

与える影響の評価

HCV NS5a 領域 ISDR の変異数がインターフェロン治療の感受性に影響を与えることが報告されている。JFH-1 株は Genotype 2a のプロトタイプ株である J6 株と比較すると 10 のアミノ酸が異なっている。また、AHC-1b 株は genotype 1b の ISDR 野生型の配列と比べると 7 つ変異がある。そこで、まず JFH-1 株の ISDR を genotype 1b 野生型、AHC-1b 株、genotype 2a プロトタイプである J6 株それぞれの ISDR に置換し、培養細胞内での増殖複製への影響を検討した。さらに AHC-1b 株の ISDR を genotype 1b 株野生型に置き換え、その影響も検討した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトゲノムに関する検討は行っていない。各種組換え DNA を用いた感染ウイルス生成および感染実験は、大臣確認申請を行い承認されている。

C. 研究結果

1. HCV JFH-1 株の HCV コア蛋白変異が増殖と IFN への抵抗性に及ぼす影響の検討

コア領域の 70 番目と 91 番目のアミノ酸変異が、IFN リバビリン併用療法におけるウイルス学的無効・有効率と非常に高い相関を示し、また肝発癌にも関与していることが報告されている。そこで、両変異のウイルス増殖に与える影響を明らかにするため、培養細胞で増殖が確認されている genotype 2a の JFH-1 株にこのコア領域の変異を導入し、増殖に与える影響について検討した。

コア領域の 70 番目と 91 番目のアミノ酸が、Wild Wild(WW)、Mutant Mutant(MM)、Wild Mutant(WM)、Mutant Wild(MW)の 4 種類の JFH-1 株を準備し、培養細胞に全長の RNA を導入後、細胞内および培養上清中のコア蛋白量を測定した。その結果、培養上清中のコア蛋白

量に差はなく、細胞内では 1 日目に 70 番目の変異がある株でやや立ち上がりが遅かったが 5 日目には差がなくなっており、コア領域の変異はこの細胞内での JFH-1 株の増殖および培養上清中へのウイルス放出にほとんど影響を与えないと考えられた。

次に、これらの変異株の導入した細胞の培養上清に IFN を加えて増殖抑制効果をみたところ、どの株でも JFH-1 株の増殖が抑制され、コア変異による影響はほとんどみられなかった。この原因として、コア変異は genotype 1b 症例で報告されているのに対し、今回用いた JFH-1 株が genotype 2a であるためと考え、改めて genotype 1b の株で検討することとした。

2. AHC-1b 株の HCV コア蛋白変異が増殖および IFN への反応性に及ぼす影響の検討

用いた株は genotype 1b の AHC-1b 株である。この AHC-1b 株はルシフェラーゼを用いたサブジェノミックレポーターレプリコンでその増殖を観察しても、ほかの 1b 株由来のレプリコンと同様に増殖はほとんどみられない。しかし、この株のネオマイシンを持ったサブジェノミックレプリコンを培養細胞に導入し、長期選択培養することで得られた NS5A 領域の 2 つの変異(5A-S/Y、5A-S/G)を導入すると、培養細胞中でレプリコンの増殖が強く認められるようになった。また、全長の AHC-1b 株にこの NS5A 領域の変異を導入することで培養細胞内での増殖複製の観察が可能であった。

そこで、この AHC-1b 株を用いてコア領域変異の与える影響について検討したところ、コア蛋白変異を導入した株と野生株で細胞中および上清中のコア蛋白量にほとんど差を認めず、これらのコア蛋白における変異は 1b 株においても培養細胞内での増殖複製に影響を与えないことがわかった。さらに JFH-1 株と同様に、IFN の添加による影響を検討したが、いずれのコア領域変異株も IFN により増殖が抑制され、

これらの変異による影響は認められなかった。

3. NS5a 領域 ISDR の変異がウイルス増殖および IFN に対する反応性に及ぼす影響の検討

次に NS5a 領域の ISDR の変異が HCV の培養細胞内での増殖複製に与える影響についても検討を行った。

まず、サブジェノミックレポーターレプリコンを用いて増殖能への影響を検討したが、ISDR を置換した株でも通常の JFH-1 株と比べて増殖能に差を認めなかった。次に ISDR を置換した株の全長 RNA を導入した細胞でも培養細胞内、培養上清中のコア蛋白量を測定し、増殖能に与える影響を検討したが、やはり ISDR の置換により差を認めなかった。さらに、これらの株で IFN 投与による反応性を検討したところ、IFN 投与によりすべての株でその増殖が抑制され、ISDR の違いによる影響はみられなかった。

次に、AHC-1b 株の ISDR を genotype 1b 株野生型に置き換え、その影響を検討した。その結果、培養細胞内および培養上清中のコア蛋白量が大きく低下したことから、ISDR 野生型配列は genotype 1b でのみ培養細胞内での増殖を抑制することがわかった。また、この AHC-1b 株の ISDR 置換株に IFN を添加した検討では、通常の AHC-1b 株も ISDR を野生型に置き換えた株も IFN 添加によって同じように複製抑制が認められ、ISDR の置換により IFN に対する感受性はほとんど変化しないという結果であった。

D. 考察

培養細胞中での複製増殖が可能な 2 種類の HCV 株 (JFH-1 株 ; Genotype 2a、AHC-1b 株 ; Genotype 1b) を用い、コア領域と NS5a 領域 ISDR の変異が培養細胞内ウイルス複製と IFN 感受性に与える影響について評価した。その結果、コア領域の変異はこのウイルスの複製

増殖にほとんど影響を与えず、IFN に対する感受性も変異による差を認めなかった。また、ISDR の置換による検討では AHC-1b 株の ISDR を genotype 1b 野生型の ISDR に置き換えることにより、AHC-1b 株の培養細胞中での増殖能は低下した。しかし、この影響は JFH-1 株では認められなかった。この違いはおそらく、ISDR の機能が genotype に特異的であるか、もしくはその ISDR の違いによる効果が JFH-1 株の強い増殖能のため検出できなくなっているのではないかと考えられた。また、培養細胞での IFN 投与実験においては JFH-1 株でも AHC-1b 株でも ISDR 置換による IFN 感受性の変化は観察されなかった。

今回、培養細胞を用いた IFN 投与による増殖抑制については差を認めなかった。その原因として、現在 HCV の増殖実験に使われている細胞が Huh7 を中心とした細胞であり、その細胞側因子の関与が考えられる。われわれが使っている細胞で IFN 投与による IFN 誘導遺伝子の発現について検討を行う必要が有ると考えられた。

E. 結論

以上のような結果から、コア領域の変異は HCV の増殖や IFN 感受性に影響を与えていなかった。ISDR の変異については、genotype 1b 株での検討では野生型で培養細胞での増殖は低下していたが、IFN の感受性については明らかな影響を認めなかった。今後、これらの変異が宿主側因子に与える影響としてアポトーシス誘導能やインターフェロンシグナルに与える影響を検討する必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y,

Mizokami M, Suzuki T, Wakita T.
Biological properties of purified
recombinant HCV particles with an
epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys
Res Commun*, 395, 565-571, 2010.

2. Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D,
Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y,
Mizokami M, Wakita T, Toyoda T. RNA
polymerase activity and specific RNA
structure are required for efficient HCV
replication in cultured cells. *PLoS Pathog*,
6, e1000885, 2010.

2. 学会発表

1. 加藤孝宣、脇田隆字. C型肝炎ウイルスの生

体内での感染様式と培養細胞での増殖能.
第45回日本肝臓学会総会、山形、2010年
5月。

2. 加藤孝宣、岡本有加、村山麻子、政木隆博、
脇田隆字. HCVの増殖適応変異とその意義
シンポジウム6:ウイルス培養系を用いたC型
肝炎ウイルスの性状と病原性の解明.
第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、
2010年11月。

G. 知的所有権の出願 ・ 登録状況
なし

B 型肝炎ウイルスによる肝発癌

研究分担者： 小池和彦 東京大学医学部（病）・教授

研究要旨： B 型慢性肝炎においては、肝硬変に至らない初期の慢性肝炎や若年者においても肝癌が発生する。また、多中心性の発癌も認められる。ウイルス肝炎における肝発癌機序として、免疫を介した持続性炎症とウイルス自体の発癌作用が想定されている。持続性炎症はウイルス肝炎における肝発癌において重要な因子であるが、B 型肝炎における肝発癌は炎症のみでは説明し難い。また、近年には患者において、血中 B 型肝炎ウイルス（HBV）量が発癌の有意なリスクであることも示されてきている。肝発癌機序としては、HBV ゲノムの宿主遺伝子への組込み、HBV 蛋白の働きなどが想定されてきているが、中でも HBV の X 遺伝子産物（HBx 蛋白）は発癌への関与が実験的に示されている。本年度、我々は HBx 蛋白が癌遺伝子産物様タンパク Pituitary tumor-transforming gene1(PTTG1)/Securin を安定化されタンパク量を増加させることによって、B 型肝炎における肝発癌・悪性化に関与していることを明らかにした。発癌活性をもつウイルス蛋白の存在は、多段階発癌の 1 ステップを進展させ、高頻度かつ多中心性の肝発癌をもたらすと考えられる。本研究の成果によって、HBV キャリアにおける肝発癌の抑制法の開発が期待される。

A. 研究目的

肝発癌と B 型肝炎ウイルス（HBV）感染症との関連性は、ヒトにおける臨床データによって強固に裏付けられている。これらのウイルス肝炎における肝発癌機序としては、ふたつの仮説が存在する。

ひとつは、HBV に対する免疫によって引き起こされる持続性炎症（肝炎）によって、肝細胞の壊死とそれに引き続く肝細胞再生が繰り返される課程で、癌遺伝子や癌抑制遺伝子などの細胞遺伝子変異の発生が促進され、それらが蓄積することによって癌細胞が出現して肝発癌に至るという考え方である。この仮説では、HBV は間接的にのみ肝発癌に関わることになる。しかしながら、B 型肝炎に発生する肝癌は、他の臓器の癌に比べて「高頻度かつ多

中心性」という特徴をもつ。むろん、炎症は肝発癌に大きな役割を果たしているであろうが、炎症だけで、この「高頻度かつ多中心性の発癌」を説明できるかは疑問といえる。炎症の強い肝炎である自己免疫性肝炎においては、たとえ肝硬変へと至った後でも肝癌の発生は稀である。また、肝癌においては、炎症によってどのような細胞遺伝子に変異が蓄積していくのかも不明である。肝癌では、他の多くの臓器の癌とは異なり、共通の細胞遺伝子変異が見つかっていないことも「炎症肝発癌説」の弱みである。また、B 型慢性肝炎においては、肝硬変に至らない初期の慢性肝炎や若年者においても肝癌が発生するという特徴が存在する。

すなわち、炎症のみで B 型肝炎における肝発癌を単純に説明することは困難である。これが、

ふたつ目の仮説である「HBVの直接的肝発癌作用」の登場する理由である。「直接関与説」では、HBVゲノムの宿主遺伝子への組込みや肝炎ウイルス蛋白の肝発癌作用が想定されている。本研究においては、B型肝炎における肝発癌機序をウイルスの面から解析し、発癌抑制法の開発を目指す。

B. 方法

15人の肝生検施行HBV関連慢性肝疾患を臨床・病理・分子医学的に検討した。HBV-X遺伝子トランスジェニックマウスを免疫組織学的に検討した。

培養細胞Chang liver、Chang liver pX-34 (p34x)、AML12 4p、AML12 4pX cells (4pX) も用いられた。

肝組織はPituitary tumor-transforming gene1(PTTG1)に対する抗体、HBxに対する抗体等によって免疫染色を行った。ユビキチン化、cell cycle等の解析も行った。

C. 結果

1) HBV関連HCCにおいては、PTTG1染色性が増強していた。B型慢性肝炎では染色性は弱く、肝硬変、肝癌へと進展するにつれて増強した。二重染色では、PTTG1とHBxの分布は一致していた。

2) X遺伝子トランスジェニックマウス肝においてもPTTG1タンパク量は前癌病変、肝癌へと進展するにつれて増強した。二重染色では、PTTG1とHBxの分布は一致していた。

3) 培養細胞Chang liver、Chang liver pX-34 (p34x)を用いた検討で、HBxがPTTG1の発現を増強することが確認された。

4) HBxによるPTTG1タンパクの増加は、posttranscriptionalに起こっていた。

5) PTTG1はリン酸化後にユビキチン化され、プロテアゾームで分解される。HBxはリン酸化されたPTTG1のユビキチン化を阻害していた。リン酸化PTTG1は、PP2A阻害後(okadaic

acid)に、HBx発現下にものみMG132(プロテアゾーム阻害薬)不在で検出された。すなわち、HBxはリン酸化PTTG1の分解を阻害する。また、PTTG1とHBxは共局在していた。HBx発現細胞をMG132で処理してもユビキチン化PTTG1は増加しなかった。対照タンパクであるOccludinのユビキチン化はHBxの影響を受けなかった。

6) HBxはPTTG1とSCF(Skp1-Cull-F-box) protein complexとの相互作用を阻害した。HBxはCullと相互作用・共在していた。

7) B型肝炎ウイルスのHBxは、癌遺伝子PTTG1タンパクのユビキチン化を阻害しPTTG1量を増加させ、肝腫瘍の悪性化、転移性の獲得等に関与していると考えられる。

D. 考察

B型肝炎における肝発癌機序として、HBVゲノムの組込み、染色体組替え亢進などと並んで、トランス活性化蛋白であるX遺伝子産物(HBx蛋白)が挙げられる。HBx蛋白の働きとして、他の遺伝子の発現を上げるトランス活性化機能がある。実験系では癌遺伝子の発現をも増強する。HBV自身のエンハンサーを活性化して、HBVの増殖を調節するという働きもつ。HBx蛋白はMAPキナーゼ等の細胞内のシグナル伝達を亢進させ、細胞増殖をもたらす働きが示されている。さらに、細胞周期やアポトーシスに影響を与え、細胞増殖と細胞死の双方に影響を与えている。

3つの独立したグループによるトランスジェニックマウスを使った研究で、HBx蛋白の肝発癌作用が示されている。HBx蛋白はいわゆる癌遺伝子産物ほどの発癌作用はもたないが、細胞増殖/死を調節することで、肝臓における癌化にウイルス因子として関与していると推測される。

この様に、HBx蛋白はB型肝炎における肝発癌や悪性転化、浸潤能増強において重要な役割を演じていると考えられるが、今回の我々の

結果は、HBxによる肝発癌における下流シグナルの一つの可能性を示すものであり、今後、この系の抑制等、治療に関連した方策の開発が期待される。

E. 結論

B型肝炎における肝発癌機序としてHBx蛋白による働きが明らかになってきている。HBxから細胞増殖、肝発癌へ至る経路の一つとして、PTTG1分解の阻害による蓄積という経路が今回示されたと考えられる。今後、この系の抑制等、治療に関連した方策の開発が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe S, Enomoto N, Koike K, Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M. Prolonged treatment with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin improves sustained virological response in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan. *Hepatol Res* 2010;40:135-44.
- 2) Tejima K, Masuzaki R, Ikeda H, Yoshida H, Tateishi R, Sugioka Y, Kume Y, Okano T, Iwai T, Gotoh H, Katoh S, Suzuki A, Koike Y, Yatomi Y, Omata M, Koike K. Thrombocytopenia is more severe in patients with advanced chronic hepatitis C than B with the same grade of liver stiffness and splenomegaly. *J Gastroenterol* 2010;45:876-84.
- 3) Sakamoto A, Ishizaka Y, Toda EI, Nagai R, Koike K, Yamakado M, Ishizaka N. Impact of Changes in Obesity Parameters on Glucose Metabolism and Insulin Resistance Over a One-Year Period. *J Atheroscler Thromb* 2010 in press.
- 4) Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inoue Y, Nishikawa T, Ikeda H, Seyama Y, Kokudo N, Shibahara J, Fukayama M, Koike K, Shirataki H, Fujiwara K. Expression of alpha-taxilin in hepatocellular carcinoma correlates with growth activity and malignant potential of the tumor. *Int J Oncol* 2010;37:1417-23.
- 5) Moriya K, Miyoshi H, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie H, Goto K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells. *J Med Virol* 2010;82:776-92.
- 6) Masuzaki R, Shiina S, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sugioka Y, Kondo Y, Goto T, Ikeda H, Omata M, Koike K. Utility of Contrast Enhanced Ultrasonography with Sonazoid in Radiofrequency Ablation for Hepatocellular Carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2010 in press.
- 7) Koike K, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K. Lipid metabolism and liver disease in hepatitis C viral infection. *Oncology* 2010;78 Suppl 1:24-30.
- 8) Koike K, Moriya K, Matsuura Y. Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatol Res* 2010;40:69-82.
- 9) Kanamori H, Yuhashi K, Ohnishi S, Koike K, Kodama T. RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus binds to its coding region RNA stem-loop structure, 5BSL3.2, and its negative strand. *J Gen Virol* 2010;91:1207-12.
- 10) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Yamakado M, Koike K, Nagai R. Association between gamma-glutamyltransferase levels and insulin resistance according to alcohol consumption and number of cigarettes smoked. *J Atheroscler Thromb*

2010;17:476-85.

- 11) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda A, Tani M, Koike K, Yamakado M, Nagai R. Changes in waist circumference and body mass index in relation to changes in serum uric acid in Japanese individuals. *J Rheumatol* 2010;37:410-6.
 - 12) Ishizaka N, Hongo M, Matsuzaki G, Furuta K, Saito K, Sakurai R, Sakamoto A, Koike K, Nagai R. Effects of the AT(1) receptor blocker losartan and the calcium channel blocker benidipine on the accumulation of lipids in the kidney of a rat model of metabolic syndrome. *Hypertens Res* 2010;33:263-8.
 - 13) Ikeda H, Ohkawa R, Watanabe N, Nakamura K, Kume Y, Nakagawa H, Yoshida H, Okubo S, Yokota H, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Koike K, Yatomi Y. Plasma concentration of bioactive lipid mediator sphingosine 1-phosphate is reduced in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2010;411:765-70.
 - 14) Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res* 2010;85:520-4.
2. 学会発表
- 1) Masuzaki, R., R. Tateishi, S. Shiina, H. Yoshida, H. Nakagawa, T. Arano, K. Uchino, K. Enooku, E. Goto, Y. Kondo, T. Goto, Y. Sugioka, H. Ikeda, M. Omata, K. Koike. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma recurrence by transient elastography after curative radiofrequency ablation. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). 2010. Vienna, Austria.
 - 2) Uchino, K., R. Tateishi, S. Shiina, T. Arano, K. Enooku, E. Goto, R. Masuzaki, H. Nakagawa, Y. Kondo, T. Goto, M. Omata, H. Yoshida, K. Koike. Clinical features of advanced hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). 2010. Vienna, Austria.
 - 3) Arano T, Nakagawa H, Yoshida H, Tateishi, R., Uchino Y, Enooku K, T. Sato, R. Masuzaki, T. Ohki, E. Goto, Goto, R. Masuzaki, Y. Kondo, T. Goto, Shiina S, M. Omata, K. Koike. Association between serum adiponectin level and the risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.
 - 4) Kojima K, Otsuka M, Takata A, Yoshikawa T, Kato N, Tateishi R, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. miRNA-122, a liver-specific miRNA, is a key regulator for bridging the clinical phenomena between alpha-feto-protein expression and biologically malignant phenotype in HCC. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.
 - 5) Tanoue Y, Tomiya T, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Shirataki H, Ikeda H, Koike K, Fujiwara K. Insulin-like growth factor I stimulates proliferation and protein production in rat hepatocytes through an mTOR signaling pathway. The 62th Annual Meeting of the American

- Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.
- 6) Takahashi H, Okuse C, Yamada N, Takatsu Y, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Suzuki M, Koike K, Itoh F. Hepatitis B virus clearance in acute hepatitis is prolonged in genotype A HBV infection. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.
- 7) Tsutsumi T., Goto K, Fujinaga H, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Suzuki T, Koike K. Association of the substitution of amino acid 75 in the hepatitis virus core region with IL-8 upregulation and hepatocarcinogenesis. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, 2010.
- 8) Li W, Muroyama R, Hu Z, Kawatari N, Goto T, Chang JH, Yoshida H, Omata M, Koike K, Kato N. Amino acid substitutions in genotype 1b HCV core protein and response to PEG-IFN/RBV treatment. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, 2010.
- 9) Yuhashi K, Kodama T, Koike K, Kanamori H. Identification of hepatic mRNA 3'-untranslated regions that bind to HCV NS5B. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, 2010.
- 10) 工藤洋太郎, 立石敬介, 田中康雄, 山本恵介, 金井文彦, 小俣政男, 小池和彦. 脂肪肝から肝発がんを呈する新たなモデルマウスの作成と解析. 第47回日本臨床分子医学会学術総会. 2010. 東京.
- 11) 大塚基之, 高田朱弥, 小島健太郎, 前田慎, 立石敬介, 池上恒雄, 平田善裕, 建石良介, 椎名秀一郎, 吉田晴彦, 小池和彦. microRNA machinery 構成因子 DDX20 の発現低下に伴う microRNA 機能の減弱によって惹起される肝発癌経路の同定. 第47回日本臨床分子医学会学術総会. 2010. 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表
(2010年4月1日～2011年3月31日迄)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
El-Shamy A, Shoji I, Saito T, Watanabe H, Ide YH, Deng L, Kawata S, <u>Hotta H.</u>	Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/ribavirin combination therapy.	Microbiol Immunol		In press	2011
El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, <u>Hotta H.</u>	Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated Interferon/Ribavirin combination therapy.	Intervirolgy		In press	2011
Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, <u>Hotta H.</u> , Kawata S.	Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C.	J Med Virol	82(8)	1364-1370	2010
Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang D-P, Ide Y-H, <u>Hotta H.</u>	17 β -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus.	Microbiol Immunol	54 (11)	684-690	2010
Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, <u>Hotta H.</u> , Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I.	E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1.	J Cell Biochem	111 (3)	676-685	2010
Sasase N, Kim SR, Kudo M, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hayashi Y, Shoji I, El-Shamy A, <u>Hotta H.</u>	Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads	Intervirolgy	53(1)	49-54	2010

	of serum HCV RNA genotype 1b.				
Kim SR, Imoto S, Kudo M, Nakajima T, Ando K, Mita K, Fukuda K, Hong HS, Lee YH, Nakashima K, Shoji I, Nagano-Fujii M, <u>Hotta H</u> , Hayashi Y.	Autoimmune thrombocytopenic purpura during pegylated interferon alpha treatment for chronic hepatitis C	Intern Med	49 (12)	1119-1122	2010
Kim SR, Imoto S, Kudo M, Mita K, Taniguchi M, Kim KI, Sasase N, Shoji I, Nagano-Fujii M, El-Shamy A, <u>Hotta H</u> , Nagai T, Nagata Y, Hayashi Y.	Double-filtration plasmapheresis plus IFN for HCV-1b patients with non-sustained virological response to previous combination therapy: early viral dynamics	Intervirology	53(1)	44-48	2010
Nishise Y, Saito T, Makino N, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Ikeda C, Kubota I, Daimon M, Kato T, Fukao A, <u>Kawata S</u>	Relationship between alcohol consumption and serum adiponectin levels: The Takahata Study - A cross-sectional study of a healthy Japanese population.	J Clin Endocrinol Metab	95(8)	3828-3835	2010
Hattori E, Shu HJ, Saito T, Okumoto K, Haga H, Yokozawa J, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, <u>Kawata S</u>	Expression of the RNA-binding protein Musashi1 in adult liver stem-like cells.	Hepatol Res	40(4)	432-437	2010
Nishise S, Takeda Y, Fujishima S, Orii T, Sato T, Sasaki Y, Nishise Y, Takeda H, <u>Kawata S</u>	Release of interleukin 1 receptor antagonist by combining a leukocyte adsorption carrier with ulinastatin.	Ther Apher Dial	14(4)	386-391	2010
伊藤純一、鈴木明彦、宇賀神智、佐藤智佳子、芳賀弘明、石井里佳、三條麻衣、奥本和夫、西瀬雄子、渡辺久剛、齋藤孝治、齋藤貴史、河田純男	高齢者に発症した肝動脈化学塞栓療法(TACE)後のガス産生肝膿瘍の1例	日本高齢消化器病学会誌	12	83-87	2010

Okuyama S, <u>Marusawa H</u> , Matsumoto T, Ueda Y, Matsumoto Y, Endo Y, Takai A, Chiba T.	Excessive activity of APOBEC2 contributes to liver and lung tumorigenesis.	Int J Cancer		In press	2011
Endo Y, <u>Marusawa H</u> , Chiba T.	Involvement of activation-induced cytidine deaminase in the development of colitis-associated colorectal cancers.	J Gastroenterol	46	6-1	2010
Matsumoto Y, <u>Marusawa H</u> , Kinoshita K, Niwa Y, Sakai Y, Chiba T.	Upregulation of activation-induced cytidine deaminase causes genetic aberrations at the CDKN2b-CDKN2a in gastric cancer.	Gastroenterology	139 (6)	1984-1994	2010
<u>Marusawa H</u> , Chiba T.	Helicobacter pylori-induced activation-induced cytidine deaminase expression and carcinogenesis.	Curr Opin Immunol	22 (4)	442-447	2010
Ikeda K, Maeda S, Ashihara H, Nagahama H, Tanaka M, <u>Sasaki Y</u> .	Transcatheter arterial infusion chemotherapy with cisplatin-lipiodol suspension in patients with hepatocellular carcinoma.	J Gastroenterol	45(1)	60-67	2010
Dessouki O, Kamiya Y, Nagahama H, Tanaka M, Suzu S, <u>Sasaki Y</u> , Okada S	Chronic hepatitis C viral infection reduced NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by anti-viral treatment.	Biochem Biophys Res Commun	393	331-337	2010
Naoe H, Araki K, Nagano O, Kobayashi Y, Ishizawa J, Chiyoda T, Shimizu T, Yamamura K, <u>Sasaki</u> Y, Saya H and Kuninaka S.	The anaphase -promoting complex/cyclosome activator cdh1 modulates Rho GTPase by targeting p190 RhoGAP for degradation.	Mol Cell Biol	30 (16)	3994-4005	2010

<u>Sasaki Y</u>	Insulin resistance and hepatocarcinogenesis	Clin J Gastroenterol	3	271-278	2010
Tateyama M, Yatsuhashi H, Taura N, Motoyoshi Y, Nagaoka S, Yanagi K, Abiru S, Komori A, Migita K, Nakamura M, Nagahama H, <u>Sasaki Y</u> , Miyakawa Y, Ishibashi H.	Alpha-fetoprotein above normal levels as a risk factor for the development of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C virus.	J Gastroenterol	46	92-100	2011
福林光太郎, 田中基彦 佐々木裕	特集 肝胆膵 薬物治療学の進歩 - この30年 低用量 CDDP/5-FU 肝動注化学療法	肝胆膵	61	1125-1130	2010
Tripathi L P, Kataoka C, Taguwa S, <u>Moriishi K</u> , Mori Y, Matsuura Y, Mizuguchi K.	Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions.	Mol Biosyst	6	2539-2553	2010
Tanaka Y, Mori Y, Tani H, Abe T, <u>Moriishi K</u> , Kojima H, Nagano T, Okabe T, Suzuki T, Tatsumi M, Matsuura Y.	Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus.	Microbiol Immunol	54	206-220	2010
<u>Moriishi K</u> , Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y.	Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus.	Hepatology	52	411-420	2010
<u>Ariumi Y</u> , Kuroki M, Maki M, Ikeda M., Dansako H, Wakita T, Kato N.	The ESCRT system is required for hepatitis C virus production.	PLoS One	6(1)	e14517	2011
Mori K, Ikeda M, <u>Ariumi Y</u> , Kato N.	Gene expression profile of Li23, a new human hepatoma cell line that enables robust hepatitis C virus replication: Comparison with HuH-7 and other hepatite cell lines.	Hepatol Res	40 (12)	1248-1253	2010
Ikeda F, Dansako H, Nishimura G, Mori K, Kawai Y, <u>Ariumi</u>	Amino acid substitutions of hepatitis C virus core	Liver Int	30(9)	1324-1331	2010

Y, Miyake Y, Takaki A, Nouso K, Iwasaki Y, Ikeda M, Kato N, Yamamoto K.	protein are not associated with intracellular antiviral response to interferon- α in vitro.				
Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N.	Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system.	Virus Res		In press	2011
Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N.	Anti-ulcer agent Teprenone inhibits hepatitis C virus replication: Potential treatment for hepatitis C.	Liver Int		In press	2011
有海康雄, 黒木美沙緒, 團迫浩方, 阿部健一, 池田正徳, 脇田隆字, 加藤宣之.	DNA 損傷センサー ATM キナーゼと Chk2 は C 型肝炎ウイルスの RNA 複製に必要である.	岡山医学会雑誌	122 (1)	9-16	2010
Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T.	RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells.	PLoS Pathog	6	e1000885	2010
Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T.	Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope.	Biochem Biophys Res Commun	395	565-571	2010
Watanabe S, Enomoto N, Koike K, Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M.	Prolonged treatment with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin improves sustained virological response in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan.	Hepatol Res	40	135-144	2010

Tejima K, Masuzaki R, Ikeda H, Yoshida H, Tateishi R, Sugioka Y, Kume Y, Okano T, Iwai T, Gotoh H, Katoh S, Suzuki A, Koike Y, Yatomi Y, Omata M, <u>Koike K.</u>	Thrombocytopenia is more severe in patients with advanced chronic hepatitis C than B with the same grade of liver stiffness and splenomegaly.	J Gastroenterol	45	876-884	2010
Sakamoto A, Ishizaka Y, Toda EI, Nagai R, <u>Koike K.</u> , Yamakado M, Ishizaka N.	Impact of Changes in Obesity Parameters on Glucose Metabolism and Insulin Resistance Over a One-Year Period.	J Atheroscler Thromb	17 (12)	1246-1255	2010
Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inoue Y, Nishikawa T, Ikeda H, Seyama Y, Kokudo N, Shibahara J, Fukayama M, <u>Koike K.</u> , Shirataki H, Fujiwara K.	Expression of alpha-taxilin in hepatocellular carcinoma correlates with growth activity and malignant potential of the tumor.	Int J Oncol	37	1417-1423	2010
Moriya K, Miyoshi H, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie H, Goto K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, <u>Koike K.</u>	Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells.	J Med Virol	82	776-782	2010
Masuzaki R, Shiina S, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sugioka Y, Kondo Y, Goto T, Ikeda H, Omata M, <u>Koike K.</u>	Utility of Contrast Enhanced Ultrasonography with Sonazoid in Radiofrequency Ablation for Hepatocellular Carcinoma.	J Gastroenterol Hepatol		In press	2010
<u>Koike K.</u> , Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K.	Lipid metabolism and liver disease in hepatitis C viral infection.	Oncology	78 Suppl 1	24-30	2010
<u>Koike K.</u> , Moriya K, Matsuura Y.	Animal models for hepatitis C and related liver disease.	Hepatol Res	40	69-82	2010

Kanamori H, Yuhashi K, Ohnishi S, <u>Koike K</u> , Kodama T.	RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus binds to its coding region RNA stem-loop structure, 5BSL3.2, and its negative strand.	J Gen Virol	91	1207-1212	2010
Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Yamakado M, <u>Koike K</u> , Nagai R.	Association between gamma-glutamyltransferase levels and insulin resistance according to alcohol consumption and number of cigarettes smoked.	J Atheroscler Thromb	17 (5)	476-485	2010
Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Yamakado M, <u>Koike K</u> , Nagai R.	Changes in waist circumference and body mass index in relation to changes in serum uric acid in Japanese individuals.	J Rheumatol	37	410-416	2010
Ishizaka N, Hongo M, Matsuzaki G, Furuta K, Saito K, Sakurai R, Sakamoto A, <u>Koike K</u> , Nagai R.	Effects of the AT(1) receptor blocker losartan and the calcium channel blocker benidipine on the accumulation of lipids in the kidney of a rat model of metabolic syndrome.	Hypertens Res	33	263-268	2010
Ikeda H, Ohkawa R, Watanabe N, Nakamura K, Kume Y, Nakagawa H, Yoshida H, Okubo S, Yokota H, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, <u>Koike K</u> , Yatomi Y.	Plasma concentration of bioactive lipid mediator sphingosine 1-phosphate is reduced in patients with chronic hepatitis C.	Clin Chim Acta	411	765-770	2010
Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, <u>Koike K</u> , Wakita T, Suzuki T.	Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin.	Antiviral Res	85	520-524	2010

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Polymorphisms of Hepatitis C Virus Non-Structural Protein 5A and Core Protein and Clinical Outcome of Pegylated-Interferon/Ribavirin Combination Therapy

Ahmed El-Shamy^{a, c} Soo-Ryang Kim^b Yoshi-Hiro Ide^a Noriko Sasase^b
Susumu Imoto^b Lin Deng^a Ikuo Shoji^a Hak Hotta^a

^aDivision of Microbiology, Center for Infectious Diseases, Kobe University Graduate School of Medicine, and

^bDivision of Gastroenterology, Kobe Asahi Hospital, Kobe, Japan; ^cDepartment of Virology, Suez Canal University Faculty of Veterinary Medicine, Ismalia, Egypt

Key Words

Hepatitis C virus · Non-structural protein 5A · Interferon/ribavirin resistance-determining region · Interferon sensitivity-determining region · Core protein · Sustained virological response · Prediction

Abstract

Objective: Hepatitis C virus (HCV genome) polymorphisms are thought to influence the outcome of pegylated-interferon/ribavirin (PEG-IFN/RBV) therapy. This study aimed to examine non-structural protein 5A (NS5A) polymorphisms, e.g. IFN/RBV resistance-determining region (IRRDR) and IFN sensitivity-determining region (ISDR), and core protein polymorphism as predictive therapeutic markers. **Methods:** Pre-treatment sequences of NS5A and core regions were analyzed in 68 HCV-1b-infected patients treated with PEG-IFN/RBV. **Results:** Of 24 patients infected with HCV having an IRRDR with 6 or more mutations (IRRDR \geq 6), 18 (75%) patients achieved sustained virological response (SVR), whereas only 11 (25%) of 44 patients infected with HCV having IRRDR \leq 5 did. IRRDR \geq 6 was significantly associated with SVR ($p < 0.0001$). On the other hand, ISDR \geq 2 was significant-

ly associated with relapse (either before [breakthrough] or after end-of-treatment response [ETR-relapse]) ($p < 0.05$) and a point mutation of the core protein from Arg to Gln at position 70 (Gln⁷⁰) was significantly associated with null-response ($p < 0.05$). Multivariate analysis identified IRRDR \geq 6 as the only viral genetic factor that independently predicted SVR. **Conclusion:** NS5A (IRRDR and ISDR) and core protein polymorphisms are associated with the outcome of PEG-IFN/RBV therapy for chronic hepatitis C. In particular, IRRDR \geq 6 is a useful marker for prediction of SVR.

Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is the major cause of chronic liver diseases worldwide [1]. As a consequence of the long-term persistence of chronic hepatitis C, the number of patients with hepatocellular carcinoma is expected to increase further over the next 20 years [2]. To reduce the impact of this worldwide health problem, efficient treatment is required. Currently, a combination therapy of pegylated-interferon- α and ribavirin (PEG-IFN/RBV) is a

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2011 S. Karger AG, Basel
0300-5526/11/0000-0000\$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/int

Hak Hotta, MD, PhD
Division of Microbiology, Center for Infectious Diseases
Kobe University Graduate School of Medicine
7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017 (Japan)
Tel. +81 78 382 5500, Fax +81 78 382 5519, E-Mail hotta@kobe-u.ac.jp

standard treatment for chronic hepatitis C [3]. However, this therapy is sometimes difficult to tolerate and results in a sustained virological response (SVR) in only ~50% of patients, especially those infected with the most resistant genotypes, HCV-1a and HCV-1b [3]. Given the considerable side effects, the possibility of discontinuation and the high cost of this treatment, prediction of treatment outcome is needed. An expanded range of predictors may assist clinicians and patients in more accurately assessing the likelihood of an SVR and thus in making more informed treatment decisions [4].

Since the HCV genotype is one of the major factors affecting the IFN-based therapy response, IFN resistance is, at least partly, genetically encoded by HCV itself [5]. In this context, non-structural protein 5A (NS5A) has been widely discussed for its correlation with IFN responsiveness. Enomoto et al. [6] proposed that sequence variations within a region in NS5A spanning from amino acids (aa) 2,209 to 2,248, called the IFN sensitivity-determining region (ISDR), is correlated with IFN responsiveness. Recently, we identified a new region near the C-terminus of NS5A spanning from aa 2,334 to 2,379, which we referred to as the IFN/RBV resistance-determining region (IRRDR) [7]. The degree of sequence variation within IRRDR was significantly associated with the clinical outcome of PEG-IFN/RBV combination therapy. On the other hand, prediction of SVR by aa substitutions within the core protein in Japanese patients infected with HCV-1b has also been proposed [8, 9]. In multivariate analysis, the criterion of double-wild core, presence of Arg at position 70 and Leu at position 91 (Arg⁷⁰/Leu⁹¹), was identified as an independent SVR predictor.

This study aimed to examine NS5A polymorphisms, including those in IRRDR and ISDR, and core polymorphism as predictive markers for HCV treatment outcome. The core protein with Arg⁷⁰/Leu⁹¹ was defined as wild-core while the other patterns as non-wild-core. The possible correlation of either Arg⁷⁰ alone or Leu⁹¹ alone with the clinical outcome of PEG-IFN/RBV therapy was also examined.

Patients and Methods

Patients

A total of 68 patients seen at Kobe Asahi Hospital in Kobe, Japan, who were chronically infected with HCV-1b, with diagnoses based on anti-HCV antibody detection and HCV-RNA detection, were enrolled in the study. HCV subtype was determined as according to the method of Okamoto et al. [10]. Patients were treated with PEG-IFN α -2b (Pegintron[®]; Schering-Plough, Kenilworth,

N.J., USA) (1.5 μ g/kg b.w., once weekly, s.c.) and RBV (Rebetol[®]; Schering-Plough) (600–800 mg daily, per os), according to a standard treatment protocol for Japanese patients established by a hepatitis study group of the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan. All patients received >80% of scheduled dosage of PEG-IFN and RBV. Serum samples were collected from the patients at intervals of 4 weeks before, during and after the treatment, and tested for HCV RNA and core antigen titers as reported previously [11].

The study protocol was approved beforehand by the Ethic Committee in Kobe Asahi Hospital, and written informed consent was obtained from each patient prior to the treatment.

Sequence Analysis of HCV NS5A and Core

HCV RNA was extracted from 140 μ l of serum using a commercially available kit (QIAmp viral RNA kit; Qiagen, Tokyo, Japan). Amplification of full-length NS5A and core regions of the HCV genome were performed as described elsewhere [7, 11, 12]. The sequences of the amplified fragments of NS5A and core regions were determined by direct sequencing. The aa sequences were deduced and aligned using Genetyx Win software version 7.0 (Genetyx Corp., Tokyo, Japan).

Statistical Analysis

Statistical differences in the patients' baseline parameters according to the degree of IRRDR polymorphism were determined by Student's t test for numerical variables and Fisher's exact probability test for categorical variables. Likewise, statistical differences in treatment responses according to NS5A and core polymorphisms were determined by Fisher's exact probability test. Kaplan-Meier HCV survival curve analysis was performed based on serum HCV-RNA positivity data during the treatment period (48 weeks) according to NS5A and core polymorphisms. The data obtained were evaluated by the log-rank test. Uni- and multivariate logistic analyses were performed to identify variables that independently predicted the treatment outcome. Variables with a p value of <0.1 in univariate analysis were included in a multivariate logistic regression analysis. The odds ratios and 95% confidence intervals (95% CI) were also calculated. All statistical analyses were performed using SPSS version 16 software (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA). Unless otherwise stated, a p value <0.05 was considered as statistically significant.

Nucleotide Sequence Accession Numbers

The sequence data reported in this paper have been deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence databases under the accession numbers AB285035 through AB285081, AB354116 through AB354118, and AB518774 through AB518861.

Results

Patients' Responses to PEG-IFN/RBV Combination Therapy

Among 68 patients enrolled in this study, HCV-RNA negativity was achieved by 8 (12%) patients at week 4 (rapid virological response [RVR]), 36 (53%) patients at week 12 (early virological response [EVR]), 47 (69%) patients at

Table 1. Proportions of various virological responses of patients treated with PEG-IFN/RBV

Virological response	Proportion, patients	
	n/total	%
RVR	8/68	12
EVR	36/68	53
ETR	47/68	69
SVR	29/68	43
Non-SVR	39/68	57
Null-response	17/68	25
ETR-relapse	18/68	26
Breakthrough	4/68	6

PEG-IFN/RBV = Pegylated-interferon/ribavirin; RVR = rapid virological response; EVR = early virological response; ETR = end-of-treatment response; SVR = sustained virological response.

week 48 (end-of-treatment response [ETR]) and 29 (43%) patients at week 72 (SVR) (table 1). A total of 39 patients (57%) failed to achieve SVR and they were referred to as non-SVR. Non-SVR can be further divided into three categories: (i) null-response, which is defined by continued presence of serum HCV RNA during the entire period of the treatment and follow-up; (ii) breakthrough, defined as transient disappearance of HCV RNA followed by its re-appearance before the end of the 48-week treatment, and (iii) ETR-relapse, defined by re-appearance of HCV RNA after ETR has been achieved. Seventeen (25%) patients were null-response while 18 (26%) and 4 (6%) patients were ETR-relapse and breakthrough, respectively (table 1).

Correlation between NS5A Polymorphism and Treatment Responses

Using a receiver operating characteristic curve analysis, 6 mutations in IRRDR were previously estimated as an optimal cutoff number of mutations for SVR prediction [7]. Initially the correlation between the patients' demographical, hematological, biochemical and virological baseline parameters and the degree of IRRDR polymorphism was examined. This analysis revealed that patient's sex was the only factor that significantly correlated to the degree of IRRDR polymorphism since 49% (17/35) of males were infected with HCV isolates having IRRDRs with 6 mutations or more (IRRDR \geq 6) compared to 21% (7/33) of females ($p = 0.02$) (table 2). HCV-RNA titers or HCV core antigen titers did not differ significantly between patients infected with HCV isolates of IRRDR \geq 6 and those of IRRDR \leq 5.

Next, the possible correlation between IRRDR polymorphism and the ultimate treatment responses was examined. Among 24 patients infected with HCV isolates of IRRDR \geq 6, 18 (75%), 6 (25%), 3 (12.5%) and 3 (12.5%) patients were SVR, non-SVR, null-response and relapse (ETR-relapse *plus* breakthrough), respectively (table 3). By contrast, among 44 patients infected with HCV isolates of IRRDR \leq 5, 11 (25%), 33 (75%), 14 (32%) and 19 (43%) patients were SVR, non-SVR, null-response and relapse (ETR-relapse *plus* breakthrough), respectively. The proportions of different treatment responses among HCV isolates with IRRDR \geq 6 and IRRDR \leq 5 were significantly different. Furthermore, patients infected with HCV isolates with Ala at position 2360 (Ala²³⁶⁰) in IRRDR had a more significant likelihood of SVR than those infected with HCV isolates with non-Ala²³⁶⁰, who tended to be non-SVR, in particular null-response (table 3; fig. 1).

As the IRRDR polymorphism was closely correlated with the ultimate treatment responses, it was also significantly correlated with the on-treatment responses, in particular EVR and ETR (table 4). However, there was no significant correlation between the IRRDR polymorphism and RVR. Also, the presence of Ala²³⁶⁰ was correlated significantly with ETR.

Regarding the analysis of ISDR polymorphism and its correlation to the treatment responses, first, the criterion of ISDR with 4 mutations or more (ISDR \geq 4), the initial criterion of IFN responsiveness proposed by Enomoto et al. [6] was tested. Since the prevalence of ISDR \geq 4 was only 9% (6/68) of all isolates analyzed, this criterion did not significantly correlate with the treatment responses (data not shown). Next, the correlation between the treatment responses and ISDR mutations at a cutoff point of 2 mutations, a newly proposed ISDR criterion of PEG-IFN/RBV responsiveness [13, 14] was tested. Although there was no significant difference in the proportions of SVR and non-SVR between HCV isolates with ISDR of 2 mutations or more (ISDR \geq 2) and those of ISDR \leq 1, a small but significant difference in the proportions of SVR and relapse (ETR-relapse *plus* breakthrough) was observed between ISDR \geq 2 and ISDR \leq 1 (table 3). Interestingly, ISDR polymorphism was the only virological factor examined in this study that showed a significant correlation with RVR (table 4). However, this correlation disappeared when further time points of treatment course, such as EVR and ETR, were considered.