

201125005A

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

C型肝炎難治症例の病態解明と抗ウイルス治療に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹原 徹郎

平成24(2012)年 3月

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

C型肝炎難治症例の病態解明と抗ウイルス治療に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹原 徹郎

平成24(2012)年 3月

C型肝炎難治症例の病態解明と抗ウイルス治療に関する研究

班員名簿

班長	竹原 徹郎	大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学	教授
班員	泉 並木	武蔵野赤十字病院消化器科	部長
	伊藤 義人	京都府立医科大学医学系研究科消化器内科学	准教授
	金子 周一	金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学	教授
	永野 浩昭	大阪大学大学院医学系研究科消化器外科学	准教授
	坂本 直哉	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子肝炎制御学	寄附講座 准教授
	芥田 憲夫	虎の門病院肝臓センター	医員
	野村 秀幸	国家公務員共済組合連合会新小倉病院肝臓センター	部長
	林 紀夫	独立行政法人労働者健康福祉機構関西労災病院 消化器内科学	病院長
	平松 直樹	大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学	講師
	三田 英治	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター消化器科	科長

[事務局]

大阪大学大学院医学系研究科・消化器内科学
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘二番二号
Tel: 06-6879-3621
Fax: 06-6879-3629

目 次

I. 総括研究報告書

- C型肝炎難治症例の病態解明と抗ウイルス治療に関する研究・・・1
竹原 徹郎

II. 共同研究報告書

- Peg-IFN/RBV 治療非著効例に対する再治療効果・・・5
竹原 徹郎

III. 分担研究報告書

1. 血小板減少による肝線維化増悪の分子機序・・・7
竹原 徹郎
2. C型慢性肝炎例で従来治療でのウイルス排除困難例の同定；DAA での
治療に向けて
泉 並木 ・・・12
3. C型肝炎難治症例の病態解明と抗ウイルス治療に関する研究・・・15
伊藤 義人
4. C型慢性肝炎症例における肝臓の低栄養状態とインターフェロン応答・不応答の解析・・・21
金子 周一
5. HCV陽性肝移植におけるステロイドフリー免疫抑制法と preemptive
抗ウイルス療法の意義に関する研究
永野 浩昭 ・・・24
6. C型肝炎難治症例の病態解明と抗ウイルス治療に関する研究・・・27
坂本 直哉
7. PEG-IFN/RBV 難治例のウイルス学的特徴と新規抗ウイルス療法・・・33
芥田 憲夫
8. HCV陽性肝硬変患者における脾臓摘出が CD4陽性 T細胞応答に与える影響・・・35
野村 秀幸
9. C型慢性肝炎における NK細胞サブセット内 IFNシグナル伝達・・・38
林 紀夫
10. 難治性 C型肝炎に対する Peg-IFN/RBV 療法の治療効果予測における
IL28B 遺伝子多型と早期治療反応性の役割について
平松 直樹 ・・・43
11. HIV感染合併 C型慢性肝炎に対する IFN治療効果と IL-28Bの SNP・・・46
三田 英治

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 ・・・51

V. 研究成果の刊行物・別刷 ・・・61

I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
総括研究報告書

C型肝炎難治症例の病態解明と抗ウイルス治療に関する研究

研究代表者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨： C型肝炎に対する標準治療は PEG-IFN/RBV 併用治療であるが、その著効率は 1 型高ウイルス量症例で 40~50%、その他の症例で 70~80%にとどまっている。PEG-IFN/RBV 治療は 2004 年 12 月に認可され、現在までに 16 万人以上に投与が行われたと推計されているが、その半数の 8 万人以上が残念ながら非著効例として、HCV 感染からの離脱に至れずにいる。同治療でウイルスが排除できない患者は今日的な意味での C型肝炎の難治群であり、プロテアーゼ阻害剤などを加えた 3 剤併用治療の開発が期待されている。PEG-IFN/RBV 併用治療非著効例に対する再治療は一般には推奨されていないが、同治療が年々最適化されていく流れのなかで、前治療の効果を勘案し、再治療の適応を明確にすることは、経年的に増え続ける同治療非著効例に対する対策として喫緊の課題である。本研究では具体的に以下のことを明らかにする目的で研究を行っている。1) PEG-IFN/RBV 併用治療無効・再燃例に対する再治療成績を解析し、再治療効果のエビデンスを創出するとともに、再治療の適応の具体的な提言を行う、2) PEG-IFN/RBV 治療に対して真に抵抗性の患者群（治療最適化後も無効あるいは再燃をきたす症例）を抽出し、その病態の特徴を明らかにする、3) プロテアーゼ阻害剤をはじめとした新規薬剤の治療効果と治療効果を規定する臨床要因および病態を明らかにする、4) その他の C型肝炎難治群として、肝移植後の C型肝炎、透析・腎移植患者、HIV 合併例、線維化進展例を取り上げ、このような患者群に対する治療法の確立と難治化メカニズムの解明を目指す。3 年計画の最終年度において、多施設共同研究として 113 例の再治療例の成績の検討を行い、IL28B、ITPA の SNP と治療効果の関連を検討した。また、個別研究として、PEG-IFN/RBV 併用治療の難治化に関連する臨床因子の解析、PNALT 症例の解析、PEG-IFN/RBV/TVR 治療の抗ウイルス効果と難治要因の解析、肝移植後 C型肝炎に対する治療成績の検討、HIV 感染者における治療成績の検討を行った。さらに、C型肝炎の難治化の病態解明として脾腫が免疫機能におよぼす影響の解析、血小板減少が線維化進展におよぼす影響の解析、IL-6 シグナルが難治化に及ぼす意義の解析、肝臓の栄養状態が IFN シグナルに与える影響等について研究を行った。

A. 研究目的

2004年12月にPEG-IFN/RBV治療が認可され、現在までに16万人以上の治療が行われたと推計されている。残念ながら、1型高ウイルス量症例を中心に約8万人以上が同治療非奏効例（無効例、再燃例）となっており、この数は今後も経年的に増加し膨大な数にのぼることが確実視されている。このような患者群は全体としては再治療を行っても難治であることが予想され、一般には抗ウイルス治療の適応とはなっていない。前治療が無効・再燃となった要因は様々であり、動かし難い患者要因やウイルス要因がある一方で、薬剤投与の遵守率や投与期間など、治療が最適化されていたかどうか大きな問題である。1型高ウイルス量症例に対する標準的治療は48週投与であるが、LVR例に対しては72週投与が推奨されるようになり、2009年度からは公費助成の対象となっている。刻々と積み重ねられるPEG-IFN/RBV治療のエビデンスと、標準治療が個別化される流れのなかで、前治療（必ずしも最適化されていない可能性）が非奏効であった患者から再治療の適応症例を拾い上げていくことは、根治的治療の対象外とされているこれらの患者に対して大きな福音となる。また、このような作業を通じて、PEG-IFN/RBV治療の真の難治例の病態が明らかとなり、新規治療法の適応の明確化にもつながる可能性がある。本研究ではPEG-IFN/RBV治療に無効・再燃であった患者群、肝移植後のC型肝炎再発、透析・腎移植症例、線維化進展/血小板減少例、HIV感染合併例を「C型肝炎難治症例」として捉え、このような患者群における根治を目指した抗ウイルス治療の戦略を構築

するとともに難治化のメカニズムを解明することを目的に研究を行う。

B. 研究方法

1) PEG-IFN/RBV 併用治療の再治療効果の検討

PEG-IFN/RBV 併用治療にて著効が得られず、同併用療法による再治療を施行したC型慢性肝炎113例を対象とした後向き解析を多施設共同で行った。

2) PEG-IFN/RBV 治療に対して抵抗性の患者群の臨床的背景および病態の解析

3) PEG-IFN/RBV/TVR 治療の治療効果と難治要因の解析

4) 肝移植後 C 型肝炎に対する抗ウイルス治療の解析

5) C型肝炎の難治化メカニズムの解明 具体的には血小板減少、脾腫、Fisher 比低下、HCV コアアミノ酸置換が C型肝炎の病態に与える影響を検討した。

C. 研究成果

1) PEG-IFN/RBV 再治療効果

PEG-IFN/RBV 治療非奏効例に対する再治療効果は Genotype 1 型での著効率は48%、Genotype 2 型での著効率は63%であった。Genotype 1 型においては、初回治療 p-EVR 達成例あるいは再治療開始時低ウイルス量例 (< 5 Log IU/ml) では著効が得られやすく、再治療の良い適応であると考えられた。また、初回治療再燃例での再治療においては、初回治療に比し RBV 投与量が増加し、投与期間が延長した症例では著効が得られやすいことが示された。IL28B major 症例では minor 症例に比し、再治療で SVR 率が高い傾向がみられたが有意差は

なかつた。また、ITPA の SNP と SVR の間には関連がみられなかつた。

2) PEG-IFN/RBV 併用治療における宿主因子の解析

NVR および肝発がんに関連する因子をデータマイニングの手法を用いて明らかにした。

3) PEG-IFN/RBV 併用治療の治療効果予測

非専門医でも SVR を予測し得る予測式(男性 2 点+低 HCV RNA 量(1000KIU/ml 以下) 3 点+血小板高値 (15 万/ul 以上) 1 点+低年齢 (60 歳以下) 1 点)を作成した。

4) PEG-IFN/RBV/TVR 3 剤併用治療におけるウイルス/宿主因子の解析

3 剤併用療法の SVR に影響する治療前のウイルス・宿主因子について検討した。初回治療/前治療再燃/前治療無効例の SVR 率は 76/90/27%であった。コアアミノ酸 70 番野生型と IL28B major allele が SVR に寄与する独立因子であった。

5) コアアミノ酸変異の意義

コア 70/91 変異により ER ストレスが誘導され、IL-6 が上昇し、SOCS3 を介して IFN シグナルが減弱することを明らかにした。C 型肝炎患者では健常者に比し血清 IL-6 が高値であり、特に男性ではインターフェロン治療後に IL-6 が低下することが、治療効果に関連していた。

6) リアルタイム PCR 法を用いた治療因子の解析

難治性 C 型肝炎に対する Peg-IFN/RBV 併用療法では、IL28B 遺伝子多型は治療前の強力な治療効果予測因子であり、治療開始後は、治療への反応性による効果予測が重要であった。

7) IFN 応答性と肝臓の栄養状態

栄養飢餓は Foxo3a の脱リン酸化を誘導し、Foxo3a による SOCS3 の転写を直接増強した。

7) 脾臓の免疫機能に与える意義

C 型肝炎患者の末梢血および脾臓では PD-1 陽性の CD4 T 細胞が増加していた。同様に PD-L1、PD-L2 の陽性率も上昇がみられた。摘脾術後に末梢 CD4 陽性 T 細胞の反応性が回復し、その一部は PD-1 発現低下を介していることが示された。

8) 血小板減少が肝線維化に与えるインパクト

血小板減少マウスでは胆汁うっ滞性肝障害時の肝線維化が亢進した。ヒトの血小板においても、混合培養により星細胞の活性化を抑制することが示された。

9) 移植後 C 型肝炎に対する対策

ステロイドフリー免疫抑制法により、HCV 肝炎早期再発頻度を抑制することが可能であり、HCV 肝硬変・肝移植症例のウイルス治療に意義がある可能性があることが示唆された。

D. 考察と結論

PEG-IFN/RBV 併用治療により著効が得られなかつた症例に対する再治療効果は Genotype 1 で 48%、Genotype 2 で 63%であった。Genotype 1 においては前治療 pEVR 達成例あるいは再治療時の HCV RNA 量が 5 log 未満の症例では治療効果が得られやすく、再治療を考慮すべき患者集団であると考えられる。また、再治療効果を得るためには、再治療期間を延長するなど RBV の投与量を十分に確保することが必要である。

PEG-IFN/RBV 治療における難治要因として IL28B minor allele、コアアミノ酸 70 番置換、肝線維化進展/血小板減少、高齢、PEG-IFN/RBV 前治療無効をあげることができる。また PEG-IFN/RBV/TVR 治療においても、引き続き IL28B minor allele、コアアミノ酸 70 番置換、前治療無効は難治に関連する因子であると考えられる。

難治化のメカニズムとして、コアアミノ酸置換を有するウイルスでは HCV の放出が抑制され、IL-6 シグナルを介して IFN 抵抗性が増強する。進展した肝疾患にみられる Fisher 比の低下は IFN α 応答性を不良にすることが示された。

C 型肝炎では肝疾患が進展すると血小板が減少するが、ヒト血小板においても肝星細胞の活性を抑制する機能があることが示された。また、線維化進展例では脾臓での CD4 T 細胞の PD-1 発現が増強し免疫を負に制御している可能性が示された。血小板減少症例に対する対策として摘脾の有効性が示唆された。

移植後 C 型肝炎に対する対策としてステロイドフリーで患者管理を行い、早期から低用量 IFN/RBV 治療を開始することが有用であることが示唆された。

II. 共同研究報告

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
共同研究報告書

Peg-IFN/RBV 治療非著効例に対する再治療効果

研究代表者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨： C型慢性肝炎に対する Peg-IFN/Ribavirin (RBV) 併用療法の非著効例に対する同療法による再治療は、今後も新規抗ウイルス剤治療非適応例にとって治療選択肢の一つと考えられる。しかし、如何なる患者群で再治療による効果が得られるかは明らかでない。今回、Peg-IFNα2b/RBV 併用療法非著効例に対する Peg-IFN/RBV の再治療効果について多施設共同研究を行った。昨年度に引き続き症例を追加するとともに IL28B、ITPA の SNP の影響について検討した。Genotype 1 症例について IL28B major 症例 67%、minor 症例では 36% の SVR 率であり、有意差はないものの、major 症例で minor 症例に比し良好であった。ITPA については major 症例 65%、minor 症例 50% であり、両群間に差を認めなかった。Genotype 1 の再治療成績については、前治療歴および治療前のウイルス量が優れた治療効果予測因子であり、IL28B の影響は限定的であった。

共同研究者

林 紀夫 関西労災病院

平松直樹 大阪大学消化器内科学 講師

小瀬嗣子 大阪大学消化器内科学

泉 並木 武蔵野赤十字病院消化器内科
部長

伊藤義人 京都府立医科大学消化器内科学
准教授

坂本直哉 東京医科歯科大学分子肝炎制御
学 寄付講座准教授

芥田憲夫 虎の門病院肝臓センター 医員

野村秀幸 国家公務員共済組合連合会新小
倉病院内科 部長

三田英治 国立病院機構大阪医療センター
消化器科 科長

A. 研究目的

1 型高ウイルス量の C 型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の第一選択は Peg-IFN/RBV 併用療法であるが、同併用療法においても約半数ではウイルス排除が得られず、このような難治例の割合は経年的に増加すると予想される。Peg-IFN/RBV 併用療法の非著効例において、同併用療法による再治療は、今後も新規抗ウイルス治療非適応剤にとって治療選択肢の一つと考えら

れるが、如何なる患者群で再治療による効果が得られるかは明らかでない。今回、Peg-IFN/RBV 併用療法での非著効例における同療法の再治療効果を検討し、再治療の適応症例の特徴と、再治療での治療効果向上に関与する因子を明らかにすることを目的に、多施設共同の後向き研究を行った。

B. 研究方法

Peg-IFN α 2b/RBV 併用療法にて著効が得られず、Peg-IFN α 2a or α 2b/RBV 併用療法による再治療を施行した C 型慢性肝炎を対象とした。HCV-RNA の消失についてはアンプリコア定性法 (< 50 IU/ml) で検討し、治療開始 12 週での HCV-RNA 減少が 2 log 未満である症例、治療開始 24 週での HCV-RNA が陽性である症例を無効例と判定した。初回治療で副作用中止となった症例を除き、初回治療効果が判定可能であった 113 例を対象とした。

C. 研究成果

Genotype 1 型の再治療での著効率は 47%であった。初回治療 p-EVR 達成例では著効率 63%、非達成例では 9%であり両群間に有意差を認めた。再治療開始時低ウイルス量 (< 5 Log IU/ml) では 100%で著効が得られたが、高ウイルス量では 38%の著効率であった。初回治療再燃例での再治療において、初回治療に比し RBV 投与量が増加し、投与期間が延長した症例では著効が得られやすかった。IL28B については IL28B major 症例 67%、minor 症例では 36%の SVR 率であり、有意差はないものの、major 症例で minor 症例に比し良好であった。ITPA については major 症例 65%、minor 症例 50%で

あり、両群間に差を認めなかった。Genotype 2 型の再治療での著効率は 63%であった。

D. 考察と結論

Genotype 1 の再治療成績については、前治療歴および治療前のウイルス量が優れた治療効果予測因子であり、IL28B の影響は限定的であった。

E. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

Ⅲ. 分担研究報告

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
分担研究報告書

血小板減少による肝線維化増悪の分子機序

研究代表者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨：血小板減少は慢性肝炎/肝硬変患者に高頻度に併発する合併症であり、血小板数と肝線維化の間には強い負の相関関係が認められる。血小板数の低下は C 型肝炎に対する Peg-IFN/RBV 治療の非奏効に強く関与するのみならず、肝臓に対する侵襲的治療を行う際の障害になる等肝疾患診療上の重要な問題であるが、血小板減少自体が肝疾患の病態形成にどのような影響を与えるかは十分に理解されていない。一昨年度、我々は血小板の寿命を制御する分子である Bcl-xL を血小板特異的に欠損させることで血小板減少マウスを作成し、血小板減少が胆汁鬱滞性肝障害モデルにおいて肝線維化を増悪させることを明らかにした。また血小板の肝線維化抑制作用として、活性化した血小板から放出される HGF が肝星細胞の I 型コラーゲン産生を抑制することを見出した。昨年度は、血小板減少状態では胆汁鬱滞性肝障害において HGF/Met 経路の十分な活性化が生じず、このことが血小板減少による肝線維化増悪の原因である事を証明した。本年度は、マウス血小板において認めた肝線維化抑制作用がヒト血小板においても認められるかどうかを検討し、また血小板由来 HGF の肝病態との関連について更に詳細に解析する為に血小板特異的 HGF 欠損マウスを作成して実験を行った。ヒト血小板は、ヒト肝星細胞株との共培養により同細胞での I 型コラーゲン遺伝子発現を減弱させたことから、ヒト血小板もマウス血小板と同様肝線維化抑制作用を有すると考えられた。また血小板特異的 HGF 欠損マウスは劇症肝炎モデルにおいて対照マウスと比し肝障害が増悪し、生存率の低下を認めた。このことから血小板由来 HGF は劇症肝炎においても重要な肝保護作用を発揮することが生体レベルで証明された。

共同研究者

小玉 尚宏 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

慢性肝炎/肝硬変は肝線維化を病態の中心

とする疾患であり、進展すると肝不全や肝細胞がんなどの致死的な疾患を引き起こす。

そこで、その進行を阻止することは重要な課題であるが、その為には肝線維化の病態

を解明することが必要である。肝線維化は、

肝臓での慢性的な炎症や肝細胞死などによって惹起される肝星細胞・線維芽細胞の活性化と、それに引き続くコラーゲンなどの細胞外マトリックス産生の亢進がその病態の中心と考えられているが、いまだ不明な点も多い。一方、慢性肝炎/肝硬変では、病態の進行に伴い血小板が減少し、肝線維化と血小板数は非常に密接な負の相関関係にあることが知られている。この血小板減少は、門脈圧亢進に伴う二次性脾機能亢進症により脾臓における血小板破壊が亢進することや、肝臓での TPO (Thrombopoietin) 産生低下に起因しており、つまり肝線維化が進行した結果であると考えられている。しかし逆に、血小板減少が肝線維化に影響を与えるかどうかについての詳細な検討は行われていない。近年、血小板はその生理学的な凝固・止血機能のみならず、組織修復、血管新生など多彩な機能を有していることが明らかにされており、肝臓領域においても炎症や再生に関与することが報告されているが、肝線維化に対する血小板の作用は明らかにされていない。血小板減少の肝線維化に対する影響、また血小板自体の肝線維化に対する役割を検討することは、肝線維化の病態の理解、並びに肝線維化進展抑制の為の新規治療を検討する上で重要であると考えられる。

一昨年度、我々は血小板の寿命を制御する分子である Bcl-xL を血小板特異的に欠損させた血小板減少マウスを作成し、血小板減少が胆汁鬱滞性肝障害モデルにおいて肝線維化を有意に増強することを明らかにした。また血小板の肝線維化抑制作用として、活性化した血小板から放出される HGF が活性化肝星細胞の I 型コラーゲン産生を抑

制することを見出した。引き続いて昨年度は、血小板減少状態では胆汁鬱滞性肝障害において HGF/Met 経路の十分な活性化が生じず、このことが血小板減少による肝線維化増悪の原因である事を証明した。本年度は、マウス血小板において認められた肝線維化抑制作用がヒト血小板においても認められるかどうかを検討し、また血小板由来 HGF の肝病態との関連について更に詳細に解析する為血小板特異的 HGF 欠損マウスを作成して実験を行った。

B. 研究方法

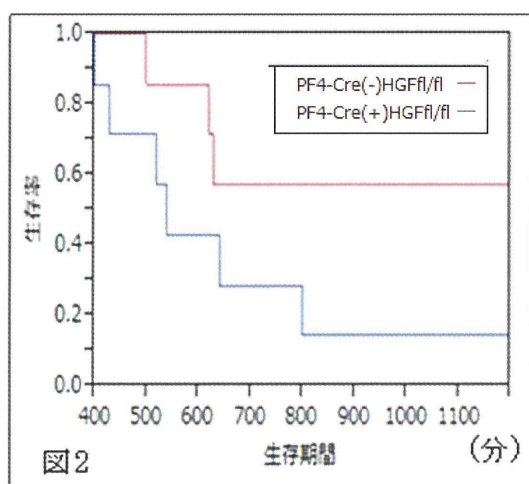
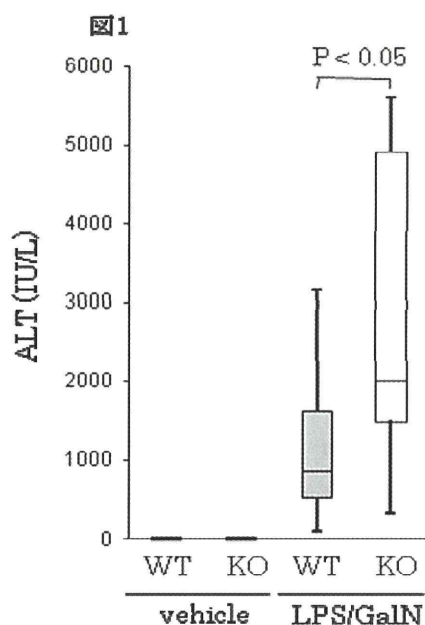
健康人から抽出した血小板とヒト肝星細胞株 (LI90) を 6 時間共培養した後に、LI90 細胞での I 型コラーゲン遺伝子発現について real time RT-PCR 法を用いて定量した。Pf4-Cre HGF fl/fl マウスと HGF fl/fl マウスを交配し、前者を血小板特異的 HGF 欠損マウス、後者を対照マウスとして実験に使用した。これらのマウスに LPS 0.4ug/kg+GalN 800mg/kg の腹腔内投与を行い、6 時間後犠死させ試料を採取した。肝障害について血清 ALT 値を測定し評価を行った。また、これらのマウスに対して LPS 10ug/kg+GalN 800mg/kg を腹腔内投与し、その後の生存率について検討した。

C. 研究成果

ヒト血小板とヒト肝星細胞株との共培養により、ヒト肝星細胞株での I 型コラーゲン遺伝子発現は減弱した。

血小板特異的 HGF 欠損マウス、対照マウス共に LPS/GalN の腹腔内投与 6 時間後において著明な肝障害を認めたが、ALT 値は血小板特異的 HGF 欠損マウスにおいて有

意に高値を呈した(図1)。また、LPS/GalN投与後の生存率は血小板特異的 HGF 欠損マウスにおいて低値であった(図2)。



D. 考察と結論

ヒト血小板もマウス血小板と同様肝線維化抑制作用を有していることが示された。

また、肝線維化のみならず劇症肝炎においても血小板由来 HGF が重要な肝保護作用を發揮することが生体レベルで証明され、これらの疾患に対する有効な治療手段となる可能性が示唆された。

E. 研究発表

論文発表

- Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Li W, Shigekawa M, Tanaka S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Morii E, Hayashi N, Takehara T. Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. **J Hepatol**. In press.
- Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Hiramatsu TK, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinases inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. **Int J Cancer**, in press
- Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Shigekawa M, Tsunematsu H, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Kubota S, Takigawa M, Tomimaru Y, Tomokuni A, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. **J Clin Invest** 121:3343-56, 2011
- Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Yin XM, Hayashi N. BH3-only activator proteins, Bid and Bim, are dispensable for Bak/Bax-dependent thrombocyte apoptosis induced by Bcl-xL deficiency: Molecular requisites for the mitochondrial pathway to

- apoptosis in platelets. **J Biol Chem** 286:13905-13913, 2011
5. Ishida H, Tatsumi T, Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N 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** 412:92-97, 2011
 6. Shigekawa M, Takehara T, Kodama T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Involvement of STAT3-regulated hepatic soluble factors in attenuation of stellate cell activity and liver fibrogenesis in mice. **Biochem Biophys Res Commun** 406:614-620, 2011
 7. Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Shimizu S, Tsujimoto Y, Hayashi N, Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bax/Bak-deficient mice. **Hepatology** 54: 240-251, 2011

学会発表

The 62nd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease
Nov 4~Nov 8, 2011 San Francisco

Continuous hepatocyte apoptosis is sufficient for liver cancer development. *Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Shimizu, Minoru*

Shigekawa, Wei Li, Satoshi Tanaka, Atsushi Hosui, Takuya Miyagi, Hisashi Ishida, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi, Tetsuo Takehara

Requirement of BH3-only activator proteins Bid and Bim for apoptosis by genetic ablation of Bcl-xL is completely different between hepatocytes and platelets. *Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Minoru Shigekawa, Hinako Tsunematsu, Kumiko Nishio, Takatoshi Nawa, Satoshi Shimizu, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Hisashi Ishida, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara*

Digestive Disease Week 2011

May 7~May 10, 2011 Chicago

Delayed onset of caspase-dependent liver failure induced by Fas stimulation in Bak and Bax double knockout mice. *Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Atsushi Hosui, Takuya Miyagi, Hisashi Ishida, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi, Tetsuo Takehara*.

A crucial role of hepatocyte p53 in liver fibrogenesis. *Takahiro Kodama, Tetsuo Takehara, Satoshi Shimizu, Hayato Hikita, Minoru Shigekawa, Hinako Tsunematsu, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Hisashi Ishida, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi*

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

「C型慢性肝炎例で従来治療でのウイルス排除困難例の同定；DAAでの治療に向けて」

研究分担者：泉 並木 武蔵野赤十字病院副院長

研究要旨：Genotype 1bかつ高HCV RNAのC型慢性肝炎症例では、ペグインターフェロンとリバビリン併用治療によってウイルス排除が約半数に得られる。この中で15%は治療中にHCV RNAが陰性化しない無反応(Null-Response;NR)である。このNRでは新規プロテアーゼを用いた3剤併用療法によるウイルス排除(Sustained Virological Response:SVR)率が11.8%と低い。そこで、従来治療で難治であり、3剤併用治療を行っても効果が得にくい例を同定することが重要である。NR例では、宿主遺伝子がIL-28Bがminor alleleであることが最も重要であったが、それ以外に肝線維化と血小板低下が関与していた。さらにIL-28Bのminor alleleの症例では、ウイルス側でコアaa70の変異型の症例が多く、宿主難治要因とウイルス側の難治要因が関連していた。IL-28Bがminor alleleの症例の臨床的特長を解析したところ、肝脂肪化が強く、 γ GTPが高いという特徴がみられ、従来宿主の難治因子といわれていたものと合致していた。これらを用いてデータマイニング解析を行うと、5年以内の肝発癌率や治療を受けたときにSVRが得られる率が個々の症例で評価でき、どのDAAでいつ治療するのかの重要な根拠が得られる。

A. 研究目的

C型肝炎の治療薬として直接ウイルス増殖に作用する薬剤の開発が進み、いつどの薬剤で治療を受けるのかが重要になっている。わが国ではC型肝炎ウイルス感染から肝癌を発症する症例が依然として多い。肝癌発生や肝硬変への進行を防止するために、肝臓からウイルスを排除することが最も有用である。第一世代のプロテアーゼ阻害薬であるテラプレビルでは、SVR率が73%に向上したが、IL-28Bがminor alleleの例や前治療がnull-responseであった場合には効果が低く、さらに耐性ウイルスが出現するリスクがある。そこで、どの薬剤でいつ治療を受けるのかについて、専門医が判断できる指針が必要となっている。今回、ペグインターフェロンとリバビリン治療を受けた症例を解析しnull-responseに関与する因子の同定や、肝発癌リスクを個々の症例で検討し、指標とな

るものを作成することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 2004から2010に当院でペグインターフェロンとリバビリン治療を受けたgenotype 1b型の496例を対象とし、IL28Bやコア70, 91, Interferon sensitive determining region (ISDR)などウイルス変異を含めて治療中にHCV RNAが陰性化しないnull-responseに関与する因子について解析した。

(2) NVRの症例について、NVRに関わる因子を、単変量解析によって有意なものを検出した。肝生検による肝線維化や炎症、血小板数など臨床的に解析できる項目をすべて検討した。

(3) さらに、単変量で有意であったものについて、logistic regression analysisによって多変量解析を行い、NVRに関わる因子について独立で寄与する因子を解析した。

(4) さらに NVR に関与することが報告されている宿主 DNA の SNP である IL-28B の遺伝子多型が major allele の TT か、minor allele の TG または GG であるのかを含めて解析した。

(5) これらの全ての因子を含めてデータマイニングによって NVR に関わるアルゴリズムを構築した。

(6) 当院で通院中の C 型慢性肝炎症例について、肝発癌まで経過を観察できた症例についてデータマイニング解析を行い、5 年間で肝発癌をきたしやすい因子を検討し、各症例について 5 年間の肝発癌リスクを予測できるアルゴリズムを構築した。

C. 研究結果

(1) genotype 1b 型でペグインターフェロンとリバビリン併用療法を行って 24 週間目までに HCV RNA が陰性化しなかった NVR に関与する因子を解析した。単変量解析では、 γ GTP が高いこと、血小板数が低値であること、肝生検で線維化が F3 または F4 の進展例であること、HCV RNA が 6 log IU/mL 以上と高いこと、ISDR の変異数が 1 箇所以下で少ないこと、コア aa70 番が His や Gln に変異していること、IL-28B が TG または GG の minor allele であることが有意であった。

(2) これらの変数の関連性を検討すると、IL-28B が minor allele であった場合には、コア aa70 番が His または Gln に変異している例が多かった。そこで、多変量解析を行うと、NVR には IL-28B が minor allele であることが Odds 比 28.3 で最も強い因子であることが判明した。さらに、HCV RNA が 6 log IU/mL 以上、血小板数低値、肝線維化が F3-4 の進展していることが有意であった。

(3) この症例で IL-28B の遺伝子多型を調べたところ、全体の 70% が TT の major allele であったのに対し、30% が TG あるいは GG の minor allele であった。Major allele の 50% の例が SVR を獲得できたのに対し、12% の症例が NVR であった。しかし、minor allele の症例では、SVR は 14% にすぎず、72% が NVR であった。したがって、IL-28B の SNP が HCV RNA の陰性化に大きく関与していると考えられる。

(4) そこで NVR となる症例を予測する目的で、NVR 例についてデータマイニング解析を行った。最も判別効率が高かったのは、IL-28B の SNP であり、major allele では 12% であったのに対し minor allele では 72% と高率であった。Major allele の症例では血小板数 14 万/ μ l 未満の例で NVR となりやすく、血小板低値例では ISDR の変異数が 2 箇所以下の変異が少ないことが NVR の予測に重要であった。血小板数が多い例では、HCV RNA 量が 600 KIU/mL 以上の多い症例が NVR になりやすく、HCV RNA が 600 KIU/mL 未満では NVR 例はなかった。

(5) IL-28B が minor allele の例の臨床的特長を調べたところ、 γ GTP が高いことと肝内脂肪化が有意に高いことが認められた。

(6) C 型慢性肝炎例の経過観察を行い、5 年以内に肝発癌をきたす因子について、データマイニング解析を行ったところ、20.9% に発癌する可能性が高い例から、5 年以内にはほとんど発癌しないと考えられる症例を同定できた。

D. 考察

今後 C 型慢性肝炎では、直接ウイルス増殖を抑制する薬剤とインターフェロン+リバビリン治療が主体になるが、ペグインターフェロンとリバビリン併用療法の無効率では 3 剤併用の効果がでにくい。テラプレビルを含む 3 剤併用療法で治療を行うか否かを決めるために、ペグインターフェロン+リバビリン併用で NVR となるか否かを治療前に予測することが重要となる。

NVR には IL-28B だけでなく、血小板低値や γ GTP 高値、肝線維化や HCV RNA 高値が関与していた。また、これらの臨床的項目を含んで、データマイニング解析を行うと、個別の症例ごとに NVR の予測値が得られた。これらの数値と、5 年以内の肝発癌率を考慮して、いつ、どの治療薬で治療を行うのかについて、的確に判断することが重要と考えられた。