

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

サイクロフィリンインヒビター開発の現状に関する研究

研究分担者 井上和明 昭和大学藤が丘病院

研究要旨; 今日 C 型慢性肝炎の新規治療薬の主流は ウイルス因子をターゲットにした治療薬であり NS3 のプロテアーゼ、NS5B のポリメラーゼの阻害剤がその代表格である。この治療法の問題点は GENOTYPE によって効果が異なること、および単独で使用すると薬剤耐性が生じやすくインターフェロンの併用が必須となることである。今回の STUDY では、HCV が増殖に必要とするサイクロフィリンをターゲットにしたサイクロスポリン A 骨格を化学修飾することにより作られたアリスポリビルの効果を検討した。具体的なエンドポイントは標準治療のペグインターフェロン・リバビリンに対してペグインターフェロン・リバビリン・アリスポリビルの三者併用で SVR が上回るかどうかの検討である。

Primary endpoint の検討

検討の結果 SVR がそれぞれ標準治療群で 55%、三者併用群で 76%と、三者併用-RGT 群で 69%、三者併用 24 週群で 53%であった。三者併用群 48 週群では SVR が標準治療群に比して有意に高かった ($p=0.008$)。

IL-28B の検討

IL-28B CC allele

CC のホモでは三者併用群、三者併用-RGT 群では SVR は 100%であった。一方標準治療群と三者併用 24 週投与群では SVR は 73%と 71%であった。

IL-28B TT allele

コントロール群では SVR が 17%であったが三者併用群では 62%、三者併用-RGT 群では 73%、三者併用 24 週では 33%であった。治療期間を半分に短縮しても通常治療の約 2 倍の SVR を IL-28B TT allele の患者で得られることがわかった。

RVR の比較

Als は宿主因子をターゲットにした薬剤であり、ウイルス因子をターゲットにしたプロテアーゼ阻害剤より RVR の占める割合が低い傾向がある。標準治療群の RVR は 15%であったが、三者併用の 48 週では 44%、三者併用-RGT 群では 42%、三者併用 24 週群では 53%であった。いずれもコントロール群に比して有意に高い RVR 率であった。症例数としては多くないが三者併用群では RVR を達成した症例は 100%SVR も達成している。この点で RVR は治療効果予測に有用であった。

Viral breakthrough と Relapse rate

VB の発生は三者併用では 2.8%でありコントロール群の 5.5%よりも有意に低かった。これまでの培養細胞を用いた実験でも Als に対する耐性クローンは出現しにくい。これは宿主因子を対象としている薬剤の一つのアドバンテージである。また relapse rate はコントロール群では 23.5%であるが、三者併用、三者併用 RGT 群ではそれぞれ 15.3%、16.4%であった。

今回の研究で得られた治療効果はプロテアーゼ阻害薬を標準治療に併用した場合と同等であり、有害事象として唯一問題となった高ビリルビン血症も自然回復した。

この薬剤は今後 HCV の有用な治療薬となりうる可能性を持っている。

A. 研究目的

平成 23 年度は、前年度に引き続きサイクロフィリンインヒビターの効果を検証するために欧州で行っていた臨床治験 Phase II 後期の最終成績の報告が中心となる。これまでの研究からサイクロフィリンインヒビターは、1) 単独での強力な抗ウイルス効果、2) Genotype1-4 に有効であること、3) 耐性が生じにくいこと 4) 高い認容性、5) そのユニークな作用機序 (図1) などの点から、実用化の可能性が示されてきたが、今回の検討は当時の標準治療であるペグインターフェロンとリバビリン併用 48 週とこの両者に Alisporivir (Als, Debio-025) (サイクロフィリンインヒビター) を組み合わせた三者併用療法 48 週または 24 週の各群における SVR (Sustained virological response) の比較検討である。なおこれまでの研究はすべてヨーロッパ人中心の研究であったが、日本人の正常人を対象に Phase I Study を施行することにより、本邦での今後の治験の可能性も併せて検討している。

B. 研究方法

I Alisporivir について

Alisporivir (Als, Debio-025) はサイクロスポリン A を化学的に修飾して 11 個のアミノ酸のうち二つ置換したサイクロフィリンインヒビターである。二つのアミノ酸を置換し側鎖も変化した結果サイクロフィリンに対する結合の親和性が増強し、その一方でカルシニューリンに対する結合の親和性をほとんど示さなくなった。結果として Als は親化合物のサイクロスポリン A で問題とされた高血圧や腎障害などの有害事象が起こりにくく (カルシニューリン結合親和性が低い)、かつ HCV の増殖抑制効果 (サイクロフィリン親和性が高い) をより強く示すようになった。

II 対象症例と治験プロトコール

本研究の目的は 48 週または 24 週のペグインターフェロン+リバビリン+Als の三者併用療法とペグインターフェロン+リバビリン 48 週 (標準治療) における SVR の比較である。Primary endpoint は三者併用群のいずれかで、標準治療を上回る SVR が認められるかである。

対象はこれまでインターフェロン治療を受けてこなかった Genotype1 の慢性 C 型肝炎症例である。

プロトコールは 4 アームである (図2)、コントロールアームはペグインターフェロンとリバビリンの通常量 48 週である (n=73)。それ以外の 3 アームでは Als が最初の一週

は 600mg 一日 2 回の投与で、その後は 600mg 一日一回の投与となる。第二アームはペグインターフェロン+リバビリンに Als を 48 週加えた三者併用療法である (n=72)。第三アームは第二アームと同様であるがこれに response guided therapy (RGT) として RVR を達成した患者は治療期間を 24 週とするものである (n=71)。第四アームは三者併用療法 24 週である (n=72)。

各群の男性の割合は 44% から 60% で群間の有意差はなく、Caucasian の割合は 96-97%、平均年齢は 39.1 才から 42.2 才、BMI は 24.2 から 25.4、HCV RNA はすべての群で平均値が 6.2 でこれらの指標については、すべて群間の有意差は認められなかった (表1)。IL-28B rs12979860 CC allele の占める割合はコントロールアームで 33%、三者併用 48 週で 19%、三者併用-RGT 群で 24.8%、三者併用 24 週群で 24% であった。

C. 研究結果

Primary endpoint

ペグインターフェロン・リバビリンの 2 者を併用した 48 週の治療 (標準治療群) で SVR は 55%、null responder は 9.6% であった。三者併用 48 週群の SVR は 76% で null responder は 0% であった (p=0.008)。三者併用 RGT 群では SVR が 69% で null responder が 0% であった。三者併用 24 週群では SVR が 53% で null responder は 0% であった (図3)。

IL-28B の検討 (図4)

IL-28B CC allele

CC のホモでは三者併用群、三者併用-RGT 群では SVR は 100% であった。一方標準治療群と三者併用 24 週投与群では SVR は 73% と 71% であった。

IL-28B TT allele

コントロール群では SVR が 17% であったが三者併用群では 62%、三者併用-RGT 群では 73%、三者併用 24 週では 33% であった。治療期間を半分に短縮しても通常治療の約 2 倍の SVR を IL-28B TT allele の患者で得られることがわかった。

RVR の比較

Als は宿主因子をターゲットにした薬剤であり、ウイルス因子をターゲットにしたプロテアーゼ阻害剤より RVR の占める割合が低い傾向がある。標準治療群の RVR は 15% であったが、三者併用の 48 週では 44%、三者併用

-RGT 群では 42%、三者併用 24 週群では 53%であった。いずれもコントロール群に比して有意に高い RVR 率であった。症例数としては多くないが三者併用群では RVR を達成した症例は 100%SVR も達成している。この点で RVR は治療効果予測に有用であった。

Viral breakthrough と Relapse rate

VB の発生は三者併用では 2.8%でありコントロール群の 5.5%よりも有意に低かった。これまでの培養細胞を用いた実験でも Als に対する耐性クローンは出現しにくい。これは宿主因子を対象としている薬剤の一つのアドバンテージである。また relapse rate はコントロール群では 23.5%であるが、三者併用、三者併用 RGT 群ではそれぞれ 15.3%、16.4%であった。

Adverse events(表2)

有害事象としては early phase より問題とされていたが血清ビリルビン値の上昇が認められることである。コントロール群ではビリルビンの上昇は 1.4%であるのに比して三者併用 48 週で 32.9%、三者併用 RGT 群で 25.4%、三者併用 24 週群で 41.7%認められた。この高ビリルビン血症はトランスアミナーゼの上昇を伴わず、また胆汁酸値の上昇を伴わないことより、肝細胞障害や胆汁鬱滞によるものではなく、はじめの一週の Loading dose の時におこり、4 週目までに自然に改善することより、ビリルビントランスポーターに一過性に薬剤が働いて起こるものと考えられた。

Phase I study について

ロンドンで日本人と Caucasian の正常人を対象とした P K study を行った。今後日本における臨床試験を進める上で重要なデータであるが、今後投稿が予定されるので、別な場所で報告させて頂く。

D. 考察

欧州での Phase IIb study (Essential study)

欧州での結果より三者併用療法は自覚的な有害事象を増加させることなく、有意に SVR を改善することが明らかになった。この薬剤は患者の認容性も高く、唯一の有害事象である高ビリルビン血症であったが、肝細胞障害も胆汁鬱滞もなく、ほとんどのケースで自然に改善することより、この点での臨床上の問題は少ないと考えられる。以上の結果より Alisporivir (Als, Debio-025)(サイクロフィリンインヒビター)は、インターフェロンリバビリンとの併用

でも、さらには経口剤だけの組み合わせにおいても、そのユニークな作用機序も併せて考えると今後検討に値する有用な薬剤と考えられた。

E. 結論

本薬剤をペグインターフェロンとリバビリンに併用した三者併用療法はこれまでの標準治療に比して有意に SVR を改善した。また本剤のユニークな作用機序も併せて考えるとインターフェロンを使用しない経口剤だけの治療においても、有用な薬剤の一つとなり得る可能性が示された。

F.健康危険情報

高ビリルビン血症 ただし 2 週目以降に自然回復。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 井上和明. 急性肝不全・劇症肝炎での対応. レジデントノート増刊 「知りたい」に答える! ICU での重症患者管理(真弓俊彦/編) 2011. 1862-1866、羊土社、東京
2. 井上和明、与芝真彰. 人工肝補助療法からみた近未来のあるべき劇症肝炎治療. 日腹部救急医学会誌 2011; 31(2): 326
3. 井上和明、高橋 寛、与芝真彰. C 型慢性肝炎の新規治療薬. 日消病会誌 2011; 108(7)1189-1199
4. 井上和明. 劇症肝炎・肝性脳症. 救急医学(9月臨時増刊号) 救急薬剤プラクティカルガイド 2011; 35(10): 1350-1354
5. 井上和明. 肝性脳症. medicina 2011; 48(11 増刊号): 278-282
6. Inoue K. Appropriate Liver Support Systems as Perioperative Care in Liver Transplantation Improves Survival. Liver Transpl 2011; 17(6, Suppl. 1): S119-S120.
7. Inoue K, Yoshiba M. An Artificial Liver Support System Using Huge Buffer Volumes Can Prevent Brain Edema and Is an Ideal Bridge for Liver Transplantation in Fulminant Hepatic Failure. Liver Transpl 2011; 17(6, Suppl. 1): S120.
8. Inoue K, Yoshiba M. Change in MELD score is a useful tool of Liver transplantation for patients with fulminant hepatic failure under ALS. Hepatol Int 2011; 5(1): 62-63
9. Inoue K, Nuriya H, Kohara M. Modified PCR-based in situ hybridization reveals accurate distribution of hepatitis B and C viruses. J Hepatol 2011; 54

(Suppl.1): S318

10. Inoue K, Kohara M. Reply to "Significance of a Single-Nucleotide Primer Mismatch in Hepatitis B Virus Real-Time PCR Diagnostic Assays". *J Clin Microbiol* 2011; 49 (12): 4420
11. Inoue K, Yoshiba M, Kohara M. Sophisticated in situ PCR and immunohistochemistry is helpful to understand pathogenesis of chronic hepatitis and fulminant hepatitis. *Hepatology* 2011; 54 (4): 1099A
12. Inoue K, Yoshiba M, Kohara M. Localization and distribution of viral genomes and proteins are helpful to understand pathogenesis of hepatitis. *Global Antiviral Journal* 2011; 7 (Suppl. 1): 94

1.学会発表

1. 井上和明、渡邊綱正、与芝真彰. 強力な人工肝補助療法から見える肝移植にあるべきチーム医療の風景. 第 97 回日本消化器病学会総会, 東京, 2011
2. 井上和明、塗谷秀子、小原道法. PCR と in situ hybridization を組み合わせた HCV と HBV のウイルスゲノム存在様式可視化の試み. 第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011
3. 加藤直也、室山良介、長村文孝、狩野 徹、井上和明、戸田剛太郎、与芝真彰、小池和彦、今井浩三、山下直秀. 日本人を被験者とした肝障害患者薬物動態試験の実施体制の構築. 第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011
4. 井上和明、小原道法. PCR と in situ hybridization を組み合わせた HBV と HCV のウイルスゲノム存在様式可視の試み. 第 7 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム, 広島, 2011
5. 佐藤亜希子、賀古 眞、井上和明. 長期肝補助療法にて救命しえた腎不全合併急性肝不全の一例. 第 47 回日本腹部救急医学会総会, 福岡, 2011
6. 菅波由有、合田真海、川島彰人、北川 泉、賀古眞、井上和明. 塩化リゾチームによる劇症肝炎と考えられた 68 歳男性の一症例. 第 47 回日本腹部救急医学会総会, 福岡, 2011
7. 井上和明、与芝真彰. 人工肝補助療法からみた近

未来のあるべき劇症肝炎治療. 47 回日本腹部救急医学会総会, 福岡, 2011

8. 井上和明、先山あゆみ、五味邦代、吉本和仁、高橋 寛、加藤直也、与芝真彰. 高度の黄疸が遷延し亜急性の経過をとった薬剤性劇症肝炎の一例, 第 316 回日本消化器病学会関東支部例会, 東京, 2011
9. 平田雄一、井上和明、小原道法. ヒト肝細胞での自然免疫応答における IFN- λ の重要性とその誘導メカニズム. 第 53 回日本消化器病学会大会, 福岡, 2011
10. 兼坂 茂、井上和明. 劇症肝不全に対する血液浄化療法の課題. 第 22 回日本急性血液浄化学会, 久留米, 2011
11. Inoue K. Appropriate Liver Support Systems as Perioperative Care in Liver Transplantation Improves Survival. The 2011 Joint International Congress of ILTS, ELITA, & LICAGE, Valencia, Spain, 2011
12. Inoue K, Yoshiba M. An Artificial Liver Support System Using Huge Buffer Volumes Can Prevent Brain Edema and Is an Ideal Bridge for Liver Transplantation in Fulminant Hepatic Failure. The 2011 Joint International Congress of ILTS, ELITA, & LICAGE, Valencia, Spain, 2011
13. Inoue K, Yoshiba M, Kohara M. Sophisticated in situ PCR and immunohistochemistry is helpful to understand pathogenesis of chronic hepatitis and fulminant hepatitis. AASLD 2011 (The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Liver Diseases), San Francisco, U.S.A. 2011
14. Inoue K, Yoshiba M, Kohara M. Localization and distribution of viral genomes and proteins are helpful to understand pathogenesis of hepatitis. HEP DART 2011, Hawaii, U.S.A., 2011

H.知的所有権の出願・取得状況

なし

1.特許取得

今回の研究内容については特になし。

図1 サイクロフィリン阻害剤の作用機序

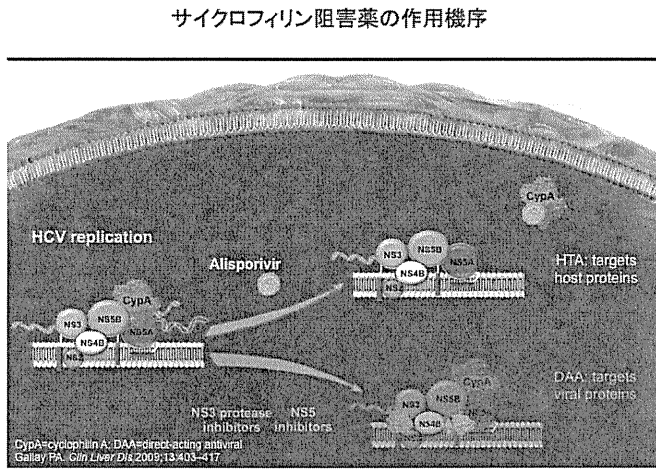
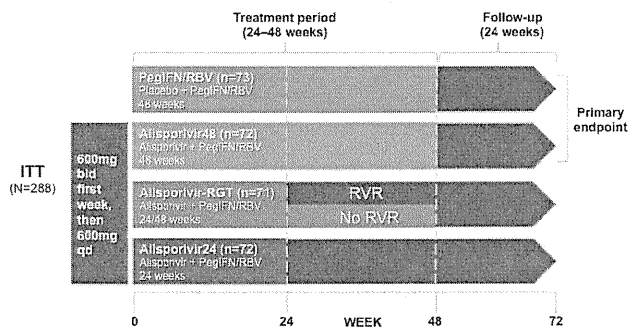


図2 治療プロトコール

今回の治験のプロトコール(4アーム)



PegIFN/RBV=PegIFNα2a 180 μg/week plus ribavirin 1000 or 1200 mg/day; RGT=response-guided treatment. 24 weeks for RVR patients (HCV-RNA <10 IU/mL), 48 weeks for non-RVR patients; ITT=intention-to-treat; bid=twice daily; qd=once daily; RVR=rapid virological response

表1 対象患者

各群の対象患者の特徴

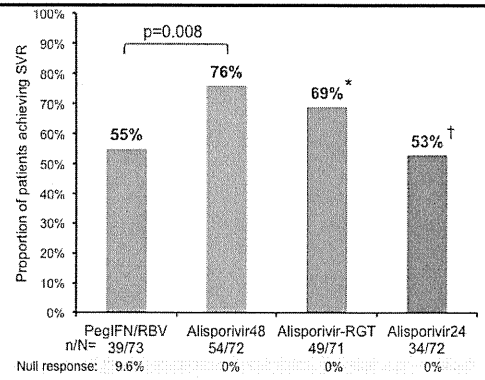
| | PegIFN/RBV n=73 | Alisporivir48 n=72 | Alisporivir-RGT n=71 | Alisporivir24 n=72 |
|----------------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| Male | 52% | 51% | 44% | 60% |
| Caucasian | 97% | 97% | 96% | 97% |
| Age [years], mean | 41.6 | 41.1 | 42.2 | 39.1 |
| BMI, kg/m ² | 25.4 | 24.3 | 24.8 | 24.2 |
| IL28B rs12979860 CC allele* | 33% | 19% | 23% | 24% |
| HCV-RNA, Log ₁₀ IU/mL | 6.2 | 6.2 | 6.2 | 6.2 |
| ALT, U/L | 67.7 | 67.2 | 63.1 | 86.4 |
| Total bilirubin, mg/dL | 0.7 | 0.6 | 0.6 | 0.6 |
| Platelet, x 10 ⁹ /L | 239 | 244 | 247 | 252 |
| ANC, x 10 ⁹ /L | 3.7 | 3.6 | 3.7 | 3.7 |

* Patients not randomized by IL28B genotype
* 78% had HCV-RNA >600,000 IU/mL
* Cirrhosis excluded by Fibroscan® or biopsy

Means unless otherwise stated; ITT population; *pharmacogenomic population
BMI=body mass index; ALT=alanine transaminase; ANC=absolute neutrophil count

図3 各群における Sustained virological response の割合

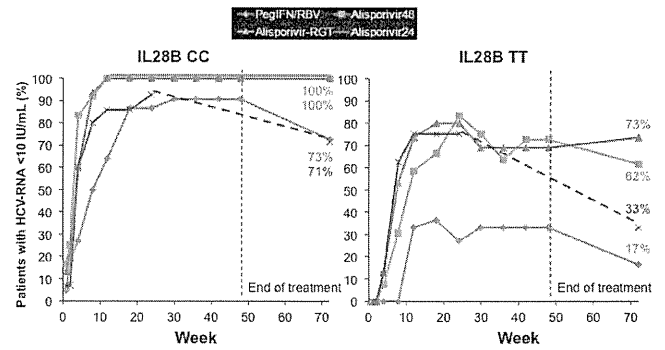
4群間の Sustained virological response の比較



*p=0.084 vs PegIFN/RBV; †p=0.058 vs Alisporivir-RGT; ITT population

図4 SVR と IL-28B との関係

各群の SVR 率と IL-28B との関係



IL28B rs12979860

表2 有害事象のまとめ

有害事象のまとめ

| | PegIFN/RBV n=73 | Alisporivir48 n=73 | Alisporivir-RGT n=71 | Alisporivir24 n=72 |
|---|--------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| Serious AEs | 4 (5.5%) | 5 (6.9%) | 7 (9.9%) | 5 (6.9%) |
| Deaths | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Discontinuations due to AEs | 3 (4.1%) | 5 (6.9%) | 2 (2.8%) | 4 (5.6%) |
| AEs of interest (>25%) | | | | |
| Asthenia | 32.9% | 35.6% | 31.0% | 30.6% |
| Headache | 27.4% | 35.6% | 42.3% | 31.9% |
| Nausea | 19.2% | 32.9% | 25.4% | 26.4% |
| Hyperbilirubinaemia | 1.4% | 32.9% | 25.4% | 41.7% |
| Laboratory abnormalities of interest | | | | |
| Total bilirubin >5 x ULN | 0.0% | 6.8% | 2.8% | 2.8% |
| Neutropenia Grade 3-4 | 29.2% | 43.1% | 38.0% | 33.3% |
| Anaemia Grade 3-4 | 1.4% | 1.4% | 2.8% | 0.0% |
| Thrombocytopenia Grade 3-4 | 1.4% | 1.4% | 7.0% | 2.8% |

Safety population; AE=adverse event; ULN=upper limit of normal

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

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

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

研究要旨； C 型慢性肝炎に対する新しい治療法として NS3 protease 阻害剤を含めた 3 剤併用療法が期待されている。しかし貧血や皮疹などの重篤な副作用も見られることや、分子標的薬に見られる薬剤耐性変異獲得の危険性が指摘されている。したがって従来の PEG-IFN+RBV 療法でも治癒可能な症例と、新規治療法の適応となる症例の選択は重要である。とくに、telaprevir (TVR) を含む 3 剤併用療法の治療効果は、PEG-IFN+RBV 療法の治療効果と関連し、とくに PEG-IFN+RBV 療法で無反応 (Null response) が予測される症例では新規 3 剤併用療法でも治療効果が乏しい可能性が指摘されている。これらは、ISDR や IRRDR などのウイルス因子、IL28B など宿主因子により、予測可能で、新規治療適応決定にも重要であることが示された。一方、TVR 耐性変異は、TVR 未治療例にも存在するが、少なくとも治療反応例では、これら耐性変異は、PEG-IFN+RBV+TVR 3 剤併用療法には影響しないことが明らかになった。

共同研究者

山梨大学大学院医学工学総合研究部

肝疾患地域先端医療システム学 前川伸哉

山梨大学医学部内科学講座第 1 教室

榎本信幸、進藤浩子、小松信俊

A. 研究目的

1b 型かつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎は難治であり、これまでの標準治療である PEG-IFN+Ribavirin (RBV) 併用療法に代わり、NS3 protease 阻害剤を用いた新規治療法に期待が持たれている。しかし、貧血や皮疹などの副作用が知られているほか、分子標的薬に見られる薬剤耐性変異獲得の危険性が指摘されており、その適応を見極めることはきわめて重要である。そこで、本研究では、従来の PEG-IFN+RBV でも治癒可能な症例と、新規治療薬による治療適応例の選択について、とくに

宿主条件と HCV ウイルス変異とから検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 現行治療の治療成績の評価は、2004 年 12 月から山梨大学第 1 内科と関連施設で組織する Y-PERS (Yamanashi PEG-interferon+ribavirin Study) で集積された 1b 高ウイルス量症例のうち PEG-IFN α 2b (ペグイントロン) +ribavirin (レベトール: RBV) 併用療法を行った 1038 例を 2 検対象とし、臨床検査成績ならびに、これまで治療効果と関連することが明らかになっている HCV のウイルス変異である、ISDR (Interferon sensitivity determining region) 変異数、IRRDR (Interferon-ribavirin resistance determining region) 変異数、コア 70 番および 91 番アミノ酸変異を検討した。また、一部の症例については宿主因子である IL28B の SNPs (rs8099917)

と、リバビリンに関する貧血に關与する遺伝子 ITPA (rs1127354) の SNP についても検討した。

2) HCV NS3 領域に見られるウイルス変異の検討は、当科で telaprevir (TVR) を含む 3 剤併用療法を行った症例の、治療開始前、治療中のウイルス変異につき、deep sequencing 解析を行った。具体的には、治療開始前および治療開始 48 時間後に採血された血清を用い、Roche Genome Sequencer (GS) Junior を用いて、報告されている変異点につき、それぞれ 5000 クローン以上を解析して変異率を解析した。

(倫理面の配慮)

Y-PERS および Y-PERS (GF) については、試験の目的・方法・副作用、患者に関する個人情報守秘義務、患者の権利・保護等に関し、十分に説明し、文書で同意を取得し研究をおこなった。なお、これらの研究の実施計画については、山梨大学医学部倫理委員会および遺伝子解析研究に関する専門委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1) PEG-IFN+RBV の治療成績

PEG-IFN+RBV の治療成績は (Sustained viral response: SVR 率) は、ITT 解析で 1b 型 52% (236/451)、2a 型 88% (102/116)、2b 型 79% (71/90) であった。これを、標準治療期間 1b 型 48 週、2a または 2b 型 24 週間の症例に限り検討しても 1b 型 50% (156/311)、2a 型 86% (76/88)、2b 型 82% (50/61) であった。さらに、最も難治である 1b 型症例の、52 週以内の治療症例につき、これまで治療効果と関係する因子として知られている ISDR、IRRDR、コア 70 番および 91 番のアミノ酸変異、および宿主 IL28B を含む臨床検査成績につき検討した。と

くに、PEG-IFN+RBV+TVR 3 剤併用療法は、先行して行われた PEG-IFN+RBV 療法の治療効果と関連し、とくに、一度もウイルスが検出感度以下に低下しなかった無反応例 (Null response: NVR) では、3 剤併用療法でも SVR 率が低く、一旦ウイルスが消失した再燃

(Relapser) 例では極めて高い SVR 率であることが国内臨床試験で明らかになっている。そこで、NVR、Relapser、SVR に分けて検討すると、NVR 例は年齢が高く、肝線維化が進行しており、ISDR 変異数 0 ないしは 1 個の症例が多く、IRRDR 変異数 3 個以下の症例が多く、コア 70 番アミノ酸の変異例が多く、IL28B の minor type (TG または GG) が多いことが明らかになった。

PEG-IFN+RBV療法の治療効果別背景 (1b, ≤52週) (n=311)

| | SVR 156 | Relapse 83 | NVR 72 | p |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------|
| 症例数 | 156 | 83 | 72 | |
| 年齢 | 53.1±10.7 | 57.0±9.0 | 58.9±7.8 | 0.001* |
| 性別 (M/F) | 96 (62%) / 60 | 46 (55%) / 37 | 35 (49%) / 37 | n.s. |
| BMI | 23.4±3.0 | 22.1±2.2 | 22.8±2.4 | n.s. |
| F因子 (=1/2-) | 83 (56%) / 42 | 23 (38%) / 38 | 26 (43%) / 34 | 0.0002 |
| A因子 (1/2/3) | 55/51/15 | 21/35/6 | 19/27/10 | 0.25 |
| Alb | 4.2±0.3 | 4.1±0.4 | 4.1±0.4 | n.s. |
| γ-GTP | 52.2±49.1 | 61.2±56.5 | 77.2±93.9 | n.s. |
| ALT | 84.6±66.3 | 80.7±64.3 | 73.4±48.3 | n.s. |
| AST | 67.8±49.6 | 74.9±52.9 | 69.7±38.1 | n.s. |
| T.Chol | 169.8±30.6 | 187.9±29.1 | 158.0±25.3 | n.s. |
| 血糖 | 105.6±27.4 | 105.2±22.6 | 103.6±22.6 | n.s. |
| HbA1c | 5.3±0.5 | 5.3±0.7 | 5.2±0.5 | n.s. |
| 白血球数 | 4941±1455 | 4925±1411 | 4786±1594 | n.s. |
| 好中球数 | 2486±965 | 2328±841 | 2425±1095 | n.s. |
| Hb | 14.2±1.3 | 14.2±1.5 | 14.1±1.5 | n.s. |
| 血小板数 | 17.0±5.5 | 15.2±5.9 | 14.1±4.3 | n.s. |
| AFP | 9.1±15.9 | 10.1±15.2 | 30.6±85.9 | n.s. |
| HCV RNA (IU/ml) | 6.0±0.8 | 6.6±0.5 | 6.3±0.5 | n.s. |
| ISDR変異数 (≤1/≥2) | 102/45 (33%) | 38/6 (7%) | 39/2 (3%) | 1.38×10 ⁻⁹ |
| IRRDR変異数 (≤3/≥4) | 10/48 (8%) | 15/8 (38%) | 16/12 (43%) | 0.002 |
| コア70 (R/NorR) | 66 (77%) / 22 | 21 (64%) / 12 | 20 (48%) / 12 | 0.004 |
| コア91 (L/NorL) | 64 (74%) / 22 | 17 (52%) / 15 | 23 (67%) / 24 | 0.05 |
| IL28B SNP (TT/TG+GG) | 60 (44%) / 74 | 23 (88%) / 9 | 13 (38%) / 21 | 2.21×10 ⁻² |

*SVR vs NVR

さらに、これらについて多変量解析を行うと、SVR を規定する因子は、60 歳未満 (odds 比 2.9、p=0.0028)、ISDR 変異数 1 個以上 (Odds 比 4.856、p=0.0021、IRRDR 変異数 4 個以上 (odds 比 5.142、p=0.0008)、IL28B TT (odds 比 14.2、p=0.0013) であり、治療効果を規定するのは、年齢と IFN 感受性を規定する宿主の SNP と HCV のウイルス因子であり、それぞれ独立に治療効果を規定していることが明らかになった。一方 NVR 規定因子は AFP ≥ 4.6 (Odds 比 19.305、p=0.0013)、IRRDR 変異数 2 個以下 (Odds 比 6.2、p=0.0212)、

IL28B TG/GG (Odds 比 13.9、 $p=0.0030$) であることが示され、SVR と同様宿主因子とウイルス因子がそれぞれ独立に治療効果と関連した。

| 因子 | 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 | 0.479 | 0.299-0.768 | 0.0023 | 0.344 | 0.180-0.914 | 0.0029 |
| 性別 | M/F | 0.663 | 0.420-1.047 | 0.0780 | - | - | - |
| BMI | <23/≥23 | 1.983 | 1.152-3.414 | 0.0134 | - | - | - |
| F因子 | 0-1/2-4 | 0.346 | 0.204-0.586 | <0.0001 | - | - | - |
| A因子 | 0-1/2-3 | 0.662 | 0.366-1.056 | 0.0789 | - | - | - |
| Alb | <4.1/≥4.1 | 0.986 | 0.583-1.656 | 0.9589 | - | - | - |
| γ-GTP | <40/≥40 | 0.444 | 0.265-0.741 | 0.0019 | - | - | - |
| ALT | <62/≥62 | 1.337 | 0.821-2.176 | 0.2481 | - | - | - |
| AST | <55/≥55 | 0.702 | 0.428-1.151 | 0.1610 | - | - | - |
| T-Chol | <170/≥170 | 1.115 | 0.670-1.853 | 0.6760 | - | - | - |
| 血糖 | <97/≥97 | 0.870 | 0.495-1.529 | 0.6288 | - | - | - |
| HbA1c | <5.2/≥5.2 | 1.047 | 0.657-1.666 | 0.8876 | - | - | - |
| 白血球数 | <4700/≥4700 | 1.120 | 0.683-1.834 | 0.6541 | - | - | - |
| 好中球数 | <2300/≥2300 | 1.169 | 0.670-2.043 | 0.5821 | - | - | - |
| Hb | <14/≥14 | 1.272 | 0.770-2.101 | 0.3477 | - | - | - |
| 血小板数 | <15/≥15 | 2.526 | 1.524-4.192 | 0.0003 | - | - | - |
| AFP | <4.8/≥4.8 | 0.435 | 0.247-0.766 | 0.0040 | - | - | - |
| HCV RNA(IU/mL) | <6.0/≥6.0 | 0.216 | 0.108-0.432 | <0.0001 | 0.140 | 0.029-0.667 | 0.0076 |
| ISDR変異数 | 0/1 | 2.419 | 1.506-3.956 | 0.0005 | 4.856 | 1.493-15.789 | 0.0027 |
| IRRDR変異数 | ≤3/≥4 | 6.860 | 2.824-16.916 | <0.0001 | 5.142 | 1.436-18.406 | 0.0008 |
| コアAA70 | 0/R | 2.349 | 1.334-4.140 | 0.0035 | - | - | - |
| コアAA81 | L/M | 0.610 | 0.259-1.002 | 0.0508 | - | - | - |
| IL28B(rs8090917) | GG-TG/TT | 9.889 | 3.098-30.626 | 0.0001 | 14.368 | 1.436-18.406 | 0.0015 |
| ITPA(rs1127454) | CC/AA+AC | 1.277 | 0.554-2.995 | 0.5747 | - | - | - |

| 因子 | 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 | 1.213 | 0.626-2.350 | 0.5679 | - | - | - |
| 性別 | M/F | 0.871 | 0.450-1.683 | 0.6804 | - | - | - |
| BMI | <23/≥23 | 1.163 | 0.555-2.438 | 0.6895 | - | - | - |
| F因子 | 0-1/2-4 | 1.404 | 0.705-2.799 | 0.3346 | - | - | - |
| A因子 | 0-1/2-3 | 0.952 | 0.468-1.935 | 0.8912 | - | - | - |
| Alb | <4.1/≥4.1 | 0.797 | 0.408-1.558 | 0.5072 | - | - | - |
| γ-GTP | <40/≥40 | 5.793 | 2.478-13.957 | 0.0001 | - | - | - |
| ALT | <62/≥62 | 1.836 | 0.711-4.684 | 0.2019 | - | - | - |
| AST | <55/≥55 | 1.852 | 0.940-3.649 | 0.0757 | - | - | - |
| T-Chol | <170/≥170 | 0.599 | 0.308-1.149 | 0.1277 | - | - | - |
| 血糖 | <97/≥97 | 1.385 | 0.648-2.968 | 0.4029 | - | - | - |
| HbA1c | <5.2/≥5.2 | 0.894 | 0.176-0.885 | 0.0240 | - | - | - |
| 白血球数 | <4700/≥4700 | 1.255 | 0.645-2.441 | 0.5036 | - | - | - |
| 好中球数 | <2300/≥2300 | 1.091 | 0.508-2.346 | 0.8228 | - | - | - |
| Hb | <14/≥14 | 1.298 | 0.663-2.541 | 0.4458 | - | - | - |
| 血小板数 | <15/≥15 | 0.437 | 0.220-0.871 | 0.0185 | - | - | - |
| AFP | <4.8/≥4.8 | 3.277 | 1.485-7.183 | 0.0030 | 18.305 | 1.856-201.409 | 0.0139 |
| HCV RNA(IU/mL) | <6.0/≥6.0 | 1.951 | 0.668-5.722 | 0.2292 | - | - | - |
| ISDR変異数 | 1/2 | 0.361 | 0.108-1.210 | 0.0888 | - | - | - |
| IRRDR変異数 | ≤2/≥3 | 0.042 | 0.005-0.335 | 0.0023 | 0.161 | 0.0082-0.814 | 0.0274 |
| コアAA70 | 0/R | 0.604 | 0.191-1.828 | 0.3655 | - | - | - |
| コアAA81 | L/M | 0.727 | 0.250-2.113 | 0.5375 | - | - | - |
| IL28B(rs8090917) | GG-TG/TT | 0.188 | 0.068-0.516 | 0.0011 | 0.072 | 0.018-0.409 | 0.0030 |
| ITPA(rs1127454) | CC/AA+AC | 0.693 | 0.219-2.195 | 0.5330 | - | - | - |

2) PEG-IFN+RBV+TVR 3 剤併用例の NS3 領域の TVR 耐性変異

これまで、われわれは TVR の未使用でも、NS3 領域に 13.4% の既知の protease 阻害剤に対する耐性変異が認められることを報告してきた。そこで今回は実際に PEG-IFN+RBV+TVR 使用例で、この耐性変異が治療経過とともにどのように変化するかを検討した。今回の検討でも、治療開始前に 0.8~20% の耐性変異が認められた。治療後 48 時間後の検討では、これら変異には著変はなかったが、変異は減少する傾向にあった。

D. 考察

国内で行われた PEG-IFN+RBV+TVR の 3 剤併用療法の臨床試験の成績によれば、治療成績は、前治療の治療効果と関連することが明らかになっている。すなわち 3 剤併用に先立って行われた PEG-IFN+RBV 療法の再燃例の 3 剤併用療法の SVR 率は 88% と非常に高率であるのに対し、NVR の SVR 率は 34% に過ぎない。従って、PEG-IFN+RBV 療法で NVR が予測される IRRDR 変異数 2 個以下ないしは IL28B minor type 症例では、TVR を含めた 3 剤併用療法でも治療に難渋する可能性が示された。一方、PEG-IFN+RBV 療法での SVR が期待できる症例は、治療期間が、3 剤併用療法 24 週間に比して倍の期間を要するが、TVR による副作用が懸念される症例では、PEG-IFN+RBV による 2 剤併用療法も選択肢の一つとなると考えられた。

また、もともと存在する TVR 耐性変異は、治療によって大きく変化することはなかったが、今回検討した症例は、最終的にはすべて SVR となった症例であり、少なくとも PEG-IFN+RBV+TVR に感受性をもつ症例では、自然に存在する TVR 耐性変異は治療に影響を及ぼさない可能性が示された。しかし今回検討したのは、少数例に過ぎず、今後 TVR に対する抵抗例でも同様の検討をすることも必要である。

E. 結論

C 型肝炎慢性肝炎に対して TVR を含む 3 剤併用の新規治療方法が開始された。この治療効果予測には、宿主因子である IL28B やウイルス因子である ISDR や IRRDR などが重要であり、PEG-IFN+RBV 療法の治療効果と PEG-IFN+RBV+TVR 3 剤併用療法の治療効果は関連することから、3 剤併用療法にあたってはこれら

の因子を考慮する必要が示された。一方、TVR 耐性変異は、TVR 未使用例でも自然に存在するが、PEG-IFN+RBV+TVR に感受性を持つ症例ではこれら変異は治療に影響を及ぼさない可能性が示された。

F. 健康危険情報 とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Sugauchi F, Sakamoto N, Yatsunashi H, Izumi N. Age and total ribavirin dose are independent predictors of relapse after interferon therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. *Antiviral Therapy* 2012 17: 35-43
- 2) Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Izumi N. Data mining model using simple and readily available factors could identify patients at high risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2012 in press.
- 3) Osada M, Kaneko M, Sakamoto M, Endoh M, Takigawa K, Inoue-Suzuki K, Inoue O, Satoh K, Enomoto N, Yatomi Y, Ozaki Y. Causes of thrombocytopenia in chronic hepatitis C viral infection. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2012 in press.
- 4) Shindo H, Maekawa S, Komase K, Sueki R, Miura M, Kadokura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Enomoto N. Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. *Hepatology*; Online First™, 18 August 2011.
- 5) Miura M, Maekawa S, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Ohmori T, Kanayama A, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Kitamura T, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N. Analysis of viral amino acid sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology*; Online First™, 17 August 2011.
- 6) Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of genotype 2b hepatitis C virus in association with the response to peginterferon and ribavirin therapy. *Plos One* 2011; 6(9): e24514
- 7) Hiramatsu N, Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Sugauchi F, Tamori A, Matsuura K, Izumi N. Pretreatment prediction of anemia progression by pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C infection: Decision-tree analysis. *J Gastroenterol* 46: 1111-1119, 2011
- 8) Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugauchi M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for

- chronic hepatitis C using genetic polymorphism in *IL28B* and viral factors. *J Hepatol* 2011 54: 439-448, 2011
- 9) Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus genotype 2a infection reveals critical site influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatol Int*; 5(3): 789-799, 2011
- 10) Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Tamori A, Nakagawa M, Izumi N. Sequences in the Interferin Sensitivity Determining Region and Core Region of Hepatitis C Virus Impact Pretreatment Prediction of Response to Peg-interferon Plus Ribavirin: Data Mining Analysis. *J Med Virol*; 83: 445-452, 2011
- 11) Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Yatsunashi H, Izumi N. Pretreatment prediction of response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C using data mining analysis. *J Gastroenterol*; 46: 401-409, 2011
- 12) 坂本穰、榎本信幸. C型肝炎のウイルス変異と治療効果、総合臨床 60 (1)、19-25、2011
- 13) 坂本穰、榎本信幸. ウイルス変異からみた PEG-IFN+RBV 療法の治療効果予測、肝胆膵 62 (2)、307-313、2011
- 14) 坂本穰、榎本信幸. [C型肝炎の治療①初回治療] について、ガイドライン/ガイダンス 慢性肝炎 こう診る・こう考える (泉並木編)、日本医事新報社、東京、20-25、2011
- 15) 坂本穰、榎本信幸. 硬変化した慢性肝炎の治療をどう考えるか、消化器 Book 04 これでわかる! 慢性肝炎の治療戦略 肝癌を防ぐためのマネジメント (井廻道夫企画)、羊土社、東京、106-112、2011
- 16) 坂本穰、榎本信幸. HCV の NS5A 遺伝子変異 (ISDR・IRRDR) とインターフェロン治療反応性、新時代のウイルス性肝炎学、日本臨床 69 増刊号 4、日本臨床社、大阪、234-238、2011
- 17) 坂本穰、榎本信幸. 肝炎診療に必要な遺伝子検査. C型肝炎の遺伝子解析と診療への応用、*Medical Practice* 28 (8)、1383-1388、2011
- 18) 三浦美香、前川伸哉、門倉信、末木良太、小馬瀬一樹、進藤浩子、進藤邦明、雨宮史武、中山康弘、植竹智義、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸. 肝発癌に関連する C型肝炎ウイルス遺伝子領域と *IL28B* SNP の解析、分子消化器病研究会 第 18 回浜名湖シンポジウム記録集 消化器疾患と幹細胞; その基礎と臨床、アークメディア、171-177、2011

2.学会発表

- 1) 進藤邦明、小松信俊、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. 初発肝細胞癌の腫瘍径と適切なサーベイランス期間の検討、第 53 回日本肝臓学会大会 (JDDW2011)、2011.10.21、福岡
- 2) 横田雄大、坂本穰、小松信俊、進藤邦明、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、榎本信幸. 腹部超音波検査による肝がん検診、第 15 回日本肝臓学会大会 (JDDW2011)、2011.10.21、福岡
- 3) 進藤邦明、小松信俊、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. 肝硬度を用いた肝癌高リスク群の囲い込み、第

- 15 回日本肝臓学会大会 (JDDW2011)、
2011.10.21、福岡
- 4) 井上泰輔、坂本穰、榎本信幸. ウイルス肝炎ネットワークの構築と診療均てん化への取り組み、第 15 回日本肝臓学会大会 (JDDW2011)、(パネルディスカッション)、
2011.10.20、福岡
- 5) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. HCV 全長解析による IL28B SNP と独立して治療効果を規定するウイルス因子の検討、第 15 回日本肝臓学会大会 (JDDW2011)、(シンポジウム)、
2011.10.20、福岡
- 6) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみた PEG-IFN+RBV 療法と protease 阻害剤の適応の検討、第 15 回日本肝臓学会大会 (JDDW2011)、(シンポジウム)、
2011.10.21、福岡
- 7) 中山康弘、坂本穰、小松信俊、進藤邦明、雨宮史武、井上泰輔、前川伸哉、榎本信幸. アルコール性肝細胞癌の臨床的特徴とファイブロスキャンによる高危険群の抽出、第 47 回日本肝臓学会総会 (ワークショップ)、
2011.7.28、静岡
- 8) 坂本穰、中山康弘、小松信俊、進藤邦明、雨宮史武、井上泰輔、前川伸哉、榎本信幸. C 型慢性肝炎の IFN 治療後に発癌した肝癌の疫学的・ウイルス学的特徴、第 47 回日本肝臓学会総会 (ワークショップ)、
2011.7.28、静岡
- 9) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス因子と宿主因子からみた PEG-IFN α 2b+Ribavirin 併用療法の今後の展望. 第 5 回東京肝疾患研究会 (PERFECT)、
2011.7.2、東京
- 10) 雨宮史武、辰巳明久、小松信俊、進藤邦明、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、坂本穰、本杉宇太郎、佐野勝廣、荒木力、榎本信幸. 肝硬度を用いた肝細胞癌発癌リスクの評価、第 47 回日本肝臓学会総会、
2011.6.2、東京
- 11) 中山康弘、坂本穰、榎本信幸. 肝細胞癌治療の実際とテーラーメイド医療の可能性、第 47 回日本肝臓学会総会、
2011.6.2、東京
- 12) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. ウイルスゲノム、および IL28B SNP 解析を用いた HCV 肝病態の検討、第 47 回日本肝臓学会総会、
2011.6.3、東京
- 13) 進藤邦明、坂本穰、榎本信幸. NBNC 肝癌のサーベイランスの現状と Fibroscan を用いた発癌高危険群の囲い込み、第 47 回日本肝臓学会総会 (ワークショップ)、
2011.6.2、東京
- 14) 坂本穰、飯田龍一、榎本信幸. 地域がん登録からみた肝癌の実態と専門医による個別化医療の可能性、第 47 回日本肝臓学会総会、
2011.6.3、東京
- 15) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノムからみたインターフェロン治療効果と新規治療法への期待、第 47 回日本肝臓学会総会 (パネルディスカッション)、
2011.6.3、東京
- 16) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. C 型慢性肝炎の病態形成における IL28 SNP とウイルス因子関与の検討. 第 97 回日本消化器病学会総会、
2011.5.14、東京
- 17) 坂本穰、前川伸哉、小松信俊、雨宮史武、進藤邦明、中山康弘、井上泰輔、榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノムからみた C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果と将来像、第 97 回日本消化器病学会総会、
2011.5.14、東京
- H.知的所有権の出願・取得状況
- 1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

PEG-IFN/RBV 早期 HCV 動態からみた IL28B と IFN 応答性の予測に関する研究

研究分担者 朝比奈靖浩 武蔵野赤十字病院 消化器科部長

研究要旨:われわれはテラプレビル投与により自然免疫系遺伝子の発現プロファイルは動的に変化し、RIG-I/IPS-1 系はテラプレビルによる HCV 抑制に密接に関与している可能性を示してきたが、さらに宿主自然免疫系遺伝子の発現プロファイルは、テラプレビル+PEG-IFN+RBV 3 剤併用療法の治療効果に関与するとされる *IL28B* の遺伝子多型と密接に関与していることが明らかとなった。临床上テラプレビル 3 剤併用療法を開始する前に *IL28B* 遺伝子多型を明らかとしておくことは重要であるが、*IL28B* 遺伝子多型を測定することは必ずしも全ての施設で実施可能ではない。そこで、ペグインターフェロン+リバビリン 2 剤併用療法の投与初期における HCV 動態から *IL28B* 遺伝子多型を予測し、最終的治療効果を検討した。2 剤投与後の早期 HCV 減少量から nonTT を予測する cutoff 値を ROC 解析で求めると、1、2、4 週において HCV 減少量がそれぞれ 0.5 log、0.9 log、1.7log 未満の症例は、感度 89%・特異度 87%で non-TT であることが多かった。また、*IL28B* 遺伝子多型と実際の治療効果が解離した症例におけるインターフェロン応答性の予測にも早期 HCV 動態を解析することが有用で、感度 87%、特異度 81%、PPV65%、NPV94%で *IL28B* 遺伝子多型による予測に比し良好であった。従って、ペグインターフェロン+リバビリン 2 剤投与による投与後 4 週以内の HCV 動態は、*IL28B* 遺伝子多型と密接に関連し、ペグインターフェロン+リバビリン先行投与により *IL28B* 遺伝子多型とインターフェロン応答性の評価が可能であると考えられた。

A. 研究目的

新規抗ウイルス薬であるテラプレビルは、強い抗 HCV 作用を有するプロテアーゼ阻害薬である。これまでの研究からテラプレビル+ペグインターフェロン+リバビリン 3 剤併用療法の治療効果に *IL28B* の遺伝子多型が重要であることが明らかとなってきた。特に nonTT はペグインターフェロン+リバビリン 2 剤併用療法無効例が多く、テラプレビル耐性を生じる可能性がある。従って、テラプレビルを投与する前に *IL28B* 遺伝子多型を明らかとしておくことは重要であるが、*IL28B* 遺伝子多型を測定することは必ずしも全ての施設で実施可能ではない。そこで、ペグインターフェロン+リバビリン 2 剤併用療法の投与初期における HCV 動態から *IL28B* 遺伝子多型を予測し、最終的治療効果を検討した。

B. 研究方法

ペグインターフェロン+リバビリン 2 剤併用療法を施行した HCV genotype 1b 型の C 型慢性肝炎 772 例を対象とし、投与 4 週以内の HCV 動態解析例において rs8099917 SNP 及びインターフェロン応答性との関連を解析した。

C. 研究結果

ペグインターフェロン+リバビリン 2 剤併用療法の無効に関与する治療前因子は、rs8099917 non-TT と女性のみであった。ペグインターフェロン+リバビリン 2 剤投与後の早期 HCV 減少量から nonTT を予測する cutoff 値を ROC 解析で求めると、1、2、4 週において HCV 減少量がそれぞれ 0.5 log、0.9 log、1.7log 未満の症例は、感度 89%・特異度 87%で non-TT であることが多く、PPV 70%、

NPV 96%と *IL28B* 遺伝子多型の予測に極めて有用であった(ROC 曲線下面積 0.86-0.89)。さらに、TT でも無効となった症例の 53%は、早期 HCV 減少量が cutoff 値未満で、同様に non-TT でも無効とならなかった症例の 29%では cutoff 値以上の HCV 減衰が認められ、*IL28B* 遺伝子多型と実際の治療効果が解離した症例におけるインターフェロン応答性の予測に早期 HCV 動態を解析することが有用であった。そこでペグインターフェロン+リバビリン 2 剤併用療法の投与早期 HCV 動態からみた無効の予測を行うと、感度 87%、特異度 81%、PPV65%、NPV94%で *IL28B* 遺伝子多型による予測に比し良好であった。

D. 考察

3 剤併用療法の治療効果には *IL28B* の遺伝子多型が重要であるが、*IL28B* の遺伝子多型はインターフェロンの応答性を規定していると考えられており、実臨床では、ペグインターフェロン+リバビリン 2 剤併用療法における応答性、すなわち HCV 動態を解析することが、*IL28B* 遺伝子多型さらには最終治療効果の予測に重要と考えられた。

E. 結論

ペグインターフェロン+リバビリン 2 剤投与による投与後 4 週以内の HCV 動態は、*IL28B* 遺伝子多型と密接に関連し、ペグインターフェロン+リバビリン先行投与により *IL28B* 遺伝子多型とインターフェロン応答性の予測が可能であり、3 剤併用療法におけるテラプレビル耐性変異の出現抑止に有用と考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 学会発表

朝比奈靖浩, 泉並木.

シンポジウム ウイルス性肝炎の標準治療の変遷と将来像. これまでの標準治療の成績及び発癌抑止効果の検証と新規 HCV 特異的阻害薬の効果.

第 97 回日本消化器病学会総会, 東京, 2011 年 5 月.

朝比奈靖浩, 土谷薫, 泉並木.

シンポジウム ウイルス肝炎・肝癌制圧の分子基盤. C 型肝炎における *IL28B* 近傍の遺伝子多型と自然免疫分子機構および発癌に与える影響.

第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011 年 6 月.

朝比奈靖浩, 加藤知爾, 泉並木.

パネルディスカッション C 型肝炎治療 新たな時代へ. 特異的 HCV 増殖阻害剤の導入を踏まえた C 型肝炎治療 発がん抑止を目指した治療戦略.

第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011 年 6 月.

朝比奈靖浩, 土谷薫, 泉並木.

シンポジウム C 型肝炎治療の新たな展開. これまでの標準治療の治療効果と発癌リスクの検証に基づく C 型肝炎の新規治療戦略.

第 15 回日本肝臓学会大会, 福岡, 2011 年 10 月.

2. 論文発表

Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in *IL28B* with antiviral response. Yasuhiro Asahina, Kaoru Tsuchiya, Masaru Muraoka, Keisuke Tanaka, Yuichiro Suzuki, Nobuharu Tamaki, Yoshihide Hoshioka, Yutaka Yasui, Tomoji Katoh, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Hiroyuki Nakanishi, Jun Itakura, Yuka Takahashi, Masayuki Kurosaki, Nobuyuki Enomoto, Sayuri Nitta, Naoya Sakamoto, Namiki Izumi. *Hepatology* 2012;55:20-29.

Masayuki Kurosaki, Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi, et., al.

Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in *IL28B* and viral factors *Journal of Hepatology* 54 439-448 2011

Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi, et., al.

Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients

Hepatology International 2011

Itakura J, Asahina Y, Tamaki N, Hirayama I, Yasui Y,
Tanaka T, Sato M, Ueda K, Kuzuya T, Tsuchiya K,
Nakanishi H, Kurosaki M, Gabriel GS, Schneider, Izumi
N.

Changes in hepatitis C viral load during first 14 days can
predict the undetectable time point of serum viral load by
pegylated interferon and ribavirin therapy.

Hepatology Res 2011

Kaoru Tsuchiya, Mina Komuta, Yutaka Yasui, Nobuharu
Tamaki, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Teiji Kuzuya,
Jun Itakura, Hiroyuki Nakanishi, Yuka Takahashi,
Masayuki Kurosaki, Yasuhiro Asahina, Nobuyuki
Enomoto, Michiie Sakamoto, Namiki Izumi
Expression of Keratin 19 Is Related to High Recurrence
of Hepatocellular Carcinoma after Radiofrequency
Ablation

Oncology 278-288 2011

Teiji Kuzuya, Yasuhiro Asahina, Kaoru Tsuchiya,
Keisuke Tanaka, Yuichiro Suzuki, Takahide Hoshioka,
Shinji Tamaki, Tomoji Kato, Yutaka Yasui, Takahiro
Hosokawa, Ken Ueda, Hiroyuki Nakanishi, Jun Itakura,
Yuka Takahashi, Masayuki Kurosaki, Namiki Izumi
Early Decrease in α -Fetoprotein, but Not Des- γ -Carboxy
Prothrombin, Predicts Sorafenib Efficacy in Patients with
Advanced Hepatocellular Carcinoma

Oncology 81 251-258 2011

朝比奈靖浩.

ウイルス肝炎 治療の現状と新しい戦略 C型肝炎ウイルス
感染の病態と治療法 ペグインターフェロンとリバビリ
ン併用療法の治療成績と寄与因子.

治療学 44 1016-1021, 2011

H.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

遺伝子型 1b の細胞感染培養系について

研究分担者 梅村武司 信州大学医学部消化器内科 講師

研究要旨: 遺伝子型1bかつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者では、PEG-IFN/RBV 併用療法中に血中 C 型肝炎ウイルスが陰性化しない無反応例が 2 割程度存在する。この様な難治性 C 型肝炎ウイルスに対する治療薬の開発には、適切な HCV 細胞培養モデルによる解析が重要である。本研究では IFN 抵抗性の遺伝子変異を持ち、かつ遺伝子型 1b の感染性クローンを用いた HCV 細胞培養モデルの開発および改良を行い、薬物スクリーニングにおける本培養系の有用性を IFN/スタチン製剤の抗 HCV 効果から検討を行った。線維性胆汁うっ滞性肝炎を発症し、IFN 治療に無反応であった患者から採取された全長 HCV RNA を用い cDNA コンストラクトを作成し、T7 RNA ポリメラーゼで全長 HCV RNA を合成した。HCV RNA の NS2 に 1 カ所と NS4B に 2 カ所変異を導入し、さらに Huh7 細胞を用いて樹立した Cure 化細胞にて培養したところ、約 20 倍に感染効率が向上した。改良した培養系を用いて、IFN- α と Simvastatin による抗ウイルス効果を測定すると、IFN による抗 HCV 効果を明確に確認することが可能であった。以上より、本改良型 HCV 細胞培養モデルは、遺伝子型 1b の HCV に対する抗ウイルス効果が期待される薬物のスクリーニングに優れた実験系と考えられた。

共同研究者

信州大学医学部 消化器内科 市川 雪(大学院生)、松本晶博(委嘱講師)、田中榮司(教授)

A. 研究目的

遺伝子型1bかつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者では PEG-IFN/RBV 併用療法では治療中に血中 C 型肝炎ウイルスが陰性化しない無反応例が 2 割程度存在する。このような難治性 C 型肝炎ウイルスに対する治療薬開発には、適切な細胞培養モデルによる解析が重要である。本研究では IFN 抵抗性の遺伝子変異を持ち、かつ遺伝子型 1b の感染性クローンを用いた HCV 細胞培養モデルの開発および改良を行い、薬物スクリーニングにおける本 HCV 細胞培養系の有用性を IFN/スタチン製剤の抗 HCV 効果から検討を行った。

B. 研究方法

肝移植後に線維性胆汁うっ滞性肝炎(FCH)を発症し、IFN 治療が無効であった患者から採取された全長 HCV RNA (1b 4×10^7 copies/mL コア変異 70 変異型、

91 野生型、ISDR 野生型、IRRDR 5 カ所)から cDNA コンストラクトを作成し、T7 RNA ポリメラーゼで全長 HCV RNA を合成した。培養効率を向上させ、実験系として使用しやすいように改良するために NS2 に 1 カ所と NS4B に 2 カ所変異を導入し、さらに Huh7細胞から Cure 化細胞の樹立を行った。最終的には改良した培養系を用いて、IFN- α 、Simvastatin による阻害実験を行った。

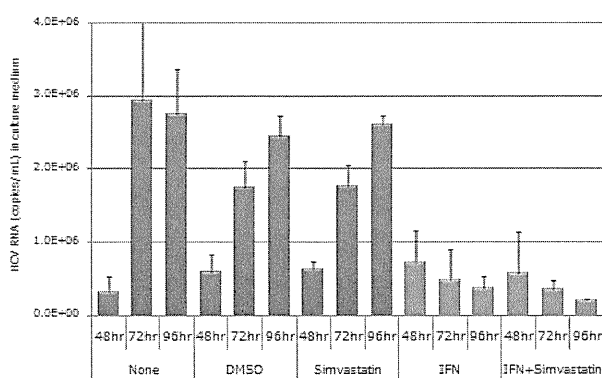
C. 研究結果

FCH 患者より樹立した TPF1/4B は Huh7 細胞において増殖し、培養上清中に感染可能なウイルス粒子を分泌した。しかし、感染能力が低いため NS2 に変異導入を行った TPF1/M クローンを作成した。感染増殖はエレクトロポレーション 72 時間後の上清中 HCV コア抗原量で比較すると TPF1/4B 85 FFU/mL と比較して TPF1/M は 180 FFU/mL と 2 倍に上昇した。Cure 化細胞の樹立を

するために RepTPF1 (sub-genomic replicon)を Huh7 細胞にエレクトロポレーションし、形成されたコロニーに IFN を添加し、sub-genomic replicon を除去して Cure 化細胞を樹立した。継代を行っても感染・増殖能が変化しない Huh7-ALS32 を選択して感染実験を行うと感染増殖は Huh7 細胞と比較して約 10 倍となった。

改良した培養系を用いて IFN と Simvastatin を用いて阻害実験を施行した。Simvastatin 単独投与では非投与群、DMSO 投与群と同様に抗 HCV 効果は認められなかった。(図)IFN 投与群では 72 時間、96 時間後の上清中 HCV RNA 量は著明に低下しており抗 HCV 効果を認めた。IFN+Simvastatin 併用群では IFN 単独群と比較して著明な阻害効果は認めなかった。

IFN- α Simvastatinによる阻害実験



D. 考察

HCV クローンに変異を導入し、培養細胞として cure 化細胞を用いる事によって、当初の遺伝子型 1b の感染性クローンを用いた HCV 細胞培養モデルと比較して約 20 倍高い感染効率を持つ改良モデルを作成することに成功した。この改良モデルを用いて IFN 添加による HCV 阻害実験を施行すると、IFN の抗 HCV 効果を明確に証明でき、本 HCV 細胞培養系が遺伝子型 1b の HCV に対する抗ウイルス薬のスクリーニングに使用可能と考えられた。

E. 結論

遺伝子型 1b の感染性クローンを用いた HCV 細胞培養系の開発および改良を行い、本培養系が 1b 型の HCV に対する抗ウイルス薬の開発に有用である可能性を示唆した。

F.健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1.学会発表

2. 論文発表

- 1) Joshita S, Umemura T, Katsuyama Y, Ichikawa Y, Kimura T, Morita S, Kamijo A, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kamijo N, Ota M, Tanaka E. Association of IL28B gene polymorphism with development of hepatocellular carcinoma in Japanese patients with chronic hepatitis C virus infection. Hum Immunol (in press)
- 2) Yoneda S, Umemura T, Joshita S, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Ota M, Tanaka E. Serum chemokine levels are associated with the outcome of pegylated interferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. Hepatol Res 2011;41:587-593.
- 3) Umemura T, Joshita S, Yoneda S, Katsuyama Y, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Ota M, Tanaka E. Serum IL-10 and IL-12p40 levels and IL28B gene polymorphisms: pretreatment prediction of treatment failure in chronic hepatitis C. Antivir Ther 2011;16:1073-80.
- 4) Yoneda S, Umemura T, Katsuyama Y, Kamijo A, Joshita S, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Ota M, Tanaka E. Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients. J Infect Dis 2011; 203:1087-1095.

H.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

C型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療における免疫細胞機能に関する研究

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

研究要旨：C型慢性肝炎に対するペグ IFN α /リバビリン併用療法によって、難治性患者では約 50%が著効となる。それ以外の再燃、無効例に対しては、新規治療法の開発が必要である。IFN 治療への抵抗性には、HCV に対する免疫応答の低下が関与する。近年、ペグ IFN α /リバビリン併用療法の治療効果に、患者 IL-28B 遺伝子近傍の一塩基多型 (SNP) が関与することが報告された。本研究では、ペグ IFN α /リバビリン併用療法における免疫反応の意義、IL-28BSNP と免疫反応の関連性を明らかにすることを目的とした。C型慢性肝炎患者、非感染者の末梢血から MDC、PDC、IFN- λ 高産生 DC (MDC2) を分離し、TLR リガンドで刺激して、IFN- β 、IFN- λ の発現を検討した。C型肝炎患者 PDC においては、IFN- β の発現は非感染者 DC より低下していたが、MDC、MDC2 では IFN- β に差を認めなかった。MDC、PDC ともに IFN- λ の発現は両群で差を認めなかったが、MDC2 では IL-28B の産生能は C型慢性肝炎患者群では著明に低下していた。IL-28B SNP major/minor 間では、各 DC における IFN- β 、IFN- λ の発現に差を認めなかった。以上の結果より、C型慢性肝炎患者 MDC2 では IFN- λ 産生能は低下しており、免疫病態への関与が示唆された。IL-28B SNP は DC における IFN- λ 発現には直接作用せず、免疫細胞頻度や機能に影響を与えることで、治療効果に関与する可能性が示唆された。

A.研究目的

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

B.研究方法

C型慢性肝炎患者または非感染者の末梢血から DC サブセット (MDC、PDC、MDC2)

を分離し、PolyI:C、CpG でそれぞれ刺激した後、IFN- β 、IFN- λ (IL-29、IL-28A、IL-28B) の発現を定量的 PCR と ELISA で検討した。また IL-28B SNP major (TT)、minor (TG/GG)群別に、各 DC における IFN 発現機能を比較した。

(倫理面への配慮)

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

C.研究結果

C型慢性肝炎患者 PDC においては、IFN- β 発現は非感染者より低値であった。MDC、PDC における IFN- λ の発現は両群で差を認めなかった。一方、IFN- λ 高産生 DC サブセット (MDC2) では、C型慢性肝炎患者において IFN- λ 産生が著明に低下していた。また両群において、IL28B SNP major/minor 間では、各 DC サブセットでの

IFN-β、IFN-λ の発現に差を認めなかった。

D. 考察

C 型慢性肝炎患者群においては、PDC での IFN-β 発現、MDC2 での IL-28B 発現は非感染者群よりも低値であり、HCV 感染症の免疫病態において、DC 機能の低下が関与する可能性が示唆された。IL-28B SNP 別では IFN-λ の発現には差を認めなかったことより、IL-28B SNP は IL-28B の発現量に直接関与するのではなく、他の因子を介して免疫修飾作用を発揮する可能性が示唆された。

E. 結論

C 型慢性肝炎患者においては、PDC、MDC2 の IFN-β、IFN-λ 産生能は低下していたが、IL-28B SNP 間では DC の IFN 産生能に差を認めなかった。IL-28B の免疫作用に関しては今後の検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Kanto, T., Inoue, M., Oze, T., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Kakita, N., Matsubara, T., Higashitani, K., Hagiwara, H., Iio, S., Katayama, K., Mita, E., Kasahara, A., Hiramatsu, N., Takehara, T. and Hayashi, N.**, Dynamics of regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells as immune markers for virological response in pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 2011; 47: 169-178.
- 2) **Tatsumi, T., Takehara, T., Miyagi, T., Nakazuru, S., Mita, E., Kanto, T., Hiramatsu, N. and Hayashi, N.**, Hepatitis C virus-specific CD8+ T cell frequencies are associated with the responses of pegylated interferon-alpha and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol Res* 2011; 41: 30-38.
- 3) **Miyagi, T., Shimizu, S., Tatsumi, T., Nishio, K., Hiramatsu, N., Kanto, T.,**

Hayashi, N. and Takehara, T., Differential alteration of CD56(bright) and CD56 (dim) natural killer cells in frequency, phenotype, and cytokine response in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2011; 46: 1020-1030.

- 4) **Ishida, H., Tatsumi, T., Hosui, A., Nawa, T., Kodama, T., Shimizu, S., Hikita, H., Hiramatsu, N., Kanto, T., Hayashi, N. and Takehara, T.**, Alterations in microRNA expression profile in HCV-infected hepatoma cells: involvement of miR-491 in regulation of HCV replication via the PI3 kinase/Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 412: 92-97.

2. 学会発表

- 1) **Matsubara T, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Hiramatsu N, Kasahara A, Takehara T.** Pro-angiogenic receptor TIE2-expressing monocytes/TEM as novel diagnostic biomarker for hepatocellular carcinoma. The Liver Meeting AASLD 62d Annual Meeting and Postgraduate Course, San Francisco, CA, USA, 2011.
- 2) **Kakita N, Kanto T, Miyazaki M, Yoshio S, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Sakakibara M, Hiramatsu N, Kasahara S, Takehara T, Hayashi N.** Enhanced ability of IL28A and IL28B induction in plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis C patients with major allele of IL28B single nucleotide polymorphism. The Liver Meeting AASLD 62d Annual Meeting and Postgraduate Course, San Francisco, CA, USA, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特に予定なし

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

HCV レプリコン細胞をつかった C 型肝炎ウイルスのリポ蛋白・IDL への影響について

研究分担者 齊藤 聡 横浜市立大学大学院医学研究科・分子消化管内科 准教授

研究要旨：昨年、我々は C 型肝炎ウイルス（HCV）遺伝子型 1b の全長が組み込まれた HCV レプリコン細胞である OR6 細胞を用いて、HCV タンパクを発現した状態とインターフェロン（IFN）処理により HCV タンパク発現を抑制したコントロールとの間で脂質プロファイルの違いが有ることを報告した。HCV タンパクを発現しているレプリコン細胞では Very low-density lipoprotein (VLDL) と Low Density Lipoprotein (LDL) の中間代謝産物で VLDL レムナントである Intermediate density lipoprotein (IDL) が増加していた。このため VLDL, IDL, LDL の代謝に関与するコレステリルエステル転送タンパク質 (CETP), レシチンコレステロールアシル トランスフェラーゼ(LCAT), リポ蛋白リパーゼ (LPL), 肝性トリグリセリドリパーゼ (HTGL) について活性, mRNA やタンパク発現を測定した。この原因は HCV タンパクを発現している細胞では肝性リパーゼ (HTGL) の発現が低下していることが原因であると結論づけた。今年度は実際に患者の肝組織でも HTGL の発現が低下しているか否かを明らかにすることを目的として抗 HTGL 抗体を用いた免疫染色により検討を行った。この結果患者検体でも HCV 感染により HTGL の発現が低下している傾向を認めた。HTGL の発現低下が HCV の感染性の低下したことを示す報告もある。このため HTGL の発現を調節する事が、新たな治療ターゲットとなり得る可能性がある。

A. 研究目的

近年 C 型肝炎ウイルス（HCV）の増殖や慢性肝炎患者の治療効果と脂質代謝の関係について、様々な報告が散見される。昨年我々は HCV レプリコン細胞である OR6 細胞を用いて、培養細胞の上清中のリポタンパクプロファイルの変化を比較し、これに関するコレステリルエステル転送蛋白 (CETP) や肝性リパーゼ (HTGL) の関与について検討した。コントロールは OR6 細胞をインターフェロン (IFN) で処理して HCV 遺伝子を除去した OR6c 細胞を用いた。その結果 OR6 細胞の培養液中には Very low-density lipoprotein (VLDL) と Low Density Lipoprotein (LDL) の中間の比重を示す Intermediate density lipoprotein (IDL) が増加していた。High density lipoprotein (HDL) から apoB 含有リポタンパク (VLDL, LDL, IDL) へのコレステロールの転送に重要な CETP の発現は変化しておらず、この現象

には CETP は関与していないと考えられた。一方、IDL から LDL への分解に重要な役割を示す HTGL の発現は HCV タンパクが発現している OR6 細胞で低下していることが明らかとなった。本研究では患者検体で HTGL の発現が HCV の感染によって変化しているかを検討した。

B. 研究方法

HTGL の発現レベルを、HCV 遺伝子型 1b の全長が組み込まれた Huh7 由来の細胞であるレプリコン細胞 OR6 (岡山大学・加藤先生、池田先生より供与) と、対照とした OR6 細胞にインターフェロン α (500 IU/ml) を添加し、HCV 遺伝子を除去した OR6 cured 細胞 (OR6c) を用いて解析した。

1) 培養細胞を抗 HTGL 抗体である sc-21741 (Santa Cruz Biotechnology, INC) を用いて免疫染色を行ない、