

Fig. 5 KEGG Pathway map and array data (biosynthesis of steroids). Gene expression changes were mapped on the pathways. Each circle within a box represents the corresponding probe set on Human Genome U133 Plus 2.0 array because multiple probe sets are sometimes designed for a single gene. Red circles indicate over-expressed genes in cured cells compared to parental Huh7 cells. The

dotted numerical code in each box represents the Enzyme Commission (EC) number based on the recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Correspondence between the genes that were examined in the microarray analyses and enzymes that are presented in Fig. 5 is shown in Supplementary Table 4

Rep-Feo cells showed that the replication of the HCV replicon was suppressed by clofibrate and fenofibrate in a dose-dependent manner, whereas pioglitazone and troglitazone elevated expression levels of replicon. The MTS

assay did not show any effect on cell viability or replication. These results suggest that the decrease or increase in HCV replication is due to specific effects of PPAR-alpha or gamma agonists on HCV replication.

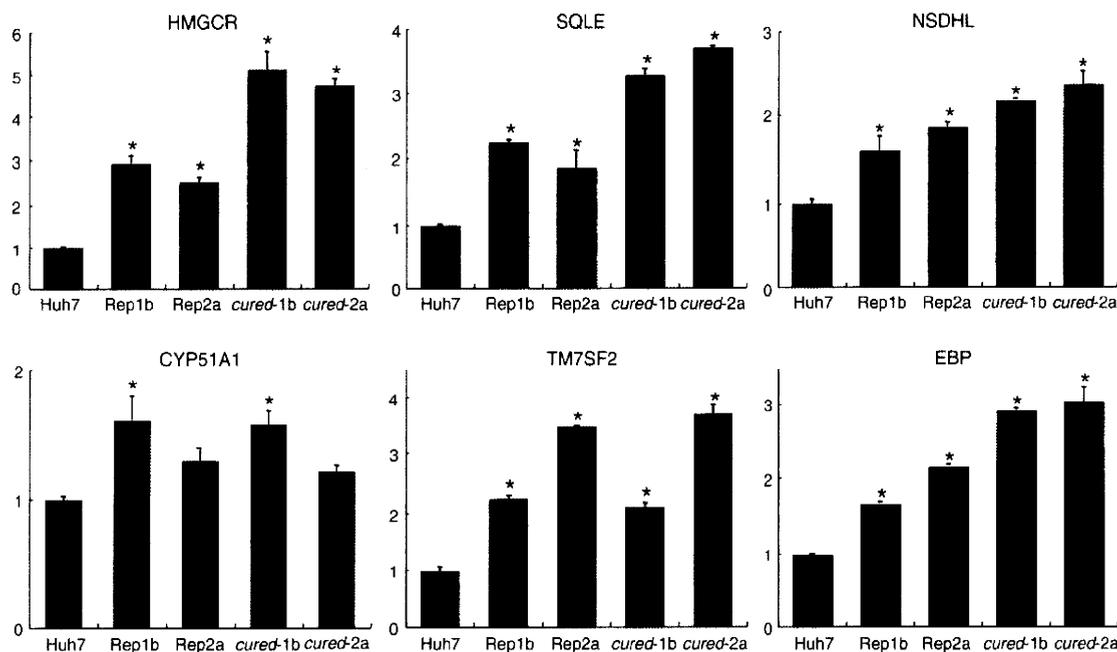


Fig. 6 Real-time detection RT-PCR. Real-time RT-PCR was performed to verify expression levels of genes that were listed in the cholesterol biosynthesis pathway in Fig. 4c and that showed

differences in their expression levels by microarray analyses. Assays were done in triplicate, and asterisks indicate *P*-values of less than 0.05

Discussion

In our present analyses, we identified MAPK signaling, biosynthesis of steroid related and TGF-beta signaling pathways as significantly changed pathway processes by comparing replicon-expressing and *cured* cells (Supplementary Table 2). The results suggest that these pathways were primarily affected by HCV replication. Comparison of *cured* cells and naïve Huh7 cells identified cell cycle, TGF-beta, sphingolipid metabolism, and biosynthesis of steroids pathways as significantly changed pathways. Interestingly, cholesterol biosynthesis pathways were significantly changed in both comparisons (Supplementary Tables 2, 3). These data suggest that these pathways may positively regulate cellular HCV replication and that cholesterol biosynthesis pathways are primarily activated by HCV replication and may be essential for continuous virus replication.

There are several studies that report gene expression changes in replicon-expressing Huh7 cells as compared with the naïve cells [30–32]. In those studies, however, the changes in gene expression do not only reflect the effect of intracellular HCV replication, but also reflect alteration of host cell clonalities. Indeed, there are inconsistencies among studies. Use of the *cured* Huh7 cells can minimize the effect of cellular clonal changes because such Huh7 subclones have already been selected through HCV replicon transduction, drug-resistance selection and subsequent HCV elimination [33]. In our study, we have compared

gene expression between genotype 1b and 2a replicon cells, respective *cured* cells and the naïve parental cells, and have identified molecular signaling or metabolic pathways that were differentially up- or down-regulated over different HCV genotypes.

Comprehensive microarray analyses and pathway analyses were very useful for the identification of molecular mechanisms of HCV infection and replication in the host cells. We used the KEGG Pathway database [28], a knowledge-based database of biological systems that integrates genomic, chemical and systemic functional information. KEGG provides a reference knowledge base for linking genome to life through the process of PATHWAY mapping, which is to map, for example, a genomic or transcriptomic content of genes to KEGG reference pathways to infer systemic behavior of the cells or the organism. These pathway databases are free on-line resources. Using these analyses, the close relation between cholesterol metabolism and HCV replication was demonstrated. Moreover, in relation to this, when we examined the pathways of other lipid metabolism, it was shown that fatty acid biosynthesis metabolism-related pathways were significantly changed in *cured* cells, and indeed we found a large number of lipid droplets in the cytosol of replicon cells and *cured* cells.

The HCV-JFH1 strain is the basis of a robustly replicating cell culture system reported recently [5]. We have performed comprehensive gene expression analyses using the HCV-JFH1 and the *cured* Huh7.5.1 cell line [6]. The

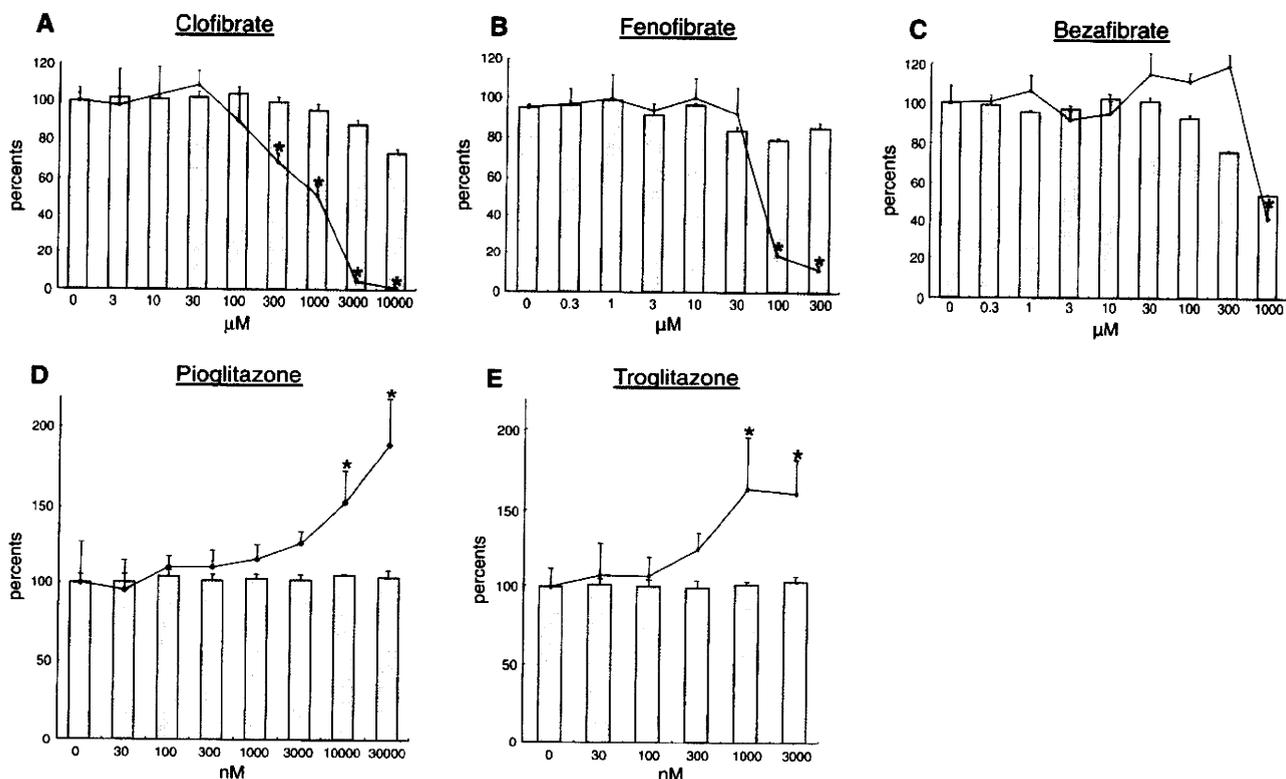


Fig. 9 Results of secondary screening with PPAR- α and - γ agonists. Luciferase activity for HCV replication levels is shown as a percentage of the control. Cell viability is also shown as percentage of

the control. Each bar represents the average of quadruplicate data points with standard deviation represented as the error bar. Asterisks denotes a significant difference from the control of at least $P < 0.05$

The JFH1 strain, however, showed substantial cytopathic effects on cultures of more than 5 days accompanied by overall induction of apoptosis-related genes and massive cell death [34]. Thus, it was difficult to conduct gene expression studies consistently.

Lipid metabolism is involved in the life cycle of many viruses. Recent studies have demonstrated the localization of HCV nonstructural proteins in the lipid raft in the endoplasmic reticulum (ER) forming intracellular replication complexes, called membranous webs [35, 36]. Because the lipid raft is enriched in cholesterol and sphingolipids, depletion of these lipids leads to inhibition of HCV genomic replication [19]. Amemiya et al. [37] reported that another serine palmitoyltransferase, myriocin, depleted cellular sphingomyelin contents and inhibited HCV replication.

It has been reported that statins efficiently suppress HCV replication in vitro and in vivo [38–40]. Statins are inhibitors of HMG-CoA reductase and shut down cholesterol biosynthesis by preventing the formation of mevalonate from 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA. As we have shown in the results, all enzymes in the cholesterol synthesis pathway were upregulated in the replicon-expressing and the cured Huh7 cells. In addition to lowering intracellular levels of sterols, statins also reduce levels of isoprenoids, which are derived from mevalonate. Isoprenoids

such as farnesyl pyrophosphate and geranylgeranyl pyrophosphate serve as lipid attachments for a variety of intracellular signaling molecules. In our results, the cholesterol biosynthesis pathway was also upregulated between cured versus naïve cell lines as well as replicon versus cured cell lines. These results suggest that HCV replication may promote synthesis of lipids including steroids that were essential for the viral efficient replication.

It has been recognized that HCV infection causes hepatic steatosis and subclinical insulin resistance and that they are independent of other risk factors such as obesity or the presence of diabetes mellitus. Similarly, in HCV cell cultures, Yang et al. [41] have reported that cellular fatty acid synthase is upregulated in HCV-infected Huh7 cells and specific inhibition of the enzymatic activity caused suppression of HCV replication. In the present study, although lipid metabolism-related genes were upregulated in cured cells, which supports efficient HCV replication, there was not significant change in lipid-related genes between replicon-expressing as compared with cured cells (Fig. 7). These results suggest that HCV subgenomic replication does not cause steatosis as it did in full-length HCV cell culture [41]. These discrepancies might be due to the absence of the presence of HCV structural genes including core and envelope proteins.

We have shown an increase in lipid droplets in HCV replicon-positive cells and their cured cell lines as a phenotype of the gene expression profiles (Fig. 8). On the other hand, ACOX1, a rate-limiting enzyme of peroxisomal beta-oxidation, was higher in cured cells than parental Huh7 cells (Fig. 7) [42]. We have shown preliminarily that cellular SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein 1), which regulates a set of triglyceride synthesis enzymes en bloc, is upregulated in HCV replicon-positive cell lines. These discrepancies might be due to more proficient activation of SREBP1-induced fatty acid biosynthesis pathways. Collectively, our results suggest that the overall fatty acid synthesis pathway, not only fatty acid synthase, is activated by upregulation of a set of responsible enzymes.

We have investigated effects of PPAR agonists to HCV replication. PPAR-alpha agonists, clofibrate and fenofibrate suppressed HCV replication (Fig. 9). PPAR-alpha, not PPAR-gamma, is expressed in hepatocytes, recognizes cellular free fatty acids and leukotriene B4 as a specific ligands, and mediates oxidative degradation of triglyceride and depletion of intracellular fat droplets [43, 44]. These properties of PPAR-alpha agonists suggest that the level of HCV replication is affected by the increased production of fatty acids, but not by the overexpression of their related enzymes. PPAR-gamma agonists, in contrast, amplified HCV replication. Because PPAR-gamma is a regulator of fatty acid metabolism in peripheral tissue and is not expressed in the hepatocytes or in Huh7 cells (data not shown), it is possible that the effects of the PPAR-gamma agonists on HCV replication may be through its pleiotropic side effects such as p38 MAPK activation [45]. Very recently, it has been reported that HCV-NS5A proteins induce expression of PPARgamma [46].

In conclusion, comprehensive gene expression and pathway analyses were useful to study molecular pathways that were involved in HCV pathogenesis and to identify host factors for HCV replication that could constitute antiviral targets.

Acknowledgment This study was supported by grants from Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology-Japan, the Japan Society for the Promotion of Science, Ministry of Health, Labour and Welfare-Japan, Japan Health Sciences Foundation, and National Institute of Biomedical Innovation.

References

1. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology*. 1997;26:62S–5S.
2. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*. 2004;140:346–55.
3. Sakamoto N, Watanabe M. New therapeutic approaches to hepatitis C virus. *J Gastroenterol*. 2009;44:643–9.
4. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 1999;285:110–3.
5. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005;11:791–6.
6. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:9294–9.
7. Tai AW, Benita Y, Peng LF, Kim SS, Sakamoto N, Xavier RJ, et al. A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe*. 2009;5:298–307.
8. Itsui Y, Sakamoto N, Kurosaki M, Kanazawa N, Tanabe Y, Koyama T, et al. Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. *J Viral Hepat*. 2006;13:690–700.
9. Yamashiro T, Sakamoto N, Kurosaki M, Kanazawa N, Tanabe Y, Nakagawa M, et al. Negative regulation of intracellular hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 3. *J Gastroenterol*. 2006;41:750–7.
10. Foy E, Li K, Sumpter R Jr, Loo YM, Johnson CL, Wang C, et al. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:2986–91.
11. Sakamoto N, Yoshimura M, Kimura T, Toyama K, Sekine-Osajima Y, Watanabe M, et al. Bone morphogenetic protein-7 and interferon-alpha synergistically suppress hepatitis C virus replicon. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357:467–73.
12. Murata T, Ohshima T, Yamaji M, Hosaka M, Miyanari Y, Hijikata M, et al. Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. *Virology*. 2005;331:407–17.
13. Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S, et al. Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol*. 2006;80:3332–40.
14. Nakagawa M, Sakamoto N, Tanabe Y, Koyama T, Itsui Y, Takeda Y, et al. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin a is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology*. 2005;129:1031–41.
15. Tardif KD, Mori K, Siddiqui A. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J Virol*. 2002;76:7453–9.
16. Wang J, Tong W, Zhang X, Chen L, Yi Z, Pan T, et al. Hepatitis C virus non-structural protein NS5A interacts with FKBP38 and inhibits apoptosis in Huh7 hepatoma cells. *FEBS Lett*. 2006;580:4392–400.
17. Choi YW, Tan YJ, Lim SG, Hong W, Goh PY. Proteomic approach identifies HSP27 as an interacting partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318:514–9.
18. Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, et al. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J*. 2006;25:5015–25.
19. Sakamoto H, Okamoto K, Aoki M, Kato H, Katsume A, Ohta A, et al. Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol*. 2005;1:333–7.
20. Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, et al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep*. 2003;4:602–8.
21. Tanabe Y, Sakamoto N, Enomoto N, Kurosaki M, Ueda E, Maekawa S, et al. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon-alpha. *J Infect Dis*. 2004;189:1129–39.

22. Guo JT, Bichko VV, Seeger C. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol*. 2001;75:8516–23.
23. Donnelly MLL, Hughes LE, Luke G, Mendoza H, ten Dam E, Gani D, et al. The ‘cleavage’ activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring ‘2A-like’ sequences. *J Gen Virol*. 2001;82:1027–41.
24. Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Kanazawa N, Koyama T, et al. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313:42–7.
25. Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 2002;76:13001–14.
26. Strand C, Enell J, Hedenfalk I, Ferno M. RNA quality in frozen breast cancer samples and the influence on gene expression analysis—a comparison of three evaluation methods using microcapillary electrophoresis traces. *BMC Mol Biol*. 2007;8:38.
27. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:5116–21.
28. Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M, Itoh M, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:D480–4.
29. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B*. 1995;57:289–300.
30. Ciccaglione AR, Marcantonio C, Tritarelli E, Tataseo P, Ferraris A, Bruni R, et al. Microarray analysis identifies a common set of cellular genes modulated by different HCV replicon clones. *BMC Genomics*. 2008;9:309.
31. Hayashi J, Stoyanova R, Seeger C. The transcriptome of HCV replicon expressing cell lines in the presence of alpha interferon. *Virology*. 2005;335:264–75.
32. Scholle F, Li K, Bodola F, Ikeda M, Luxon BA, Lemon SM. Virus–host cell interactions during hepatitis C virus RNA replication: impact of polyprotein expression on the cellular transcriptome and cell cycle association with viral RNA synthesis. *J Virol*. 2004;78:1513–24.
33. Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, Shimotohno K, Kato N. cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells. *Virus Res*. 2005;107:73–81.
34. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, et al. Development of plaque assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology*. 2008;371:71–85.
35. Mottola G, Cardinali G, Ceccacci A, Trozzi C, Bartholomew L, Torrisi MR, et al. Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. *Virology*. 2002;293:31–43.
36. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, et al. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol*. 2003;77:5487–92.
37. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Takano S, Yamaguchi T, et al. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C. *J Infect Dis*. 2008;197:361–70.
38. Ikeda M, Abe K, Yamada M, Dansako H, Naka K, Kato N. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology*. 2006;44:117–25.
39. Kim SS, Peng LF, Lin W, Choe WH, Sakamoto N, Kato N, et al. A cell-based, high-throughput screen for small molecule regulators of hepatitis C virus replication. *Gastroenterology*. 2007;132:311–20.
40. Bader T, Fazili J, Madhoun M, Aston C, Hughes D, Rizvi S, et al. Fluvastatin inhibits hepatitis C replication in humans. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:1383–9.
41. Yang W, Hood BL, Chadwick SL, Liu S, Watkins SC, Luo G, et al. Fatty acid synthase is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production. *Hepatology*. 2008;48:1396–403.
42. Li Y, Tharappel JC, Gooper S, Glenn M, Glauert HP, Spear BT. Expression of the hydrogen peroxide-generating enzyme fatty acyl CoA oxidase activates NF-kappaB. *DNA Cell Biol*. 2000;19:113–20.
43. Costet P, Legendre C, More J, Edgar A, Galtier P, Pineau T. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J Biol Chem*. 1998;273:29577–85.
44. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*. 1999;103:1489–98.
45. Schiefelbein D, Seitz O, Goren I, Dissmann JP, Schmidt H, Bachmann M, et al. Keratinocyte-derived vascular endothelial growth factor biosynthesis represents a pleiotropic side effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist troglitazone but not rosiglitazone and involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase: implications for diabetes-impaired skin repair. *Mol Pharmacol*. 2008;74:952–63.
46. Kim K, Kim KH, Ha E, Park JY, Sakamoto N, Cheong J. Hepatitis C virus NS5A protein increases hepatic lipid accumulation via induction of activation and expression of PPARgamma. *FEBS Lett*. 2009;583:2720–6.
47. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*. 2003;125:1808–17.

平成21年度

2. ウイルス性肝炎の最新の治療と展望

榎本 信幸

Key words : B型肝炎, C型肝炎, 核酸アナログ, ペグインターフェロン, リバビリン

はじめに

現在, ウイルス性肝炎に起因する肝細胞癌の死亡数は年間約3万人であり, 肝癌は癌死の約1割を占め肺癌, 胃癌, 大腸癌について第4位となっている. しかも, 肝癌は発症後は種々の治療により担癌状態のまま平均して数年間にわたり療養が必要になることから, 現在の日本においては担癌状態のまま生存している「がん患者数」としては最も多いと考えられる. これは, 多くの病院の消化器内科病棟において肝癌患者の入院が最多であることから実感されるところである.

一方, 肝癌はその約9割が肝炎ウイルスの慢性感染から発症することから, ウイルス性慢性肝炎の制御によりこの数を大幅に減らすことが可能となる. とくにC型肝炎がその原因の7割を占め, B型肝炎が1~2割を占めることから, これらの慢性肝炎ウイルス感染を的確に診断し治療することが重要である. たとえば, 日本には約100万人のC型肝炎ウイルス (Hepatitis C Virus, HCV) の持続感染者が存在すると推計されている一方, 毎年2万5,000人の患者がHCVによる肝癌を発症している. このような状況が20年間持続すれば, HCVによる肝癌患者数は50

万人となり, 感染者の約半数が肝癌発症のリスクにさらされていることになる. 同様にB型肝炎ウイルスに関しては約100万人の持続感染者から年間5,000人, 20年間で10万人, 10%の感染者に肝癌が発生することが予測される. このような面からも感染者の発見, 早期治療, 肝癌の早期発見・治療がその対策に非常に重要なことがわかる.

本稿では, 以下にB型およびC型肝炎に対する抗ウイルス治療の現状と展望についてまとめる.

1. B型慢性肝炎

B型肝炎ウイルス (HBV) による肝癌は肝細胞癌全体の約15%を占め, その発症は若年者に多くそのインパクトは大きい. かつてはHBe抗原からHBe抗体へのseroconversionにより, 肝炎は鎮静化し無症候性キャリアとして生涯を経過すると考えられてきた. しかし現在ではHBe抗原・抗体よりもHBV-DNA量が予後に密接に関連することが明らかとなり, これを指標に治療方針を決定する必要がある. 特に血中HBV-DNA量は肝硬変への進展, 肝発癌に相関する. 1~3 log copies/mlではほとんど肝硬変への進展, 肝癌の発症が認められないのに対して, 5 log copies/ml以上では高率に肝硬変・肝癌の発症が認められる. 一方, 4 log copies/ml以上では, 5 log copies/ml以上ほどではないにしても4 log copies/ml未満よ

えのもと のぶゆき: 山梨大学第一内科

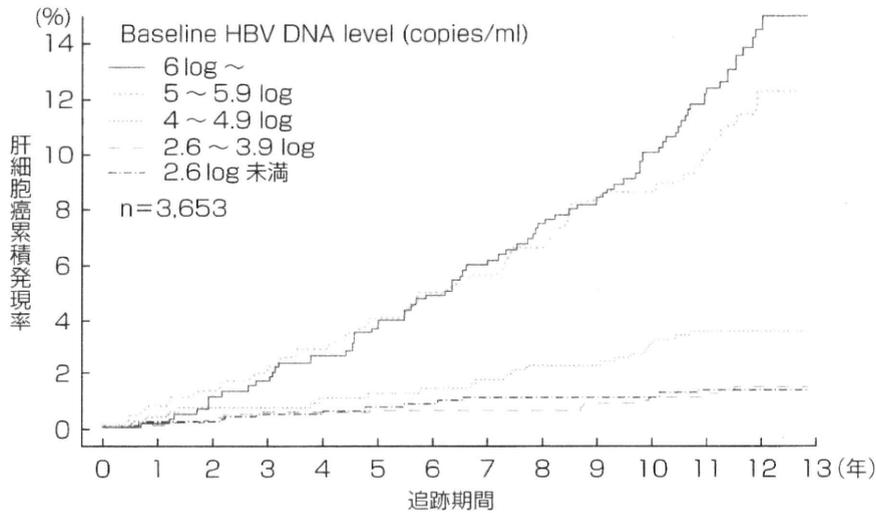


図 1. HBV DNA 量と肝癌発症率

りは有意にその進展率は高い¹⁾(図 1)。

このようなエビデンスを踏まえて、現行の厚生労働省研究班による治療ガイドラインでも肝硬変では 3 log copies/ml 以上, HBe 抗原陰性では 4 log copies/ml 以上, HBe 抗原陽性では 5 log copies/ml 以上の症例を治療対象とみなしている(表)。しかしながら、このウイルス量を核酸アナログ剤(逆転写酵素阻害剤, ラミブジン, アデホビル, エンテカビルが国内では認可されている)により人為的に抑制した場合にどの程度その予後が改善するかについては限定された成績しか示されていない。ラミブジンの 5 年間の投与で肝機能, ウイルス増殖, 肝線維化進展などについて抑制効果があることは示されている²⁾が、より長期の肝硬変進展・肝発癌抑制効果については確実には証明されていない。さらに現在の第一選択であるエンテカビルを使用した場合にどの程度これらのエンドポイントが改善するかは今後の課題である。

また、核酸アナログ剤では HBV を体内から完全に排除することは不可能であり、投与を中止すると HBV の再増殖が高率に起こり、長期の維持投与が必要である。HBe 抗原陽性患者ではセロコンバージョンが長期間持続した場合、HBe 抗原陰性患者では HBs 抗原の消失あるいは HBV-DNA

の陰性化が 6 カ月以上持続した場合にラミブジン投与の中止も検討可能とされている。このような場合の再燃率、あるいは再燃予測因子についても十分に解明されているとは言えず、また中止後の肝炎の再増悪による重症化の可能性もあることから一般化しておらず今後の検討が待たれている。ガイドラインには Sequential 療法として核酸アナログ治療後にインターフェロン治療を行い薬剤を中止する方法も選択肢とされている。

また初期の核酸アナログ剤であるラミブジンでは年率 10~20% で HBV の逆転写酵素遺伝子に耐性変異が生じウイルスが再増殖する。このようなラミブジン耐性ウイルスに対してはアデホビルが有効であるが、ラミブジン耐性ウイルスに対するアデホビル単独投与では年率約 5% でアデホビル耐性となるため、ラミブジン・アデホビルの併用治療が必要である³⁾。

現在の第一選択薬は耐性発現率の最も低いエンテカビル(年間耐性化率 1%)であるが、ラミブジン耐性ウイルスはエンテカビルに対しても耐性化しやすい(年間耐性化率 10%)ため注意が必要である⁴⁾。すでにラミブジンを投与され耐性化の認められていない症例で、エンテカビルへの切り替えが可能であるかについては明確な

表. 厚生労働省研究班による B 型慢性肝炎の治療ガイドライン (2009 年 3 月改定)

35 歳未満 B 型慢性肝炎の治療ガイドライン

治療対象は、ALT \geq 31 IU/l で：
 HBe 抗原陽性例は、HBV DNA 量 5 log copies/ml 以上、
 HBe 抗原陰性例は、4 log copies/ml 以上
 肝硬変では、3 log copies/ml 以上

HBV DNA 量 HBe 抗原	\geq 7 log copies/ml	< 7 log copies/ml
e 抗原陽性	① IFN 長期投与 (24 ~ 48 週) ② Entecavir	① IFN 長期投与 (24 ~ 48 週) ② Entecavir
e 抗原陰性	① *Sequential 療法 (Entecavir + IFN 連続療法) ② Entecavir	① 経過観察 ② IFN 長期投与 (24 週)
血小板 15 万未満または F2 以上の進行例には最初から Entecavir		

*Sequential 療法とは、核酸アナログ製剤投与により HBV DNA が検出感度以下になった症例に対し IFN を 4 週間併用し、その後、IFN 単独で 20 週間投与し薬剤を中止する。

35 歳以上 B 型慢性肝炎の治療ガイドライン

治療対象は、ALT \geq 31 IU/l で：
 HBe 抗原陽性例は、HBV DNA 量 5 log copies/ml 以上、
 HBe 抗原陰性例は、4 log copies/ml 以上
 肝硬変では、3 log copies/ml 以上

HBV DNA 量 HBe 抗原	\geq 7 log copies/ml	< 7 log copies/ml
e 抗原陽性	① Entecavir ② *Sequential 療法 (Entecavir + IFN 連続療法)	① Entecavir ② IFN 長期投与 (24 ~ 48 週)
e 抗原陰性	Entecavir	① Entecavir ② IFN 長期投与 (24 ~ 48 週)

*Sequential 療法とは、核酸アナログ製剤投与により HBV DNA が検出感度以下になった症例に対し IFN を 4 週間併用し、その後、IFN 単独で 20 週間投与し薬剤を中止する。

Lamivudine 投与中 B 型慢性肝炎患者に対する
核酸アナログ製剤治療ガイドライン

Lamivudine 投与期間		3 年未満	3 年以上
HBV DNA 量			
< 1.8 log copies/ml 持続		Entecavir 0.5 mg/日に 切り替え可	Lamivudine 100 mg/日 を継続
\geq 1.8 log copies/ml	* VBT なし	Entecavir 0.5 mg/日に 切り替え可	
	* VBT あり	Adefovir 10 mg/日併用	Adefovir 10 mg/日併用

*VBT : viral breakthrough

エビデンスは乏しいが、3 年以内であればラミブジン耐性ウイルスの発生はまれと考えられ明ら

かなラミブジン耐性変異が検出されていなければ切り替えが考慮される。一方、それ以上の期

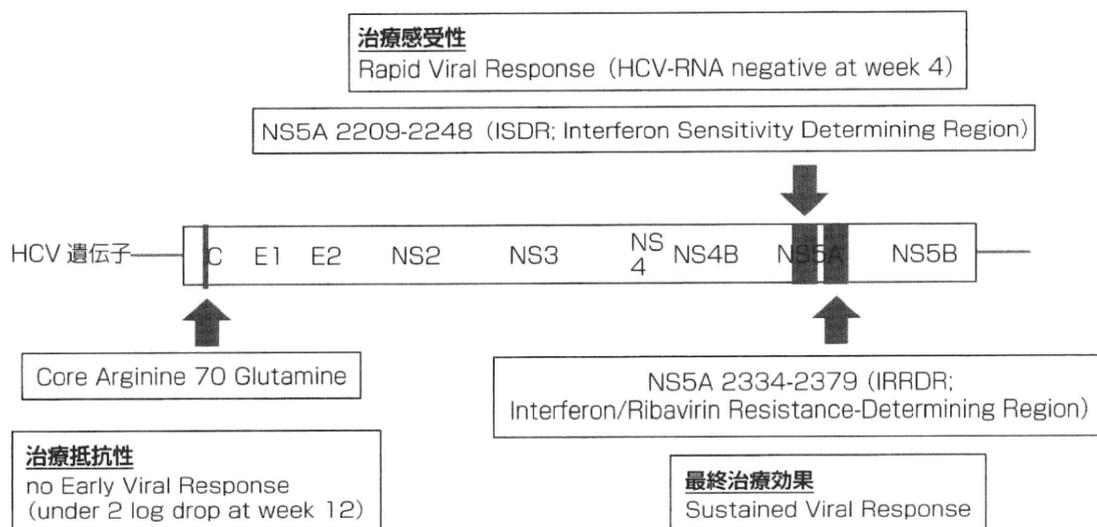


図2. HCV-1bにおいて Peginterferon/Ribavirin 治療効果を規定する HCV 遺伝子領域

間ラミブジンを投与された症例ではすでに耐性ウイルスが体内に出現している可能性があるため、ラミブジンは続行し万一臨床的に耐性ウイルスが確認されればアデホビルを加えることが推奨されている。

以上のように、核酸アナログ治療は短期的な効果は良好であるが、長期的な持続投与の効果については不明の点が残っている。一方、インターフェロンの半年から1年の投与で30%程度の患者で投与中止後の持続的なHBV増殖の鎮静化、さらに一部の患者ではウイルスの体内からの完全排除を達成する可能性があり、特にsero-conversionによる鎮静化の起こりやすい35歳以下の症例ではまず、第一に試みるべき治療となっている。週一回投与の可能なペグインターフェロンによる治療がすでに海外では認可されており治療の利便性も向上している⁴⁾。今後、B型慢性肝炎の治療としてはペグインターフェロンの導入、新たな核酸アナログ剤の導入・開発、併用療法の評価などが展望される。

2. C型慢性肝炎

HCVは肝癌の原因の約70%を占め、その対策

は現在国民的課題となっている。C型慢性肝炎の治療は2001年のペグインターフェロン・リバビリン治療の導入により劇的にその治療効果が向上した。すなわちインターフェロンに抵抗性のHCV-1b、高ウイルス量の症例であっても約45%は1年間の標準治療によりHCVの排除(sustained viral response, SVR)が達成されることが明らかとなった。

またインターフェロンに感受性のHCV遺伝子型2a/2bであれば6カ月間の治療で80~90%の症例でHCV排除が達成される。HCVの遺伝子型により肝癌への進展率に差はないので、HCV遺伝子型2a/2bであっても肝癌に進展するまで未治療で放置されることがあってはならない。HCV陽性が判明した場合には必ずHCV遺伝子型を検索し2a/2b型であれば積極的にインターフェロン治療を考慮する必要がある。遺伝子型1b型であっても低ウイルス量の場合にはインターフェロン単独治療で高いウイルス排除率が見込まれる。これは後述のようにHCV遺伝子NS5A領域のインターフェロン感受性決定領域(ISDR)に変異を持つウイルスに感染している場合が多いためである。

HCV-1b感染でウイルス排除が可能であるかど

うかは、ウイルス因子、宿主因子、治療因子などに影響される。特にウイルス因子として重要なのはウイルス遺伝子変異であり、HCV遺伝子NS5A領域内のインターフェロン感受性決定領域 (interferon sensitivity determining region, ISDR) の変異⁵⁾ およびコア蛋白 70 番アミノ酸変異⁶⁾ が重要である。これらの解析は臨床検査として普及しており、インターフェロン治療の効果を予測する上で非常に有用である。ISDRはNS5A蛋白内の 40 アミノ酸領域(2209~2248 番アミノ酸) であり、この領域に変異が多いほどHCVはインターフェロン感受性となり、一般に血中ウイルス量は低下する。4 アミノ酸変異以上であればインターフェロン単独治療で、2 アミノ酸変異以上であればペグインターフェロン・リバビリン併用治療で 80% 以上の高い治癒率が見込まれる。一方、ISDR変異が 0 または 1 変異のHCV-1bは難治性である。これらのウイルスに対するペグインターフェロン・リバビリン併用治療ではコア蛋白 70 番アミノ酸が治療効果に強い影響を与える。すなわち 70 番アミノ酸がアルギニンの場合には比較的治療感受性があり 60% 以上のウイルス排除率があるが、グルタミンの場合は一般に高度に治療抵抗性であり著効率は 20% 程度である。さらに、NS5A蛋白のIRRDR (interferon ribavirin resistance determining region) のアミノ酸変異がさらに詳細な治療効果に影響を与えることも解明されている⁷⁾。

一方、宿主因子としては年齢、性別、肝臓の線維化が影響する。年齢については、平均してウイルス排除率は男性で (100 - 年齢) %、女性は男性より同じ年齢であれば 10% ウイルス排除率が低下する。男女とも 1 歳ごとに 1% ずつウイルス排除率は低下する⁸⁾。肝臓の線維化は進行するほど著効率は低下する。これらの現象の機序は十分に解明されていない。2009 年にゲノムワイド関連解析によるヒト全遺伝子の SNP 解析により IL28B (インターフェロンラムダ 3) 遺伝子多型が治療感受性に非常に強い影響を与えるこ

とが明らかとなった⁹⁾。今後は、ウイルスおよび宿主遺伝子情報によるインターフェロン感受性検査が臨床上もさらに重要になると考えられる。

治療因子としてはペグインターフェロンおよびリバビリンの投与量および投与期間があり、一般的には投与量と投与期間が増大するほど治療効果は高くなるが、至適な投与量・期間はウイルスおよび宿主因子により異なる。さらには治療開始後の血液中のウイルス動態をガイドとして治療期間を設定することが一般化している。すなわち、投与開始 4 週以内に血中ウイルスが検出できなくなる rapid viral responder では高い著効率が期待され、治療前のウイルス量が低い場合には 24 週間に治療期間を短縮できる可能性がある。また投与開始 12 週以内に血中ウイルスが陰性となる complete early viral responder は標準の 48 週治療により高率にウイルスが排除される。一方、12 週でウイルスが陽性であるが治療前の 100 分の 1 以下となる partial early viral responder、あるいは 12 週以降、36 週までにウイルスが消失する late viral responder は治療期間の延長が必要であり、通常は 72 週間の投与が行われる。12 週の治療で HCV の減少が 1/100 に達しない no early viral responder ではウイルス排除は通常困難であり治療の中止が考慮される。このような response-guided therapy は現在の C 型肝炎治療の基本となっている¹⁰⁾。

今後、登場する経口の HCV のプロテアーゼ阻害剤あるいはポリメラーゼ阻害剤はさらに治療効果を高めることが期待されている。プロテアーゼ阻害剤であるテラプレビルは最も開発の進んでいる薬剤であり臨床試験も終了しつつある。欧米の試験では、ペグインターフェロン・リバビリン・テラプレビルの 3 剤併用の 24 週治療でこれまでのペグインターフェロン・リバビリンの 2 剤併用の 48 週治療に比較して 20% 程度ウイルス排除率が向上することが示されており、その臨床導入が期待されている^{11,12)}。しかし、3 剤併用によっても依然として難治の症例が存在

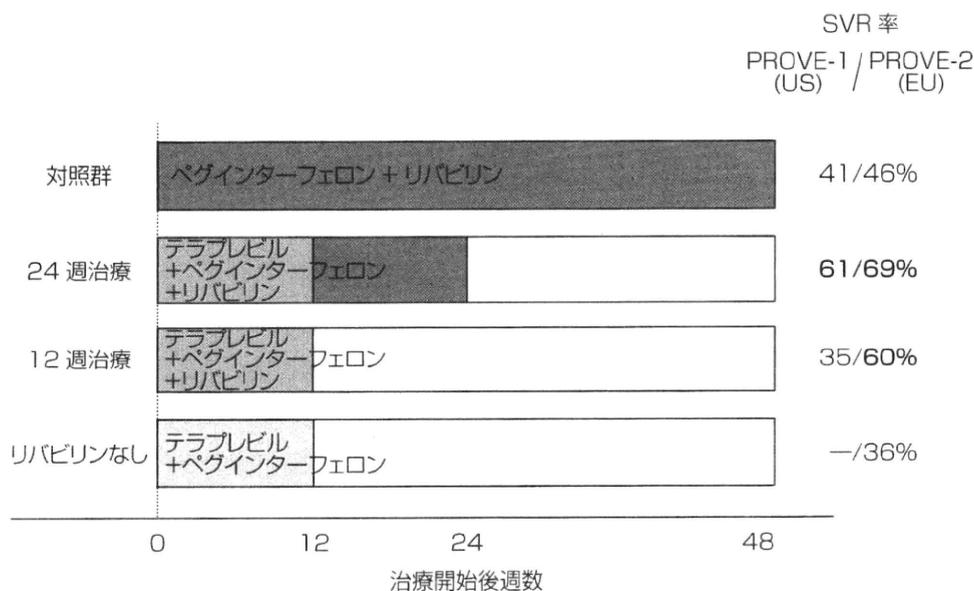


図 3. 新しい C 型肝炎治療薬テラプレビル（プロテアーゼ阻害剤）による治療効果

すること、また副作用が増大する懸念もありさらなる治療法の向上が望まれる。

おわりに

B型およびC型慢性肝炎治療の最近の状況と今後の展望を中心に解説した。ウイルス肝炎の治療は年単位で急速に進歩しており、一般内科医にその成果が周知される前に患者が肝細胞癌を発症しているくらいすらある。多くの内科専門医が最新の肝炎ウイルス治療に知悉し、一人でも多くの患者が最新の治療を受けられることが望まれる。

文 献

- 1) Chen CJ, et al; REVEAL-HBV Study Group: Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 295 (1) : 65-73, 2006.
- 2) Liaw YF, et al; Cirrhosis Asian Lamivudine Multicentre Study Group: Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 351 (15) : 1521-1531, 2004.
- 3) Dienstag JL: Benefits and risks of nucleoside analog therapy for hepatitis B. *Hepatology* 49 (5 Suppl) : S112-121, 2009.
- 4) Perrillo R: Benefits and risks of interferon therapy for hepatitis B. *Hepatology* 49 (5 Suppl) : S103-101, 2009.
- 5) Enomoto N, 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 (2) : 77-81, 1996.
- 6) Akuta N, et al: Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology* 48(6) : 372-380, 2005.
- 7) El-Shamy A, et al: Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 48 (1) : 38-47, 2008.
- 8) Watanabe S, et al; PERFECT Study Group: 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. *Hepatology* 2009. [Epub ahead of print]
- 9) Tanaka Y, et al: Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41 (10) : 1105-1109, 2009. Epub 2009 Sep 13.
- 10) Ghany MG, et al; American Association for the Study of Liver Diseases: Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 49 (4) : 1335-1374, 2009.
- 11) McHutchison JG, et al; PROVE1 Study Team: Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV geno-

- type 1 infection. *N Engl J Med* 360(18) : 1827-1838, 2009.
Erratum in : *N Engl J Med* 2009 Oct 8 ; 361 (15) : 1516.
- 12) Hézode C, et al ; PROVE2 Study Team : Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 360 (18) : 1839-1850, 2009.
-

最新の検査と臨床
肝炎ウイルスの遺伝子解析—病態・治療効果との関連—
C型肝炎ウイルス(HCV)

三浦美香・坂本 穰*・榎本信幸

山梨大学医学部第1内科・*山梨大学大学院肝炎地域先端医療システム学/みうら・みか さかもと・みのる
えのもと・のぶゆき

はじめに●

C型肝炎ウイルス(HCV)は、高率に持続感染し、数十年の経過で肝硬変、肝癌を引き起こすが、これらの発症を防ぐにはHCVを体内から完全排除する必要があり、インターフェロン治療の重要性が高まっている。現在、C型慢性肝炎に対する治療成績はペグインターフェロンとリバビリンの併用療法によりウイルス学的著効 sustained virological response (SVR)率が70%に向上している。しかし、難治とされる genotype 1b かつ高ウイルス量では、併用療法を48週間行ってもSVRは50%弱である。このようなインターフェロン治療反応性については、ウイルス側の要因としてHCVの遺伝子型(genotype)をはじめとする、さまざまな遺伝子変異の存在が明らかになってきている。これに宿主側因子(年齢、性別、肝線維化など)を加えることでより詳細な治療効果予測が可能となり、臨床応用されている。

HCVの遺伝子構造●

HCVは *Flavivirus* 科の *Hepacivirus* 属に属する約9,600塩基の一本鎖(プラス鎖)RNAウイルス

である。ゲノムの両端に非翻訳領域が存在し、中央部には約3,010個のアミノ酸からなる一本のポリ蛋白前駆体をコードする open reading region が存在し、この領域からHCVの構造蛋白(コア、エンベロープ蛋白)とウイルス増殖に必要な種々の酵素(非構造蛋白)がつくられる(図1)。

HCVはウイルス増殖の過程で遺伝子の修復機構を持たないため、高頻度にウイルス遺伝子変化を生じる。さらに、一個体の中でも遺伝子配列のわずかに異なるさまざまな clone が混在する状態 (quasispecies) となっている。この多様性が臨床経過の決定的な差異を作り出している可能性がある。

これまでに、このHCV遺伝子変化とインターフェロン感受性との関連については多くの指摘がある。コア領域(コア70・91番アミノ酸変異)、E2/NS1領域に存在する超可変領域 hypervariable region (HVR)、phosphorylation homology domain (PePHD)、NS5A領域のPKR binding domain、インターフェロン感受性領域 interferon sensitivity determining region (ISDR)、IFN/RBV

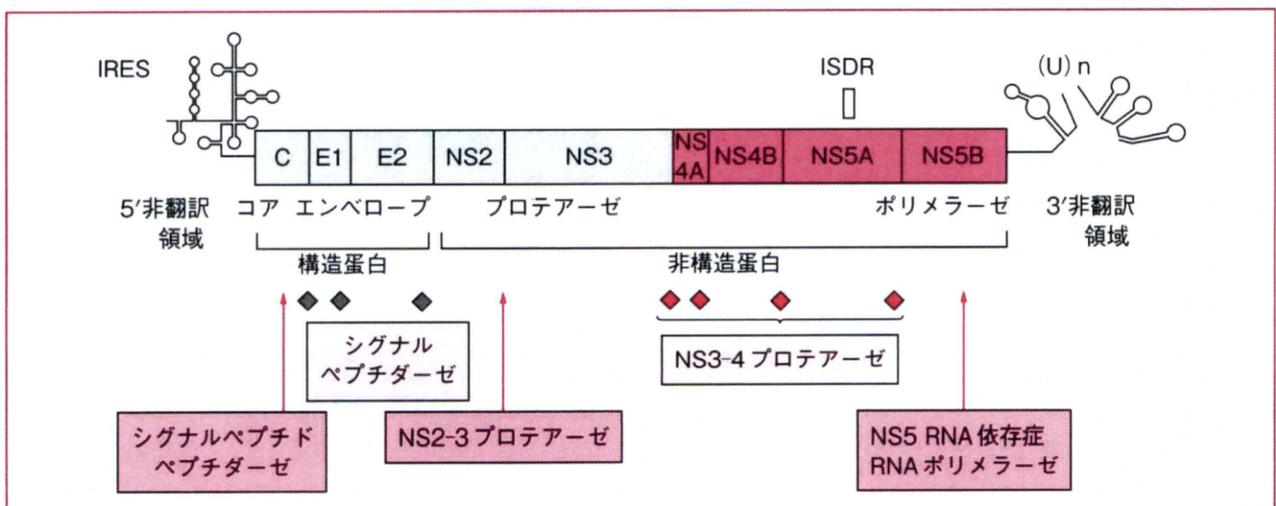


図1 C型肝炎ウイルスの遺伝子構造

- 現在、臨床応用に最も注目されているのが、NS5A領域 (ISDR) とコアアミノ酸変異である。
- 遺伝子型ごとのインターフェロン治療効果は genotype 間で異なる。
- インターフェロン単独療法では4個以上の変異が治療効果を得るために必要であった。

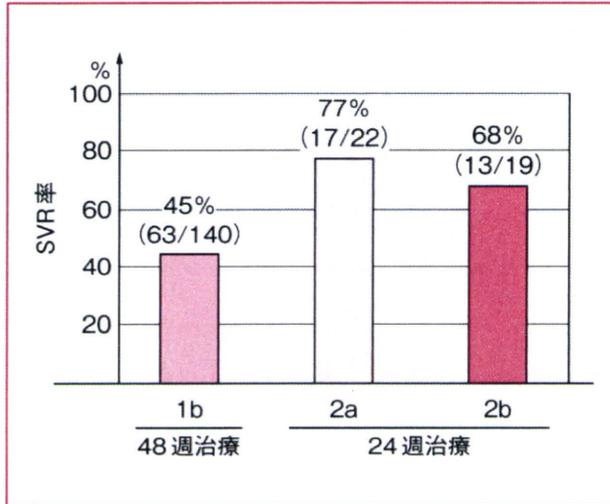


図2 ペグインターフェロン+リバビリン併用療法における genotype と SVR 率

resistance-determining region (IRRD) などであるが、現在、臨床応用に最も注目されているのが、NS5A領域 (ISDR) とコアアミノ酸変異である。

● HCV 遺伝子型

このように HCV 遺伝子は株間での変異が大きく、HCV はその核酸配列の比較解析から大きく6個の遺伝型 (genotype 1~6) に分けられ、さらにそれが2ないし3種類のサブタイプ (a, b, c など) に細分される。これらの遺伝子型は各国、地域ごとに分布が大きく異なっており、わが国においては、1b型が70%、2a型が20%、2b型が10%の構成である。

遺伝子型ごとのインターフェロン治療効果は genotype 間で異なり、一般に genotype 1, 4で悪く、genotype 2, 3, 5, 6で良好である。われわれの施設でのペグインターフェロンとリバビリン併用療法の SVR 率は、1b型に対する48週治療、2a型および2b型の24週治療でそれぞれ45% (63/140)、77% (17/22)、68% (13/19)であった (図2)。

● NS5A-ISDR

1b型のHCVでは、インターフェロン単独療法において、NS5A領域のC末端側の40アミノ酸 (NS5A a.a.2209-2248) が治療効果と密接に関連することが明らかにされ、この領域はISDRと命名された¹⁾。この領域はPKR binding domainのN末端側に位置し、ウイルス増殖に関与している部位と考えられている。インターフェロン単独療法では、この領域に変異のない野生型 (wild type) でSVRとなる可能性が低く、4個以上の変異がある変異型 (mutant type) ではきわめて高いSVR率を示し、1~3個の変異がある中間型 (intermediate type) ではこの中間のSVR率を示すことが明らかとなっている。臨床的には、野生型ではウイルス量は低く、ISDRの変異が増すほどウイルス量は減少し、ウイルス量とも相関することが明らかになっているが、多変量解析では、ISDR変異数はウイルス量とは独立した治療効果を決める因子であった。同様に、ペグインターフェロンとリバビリン併用療法においてISDRについて検討すると、治療効果予測因子は、宿主因子を含めて多変量解析を行ってもISDR変異2個以上が、治療効果を規定する最も重要な因子であることが明らかになった。したがって、ISDR変異は、インターフェロン単独療法では4個以上の変異が治療効果を得るために必要であったが、治療効果の高いペグインターフェロンとリバビリン併用療法では、2個以上の変異があれば80%以上の高い確率でSVRが期待できることとなった。

● コア領域変異

しかし、ISDR変異数が同じであっても治療反応性が異なる症例が存在し、特にISDR変異0ないし1個であってもSVRとなる症例とそうでない症例が存在する。そこでわれわれはHCV genotype 1bでISDR変異0ないし1個の症例で

- ペグインターフェロンとリバビリン併用療法では、2個以上の変異があれば80%以上の高い確率でSVRが期待できる。
- ISDR変異0ないし1個の難治が予想される症例であっても、コア70番アミノ酸がアルギニン(R)であれば高率にSVRが期待できる。

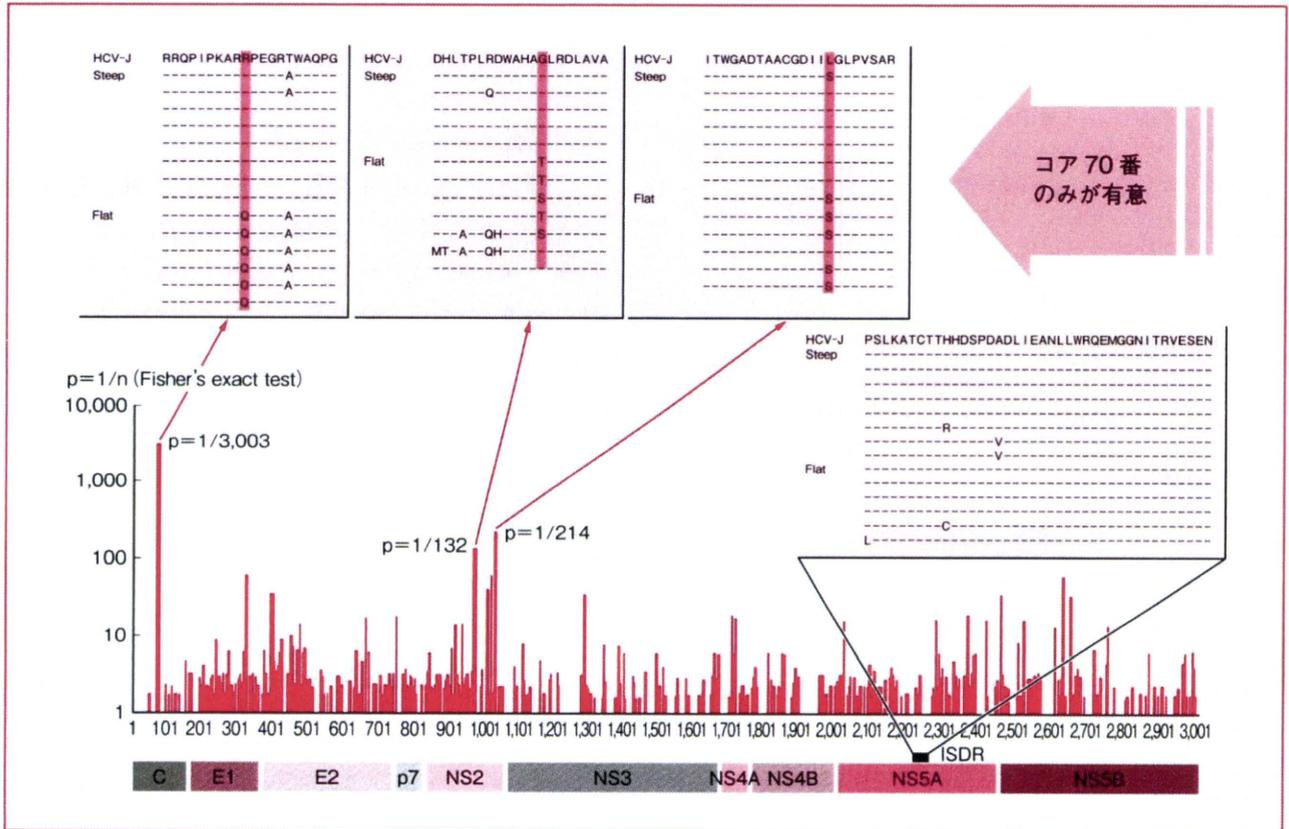


図3 1b型のHCVのうちISDR変異数0ないし1個の症例での、ウイルス反応別の各アミノ酸部位の相違

治療効果に関連する、ISDR以外のウイルス側因子を検討するため、ペグインターフェロンとリバビリン併用療法を行ったISDR変異1ないし0個の症例の中から、極端に初期反応性が異なる2群を選び、HCV全アミノ酸配列の違いを決定した。すなわち、治療開始後4週間でウイルス量が2log以上低下したsteep responderと1log未満しか低下しなかったflat responderと定義し、HCV全アミノ酸配列の相違を検討した。その結果、明らかにこの2群で有意差をもって異なっていたのは、コア70番のアミノ酸であった(図3)。

さらにこの領域に注目してretrospectiveにインターフェロン治療効果とアミノ酸変異との関連

を検討すると、ISDR変異0ないし1個の難治が予想される症例であっても、コア70番アミノ酸がアルギニン(R)であれば高率にSVRが期待できるが、グルタミン(Q)に変異しているとインターフェロン治療反応性がきわめて悪く、治療中断した症例や治療完遂してもSVRとならない症例が多数を占めた。このようにISDR変異に加えてコア変異を検討することで、難治性であるHCV genotype 1b症例の治療効果を正確に予測することが可能となった^{2,3)}。

Akutaらもコア領域の70番と91番のアミノ酸変異がみられるとインターフェロン治療効果が劣り、特に50歳以上の女性ではその傾向が顕著

- ISDR 変異に加えてコア変異を検討することで、難治性である HCV genotype 1b 症例の治療効果を正確に予測することが可能。
- ウイルス側因子の検討に、宿主側因子である年齢、性別、肝線維化、脂肪化、初回・再治療、前治療の効果などを考慮することでより詳細な治療効果予測が可能になる。

表 1 C 型慢性肝炎に対するテーラーメイド治療

1) 遺伝子型
2 型：インターフェロン単独
高ウイルス量ではペグインターフェロン
＋リバビリン 24 週
1 型：ISDR とコア領域変異測定による方針決定

2) 1 型における ISDR とコアアミノ酸 70 番変異
ISDR 変異数 4 個以上：インターフェロン単独
ISDR 変異数 2 個以上：ペグインターフェロン
＋リバビリン 48 週
ISDR 変異数 0・1 個の場合：下記のペグインター
フェロン＋リバビリンの成績をふまえ、検討する

コア70番 アミノ酸	ISDR 変異数		
	0	1	2 個 以上
R	72 週投与により 70%	86%	81%
NonR (Q)	72 週投与 (8 週以内の陰 性化例) により 40%		

であることを報告している⁴⁾。

● HCV 遺伝子解析と臨床への応用

このように HCV の遺伝子解析により治療効果を予測することは可能となった。すなわち、遺伝子型が 2a ないしは 2b 型であれば、インターフェロン単独療法でもある程度治療効果は期待できるが、ウイルス量が多い場合は、ペグインターフェロンとリバビリンの併用療法が選択可能である。1b 型でウイルス量が多い場合は ISDR が重要である。ISDR 変異数が 4 個以上あれば、単独治療でも治療可能であるし、2 個以上であればペグインターフェロンとリバビリンの併用療法 48 週間の治療で SVR が期待できる。また、ISDR 変異数が 0 ないし 1 個であってもコア 70 番のアミノ酸が R であればある程度 SVR が期待できるが、Q であれば治療には慎重である必要がある。しか

し、ISDR 変異数が 0 ないし 1 個でコア 70 番が Q であっても、治療早期 (8 週以内) にウイルス陰性化が得られれば、72 週間投与により SVR となる可能性が残されている (表 1)。

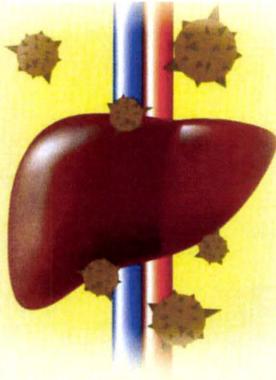
これらのウイルス側因子の検討に、宿主側因子である年齢、性別、肝線維化、脂肪化、初回・再治療、前治療の効果などを考慮することでより詳細な治療効果予測が可能になるとと思われる。

● おわりに

HCV の遺伝子解析によって、インターフェロン感受性とウイルス構造の関連が明らかとなり、臨床応用が可能となった。今後は新しい抗ウイルス薬 (プロテアーゼ阻害薬やポリメラーゼ阻害薬など) への耐性化における HCV 遺伝子解析の応用が期待されている。一方、HCV 遺伝子構造によって臨床経過がどのように修飾され得るのかは未だ解明されていない問題である。肝線維化や発癌などの病態の進行に関与する HCV 遺伝子構造が明らかとなれば、個々の症例ごとのテーラーメイド治療が可能となることから、この方面におけるさらなる研究の進展が望まれる。

文 献

- 1) Enomoto, N. et al. : Mutations in the non-structural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b. *N Engl J Med* 334 : 77-81, 1996
- 2) 前川 伸哉 ほか : Hepatitis Virus Genome Wide Analysis. 肝疾患 Review 2008-2009, 日本メデイカルセンター, p.92-97, 2008
- 3) 坂本 穰 ほか : Interferon sensitivity determining region : ISDR. *肝胆膵* 57 (5) : 773-779, 2008
- 4) Akuta, N. et al. : Predictors of viral kinetics to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol* 79 : 1686-1695, 2007



ウイルス遺伝子から見た C型肝炎治療

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

講師 坂本 穰 (さかもと・みのる)

山梨大学 医学部
内科学講座第1教室 (消化器内科)

教授 榎本信幸 (えのもと・のぶゆき)

はじめに

C型肝炎に対する最も根本的な治療はC型肝炎ウイルス(HCV)を排除することである。現在のところ、これを可能とする治療法はインターフェロンを中心とした抗ウイルス療法のみであり、その治療効果は持続的ウイルス陰性化(sustained viral response〔SVR〕)として評価される。しかし、現在の最強かつ標準治療であるペグインターフェロン+リバビリン併用療法のSVR率は約70%に過ぎず、とくに、最も難治である1b型かつ高ウイルス量症例の48週間治療の成績は40%程度に過ぎない。しかしウイルス排除が可能な症例も存在することから、インターフェロン反応性の違いについて多くの検討がなされ、多くの因子が明らかになってきた。すなわち、遺伝子型、ウイルス量、遺伝子変異などのウイルス側因子、性、年齢、肝線維化・脂肪化、インスリン抵抗性などの宿主因子、また、薬剤の中止・減量、治療期間などの治療因子などである。このうち、とくに遺伝子型とウイルス量をはじめとしたウイルス側の因子が最も重要であることが明らかになっている。

インターフェロン治療効果に 関連するHCVの遺伝子変異

C型肝炎ウイルスは+1本鎖のRNAウイルスであり、ゲノムの両端に非翻訳領域が存在し、中央部には約3010個のアミノ酸からなる1本のポリ蛋白前駆体をコードするopen reading frameが存在する。この領域にはHCVの構造蛋白(コア、エンベロープ蛋白)とウイルス増殖に必要な種々の酵素をコードする非構造領域

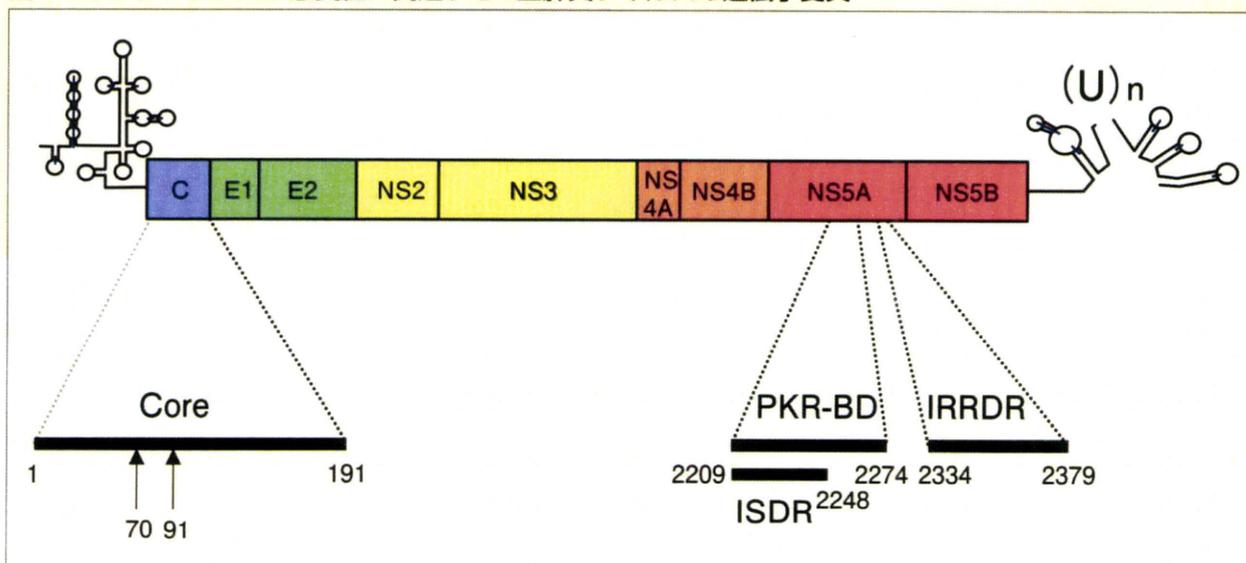
(Nonstructural region : NS)が存在する。これまで、インターフェロン治療の治療効果規定因子として明らかになっているウイルス側の因子は、上述の遺伝子型、ウイルス量であるが、1b型ではこのほかに、インターフェロン感受性領域(Interferon sensitivity determining region : ISDR)¹⁻²⁾、コアアミノ酸変異³⁻⁶⁾、IFN/RBV抵抗性領域(IFN/RBV resistance-determining region : IRRDR)⁷⁾などが報告されている(図1)。

HCV遺伝子型

HCVはRNAウイルスであるため、遺伝子の修復機構を持たず、約20%の塩基配列が異なる遺伝子型が存在する。これまでに、世界では少なくとも1~6の遺伝子型(genotype)が存在することが明らかになっているが、わが国では、ほとんどが、1b、2a、2b型であり、1bが70%、2aが20%、2bが10%を占める。遺伝子型測定は健康保険の適応ではないため、日常臨床の現場ではセログループ(serogroup)が用いられ、グループ1は1b、グループ2は2a、2b型に相当する。

遺伝子型ごとのインターフェロン治療効果は大きく異なり、感受性が最も高いのは2a型で、2b、1bの順で感受性が劣る。従来のインターフェロン単独療法(6ヶ月)の治療成績は2aが70%、2bが50%、1bが20%程度であり、2aないしは2b型ではインターフェロン単独療法でも非常に高いウイルス排除率が期待できる。一方、インターフェロンの治療効果は、ウイルス量によっても規定され、ウイルス量が少ないと治療効果が高く、多いとウイルス排除率は低い。このため厚生労働省の研究室から示されているガイドライン⁸⁾でも、初回治療の場合、高ウイルス量症例では、最も強力なペグインターフ

図1 インターフェロン感受性に関連するC型肝炎ウイルスの遺伝子変異



エロン+リバビリン併用療法が推奨され、1b型では48週間、2a/2b型では24週間の治療期間が標準とされている。すなわち、低ウイルス症例では、インターフェロン単独療法で十分に治癒可能であり、2a/2b型では、たとえ高ウイルス量であっても、併用療法(24週)を行なえば、80%以上のSVRが得られるとの臨床成績による。一方、1b型かつ高ウイルス量症例では、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法を48週間行なっても、ウイルス排除率は40%程度にとどまる。

ISDR

ISDRは、HCVのNS5A領域C末端よりの40アミノ酸(a.a.2209-2248)領域であり、インターフェロン単独療法の時代に1b型の著効症例と無効症例の全塩基配列の比較から見出されたものである。すなわち、インターフェロン単独6ヶ月間の治療で、この領域に、標準配列であるHCV-Jとの比較で4個以上のアミノ酸変異がある(mutant type)とSVRになる可能性が高く、1～3個の変異(intermediate type)や変異なし(wild type)では、治療効果に乏しい。しかし、インターフェロン単独療法では、治療効果はウイルス量と相関し、HCV RNAが多いほど治療効果が劣るため、ISDR変異は単にウイルス量を反映しているに過ぎないとの指摘もある。実際、

ISDRはPKR Binding domainのN末端側に位置し、ウイルス増殖と密接に関連し、ISDRに変異が多くなるほどウイルス量は少なくなることが知られている。しかし、治療効果を規定する因子について、多変量解析を行なうとISDRはウイルス量とは関係なく、SVRに寄与する独立した因子として認められる。一方、現在1b型かつ高ウイルス量のC型慢性肝炎に対する標準治療であるペグインターフェロン+リバビリン併用療法においても、ISDR変異はSVRを規定する独立した因子であることも、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)で集積された症例の検討で明らかになってきた。しかも、インターフェロン単独療法でSVRを得るためには4個以上のアミノ酸変異が必要であったが、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法においては、2個以上の変異があれば80%以上の高い確率でSVRを期待できることが示されている(図2)⁹⁾。

コアアミノ酸変異

1b型HCVのコア領域の70番と91番のアミノ酸変異が、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ことはAkutaraらによって報告されている。すなわち、コアアミノ酸70番のアミノ酸は野生型

図2 1b型に対するPEG-IFN+RBV療法(≦52週)のISDR別SVR率(高ウイルス量のみ、N=193)

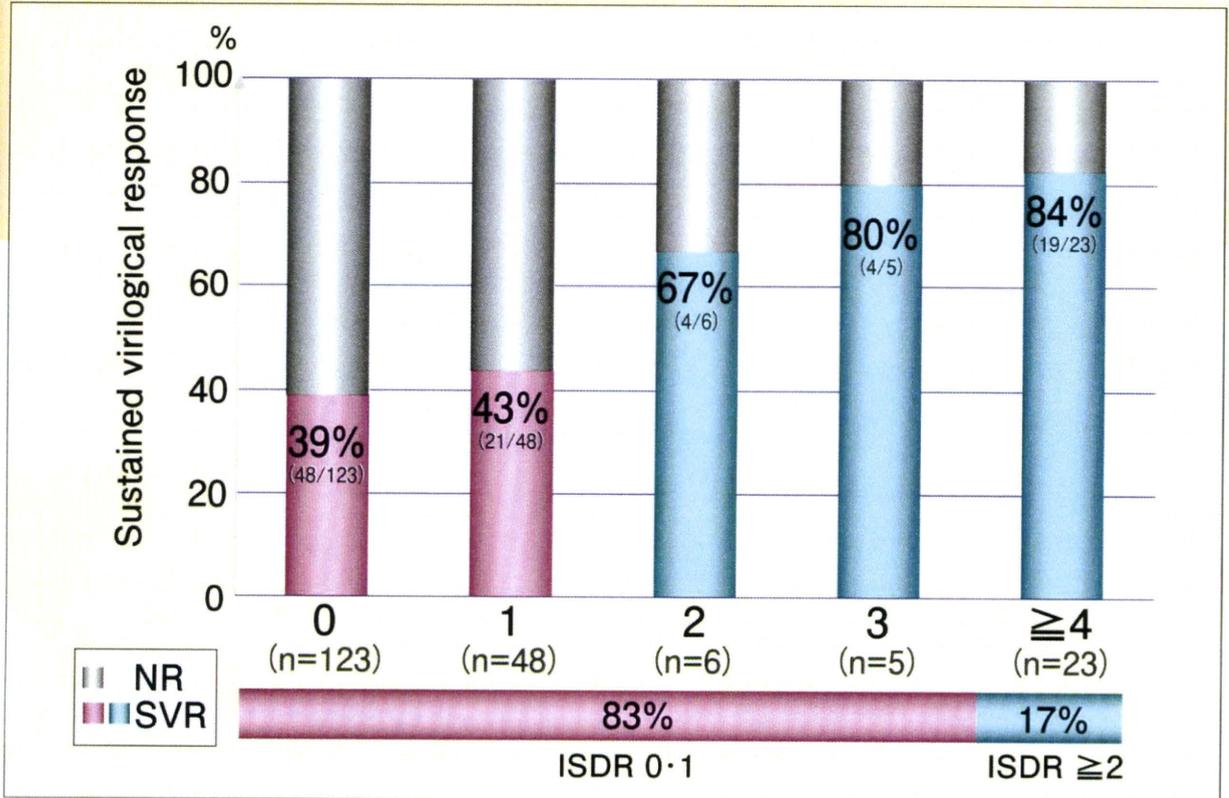


表1 1b型に対するPEG-IFN+RBV療法(≦52週)のISDR別SVR率 (ISDR 0-1のみの検討、高ウイルス量のみ、ISDRN=173)

		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	0.288	0.144-0.578	0.0005	0.165	0.051-0.535	0.0027
性別	M/F	0.896	0.482-1.666	0.7287			
BMI	<23/≥23	1.500	0.729-3.086	0.2707			
F因子	0-1/2-4	0.284	0.109-0.508	0.0005	-	-	-
A因子	0-1/2-3	0.481	0.193-0.832	0.0377	-	-	-
Alb	<4.1/≥4.1	1.305	0.625-2.722	0.4786			
γGTP	<49/≥49	0.317	0.156-0.644	0.0015	-	-	-
ALT	<66/≥66	1.173	0.606-2.270	0.6315			
AST	<58/≥58	0.761	0.390-1.484	0.4228			
T.Chol	<160/≥160	1.524	0.753-3.083	0.2411			
血糖	<97/≥97	0.680	0.301-1.536	0.3537			
HbA1c	<5.2/≥5.2	1.056	0.451-2.470	0.9008			
白血球数	<4700/≥4700	1.900	0.953-3.788	0.0683	-	-	-
好中球数	<2300/≥2300	1.706	0.754-3.857	0.1995			
Hb	<14/≥14	1.696	0.845-3.403	0.1374	-	-	-
血小板数	<15/≥15	3.894	1.915-7.981	0.0002	2.334	0.775-7.032	0.1319
AFP	<4.8/≥4.8	0.305	0.159-0.768	0.0089	-	-	-
HCV RNA (KIU/ml)	<1700/≥1700	0.866	0.450-1.668	0.6671			
HCV コア蛋白量	<6500/≥6500	0.957	0.503-1.821	0.8942			
コアAA70	Q/R	8.533	2.276-31.991	0.0015	21.155	1.790-31.829	0.0059
コアAA91	L/M	0.659	0.255-1.702	0.3889			