Figure 1B).

### miRNA expression profile in each human liver fibrosis grade

We then established human miRNAs expression profile by using 105 fresh-frozen human chronic hepatitis (CH) C liver tissues without a history of anti-viral therapy, classified according to the grade of the liver fibrosis (F0, F1, F2, and F3 referred to METAVIR fibrosis stages)(Figure 2, Table S2). Fibrosis grade F0 was considered to be the negative control because these samples were derived from patients with no finding of liver fibrosis. In zebrafish, most highly tissue-specific miRNAs are expressed during embryonic development; approximately 30% of all miRNAs are expressed at a given time point in a given tissue [13]. In mammals, the 20–30% miRNA call rate has recently been validated [14]. Such analysis revealed that the diversity of miRNA expression level among specimens was small. Therefore, we focused on miRNAs with a fold change in mean expression level greater than 1.5 ( $p < 0.05$ ) in the two arbitrary groups of liver fibrosis.

Expression of several miRNAs was dramatically different among grades of fibrosis. In the mice study 11 miRNAs were related to the progression of liver fibrosis (mmu-let-7e, miR-125-5p, 199a-5p, 199b, 199b\*, 200a, 200b, 31, 34a, 497, and 802). In the human study 10 miRNAs were extracted, and the change in their expression level varied significantly between F0 and F3 (F0<F3: hsa-miR-146b, 199a, 199a\*, 200a, 200b, 34a, and 34b, F0>F3: hsa-miR-212, 23b, and 422b). The expression level of 6 miRNAs was significantly different between F0 and F2 (F0<F2: hsa-miR-146b, 200a, 34a, and 34b, F0>F2: hsa-miR-122 and 23b). 5 extracted miRNAs had an expression level that was significantly different between F1 and F2 (F1<F2: hsa-miR-146b, F1>F2: hsa-miR-122, 197, 574, and 768-5p). The expression level of 9 miRNAs changed significantly between F1 and F3 (F1<F3:

hsa-miR-146b, 150, 199a, 199a\*, 200a, and 200b, F1>F3: hsa-miR-378, 422b, and 768-5p). The miRNAs related to liver fibrosis were extracted using two criteria: similar expression pattern in both the human and the mice specimens and shared sequence between human and mouse. We compared the sequences of mouse miRNAs as described on the Agilent Mouse MiRNA array Version 1.0 (miRbase Version 10.1) and human miRNAs as described on the Agilent Human MiRNA array Version 1.5 (miRbase Version 9.1). The sequences of mmu-miR-199a-5p, mmu-miR-199b, mmu-miR-199b, mmu-miR-200a, and mmu-miR-200b in mouse miRNA corresponded to the sequences of hsa-miR-199a, hsa-miR-199a\*, hsa-miR-199a, hsa-miR-200a, and hsa-miR-200b in human miRNA, respectively (Table S3).

### Validation of the microarray result by real-time qPCR

The 4 human miRNAs (miR-199a, miR-199a\*, miR-200a, and miR-200b) with the largest difference in fold change between the F1 and F3 groups were chosen to validate the microarray results using stem-loop based real-time qPCR. The result of real-time qPCR supported the result of that microarray analysis. The expression level of these 4 miRNAs was significantly different between F0 and F3 and spearman correlation analysis also showed that the expressions of these miRNAs were strongly and positively correlated with fibrosis grade ( $n = 105$ ,  $r = 0.498$ (miR-199a),  $0.607$ (miR-199a\*),  $0.639$ (miR-200a),  $0.618$ (miR-200b),  $p$ -values  $< 0.0001$ ) (Figure 3).

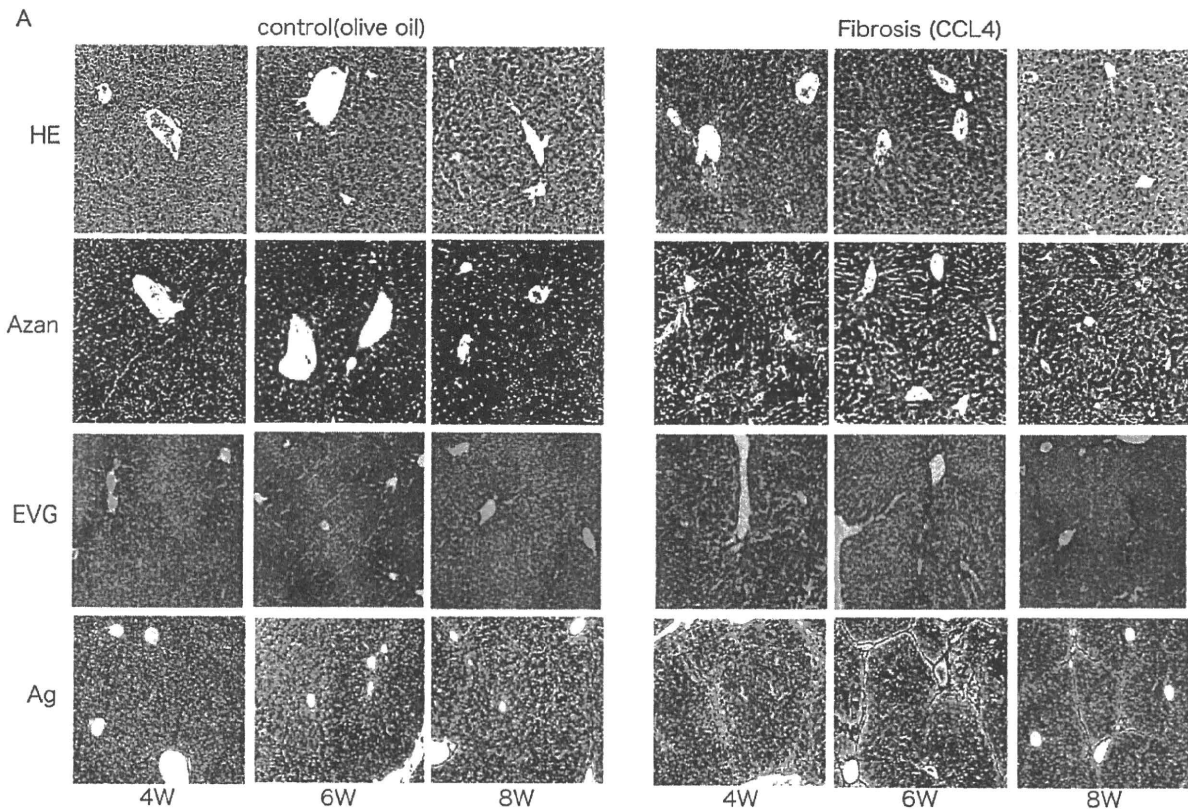
### Over expression of miR-199a, 199a\*, 200a, and 200b was associated with the progression of liver fibrosis

In order to reveal the function of miR-199a, miR-199a\*, miR-200a, and miR-200b, we investigated the involvement of these miRNAs in the modulation of fibrosis-related gene in LX-2 cells. The endogenous expression level of these 4 miRNAs in LX2 and normal liver was low according to the microarray study (Figure S2). Transforming growth factor (TGF) $\beta$  is one of the critical factors for the activation of HSC during chronic inflammation [15] and TGF $\beta$  strongly induced expression of three fibrosis-related genes include a matrix degrading complex comprised of  $\alpha 1$  procollagen, matrix remodeling complex, comprised of metalloproteinases-13 (MMP-13), tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in LX-2 cells (Figure 4A). Furthermore, overexpression of miR-199a, miR-199a\*, miR-200a and miR-200b in LX-2 cells resulted significant induction of above fibrosis-related genes compared with control miRNA (Figure 4B). Finally we validated the involvement of TGF $\beta$  in the modulation of these miRNAs. In LX-2 cells treated with TGF $\beta$ , the expression levels of miR-199a and miR-199a\* were significantly higher than in untreated cells; the expression levels of miR-200a and miR-200b were significantly lower than in untreated cells. Thus, our in vitro analysis suggested a possible involvement of miR-199a, 199a\*, 200a, and 200b in the progression of liver fibrosis.

## Discussion

Our comprehensive analysis showed that the aberrant expression of miRNAs was associated with the progression of liver fibrosis. We identified that 4 highly expressed miRNAs (miR-199a, miR-199a\*, miR-200a, and miR-200b) that were significantly associated with the progression of liver fibrosis both human and mouse. Coordination of aberrant expression of these miRNAs may contribute to the progression of liver fibrosis.

Prior studies have discussed the expression pattern of miRNA found in liver fibrosis samples between previous and present study. In this report and prior mouse studies and the expression pattern of



**B**

miRNA	Fold change CCL4 mouse/control		
	4week	6week	8week
mmu-let-7e	2.92	2.09	2.64
mmu-miR-125a-5p	4.29	2.35	2.67
mmu-miR-199a-5p	2.71	2.12	2.38
mmu-miR-199b	3.25	2.55	2.49
mmu-miR-199b*	5.13	4.47	3.94
mmu-miR-200a	2.23	1.63	2.02
mmu-miR-200b	2.38	2.06	2.20
mmu-miR-31	3.4	2.35	3.19
mmu-miR-34a	3.89	3.22	3.5
mmu-miR-497	2.25	2.00	2.55
mmu-miR-802	2.02	2.87	2.74

**Figure 1. The change of liver fibrosis in mouse model.** A. Representative H&E-stained, Azan-stained, Ag-stained, and EVG-stained histological sections of liver from mice receiving olive oil alone or CCL<sub>4</sub> in olive oil. Magnification is  $\times 10$ . B. The expression level of mmu-miRNA in mouse liver with olive oil or CCL<sub>4</sub> at 4W, 6W, and 8W respectively, by microarray analysis. doi:10.1371/journal.pone.0016081.g001

3 miRNAs (miR-199a-5p, 199b\*, 125-5p) was found to be similar while the expression pattern of 11 miRNAs (miR-223, 221, 24, 877, 29b, 29a, 29c, 30c, 365, 148a, and 193) was partially consistent with fibrosis grade [16]. In low graded liver fibrosis, the low expression pattern of 3 miRNAs (miR-140, 27a, and 27b) and the high expression pattern of 6 miRNAs in rat miRNAs (miR-29c\*, 143, 872, 193, 122, and 146) in rat miRNA was also similar to our mouse study (GEO Series accession number GSE19865) [11] [12] [17].

The results in this study and previously completed human studies reveal that the expression level of miR-195, 222, 200c, 21,

and let-7d was higher in high graded fibrotic liver tissue than in low graded fibrotic liver tissue. Additionally, the expression level of miR-301, 194, and 122 was lower in the high graded fibrotic liver tissue than in low graded fibrotic liver tissue [18] [19] [20] (GEO Series accession number GSE16922). This difference in miRNA expression pattern may be contributed to (1) the difference of microarray platform, (2) difference of analytic procedure, and (3) the difference of the species (rat, mouse, and human).

The miR-199 and miR-200 families have are circumstantially related to liver fibrosis. TGF $\beta$ -induced factor (TGIF) and SMAD