

17(4): 274-279

- 3) Yoneda M, Nozaki Y, Endo H, Mawatari H, Iida H, Fujita K, Yoneda K, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Kobayashi N, Kubota K, Saito S, Maeyama S, Hotta K, Nakajima A. Serum ferritin is a clinical biomarker in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) independent of HFE gene mutation. *Dig Dis Sci* 2010; 55(3): 808-814

2. 学会発表

- 1) 篠原義康, 藤田浩司, 米田正人, 野崎雄一, 今城健人, 鈴木香峰理, 馬渡弘典, 桐越博之, 船越健悟, 池田正徳, 加藤宣之, 前田慎, 中島淳, 斉藤聡. HCV感染におけるERストレスを介した細胞死の検討. 第33回日本分子生物学会, 神戸, 2010, 12.07-10
- 2) 篠原義康, 藤田浩司, 米田正人, 野崎雄一, 今城健人, 鈴木香峰理, 馬渡弘典, 桐越博之, 船越健悟, 池田正徳, 加藤宣之, 前田慎, 中島淳, 斉藤聡. HCV感染におけるリポ蛋白代謝の解析. 第58回日本ウイルス学会, 徳島, 2010, 11.07-09
- 3) Shinohara Y, Fujita K, Mawatari H, Yoneda M, Nozaki Y, Kirikoshi H, Imajo K, Suzuki K, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S. The ER stress caused by hepatitis C virus in replicon cells was reversed by interferon treatment. The 61th AASLD, Boston, USA, 2010, 10.29-11.02
- 4) Shinohara Y, Fujita K, Mawatari H, Yoneda M, Nozaki Y, Kirikoshi H, Imajo K, Suzuki K, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S. Hepatic triglyceride lipase may play important role to change the lipoprotein profiles in the HCV replicon system. The 61th AASLD, Boston, USA, 2010, 10.29-11.02
- 5) Shinohara Y, Fujita K, Mawatari H, Yoneda M,

Nozaki Y, Kirikoshi H, Imajo K, Suzuki K, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S. Clearance of the hepatitis C virus replicon by interferon-alpha treatment restored the signal pathway involving JNK. The 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama Japan, 2010, 9.10-14

- 6) Shinohara Y, Fujita K, Nozaki Y, Imajo K, Mawatari H, Yoneda M, Kirikoshi H, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S. Hepatitis C Virus infection changes the lipoprotein profiles in the replicon system. The 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama Japan, 2010, 9.10-14
- 7) 篠原義康, 野崎雄一, 藤田浩司, 米田正人, 馬渡弘典, 桐越博之, 船越健悟, 中島淳, 斉藤聡. 培養細胞におけるHepatitis C virus 遺伝子型1bの脂質代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響. 第46回日本肝臓学会総会, 山形, 2010, 5.27-28
- 8) 馬渡弘典, 斉藤聡, 篠原義康, 米田正人, 藤田浩司, 野崎雄一, 桐越博之, 加藤真吾, 遠藤宏樹, 細野邦広, 坂本康成, 高橋宏和, 阿部泰伸, 稲森正彦, 小林規俊, 中島淳. HDL-free chlesterol と C型慢性肝炎(genotype 1・抗ウイルス量)に対する治療抵抗性との関係. 第46回日本肝臓学会総会, 山形, 2010, 5.27-28
- 9) Mawatari H, Yoneda M, Fujita K, Nozaki Y, Shinohara Y, Kato S, Takahashi H, Inamori M, Abe Y, Kobayashi N, Kubota K, Kirikoshi H, Nakajima A, Saito S. HDL-free cholesterol is an independent clinical marker of the resistance to hepatitis C treatment. DDW, New Orleans, USA, 2010, 5.01-05

H. 知的所有権の出願・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）

分担研究報告書

C型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療における免疫細胞機能に関する研究

研究分担者 考藤達哉 大阪大学大学院医学系研究科
樹状細胞制御治療学寄附講座 准教授

研究要旨：C型慢性肝炎に対するペグ IFN α /リバビリン併用療法によって、難治性患者では約50%が著効となる。それ以外の再燃、無効例に対しては、新規治療法の開発が必要である。IFN治療への抵抗性には、HCVに対する免疫応答の低下が関与する。近年、ペグ IFN α /リバビリン併用療法の治療効果に、患者 IL-28B 遺伝子近傍の一塩基多型 (SNP) が関与することが報告されたが、その機能的意義は明らかではない。今年度は、IL-28B SNP と免疫反応、治療効果との関連を明らかにすることを目的とした。C型慢性肝炎患者 (CHC)、非感染者 (HV) の末梢血からミエロイド DC (MDC)、プラスマサイトイド DC (PDC) を分離し、TLR リガンドで刺激して、IFN- β 、IFN- λ (IL-29、IL-28A、IL-28B) の発現を Real-time PCR で検討した。また IL-28B SNP major (TT)、minor (TG) 群別に、MDC、PDC などの免疫細胞頻度を比較した。MDC においては、IFN- β 発現は CHC 群で HV 群より低値であったが、IFN- λ の発現は両群で差を認めなかった。また IL-28B SNP major/minor 間でも差を認めなかった。PDC においては IFN- β 、IL-28B は CHC 群で HV 群より低値であったが、IL-28B SNP major/minor 間では差を認めなかった。IL-28B SNP major では minor 群に比べて、PDC 頻度が高く、制御性 T 細胞頻度は低かった。IL-28B SNP は免疫細胞頻度や DC 機能に影響を与え、治療効果に関与する可能性が示唆された。

A.研究目的

C型慢性肝炎に対してペグ IFN α /リバビリン療法が導入され、難治例でも約50%の患者でHCVが排除できるようになった。しかし再燃例、無効例に対しては、新たな方策が必要である。本研究では、既存のペグ IFN α /リバビリン治療や新規治療法における免疫反応と治療効果との関連性を明らかにし、治療効果改善のための免疫制御療法を開発することを目標とする。近年、ペグ IFN α /リバビリン併用療法の治療効果に患者 IL-28B 遺伝子近傍の一塩基多型 (SNP) が関与することが報告されたが、その機能的意義は明らかではない。今年度は、IL-28B SNP と免疫反応、治療効果との関連を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

セロタイプ1型・高ウイルス量のC型慢性肝炎患者と非感染者を対象とした。末梢血からMDC、PDCを分離し、PolyI:C、CpGオリゴでそれぞれ刺激した後、IFN- β 、IFN- λ

(IL-29、IL-28A、IL-28B) の発現を Real-time PCR で検討した。また IL-28B SNP major (TT)、minor (TG/GG) 群別に、MDC、PDC などの免疫細胞頻度を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は大阪大学医学部倫理委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える

C.研究結果

MDC においては、IFN- β 発現は CHC 群で HV 群より低値であったが、IFN- λ (IL-29、IL-28A、IL-28B) の発現は両群で差を認めなかった。また CHC、HV 両群において、IL28B SNP major/minor 間でも差を認めなかった。PDC においては IFN- β 、IL-28B は CHC 群で HV 群より低値であったが、IL-28B SNP major/minor 間では差を認めなかった。CHC 群において、IL-28B SNP major では minor 群に比べて、PDC 頻度が高く、制御性 T 細胞頻度は低かった。また IL-28B SNP minor 群では、NR 例が非 NR

例より有意に多かった。

D. 考察

CHC 群においては、MDC、PDC での IFN- β 発現は HV 群よりも低値であり、HCV 感染症における DC 機能の低下が認められた。IL-28B SNP 別では IFN- λ の発現には差を認めなかった。IL-28B SNP は IL-28B 自体の発現に直接関与するよりも、他の因子を介して PDC や制御性 T 細胞に関与し、免疫修飾作用を発揮する可能性が示唆された。

E. 結論

IL-28B SNP によって免疫細胞頻度に差が認められ、IL-28B は免疫系を介してペグ IFN α /リバビリン併用療法の治療効果に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oze, T., Hiramastu, N., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Ito, T., Fukui, H., Inui, Y., Hijioka, T., Inada, M., Katayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Miyagi, T., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N. Indications and limitations for aged patients with chronic hepatitis C in pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin combination therapy. *J Hepatol* 2011; (in press)
- 2) Inoue, Y., Hiramastu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Fukuda, K., Mita, E., Haruna, Y., Inoue, A., Imai, Y., Hosui, A., Miyagi, T., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Amino acid substitution in the core protein has no impact on relapse in hepatitis C genotype 1 patients treated with peginterferon and ribavirin. *J Med Virol* 2011; 83: 419-427
- 3) Tatsumi T, Takehara T, Miyagi T, Sugiyama T, Aketa H, Sasakawa A, Kanto T, Hiramastu N, Hayashi N. α -Galactosylceramide activates antitumor immunity against liver tumor. *Hepatol Res* 2010; 41: 160-169

- 4) Tatsumi T, Takehara T, Miyagi T, Nakazuru S, Mita E, Kanto T, Hiramastu N, Hayashi N. Hepatitis C virus-specific CD8+ T cell frequencies are associated with the responses of pegylated interferon- α and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol Res* 2010; 41: 30-38

2. 学会発表

- 1) Higashitani K, Kanto T, Miyazaki M, Matsubara T, Kakita N, Itose I, Sakakibara M, Hiramastu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Active role of teyptophan catalyzing enzyme, indoleamine 2, 3-dioxygenase, in the generation of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients. **The Liver Meeting AASLD 61st Annual Meeting and Postgraduate Course** Boston, MA, USA 10.29-11.2, 2010
- 2) Matsubara M, Kanto T, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramastu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Pro-angiogenic receptor TIE2 expressing monocytes/ TEMs as novel diagnostic biomarker for hepatocellular carcinoma. **The Liver Meeting AASLD 61st Annual Meeting and Postgraduate Course** Boston, MA, USA 10.29-11.2, 2010
- 3) Kakita N, Kanto T, Matsubara M, Higashitani K, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramastu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Distinctive roles of IL-10-producing Type 1 regulatory T cells (Tr1) in the pathogenesis of hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma. **The Liver Meeting AASLD 61st Annual Meeting and Postgraduate Course** Boston, MA, USA 10.29-11.2, 2010
- 4) Kakita N, Kanto T, Matsubara M, Higashitani K, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramastu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Crucial roles of IL-10-producing Type 1 regulatory T cells (Tr1) in the pathogenesis of hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma. **17th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses**, Yokohama, Japan, September 10-14, 2010
- 5) Higashitani K, Kanto T, Kakita N,

Matsubara M, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Indoleamine 2, 3-dioxygenase as an active inducer of regulatory T cells in chronic HCV infection. **17th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses**, Yokohama, Japan, September 10-14, 2010

6) **Matsubara M, Kanto T, Kakita N, Higashitani K, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N.** Pro-angiogenic receptor TIE2-expressing monocytes/ TEMs as novel diagnostic marker for HCV-infected hepatocellular carcinoma. **17th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses**, Yokohama, Japan, September 10-14, 2010

7) **Miyazaki M, Kanto T, Matsubara M, Kakita N, Higashitani K, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N.** Type-I and type-III interferon induction from myeloid and plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis C patients; lack of association with single nucleotide polymorphism near IL28B gene. **17th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses**, Yokohama, Japan, September 10-14, 2010

H.知的財産権の出願・登録状況
特に予定なし

C型肝炎における新規治療法に関する研究

研究分担者 朝比奈 靖浩 武蔵野赤十字病院 消化器科部長

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)の排除にはRIG-I/IPS-1系などの自然免疫が重要であるが、HCVは自然免疫に対し自己のNS3/4AセリンプロテアーゼでIPS-1を分解することで逃避するとされる。各種プロテアーゼ阻害薬は、強い抗HCV作用を有するNS3/4A阻害薬であるが、プロテアーゼ阻害薬によるNS3/4A阻害時の宿主自然免疫の分子機構の変化は不明である。今回PEG-IFN/RBV併用療法の難治例における宿主因子及び自然免疫の関与を明らかとし、さらにテラプレビル(TVR)単独投与中の遺伝子プロファイルを一網打尽的に解析した。治療前の肝における、RIG-I、MDA5、LGP2、ISG15およびUSP18はNVR例で有意に高発現であった。TVR単独投与例(n=5)で、治療前・中におけるPBMC中の遺伝子発現動態を検討したところ、viral breakthroughを認めた症例ではRIG-I系遺伝子は低発現となったのに対し、breakthroughを認めず治療を完遂し得た症例では高発現となった。さらにDNAマイクロアレイを用いTVR投与前後の遺伝子発現プロファイルを一網打尽的に解析したところ、抗原提示、NK細胞およびToll-like receptorシグナル伝達に関わる遺伝子群の発現変化が認められた。これらより、テラプレビルによるHCV抑制は宿主免疫系に密接な影響を与えることが示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の排除にはRIG-I/IPS-1系などの自然免疫が重要であるが、HCVは自然免疫に対し自己のNS3/4AセリンプロテアーゼでIPS-1を分解することで逃避するとされる。各種プロテアーゼ阻害薬は、強い抗HCV作用を有するNS3/4A阻害薬であるが、プロテアーゼ阻害薬によるNS3/4A阻害時の宿主自然免疫の分子機構の変化は不明である。今回PEG-IFN/RBV併用療法の難治例における宿主因子及び自然免疫の関与を明らかとし、さらにテラプレビル(TVR)単独投与中の遺伝子プロファイルを一網打尽的に解析した。

B. 研究方法

PEG-IFN/RBV併用療法を施行例(年齢中央値61歳)を対象とし、自然

免疫遺伝子プロファイルを解析した。またTVR単独投与例(n=5)では、治療前・中におけるHCV動態とPBMC中の遺伝子発現動態をリアルタイムPCR法を用いて検討した。さらにTVR単独投与例前後におけるPBMC中の遺伝子発現プロファイルをDNAマイクロアレイを用い25,000の遺伝子発現について一網打尽的に解析した。

(倫理面への配慮)

倫理上の問題が生じる場合には、武蔵野赤十字病院の倫理委員会において審議を行い、承認を得ることとした。

C. 研究結果

治療前の肝における、自然免疫に関わる細胞内ウイルスセンサー(RIG-I、MDA5、LGP2)、IFN誘導遺伝子(ISG15、USP18)はNVRの症例で有意に高発現であった。一方、アダプター分子(IPS-1)および抑制系遺伝子(RNF125)はNVRの症例で低発現であった。一方、NVRに関与するIL28B近傍のSNPがheterozygoteまたはminor homozygoteの症例でもRIG-I、MDA5、LGP2、ISG15、USP18は高発現であったが、IL28B SNPがmajor homozygoteでもNVRとなった症例では高発現であった。IPS-1およびRNF125にも同様の関係性を認めた。ラプレビル単剤投与例では全例で速やかにHCV減衰が得られたが(平均4.6 log/ml)、viral breakthroughを3例に認めた。これらの症例ではRIG-I系遺伝子は低発現となったのに対し、breakthroughを認めず治療を完遂し得た症例では高発現となった。DNAマイクロアレイを用いた一網打尽的な遺伝子発現解析において、発現

変化量 >1.2 かつ $p<0.01$ を条件とした599プロローブのパスウェイ解析では、テラプレビル投与により抗原提示、NK細胞およびToll-like receptor シグナル伝達に関わる遺伝子群の発現の低下を認めた($p=1.2 \times 10^{-4}$, 5.6×10^{-3} , 2.3×10^{-3})。

D. 考察

RIG-I/IPS-1系はPEG-IFN/RBV併用療法におけるNVRに関与していた。今回IFNの自然免疫系に与える影響を排除するために、テラプレビル単独投与を行った症例で検討したが、テラプレビル投与により自然免疫系遺伝子の発現プロファイルは動的に変化し、テラプレビルによるHCV抑制に宿主自然免疫系は密接に関与していることが示唆された。

E. 結論

RIG-I/IPS-1系はIL28B近傍のSNPとともにPEG-IFN/RBV併用療法におけるNVRに関与していた。テラプレビルによるHCV抑制は宿主免疫系に密接な影響を与えることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asahina Y, Tsuchiya K, Tamaki N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N. Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 52(2): 518-27, 2010.

2. Itakura J, Asahina Y, Tamaki N, Hirayama I, Yasui Y, Tanaka T, Sato M, Ueda K, Kuzuya T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Kurosaki M, Gabriel GS, Schneider, Izumi N. Changes in hepatitis C viral load during first 14 days can predict the undetectable time point of serum viral load by pegylated interferon and

ribavirin therapy. *Heptol Res* 2011 in press.

3. Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M. Predictors of virological response to a combination therapy with pegylated interferon plus ribavirin including virus and host factors. *Hepatitis Reserch and Treatment* 2010: 703602, 2010.

4. Namiki I, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M. Management of hepatitis C; Report of the Consensus Meeting at the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009). *Hepato Res* 40(4): 347-68, 2010.

5. Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, 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. *Hepato Res* 40(3): 251-60, 2010.

6. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol* 2010.

7. Kurosaki M, Hosokawa T, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Ueda K, Tsuchiya K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Enomoto N, Izumi N. Hepatic steatosis in chronic hepatitis C is a significant risk factor for developing hepatocellular carcinoma

independent of age, sex, obesity, fibrosis stage and response to interferon therapy. *Hepatol Res* 40(9): 870-7, 2010.

8. 朝比奈靖浩. C型肝炎の最新治療と医療連携. *日本臨床内科医会誌* 25; 9-18, 2010.

9. 朝比奈靖浩. ウイルス肝炎 治療の現状と新しい戦略】C型肝炎ウイルス感染の病態と治療法 ペグインターフェロンとリバビリン併用療法の治療成績と寄与因子. *治療学* 44; 1016-1021, 2010.

2. 学会発表

1. Asahina Y, Tsuchiya K, Tamaki N, Sato M, Tanaka T, Hirayama I, Yasui Y, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Izumi N. Reducing alpha-fetoprotein with interferon therapy suppresses hepatocarcinogenesis in hepatitis C virus-infected patients who are virological responders and non-responders. The 45th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2010). Apr 14-18, 2010, Vienna, Austria.

2. Asahina Y, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka T, Katoh T, Tanaka T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Izumi N. Gene expression involving innate immunity and IL28B variation: its association with antiviral response in chronic hepatitis C. The 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2010). 2010 Oct 29-Nov 2, Boston, USA. (Oral Presentation).

3. 朝比奈靖浩, 田中博, 泉並木. シンポジウム C型肝炎-ウイルス感染の分子免疫機構. PEG-IFN/RBV およびTelaprevir 投与中の自然免疫系遺伝子発現プロファイルと治療効果. 第96

回日本消化器病学会大会, 2010, 新潟.

4. 朝比奈靖浩, 田中博, 泉並木. シンポジウム C型肝炎における抗ウイルス療法の近未来. PEG-IFN/RBV 併用療法およびプロテアーゼ阻害薬投与中の自然免疫系遺伝子発現プロファイルと治療効果. 第46回日本肝臓学会総会, 2010, 山形.

5. 朝比奈靖浩, 泉並木. パネルディスカッション C型肝炎に対する新たな治療戦略. PEG-IFN/RBV 併用療法における難治要因と新規抗ウイルス薬の治療効果. 第14回日本肝臓学会大会, 2010, 横浜.

6. 朝比奈靖浩, 田中博, 泉並木. シンポジウム ウイルス肝炎における免疫応答の研究. 病態解明と治療への応用 PEG-IFN/RBV およびプロテアーゼ阻害薬投与中の宿主因子および自然免疫系遺伝子プロファイルと治療効果. 第38回日本肝臓学会東部会, 2010, 東京.

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

ウイルス変異と宿主因子から見た C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN+RBV 療法と
NS3 protease 阻害剤を含めた新規治療法の検討

研究分担者 坂本穰 山梨大学医学部附属病院肝疾患センター センター長・准教授

研究要旨：C 型慢性肝炎に対する新しい治療法として NS3 protease 阻害剤を含めた 3 剤併用療法が期待されている。しかし貧血などの副作用も見られることから、現行治療でも治癒可能な症例と新規治療法の適応例を選別することは重要である。現行の PEG-IFN+Ribavirin (P+R) 併用療法の治療効果規定因子は、genotype・HCV ウイルス変異と年齢・IL28B の宿主因子であり、これらを相互に検討することで治療効果を予測し、新規治療法の適応例を絞り込むことが可能であることが示された。一方、新規治療法の開始にあたっては、protease 阻害剤未投与例でもすでに HCV NS3 領域に耐性変異を獲得している HCV 株が存在していることや、ITPA genotype によっては高度な貧血が生じる症例も存在することなどを念頭に置く必要があると考えられた。

共同研究者

山梨大学大学院医学工学総合研究部
肝疾患地域先端医療システム学 前川伸哉
山梨大学医学部内科学講座第1教室
榎本信幸、進藤浩子

A. 研究目的

1b 型かつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎は難治であり、現在の標準治療である PEG-IFN+Ribavirin (RBV) 併用療法に代わり、NS3 protease 阻害剤を用いた新規治療法に期待が持たれている。しかし、貧血や皮疹などの副作用が知られているほか、分子標的薬に見られる薬剤耐性変異獲得の危険性が指摘されており、その適応を見極めることはきわめて重要である。そこで、本研究では、従来の PEG-IFN+RBV でも治癒可能症例と、新規治療法を待たずに早期に現行治療を導入すべき患者の絞込みと、新規治療薬による治療適応例の選択について宿主条件と HCV ウイルス変異とから検討した。

B. 研究方法

1) 現行治療の治療成績の評価は、2004年12月から山梨大学第1内科と関連施設で組織する Y-PERS (Yamanashi PEG-interferon+Ribavirin Study) で集積された 1b 高ウイルス量症例のうち PEG-IFN α 2b (ペグイントロン)+Ribavirin (レベトール: RBV) 併用療法を行った 946 例のうち、治療効果が判明している 612 例を検討対象とし臨床成績ならびに ISDR (Interferon sensitivity determining region) 変異数、IRRDR (Interferon-ribavirin resistance determining region) 変異数、コア 70 番および 91 番アミノ酸変異を検討した。また、一部の症例については宿主因子である IL28B の SNPs (rs8099917) と、リバビリンに関する貧血に関与する遺伝子 ITPA (rs1127354) の SNP についても検討した。

2) HCV NS3 領域に見られるウイルス変異の検討は、昨年度に引き続き、2004年12月から山梨大学第1内科および金沢大学消化器内科、武蔵野赤十字病院で行われた 1b 高ウイルス量症例のうち PEG-IFN α 2b (ペグイントロン)

+Ribavirin (レベトール) 併用療法を行い、治療効果が判明しており、かつ治療開始前の保存血清が存在している261例を解析対象とし、治療開始前の血清を用いてHCVのNS3領域の遺伝子 (アミノ酸) 変異をDirect sequencing法で検討した。

(倫理面の配慮)

臨床試験の目的・方法・副作用、患者に関する個人情報、守秘義務、患者の権利・保護等に関し、十分に説明し、文書で同意を取得し研究をおこなった。なお、これらの研究の実施計画については、山梨大学医学部倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1) PEG-IFN α 2b+RBV 療法の治療成績

(Sustained viral response: SVR 率) は、ITT 解析で1b型50%(212/423)、2a型88%(102/116)、2b型80%(61/76)であった。最も難治である1b型症例に限り、これまで治療効果と関係する因子として知られているISDR、IRRDR、コア70番および91番のアミノ酸変異、および宿主IL28Bおよび、貧血に関連するITPAにつき検討した。多変量解析で治療効果と関連するのは、60歳未満 (odds比11.2、p=0.002)、IRRDR変異数4個以上 (odds比20.0、p=0.0005)、IL28B TT (odds比14.0、p=0.0014)であり、1b型に限ると宿主因子とウイルス因子がそれぞれ独立して治療効果を規定していることが明らかになった (図1)。

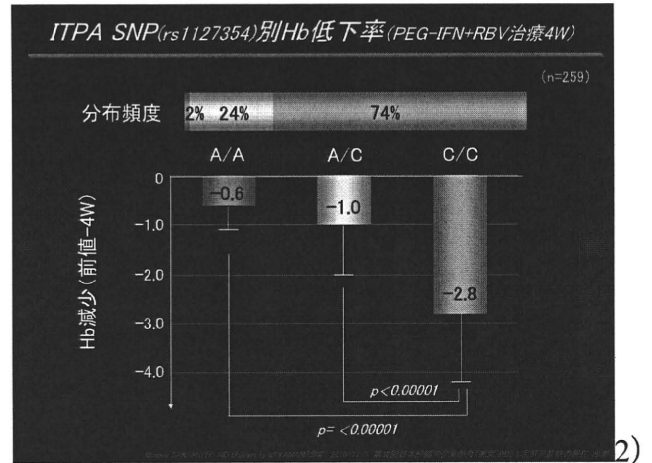
ウイルス変異と宿主変異からみたC型慢性肝炎の治療方針

PEG-IFN+RBV療法の治療効果を規定する因子 (多変量解析) (n=294)

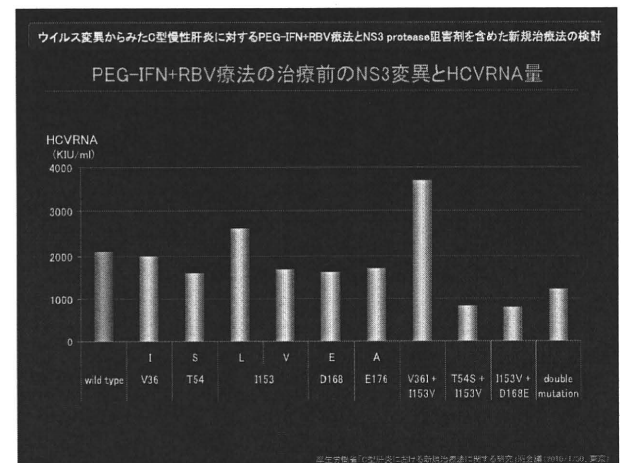
	単変量解析			多変量ロジスティック回帰分析			
	odds比	95%CI	p	odds比	95%CI	p	
年齢	<60/≥60	0.435	0.267-0.710	0.0009	0.069	0.019-0.411	0.0020
性別	M/F	0.633	0.395-1.013	0.0568	-	-	-
BMI	<23/≥23	2.155	1.242-3.740	0.0063	-	-	-
F因子	0-1/2-3	0.381	0.216-0.654	0.0005	-	-	-
A因子	0-1/2-3	0.611	0.355-1.051	0.0250	-	-	-
Alb	<4.1/≥4.1	1.006	0.593-1.708	0.9812	-	-	-
γ-GTP	<40/≥40	0.477	0.283-0.805	0.0056	-	-	-
ALT	<62/≥62	1.490	0.906-2.450	0.1165	-	-	-
AST	<35/≥35	0.672	0.406-1.114	0.1234	-	-	-
T.bil	<170/≥170	1.225	0.731-2.050	0.4410	-	-	-
血糖	<97/≥97	0.905	0.509-1.612	0.7449	-	-	-
HbA1c	<5.2/≥5.2	1.028	0.540-1.959	0.9319	-	-	-
白血球数	<4700/≥4700	1.127	0.681-1.866	0.6409	-	-	-
好中球数	<2300/≥2300	1.187	0.671-2.102	0.5553	-	-	-
Hb	<14/≥14	1.945	0.805-2.246	0.2360	-	-	-
血小板数	<15/≥15	2.377	1.421-3.975	0.0010	-	-	-
AFP	<4.8/≥4.8	0.448	0.252-0.828	0.0065	-	-	-
HCV RNA (IU/ml)	<6.0/≥6.0	0.455	0.114-0.466	0.0033	-	-	-
ISDR変異数	0/1	2.570	1.580-4.161	0.0001	11.800	2.728-51.052	0.0010
IRRDR変異数	≤3/≥4	7.572	3.040-18.863	<0.0001	20.049	3.714-108.218	0.0005
コア70	0/R	2.513	1.242-5.088	0.0104	-	-	-
コア91	I/M	0.580	0.288-1.167	0.1265	-	-	-
IL28B(rs8099917)	GG+TG/TT	7.794	2.451-24.779	0.0005	14.049	2.807-75.104	0.0014
ITPA(rs1127354)	CC/AA+AC	1.110	0.453-2.715	0.6196	-	-	-

治療効果 (Sustained viral response) と宿主変異 (ITPA) との関連性に関する研究 (n=261) による。

しかし、ITPA 遺伝子については治療開始後の貧血とは関連あることが示されたがSVRとの統計学的な差はみられなかった。



PEG-IFN+Ribavirin 治療開始前の261例の検討では、NS3領域にHCV-1との比較で何らかの変異が見られた症例が13%(34/261)存在したが、変異の存在する症例34例と変異の見られない227例について、臨床背景ISDR変異数、コア70番アミノ酸変異、および治療経過ならびに最終治療効果につき検討したが、いずれにも差はなかった。これらのウイルス量はV36I+I153V、T54S+I153V、I153V+D168Eの変異をもつ症例の治療開始前のHCV RNA量を検討したが、I153LやV36I+I153Vでウイルス量が多い傾向にあり、T54S+I153V、I153V+D168Eではウイルス量が少ない傾向にあったが統計学的には有意差はなかった (図2)。



D. 考察

1) C型慢性肝炎に対するインターフェロン治

療の治療効果はHCVのウイルス遺伝子変異と宿主因子がそれぞれ独立に規定していることが明らかになった。とくに1b型ではISDRやIRRDRなどのウイルス因子とIL28BのSNPがそれぞれ独立に治療効果を規定しており、治療開始前にこれらを測定することが重要と考えられた。とくにIRRDRの変異数が3個以下であり、IL28BがTGもしくはGGの症例は現行のPEG-IFN+RBVの48週治療では根治は見込めず、近々使用可能となるHCV NS3 protease阻害剤を含めた新規治療法の適応症例と考えられた。また、ITPA SNPはPEG-IFN+RBV療法における貧血と関連し、A/CまたはC/C症例では治療開始後の4週間後のHb値やHb低下率に有意な差を認めた。しかし治療成績に統計学的な有意な差が出なかったのは、治療医がHb量と低下量・率を詳細にモニターしつつ、RBVが中止にならないよう適切に減量して治療継続した結果であると考えられた。しかし、今後のprotease阻害剤を含めた3剤併用療法では、さらに強い貧血が認められる可能性があることから、ITPA遺伝子の測定はさらに大きな意義を持つ可能性が示唆された。

2) 一方、HCV NS3領域のアミノ酸変異の検討では、PEG-IFN+Ribavirin併用療法開始前に既報のNS3 protease阻害剤の耐性変異を獲得している症例も見られたが、この変異は、PEG-IFN+Ribavirin併用療法の治療効果とは関連なかった。しかし、ウイルス量には若干の相違もあり、今後の3剤併用療法を行う際に、検討すべきものと考えられた。また、protease阻害剤を含めた3剤併用療法の抵抗例では、耐性変異の検討も必要となる可能性も考えられた。しかし現行のP+R療法がprotease阻害剤の耐性変異を誘導することはなく、P+R無効例にprotease阻害剤を含めた新規治療法を行うことに障害はないものと考えられた。

E. 結論

PEG-IFN+Ribavirin併用療法の治療効果は年齢やIL28Bの宿主因子のほかに、IRRDR変異数

などに規定され、これらを検討することで現行治療法でも治癒可能な症例とprotease阻害剤を含めた新規治療法の適応例を選択可能であることが示された。しかし、新規治療法の開始にあたっては、protease阻害剤未投与例でもすでにHCV NS3領域に耐性変異を獲得しているHCV株が存在していることや、ITPA SNP genotypeによっては高度な貧血が生じる症例も存在することなどを念頭に置く必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Hepatol Int; in press
- 2) Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Tamori A, Nakagawa M, Uehashi H, Izumi M. Sequences in the Interferin Sensitivity Determining Region and Core Region of Hepatitis C Virus Impact Pretreatment Prediction of Response to Peg-interferon Plus Ribavirin: Data Mining Analysis. J Med Virol; 83: 445-452, 2011
- 3) Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugauchi M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in *IL28B* and viral factors. J Hepatol 54: 439-448, 2011

- 4) Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Yatsushashi H, Izumi M. Pretreatment prediction of response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C using detemining analysis. J Gastroenterol 2010 Sep (On line first)
- 5) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. HCV 全アミノ酸解析を用いた PEG-IFN/RBV 併用療法の治療反応性の検討、消化器内科 51(6): 642-651, 2010
- 6) 坂本穰、榎本信幸. 山梨県における肝炎対策、肝胆膵 61(5)、763-771, 2010
- 7) 坂本穰、榎本信幸. HCV ゲノム解析からみた治療方針、最新医学 65(9)、1892-1900, 2010
- 8) 坂本穰、榎本信幸. 肝臓領域における検査法の進歩と臨床応用、日本内科学会雑誌 99: 1959-1964, 2010
- 9) 坂本穰、榎本信幸. 遺伝子変異と Adherence からみた peg-IFN+RBV 療法無効例の対策、消化器内科 50(6): 575-580, 2010
- 10) 坂本穰、榎本信幸. 慢性肝炎の治療(C型)、今日の消化器疾患治療指針第3版(幕内雅敏、菅野健太郎、工藤正俊編)、医学書院、東京 585-588, 2010
- 11) 坂本穰、榎本信幸. ウイルス遺伝子から見た C 型肝炎治療、Vita 27(2). 32-38, 2010
- 12) 三浦美香、坂本穰、榎本信幸. 最新の検査と臨床 肝炎ウイルスの遺伝子解析ー病態・治療効果との関連ー C 型肝炎ウイルス (HCV) . Medical Practice 27 (1) 65-68. 2010
- 2) 井上泰輔、坂本穰、榎本信幸. ウイルス肝炎ネットワークの構築、第 38 回日本肝臓学会東部会 (ワークショップ)、東京、2010.12.3
- 3) 進藤浩子、雨宮史武、小馬瀬一樹、門倉信、末木良太、三浦美香、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. HCV replicon における IFNλ の HCV 増殖抑制効果の検討. 第 38 回日本肝臓学会東部会、東京、2010.12.3、
- 4) 三浦美香、前川伸哉、門倉信、末木良太、進藤邦明、小馬瀬一樹、進藤浩子、雨宮史武、中山康弘、植竹智義、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸. 肝炎の進展、癌化と関連する C 型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索. 第 38 回日本肝臓学会東部会、東京、2010.12.3
- 5) 浅川幸子、坂本穰、佐藤光明、小松信俊、進藤邦明、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみた IFN 単独療法の位置づけ. 第 38 回日本肝臓学会東部会、東京、2010.12.3、
- 6) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみた C 型慢性肝炎に対する治療戦略. 第 14 回日本肝臓学会大会 (JDW) (パネルディスカッション) 横浜、2010.10.14
- 7) 坂本穰. Y-PERS から得られた、ウイルス遺伝子と宿主ゲノム解析による C 型慢性肝炎の治療方針. 第 52 回日本消化器病学会大会 (JDDW) ランチョンセミナー、横浜、2010.10.16
- 8) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. IL28B SNP による PEG-IFN/RBV 療法における HCV 動態変化の検討. 第 14 回日本肝臓学会大会 (JDW) (ワークショップ)、2010.10.14、横浜
- 9) 進藤浩子、雨宮史武、前川伸哉、小馬瀬一樹、門倉信、末木良太、三浦美香、井上泰輔、坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. HCV

2.学会発表

- 1) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異 (とくに IRRDR) と宿主ゲノム解析からみた C 型慢性肝炎に対する治療戦略. 第 38 回日本肝臓学会東部会 (パネルディスカッション)、東京、2010.12.3、

- replicon における IFN λ の HCV 増殖抑制効果の検討. 第 14 回日本肝臓学会大会 (JDW) 横浜、2010.10.14
- 10) 門倉信、前川伸哉、末木良太、三浦美香、雨宮史武、北村敬利、植竹智義、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、中川美奈、坂本直哉、榎本信幸、. ゲノム全長解析による Genotype 2b 型 HCV における治療効果規定領域の検索. 第 14 回日本肝臓学会大会 (JDW) 横浜、2010.10.14
- 11) 三浦美香、前川伸哉、末木良太、門倉信、小馬瀬一樹、進藤浩子、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸. 肝発癌に関連する C 型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索. 第 14 回日本肝臓学会大会 (JDW) 横浜、2010.10.14
- 12) 小馬瀬一樹、前川伸哉、進藤浩子、門倉信、末木良太、三浦美香、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸. Cytokine Array 解析を用いた HCV の PEG-IFN+RBV 治療効果と関連する宿主因子の同定. 第 14 回日本肝臓学会大会 (JDW) 横浜、2010.10.14
- 13) K. Komase, S. Maekawa, H. Shindo, M. Kadokura, R. Sueki, M. Miura, K. Shindo, F. Amemiya, Y. Nakayama, T. Inoue, M. Sakamoto, N. Enomoto. Extensive analysis of Serum Cytokines Associated to The Response in The PEG-IFN+RBV Combination Therapy in Genotype 1b HCV Infection. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses (HCV2010). Yokohama, Japan. September 10-14, 2010,
- 14) H. Shindo, S. Maekawa, R. Sueki, M. Miura, M. Kadokura, K. Komase, K. Shindo, F. Amemiya, Y. Nakayama, T. Inoue, M. Sakamoto, N. Enomoto. Characterization of Protease Inhibitor Resistance Mutations in Untreated Patients Infected with Genotype 1b Hepatitis C Virus. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses (HCV2010). Yokohama, Japan. September 10-14, 2010.
- 15) M. Miura, S. Maekawa, M. Kadokura, R. Sueki, K. Komase, H. Shindo, F. Amemiya, Y. Nakayama, T. Kitamura, T. Uetake, T. Inoue, M. Sakamoto, S.-I. Okada, N. Enomoto. Investigation for viral genomic regions associated to hepatocarcinogenesis in hepatitis C. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses (HCV2010). Yokohama, Japan. September 10-14, 2010.
- 16) S. Maekawa, R. Sueki, A. Kanayama, M. Miura, M. Kadokura, K. Komase, H. Shindo, T. Omori, F. Amemiya, T. Kitamura, T. Inoue, M. Sakamoto, N. Enomoto. Analysis of the early response and the final outcome to pegylated-interferon plus ribavirin therapy in chronic HCV-1b infection using comprehensive information of viral and host factors. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses (HCV2010). Yokohama, Japan. September 10-14, 2010.
- 17) 三浦美香、前川伸哉、末木良太、門倉信、小馬瀬一樹、進藤浩子、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸. HCV ゲノム解析による肝発癌に関連する C 型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索. 大阪、第 46 回日本肝臓学会 2010.7.8
- 18) 坂本穰、前川伸哉、坂本穰. IRRDR からみた PEG-IFN/RBV 療法の治療成績. 第 4 回東京肝疾患研究会 (PERFECT)、東京、2010.6.26
- 19) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノムからみたインターフェロン治療効果と個別化医療の可能性. 第 46 回日本肝臓学会総会 (シンポジウム)、山形、2010.5.27
- 20) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. HCV 全アミノ酸解析を用いた PEG-IFN/RBV 併用治

- 療反応性の包括的検討. 第 46 回日本肝臓学会総会 (ワークショップ)、山形、2010.5.27
- 21) 進藤浩子、前川伸哉、小馬瀬一樹、門倉信、末木良太、三浦美香、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸、朝比奈靖浩、泉並木、中本安成、本多政夫、金子周一. HCV プロテアーゼ阻害剤未投与例における HCV-NS3 領域変異の検索と PEG-IFN/RBV 治療効果の検討. 第 46 回日本肝臓学会総会、山形、2010.5.27、
- 22) 門倉信、前川伸哉、末木良太、三浦美香、雨宮史武、北村敬利、植竹智義、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸、中川美奈、坂本直哉. ゲノム全長解析による Genotype 2 型 HCV における治療効果規定領域の検索. 第 46 回日本肝臓学会総会、山形、2010.5.27
- 23) 小馬瀬一樹、前川伸哉、進藤浩子、門倉信、末木良太、三浦美香、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸. HCV genotype 1b に対する PEG-IFN+ribavirin 併用療法症例における cytokine 発現の網羅的解析. 第 46 回日本肝臓学会総会、山形、2010.5.27
- 24) 三浦美香、前川伸哉、進藤浩子、小馬瀬一樹、末木良太、門倉信、雨宮史武、北村敬利、植竹智義、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸. HCV ゲノム解析による肝発癌に関連する C 型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索. 第 46 回日本肝臓学会総会、山形、2010.5.27
- 25) 雨宮史武、進藤浩子、前川伸哉、金山明日香、進藤邦明、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸. IFN- λ による HCV 増殖抑制効果. 第 46 回日本肝臓学会総会、山形、2010.5.27
- 26) 坂本穰、前川伸哉、進藤浩子、三浦美香、門倉信、進藤邦明、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、岡田俊一、榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみた C 型肝炎
- 肝炎に対するインターフェロン治療効果予測. 第 20 回日本抗ウイルス療法研究会学術講演会、熊本、2010.5.20
- 27) 三浦美香、前川伸哉、門倉信、末木良太、小馬瀬一樹、進藤浩子、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸. HCV ゲノム解析による肝発癌に関連する C 型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索. 第 20 回日本抗ウイルス療法研究会学術講演会、熊本、2010.5.20
- 28) 進藤浩子、前川伸哉、小馬瀬一樹、末木良太、門倉信、三浦美香、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、金子周一、泉並木、榎本信幸. HCV プロテアーゼ阻害剤未投与例における HCV-NS3 領域変異の検索と PEG-IFN/RBV 治療効果の検討. 第 20 回日本抗ウイルス療法研究会学術講演会、熊本、2010.5.20
- 29) S. Maekawa, A. Kanayama, T. Omori, M. Miura, M. Kadokura, R. Sueki, K. Komase, H. Shindo, F. Amemiya, K. Shindo, T. Kitamura, T. Inoue, M. Sakamoto, S.-I. Okada, N. Enomoto. Analysis of the response to pegylated-interferon plus ribavirin therapy in chronic HCV-1b infection using comprehensive information of viral and host factors. 45th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL2010). Vienna, Austria, April 14-18, 2010.
- 30) H. Shindo, S. Maekawa, M. Miura, K. Komase, M. Kadokura, R. Sueki, F. Amemiya, T. Kitamura, T. Inoue, M. Sakamoto, S.-I. Okada, N. Enomoto. Characterization of protease inhibitor resistance mutations in untreated patients infected with genotype 1b hepatitis c virus. 45th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL2010). Vienna, Austria, April 14-18, 2010.

- 31) 坂本穰、進藤邦明、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、前川伸哉、岡田俊一、榎本信幸。C型慢性肝炎の診療ガイドラインの検証と個別化治療の可能性。第96回日本消化器病学会総会、新潟、2010.4.24
- 32) 前川伸哉、三浦美香、門倉信、末木良太、小馬瀬一樹、進藤浩子、金山明日香、大森高子、雨宮史武、進藤邦明、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸。ウイルスゲノム解析によるC型肝炎病態、および薬剤感受性の解析。第96回日本消化器病学会総会、熊本、2010.4.23

H.知的所有権の出願・取得状況

- 1.特許取得
特になし
- 2.実用新案登録
特になし
- 3.その他
特になし

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（肝炎分野）

分担研究報告書

C型慢性肝炎における PEG-IFN/RBV 併用療法の治療効果とサイトカインの関連

研究分担者 梅村武司 信州大学医学部消化器内科 講師

研究要旨：C型慢性肝炎患者に対する PEG-IFN/RBV 併用療法では、治療中に血中 C 型肝炎ウイルスが陰性化しない無効例が 2 割程度存在する。本研究では、Luminex beads assay を用いて各種サイトカインの動態を測定し、この PEG-IFN/RBV 併用療法無効例との関連を検討した。治療前 IL-10 高値または IL-12 低値の症例では無効例が有意に多い傾向がみられた。IL-10 はウイルス側の因子であるコア 70 の変異と相関を認めた。さらに、IL-10 と IL-12 はそれぞれ IL-28B SNPs(rs8099917)メジャーアレル、ヘテロ+マイナーアレルと有意な相関を示した。多変量解析による無効に寄与する因子の解析では、IL-28B SNP(ヘテロ+マイナーアレル)、高 IL-10 値、低 IL-12 値がそれぞれ独立した因子であった。以上の結果より、IL-28B に加えて血清 IL-10、IL-12 の測定が PEG-IFN/RBV 併用療法に対する無効例の予測因子になり得ることが明らかとなった。無効が強く予測される症例ではプロテアーゼ阻害薬やポリメラーゼ阻害薬などの新規治療薬の登場を待って抗ウイルス療法を行うことが効率的であり、血中サイトカインの測定はこのような無効例の選択に有用であることが示唆された。

共同研究者

信州大学医学部 消化器内科
松本晶博、田中榮司

ウイルス量の C 型肝炎患者 79 例を対象とした。治療開始前、治療開始 4 週、治療終了後 24 週の保存血清を用いて、Luminex™ サイトカインアッセイシステムにて血清サイトカイン (IL-10、IL-12) を測定した。ウイルス側要因として core 領域 70 と 91 および ISDR のアミノ酸変異について解析した。52 症例については IL28B 近傍の SNP (rs8099917) を測定し、治療効果に関与する因子について検討した。(倫理面の配慮)

研究の目的・方法・副作用・患者に関する個人情報、守備義務、患者の権利・保護等に関し、十分に説明し、文書で同意を取得して研究を行っている。本研究は信州大学医学部倫理委員会の承認を受けて行っている。

A. 研究目的

C 型肝炎患者に対する PEG-IFN/RBV 併用療法では治療中に血中 C 型肝炎ウイルスが陰性化しない無効例が 2 割程度存在する。血清サイトカイン濃度は肝病変の進展、IFN 治療効果と相関があると報告されているが、網羅的に測定し、検討をした報告はない。本研究では、Luminex beads assay を用いて各種サイトカインの動態を測定し C 型肝炎患者における PEG-IFN/RBV 併用療法無効例の予測を行い、今後の新規治療法を行う際のマーカーになり得るかを検討した。

B. 研究方法

PEG-IFN /RBV 併用療法を施行した 1 型・高

C. 研究結果

SVR 群 (31 例) と non-SVR 群 (48 例) における治療前血清サイトカイン値の比較では、IL-12 が SVR 群で、IL-10 は non-SVR 群で有意

に高値であった。血清 IL-10 はコア 70 が変異型の患者より野生型の患者で有意に高値であった (P=0.045)。IL-10、IL-12 は SVR 群では治療前、治療 4 週目、治療終了 24 週後と有意に低下していた。

IL28B SNPs(rs8099917)についてはメジャーアレルでは IL-10 (P=0.01)が低値、IL-12 (P=0.006)が高値であった。血清 IL-10 値と IL-28B SNPs からみた無効率は IL-28B SNP (メジャーアレル) では IL-10 高値例では低値例と比較して有意に高く (50% vs. 0%; P=0.003)、IL-28B SNP (ヘテロ+マイナーアレル) でも (87% vs. 0%; P=0.001) 同様の傾向を認めた (図 1)。無効に寄与する因子について多変量解析を施行すると IL-28B SNP (ヘテロ+マイナーアレル)、高 IL-10 値、低 IL-12 値がそれぞれ独立した因子であった (表 1)。

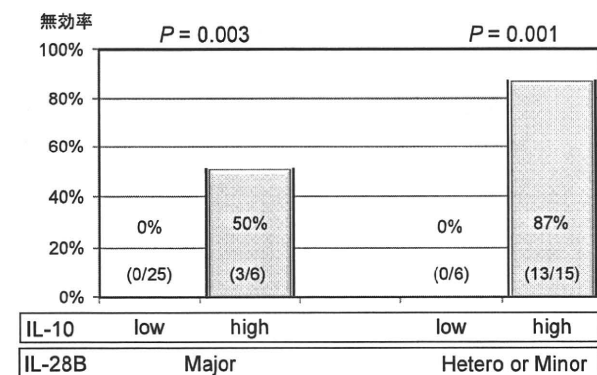


図1: 血清IL-10値とIL-28B SNPからみた無効率の比較

表1: 多変量解析を用いた無効に関与するマーカーの同定

	OR (95% CI)	P
IL-28B TT	1	
TG+GG	10.4 (1.7 - 63.0)	0.011
血清 IL-10 < 5.0 (pg/mL)	1	
= 5.0	1.2 (1.0 - 1.4)	0.019
血清 IL-12 < 17.4 (pg/mL)	1	
= 17.4	0.8 (0.7 - 1.0)	0.021

D. 考察

IL28B SNP に加え、治療前血清 IL-10 および IL-12 値を測定することにより PEG-IFN+RBV 併用療法の治療無効例をより効率的に予測することが可能であった。現在、PEG-IFN+RBV

併用療法が C 型肝炎に対する最も強力な抗ウイルス療法であるが、近々、プロテアーゼ阻害薬やポリメラーゼ阻害薬などの新規治療薬が登場する。このため、PEG-IFN+RBV 併用療法に対して無効が強く予測される症例では新規治療法の登場を待つことがより効率的と考えられる。今回の研究で得られた知見は、このような無効例の選択に有用であることが示唆された。

IL-10 と IL-28B の受容体は IL-10RB で共通している。しかし、両者の関連は十分には解明されておらず、今後の検討が必要である。

E. 結論

IL-28B SNPs に加え、血清 IL-10 と IL-12 の測定は PEG-IFN+RBV 併用療法に対する無効例の予測に有用であった。無効が強く予測される症例では新規抗ウイルス薬の登場を待つことも一つの選択肢と考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoneda S, Umemura T, Katsuyama Y, Kamijo A, Joshita S, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Ota M, Tanaka E. Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients. J Infect Dis in press
- 2) Umemura T, Zen Y, Nakanuma Y, Kiyosawa K. Another cause of autoimmune hepatitis. Hepatology 2010;52:389-390.
- 3) Joshita S, Umemura T, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Tanaka E, Nakamura M, Ishibashi H, Ota M, the Shinshu PBC Study Group. Association analysis of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms

with primary biliary cirrhosis in Japanese patients. J Hepatol 2010;53:537-541.

4) Joshita S, Umemura T, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Tanaka E, Ota M, the Shinshu PBC Study Group. A2BP1 as a novel susceptible gene for primary biliary cirrhosis in Japanese patients. Hum Immunol 2010;71:520-524.

2. 学会発表

1) Yoneda S, Umemura T, Katsuyama Y, Kamiyo A, Joshita S, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Ota M, Tanaka E. Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients. The 7th APASL Single Topic Conference Makuhari, Japan, December 17, 2010

2) 梅村武司、米田傑、松本晶博 C型慢性肝炎のPEG-IFN/RBV併用療法におけるサイトカイン・ケモカイン測定の意義 第14回日本肝臓学会大会 横浜 平成22年10月14日

3) 米田傑、梅村武司、上條敦、森田進、城下智、小松通治、一條哲也、松本晶博、吉澤要、田中榮司 1型高ウイルス量のC型慢性肝炎患者におけるPEG-IFN/RBV併用療法の治療効果とサイトカイン・ケモカインとの関連 第46回日本肝臓学会総会 山形 平成22年5月27日

H. 知的所有権の出願・取得状況

今回の研究内容については特になし。

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（肝炎分野）

分担研究報告書

サイクロフィリンインヒビターを用いた慢性 C 型肝炎治療に関する研究

研究協力者 井上和明 昭和大学消化器内科 准教授

研究要旨：サイクロフィリンインヒビターは宿主因子をターゲットにしたユニークな HCV の治療薬であり、我々が治療のコンセプトを提供してこれまで欧州で治験が行われてきた。今後日本で実用化する為に早期の PK study は必須である。

A. 研究目的

インターフェロンとサイクロスポリンAの併用療法が慢性C型肝炎の治療におけるSVRを向上させたことが嚆矢となり、サイクロスポリンがHCVの増殖に関連する宿主因子として同定され、それを標的にした治療薬の開発が進んでいる。サイクロスポリンはサイクロフィリンの阻害作用に加えて、カルシニューリンの阻害作用を持つために、免疫抑制作用に加えて血管系に作用して血圧上昇や腎障害などの有害事象を引き起こすことが知られている。そこでカルシニューリン阻害作用の無いサイクロスポリンアナログが治療薬の候補となり、いくつかの薬剤の治験が海外で行われた。その中でもPhase IIの後期まで進んでいるのがDEBIO-025であるが、Phase Iからこれまで対象とした正常人及び慢性C型肝炎患者はすべてヨーロッパ人を対象としており、日本人を対象とした試験は行われていなかった。今後本邦で治験を進めるために日本人とヨーロッパ人を比較するためのPhase I study を企画した。

B. 研究方法

対象は30名の日本人と30名のCaucasianである。DAY1にはstandard breakfastの30分後に240mlの水と一緒にDEBIO-025を400ミリ、600ミリ、800ミリまたはプラセボを服用して

PK profileを検討する。また21日後より7日間朝晩の二回、それぞれDEBIO-025を400ミリ、600ミリ、800ミリまたはプラセボを服用してPK studyを検討する。

また朝食を日本食（低カロリー低脂肪）とした場合とFDA 朝食（高カロリー高脂肪）とした場合の単回投与PK studyも同時に検討を行う。

（倫理面の配慮）

ヘルシンキ宣言および EMEA の指針に従って行う。

C. 研究結果

現在治験は進行中である、数例の結果からは日本人とCaucasianのPKに若干の差がある可能性も考えられた。

D. 考察

日本人とCaucasianのPKに差がある場合は薬物の投与量を勘案する必要がある。PKデータを考慮に入れて今後の検討を進めたい。

E. 結論

Drug ラグを解消するためにも早期にPKを検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inoue K, Watanabe T, Hirasawa H, Yoshiba M. Liver support systems as perioperative care in liver transplantation - historical perspective and recent progress in Japan. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2010; 56: 345-353
- 2) Inoue K, Watanabe T. Japanese-style intensive medical care improves prognosis for acute liver failure and the perioperative management of liver transplantation. *Transplant Proc* 2010; 42: 4109-4112
- 3) Nuriya H, Inoue K, Tanaka T, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Kaji K, Hayashi S, Kaneko S, Kohara M. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3843-3851

2. 学会発表

- 1) Inoue K, Kohara M. Impairment of interferon regulatory factor-3 dimer formation by hepatitis C virus core protein facilitates evasion of the host interferon system. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL 2010, Vienna, Austria)
- 2) 井上和明, 与芝真彰. 急性肝不全患者の肝移植術前の人工肝補助療法に求められるもの. 第36回日本急性肝不全研究会, 山形.
- 3) Inoue K, Yamamura E, Watanabe T, Yoshiba M. Prediction and early intervention improved the survival rate of patients with fulminant hepatic failure. *Digestive Disease Week 2010 (DDW 2010, New Orleans, U.S.A.)*
- 4) Inoue K, Yamamura E, Watanabe T, Yoshiba M. Originally developed intensive medical care for fulminant hepatic failure improved patients' survival rate and also safely bridge patients to liver transplantation. *Digestive Disease Week 2010 (DDW 2010, New Orleans,*

U.S.A.)

H. 知的所有権の出願・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