

症例の治療前予測因子として AFP 値と前治療反応性が重要であることが分かった。特に、高率な ETR が予測される AFP 低値の partial response 症例は延長投与で SVR 率を改善出来る可能性が高いが、逆に AFP 高値の症例は ETR を期待出来る可能性が低く難治な症例であると同時に TVR 耐性ウイルス出現の可能性も高く次世代の治療が期待される対象と言える。

TVR 投与量に関しては、減量群で Hb 減少を軽くすることが出来るだけでなく、12 週経過時点までのウイルス動態にも差を認めないことが確認された。これは貧血脱落が懸念される症例には安全性の観点から TVR を減量して開始することも一つの選択肢になり得ることを示している。今後は TVR 減量群の最終的な SVR 率についても検討していく必要が有る。

E. 結論

[検討 1] 前治療無効例の ETR 予測に AFP・前治療反応性の組み合わせが有用である。AFP 低値の partial response は PEG-IFN/RBV 併用療法の治療期間延長で効果改善が期待されるが、AFP 高値は TVR 耐性の出現に注意を要する。

[検討 2] 日本人に対する TVR1,500mg/日の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、早期ウイルス動態にも影響しなかった。最終的な治療成績は今後の検討課題である。

F. 健康危険情報

今回の研究内容については特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in hepatitis C virus core region predict hepatocarcinogenesis following eradication of HCV RNA by antiviral therapy. J Med Virol 2011;83:1016-22.

2) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y, Kumada H. Amino acid substitution in HCV core region and genetic variation near the IL28B gene affect viral dynamics during telaprevir, peginterferon and ribavirin treatment. Intervirology. 2011 Feb 16. [Epub ahead of print]

3) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y, Kumada H. Amino acid substitution in HCV core/NS5A

region and genetic variation near IL28B gene affect treatment efficacy to interferon plus ribavirin combination therapy. Intervirology. 2011 Jul 5. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1) Akuta N. Amino acid substitution in the hepatitis C virus core region of genotype 1b are the important predictor of telaprevir with peginterferon plus ribavirin, and hepatocarcinogenesis. The 62th annual meeting of the American association for the study of liver disease, 2011. CA, USA.

H. 知的所有権の取得状況

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）
平成 23 年度 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
研究分担報告書

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

研究分担者 野村秀幸 国家公務員共済組合連合会 新小倉病院 診療部長

研究要旨：HCV 陽性肝硬変症における脾臓摘出は末梢での T 細胞反応性を回復させた。このとき T 細胞での疲弊化が脾臓摘出によって回復していた。従って、脾臓での疲弊化を増強させるリガンドが脾摘によって消失したことが、T 細胞反応性回復の一因と考えられた。

共同研究者
下田慎治 九州大学医学部修復内科学

A. 研究目的

昨年、一昨年度の研究で、HCV 陽性肝硬変症脾臓での CD4 陽性 T 細胞では細胞増殖能、IFN- γ 産生量が低値であることが明らかとなった。この理由としては、抑制性の副刺激分子である CTLA-4、疲弊化 T 細胞の表面マーカーである PD-1 の有意な発現亢進があった。また、HCV 陽性肝硬変症脾臓では、単核球において PD1-ligand の発現が亢進しており、免疫組織化学染色においては、特に PD-L2 の発現亢進を認めることが明らかとなった。そこで本年度は HCV 陽性肝硬変症に対する脾臓摘出術が CD4+T 細胞応答に与える影響の検討を行うこととした。

B. 研究方法

1.非特異的刺激下の CD4+T 細胞の反応性の変化の検討。

HCV 陽性肝硬変症患者で、脾臓摘出術を施行した 11 症例より術後 1-2 か月後(IFN 治療開始前)の単核球を採取し CD4+T 細胞を抽出した。10 μ g/ml の CD3 に対するモノクローナル抗体をコーティングした 96 穴プレートに、各々 1×10^5 個/穴の CD4+T 細胞を、10 単位/ml の IL-2 存在下に 5 日間培養後、培養上清を回収し ELISA にてサイトカイン(IFN- γ 、IL-10)を測定した。また、細胞はトリチウムチミジンパルスし、細胞増殖能を測定した。

2.CD4+T 細胞における副刺激分子発現の変化の検討。

HCV 陽性肝硬変症患者で、脾臓摘出術を施行した 11 症例より術後 1-2 か月後(IFN 治療開始前)の単核球を採取した。フローサイトメトリーにて、HCV 陽性肝硬変症脾臓での発現亢進を認めた CTLA-4、PD-1 の発現を脾臓摘出後に検討した。倫理面への配慮
個人情報保護をはじめ、全ての研究計画を九州

大学倫理委員会での承認後に執り行った。

C. 研究結果

HCV 陽性肝硬変症例においては、脾臓摘出後に CD4+T 細胞の非特異的刺激下での IFN- γ 産生量が有意に回復した。HCV 陽性肝硬変症患者での脾臓摘出後には、CD4+T 細胞における PD-1 の発現が優位に低下していた。

D. 考察

肝硬変脾臓は疲弊化 T 細胞の表面マーカーである PD-1 のリガンド発現が亢進しているために、脾臓摘出によりリガンド刺激がなくなった T 細胞の疲弊化が解除されることが考えられた。

E. 結論

HCV 陽性肝硬変症患者において問題となる末梢免疫寛容は、脾臓での PD-1/PD-1 ligand の過剰発現により部分的に誘導されており、脾摘にはこの免疫寛容を解除する機能があることが示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1)Matsuura K, Tanaka Y, Kusakabe A, Hige S, Inoue J, Komatsu M, Kuramitsu T, Hirano K, Ohno T, Hasegawa I, Kobashi H, Hino K, Hiasa Y, Nomura H, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. Recommendation of lamivudine-to-entecavir switching treatment in chronic hepatitis B responders: Randomized controlled trial. Hepatol Res. 41: 505-511, 2011.

2)Ito K, Higami K, Masaki N, Sugiyama M, Mukaide M, Saito H, Aoki Y, Sato Y, Imamura M, Murata K, Nomura H, Hige S, Adachi H, Hino K, Yatsushashi H, Orito E, Kani S, Tanaka Y, Mizokami M. The rs8099917

- polymorphism, when determined by a suitable genotyping method, is a better predictor for response to pegylated alpha interferon/ribavirin therapy in Japanese patients than other single nucleotide polymorphisms associated with interleukin-28B. *J Clin Microbiol.* 49: 1853-1860, 2011.
- 3) Chayama K, Hayes CN, Yoshioka K, Moriwaki H, Okanoue T, Sakisaka S, Takehara T, Oketani M, Toyota J, Izumi N, Hiasa Y, Matsumoto A, Nomura H, Seike M, Ueno Y, Yotsuyanagi H, Kumada H. Factors predictive of sustained virological response following 72 weeks of combination therapy for genotype 1b hepatitis C. *J Gastroenterol.* 46: 545-555, 2011.
- 4) Kainuma M, Furusyo N, Azuma K, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Shimoda S, Hayashi J; the Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. Pegylated interferon α -2b plus ribavirin for Japanese chronic hepatitis C patients with normal alanine aminotransferase. *Hepatol Res.* 42: 33-41, 2011.
- 5) Ogawa E, Furusyo N, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Dohmen K, Shimoda S, Hayashi J; The Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. An evaluation of the adverse effect of premature discontinuation of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin treatment for chronic hepatitis C virus infection: Results from Kyushu University Liver Disease Study (KULDS). *J Gastroenterol Hepatol.* 18: , 2011.
- 6) Nomura H, Miyagi Y, Tanimoto H, Yamashita N, Oohashi S, Nishiura S. Occurrence of clinical depression during combination therapy with pegylated interferon alpha or natural human interferon beta plus ribavirin *Hepatol Res.* : 42(3), 2012.
- 7) Tsuda M, Ambrosini YM, Zhang W, Yang GX, Ando Y, Rong G, Tsuneyama K, Sumida K, Shimoda S, Bowlus CL, Leung PS, He XS, Coppel RL, Ansari AA, Lian ZX, Gershwin ME. Fine phenotypic and functional characterization of effector cluster of differentiation 8 positive T cells in human patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 54:1293-302, 2011.
- 8) Hashimoto N, Shimoda S, Kawanaka H, Tsuneyama K, Uehara H, Akahoshi T, Kinjo N, Taketomi A, Shirabe K, Akashi K, Lleo A, Ansari AA, Gershwin ME, Maehara Y. Modulation of CD4⁺ T cell responses following splenectomy in hepatitis C virus-related liver cirrhosis. *Clin Exp Immunol.* 165:243-50, 2011.
- 9) Shimoda S, Harada K, Niuro H, Shirabe K, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Nakanuma Y, Leung P, Ansari AA, Gershwin ME, Akashi K. Interaction between Toll-like receptors and natural killer cells in the destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 53:1270-81, 2011.
- 10) Ishibashi H, Komori A, Shimoda S, Ambrosini YM, Gershwin ME, Nakamura M. Risk factors and prediction of long-term outcome in primary biliary cirrhosis. *Intern Med.* 50:1-10, 2011.
- 11) Chen Y, Guo G, Guo S, Shimoda S, Shroyer KR, Tang Y, Wu Y. Intracellular b7-h4 suppresses bile duct epithelial cell apoptosis in human primary biliary cirrhosis. *Inflammation.* 34:688-97, 2011.
- 12) Harada K, Shimoda S, Ikeda H, Chiba M, Hsu M, Sato Y, Kobayashi M, Ren XS, Ohta H, Kasashima S, Kawashima A, Nakanuma Y. Significance of periductal Langerhans cells and biliary epithelial cell-derived macrophage inflammatory protein-3 α in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Liver Int.* 31:245-53, 2011.
- 13) Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis: apotopes and epitopes. *Lleo A, J Gastroenterol.* 46 Suppl 1:29-38, 2011.
2. 学会発表
- 1) Doumen K, Kawano A, Takahashi K, Shigematsu H, Tanaka H, Haruno M, Yanagita K, Ichiki Y, Mori T, Hayashida K, Shimoda S, Ishibashi H, Nomura H. :The incidence and risk factors for the development of hepatocellular carcinoma after peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *AASLD(San Francisco)* 2011.11.
- 2) Nakamuta M, Yoshimoto T, Kohjima M, Fukushima N, Fukuizumi K, Tada S, Higashi N, Kawabe K, Mizutani T, Harada N, Dohmen N, Nomura N, Enjoji M. :Add-on lipid modulators (statin and EPA) for peg-IFN and RBV increases SVR particularly in HCV patients with intractable IL-28B rs8099917 TG/GG allele. *AASLD(San Francisco)* 2011.11.
- 3) Yoshimoto T, Kohjima M, Fukushima N, Fukuizumi K, Tada S, Higashi N, Kawabe K, Mizutani T, Harada N, Dohmen K, Nomura H, Enjoji M, Nakamuta N. :Role of Iron Metabolism during Treatment for Chronic Hepatitis C: Importance of Hepcidin

Expression and Its Regulations. AASLD(San Francisco)2011.11.

H. 知的財産権の出願・登録状況
今回の研究内容については特になし。

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

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

研究分担者： 林 紀夫
独立行政法人労働者健康福祉機構関西労災病院・病院長

研究要旨：C 型慢性肝炎において抗ウイルス治療が難治抵抗性となるメカニズムの解明には、宿主側因子として、免疫担当細胞におけるシグナル伝達や遺伝子発現について包括的に理解する必要がある。C 型慢性肝炎患者では、ウイルス排除に重要な役割を果たす NK 細胞において IFN- α シグナル伝達に変調をきたしていることを我々はこれまでに報告した。NK 細胞は二つのサブセット、すなわち、CD56^{bright}と CD56^{dim}とからなり、前者はサイトカイン分泌能に、後者は細胞傷害活性能に偏向した機能を有することが報告されている。これら NK 細胞サブセットにおける IFN により伝達されるシグナルや遺伝子発現について解析することにより、C 型慢性肝炎における治療抵抗性メカニズムを解明することとした。

本年度以下のことが明らかになった。細胞内 STAT1 発現量は、CD56^{bright}、CD56^{dim}いずれのサブセットにおいても、感染患者で健常者に比して有意に高く、CD56^{dim} サブセットで顕著であった。*in vitro*での IFN- α 刺激で誘導されるリン酸化 STAT の程度が、CD56^{bright}サブセットでは、サイトカイン分泌に必要な STAT4 リン酸化が有意に減弱し、CD56^{dim}サブセットでは、細胞傷害に必要な STAT1 リン酸化が有意に増強していた。

C 型慢性肝炎において、機能的に異なる特徴を有する二つの NK 細胞サブセット、すなわち、CD56^{bright}サブセットと CD56^{dim}サブセットとの間で異なった違いがあることが見出された。これらの違いが、C 型慢性肝炎における病態や抗ウイルス治療抵抗性メカニズムに関与している可能性が示唆された。

共同研究者

宮城琢也 大阪大学消化器内科学 助教

び抗ウイルス治療に対する抵抗性メカニズムの解明には、宿主側因子として、免疫担当細胞における表現形やシグナル伝達について包括的に理解する必要がある。ウイルス感染に対する免疫応答において重要な役

A. 研究目的

C 型肝炎における慢性化の成立機序およ

割を果たす NK 細胞は二つのサブセット、CD56^{bright} と CD56^{dim} とから成り、前者はサイトカイン分泌能に、後者は細胞傷害活性能に偏向した機能を有する。今回我々は、これらサブセットの頻度、表現形やサイトカイン応答性について解析することにより、C 型肝炎慢性化成立の機序や治療抵抗性メカニズムを解明することとした。

B. 研究方法

C 型慢性肝炎患者（遺伝子型 1 型、高ウイルス量）を対象とし、末梢血単核球を単離した。対照として健常者由来の末梢血単核球を用いた。細胞表面マーカーとして CD56、CD3 により NK 細胞をサブセット毎に区別し、IFN- α によって伝達される細胞内シグナルを phospho-STAT1(pSTAT1)、pSTAT4 の発現量で FACS 解析にて評価した。

C. 研究成果

(1) CD56^{dim} サブセットの頻度が、感染患者で健常者に比し有意に低かった。(2) NK 細胞活性化レセプターである NKG2D の発現が CD56^{bright}、CD56^{dim} 両サブセットにおいて、感染患者で健常者に比し有意に低かった。また、抑制性レセプターである NKG2A/CD94 の発現は、CD56^{bright} サブセットにおいて、感染患者で健常者に比し有意に高かった。(3) 細胞内 STAT1 発現量が、CD56^{bright}、CD56^{dim} 両サブセットにおいて、感染患者で健常者に比し有意に高く、CD56^{dim} サブセットで顕著であった。(4) *in vitro* での IFN- α 刺激で誘導される STAT リン酸化の程度が、感染患者で健常者に比し、CD56^{bright} サブセットでは、サイトカイン分

泌に必要な STAT4 リン酸化が有意に減弱し、CD56^{dim} サブセットでは、細胞傷害に必要な STAT1 リン酸化が有意に増強していた。

D. 考察と結論

NK 細胞サブセット別の解析結果から、サブセットによって病態への関与が異なる可能性が示唆された。

CD56^{dim} と CD56^{bright} とのいずれのサブセットにおいても細胞内の STAT1 発現量が有意に増大していた。STAT1 は IFN によって発現が誘導される Interferon-stimulated gene (ISG) の一つであることから、HCV 感染に伴って、感染肝細胞や形質細胞様樹状細胞から分泌される内因性の IFN によって誘導されたものと考えられる。

CD56^{dim} における STAT1 リン酸化経路の増強が細胞傷害活性因子の発現増大を介して肝細胞傷害と関連しているものと考えられる。CD56^{bright} における STAT4 リン酸化経路の減弱が IFN- γ の産生低下を介して効果的な適応免疫の誘導減弱に関連しているものと考えられる。

NK 細胞サブセットによって、C 型肝炎ウイルス感染症における慢性化成立や治療抵抗性メカニズムへの関与が異なっている可能性が示唆された。

E. 研究発表

論文発表

1. Kohga K, Tatsumi T, Tsunematsu H, Aono S, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Yamamoto M, Oze T, Aketa H, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, and Takehara T. Interleukin-1 β

- enhances the production of soluble MICA in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, in press.
2. Kurokawa M, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Miyazaki M, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Ishida H, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Iio S, Doi Y, Yamada A, Oshita M, Kaneko A, Mochizuki K, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Katayama K, Yoshihara H, Imai Y, Hayashi E, Hayashi N, and Takehara T. Long-term effect of lamivudine treatment on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol*, in press.
 3. Oze T, Hiramatsu N, Song C, Yakushijin T, Iio S, Doi Y, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Hijioka T, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Hayashi E, Kato M, Miyazaki M, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Hayashi N, and Takehara T. Reducing Peg-IFN doses causes later virologic response or no response in HCV genotype 1 patients treated with Peg-IFN alfa-2b plus ribavirin. *J Gastroenterol*, in press.
 4. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Hiramatsu TK, Fujita N, Yoshimori T, and Hayashi N. Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, in press.
 5. Tsunematsu H, Tatsumi T, Kohga K, Yamamoto M, Aketa H, Miyagi T, Hosui A, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, and Takehara T. Fibroblast growth factor-2 enhances NK sensitivity of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 130: 356-64, 2012.
 6. Hiramatsu N, Inoue Y, Oze T, Kurashige N, Yakushijin T, Mochizuki K, Miyagi T, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Oshita M, Mita E, Hagiwara H, Inui Y, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, and Hayashi N. Efficacy of pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for hepatitis C patients with normal ALT levels: a matched case-control study. *J Gastroenterol* 46: 1335-1343, 2011.
 7. 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, and 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: 3343-3356, 2011.

8. 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* 46: 1020-1030, 2011.
9. Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Mochizuki K, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Fukui H, Hijioka T, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Hayashi E, Kato M, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, and Hayashi N. Efficacy of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. *J Gastroenterol* 46: 1031-1037, 2011.
10. Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Mochizuki K, Imanaka K, Yamada A, Oshita M, Kaneko A, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Nagase T, Inui Y, Hijioka T, Tamura S, Yoshihara H, Hayashi E, Imai Y, Kato M, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Ishida H, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, and Hayashi N. The efficacy of extended treatment with pegylated interferon plus ribavirin in patients with HCV genotype 1 and slow virologic response in Japan. *J Gastroenterol* 46: 944-952, 2011.
11. Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Tsujimoto Y, and Hayashi N. Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon fas activation in bak/bax-deficient mice. *Hepatology* 54: 240-251, 2011.
12. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Shigekawa M, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Yin XM, and 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.
13. Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Mochizuki K, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Fukui H, Inui Y, Hijioka T, Inada M, Kaytayama K, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Kato M, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, and Hayashi N. Indications and limitations for aged patients with chronic hepatitis C in pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin combination therapy. *J Hepatol* 54: 604-611, 2011.

14. Shigekawa M, Takehara T, Kodama T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, and 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.

学会発表

- The American Association for the Study of Liver Diseases, 62th Annual Meeting AASLD, November 4-November 8, 2011, San Francisco
- #206 Continuous hepatocytes apoptosis is sufficient for liver cancer development. Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Li W, Tanaka S, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N, Takehara T.
- #1039 Viral suppression at week 4 exceeds the IL-28B SNP for predicting SVR in Pegylated interferon plus ribavirin combination therapy of genotype 1 infected patients with chronic hepatitis. Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Doi Y, Ogawa H, Hagiwara H, Mita E, Kaneko A, Katayama K, Hijioka T, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Hayashi E, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Hayashi N, Takehara T.
- #1142 Estimation of liver fibrosis by

VTTQ (Virtual Tissue Touch Quantification) in chronic liver disease: the usefulness of VS/PLT. Yamada R, Hiramatsu N, Oze T, Harada N, Song C, Inoue Y, Kurokawa M, Miyazaki M, Yakushijin T, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Hayashi N, Takehara T.

- #1347 Safety and efficacy of Vaniprevir (MK-7009) in combination with PEG-Interferon alpha-2A (PEG-IFN) / Ribavirin (RBV) in genotype 1 treatment experienced HCV-infected Japanese patients. Hayashi N, Nakamura K, Wright DH, Caro L, Barnard RJ, Mobashery MS, Tanaka Y.

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

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

研究分担者 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

研究要旨：大阪大学および関連施設において Peg-IFN α 2b/RBV 併用療法を施行し、IL28B SNP を測定した C 型肝炎 1 型高ウイルス量 645 例（平均年齢 56.9 \pm 10.2 才、男性/女性=292/352）を対象とし、Peg-IFN/RBV 併用療法の治療効果における IL28B 遺伝子多型と早期治療反応性の役割について検討した。IL28B major allele の response-guided therapy (RGT) における著効率は 58% と、minor allele の 29% に比し有意に高率であった ($p < 0.01$)。また、4 週減少率別の RGT による著効率には強い相関が認められ、著効に対する治療前因子のみの多変量解析では、肝線維化進展度 (OR: 0.44, $p = 0.025$)、血小板数 (OR: 1.06, $p = 0.007$)、IL28B SNP (OR: 0.09, $p < 0.001$) が有意な因子であったが、治療開始 4 週 HCV-RNA 減少率を含む多変量解析では、4 週 HCV-RNA 減少率のみが有意な因子であった (OR 2.9, $p < 0.001$)。【結論】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ることが示唆された。

A. 研究目的

近年、C 型肝炎に対する抗ウイルス療法の治療効果に、IL28B 遺伝子多型 (SNP; single nucleotide polymorphism) が関与することが報告されている。一方、Peg-IFN/RBV 併用療法において、早期抗ウイルス効果と著効率の関係が明らかになっており、さらに HCV-RNA 量測定系に Real-time PCR 法が導入され、抗ウイルス療法中の早期抗ウイルス効果がより詳細に検討できるようになった。そこで、本研究では、Peg-IFN/RBV 併用療法の治療効果における IL28B 遺伝子多型と早期治療反応性の役割について検討した。

B. 研究方法

大阪大学および関連施設において

Peg-IFN α 2b/RBV 併用療法を施行した C 型肝炎慢性肝疾患 4161 例のうち、IL28B SNP を測定した 1 型高ウイルス量 645 例（平均年齢 56.9 \pm 10.2 才、男性/女性=292/352）を対象とした。HCV-RNA は Real-time PCR 法で測定し、IL28B のタイピングは、rs8099917 の TT を major allele、TG もしくは GG を minor allele とした。

C. 研究結果

IL28B major allele は、全症例の 76%、minor allele は 24% であり、response-guided therapy (RGT) による著効率は、各々 58%、29% と、IL28B major allele で有意に高率であった ($p < 0.01$)。また、治療開始 4 週 HCV-RNA 減少率の症例頻度は、1log 未満; 11%、1-2log;

14%、2-3log ; 24%、3-4log ; 22%、4log 以上 ; 21%、HCV-RNA 陰性化 ; 8%であり、4 週減少率別の RGT による著効率は、順に 5%、20%、55%、69%、87%、100%と、4 週減少率と著効率には強い相関が認められた。さらに著効に対する治療前因子のみの多変量解析では、肝線維化進展度 (OR:0.44, p=0.025)、血小板数 (OR:1.06, p=0.007) に加えて、IL28B SNP (OR:0.09, p<0.001) が有意な因子であったが、治療開始 4 週 HCV-RNA 減少率を含む多変量解析では、4 週 HCV-RNA 減少率のみが有意な因子であり (OR 2.9, p<0.001)、IL28B SNP は有意ではなかった。一方、同療法において、治療開始 8 週で 1 log 未満あるいは 12 週で 2log 未満の HCV-RNA 量低下症例では、24 週での HCV-RNA 陰性化を認めなかった。

D. 考案

C 型慢性肝炎 (1 型高ウイルス量) 症例に対する Peg-IFN α 2b/RBV 併用療法の治療予測では、IL28B 遺伝子多型の測定が治療適応決定の判断の一助になる。治療中には、4 週時点でのウイルス減少率により、延長投与を含めた治療効果予測が可能であり、治療開始 8 週で 1log 未満あるいは 12 週で 2log 未満の HCV-RNA 量低下症例では、この時点で治療を終了することが推奨される。

E. 結論

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ることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表 :

- 1) Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Mochizuki K, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Fukui H, Inui Y, Hijioka T, Inada M, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Kato M, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. Indications and limitations for aged patients with chronic hepatitis C in pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin combination therapy. *J Hepatol.* 2011 Apr;54 (4) :604-11.
- 2) Sakakibara M, Kanto T, Hayakawa M, Kuroda S, Miyatake H, Itose I, Miyazaki M, Kakita N, Higashitani K, Matsubara T, Hiramatsu N, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. Comprehensive immunological analyses of colorectal cancer patients in the phase I/II study of quickly matured dendritic cell vaccine pulsed with carcinoembryonic antigen peptide. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Nov;60 (11) :1565-75.

2. 学会発表 :

- 1) 平松直樹、竹原徹郎、林 紀夫. “難治性 C 型肝炎に対する Peg-IFN/Ribavirin 併用療法 - 高齢者における問題と対策 -” 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」第 97 回日本消化器病学会総会 (東京) 2011
- 2) 平松直樹、竹原徹郎、林 紀夫. “難

治性C型肝炎に対する新薬を踏まえ
たPegIFN/Ribavirin併用療法の適応
と限界” パネルディスカッション
「C型肝炎治療－新たな時代へ」
第47回日本肝臓学会総会（東京）
2011

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

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

研究分担者：三田英治 大阪医療センター消化器科科長

研究要旨：HIV 合併 C 型慢性肝炎に対し、Peg-IFN- α 2b・リバビリン併用療法の治療成績と IL-28B の SNP の相関について検討した。HCV genotype 1 型・高ウイルス量における治療成績に対し、HIV 感染例では IL-28B の SNP は治療効果規定因子ではなく、「HCV-RNA が 6 log IU/mL 未満であること」が良好な治療効果を規定していた。

A. 研究目的

HIV 合併 C 型慢性肝炎患者例では、HIV 非感染例に比べ、肝線維化の進展速度が速く、予後不良であることが示されている。したがって、積極的な抗 HCV 療法の導入が望まれるが、治療効果規定因子の報告は少ない。今回、Peg-IFN- α 2b・リバビリン併用療法を行った HIV 感染 C 型慢性肝炎患者例において IL-28B の SNP を測定し、その意義を検討した。

B. 研究方法

当科にて Peg-IFN- α 2b・リバビリン併用療法を行った HIV 感染 C 型慢性肝炎患者例の IL-28B の SNP を invader 法にて測定し、HCV genotype、治療開始時の HCV-RNA 量との相関を検討した。また治療中の HCV-RNA 量の推移も検証した。

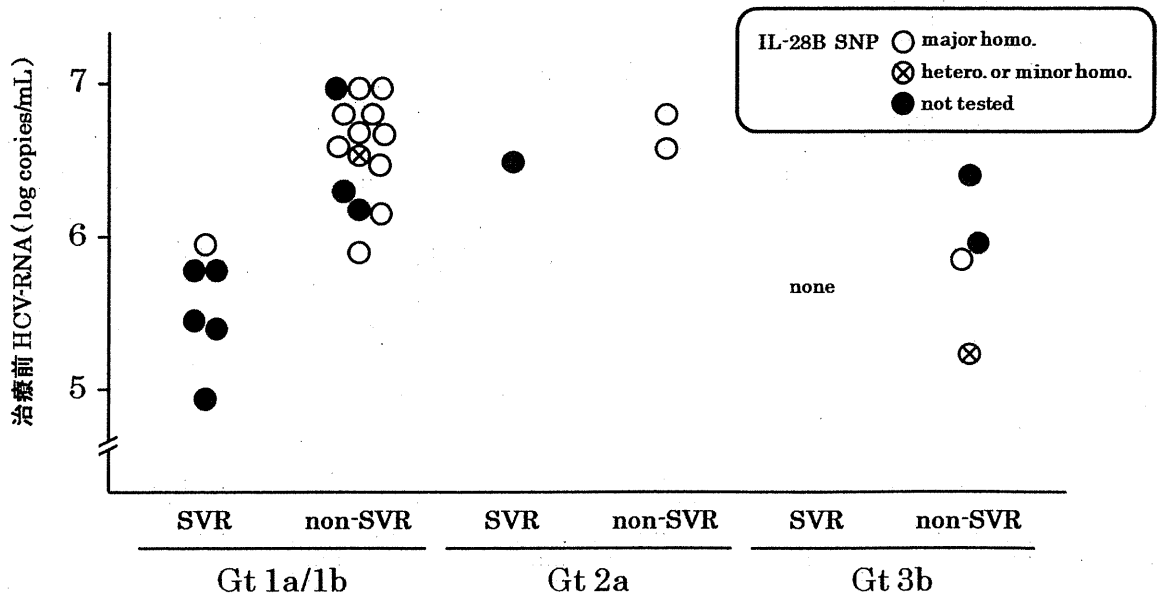


図 1. HIV 合併 C 型慢性肝炎例に対する Peg-IFN- α 2b・リバビリン併用療法の治療効果と IL-28B の SNP

※ Gt, genotype

C. 研究結果

転院などの理由で測定不可であった症例をのぞく16例でIL-28BのSNPを測定した。初年度に、HCV genotype 1型・高ウイルス量症例ではHCV-RNA 6 log IU/mL未満であることが、SVRを規定する因子であることを報告した。non-SVR例においてIL-28BのマイナーSNPが関与しているかを検証することが今回のポイントであったが、non-SVR例のほとんどがIL-28BメジャーSNPであった(図1)。したがって、HIV感染合併でHCV genotype 1型・高ウイルス量のC型慢性肝炎では、IL-28BのSNPは治療効果を規定しておらず、従来通りHCV-RNAの6 log IU/mL以上と未満が重

要なファクターであった。一方、治療中のHCV-RNAの経過では、IL-28BのメジャーSNPであっても、12週目までに2 log dropを認める症例とNull responseを呈する症例がおおよそ半数ずつに分かれ(図2)、HIV感染特有の傾向を示した。

HCV genotype 2型でもnon-SVRが2例認めたが再燃例であり、治療法を工夫することが必要と思われた。

HCV genotype 3型は全例non-SVRであったが、4例中2例が治療中に乳酸の上昇を認めため、治療を中止した症例であった。

全体を通して、半数にARTを行っていたが、ARTの有無と治療効果に相関を認めなかった。

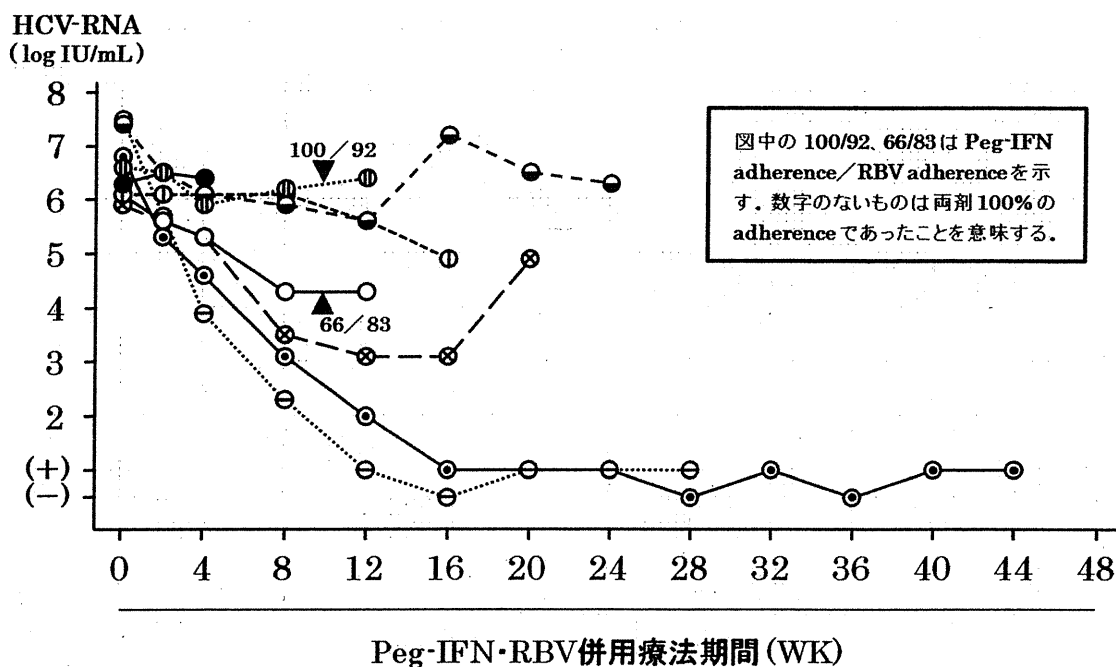


図2. HCV genotype 1型・高ウイルス量のHIV感染合併C型慢性肝炎例に対するPeg-IFN- α 2b・リバビリン併用療法中のHCV-RNAの推移

D. 考察

HCV genotype 1型・高ウイルス量のC型慢性肝炎に対するPeg-IFN- α 2b・リバビリン併用療法において治療効果を規定しているのは、ウイルス量の多寡(HCV-RNAの6 log IU/mL以上と未満)であって、IL-28BのSNPおよ

びARTの有無ではなかった。現在、IL-28BのSNPは保険適応外検査であるが、より簡便なHCV-RNA量を測定することで治療効果を予測することは可能である。ただHCV-RNAが6 log IU/mL以上であった場合は、プロテアーゼ阻害剤を含めた新規治療法に期待する方

が妥当と考えられた。

Genotype 2 型では、一旦 HCV-RNA が陰性化しながら再燃していた。ヨーロッパのガイドラインでは、HIV 感染合併例の Peg-IFN・リバビリン併用療法は、治療開始 4 週目に HCV-RNA が陰性化していれば 24 週間、陰性化していなければ 48 週間の治療を推奨している。今回の 2 症例は 4 週目に HCV-RNA は陰性化していなかったが、日本で推奨されている 24 週間の治療を行った。今後はヨーロッパのガイドラインに準じた対応が望ましい。

E. 結論

HIV 合併 C 型慢性肝炎の治療方針は、非感染例とは別の効果因子を考慮した対応が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oze T, Hiramatsu N, Song C, Yakushijin T, Iio S, Doi Y, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Hijioka T, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Hayashi E, Kato M, Miyazaki M, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Hayashi N, Takehara T. Reducing Peg-IFN doses causes later virologic response or no response in HCV genotype 1 patients treated with Peg-IFN alfa-2b plus ribavirin. J Gastroenterol. 2011 Nov 23. [Epub ahead of print]
- 2) 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, Hayashi N. Dynamics of regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells as immune markers for virological

response in pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients.

J Gastroenterol. 2011 Sep 27. [Epub ahead of print]

- 3) Hiramatsu N, Inoue Y, Oze T, Kurashige N, Yakushijin T, Mochizuki K, Miyagi T, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Oshita M, Mita E, Hagiwara H, Inui Y, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, Hayashi N. Efficacy of pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for hepatitis C patients with normal ALT levels: a matched case-control study. J Gastroenterol. 2011;46:1335-43.
- 4) Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Mochizuki K, Imanaka K, Yamada A, Oshita M, Kaneko A, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Nagase T, Inui Y, Hijioka T, Tamura S, Yoshihara H, Hayashi E, Imai Y, Kato M, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Ishida H, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. Efficacy of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. J Gastroenterol. 2011;46:1031-7.
- 5) Inoue Y, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Mochizuki K, Hagiwara H, Oshita M, Mita E, Fukui H, Inada M, Tamura S, Yoshihara H, Hayashi E, Inoue A, Imai Y, Kato M, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon

alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses.

J Viral Hepat. 2010;17(5):336-44.

- 6) Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Mochizuki K, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Fukui H, Inui Y, Hijioka T, Inada M, Kaytayama K, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Kato M, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, and Hayashi N.

Indications and limitations for aged patients with chronic hepatitis C in pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin combination therapy.

J Hepatol. 2011;54:604-11.

- 7) Inoue Y, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Mochizuki K, Fukuda K, Mita E, Haruna Y, Inoue A, Imai Y,

Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, and Hayashi N.

Amino acid substitution in the core protein has no impact on relapse in hepatitis C genotype 1 patients treated with peginterferon and ribavirin.

J Med Virol. 2011;83:419-27.

- 8) 三田英治.

C型肝炎 Hepatitis C among HIV-infected patients.

HIV感染症とAIDSの治療
2011;2:37-42.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|--------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|-----------|-----|------|---------|
| 泉 並木 (泉) | ウイルスおよび宿主因子に基づいたC型肝炎の治療 | 森正樹、下瀬川徹、金子周一、松本俊治、寺田弘司 | 消化器疾患の最新医療 | 先端医療技術研究所 | 東京 | 2011 | 104-107 |
| 泉 並木 (泉) | ウイルス肝炎の治療戦略 序文 | 工藤正俊、泉 並木 | ウイルス肝炎の治療戦略 | 診断と治療社 | 東京 | 2010 | vii |
| 泉 並木 (泉) | 健康診断で肝臓の数値が気になるとき読む本 | 泉 並木 | 健康診断で肝臓の数値が気になるとき読む本 | 幻冬舎 | 東京 | 2011 | 全頁 |
| 芥田憲夫 (芥田) | 肝疾患治療薬 | 高久史麿 | 治療薬ハンドブック | じほう | 東京 | 2011 | 524-529 |
| 芥田憲夫 (芥田) | C型慢性肝炎の治療効果予測因子 | 井廻道夫 | これでわかる慢性肝炎の治療戦略 | 羊土社 | 東京 | 2011 | 79-87 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|-------------------|---|---------------|-----|-------------|----------|
| Hikita H (竹原) | Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. | J Hepatol. | | | in press |
| Shimizu S (竹原) | Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinases inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. | Int J Cancer | | | in press |
| Kodama T (竹原) | 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 (竹原) | 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 |

| | | | | | |
|---------------------|--|----------------------------|-----|---------|----------|
| Ishida H (竹原) | 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 |
| Shigekawa M (竹原) | 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 |
| Hikita H (竹原) | Delayed-onset caspases-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bax/Bak-deficient mice. | Hepatology | 54 | 240-251 | 2011 |
| Asahina Y (泉) | Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in interleukin 28B with antiviral response. | Hepatology | 55 | 20-9 | 2012 |
| Kurosaki M (泉) | Data mining model using simple and readily available factors could identify patients at high risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. | J Hepatol | | | in press |
| Kurosaki M (泉) | Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphate gene and anemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin. | Antivir Ther | 16 | 685-94 | 2011 |
| Itakura J (泉) | 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. | Hepatol Res | 41 | 217-24 | 2011 |
| Watanabe S (泉) | Cancer preventive effect of pegylated interferon α -2b plus ribavirin in a real-life clinical setting in Japan: PERFECT interim analysis. | Hepatol Res | 41 | 955-64 | 2011 |
| Shindo H (泉) | Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients | Hepatol Int | | | in press |
| Kurosaki M (泉) | 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 | 83 | 445-52 | 2011 |

| | | | | | |
|--------------------|---|----------------------------|----|-----------|----------|
| Kurosaki M (泉) | Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. | J Hepatol | 54 | 439-48 | 2011 |
| Hiramatsu N (泉) | 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 | 1111-9 | 2011 |
| Itoh Y (伊藤) | Simple formula to predict response to peginterferon alpha2b and ribavirin combination therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients with high viral loads | Hepatol Res | 41 | 126-132 | 2011 |
| Sumida Y (伊藤) | Impact of amino acid substitutions in 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 |
| Sakamoto N (伊藤) | 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 |
| Takasaka T (伊藤) | Detection of hepatitis C virus and antibodies in postmortem blood and bloodstains. | J Clin Microbiol | 49 | 1122-1123 | 2011 |
| Tanaka Y (伊藤) | 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 |
| Itoh Y (伊藤) | 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 | 41 | 1145-1152 | 2011 |
| Shindo H (金子) | Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. | Hepatol Int | | | in press |