

E. 結論

直接抗ウイルス薬を含んでペグインターフェロンとリバビリン併用療法を行う場合に、治療前に効果と肝発癌率を予測して、いすどの薬で治療を開始するのかについて、的確な判断材料が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1)Asahina Y, Izumi N.et al. Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in IL28B with antiviral response. Hepatology 2011 in press.

(2)Kurosaki M, Izumi N, et al. Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphate gene and anemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin. Antivir Ther 2011;16:685-94.

(3) Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M. Predictors of virological response to a combination therapy with pegylated interferon plus ribavirin including virus and host factors. Hepat Res Treat 2010;2010:703602.

2. 学会発表

1. 泉並木、第15回日本肝臓学会大会シンポジウム 2 C型肝炎個別化医療のための宿主因子・ウイルス因子 特別発言 2011.

2.泉並木、山田剛太郎、熊田博光. 第15回日本肝臓学会大会シンポジウム 10. C型肝炎治療の新たな展開 S10-9 型肝炎症例における PEG-IFN α 2a 少量長期投与による肝発癌抑止効果の検討：全国多施設共同研究 2011.

3. 黒崎雅之、泉並木. 第15回日本肝臓学会大会シンポジウム 2 C型肝炎個別化医療のための宿主因子・ウイルス因子 データマイニング解析に基づくC型肝炎の個別化医療 2011

G. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究については予定なし。

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

研究分担者 伊藤義人 京都府立医科大学医学研究科消化器内科学准教授

研究要旨：

1) Genotype 2型C型慢性肝炎における肝脂肪化の検討：Genotype 2型のC型慢性肝炎におけるペグインターフェロン・リバビリン（PEG-IFN/RBV）併用療法に対する治療抵抗性に肝脂肪化が関連するか否かを検討した。ROC解析で肝脂肪化とSVRとの関連性を検討したところ、肝脂肪化10%が特異度・感度に優れていると考えられた。肝脂肪化10%（N=13）群は0-10%（N=61）群に比して、インスリン抵抗性の指標であるHOMA-IR値が有意（ $P=0.040$ ）に高く、肝線維化が有意（ $P=0.042$ ）に進展しており、HCV RNA陰性化の有意（ $P=0.042$ ）な遅延を認め、SVR率が有意（ $P=0.003$ ）に低く、10%を超える肝脂肪化は治療抵抗性に深く関わるものと考えられた。

2) Genotype 1型C型慢性肝炎 cEVR例の治療抵抗因子の検討：Genotype 1型のC型慢性肝炎でPEG-IFN/RBV併用療法にcEVRを示した症例の治療抵抗因子を検討した。48週治療例で女性は男性に比して有意（ $P=0.004$ ）にSVR率が低かった。治療開始後8週目にHCV RNAが陰性化した症例では男女差はなかった（ $P=0.413$ ）が、治療開始後12週目にHCV RNAが陰性化した症例では女性のSVR率が有意（ $P=0.005$ ）に低かった。また、治療開始後12週目にHCV RNAが陰性化し、かつ、52-64週の延長投与を行った症例では男女差は消失した（ $P=0.604$ ）。延長投与例のRBV総投与量や投与期間に男女差はなかった（ $P=0.142$ 、 $P=0.227$ ）が、52-64週の延長投与期間中のRBV投与量は女性で有意（ $P=0.027$ ）に低く、治療開始後12週目にHCV RNAが陰性化した女性においては貧血のためRBVの減量が強いいられても投与期間の延長が性差による治療抵抗性の克服に重要であると考えられた。

A. 研究目的

1. Genotype 2型C型慢性肝炎における肝脂肪化の検討：Genotype 2型のC型慢性肝炎患者におけるペグインターフェロン・リバビリン（PEG-IFN/RBV）併用療法の治療成績は良好で約80%の患者で著効（SVR）が得られる。そのため、新規の薬剤であるプロテアーゼ阻害薬の適応とならず、無効（NR）例では有効な治療方法の進歩がみられない。

また、NR例ではPEG-IFN/RBV併用療法の48週間の延長投与も行われているが、依然としてSVRに至らない症例が多くみられる。C型慢性肝炎患者は最近では高齢化しており、Genotype 2型のC型慢性肝炎患者難治例に対する安全で経済的・効率的な治療指針の樹立が必要である。また、慢性肝疾患に占める非アルコール性の脂肪性肝疾患は社会問題化しており、Genotype 2型のC型慢性肝炎患者における肝脂肪化がPEG-IFN/RBV併用療法の治療成績に与える影響は重要な研究

課題であると考えられる。今回、我々は肝生検にて肝脂肪化の程度を確認し得た74例のGenotype 2型のC型慢性肝炎患者に対するPEG-IFN/RBV併用療法の治療成績をもとに、肝組織の脂肪化が肝線維化、HOMA-IRで検討したインスリン抵抗性、治療効果に関わるか否かを検討した。

2. Genotype 1型C型慢性肝炎cEVR例の治療抵抗因子の検討：Genotype 1型のC型慢性肝炎患者に対するPEG-IFN/RBV併用療法では、12週目にHCV RNAが陰性化したcEVR例の治療成績は約70%と良好である。しかし、cEVR例の治癒率をさらに向上させることが可能であるか否かの検討は少なく、小さな治療プロトコールの変更点を検討することも必要と考えられる。今回、この点を明らかにすべく検討を行った。

B. 研究方法

1. Genotype 2型C型慢性肝炎における肝脂肪化の検討：京都府立医大消化器内科と関連施設で24週間のPEG-IFN/RBV併用療法を受け、治療効果判定が終了したGenotype 2型高ウイルス量のC型慢性肝炎患者約74例を対象とした。ROC解析で肝脂肪化とSVRとの関連性を検討したところ、肝脂肪化10%が特異度・感度に優れていると考えられたため、肝脂肪化10% $<$ (N=13)群と0-10% (N=61)群との間でインスリン抵抗性の指標であるHOMA-IR値、肝線維化、HCV RNA 陰性化遅延、SVR 率に差を認めるか否かを検討した。

2. Genotype 1型C型慢性肝炎cEVR例の治療抵抗因子の検討：京都府立医大消化器内科と関連施設で48週間のPEG-IFN/RBV併用療法を受け、治療効果判定が終了したGenotype 1型高ウイルス量のC型慢性肝炎患者約104例と52-64週間の延長治療を受けた46例、計150

を対象とし、治療抵抗性を克服することを目的に、治療上の工夫を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は京都府立医科大学医学倫理委員会の承認を得ており、ヘルシンキ宣言に則り患者の同意を得ている。

C. 研究結果

1. Genotype 2型C型慢性肝炎における肝脂肪化の検討：Genotype 2型のC型慢性肝炎患者におけるPEG-IFN/RBV併用療法に対する治療抵抗性に肝脂肪化が関連するか否かを検討した。ROC解析で肝脂肪化とSVRとの関連性を検討したところ、肝脂肪化10%が特異度・感度に優れていると考えられた。肝脂肪化10% $<$ (N=13)群は0-10% (N=61)群に比して、インスリン抵抗性の指標であるHOMA-IR値が有意 ($P=0.040$) に高く、肝線維化が有意 ($P=0.042$) に進展しており、HCV RNA 陰性化の有意 ($P=0.042$) な遅延を認め、SVR 率が有意 ($P=0.003$) に低く、10%を超える肝脂肪化は治療抵抗性の深く関わるものと考えられた。

2. Genotype 1型C型慢性肝炎cEVR例の治療抵抗因子の検討：Genotype 1型のC型慢性肝炎でPEG-IFN/RBV併用療法にcEVRを示した症例の治療抵抗因子を検討した。48週治療例で女性は男性に比して有意 ($P=0.004$) にSVR率が低かった。治療開始後8週目にHCV RNAが陰性化した症例では男女差はなかった ($P=0.413$) が、治療開始後12週目にHCV RNAが陰性化した症例では女性のSVR率が有意 ($P=0.005$) に低かった。また、治療開始後12週目にHCV RNAが陰性化し、かつ、52-64週の延長投与を行った症例では男女差は消失した ($P=0.604$)。延長投与例のRBV総投与量や投与期間に男女差はなかった ($P=0.142$ 、 $P=0.227$) が、52-64週の延長投与期間中のRBV

投与量は女性で有意 (P=0.027) に低かった。

D. 考察

Genotype 2型のC型慢性肝炎ではPEG-IFN/RBV併用療法に対する治療成績は良い。しかし、約20%では完治が得られない。今回の検討で、肝脂肪化10% \leq (N=13)群は0-10% (N=61)群に比して、インスリン抵抗性の指標であるHOMA-IR値が有意 (P=0.040) に高く、肝線維化が有意 (P=0.042) に進展しており、HCV RNA 陰性化の有意 (P=0.042) な遅延を認め、SVR 率が有意 (P=0.003) に低く、10%を超える肝脂肪化は治療抵抗性の深く関わるものと考えられ、2型の治癒率向上のために重要な所見と考えられた。

わが国のGenotype 1型のC型慢性肝炎では、女性、特に高齢者の治療効果が不良で、治療開始後12週目にHCV RNAが陰性化しない症例では延長投与に頼る場合も少なくない。今回、治療開始後12週目にHCV RNAが陰性化した女性についても治療期間の延長が治療効果の向上に寄与するか否かを検討した。結果、治療開始後8週目にHCV RNAが陰性化していない症例では治療開始後12週目にHCV RNAが陰性化しても、投与期間の延長が性差による治療抵抗性の克服に重要であると考えられた。女性においては貧血のためRBVの減量が強いながらも治療期間の延長が有用と考えられた。

E. 結論

1. Genotype 2型のC型慢性肝炎患者では、肝脂肪化は治療抵抗性の深く関わるものと考えられた。

2. Genotype 1型のC型慢性肝炎では、治療開始後12週目にHCV RNAが陰性化した女性においては貧血のためRBVの減量が強いながらも投与期間の延長が性差による治療抵抗性の克服に重要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Itoh Y, Nishimura T, Hashimoto H, Yamaguchi K, Niimi T, Yokomizo C, Fujii H, Mimami M, Yasui K, Mitsuyoshi H, Okanoue T, Takehara T, Hiasa Y, Onji M, and Yoshikawa T. A simple and convenient formula to predict the response to peginterferon alpha2b and ribavirin combination therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients with high viral load. *Hepatol Res.* 41: 126-132, 2011.
- 2 Park H, Shima T, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 46:101-107, 2011.
- 3 Okanoue T, Umemura A, Yasui K, Itoh Y. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in Japan (review article). *J Gastroenterol Hepatol* 26 suppl. 1; 153-162, 2011.
- 4 Yasui K, Sumida Y, Mori Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Kanemasa K, Matsubara H, Okanoue T, Yoshikawa T. Nonalcoholic steatohepatitis and

- increased risk of kidney disease. *Metabolism*. 60:735-739, 2011.
- 5 Sumida Y, Kanemasa K, Inada Y, Hara T, Saikai K, Imai s, Yoshinda N, Yadsui K, Itoh Y, Okanoué T, Yoshikawa T. Impact of amino acid substitutions in the Hepatitis C virus genotype 1b core region on liver steatosis and glucose tolerance in non- cirrhotic patients without overt diabetes. *J Gastroenterol Hepatol* 26:836-842, 2011.
 - 6 Yamaguchi K, Itoh Y, Yokomizo C, Nishimura T, Niimi T, Umemura A, Fujii H, Okanoué T, Yoshikawa T. Blockade of IL-6 signaling exacerbates liver injury and suppresses anti-apoptotic gene expression in methionine choline deficient diet-fed db/db mice. *Lab Invest* 91:609-618, 2011.
 - 7 Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajimal Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Yuki NS, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M and the Ochanomizu-Liver Conference Study Group. Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b. *J Med Virol* 83: 871-878, 2011.
 - 8 Takasaka T, Itoh Y, Kaneko H, and Ikegaya H. Detection of hepatitis C virus and antibodies in postmortem blood and bloodstains. *J Clin Microbiol* 49: 1122-1123, 2011.
 - 9 Jo M, Nishikawa T, Nakajima T, Okada Y, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Yasui K, Minami M, Kagawa K, Itoh Y, Yoshikawa T. Oxidative stress is closely associated with tumor angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 46:809-821, 2011.
 - 10 Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, enomoto N, Yatsunashi H, Nishiguchi S, Hini K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome -wide association study identified *ITPA/DDRKG1* variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hum Mol Genet* 20:3507-3516, 2011.
 - 11 Yoneda M, Fujii H, Sumida Y, Hyogo H, Itoh Y, Ono M, Eguchi Y, Suzuki Y, Aoki N, Kanemasa K, Imajo K, Chyayama K, Saibata T, Kawada N, Fujimoto K, Khogo Y, Yoshikawa T, Okanoué T, Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). Platelet Count for Predicting Fibrosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Gastroenterol* 46:1300-1306, 2011 .
 - 12 Yokomizo C, Yamaguchi K, Itoh Y, Nishimura T, Minami M, Yasui K,

- Mitsuyoshi H, tochiki N, Fujii H, Nakajima T, Umemura A, Okanoue T, Yoshikawa T. High expression of p300 in HCC predicts shortened overall survival in association with enhanced epithelial mesenchymal transition of HCC cells. *Cancer Lett* 310:140-147, 2011.
- 13 Itoh Y, Nishimura T, Yamaguchi K, Yokomizo C, Fujii H, Minami M, Nagao Y, Sumida Y, Hashimoto H, Umemura A, Shima T, Okanoue T, Yoshikawa T. Hepatic Steatosis in Chronic Hepatitis C Patients Infected with Genotype 2 is Associated with Insulin Resistance, Hepatic Fibrosis and Affects Cumulative Positivity of Serum HCV RNA in Peginterferon and Ribavirin Combination Therapy. *Hepatol Res* 2011 Sep 26 [Epub ahead of print].
- 14 Nakajima T, Nakashima T, Yamaoka J, Shibuya A, Konishi E, Okada Y, Jo M, Nishikawa T, Itoh Y, Yoshikawa T. Greater age and hepatocellular aging are independent risk factors for hepatocellular carcinoma arising from non-B non-C non-alcoholic chronic liver disease. *Pathol Int* 61:572-576, 2011.
- 15 Fukui M, Senmaru T, Hasegawa G, Yamazaki M, Asano M, Kagami Y, Ishigami A, Marymyama N, Iwasa K, Kitawaki J, Itoh Y, Okanoue T, Ohta M, Obayashi H, Nakamura N. 17 beta-estradiol attenuates fatty acid diet-induced liver injury in ovariectomized mice by up-regulating hepatic senescence marker protein-30. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 Oct 19 [Epub ahead of print]
- 16 Fujii H, Itoh Y, Ohnishi N, sakamoto M, Ohkawara T, Sawa Y, Nishida K, Ohkawara Y, Yamaguchi K, Minami M, Okanoue T. Factors Associated with the Overall Survival of Elderly Patients with Hepatocellular Carcinoma. *World J Gastroenterol* (in press)
2. 学会発表
- 1 西村健、伊藤義人、横溝千尋、山口寛二、光吉博則、安居幸一郎、南祐仁、岩井眞樹、岡上武、吉川敏一。C型慢性肝炎における PEG-IFN/Ribavirin 併用療法と肝発癌。第 47 回日本肝臓学会総会 2011 年 6 月 2 日 (東京)。
- 2 西村健、伊藤義人、横溝千尋、山口寛二、光吉博則、安居幸一郎、南祐仁、岩井眞樹、岡上武、吉川敏一。C型慢性肝炎に対する PEG-IFN/Ribavirin 併用療法後の肝発癌関連因子の検討。第 15 回日本肝臓学会大会 2011 年 10 月 20 日 (福岡)
- 3 西村健、山口寛二、片山貴之、岡田頼久、光吉博則、安居幸一郎、南祐仁、岩井眞樹、岡上武、伊藤義人。C型慢性肝炎に対する PEG-IFN/Ribavirin 併用療法の副作用中止例の検討。第 39 回日本肝臓学会西部会 2011 年 12 月 9 日 (岡山)

G. 知的財産権の出願・登録状況
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）
分担研究報告書（平成 23 年度）

研究分担者 金子 周一 金沢大学大学院恒常性制御学 教授

分担研究課題：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

研究要旨：C 型慢性肝炎の治療抵抗性には様々な因子が関与し、肝線維化、脂肪化、インスリン抵抗性などの宿主因子が重要な働きを演じている。これまでに肝臓の栄養状態の低下により、mTOR シグナルが低下し、インターフェロンシグナルが抑制されることを報告した。今年度は、mTOR シグナルと並び重要な栄養調節因子である FoxO につき解析した。低栄養状態ではリン酸化 pFoxo3a が低下し、Foxo3a 総量の増加を認めた。Foxo3a の増加と比例して Socs3 の増加が認められた。Socs3 プロモーター領域には FoxO 結合領域が存在し、Foxo3a が Socs3 を転写レベルで上昇させていることを明らかにした。BCAA 投与により、Huh7.5 細胞では mTORC1 の活性化と Foxo3 の発現低下に伴う Socs3 の発現低下が誘導され、インターフェロンシグナルが活性化し、HCV の複製を濃度依存性に抑制した。

A. 研究目的

C 型慢性肝炎の治療抵抗性には様々な因子が関与している。近年 IL28B の遺伝子多型が Peg-IFN+Rib 併用療法の治療反応性を決定する重要な宿主因子であることが報告された。しかしながら、それ以外にも年齢、肝線維化、脂肪化、インスリン抵抗性などの宿主因子をはじめ、ISDR やコア領域変異を代表とするウイルス側因子も治療抵抗性に寄与していると考えられる。本研究では、特に肝臓の低栄養状態の観点からインターフェロン応答・不応答の解析を行った。

B. 研究方法

peg インترون+レボトル併用療法を行った 168 例を対象とし、全症例において、血中アミノグラム解析を行い各種臨床パラメーターと併せ解析した。95 症例において肝組織の遺伝子発現を affymetrix gene chip により解析した。Huh7 細胞及び HCV 感染クローン(G1a 由来)を用いて低アミノ酸状態における IFN シグナルを解析した。

C. 研究結果

168 例の治療効果の内訳は SVR70 例、TR55 例、NR43 例であった。多変量解析の結果、線維化進展 (Odds=5.91, p=0.0018)、IL28B マイナー (Odds=20.0, p<0.001)、肝組織 ISGs (Odds=4.60, p=0.021)、Fischer 比 (Odds=8.07, p=0.014)、ISDR 変異 (Odds=4.23, p=0.016) が有意因子として抽出された。Fischer 比の低下はインターフェロン治療抵抗性と有意に関連した因子であった。

培養細胞 Huh7 において低アミノ酸状態ではリン酸化

mTOR の発現低下、mTORC1 下流の pS6K の発現低下を認めると同時に pSTAT1 の発現低下が認められた。

一方、mTOR シグナルと並び重要な栄養調節因子である FoxO につき解析した。低栄養状態ではリン酸化 pFoxo3a が低下し、Foxo3a 総量の増加を認めた。Foxo3a の増加と比例して Socs3 の増加が認められた。Socs3 プロモーター領域には FoxO 結合領域が存在することから、Socs3 プロモーターに変異を導入したレポーターアッセイを行うと FoxO 結合領域変異により、Socs3 プロモーター活性が低下した。またクロマチン免疫沈降により Foxo3a が FoxO 結合領域を介して Socs3 プロモーター領域に結合していることを確認した。以上から、Foxo3a が Socs3 を転写レベルで上昇させていることを初めて明らかにした。BCAA 投与により、Huh7.5 細胞では mTORC1 の活性化と Foxo3 の発現低下に伴う Socs3 の発現低下が誘導され、インターフェロンシグナルが活性化し、HCV の複製を濃度依存性に抑制した。

D. 考察

C 型慢性肝炎の治療抵抗性には様々な因子が関与し、肝線維化、脂肪化、インスリン抵抗性などの宿主因子が重要な働きを演じている。なかでも肝線維化の進行に伴い治療抵抗性が増強することは、異なるゲノタイプでも共通して認められ、その機序に関して十分に解明されてこなかった。肝線維化の進行に伴う治療抵抗性のメカニズムには血流、薬物の delivery など様々な因子が関連する可能性があるが、今回、肝の栄養状態に注目して解析を行った。血中アミノグラムの解析から Fischer 比の低下が治療抵抗性と密接に関連することが明らかとなり、BCAA の低下が重要な因子であった。培養細胞を

用いた検討では低アミノ酸状態では mTOR シグナル及び下流の pS6K の発現低下を認めると同時に pSTAT1 の発現低下が認められた。本年度、新たに mTOR シグナルと並び重要な栄養調節因子である FoxO につき解析した。低栄養状態では Foxo3a 総量の増加を認め、比例して Socs3 の増加が認められた。Socs3 プロモーター領域には FoxO 結合領域が存在し、Foxo3a が Socs3 を転写レベルで上昇させていることを明らかにした。さらに、BCAA 投与により、Huh7.5 細胞では mTORC1 の活性化と Foxo3 の発現低下に伴う Socs3 の発現低下が誘導され、インターフェロンシグナルが活性化し、HCV の複製を濃度依存性に抑制した。このように、肝の栄養状態からもたらされるインターフェロンシグナルの変化が、治療成績と密接に関連しており、BCAA 投与を含めた栄養状態の改善によりインターフェロン応答の回復が認められる可能性を示した。

E. 結論

肝の低栄養状態では mTORC1 の低下、Foxo3-Socs3 の上昇を介したインターフェロン応答の低下が起こっており、BCAA 投与を含めた栄養状態の改善によりインターフェロン応答の回復が認められる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in association with hTERT is a potential biomarker for hepatocellular carcinoma

Mizuno H, Honda M, Shirasaki T, Yamashita T, Yamashita T, Mizukoshi E and Kaneko S

Liver International. 2012. in press

Induction of elastin expression in vascular endothelial cells relates to hepatoportal sclerosis in idiopathic portal hypertension: possible link to serum anti-endothelial cell antibodies.

Sato Y, Ren XS, Harada K, Sasaki M, Morikawa H, Shiomi S, Honda M, Kaneko S, Nakanuma Y.

Clin Exp Immunol. 2012;167(3):532-42

Identification of blood biomarkers of aging by transcript profiling of whole blood.

Nakamura S, Kawai K, Takeshita Y, Honda M, Takamura T, Kaneko S, Matoba R, Matsubara K.

Biochem Biophys Res Commun. 2012. [Epub ahead of print]

Randomized, Phase II Study Comparing Interferon Combined with Hepatic Arterial Infusion of Fluorouracil plus Cisplatin and Fluorouracil Alone in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma.

Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Terashima T, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S.

Oncology. 2011;81(5-6):281-290.

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

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 SI, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Enomoto N.

Hepatol Int. 2011 Aug 18. [Epub ahead of print]

Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C.

Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsushashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M.

Hum Mol Genet. 2011 Sep 1;20(17):3507-16.

Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma.

Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, Honda M, Kaneko S.

Hepatology. 2011 Apr;53(4):1206-16

Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C.

Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group.

Gastroenterology. 2011 Jul;141(1):128-40,

Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection.

Yamashita T, Honda M, Kaneko S

J Gastroenterol Hepatol. 2011 Jun;26(6):960-4.

Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors.

Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama 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.

J Hepatol. 2011 Mar;54(3):439-48

Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma.

Sunagozaka H, Honda M, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S.

Int J Cancer. 2011 Oct 1;129(7):1576-85. doi: 10.

2.学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

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

研究分担者 永野浩昭 大阪大学大学院 消化器外科学 准教授

研究要旨

HCV 陽性症例に対する肝移植後の HCV 肝炎再発に対して、ステロイドフリー免疫抑制法と術後早期から低用量より開始する preemptive インターフェロン+リバビリン療法 (Low dose interferon ribavirin (LDIR) therapy) の有効性を報告してきた。本年度は、上記症例のゲノム解析 (IL28B-SNIP) を施行することでステロイドフリー免疫抑制法と LDIR therapy の有効性との関係について検討した。その結果、ステロイドフリー免疫抑制法は早期の HCV 再発を抑制していたが、HCV に対する抗ウイルス療法の効果については、IL28B-SNIP の結果と有意に相関しており、プロトコールとの関係は明らかではなかった。

**A. 研究背景、目的
(背景)**

HCV 陽性症例に対する肝移植後の HCV 肝炎再発に対して、ステロイドフリー免疫抑制法と術後早期から低用量より開始する preemptive インターフェロン+リバビリン療法 (Low dose interferon ribavirin (LDIR) therapy) の有効性を報告してきた。本年度は、上記症例のゲノム解析 (IL28B-SNIP) を施行することでステロイドフリー免疫抑制法と LDIR therapy の有効性との関係について検討した。その結果、ステロイドフリー免疫抑制法は早期の HCV 再発を抑制していたが、HCV に対する抗ウイルス療法の効果については、IL28B-SNIP の結果と有意に相関しており、プロトコールとの関係は明らかではなかった。

B. 研究方法

1999 年より 2011 年の間に行われた成人間生体肝移植 123 例中、HCV 肝炎陽性 46 例のうちで、ABO 不適合肝移植症例、HBV との混合感染症例、ステロイドを術中 1g のみ使用した症例を除く 39 例を対象とした。免疫抑制剤はステロイドを全く使用しないステロイドフリー群 (F 群、n=28) とステロイドを漸減し 3 か月で終了するステロイド群 (S 群、n=11) を用いた。抗ウイルス治療は、可能な限り、術後肝機能が安定し次第速やかに低用量 (ペグインターフェロン α -2b 0.5 μ g/kg/week+ribavirin 400mg/day) より開始し、副作用に応じて増減

を行い、HCVRNA が陰性化してから 48 週間投与 (Low dose interferon ribavirin (LDIR) therapy) を施行した (n=22)。上記の 39 症例中 36 例について、ゲノム解析 (IL28B-遺伝子多型:SNIP) を施行した。HCV 肝炎再発の診断は、肝機能異常、HCVRNA 陽性、および組織学的に A2 あるいは F2 以上と定義した。

C. 研究結果

IL28B 遺伝子多型の結果については、TT:30 例、GT/GG:6 例で、83%が MAJOR であった。抗ウイルス療法の効果については、LDIR は IL28B 遺伝子多型の結果に有意に相関しており、抗 HCV 治療のプロトコールによる治療効果については明らかでなかった。その一方で、ステロイドフリー免疫抑制療法については、移植直後の HCV-RNA の上昇を抑制することで、早期の HCV 再発と FCH の発症を認めなかった。

D. 考察

肝移植後のウイルス治療効果にレシピエント IL28B 遺伝子多型が関与していた。また、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示唆された。さらに、Preemptive にウイルス治療を開始することで、肝線維化の進行を抑制することが可能であったが、IL28B 遺伝子多型の結果を考慮するとその意義については明らかではなかった。

E. 結論

ステロイドフリー免疫抑制法は早期のHCV再発を抑制していたが、HCVに対する抗ウイルス療法の効果については、IL28B-SNIPの結果と有意に相関しており、その意義については、今後の検討課題であると思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kim C, Aono S, Marubashi S, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Okumura N, Takao T, Doki Y, Mori M, Nagano H. Significance of Alanine Aminopeptidase N (APN) in Bile in the Diagnosis of Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation. *J Surg Res.* (in press)
2. Marubashi S, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Doki Y, Mori M. Donor hepatectomy for living donor liver transplantation: learning steps and surgical outcome. *Dig Dis Sci.* 2011; 56(8):2482-2490.
3. Marubashi S, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Clinical significance of alpha-fetoprotein mRNA in peripheral blood in liver resection for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2011; 18(8): 2200-2209.
4. Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Wada H, Takeda Y, Eguchi H, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Successful adult ABO incompatible living donor liver transplantation: Experience with double infusion through the hepatic artery and portal vein. *Hepatogastroenterol.* 2011; 58(106): 503-507.
5. Marubashi S, Dono K, Nagano H, Asaoka T, Hama N, Kobayashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Umeshita K, Monden M. Efficacy of Minimal Dosage of Calcineurin Inhibitor for Living Donor Liver Transplant Recipients with Preoperative Renal Dysfunction. *Hepatogastroenterol.* 2011; 58(106): 508-511.
6. Marubashi S, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M, Nagano H. Once-Daily Prolonged-Release Tacrolimus in De Novo Liver Transplantation: A Single Center Cohort Study. *Hepatogastroenterology.* 2011; 14(59): 115-116.
7. 永野浩昭, 丸橋 繁, 小林省吾, 和田浩志, 江口英利, 種村匡弘, 土岐祐一郎, 森 正樹. 脳死肝移植の現状と問題点—これからの脳死移植— *日消病誌*, 108(5): 2011

2. 学会発表

1. 永野浩昭, 丸橋 繁, 福澤正洋: 当院における脳死肝移植の経験とこれからの課題、第47回日本肝臓学会総会:2011.6.2-3 (東京)
2. 和田浩志, 竹原徹郎, 永野浩昭: 教室における肝移植後C型肝炎再発抑制の取り組み、第37回日本肝臓学会西部会肝移植後における肝疾患の再発と対策 2011.12.9-10(岡山)
3. 丸橋 繁, 永野浩昭, 森 正樹: 肝移植成績向上のための取り組みと将来展望、JDDW2011: 我が国の肝移植の現状と将来: 2011.10.20-23(福岡)
4. 丸橋 繁, 小林省吾, 和田浩志, 江口英利, 川本弘一, 種村匡弘, 梅下浩司, 土岐祐一郎, 森 正樹, 永野浩昭: 肝細胞癌に対する肝移植の適応条件、第47回日本肝癌研究会、肝細胞癌治療に対する肝移植の Responsibility: 2011.7.28-29 (静岡)
5. 丸橋 繁, 小林省吾, 和田浩志, 江口英利, 川本弘一, 種村匡弘, 梅下浩司, 土岐祐一郎, 森 正樹, 永野浩昭: 肝細胞癌に対する肝移植における工夫と成績、第47回日本肝癌研究会、肝細胞癌の肝移植: 2011.7.28-29(静岡)
6. 永野浩昭, 丸橋 繁, 小林省吾, 和田浩志, 江口英利, 種村匡弘, 川本弘一, 梅下浩司, 土岐祐一郎, 森 正樹, 小川 馨, 萩原邦子, 上野豪久, 近藤宏樹, 平松直樹, 竹原徹郎, 福澤正洋: 当院における脳死肝移植の経験とこれからの課題、第29回日本肝移植研究会、改正臓器移植法1年の総括—脳死肝移植の体制強化

に向けてー2011.7.22-23(仙台)

7. 小林省吾、丸橋 繁、和田浩志、江口英利、種村匡弘、梅下浩司、土岐祐一郎、森 正樹、永野浩昭:原発性胆汁性肝硬変に対する成人間生体肝移植の長期成績と再発治療に関する検討、第 29 回日本肝移植研究会 シンポジウム2 原疾患の差異により生じているわが国の肝移植の特殊性(PSC, PBC)2011.7.22-23(仙台)
8. 和田浩志、丸橋 繁、小林省吾、江口英利、川本弘一、種村匡弘、梅下浩司、土岐祐一郎、森 正樹、永野浩昭:原発性胆汁性肝硬変に対する成人間生体肝移植の長期成績と再発治療に関する検討、第 29 回日本肝移植研究会 シンポジウム3 移植後胆道狭窄に対する治療の長期成績、)2011.7.22-23(仙台)
9. 丸橋 繁、和田浩志、小林省吾、江口英利、種村匡弘、小川 馨、萩原邦子、梅下浩司、中川雄公、平松直樹、竹原徹郎、土岐祐一郎、森 正樹、永野浩昭:肝移植適応評価と周術期および長期 follow-up マネジメント効率化への取り組み、第 29 回日本肝移植研究会 シンポジウム4 理想的な肝移植チームの在り方:2011.7.22-23(仙台)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- 1.特許取得
特になし。
- 2.実用新案登録
特になし。
- 3.その他
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）
分担研究報告書

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

研究分担者 坂本 直哉 東京医科歯科大学・分子肝炎制御学講座 准教授

研究要旨：我々はC型肝炎難治症例の病態解明のため、HCV複製増殖に関連する遺伝子および分子間ネットワークの網羅的解析、およびHCVコア蛋白変異株培養系を用いた増殖動態、インターフェロン感受性の解析をおこない以下の知見を得た。(1) Core70/91変異HCV-JFH1クローンではウイルス蛋白の細胞内への蓄積傾向が見られ、インターフェロン応答性が低下していた。(3) PEG-IFN/RBV治療を行った患者を対象に血清IL-6レベルを測定したところ、C型肝炎患者では、健常者、他の慢性肝炎患者に比べ高値であった。今後他のインターフェロン抵抗株（1b型など）へ解析対象を広げ、インターフェロン抵抗性の分子機構などについて解析を進めるとともに、テラプレビル・インターフェロン・リバビリン併用療法についてもIL6と治療抵抗性の関連について検討を進める。

A. 研究目的

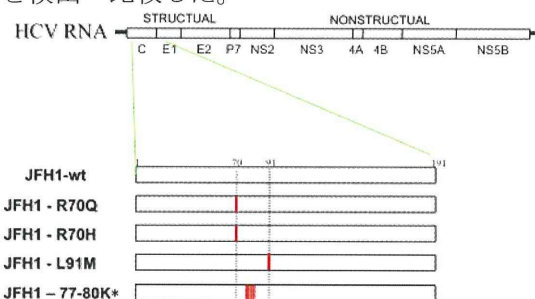
HCV感染に対して現在までにDAAを含めた多くの抗HCV薬の開発がさかんに行われているがIFNは今なお、抗HCV薬のkey drugである。しかしながら近年登場したテラプレビル(TPV)、ペグインターフェロン(IFN)とリバビリン(RBV)併用療法においてもIFN低感受性に起因する治療難治群が存在する。その為、現在IFN治療の成績を規定する因子のin-vitroにおける検討が必要である。

本研究で我々は、独自に開発したHCV培養増殖系を用い、抗ウイルス薬感受性に関わる宿主蛋白の探索・機能解析を進め、新たな抗ウイルス療法を開発することを目的として研究を遂行している。本年度我々は、(1)異なるHCV株間のIFN感受性の差異の発現機構、および(2) HCVコア領域のアミノ酸70番および91番変異のPEG-IFN・Ribavirin治療抵抗性発現の分子機構、およびコア70/91変異がHCV増殖・粒子形成・interferon(IFN)感受性に与える影響を検討した。(2) PEG-IFN+RBV療法を施行した患者献体を用いてIFN抵抗性のキー分子であるIL-6の血中レベルと臨床像、IFN治療成績との関連を検討した。

B. 研究方法

(1) HCV-JFH1プラスミドpJFH1full (HCV-wild)にin-vitro mutagenesisによりcore aa70 (R70Q, R70H)、aa91 (L91M)変異をそれぞれ導入した。合成HCV-RNAをHuh7細胞に導入し、培養上清中のコア抗原および

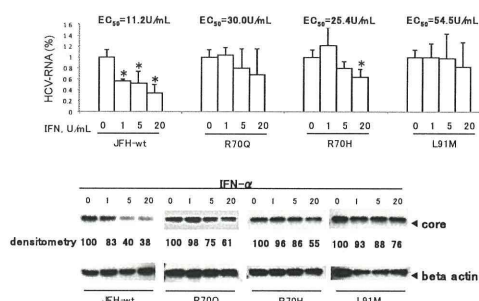
上清・細胞内のHCV-RNA・コア蛋白を測定した。HCV-core野生株、変異株をそれぞれ細胞に導入し、種々の濃度のIFN- α を添加しコア抗原およびHCV-RNAを測定した。また種々のインターフェロン誘導遺伝子(ISG)、SOCS、およびERストレス関連蛋白を検出・比較した。



(2) PEG-IFN/RBV治療を施行したgenotype 1b患者149例を対象に、治療前、治療中の血清IL-6レベルを測定し、治療成績との関連を解析した。

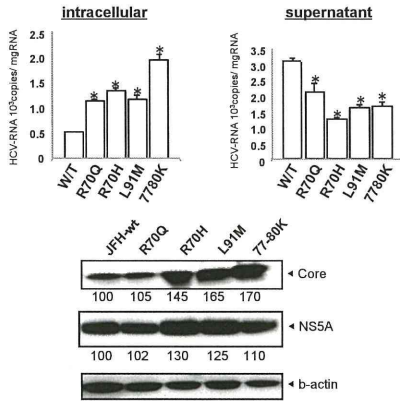
C. 研究結果

(1) HCV-core 変異株、HCV-R70Q, -R70H および-L91Mは、wild株にくらべIFNに対し抵抗性が認められた。

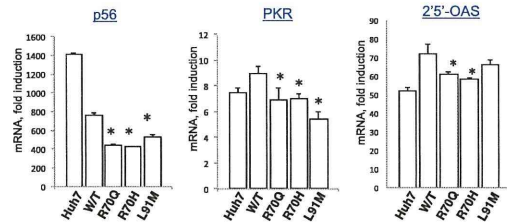


厚生労働科学研究費補助金（肝炎緊急対策研究事業）
分担研究報告書

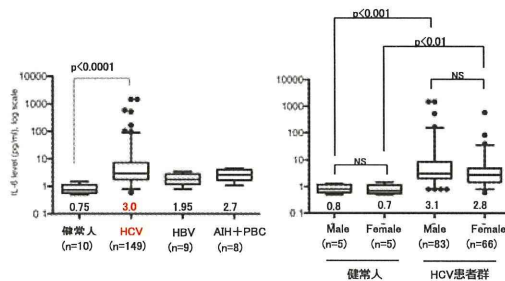
HCV-core 変異株、HCV-R70Q, -R70H および -L91M は、wild 株にくらべ細胞内 HCV-RNA レベルが高い一方で、上清中 HCV 蛋白は HCV-wild に比し低値であり、コア蛋白が細胞内に蓄積する傾向が認められた。



Core 変異株では IFN 抵抗性が認められ、IFN 伝達経路の抑制因子である SOCS-1, SOCS-3 の発現が野生株に比べて増強しており、25-AS や MXA などの ISG は変異株で低下していた。



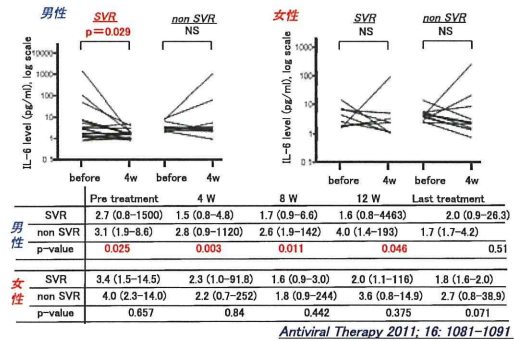
(3) PEG-IFN/RBV 治療を行った患者を対象に血清 IL-6 レベルを測定したところ、C 型肝炎患者では、健常人、他の慢性肝疾患患者に比べ高値であった。



IFN 治療経過中の IL-6 の推移を治療効果別に検討したところ、男性では、治療が効いた群では速やかに IL-6 が低下し、低値のまま推移するのに対して、治療抵抗群である nonSVR 群では IL-6 は持続高値で経過しており、IL-6 高値により IFN 抵抗性がもた

らされるという in vitro の実験結果と一致する結果であった。

治療効果別の治療開始後血清IL-6値の推移



D. 考察

HCV 感染においては、IL6 の産生亢進が起こり SOCS2 を介しインターフェロン低感受性を引き起こすと考えられる。

Core70/91 アミノ酸変異等を導入した HCV 培養系を用いた解析により、C70/91 変異株は細胞内増殖レベルに比し粒子分泌が低下しており、ウイルス蛋白の蓄積傾向が見られた。C70/91 変異株では SOCS1/3 などの高発現とともにリン酸化 STAT1/2 を始めとしたインターフェロン応答能が低下しており、ウイルスの特定領域のアミノ酸変異がインターフェロン不応性を来り、その機序に ER ストレスや IFN 伝達経路の抑制因子が関与している可能性が考えられた。

C 型肝炎患者の血清 IL-6 値は、健常人および他の慢性肝疾患と比して有意に高値であった。インターフェロン治療前および治療後早期の血清 IL-6 値は男性における治療効果と有意に関連した。

E. 今後の研究課題

他のインターフェロン抵抗株 (1b型など) へ解析対象を広げ、in-vitro および in-vivo における増殖能、インターフェロン抵抗性の分子機構などについて解析を進めるとともに、テラプレビル・インターフェロン・リバビリン併用療法についても IL6 と治療抵抗性の関連について検討を進める。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎緊急対策研究事業）
分担研究報告書

F. 研究発表

論文発表

1. Kaushik-Basu N, Sakamoto N: Inhibition of hepatitis C virus NS5B polymerase by S-trityl-L-cysteine derivatives. *Eur J Med Chem* 2012; in press.
2. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Yatsuhashi H, Izumi N: Age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among early virological responders to peg-interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. *Antivir Ther* 2011; in press.
3. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M: Identification of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agent Chemother*; 2011 Epub ahead of Print.
4. 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 Analysis of Hepatocellular Carcinoma Risk Predictors in Chronic Hepatitis C. *J Hepatol* 2011; Epub ahead of Print
5. Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S, Sakamoto N, Izumi N: Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in IL28B with antiviral response. *Hepatology* 2011; 55(1):20-29.
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 hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatol Int* 2011; 5(3):789-799.
7. Yoshida T, Takayama K, Kondoh M, Sakurai F, Tani H, Sakamoto N, Matsuura Y, Mizuguchi H, Yagi K: Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 416(1-2):119-124.
8. Takaya D, Yamashita A, Kamijo K, Gomi J, Ito M, Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Watanabe Y, Arai R, Umeyama H, Honma T, Matsumoto T, Yokoyama S: A new method for induced fit docking (GENIUS) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2011; 19(22):6892-6905.
9. Ueyama M, Nakagawa M, Sakamoto N, Onozuka I, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, et al: Serum interleukin-6 levels correlate with resistance to treatment of chronic hepatitis C infection with pegylated-interferon-alpha2b plus ribavirin. *Antivir Ther* 2011;16(7):1081-1091.
10. Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M: Genome-wide association study identified ITPA/DDRGG1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Human Molecular Genetics* 2011; 20(17):3507-3516.
11. Hiramatsu N, Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Sugauchi F, Tamori A, Kakinuma S, Matsuura K, and Izumi N: Pretreatment Prediction of Anemia Progression by Peginterferon Plus Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C: Decision-Tree Analysis. *J Gastroenterol* 2011; 46 (9): 1111-1119.
12. 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.

厚生労働科学研究費補助金（肝炎緊急対策研究事業）
分担研究報告書

13. Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Yatsushashi H, Izumi N: Pretreatment prediction of response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C using data mining analysis. *J Gastroenterol* 2011; 46(3):401-409.
14. Yoshida T, Kondoh M, Ojima M, Mizuguchi H, Yamagishi Y, Sakamoto N, Yagi K: Adenovirus vector-mediated assay system for hepatitis C virus replication. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(10):e64.
15. Funaoka Y, Sakamoto N, Suda G, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe T, Mishima K, Ueyama M, Onozuka I, Nitta S, Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Watanabe M: Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. *J Virol* 2011; 85(12):5986-5994.
16. Watanabe T, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Itsui Y, Nishimura-Sakurai Y, Ueyama M, Funaoka Y, Kitazume A, Nitta S, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Oooka S, Watanabe M: Inhibitory effect of a triterpenoid compound, with or without alpha interferon, on hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(6):2537-2545.
17. Yamamoto M, Sakamoto N, Nakamura T, Itsui Y, Nakagawa M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Azuma S, Tsuchiya K, Kato T, Wakita T, Watanabe M: Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatol Res* 2011;41:258-269.
18. Toyoda M, Kitaoka A, Machida K, Nishinakagawa T, Yada R, Kohjima M, Kato M, Kotoh K, Sakamoto N, Shiota G, Nakamuta M, Nakashima M, Enjoji M: Association between lipid accumulation and the cannabinoid system in Huh7 cells expressing HCV genes. *Int J Mol Med* 2011;27:619-624.
19. Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Yuki NS, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M: Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b. *J Med Virol* 2011;83:871-878.
20. Onozuka I, Kakinuma S, Kamiya A, Miyoshi M, Sakamoto N, Kiyohashi K, Watanabe T, Funaoka Y, Ueyama M, Nakagawa M, Koshikawa N, Seiki M, Nakauchi H, Watanabe M: Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;406:134-140
21. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama 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.
22. Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Tamori A, Nakagawa M, Izumi N: Sequences in the interferon 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* 2011;83:445-452.

総説

1. 坂本直哉：インターロイキン 28-29（IL-28・IL-29）-インターフェロンλ。臨床免疫・アレルギー科特集：サイトカインのすべて 2011 in press.
2. 坂本直哉：海外における DAA 開発臨床試験：最近の動向。化学療法 2011; 63: 1112-1118, 2011. 12. 1 発行.
3. 坂本直哉：海外における DAA 開発臨床試験：最近の動向。肝胆膵 2011; 63: 1112-1118, 2011. 12. 1 発行.
4. 須田剛生、坂本直哉：インターフェロン治療抵抗性に関わるサイトカイン。ネットワーク 肝胆膵 2011; 63: 1112-1118, 2011. 12. 1 発行

厚生労働科学研究費補助金（肝炎緊急対策研究事業）
分担研究報告書

5. 藤田めぐみ、加藤孝宣、坂本直哉：HCVによる自然免疫系の抑制機構：NS3、NS4B. 肝胆膵 2011；63：1 107-1111, 2011. 12. 1 発行.
6. 箆島裕子、中川美奈、坂本直哉：HCVの複製・増殖機構と遺伝子型・遺伝子変異. 日本臨床 2011；69：52-58.
7. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守：シクロフィリン阻害剤. 肝胆膵 2011；62：403-412.
8. 坂本直哉：STAT-C 多剤併用療法：脱インターフェロン治療なるか？ 肝胆膵 2011；62：421-426.

学会発表

1. Sakamoto N, Tanaka Y, Nakagawa M, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Enomoto N, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Nishida N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M: ITPA gene variant protects against treatment-induced anemia and improves viral clearance by pegylated interferon-alfa and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #1016)
2. Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nakauchi H, Watanabe M: MMP-2 and MMP-14 derived from donor cells enhance therapeutic efficacy of liver cell transplantation in mice. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #670)
3. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Yamamoto M, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyohashi K, Nitta S, Murakawa M, Hagiwara M, Watanabe M: A high-content screening assay using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus reveals candidates for small molecule inhibitors of viral entry. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #383)
4. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nakauchi H, Watanabe M: Loww of Wnt5A promotes biliary differentiation of murine hepatic stem/progenitor cells. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Oral presentation #176)
5. Itsui Y, Sakamoto N, Yauchi T, Watanabe M: Antiviral effect of a novel interferon-inducible protein, IFI-27, against hepatitis C virus replication. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #2086)
6. Suda G, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Azuma S, Kakinuma S, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Watanabe M: IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #2040)
7. Kurosaki M, Itakura J, Yasui Y, Tsuchiya K, Nakanishi H, Takahashi Y, Asahina Y, Tanaka Y, Mizokami M, Sakamoto N, Enomoto N, Izumi N: Prediction model of ribavirin-induced anemia incorporating ITPA genotype could identify chronic hepatitis C patients at high risk of relapse among virological responders to pegylated-interferon and ribavirin. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #982)
8. Matsuura K, Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Watanabe T, Sugauchi F, Kurosaki M, Izumi N, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Hino K, Kaneko S, Nojiri S, Joh T, Tokunaga K, Mizokami M: IL28B and ITPA gene variants correlate with treatment efficacy in pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #994)
9. Kurosaki M, Sakamoto N, Matsuura K, Kakinuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Enomoto N, Izumi N: Mutations in the interferon sensitivity determining region of HCV, age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among

厚生労働科学研究費補助金（肝炎緊急対策研究事業）
分担研究報告書

- early virological responders to
peg-interferon plus ribavirin therapy. 62th.
Annual Meeting of American Association
for the Study of Liver Diseases,
Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster
#995)
10. Takeshi Yoshida, Fumi Satoh, Watari
Akihiro, Masuo Kondoh, Hiroyuki
Mizuguchi, Naoya Sakamoto, Kiyohito
Yagi: Development of an RNA
polymerase I-driven adenoviral vector
and its application in an HCV replication
assay. 18th. International Meeting on
Hepatitis C Virus & Related Viruses.
Sep-8-2011, Seattle, WA.
11. Naoya Sakamoto, Yusuke Funaoka, Goki
Suda, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma,
Mamoru Watanabe: Analysis of interferon
signaling by infectious hepatitis C virus
clones with substitutions of core amino
acids 70 and 91. 18th. International
Meeting on Hepatitis C Virus & Related
Viruses. Sep-8-2011, Seattle, WA.
12. Sayuri Nitta, Naoya Sakamoto, Megumi
Tasaka-Fujita, Kei Kiyohashi, Akiko
Kusano-Kitazume, Miyako Murakawa,
Kouhei Yoshino, Kako Mishima, Sei
Kakinuma, Mina Nakagawa, Mamoru
Watanabe: HCV-NS4B targets STING
and abrogates RIG-I-mediated type-I
interferon- dependent innate immune
response. 18th. International Meeting on
Hepatitis C Virus & Related Viruses.
Sep-8-2011, Seattle, WA.
13. Yoshiaki Yamagishi, Takeshi Yoshida,
Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi,
Naoya Sakamoto, Akihiro Watari,
Kiyohito Yagi: Development of RNA
pol-driven adenovirus vector expressing
hepatitis C virus replicon. Experimental
Biology 2011, Apr-13-2011, Washington,
DC.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 出願番号：特願 2011-194082
- 発明の名称：C型肝炎ウイルスの
増殖を抑制する医薬組成物
- 発明者：坂本直哉、渡辺守、北詰晶子、
萩原正敏、奥野友紀子
- 特許出願人：東京医科歯科大学
- 提出日：平成 23 年 9 月 6 日

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）

(H23年度) 研究報告書

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

研究分担者 芥田憲夫 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院肝臓センター 医員

研究要旨：前治療無効例に対する PEG-IFN/RBV/Telaprevir(TVR)併用の治療成績改善を目指して、PEG-IFN/RBV 延長投与が有効な可能性のある ETR(治療終了時点の RNA 陰性)に影響する要因を検討した。ETR は 60%で、AFP 低値(<10 μ g/l)と前治療反応性(partial response)が ETR に寄与する要因であった。AFP 低値かつ partial response では ETR が 88%で延長投与が有効な対象群と思われるが、AFP 高値(\geq 10 μ g/l)から ETR 例は確認されなかった。Non ETR 例からは既報の TVR 耐性ウイルスが確認された。更に、TVR 1,500mg/日(減量群)と 2,250mg/日(通常群)における経時的な Hb・RNA 減少量を比較した。減量群は Hb 減少を緩やかにし、12 週間以内のウイルス動態にも差を認めなかった。また、減量群は貧血脱落が懸念される症例や肝組織進行例でも治療導入が可能であり、2 週間以内の早期ウイルス動態にも影響しなかった。TVR 減量群の最終的な治療成績は今後の検討課題である。

A. 研究目的

PEG-IFN/RBV/Telaprevir(TVR)併用療法は高率な SVR が期待される反面、前治療無効例の SVR は依然 30%台に留まっている。更に、副作用面では貧血に伴う治療中止を防ぐ必要がある。今回は、前治療無効例の治療成績改善を目指して、PEG-IFN/RBV 延長投与が有効な症例の判別を行った。また、貧血対策として TVR 減量投与の有効性を検討した。

B. 研究方法

[検討 1]臨床治験で、当院の前治療無効例に対して PEG-IFN α 2b/RBV/TVR(初期 12 週間は PEG-IFN/RBV/TVR の 3 剤併用投与し、その後の 12 週間は PEG-IFN/RBV の 2 剤併用投与)を施行された HCV genotype 1 の 15 例(1a 1 例, 1b 14 例)を対象として PEG-IFN/RBV 延長投与が有効な可能性のある ETR(治療終了時点の RNA 陰性)予測因子を検討した。治療効果予測因子として *IL28B* rs8099917, Core aa70 置換, AFP 値, 前治療反応性を検討した。Core aa70 や NS3 の V36, T54, R155, A156(既報の TVR 耐性ウイルス)はダイレクトシーケンシング法でアミノ酸配列を決定した。

[検討 2]製造承認後に当院で PEG-IFN/RBV/TVR を導入された 30 例も含めて、TVR 1,500mg/日(減量群)と 2,250mg/日(通常群)における経時的な Hb 減少量と RNA 減少量を比較検討した。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報等の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した(新 GCP に遵守)。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

C. 研究結果

[検討 1]前治療無効例の ETR は 60%。ETR に寄与する要因は、単変量解析(Chi-squared test)で AFP 低値(<10 μ g/l)($P=0.011$)、前治療反応性(partial response; RNA 量が 2 log 以上低下した無効例)($P=0.041$)が有意差を示した。AFP 値に前治療反応性を組み合わせて ETR 率を検討すると、AFP 低値かつ前治療 partial response の症例では ETR が 88%であった。一方、AFP 高値(\geq 10 μ g/l)の症例では ETR 例は確認されなかった。Non ETR の 6 例からは何れも TVR 耐性ウイルス(V36A/M, T54A/S, R155K, A156S/T)が確認された。

[検討 2]TVR 投与量別に 12 週間以内の Hb 減少量を経時的に比較すると、通常群よりも減量群で Hb 減少量を緩やかに抑えることが出来た。特に、8 週経過時点で通常群(-4.1 g/dl)よりも減量群(-3.2 g/dl)で Hb 減少が軽い傾向を認めた(Mann-Whitney U test)($P=0.055$)。TVR 投与量別に 12 週間以内の RNA 減少量や RNA 陰性化率(TaqMan HCV;検出せず)を経時的に比較すると、通常群と減量群との間で有意差を認めなかった。更に、貧血脱落が懸念される症例(女性・Hb14 g/dl 未満・60 歳以上・*ITPA* rs127354 CC)、肝組織進行例(血小板 15 万以下・albumin 3.9 g/dl 未満・Fibroscan 10kPa 以上・APRI 1.5 以上)、難治例(*IL28B* non-TT かつ Core aa70 Mutant)においても通常群と減量群の間で 2 週間以内の早期ウイルス動態に有意差を認めなかった。

D. 考察

前治療無効例に対する PEG-IFN/RBV/TVR 併用療法の治療成績を改善させるためには PEG-IFN/RBV 併用療法延長投与が有効な症例を判別することが重要である。今回の検討から、延長投与が有効な可能性のある ETR