

図2 リアルタイムPCR法で判定したHCV消失時期とウイルス学的治療効果
ペグインターフェロン $\alpha 2b$ ・リバビリン併用48週療法での検討。中止例を除く

SVR率は100%であった(図2)。また、9～12週の陰性化例でも75%の症例でSVR率が得られた。それに対して、13～24週に陰性化した症例では再燃率が高く、48週投与でのSVR率は47%で、さらに24週以降に陰性化した症例からは1例もSVRが得られなかった。したがって、HCV-RNA陰性化時期の遅れた症例における治療後の再燃をいかに減らすかが、治療成績を向上させるためには大変重要な課題となる。

治療中のウイルス学的反応による最適投与期間の設定

そこで最近では、治療前のgenotypeとウイルス量による画一的な治療法から、個々の症例における治療中のウイルス学的反応性により、最適な治療期間を設定する治療法が行われている。すなわち、HCV-RNAの陰性化が遅れ13週以降36週以内に消失するいわゆるlate virological responder(LVR)に対して72週への延長投与が行われており、現在厚生労働省B型・C型肝炎治療標準化研究班(熊田博光班長)のガイドラインでは、治療開始12週時点でHCV-RNAの2log低下を認め、リアルタイムPCR法で13～36週に陰性化した症例に対しては72週投与が推奨されている。実際に当院でのインターフェロン $\alpha 2a$ ・リバビリン併用72週療法を検討してみると、投与例の年齢の中央値は64歳で女性が86%を占めており、いわゆる難治例の集団と考えられるにもかかわらず

ず、SVR率は60%で60歳以上の症例や女性でもそれぞれ60%、62%と良好な成績が得られている。

再燃に関する因子の検討と72週延長投与の推奨の拡大

HCV-RNAの陰性化時期のほかに、治療後の再燃に関する治療前因子がないかを検討するために、当院においてペグインターフェロン $\alpha 2b$ ・リバビリン併用48週療法を行った症例について再燃因子を解析した。その結果、単変量解析では、年齢、過去のインターフェロン治療効果、ヘモグロビン値、血小板数、肝組織の脂肪化、ISDR変異が有意であった。さらに、多変量解析では年齢とISDR変異が独立因子として抽出され、すなわち高齢者やISDRが野生型の症例は48週治療後の再燃が多いことがわかった。

先に述べたように、治療後の再燃には治療中のHCV-RNA消失時期が強く関連するため、HCV-RNA消失時期別に年齢とISDRで層別化してその再燃率を検討した(図3)。それによると、リアルタイムPCR法で9～12週にHCV-RNAが陰性化した症例において、60歳未満の症例やISDR非野生型の症例では治療後再燃を認めなかったのに対し、60歳以上かつISDR野生型の症例では48週治療では再燃が認められた。一方、リアルタイムPCR法で13～24週にHCV-RNAが陰性化したLVR例での再燃率は総じて高率だが、60歳未満かつISDR非野生型症例の再燃率は低率であった。

したがって、現在の標準治療であるペグインターフェロン α ・リバビリン併用療法におけるさらなる治療効果の向上のためには、HCV-RNAの陰性化時期に加えて年齢やウイルス変異といった再燃要因を考慮して、治療期間を決定するなど治療の個別化が必要と考えられた。

ちなみに、本年度の厚生労働省治療ガイドラインでは、50歳以上の女性や血小板 $13\text{万}/\mu\text{l}$ 未満の線維化進展例では、9～12週にHCV-RNA陰性化が達成された症例においても、72週への延長投与が推奨されている。

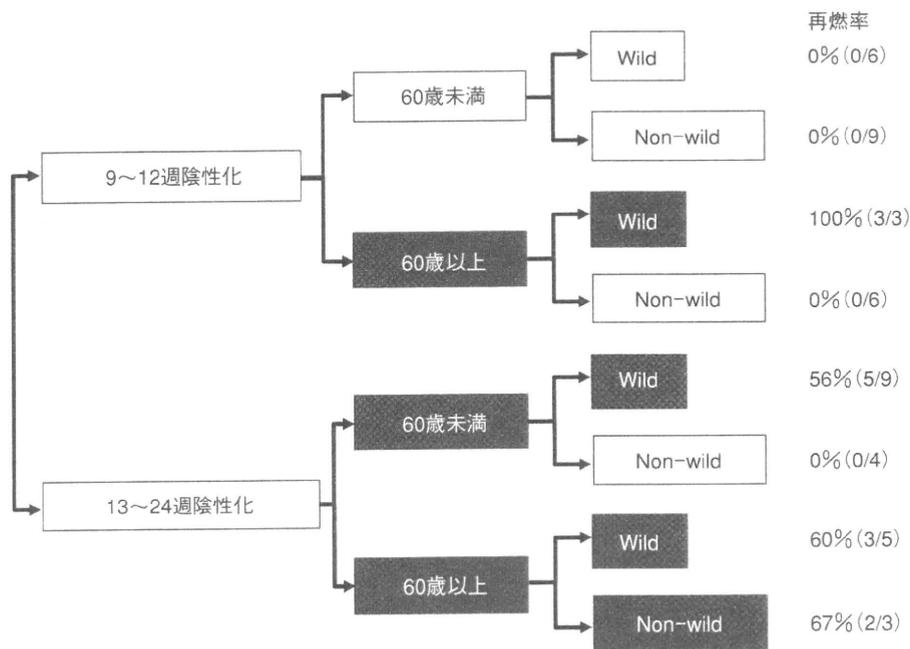


図 3 再燃因子を加味したウイルス消失時期別のペグインターフェロンα・リバビリン併用 48 週治療における再燃率

ペグインターフェロンα・リバビリン併用による再治療

わが国では 1992 年からインターフェロン治療が保険適応となっている。したがって、以前インターフェロン治療を受けたものの SVR が得られなかった症例が、相当数存在する。これらの症例においては、前回治療において SVR が得られなかった要因を検討し、適応があればペグインターフェロンα・リバビリン併用療法による再治療を行うべきと考えられる。

前回インターフェロン単独療法非著効例における、当院でのペグインターフェロンα2b・リバビリン併用療法の SVR 率は、前回無効例では 17%であったが、前回再燃例では 53%と初回治療例の 48%より良好であった。したがって、前回インターフェロン単独療法でいったん HCV-RNA の陰性化が達成された症例では、ペグインターフェロンα・リバビリン併用による再治療のよい適応と考えられる。また、ペグインターフェロンα・リバビリン併用 48 週治療の再燃例でも、72 週の

ペグインターフェロンα・リバビリン併用の再治療により SVR が得られることがある。

本年 4 月から一定の条件を満たせばペグインターフェロンα・リバビリン併用による再治療がインターフェロン医療費助成の対象となったため、臨床内科医はこれを活用し治療を推進する必要がある。実質的には、前回十分量の薬剤が投与されたペグインターフェロンα・リバビリン併用療法によっても 48 週の治療中に HCV-RNA の陰性化が得られなかった NVR 例の症例以外は、ペグインターフェロンα・リバビリン併用の再治療の適応となる。もちろん現行の治療による再治療は、新薬の開発状況をよく考慮して行われるべきであるが、高齢者など新薬開発まで待てできない症例や新薬の副作用等が懸念される症例では、現時点においてペグインターフェロンα・リバビリンによる再治療を考慮すべきを考える。

治療不応例の特徴と対策

当院の成績では、予定投与量の 80%以上の薬剤

が投与されたにもかかわらず、48週のパグインターフェロン α ・リバビリン併用療法中にHCV-RNAが陰性化しないNVRの症例を13%に認めた(図1)。これらのいわゆる治療不応例では、その背景にある機序を解明し、新薬による治療を含めた新たな対策が必要となる。

当院においてNVRに関与する治療抵抗因子を多変量解析を用いて検討すると、①HCVコア変異、②架橋形成を伴う高度線維化、③血清 γ -GTP高値、④血清クレアチニン低値が独立因子として抽出された。特に、HCVコア変異はNVRに強く関与しコア70番・91番両方に変異が認められると、NVRとなるオッズ比は8.0ときわめて高い。

一方最近、宿主の遺伝子多型とパグインターフェロン α ・リバビリン併用療法の治療効果との強い関連を指摘する報告が相次ぎ、大きな話題となっている^{3,4,5)}。すなわち、19番染色体上のIL28B(インターフェロン λ)をコードする遺伝子近傍に存在するsingle nucleotide polymorphisms(SNPs)がminor alleleである症例では、パグインターフェロン α ・リバビリン併用48週治療の治療効果がきわめて悪くNVRとなりやすいことが報告された。当院においてもC型慢性肝炎で通院中の240例においてIL28B近傍のSNPsを検討したところ、minor alleleの症例は全症例の22%に認められ、minor alleleを有する症例ではパグインターフェロン α 2b・リバビリン併用48週治療においてSVRが得られた症例は1例もなく、NVR率は88%ときわめて高率であった。minor alleleを有する症例の臨床的特徴を解析すると、HCVコア遺伝子変異を有する症例が有意に多く、非常に興味深い結果であった。そこでIL28B近傍のSNPsも因子に加えてNVRに関連する因子を多変量解析を用いて検討すると、SNPsがminor allele以外は性別(女性)のみが独立因子として抽出された。今後、SNPsとインターフェロン λ の発現や抗ウイルス効果との関連をはじめ、IL28B近傍のSNPsと治療効果にかかわる機序の解明が期待される。

自然免疫系遺伝子の肝内発現プロファイルと抗ウイルス効果

このようにパグインターフェロン α ・リバビリン併用療法における種々の難治要因が明らかとなってきたが、宿主自然免疫と治療効果についてはこれまで十分明らかではなかった。われわれはHCVの排除に重要と考えられている宿主の自然免疫機構に注目し、これらの遺伝子発現とパグインターフェロン α ・リバビリン併用療法の治療効果との関連について検討した⁶⁾。

HCVが細胞に感染すると、まずHCV由来のRNAが細胞内のウイルスセンサーであるRIG-I(retinoic acid inducible gene I)によって探知され、そのシグナルがアダプター分子であるIPS-1(IFN- β promoter stimulator-1:別名MAVS, Cardif, VISA)を介して核に伝達されIFN- β が産生される。この自然免疫の作動がHCV感染に際して生体側で起こる最初の防御機構であるとされる(図4)。一方、興味深いことにHCVのNS3/4AセリンプロテアーゼはIPS-1を分解することが示されており、HCVはRIG-I/IPS-1系を標的とすることで巧みに宿主の自然免疫系から逃れている可能性が指摘されている。したがって、RIG-I/IPS-1系は宿主によるHCVの排除およびそれに対するHCVの抵抗性に重要な鍵を握っていることは間違いないと考えられる。

そこでパグインターフェロン α 2b・リバビリン併用療法を施行した1b高ウイルス量のC型慢性肝炎74例を対象として、細胞内ウイルスセンサーであるRIG-Iや修飾・制御系分子およびアダプター分子であるIPS-1のmRNAの治療前肝生検組織における肝内発現量を定量した(図4)。その結果、RIG-Iなどの肝内遺伝子発現は、治療中HCVが減衰しないNVR群でSVR群に比し有意に1.5~4倍高発現していたのに対して、IPS-1の治療前肝内遺伝子発現はNVR群で有意に低値で、RIG-I/IPS-1比はNVRで有意に高かった(NVR:SVR=1.3:0.4)。多変量解析でNVRに関与する因子を検討すると、RIG-I/IPS-1比と血

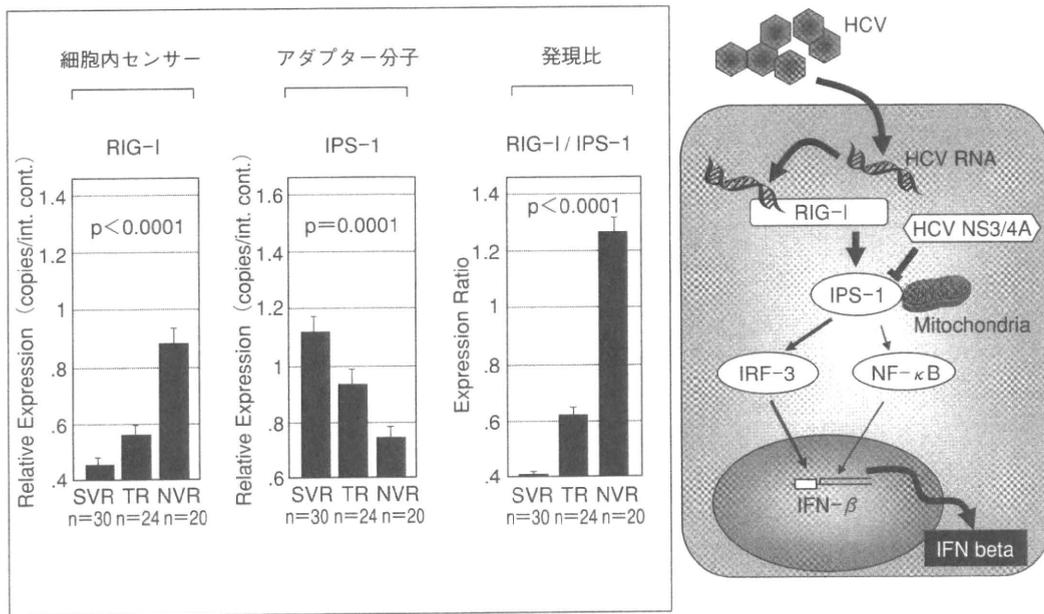


図 4 自然免疫系分子の肝内遺伝子発現とウイルス学的治療効果 (文献 6 を改変)

血小板数が独立因子として有意であり、これらの自然免疫系遺伝子の肝内発現を定量することは、これまで困難とされてきたペグインターフェロン α ・リバビリン併用療法の最終治療効果を治療前に予測するのにきわめて有用と考えられた。さらにわれわれの検討では、IL28B 近傍の SNPs とこれら自然免疫系遺伝子発現は関連があり、今後さらなる解析が期待される。

新薬の開発状況

前述のごとく、NVR 例においては現行の治療ではウイルス駆除は困難であり、新薬の開発が待たれるところである。最近の HCV に対する基礎的・臨床的研究の進歩により、HCV そのものを分子標的とした新しい抗ウイルス薬が次々に開発されてきている。HCV 遺伝子にはウイルス粒子の構成蛋白をコードする構造領域とさまざまな機能を有するウイルス蛋白をコードする非構造領域および非翻訳領域が存在する。それぞれの遺伝子領域が治療薬の標的となりうるが、最も開発が進んでいるのが HCV の非構造蛋白 NS3 セリンプロ

テアーゼを標的としたプロテアーゼ阻害薬であり、欧米において現行の標準治療に比し良好な治療成績が報告されている^{7,8)}。わが国でもインターフェロン α ・リバビリンとプロテアーゼ阻害剤の 3 剤を併用した臨床試験が進行中であり、臨床応用が期待される。

また、ポリメラーゼ阻害薬の開発も進んでいる。特に、昨年あたりからインターフェロンを用いないプロテアーゼ阻害剤とポリメラーゼ阻害剤の多剤併用療法にかかわる臨床試験が急増してきており、内服薬のみで効果的かつ副作用の少ない C 型肝炎治療が今後期待される場所である。その他、サイクロフィリンなど宿主蛋白を標的とした治療薬や抗原虫薬の開発が進んでいる。

C 型肝炎・肝がん診療と医療連携の必要性

これまで述べてきたように C 型肝炎治療は近年専門性が高くなってきているが専門医のみでは肝炎対策は進まず、かかりつけ医との医療連携が重要である。また行政的観点からも、C 型肝炎・肝がん対策はわが国における重要な課題であり、

これらの対策が十分な効果をあげるためには地域医療連携が重要とされる。実際に2010年4月の診療報酬改訂では、肝炎・肝がんの連携パスを想定した医療連携にかかわる診療報酬の算定が新設され、臨床内科医にとって連携パスを活用した医療連携の必要性がますます増加してきた。

われわれの地域では、専門医とかかりつけ医との連携にいち早く取り組み地域医療連携の体制づくりに力を注いできた。その一つとして、平成14年度から武蔵野市医師会・三鷹市医師会のメンバーとともにウイルス肝炎研究会を立ち上げ、肝炎ウイルス検診で肝炎ウイルス感染者が発見された場合のフォローアップ体制を構築し普及に努めてきた。いわゆる「三鷹・武蔵野方式」と呼ばれるフローチャートを作成し実効性のある肝炎ウイルス検診を推進するための地域医療連携を構築した。

このような地域医療連携のためのフローチャートの作成により、当地域におけるウイルス肝炎検診は一定の効果があった。しかし、さらに一歩進んで重要なことは肝炎ウイルス検診陽性者の「その後」であり、検診陽性者が専門医療機関を受診して、効果的な治療に結びついたか否かである。そのため、地域におけるかかりつけ医と専門医療期間とのさらなる密なやりとりが大切で、明確な医療連携のシステムづくりが重要と考えられる。ウイルス肝炎検診で発見された陽性者を専門医とかかりつけ医が連携して治療にあたり、さらに長期的にフォローアップできるC型肝炎から肝がん診療に至るまでの総合的な「仕組み」を構築する必要があると考えた。その「仕組み」を構築するうえで有用と考えられるものが、専門医とかかりつけ医が連携して治療を行っていく工程を明確化した「地域連携パス」である。

地域一体となった医療連携システムの構築

われわれの地域には、武蔵野市医師会と三鷹市医師会の両医師会と、杏林大学付属病院、武蔵野赤十字病院の2つの専門病院が近接して存在する全国的にも特殊な地域である。当地域に在住する

患者さんが、どの医療機関を受診しても同じような質の高い医療を受けられるように、この4者が協力して医療の均てん化と連携を図る必要性がある。

そこで、2008年度より武蔵野市・三鷹市両医師会が主導となり、杏林大学付属病院と武蔵野赤十字病院の4者会議が立ち上げられた。ここでは、ウイルス肝炎といわゆる5大がんと前立腺がんおよび脳卒中について、共通の連携パスを整備し運用する具体的な作業が行われている。各疾患のグループ・ワークとそれを統括する全体会議を数回開催し連携パスが作成され運用が開始されている。この4者会議の特色は、医師会が主導となった点と、2つの専門病院が手を取り合った点があげられ、全国的にも類をみない先駆的な取り組みといえる。この4者共通の連携パスの運用はその端緒に着いたばかりであるが、全国のモデルになるべく地域一体となって連携が推し進められている。

C型肝炎・肝がん診療における医療連携のポイント

C型肝炎を背景とする肝細胞がんには、他の臓器のがんと異なる特徴を何点か有し、このなかに肝がん診療の連携パスを作成し医療連携を構築するうえで鍵を握る問題点が3点ある。

第1点は、肝細胞がんはその原因の多くがC型肝炎ということである。すなわち、肝がんを早期発見するためのスクリーニングの対象者を囲い込むことが可能であることを意味し、かかりつけ医による疾患拾い上げが可能である。そしてC型肝炎に対するインターフェロン治療などの治療介入により、発がん予防が可能であるという点も他の臓器のがんと大きく異なる。したがって、スクリーニングと肝がんの予防治療という観点で、かかりつけ医と専門医との密な医療連携が必要である。

第2点は、肝がんはC型慢性肝炎や肝硬変が基礎に存在していることが多いため、肝予備能低下例が多いという点である。これは、日常診療を担うかかりつけ医が行う肝予備能対策やその治療の役割が大きいことを意味する。

第3点は、肝がんは再発が多いという点である。

C型肝炎の場合、肝がん局所根治後の残肝再発率は、年率20%と高頻度である。したがって、日常診療において、切れ目ない医療連携により再発の早期発見のための検査を定期的に行い、さらには再発抑止策を講じていく必要がある。

このように、地域医療連携により、肝がん早期発見のプログラムを構築し、また根治後においては肝がん再発の早期発見やその抑止対策および肝予備能を温存する対策などの対処を効果的に行うことが重要であり、疾病罹患率の低下や生命予後改善などに資する連携パスを用いた医療連携の役割はきわめて大きい。

○ C型肝炎・肝がん医療連携パスの実際

C型肝炎治療については、厚生労働省研究班により治療ガイドラインが作成されており、当地域ではこれらに準拠して各種インターフェロン療法連携パスを作成した(図5)。パス作成にあたっては、①副作用をコントロールし良好なコンプライアンスを保ち、②副作用出現時には適切に対応することにより、③インターフェロン治療を安全に完遂することを目標とした。われわれの医療連携パスでは、横長に時系列をおき、副作用や効果のチェックにもれが生じないように診療スケジュールがひと目でわかるようになっており、検査項目については必要条件是満たすが、なるべく少なくするように努めた。さらに、このパスの特徴的かつ重要な点は、それぞれに専門医に紹介する基準が明示され、基準を逸脱したか否かが単純な記号で記入されることで視覚的に患者さんの状況と対策がわかる点といえる。かかりつけ医は、定期の診療においてかかりつけ医に割り当てられた項目のデータをチェックし、それが基準を逸脱していないかのみをチェックし、その結果をこの時系列シートの欄に▲印や×印といった記号で記載すればよいというフォーマットにした。

がん診療連携パスにおいては、肝細胞がんの高危険群であるC型慢性肝炎のがんサーベイランスパスと、ラジオ波焼灼療法などで肝がんを治療

したあとのパスを作成した。肝がんのサーベイランスについては、厚生労働省の「科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン作成に関する研究班」によって、サーベイランスのアルゴリズムが作成されているので⁹⁾、これを参考にして作成した。肝がん早期発見のためには肝画像診断と腫瘍マーカー検査を定期的に行うことがポイントであるため、この医療連携パスでは、①どの項目を、②どれくらいの頻度で、③どちらの医療機関でチェックすべきかという点が簡単にわかるように作成した。肝がん治療後のパスにおいては、再発の早期発見と肝予備能温存の観点に重点をおき作成し、基本的なレイアウトは他のパスと共通とした。

○ おわりに

ペグインターフェロン α ・リバビリン併用療法が臨床応用され広く施行されるようになり、その難治要因も次第に明らかとなってきた。したがって、今後はこれらの難治要因を個々の症例において検討し的確な治療効果予測を行い、これに対してより有効な対策を講じることで、治療成績の向上をはかる必要がある。われわれ臨床内科医にとって、最新の研究動向にも注目し、日々の診療にあたることが重要である。また、わが国における肝炎・肝がん対策をより実効性のあるものにするために、各地域において医療連携を構築し推進していくことが求められる。

文 献

- 1) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al : Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. J Clin Invest. 96 : 224-230. 1995
- 2) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al : Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. N Engl J Med. 334 : 77-81. 1996
- 3) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al : Genome-

wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat Genet, 10 : 1105-1109, 2009

- 4) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al : Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature, 461 : 399-401, 2009
- 5) Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al : Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. Nature, 461 : 798-801, 2009
- 6) Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, et al : Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral

response. Gastroenterology, 134 : 1396-1405, 2008

- 7) Hézode C, Forestier N, Dusheiko G, et al : Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. N Engl J Med, 360 : 1839-1850, 2009
- 8) McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC, et al : Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. N Engl J Med, 360 : 1827-1838, 2009
- 9) 科学的根拠に基づく肝臓診療ガイドライン作成に関する研究班 編 : 科学的根拠に基づく肝臓診療ガイドライン, 金原出版, 東京, 2005, pp8-9

📌 セルフアセスメントテスト

【第1問】 以下について、間違っているものをひとつ選びなさい。

- a. C型慢性肝炎難治例である genotype 1b に対する標準治療はペグインターフェロン α ・リバビリン 48 週治療である。
- b. HCV genotype 1b に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法中の HCV-RNA 消失時期が 13~36 週の症例では 72 週の延長投与が推奨される。
- c. 50 歳以上の女性において、HCV genotype 1b に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法中の HCV-RNA 消失時期が 9~12 週以内であれば 72 週の延長投与は推奨されない。
- d. 前回インターフェロン単独療法の再燃例では、ペグインターフェロン α ・リバビリン併用療法の治療効果は、前治療歴のない初回治療例よりよい。
- e. ペグインターフェロン・リバビリン併用療法

の治療効果を規定する因子として、HCV 変異、宿主 IL28B 近傍の遺伝子多型、自然免疫系遺伝子発現があげられる。

【第2問】 以下について、間違っているものをひとつ選びなさい。

- a. わが国における肝がん死亡者数は他の先進国に比し少ない。
- b. わが国における肝細胞がんの主要原因は C 型ウイルス感染である。
- c. 肝細胞がんの予防には、インターフェロンを基本とした抗ウイルス療法による C 型肝炎の駆除が最も有効である。
- d. 肝細胞がん局所根治術後の他部位再発率は年率約 20% である。
- e. 肝細胞がん診療の医療連携において、肝がんのサーベイランスのみならず背景肝疾患の治療が重要である。

この総説は“日臨内認定医及び専門医制度単位取得企画”です。設問の解答を会誌の前方に綴じ込まれている履修単位取得用郵便振込用紙のおモチ面に記入し、ご提出ください。正解の場合は履修単位を取得できます。詳細につきましては郵便振込用紙のページをご覧ください。なお、正解は次号の編集後記の頁に掲載されます。

 **ライフサイエンス出版**

TEL (03) 3664-7900 (代表)

【禁 無断転載・複製】

C 型肝炎ウイルス感染の病態と治療法 3

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

朝比奈靖浩

あさひな やすひろ：武蔵野赤十字病院 消化器科

● はじめに

わが国では、年間約3万5千人が肝臓で死亡しており、その多くはC型肝炎ウイルス(HCV)が原因である。わが国のC型肝炎患者は高齢化しており、他の先進国とは異なり、その発がんリスクが高い¹⁾。したがって、C型肝炎対策による肝臓撲滅は国の重要課題のひとつであり、肝臓専門医のみならず臨床医においては、インターフェロン(IFN)を中心としたC型肝炎の治療を積極的に行い、肝炎対策の効果を上げることが強く求められている。

わが国のC型慢性肝炎の約70%を占めるHCV genotype 1b型かつ高ウイルス量症例、いわゆる難治例に対して、2004年12月よりペグインターフェロン(Peg-IFN)- α + リバビリン併用療法が導入され、約50%の症例でウイルス学的著効(SVR)が得られるようになった。しかし、再燃例や無効例もいまだ多く、実際の臨床現場では治療効果を予測しそれに応じた対策が求められている。本稿ではPeg-IFN- α + リバビリン併用療法の実際の臨床における治療成績を概説するとともに、治療効果に寄与する因子および問題点について述べる。

● Peg-IFN- α + リバビリン併用療法の治療成績

Peg-IFN- α + リバビリン併用療法が導入されて以来、実臨床における治療成績が明らかとなってきた。そこで、当院においてPeg-IFN- α 2b + リバビリン併用療法を施行した614例のうちgenotype 1b型かつ高ウイルス量の488例を対象とし、治療成績と治療効果に寄与する因子について検討した。

すでに最終治療効果を判定しえた症例について検討すると、48週投与例のSVR率は薬剤減量・中止例も含めたITT解析では40%であったが、予定投与量の80%以上を投与しえた症例(PP解析)では61%と高率であった(図1)。一方、予定投与量の80%以上を投与しえた症例においても、治療終了後のHCV-RNAの再燃を26%に認め、さらに48週の治療中にHCV-RNAが陰性化しないウイルス学的不応(NVR)例を13%に認めた(図1)。これらのうち、48週投与でいったんはHCV-RNAが血中から消失する再燃例では、いわゆるresponse-guided therapyを行うなどの治療の工夫で、治療成績の向上が期待される。しかし、NVR例に対しては現行の治療法の工夫ではSVRを得ることは困難なことが多く、難治要因の解明と新薬を含め

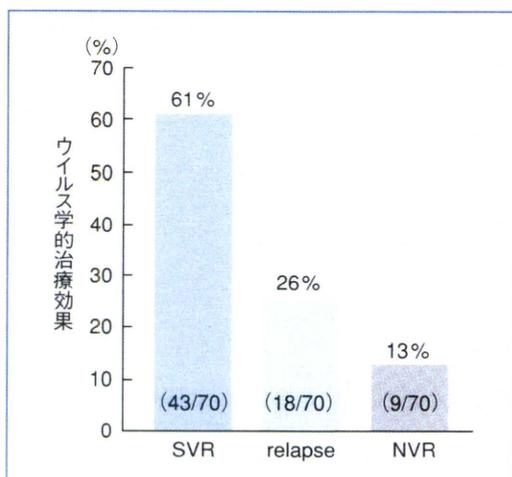


図 1 ペグインターフェロン $\alpha 2b$ + リバビリン 48 週併用療法におけるウイルス学的治療効果

予定投与量の 80% 以上が投与された症例での検討 ($n=292$)。SVR: ウイルス学的著効, relapse: 再燃, NVR: ウイルス学的不応

た新たな対策が必要と考えられる。

● Peg-IFN- α + リバビリン併用療法の治療効果に影響を与える治療前因子

genotype 1b 型かつ高ウイルス量症例における Peg-IFN- α + リバビリン併用療法の SVR に関与する治療前因子を単変量解析を用いて解析すると、年齢、性別、過去の IFN 治療効果のほか、ヘモグロビン濃度、血小板数、血清クレアチニン濃度、AST 値、 γ -GTP 値、LDL コレステロール値、血糖値、さらに肝組織における脂肪化および線維化の程度などが有意な因子としてあげられた。また、HCV NS5A 領域のインターフェロン感受性決定領域 (ISDR) の変異数²⁾ や、HCV コア 70 番・91 番のアミノ酸変異といったウイルス学的因子も有意であった。これらの因子をもとに多変量解析を用いて検討すると、①年齢 60 歳未満、②男性、③F2 以下の線維化非進行例、④LDL コレステロール非低値例、⑤ISDR 変異数が 2 個以上の症例、⑥HCV コア 70 番・91 番が野生型の症例は、それぞれ SVR が得られやすい症例と考えられた。

一方、NVR に関与する治療抵抗因子として

は、①HCV コア変異、②架橋形成を伴う高度線維化、③血清 γ -GTP 高値、④血清クレアチニン低値が多変量解析により抽出され、これらの治療抵抗因子を有する症例は、現行の治療では難治性で不応性となることが多い。特に、HCV コア変異は NVR に強く関与しコア 70 番・91 番両方に変異が認められると、NVR となるオッズ比は 8.0 ときわめて高かった。しかし、現在までのところ HCV コア変異の治療抵抗性に関連する詳細な機序は明らかとなっていない。

● ウイルス変異と治療効果

これまで述べてきたように、ISDR や HCV コア遺伝子のウイルス変異は Peg-IFN- α + リバビリン併用療法の治療効果と密接な関連がある。そこで当院で Peg-IFN- $\alpha 2b$ + リバビリン併用療法を施行した症例において、ISDR とコア変異別のウイルス学的治療効果を検討した。それによると、ISDR 野生型の症例では、48 週治療中にいったんは HCV-RNA が陰性化するが、治療後に再燃する症例が ISDR 非野生型の症例に比し多いことがわかった。一方、コア 70 番・91 番変異を有する症例では、48 週治療中に HCV-RNA が陰性化しない NVR の症例がコア野生型の症例に比し多かった。したがって、ISDR は再燃に、コア変異は NVR に関与していると考えられ、これら 2 つの遺伝子変異のウイルス学的治療効果に及ぼす特徴を考慮して、個々の症例において治療方針を決定することが有用と考えられた。

● 治療中の抗ウイルス効果と治療成績

治療中においては、そのウイルス学的反応をモニターすることが、最終治療効果を予測するうえできわめて重要である。すなわち、IFN 療法中における HCV-RNA の消失時期と SVR 率との間には密接な関連があり、種々の治療ガイドラインでは、HCV-RNA 陰性化時期により最適な治療期間を設定するなどの、いわゆる response-guided therapy が推奨されている。

当院の症例において、リアルタイム PCR 法でみた HCV-RNA の陰性化時期と治療完遂例に

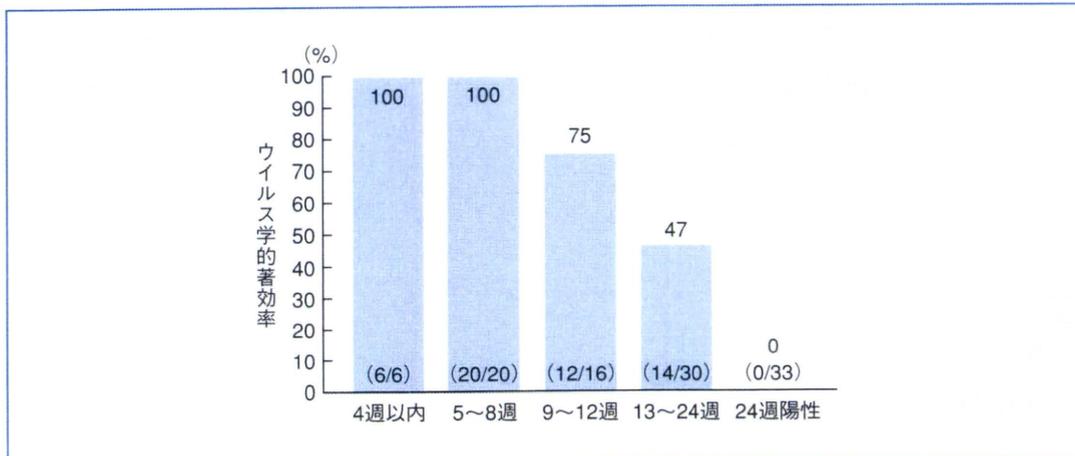


図 2 リアルタイム PCR 法で判定した C 型肝炎ウイルス (HCV) 消失時期とウイルス学的治療効果
ペグインターフェロン $\alpha 2b$ + リバビリン併用 48 週療法での検討。中止例を除く。

における SVR の関係を検討すると、治療開始 8 週以内に HCV-RNA が陰性化していれば、全例 SVR となり、SVR 率は 100% であった。また、9~12 週の陰性化例でも 75% の症例で SVR が得られた。それに対して、13~24 週に陰性化した症例では再燃率が高く、48 週投与での SVR 率は 47% で、さらに 24 週以降に陰性化した症例からは 1 例も SVR が得られなかった (図 2)。したがって、HCV-RNA 陰性化時期の遅れた症例における治療後の再燃をいかに減らすかが、治療成績を向上させるためには大変重要な課題である。

● 再燃に関与する因子の検討

そこで当院において Peg-IFN- $\alpha 2b$ + リバビリン併用 48 週療法を行った症例について、再燃にかかわる治療前因子を解析した。その結果、単変量解析では、年齢、過去の IFN 治療効果、ヘモグロビン値、血小板数、肝組織の脂肪化、ISDR 変異が有意であった。さらに、多変量解析では①年齢、②ISDR 変異が独立因子として抽出され、すなわち高齢者や ISDR 変異型が野生型の症例は 48 週治療後の再燃が多いことがわかった。

先に述べたように、治療後の再燃には治療中の HCV-RNA 消失時期が強く関連するため、HCV-RNA 消失時期別に年齢と ISDR で層別化

してその再燃率を検討した。それによると、リアルタイム PCR 法で 9~12 週に HCV-RNA が陰性化した症例において、60 歳未満の症例や ISDR 非野生型の症例では治療後再燃を認めなかったのに対し、60 歳以上かつ ISDR 野生型の症例では 48 週治療で再燃が認められた。一方、リアルタイム PCR 法で 13~24 週に HCV-RNA が陰性化したいわゆる late virological response (LVR) の症例における再燃率は総じて高率だが、60 歳未満かつ ISDR 非野生型症例の再燃率は低率であった。

したがって、再燃率の低下のためには、HCV-RNA の陰性化時期に加えて、年齢やウイルス変異といった再燃要因を考慮して最適な治療期間を設定するなど、治療スケジュールを個別に決定する必要があると考えられた。

● 自然免疫系遺伝子の肝内発現プロファイルと抗ウイルス効果

一方、NVR 例に対しては現行の治療法の工夫では SVR を得ることは困難なことが多く、難治要因の解明と新たな対策が必要である。前述のようにわれわれの臨床的解析では、Peg-IFN- α + リバビリン併用療法における難治要因にかかわるものとして、ウイルス因子のほかに血清 γ -GTP 高値などのなんらかの宿主因子の関与も示唆されている。そこで、われわれは生体防

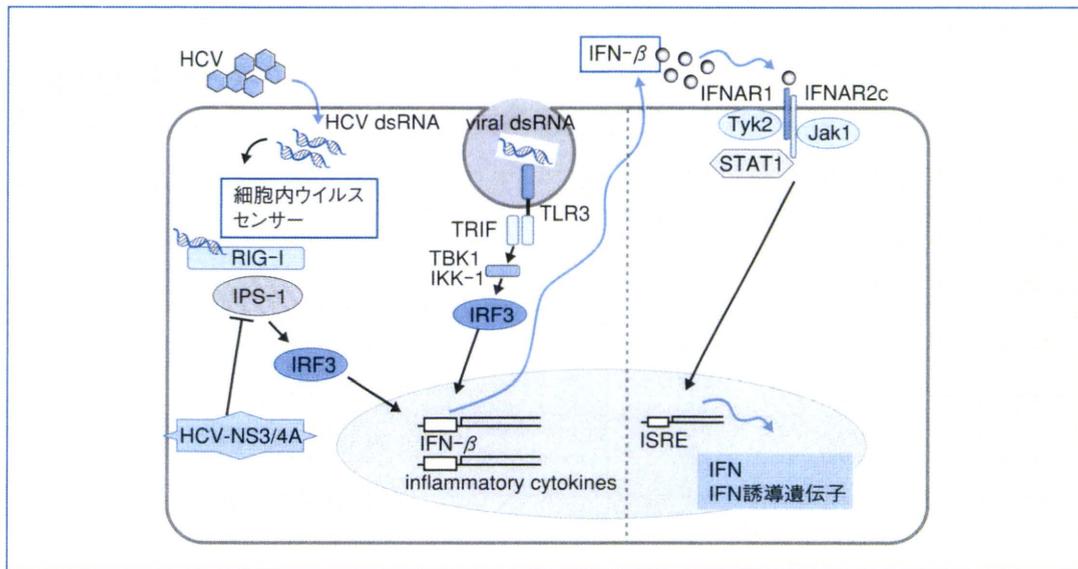


図 3 RIG-I/IPS-1 系を中心とした宿主自然免疫機構
RIG-I : retinoic acid inducible gene I, IPS : インターフェロン-β promoter stimulator

御にかかわる宿主因子である自然免疫機構と治療効果について注目した。

近年の *in vitro* の研究によると、HCV に対する生体防御には宿主自然免疫機構が重要とされる。すなわち、HCV が細胞に感染すると、まず HCV 由来の RNA が細胞内のウイルスセンサーである RIG-I (retinoic acid inducible gene I) によって探知され、そのシグナルがアダプター分子である IPS-1 (IFN-β promoter stimulator-1 : 別名 MAVS, Cardif, VISA) を介して核に伝達され、IFN-β が産生されるとされる。この RIG-I/IPS-1 系による自然免疫の作動が HCV 感染に際して生体側で起こる最初の防御機構であるとされ、IFN-β は I 型の IFN 受容体に結合し、Jak-STAT 系を介し大量の IFN の産生や IFN 誘導遺伝子 (ISG : interferon stimulated gene) の誘導を引き起こし、宿主を抗ウイルス状態にすると考えられている (図 3)。

一方、HCV の NS3/4A セリンプロテアーゼは IPS-1 を分解することが示されており、HCV は RIG-I/IPS-1 系を標的とすることで、巧みに宿主の自然免疫系から逃れているとされる (図 3)。したがって、RIG-I/IPS-1 系は宿主による HCV の排除、およびそれに対する HCV の抵抗

性に重要な鍵を握っていることは間違いないと考えられるが、ヒトにおける臨床的意義はほとんど解明されていなかった。

そこで、われわれは治療により大量に外因性 IFN を投与してもウイルス排除が起らない NVR の症例では、この宿主自然免疫機構になんらかの特徴があると考え、Peg-IFN-α2b+リバビリン併用療法を施行した 1b 高ウイルス量の C 型慢性肝炎 74 例を対象として、細胞内ウイルスセンサーである RIG-I およびアダプター分子である IPS-1、さらに IFN 誘導遺伝子である ISG15 などの mRNA の治療前肝生検組織における肝内発現量を定量した³⁾。その結果、RIG-I や ISG15 の肝内遺伝子発現は、治療中 HCV が減衰しない NVR 群で SVR 群に比し有意に高発現していたのに対して、IPS-1 の治療前肝内遺伝子発現は NVR 群で有意に低値で、RIG-I/IPS-1 比は NVR 群で有意に高かった (NVR : SVR=1.3 : 0.4) (図 4)。ROC 解析では ISG15、USP18 発現および RIG-I/IPS-1 比の area under the curve は 0.9 以上で、これらの遺伝子の治療前における肝内発現を定量することは、これまで困難とされてきた Peg-IFN-α+リバビリン併用療法の最終治療効果を治療前に予測

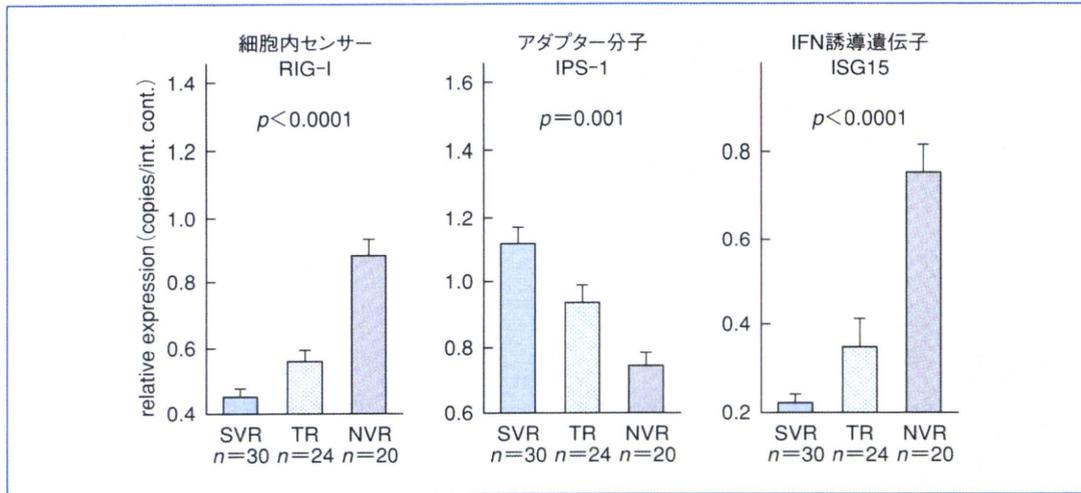


図 4 自然免疫系分子の肝内遺伝子発現とウイルス学的治療効果 (文献 3 を引用, 改変)

するのにきわめて有用と考えられた。

一方, 治療による自然免疫系遺伝子の発現誘導の反応性を検討すると, 治療前に高発現状態となっていた RIG-I や ISG15 は, Peg-IFN- α + リバビリン投与による発現誘導が NVR 例では有意に低いことがわかった³⁾。したがって, NVR 例では治療前に内因性 IFN により自然免疫系がすでに up regulation されているため, 治療である外因性 IFN に対する反応性が減弱していることが示唆され, IFN に対する不応性のメカニズムを探る糸口となると考えられた。

● IL28B 近傍の一遺伝子多型 (SNP) と治療効果および自然免疫系遺伝子発現との関連

さらに, 最近 IL28B 近傍の SNP と Peg-IFN- α + リバビリン併用 48 週投与における治療効果との関連が報告されている^{4~6)}。これについては他稿に詳しいが, 当院においても IL28B 近傍の SNP と Peg-IFN- α 2b + リバビリン併用療法中の血中 HCV 動態と治療成績を検討した。それによると IL28B の minor allele の症例では, 治療中に HCV 減衰がほとんど得られない, いわゆる null responder が多いことがわかり, 最終的治療効果も IL28B の major allele の症例における NVR 率が 10% であったのに対し, minor allele の症例では約 70% が NVR であつ

た。したがって, IL28B の minor allele は, NVR ときわめて強い関連があることが示唆された。また, IL28B minor allele にかかわる臨床的背景を単変量解析で検討すると, 血清 γ -GTP 高値や LDL コレステロール低値, 肝脂肪化などの宿主因子と関連していることがわかった。そこで, 前述の宿主自然免疫系遺伝子発現と IL28B 近傍の SNP との関連を検討すると, IL28B の minor allele の症例では, 有意に RIG-I や ISG15 の治療前の肝内発現が major allele の症例に比し高く, 反対に IPS-1 の発現は低い傾向を認めた。多変量解析では NVR にかかわる独立因子として, RIG-I/IPS-1 比と IL28B minor allele が抽出されたことから, RIG-I/IPS-1 系を中心とした宿主自然免疫機構は IL28B 近傍の SNP とともに NVR と関連していることが示唆された。

● おわりに

Peg-IFN- α + リバビリン併用療法が臨床応用され広く施行されるようになり, その効果規定因子や難治要因も次第に明らかとなってきた。したがって, 今後はこれらの要因を個々の症例において検討し, 的確な治療効果予測を行い, より有効な対策を講じることで治療成績の向上をはかる必要がある。

文献

- 1) Asahina Y, Tsuchiya K, Tamaki N, et al. Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2010 ; 52 : 518-27.
- 2) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996 ; 334 : 77-81.
- 3) Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, et al. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology* 2008 ; 134 : 1396-405.
- 4) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009 ; 41 : 1105-9.
- 5) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009 ; 461 : 399-401.
- 6) Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009 ; 461 : 798-801.

DVD-ROM カラーアトラス 循環器病

監修 国立循環器病センター 曲直部壽夫 尾前照雄 北村惣一郎 友池仁暢
財団法人循環器病研究振興財団「カラーアトラス血管疾患」編集委員会

744ページ(カラー)
図2366点(カラー)
写真1196点を全て網羅!

カラーアトラス4冊の膨大なデータをDVD-ROM1枚に集約。



DVD-ROM 循環器病 は、既刊のカラーアトラス(弁膜症, 虚血性心疾患, 脳血管障害, 血管疾患)の内容をすべてデジタル化したものです。同シリーズは、国立循環器病センターに集積された膨大な資料を厳選し、約120種のぼる疾患を、臨床経過から病理像に至るまで系統的に提示しました。合計520葉にも及ぶ特撮映像は、圧倒的な質感で循環器病の実像を伝えています。研究の場で、教育の場で、幅広くご利用いただけます。

●DVD-ROM カラーアトラス 循環器病 CIRCULATORY DISEASE
定価(本体9,500円+税) [ISBN978-4-89775-244-0 C3847]

 ライフサイエンス出版

URL <http://www.lifescience.co.jp/>

〒103-0024 東京都中央区日本橋小舟町11-7
TEL.03 (3664) 7900 FAX.03 (3664) 7734/7735
e-mail info@lifescience.co.jp



HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy

C Nelson Hayes, Mariko Kobayashi, Norio Akuta, et al.

Gut 2011 60: 261-267 originally published online November 10, 2010
doi: 10.1136/gut.2010.223495

Updated information and services can be found at:

<http://gut.bmj.com/content/60/2/261.full.html>

These include:

References

This article cites 47 articles, 7 of which can be accessed free at:

<http://gut.bmj.com/content/60/2/261.full.html#ref-list-1>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Notes

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/ep>

HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy

C Nelson Hayes,^{1,2} Mariko Kobayashi,³ Norio Akuta,³ Fumitaka Suzuki,³ Hiromitsu Kumada,³ Hiromi Abe,^{1,2} Daiki Miki,^{1,2} Michio Imamura,^{1,2} Hidenori Ochi,^{1,2} Naoyuki Kamatani,⁴ Yusuke Nakamura,⁵ Kazuaki Chayama^{1,2}

¹Laboratory for Digestive Diseases, Center for Genomic Medicine, RIKEN, Hiroshima, Japan

²Department of Medicine and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

³Department of Hepatology, Toranomon Hospital, Tokyo, Japan

⁴Center for Genomic Medicine, Riken, Yokohama, Japan

⁵Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, The Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan

Correspondence to

Professor Kazuaki Chayama, Department of Medical and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Science, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan; chayama@hiroshima-u.ac.jp

Revised 21 September 2010
Accepted 26 September 2010
Published Online First
10 November 2010

ABSTRACT

Background and aims A number of recent studies have shown that human polymorphisms near the *IL28B* type III interferon ($IFN\lambda$) gene influence the response to peg-interferon plus ribavirin combination therapy for infection with chronic hepatitis C virus (HCV). Viral polymorphisms, including substitutions within the HCV core and NS5A proteins, have also been shown to influence treatment outcome, but it is not known whether these factors act independently of the *IL28B* polymorphism or if they reflect the same or a different underlying mechanism. Multiple logistic regression was used to determine whether host and viral polymorphisms independently predict sustained virological response (SVR).

Methods Two single nucleotide polymorphisms were genotyped in the *IL28B* locus (rs12979860 and rs8099917) from 817 patients with chronic HCV infection, and substitutions at amino acids 70 and 91 of the HCV core protein and within the NS5A interferon sensitivity-determining region (ISDR) were analysed.

Results It was found that independent predictors of an SVR included *IL28B* rs12979860 CC genotype (OR=4.98; $p=4.00E-08$), core amino acid 70 substitutions (OR=0.53; $p=0.016$), age and baseline viral load. For non-virological response, the *IL28B* rs12979860 CT/TT genotype (OR=0.23; $p=1.96E-8$) and age were independent predictors. *IL28B* rs12979860 genotype ($p=1.4E-8$), core amino acid 70 substitutions ($p=0.0013$), ISDR substitutions ($p=0.0019$), baseline viral load, γ -glutamyltranspeptidase, alanine aminotransferase and platelet count were independent predictors for change in viral load by week 4 of treatment.

Conclusions *IL28B* polymorphisms and HCV core amino acid 70 substitutions contribute independently to an SVR to peg-interferon plus ribavirin combination therapy.

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) is a primary cause of chronic hepatitis and often progresses to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma.^{1,2} Peg-interferon plus ribavirin combination therapy (PEG-RBV) is the current standard of care, but it is only effective in 50% of patients and has severe side effects often requiring discontinuation or dose modification.³ Consequently, reliable predictors are needed to identify unsuitable candidates as early as possible.

Genome-wide association studies have reported common single nucleotide polymorphisms (SNPs) predictive of response to interferon treatment.

Significance of this study

What is already known about this subject?

- ▶ Clinical and viral factors influence the outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C virus infection.
- ▶ Polymorphisms within the human *IL28B* locus strongly influence treatment outcome.
- ▶ Substitutions at amino acids 70 and 91 of the HCV core protein as well as within the interferon sensitivity-determining region (ISDR) also affect response to treatment.

What are the new findings?

- ▶ *IL28B* polymorphisms as well as substitutions at amino acid 70 both independently predict sustained virological response, suggesting that they influence treatment outcome through different mechanisms.
- ▶ *IL28B* polymorphisms, substitutions at core protein amino acid 70 and ISDR substitutions are each independent predictors for change in viral load after 4 weeks of treatment.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- ▶ The combination of *IL28B* genotyping and detection of core protein substitutions may yield more accurate pretreatment predictions of treatment efficacy.

While polymorphisms in *MxA*,^{4,5} interferon α -receptor 1,⁶ osteopontin⁷ and *MAPKAPK3*⁸ have been reported to be associated with interferon response, several linked SNPs within the *IL28B* locus on chromosome 19 have recently been shown to be the strongest predictors of early viral kinetics, response to treatment and spontaneous viral clearance.^{9–15}

Viral polymorphisms have also been shown to be associated with treatment response. HCV genotypes 1 and 4 in particular are considered more difficult to treat than genotypes 2 and 3,^{16,17} and genotype 3 is associated with steatosis.¹⁸ Within genotype 1b, amino acid substitutions at positions 70 and 91 of the HCV core protein and accumulation of substitutions in the interferon sensitivity-determining region (ISDR) of the NS5A protein^{19,20} have also been shown to be associated with treatment outcome, especially among Japanese patients.

Hepatology

Consequently, a number of human and viral factors are now known to affect response to treatment, but in order to identify the most important independent predictors and to identify which, if any, may be useful in guiding clinical practice, it is necessary to analyse them simultaneously in a multivariate model. In this study we therefore attempted to identify host and viral factors that independently predict treatment outcome.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Data from 817 patients who were treated with PEG-RBV combination therapy for chronic hepatitis C genotype 1b infection between 2002 and 2008 were collected from Toranomon Hospital (Tokyo) and hospitals that belong to the Hiroshima Liver Study Group (<http://home.hiroshima-u.ac.jp/naika1/hepatology/english/study.html>) in Hiroshima, Japan. Study subjects tested positive for HCV RNA over a span of >6 months, were negative for hepatitis B and HIV, and showed no evidence of other liver diseases. Patients received weekly injections of peg-interferon- α 2b at 1.5 g/kg body weight for 48 weeks and ribavirin was administered orally. The amount of ribavirin was adjusted based on body weight (600 mg for <60 kg, 800 mg for 60–80 kg, 1000 mg for >80 kg). Patients with low baseline viral load (<5 log IU/ml) were excluded, as were patients who received <0.89 g/kg of peg-interferon or <8.3 mg/kg of ribavirin. Treatment success was evaluated based on a sustained virological response (SVR), defined as undetectable HCV RNA levels 24 weeks after cessation of treatment. Some patients showed a transient response (TR or relapser), in which HCV RNA dropped to undetectable levels during treatment but then later rebounded. In those with a non-viral response (NVR), HCV RNA levels failed to decline by 2 log₁₀ IU/ml by week 12 of treatment and never dropped below detectable levels. Histopathological diagnosis was made according to the criteria of Desmet *et al.*²¹ All subjects gave written informed consent to participate in the study according to the process approved by the ethical committee of each hospital and conforming to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

HCV RNA levels

HCV RNA levels were monitored throughout the course of treatment at 1 or 2 month intervals for a total of at least six time points via reverse transcription-PCR (RT-PCR) using the original Amplicor method, the high range method or the TaqMan RT-PCR test. The measurement ranges of these assays were 0.5–850 kIU/ml, 5–5000 kIU/ml and 1.2–7.8 log IU, respectively. Samples exceeding the measurement range were diluted with phosphate-buffered saline (PBS) and reanalysed. All values were reported as log IU/ml.

ISDR and core amino acid substitutions

Amino acid substitutions in the HCV core and ISDRs were determined by direct sequencing of PCR products following extraction and reverse transcription of serum HCV RNA. Core amino acid substitutions at positions 70 and 91 (core70 and core91) were determined according to Akuta *et al.*^{22, 23} and the number of ISDR substitutions was established as in Enomoto *et al.*^{19, 21, 24} Of the 817 patients in the study, substitutions for both ISDR and core70 could be determined for 379 patients.

SNP genotyping

We genotyped each patient for two IL28B SNPs previously reported to be associated with treatment outcome, rs12979860 and rs8099917.^{9–11} Samples were genotyped using the Illumina

HumanHap610-Quad Genotyping BeadChip or the Invader assay, as described previously.^{25, 26} The two SNPs are in strong linkage disequilibrium, with a correlation coefficient of 0.99. SNP genotypes for both rs12979860 and rs8099917 were determined for 815 patients (99.7%).

Statistical analysis

All analyses were performed using the R statistical package (<http://www.r-project.org>). Non-parametric tests (χ^2 and Mann-Whitney U tests) were used to detect significant associations. All statistical analyses were two sided, and $p < 0.05$ was considered significant. Simple and multiple logistic regression analyses were used to examine the association between viral substitutions and clinical factors using $p < 0.05$ as the criterion for inclusion in the initial multivariate model. Multivariate logistic regression analysis was performed using forward/backward stepwise selection based on Akaike Information Criterion (AIC) score and validated using the rms package in R. ORs and 95% CIs were calculated for each factor.

RESULTS

Patient characteristics

Patient profiles are shown in table 1. Forty-five per cent of patients achieved an SVR, 22% were transient responders and 33% failed to respond to treatment (NVR). Males were significantly more likely to achieve an SVR than females (50% and 38%, respectively; $p = 0.0011$), and younger patients were more likely to achieve an SVR than older patients (59.2% and 40.9% above and below median age 58, respectively; $p = 1.57E-6$). Patients who achieved an SVR also had lower γ -glutamyl-transpeptidase (γ GTP) levels (36 IU/l vs 45 IU/l; $p = 0.008$) and higher platelet counts (17.1 vs $15.3 \times 10^{10}/L$; $p = 3.649E-05$) than those who did not.

IL28B SNP genotypes

The genotypes of two IL28B SNPs were measured for each patient. Because of linkage disequilibrium, SNP results are nearly interchangeable. However, six patients showed an intermediate haplotype consisting of the favourable genotype for rs8099917 (TT) but an unfavourable genotype for rs12979860 (CT), whereas only one of the six patients achieved an SVR, suggesting that rs12979860 is a better predictor of SVR in this data set.

The frequency of the risk allele (T) for rs12979860 was 0.15 among all patients and 0.08 in SVR patients, 0.14 in TR patients and 0.27 in NVR patients. Patients homozygous for the rs12979860 favourable allele (CC) were significantly more likely to achieve an SVR compared with those with TC or TT genotypes (53% vs 24%, OR=3.55, $p = 3.95E-13$). Conversely, patients with the risk allele (TC or TT) were significantly more likely to show an NVR (55% vs 25%; OR=0.265; $p = 4.4E-16$). Patients with the rs12979860 CC genotype had a marginally lower baseline viral load (6.6 vs 6.4 log IU/ml; $p = 0.093$), but showed significantly greater reduction in viral load by week 4 of treatment (-3.2 vs -0.8 log IU/ml; $p < 2.2E-16$). The rs12979860 CC genotype was also associated with wild type core70 (78% vs 54%; $p = 1.6E-6$) and non-wild type ISDR (67% vs 83%; $p = 0.007$).

The frequency of the rs8099917 risk allele (G) was 0.15 among all patients, 0.08 in SVR patients, 0.13 in TR patients and 0.26 in NVR patients. Patients with the rs8099917 TT genotype were significantly more likely to achieve an SVR than patients with GT or GG genotypes (53% vs 24%, OR=3.43, $p = 2.18E-12$), and GT/GG patients were significantly more likely to show an NVR

Table 1 Patient profiles by response to treatment

	All (813)	SVR (366)	TR (176)	NVR (271)
Sex (M/F)	459/354	231/135	84/92	144/127
Age	58 (51–65)	56 (47–63)	60.5 (56–65.25)	59 (52.5–66)
Body weight (kg)	59 (52–67)	60 (52–68.25)	58 (51–66)	60 (52–66.4)
BMI (kg/m ²)	22.61 (20.81–24.65)	22.44 (20.46–24.58)	22.85 (20.85–24.89)	22.76 (21.12–24.63)
Hypertension (yes/no)	141/672	61/305	29/147	51/220
Diabetes (yes/no)	97/716	31/335	25/151	41/230
Fibrosis (0–2/3–4)	138/421	52/227	34/81	52/113
Activity (0–1/2–3)	274/272	136/138	53/56	85/78
ISDR (0, 1≥2)	78/298	43/128	15/71	20/99
Amino acid 70 (wild-type/mutant)	256/139	137/45	54/35	65/59
Amino acid 91 (wild-type/mutant)	221/178	112/72	51/40	58/66
WBC (/L)	4.71×10 ⁹ (3.9×10 ⁹ –5.7×10 ⁹)	4.9×10 ⁹ (4.0×10 ⁹ –6.0×10 ⁹)	4.6×10 ⁹ (3.8×10 ⁹ –5.4×10 ⁹)	4.6×10 ⁹ (3.7×10 ⁹ –5.5×10 ⁹)
Haemoglobin (g/dl)	14.1 (13.2–15)	14.2 (13.3–15.22)	13.9 (13.1–14.8)	14.1 (13.05–14.9)
Platelets (×10 ⁹ /L)	16.1×10 ⁶ (12.5×10 ⁶ –19.9×10 ⁶)	17.1×10 ⁶ (13.7×10 ⁶ –20.7×10 ⁶)	15.5×10 ⁶ (11.3×10 ⁶ –18.8×10 ⁶)	15.1×10 ⁶ (12×10 ⁶ –19.2×10 ⁶)
AST (IU/l)	45 (34–65.5)	43 (32.25–64)	43.5 (33.25–66)	48 (37–66.5)
ALT (IU/l)	55 (37–87)	57 (37–92)	50 (33–78)	53 (39–82.5)
γGTP (IU/l)	40 (25–72)	36 (23–65.75)	36 (23–69)	52 (32–86)a
Albumin (g/dl)	3.9 (3.7–4.1)	3.9 (3.7–4.1)	3.8 (3.7–4)	3.8 (3.7–4.1)
Total cholesterol (mg/dl)	171 (150–192)	169 (149.2–192)	175 (158–191)	170 (148.5–192.5)
Viral load (log IU/ml)	6.5 (6.1–6.9)	6.4 (5.9–6.825)	6.6 (6.3–7)	6.6 (6.2–7)
PEG-IFN-α2b (μg)	80 (80–100)	80 (80–100)	80 (75–100)	80 (60–100)
PEG-IFN-α2b/kg (μg/kg)	1.19 (1.19–1.48)	1.36 (1.19–1.48)	1.19 (1.19–1.48)	1.19 (1.02–1.48)
Ribavirin (mg)	600 (600–800)	600 (600–800)	600 (600–800)	600 (400–800)
Ribavirin/kg (mg/kg)	8.9 (8.9–11.87)	10.29 (8.9–11.87)	8.9 (8.9–11.87)	8.9 (7.8–11.86)
rs12979860 (CC/CT/TT)	582/203/27	311/51/4	128/43/4	143/109/19
rs8099917 (TT/TG/GG)	588/199/25	311/51/3	132/40/4	145/108/18

For categorical data, the number of patients in each category is shown. For continuous data, the median and range are displayed.

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; F, female; γGTP, γ-glutamyltranspeptidase; ISDR, interferon sensitivity-determining region; M, male; NVR, non-virological response; PEG-IFN, pegylated interferon; SVR, sustained virological response; TR, transient response; WBC, white blood cells.

(56% vs 25%; OR=0.26; $p=3.33E-16$). Patients with the rs8099917 TT genotype had marginally higher baseline viral load (6.6 vs 6.4 log IU/ml; $p=0.077$) but showed a significantly greater drop in viral load by week 4 of treatment (-3.1 vs -0.8 log IU/ml; $p<2.2E-16$). The rs8099917 TT genotype was also associated with wild-type core70 (79% vs 56%; $p=3.1E-6$) and non-wild-type ISDR (68% vs 83%; $p=0.015$).

Viral substitutions

Patients who achieved an SVR had significantly lower initial HCV RNA levels than those who did not (6.4 vs 6.6 log IU/ml; $p=2.1E-6$). The 140 patients (17%) with a substitution at position 70 of the HCV core protein (core70) were significantly less likely to achieve an SVR than patients with wild type core70 (33% vs 53%; $p=0.00019$) and were significantly more likely to show an NVR (42% vs 25%; $p=0.0013$). The 179 (22%) of patients with a substitution at position 91 (core91) were marginally less likely to achieve an SVR (41% vs 50%; $p=0.08$) but were significantly more likely to show an NVR (37% vs 27%; $p=0.039$). The 78 (10%) of patients who had two or more substitutions in the ISDR of NS5A were only marginally less likely to achieve an SVR than those with wild-type ISDR (43% vs 55%; $p=0.066$) and were not more likely to show an NVR (33% vs 26%; $p=0.24$).

Predictive factors for an SVR

Significant univariate predictors for an SVR included patient clinical factors (age, sex, diabetes, platelet count, white blood cell count, haemoglobin level, γGTP level); SNP genotype (rs12979860 and rs8099917); and viral factors (baseline viral load and core70, core91 and ISDR substitutions) (table 2). Following multivariate analysis, only age, rs12979860 genotype, core70

substitution and baseline viral load were significant independent predictors (figure 1A). The joint effects of rs12979860 and core70 on response to treatments are illustrated in figure 2.

Predictive factors for an NVR

Significant univariate predictors for an NVR included age, rs12979860 and rs8099917 genotypes, core70 and core91 substitutions, diabetes, aspartate aminotransferase (AST), baseline viral load, platelet count, white blood cell count and γGTP levels (table 3). Following multivariate analysis only age and rs12979860 genotype remained as independent predictors (figure 1B).

Predictive factors for change in viral load by week 4 of treatment

Factors influencing virological response were assessed by examining change in viral load between the start of treatment and week 4. Using linear regression, sex, rs12979860, rs8099917, core70, core91, ISDR, baseline viral load, alanine aminotransferase (ALT), platelet count, white blood cell count, haemoglobin level and γGTP were found to be significant univariate predictors of change in viral load by week 4 (table 4). Independent factors included rs12979860, core70, ISDR, ALT, platelet count and γGTP. We also found a significant positive linear relationship between the total number of ISDR substitutions and change in viral load between week 0 and week 4 (slope=0.2; $p=0.0047$).

In patients with the favourable rs12979860 CC genotype, core70 wild type was a significant predictor of viral decline ($p=0.007$; figures 3A,B), but in patients with the CT or TT genotypes, viral decline did not vary with respect to core70 substitutions ($p=0.18$; figures 3C,D). Conversely, ISDR was not

Table 2 Predictors for a sustained virological response

Variable	Simple			Multiple			
	n	OR	p Value	n	OR	95% CI	p Value
Age	813	0.58	1.22E-08***	362	0.432	0.31 to 0.60	6.61E-07***
Sex (male vs female)	813	1.28	0.0006***	362	1.2	0.95 to 1.54	0.133
BMI (kg/m ²)	800	0.87	0.1286				
rs12979860 (CC vs TC/TT)	812	3.65	2.67E-14***	362	4.98	2.81 to 8.82	4.00E-08***
rs8099917 (TT vs GT/GG)	812	3.53	1.77E-13***				
Hypertension	813	0.92	0.6452				
Diabetes	813	0.53	0.005907**				
Core amino acid 70 (wild type vs mutant)	395	0.42	5.82E-05***	362	0.527	0.31 to 0.89	0.01575*
Core amino acid 91 (wild type vs mutant)	399	0.66	0.0419*				
ISDR	376	1.12	0.1627				
Viral load (log IU/ml)	695	0.68	2.09E-06***	362	0.77	0.62 to 0.96	0.02249*
Fibrosis (F0-1 vs F2-4)	559	0.74	0.0817				
Activity (A0-1 vs A2-4)	546	0.96	0.7975				
Total cholesterol (mg/dl)	663	0.86	0.2151				
AST (IU/l)	687	1.03	0.1069				
ALT (IU/l)	692	1.26	0.0920				
Platelets ($\times 10^4$ /L)	694	1.49	3.57E-05***	362	1.39	0.97 to 1.99	0.073
WBC (/L)	693	1.31	0.0014**				
Haemoglobin (g/dl)	693	1.28	0.0043**				
γ GTP (IU/l)	646	0.96	0.0052**				

Results of simple and multiple regression are shown. Factors with a p value <0.05 were included in the multivariate model. Variables were selected using stepwise selection. Asterisks indicate level of statistical significance: * <0.05; ** <0.01; *** <0.001. ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; γ GTP, γ -glutamyltranspeptidase; ISDR, interferon sensitivity-determining region; WBC, white blood cells.

a significant predictor of viral decline in patients with the rs12979860 CC genotype ($p=0.078$; figures 4A,B), but patients with the CT or TT genotypes and two or more substitutions in the ISDR showed significantly greater viral decline by week 4 than patients with zero or one ISDR substitution ($p=0.007$; figures 4C,D).

DISCUSSION

In this study we showed that host factors (younger age, male sex, favourable IL28B SNP genotypes) as well as viral factors (baseline viral load, wild-type core70 and two or more substitutions in the ISDR) contribute to the successful outcome of PEG-RBV combination therapy. Although some of these factors independently predict an SVR or NVR in multivariate analysis, collectively they reflect a complex genotype-by-environment

interaction involving common polymorphisms in both the virus and the human host.

Genetic variation within the human IL28 locus has been reported as the strongest pretreatment predictor of an SVR,¹⁵ and the results of this study support this finding. Several tightly linked SNPs in the non-coding region of *IL28A* and *IL28B* have been shown to be associated with spontaneous viral clearance, rapid and early virological response and/or SVR following treatment with interferon and ribavirin for HCV genotype 1b.⁹⁻¹⁵ *IL28A*, *IL28B* and *IL29* code for type III (λ) interferons, which are similar to type I interferons but use a different receptor and show high tissue specificity.^{27, 28} It has not been determined which, if any, of the reported SNPs directly affects function, but the functional SNP probably affects gene expression. IRF3- and IRF7-binding sites near the transcription start

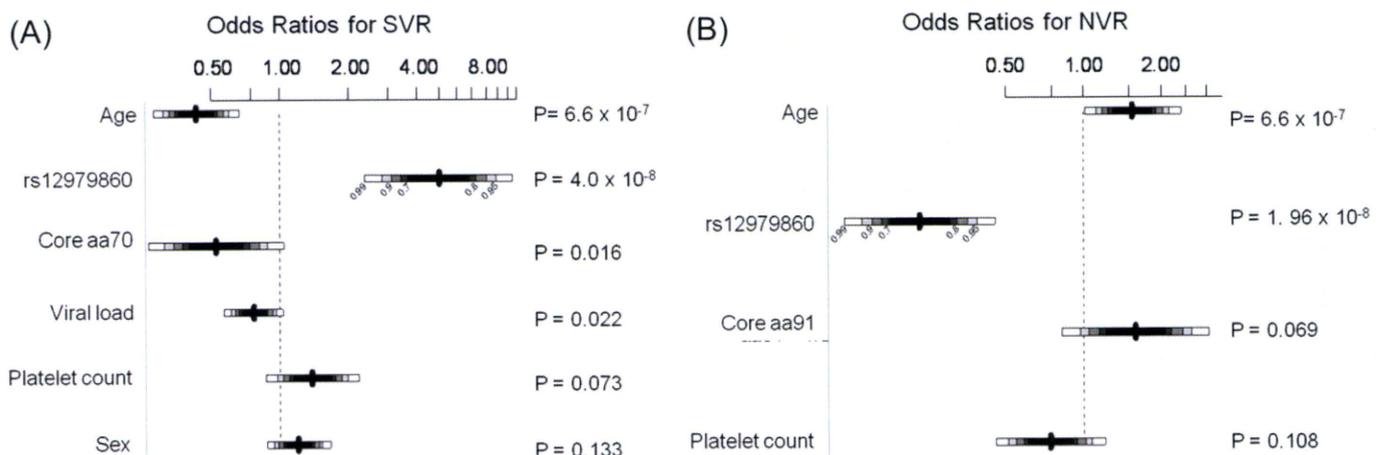


Figure 1 ORs for predictive factors response to treatment. ORs and 95% CIs are shown for predictive factors for (A) sustained virological response (SVR) and (B) non-virological response (NVR) based on multiple logistic regression with stepwise selection.