

Fig. 5. (A) Expression of activating receptor, inhibitory receptor, and effectors based on TLR4-L, IFN- α , or a combination of TLR4-L and IFN- α stimulation. Activating receptors and inhibitory receptors were not expressed following stimulation from TLR4-L, IFN- α , or their combination. Effectors such as FasL, TRAIL, and Granzyme B were synergistically expressed dependent on the stimulation. Data displayed are from one representative PBC patient. (B) Contribution of TRAIL to liver NK cell cytotoxicity against autologous BEC. Aliquots of NK cells were cultured in the presence of TLR4-L and 500 pg/mL of IFN- α alone (control) or with the addition of predetermined optimum concentrations of anti-FAS-L, anti-TRAIL, or Z-AAD-CMK (inhibitor of Granzyme B) and then assayed for cytotoxicity against autologous BEC. Cultures were performed in triplicate and the data displayed reflect net percent cytotoxicity expressed as mean \pm SD of the triplicate cultures. The data shown are from one PBC patient and are representative.

of TLR4-L-activated NK cells. These data indicate that IFN- α from Mo and TLR4-L-activated NK cells induce TRAIL to mediate cytotoxicity against liver BEC.

NK Cells Around BEC in the Liver. Finally, we investigated the relative levels of NK cells around bile ducts in sections of liver by immunohistochemistry. Comparative analyses of sections of liver from PBC patients and patients with liver diseases other than PBC demonstrated that CD56⁺ NK cells predominantly invaded the portal area only in sections from PBC patients. Thus, whereas the number of CD56⁺ NK cells invading portal areas was determined to be 8 ± 4.4 cells per small bile duct from PBC patients, those for sections of liver from patients with hepatitis C gave values of 2.7 ± 2.1 CD56⁺ NK cells per small bile duct ($P < 0.01$), those from PSC gave values of 1.1 ± 1.2 CD56⁺ NK cells ($P < 0.01$), and those from normal liver gave a value of 0.8 ± 1.0 CD56⁺ NK cells ($P < 0.01$). Representative histochemical images are displayed in Fig. 6.

Discussion

Studies of the mechanisms of a variety of autoimmune diseases, including PBC, have predominantly focused on the contributory role of adaptive T and B cell responses in the pathogenesis of disease.¹⁴⁻¹⁶ It is thus generally assumed that the major effector mechanisms that induce tissue pathology are those mediated by autoantigen-specific CD8⁺ T cells and autoantigen-specific antibodies that directly and/or indirectly contribute to tissue pathology. Interestingly, the institution of immunosuppressive agents that predominantly target pathways involved in the activation and effector mechanisms employed by cells of the adaptive immune system have so far failed to result in clear therapeutic benefit in patients with PBC. This therapeutic failure of inhibiting adaptive immunity in patients with chronic autoimmune diseases such as PBC has prompted a need for the reevaluation of this line of thinking. Thus, it is reasonable to consider that alternate immune effector mechanisms are functioning and contributing to the pathogenesis of human PBC.

We submit that the involvement of innate immune effector mechanisms in any chronic disease including

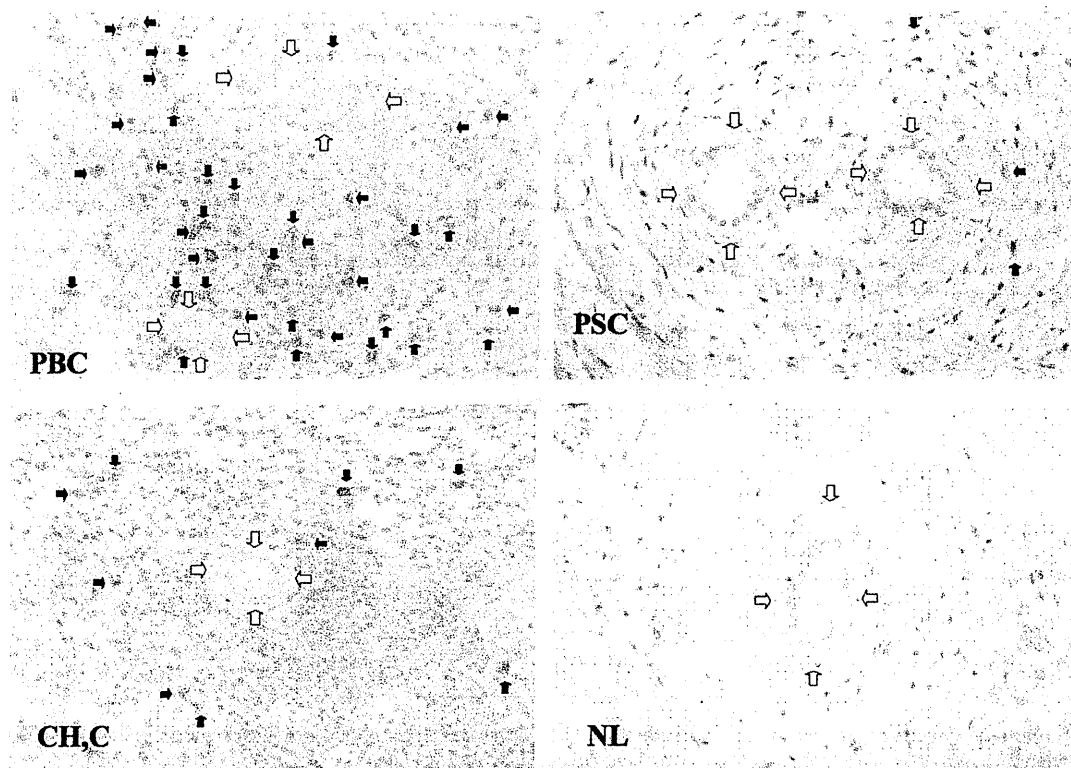


Fig. 6. Immunohistochemistry of CD56-positive cells in liver. Mononuclear cells expressing CD56 are seen in the biliary epithelial layer and periductal tissue. In PBC, CD56⁺ cells are seen within the biliary epithelium (white arrow) and also at high density around the bile ducts (black arrow). In PSC and hepatitis C, CD56⁺ cells are scattered, and in normal liver CD56⁺ cells are rare around the bile ducts. Statistical differences between PBC patients and controls are described in the text.

autoimmune diseases such as PBC needs to be considered and evaluated. Thus, whereas it is easy to visualize a role for innate immune involvement in the initial stages of the disease process followed by the emergence of adaptive immune responses, it is clear that destruction of tissues during the chronic stages must require removal of dying cells and products of lytic cells. The removal of such unwanted tissues in addition to autophagy must involve the function of innate immune mechanisms. It naturally follows that the activated state of the innate immune system must result in proinflammatory cascades contributing to the pathology of the autoimmune disease. It should also be noted that the adaptive immune system has been shown to affect the character and magnitude of innate inflammatory responses.¹⁷

One of the major cell lineages of the innate immune system that is known to mediate target cell destruction are cells of the NK cell lineage.¹⁸ Our previous findings of a high frequency of NK cells within cellular infiltrates around small bile duct cells of the liver in PBC patients¹² prompted us to examine the potential role this cell lineage plays in the pathogenesis of human PBC. Data presented

herein demonstrate that NK cells from TLR3-L and TLR4-L-stimulated LMC kill autologous BEC, especially in PBC patients when compared to other control liver diseases; there have been descriptions of crosstalk between NK cells and other innate immune populations by way of TLRs.^{13,19} One explanation for this observation is the finding of high levels of IFN- α in the sera of patients with PBC as compared with sera from patients with other liver diseases and otherwise control individuals. Thus, IFN- α is known to activate NK cell and contributes to enhance NK cell mediated cytotoxicity (Supporting Fig. 2 highlights these pathways).

The data herein also demonstrate that CD56-expressing NK cells upon ligation of TLR4 in the presence of IFN- α activates NK cells²⁰ and induces TRAIL.²¹ The function of NK cells appears to vary depending on the disease process.²² For example, the phenotypes of NK cells in patients with inflammatory bowel disease are different from those from normal intestinal mucosa.²³ NK cell activation receptor NKp46-positive NK cells have been shown to recognize and destroy beta cells in type I diabetes.²⁴ However, as previously shown, NKp46 is not induced on NK cells by

TLR4-L in the presence of IFN- α . Hence, it is our working hypothesis that the function of local resident NK cells in CNSDC is distinct from that noted in patients with PBC as exemplified by the unique expression of TRAIL in the latter but not the former.

There was no detectable cytotoxic effect when BECs were cultured with either TLR3-L or TLR4-L alone in our assay. Up-regulation of NK cell activating ligands has been reported in several liver subpopulations, including BEC, and has been implicated in liver injury.²⁵ It is not clear whether NK cell-activating ligands are also up-regulated on BEC in PBC and involved in the increased sensitivity to NK cell killing. Studies are in progress to define the relative sensitivity of BEC to NK cell cytotoxicity.

NK cells are cytotoxic for autologous BEC in the presence of TRAIL. The fact that human cholangiocytes constitutively express death receptor 5, which is the natural receptor for TRAIL, coupled with the finding of elevated levels of TRAIL expression and apoptosis in cholangiocytes of PBC patients,²⁶ suggests that TRAIL/Death receptor 5-mediated apoptosis may be the major pathway involved in the pathogenesis of chronic cholestatic disease.

Our data indicate that there are two requirements for NK cell-mediated cytotoxicity. One requirement depends on the source of TLR4 ligation and the other is the source of IFN- α , reportedly elevated in CNSDC.²⁷ Indeed, IFN- α appears to be derived from a monocytoid lineage, potentially plasmacytoid dendritic cells (pDC)²⁸; in our study we were not able to address this issue because of insufficient quantities of pDC in this experimental protocol. This is an issue that should be examined in the future. An additional remaining question is the identification of the source of the ligands for TLR3 and TLR4 that activate Mo and NK cells, respectively. Thus, whereas exogenous sources of ligands for TLR3 and 4 were used herein, it will be important to identify the natural ligands that are functional in patients with PBC because such data will be of major clinical importance. In this regard, it is of interest to note that there is a correlation of urinary tract infections and PBC^{29,30}; this could be the candidate source for TLR-L.

Sera from patients with autoimmune diseases often reflect the presence of elevated levels of inflammatory cytokines, including type 1 and 2 interferons (IFN), TNF- α , and IL-12.³¹⁻³³ IFN is induced by both a TLR-dependent and independent pathway in systemic autoimmunity.³⁴ Additionally, activation and proliferation of both autoantigen specific and non-specific CD8 T cell responses are characterized by

the expression of CD38 and Ki-67 expression.³⁵ Previous work has demonstrated that pDC is a major source of type 1 IFN in response to ligation of TLR7.³⁶ In this regard, the characteristics of pDC that contribute to their pathogenic role include the observation that TRAIL-expressing pDC induces death of CD4 T cells that express TRAIL-associated death receptors.³⁷ In addition, pDC inhibit T cell proliferation through an indoleamine oxidase (IDO)-dependent pathway³⁸ and, finally, pDC rapidly migrate to the site of autoimmune mediated injury and/or infection and attract CD4+ T cells to the site.³⁹ We should note that in this study we did not evaluate IFN production from pDC in the presence of TLR7/8-L (CL097), but we did note the absence of cytolytic activity of LMC incubated with TLR4-L and TLR7/8-L (CL097).

Finally, it has also been demonstrated that CX3CL1 is expressed by BEC from patients with PBC and appears involved in the recruitment of intrahepatic lymphocytes into bile ducts.^{8,40} This interaction promotes NK cell activation.⁴¹ In conclusion, therefore, there is a complex but nonetheless well-defined relationship between liver mononuclear cell subpopulations and the biliary cell pathology of PBC. These interactions provide several steps that can potentially be modulated to reduce inflammation and will be the focus of further studies.

References

- Gershwin ME, Ansari AA, Mackay IR, Nakanuma Y, Nishio A, Rowley MJ, et al. Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunol Rev* 2000;174:210-225.
- Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005;353:1261-1273.
- Lleo A, Selmi C, Invernizzi P, Podda M, Coppel RL, Mackay IR, et al. Apoptosis and the biliary specificity of primary biliary cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2009;49:871-879.
- McNally RJ, Ducker S, James OF. Are transient environmental agents involved in the cause of primary biliary cirrhosis? Evidence from space-time clustering analysis. *HEPATOLOGY* 2009;50:1169-1174.
- Lleo A, Bowlus C, Yang G-X, Invernizzi P, Podda M, Van de Water J, et al. Biliary apoptosis and anti-mitochondrial antibodies activate innate immune responses in primary biliary cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2010;52:987-998.
- Van de Water J, Ishibashi H, Coppel RL, Gershwin ME. Molecular mimicry and primary biliary cirrhosis: premises not promises. *HEPATOLOGY* 2001;33:771-775.
- Kamihira T, Shimoda S, Nakamura M, Yokoyama T, Takii Y, Kawano A, et al. Biliary epithelial cells regulate autoreactive T cells: implications for biliary-specific diseases. *HEPATOLOGY* 2005;41:151-159.
- Shimoda S, Harada K, Niuro H, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, et al. CX3CL1 (fractalkine): a signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2010;51:567-575.
- Shimoda S, Van de Water J, Ansari A, Nakamura M, Ishibashi H, Coppel RL, et al. Identification and precursor frequency analysis of a

- common T cell epitope motif in mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest* 1998;102:1831-1840.
10. Kawano A, Shimoda S, Kamihira T, Ishikawa F, Niiro H, Soejima Y, et al. Peripheral tolerance and the qualitative characteristics of autoreactive T cell clones in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 2007;179:3315-3324.
 11. Shimoda S, Ishikawa F, Kamihira T, Komori A, Niiro H, Baba E, et al. Autoreactive T-cell responses in primary biliary cirrhosis are proinflammatory whereas those of controls are regulatory. *Gastroenterology* 2006;131:606-618.
 12. Chuang YH, Lian ZX, Tsuneyama K, Chiang BL, Ansari AA, Coppel RL, et al. Increased killing activity and decreased cytokine production in NK cells in patients with primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2006;26:232-240.
 13. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force." *Blood* 2005;106:2252-2258.
 14. Goodnow CC. Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell* 2007;130:25-35.
 15. Palmer MT, Weaver CT. Autoimmunity: increasing suspects in the CD4+ T cell lineup. *Nat Immunol* 2010;11:36-40.
 16. Gershwin ME, Mackay IR. The causes of primary biliary cirrhosis: convenient and inconvenient truths. *HEPATOLOGY* 2008;47:737-745.
 17. Strutt TM, McKinstry KK, Dibble JP, Winchell C, Kuang Y, Curtis JD, et al. Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nat Med* 2010;16:558-564.
 18. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008;9:495-502.
 19. Tu Z, Bozorgzadeh A, Pierce RH, Kurtis J, Crispe IN, Orloff MS. TLR-dependent cross talk between human Kupffer cells and NK cells. *J Exp Med* 2008;205:233-244.
 20. Hart OM, Athie-Morales V, O'Connor GM, Gardiner CM. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol* 2005;175:1636-1642.
 21. Stegmann KA, Bjorkstrom NK, Veber H, Ciesek S, Riese P, Wiegand J, et al. Interferon-alpha-induced TRAIL on natural killer cells is associated with control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010;138:1885-1897.
 22. Oliviero B, Varchetta S, Paudice E, Michelone G, Zaramella M, Mavilio D, F, et al. Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 2009;137:1151-1160.
 23. Takayama T, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Kitazume M, Chang J, et al. Imbalance of NKp44+ NKp46- and NKp44- NKp46+ natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2010;139:882-892.
 24. Gur C, Porgador A, Elboim M, Gazit R, Mizrahi S, Stern-Ginossar N, et al. The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2010;11:121-128.
 25. Gao B. Natural killer group 2 member D, its ligands, and liver disease: good or bad? *HEPATOLOGY* 2010;51:8-11.
 26. Takeda K, Kojima Y, Ikejima K, Harada K, Yamashina S, Okumura K, et al. Death receptor 5 mediated-apoptosis contributes to cholestatic liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10895-10900.
 27. Takii Y, Nakamura M, Ito M, Yokoyama T, Komori A, Shimizu-Yoshida Y, et al. Enhanced expression of type I interferon and toll-like receptor-3 in primary biliary cirrhosis. *Lab Invest* 2005;85:908-920.
 28. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005;23:275-306.
 29. Hopf U, Moller B, Stemerowicz R, Lobeck H, Rodloff A, Freudenberg M, et al. Relation between *Escherichia coli* R(rough)-forms in gut, lipid A in liver, and primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1989;2:1419-1422.
 30. Buder P, Valle F, Hamilton-Miller JM, Brumfit W, Baum H, Burroughs AK. M2 mitochondrial antibodies and urinary rough mutant bacteria in patients with primary biliary cirrhosis and in patients with recurrent bacteriuria. *J Hepatol* 1993;17:408-414.
 31. Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 2006;25:383-392.
 32. Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* 2009;9:271-285.
 33. Luger D, Silver PB, Tang J, Cua D, Chen Z, Iwakura Y, et al. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med* 2008;205:799-810.
 34. Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med* 2007;13:543-551.
 35. Walter U, Santamaria P. CD8+ T cells in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2005;17:624-631.
 36. Rajagopal D, Patrel C, Morel Y, Uematsu S, Akira S, Diebold SS. Plasmacytoid dendritic cell-derived type I interferon is crucial for the adjuvant activity of Toll-like receptor 7 agonists. *Blood* 2010;115:1949-1957.
 37. Stary G, Klein I, Kohlhofer S, Koszik F, Scherzer T, Mullauer L, et al. Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* 2009;114:3854-3863.
 38. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004;4:762-774.
 39. Sozzani S, Vermi W, Del Prete A, Facchetti F. Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease. *Trends Immunol* 2010;31:270-277.
 40. Isse K, Harada K, Zen Y, Kamihira T, Shimoda S, Harada M, et al. Fractalkine and CX3CR1 are involved in the recruitment of intraepithelial lymphocytes of intrahepatic bile ducts. *HEPATOLOGY* 2005;41:506-516.
 41. Pallandre JR, Krzewski K, Bedel R, Ryffel B, Caignard A, Rohrlisch PS, et al. Dendritic cell and natural killer cell cross-talk: a pivotal role of CX3CL1 in NK cytoskeleton organization and activation. *Blood* 2008;112:4420-4424.

C型肝炎

C型肝炎の抗ウイルス療法の実際

野村秀幸

新小倉病院肝臓病センター/のむら・ひでゆき

はじめに●

1992年よりC型慢性肝炎に対してのインターフェロン(interferon, IFN)治療が開始された。当時は、IFN単独24週間治療であった。日本ではC型肝炎ウイルス hepatitis C virus (HCV)の型は1型と2型が多く、ウイルス量も測定可能である。このウイルスの型によりIFN治療効果が異なる。1型は2型に比べIFN治療に抵抗性である。このため1型・高ウイルス例は難治例と呼ばれている。IFN単独24週間治療では、難治症例の著効 sustained virological response (SVR)率は約10%前後である。2004年12月よりペグインターフェロンとリバビリン併用療法 peg-interferon plus ribavirin (PEG-IFN/RBV)が開始され、1型・高ウイルス例においてもSVR率は40%から50%と改善し、2型・高ウイルス例では80%以上のSVR率が得られ、このため高ウイルス例の治療に対しては、PEG-IFN/RBV療法が第一選択となっている。1型では、今後、より治療効果の高いプロテアーゼ阻害薬の併用による治療が期待されるが、副作用の問題などでPEG-IFN/RBV療法の必要性も残る。2型においては、現行のPEG-IFN/RBV療法の24週間治療が最良の治療と考えられている。1型・高ウイルス例におけるPEG-IFN/RBV療法の現状、問題点、治療の予測因子、および今後の治療(PEG-IFN/RBV+プロテアーゼ阻害薬の三者併用療法)について述べる。

PEG-IFN/RBV療法の現状●

2004年12月から開始されたPEG-IFN/RBV療法により、1型・高ウイルス例でもSVR率は40~50%となった。現在は、C型肝炎慢性肝炎治療の第一選択と考えられている。ここでは、当院の成績と当院も参加している九州大学が中心となっ

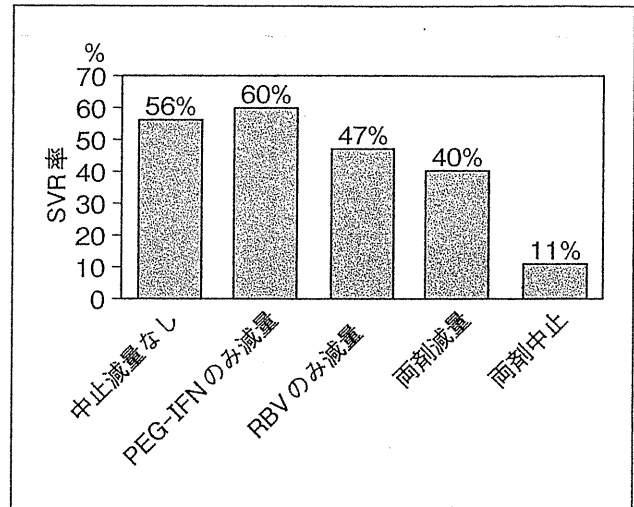


図1 1型・高ウイルス例に対するPEG-IFN/RBV服薬状況別のSVR率(n=1,152)

て集積したKULDSのデータを用いて述べる。特にKULDSデータについては、Furusyoらにより報告された文献を参照する¹⁾。KULDSデータは2009年8月までに2,871例の登録があり、1型・高ウイルス例については1,152例が解析可能であった。PEG-IFN/RBV療法では、48週間治療が基本であるが、図1に示すように治療中のPEG-IFNやRBVの減量ではSVR率の低下は低いが、40週までに治療を中止した場合はSVR率が11%まで低下する。治療中止は、約20%にみられる。特にPEG-IFN/RBV療法の副作用による中止例は約9%である。この中止例の内約半数は、全身倦怠感やうつ症状によるものであった。また若年者でのSVR率は高いが、図2に示すように加齢とともに低下し、70歳以上の高齢者ではSVR率はより低くなる。高齢者では、PEG-IFNやRBVの減量者、中止例が多いが、48週間完遂例においても若年者に比べ低い。12週目までのHCV-RNAの陰性化率は約40%で終了時には約80%が陰性化するが、その後判定時

- C型慢性肝炎へのPEG-IFN/RBV療法のSVR率は約40～50%である。
- 治療中止例では、SVR率は低い。
- SVR率は加齢とともに低下し、高齢者のSVR率は低い。

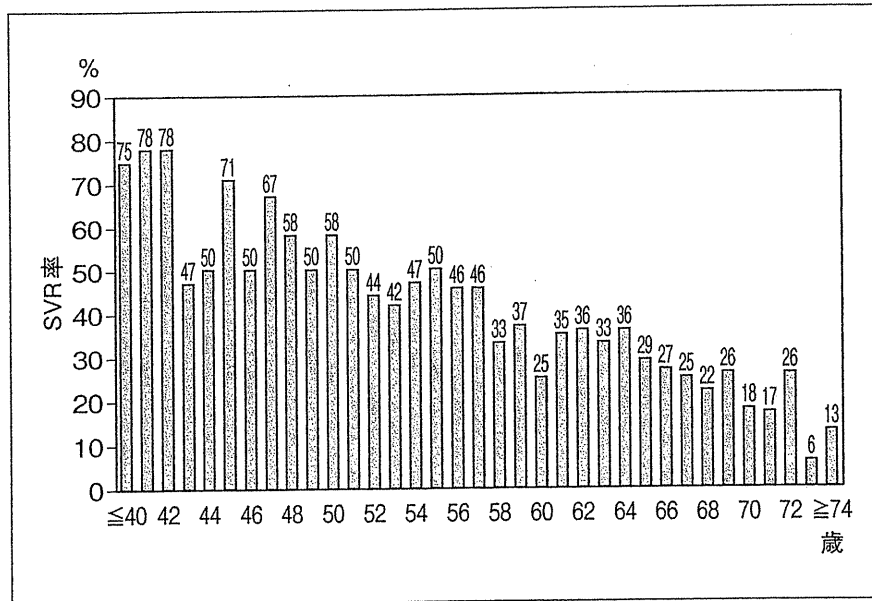


図2 年齢別の1型・高ウイルス例に対するPEG-IFN/RBV療法のSVR率 (文献1)より引用)

表1 1型・高ウイルス例へのPEG-IFN/RBV療法の問題点

- ① 高齢者問題
- ② 20～30%の高い再燃率
- ③ 高い中止率(うつ状態など)
- ④ 高額医療費
- ⑤ 治療効果(著効率)が40～50%
- ⑥ 治療期間が、48～72週と長い
- ⑦ 肝硬変患者への治療

(治療終了24週目)には約35%が再燃しSVR率は約40%から50%となる。治療効果は治療中のHCV-RNAの陰性化時期により異なる。4週目、8週目までにHCV-RNAが陰性化すればSVR率は97%以上となる。12週目までであれば75%となるが、13週目から36週目までにHCV-RNAが陰性化しても、48週間治療では再燃例が多くSVR率は26%と低下する。このため、現在では13週目から36週目までにHCV-RNAが陰性化したlate virological response (LVR)例に対しては、72週間治療が推奨され公費助成制度も適用

されている。PEG-IFN/RBV療法の減量については、PEG-IFNは標準投与量の80%以上、RBVは60%以上の投与量があれば、標準投与量とのSVR率は差がないが、それ以下であればSVR率が低下する。特にPEG-IFNが80%以下となるとSVR率がより低下する。

2型・高ウイルス例に対しては、PEG-IFN/RBV療法の24週間投与でSVR率は83%であり、年齢差、性別の差もみられず、2型に対してはこのPEG-IFN/RBV療法が最適の治療方法と考えられている。

1型・高ウイルス例へのPEG-IFN/RBV療法の

問題点(表1)●

- ① 高齢者のSVR率が低い、② 48週間投与では再燃率が約30%にみられる、③ 約10%に副作用中止がみられ、約半数は全身倦怠感やうつ症状である、④ 高額医療費、⑤ 治療効果が約40～50%にとどまる、⑥ 治療期間が48週間から72週間と長く、⑦ 肝硬変症例への適応がない。

- うつ傾向患者へは、IFNβ/RBV 療法が推奨されている。
- C型肝炎へのIFN治療には公費助成が得られる。
- 2型・高ウイルス例へは、24週間のPEG-IFN/RBV療法が最適の治療である。

②の高い再燃率については、72週間の延長投与によりLVR例の約50%はSVRとなり、改善した。④の高額医療費については、現在医療費の公費助成制度が適用され、ほぼ改善されている。

うつ傾向の患者へのIFN治療●

PEG-IFN/RBV療法によりC型慢性肝炎の治療効果は改善されたが、PEG-IFNα製剤によるうつ状態の出現がみられ、うつ傾向の患者への治療は控えられている。うつ傾向の患者に対してのIFNβ/RBV療法では、うつ傾向の悪化はみられず、SVR率は1型では約40%、2型では80%以上である²⁾。当院のIFN治療12週目のうつ傾向のアンケート調査(BDI-II)では、軽症の抑うつ傾向の出現率はPEG-IFN/RBV療法では約39%、IFNβ/RBV療法では9%で、有意にIFNβ/RBVが低かった。中等度以上は、PEG-IFN/RBVでは21%であったが、IFNβ/RBVではみられなかった。現在ではうつ傾向のみられる高ウイルス例に対しては、2011年度のガイドラインでもIFNβ/RBV療法が推奨されている。

1型・高ウイルス例へのPEG-IFN/RBV療法の

予測因子●

PEG-IFN/RBV療法の予測因子としては、宿主側因子として、年齢、性、ウイルス側因子として、genotype、治療前のウイルス量、が考えられていたが、2009年に宿主側因子として遺伝子多型(IL28BのSNPs)が発見され³⁾、ウイルス側因子としても、core 70/91のアミノ酸の置換やinterferon sensitivity determining region (ISDR)の変異などが有用な因子として考えられている。IL28BのSNPs(rs8099917)の分布は、当院の317例ではPEG-IFN/RBV治療効果の高いmajor allele(TT)は76%で、治療効果が低いminor allele(TG/

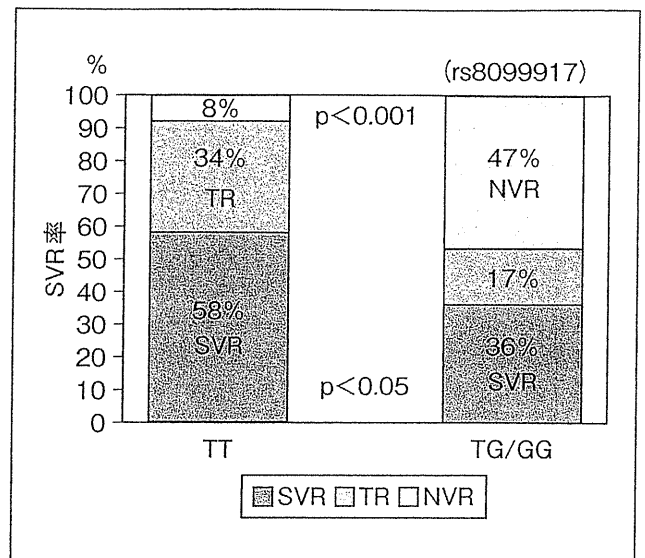


図3 1型・高ウイルス例に対するPEG-IFN/RBV療法のIL28BのSNPs別のSVR, TR, NVRの割合

GG)は24%であった。IL28B別のPEG-IFN/RBV治療効果は、図3に示すようにIL28BのTT群では、SVRは58%、再燃transient response(TR)は34%、無効non virological response(NVR)は8%で、TG/GG群ではSVRは36%、TRは17%、NVRは47%であった。SVR率はTT群が高く、一度もHCV-RNAが陰性化しなかったNVR率はTG/GG群が有意に高かった。

PEG-IFN/RBV/telaprevirによる三剤併用療法●

1型・高ウイルス例への48週間のPEG-IFN/RBV療法では、SVR率は約40~50%であり、中には72週間と長期投与となる。治療期間の短縮と治療効果の向上を目指して、PEG-IFN/RBV療法にプロテアーゼ阻害薬を併用する治療が検討され、2011年中に保険適用される予定である。治療期間は24週間で、プロテアーゼ阻害薬としてテラプレビルtelaprevir(TVR)を用い、治療開始から12週間はTVRをPEG-IFN/RBVに加

- 宿主側予測因子として、遺伝子多型 (IL28B) が測定可能となった。
- 今後 PEG-IFN/RBV/TVR の三者併用療法が導入され、治療期間の短縮、SVR 率の向上が期待される。
- PEG-IFN/RBV/TVR 療法不応例へは、IFN 単独・少量・長期治療も推奨されている。

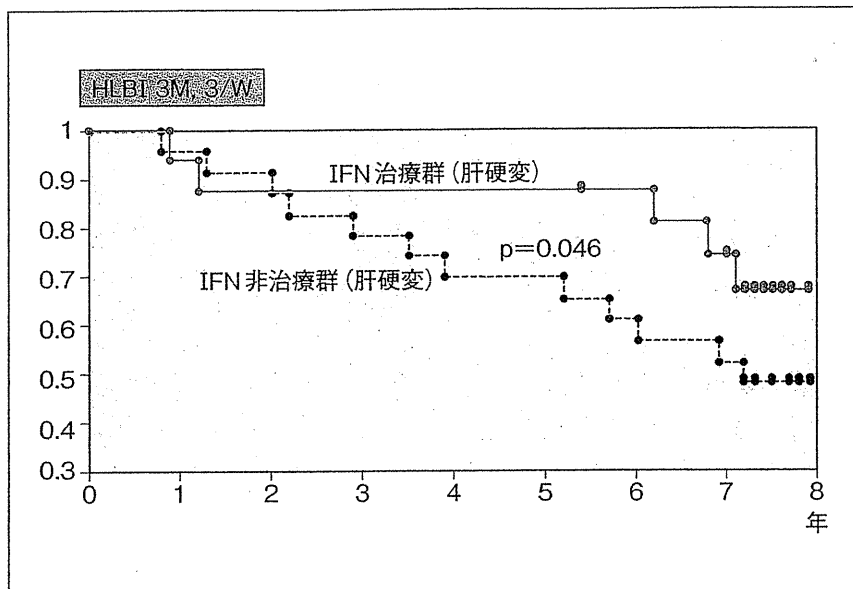


図4 1型・高ウイルス肝硬変症例に対する IFN 単独少量・長期治療の非発癌率の推移 (文献5)より改変引用)

えた三剤併用療法を行い、次の12週間はPEG-IFN/RBV二剤併用療法を行う。臨床試験結果では、IFN未治療者のSVR率は70%以上で、TR例のSVR率は約90%で、PEG-IFN/RBV療法に比べかなりのSVR率の改善がみられる。特にIL28BがTT群であればSVR率が非常に高く、TG/GG群であれば、core 70のアミノ酸置換がないwildの場合はSVR率が高いが、mutant(置換あり)となるとSVR率が低下する⁴⁾。つまり、PEG-IFN/RBV/TVRの三剤併用療法においても、IL28Bやcore 70のアミノ酸の置換は予測因子の一つであり、IL28B(TG/GG)かつcore aa70(mutant)かつISDR(0-1)の場合、PEG-IFN/RBV/TVRの三剤併用療法においても治療効果はきわめて低い。

IFN 単独少量・長期療法●

PEG-IFN/RBV療法やPEG-IFN/RBV/TVR療法が不適応な症例(血小板数低値、ヘモグロビン低値、肝硬変症例など)に対しては、他の治療

方法でHCV-RNAの陰性化が望めない場合、肝発癌予防のためにIFN単独・少量・長期投与が推奨されている。2011年度のガイドラインでは、IFN α (human lymphoblastoid interferon: HLBI)の300万単位を週3回筋注する。なるべく自己注射を勧める。PEG-IFN α 2aを用いる場合は、1から2週間に1回90 μ gを皮下注する。IFN単独・少量・長期投与では、肝障害(AST, ALT値高値)が改善し、AFP値も低下する症例がみられ、肝硬変症例では3年間の治療により有意に肝発癌を抑制できる⁵⁾(図4)。適応は、肝機能異常(AST, ALT値高値)、AFP値高値、肝硬変症例などである。治療期間はできれば3年間以上継続することが必要である。

おわりに●

近年C型肝炎に対する抗ウイルス療法は進化し、PEG-IFN/RBV/TVRの三剤併用療法による24週間治療で75%以上のSVR率が可能となった。抑うつ傾向の患者へもIFN β /RBV療法が確

-
- PEG-IFN/RBV/TVR療法では、IL28BがTT群(rs8099917)であれば、SVR率は80%以上得られる。
 - しかし、同療法でもIL28BがTG/GG群かつcore aa70 (mutant)かつISDR (0-1)の場合は、治療効果が低い。
-

立されている。血小板減少例、ヘモグロビン低値例、肝硬変症例などには、IFN単独・少量・長期投与により肝発癌の抑制を考えた治療も加わり、多くのC型肝炎患者に対して病態に応じたIFN治療が確立されているので、ガイドラインを参照にして最も効率のよい安全な治療を行うことが必要である。治療の選択・実施においては肝臓専門医と密接な連携をとり実行すべきである。

文献

- 1) Kainuma, M. et al. : Pegylated interferon α -2b plus ribavirin for older patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 16 : 4400-4409, 2010
- 2) Arase, Y. et al. : Efficacy and safety of combi-

nation therapy of natural human interferon beta and ribavirin in chronic hepatitis C patients with genotype 1b and high virus load. *Intern Med* 49 : 957-963, 2010

- 3) Tanaka, Y. et al. : Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41 : 1105-1109, 2009
- 4) Akuta, N. et al. : Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology* 52 : 421-429, 2010
- 5) Nomura, H. et al. : Efficacy of low dose long-term interferon monotherapy in aged patients with chronic hepatitis C genotype 1 and its relation to alpha-fetoprotein : A pilot study. *Hepatol Res* 37 : 490-497, 2007

II. C 型肝炎

C 型急性肝炎の動向と診断・治療

Epidemiology, diagnosis and treatment for acute hepatitis C in Japan

野村秀幸

Key words : C 型急性肝炎, インターフェロン治療, 治療開始時期, 治療期間

II

C
型
肝
炎

はじめに

急激な肝細胞障害を起こし、全身倦怠感や黄疸などの症状が出現する急性肝炎において、原因が明らかなものはウイルス性急性肝炎が最も多い。我が国では、A型、B型、C型、E型のウイルス性急性肝炎がみられる。

本稿では、C型急性肝炎についてその動向、感染経路、診断、治療などについて述べる。

1. C 型急性肝炎の動向と感染経路

a. 動 向

我が国におけるウイルス性急性肝炎の年次的

な発生状況に関する検討は少ない。ここでは、国立病院機構共同研究の平成 21 年度の研究報告書をもとに述べる。1980 年から 2009 年にかけての年次別推移では、C 型急性肝炎は散発性急性肝炎の 8.5% を占める。特に 2000 年以降の 10 年間でも 9.5% を占めている。非 A 非 B 非 C 型急性肝炎を除いた、A 型、B 型、C 型ウイルス性急性肝炎のうち C 型急性肝炎は 14.5% を占めていた。C 型急性肝炎は症状に乏しく、劇症化しないため見落とされがちであるが、だいたい急性肝炎の約 1 割を占め、年次的にも流行などはなく一定している¹⁾(図 1)。

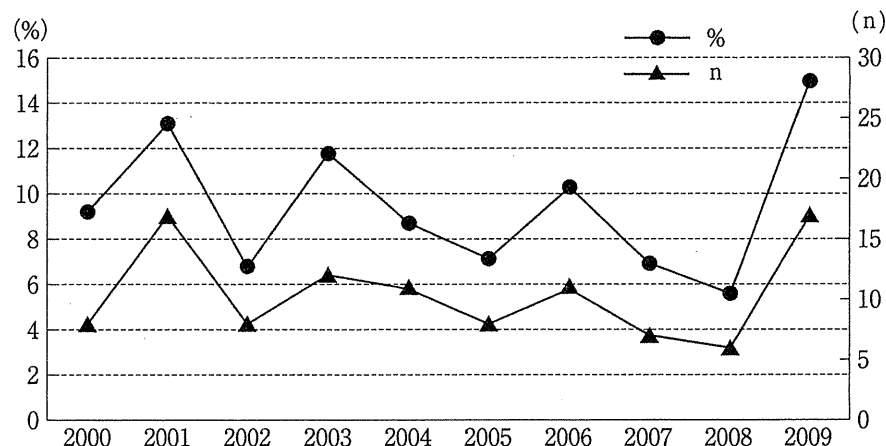


図 1 C 型急性肝炎の年次推移(2000-2009)

(文献¹⁾より引用)

Hideyuki Nomura: The Center for Liver Disease, Shin-Kokura Hospital 国家公務員共済組合連合会 新小倉病院 肝臓病センター

b. 感染経路

1991年までは輸血によるC型急性肝炎が多くみられたが、HCVが同定され、1992年以降第2世代HCV抗体を献血血液スクリーニングに導入して以来、輸血後C型急性肝炎は著明に減少した。その後核酸増幅検査(NAT)の導入により、2000年以降輸血後C型急性肝炎はほとんどみられなくなった。国立病院機構共同研究においても、輸血後C型急性肝炎は2000年以降3例のみの報告であり、特に2004年以降は疑いが1例みられたが、確定症例はみられない。感染経路は原因不明な場合が多いが、原因としては、針刺し事故、麻薬常用者、tattoo 施行者、ピアス使用者、医療原性、性行為、である。欧米では静脈内薬物使用(覚醒剤など)がC型急性肝炎の原因の約25-54%を占めている。性的接触による感染は、4-25%である。ほかには、外科的手術などの医療原性などである。一方日本では、針刺し事故による報告が多くみられる。最近では日本でも覚醒剤使用者、tattoo 施行者やピアス使用者のC型急性肝炎患者が増加し、若年化している²⁻⁷⁾。

2. 診断と臨床症状, 慢性化

a. C型急性肝炎の診断

C型急性肝炎の診断には、A型肝炎やB型肝炎のように急性肝炎を診断するIgM型抗体がないので、HCV抗体やHCV RNA(real time PCR法)により診断する。HCV抗体はC型肝炎のスクリーニングに広く使用されているが、C型肝炎ウイルスの初感染後数カ月間は陰性である。このためC型肝炎発症初期にはHCV抗体が陰性かまたは抗体価が低いことが多い。経時的観察中に抗体が陽性化したり、抗体価が上昇してくることがしばしばみられる。HCV抗体の1回のみでの測定でC型肝炎を診断するのは不可能である。そのためHCV抗体価の経時的観察は重要である。一方、抗体価が最初から高値の場合は、C型肝炎の診断には感染前にHCV抗体が陰性であることが必要である。HCV抗体陰性で、C型肝炎の疑いがある場合は、HCV RNA定量(real time PCR法な

ど)検査を行う。

C型肝炎の診断は以下に示す。まず、IgM-HA抗体陰性、HBs抗原陰性で、ALTの上昇がみられる急性肝機能障害を認め、C型肝炎ウイルスマーカーとしては、以下の3条件のいずれかを満たすことが必要である。①HCV抗体陰性で、HCV RNA陽性、②HCV抗体陰性かまたは抗体価が低く、経過観察中に抗体価の上昇を認める、③発症数カ月以前にHCV抗体陰性で、発症時陽性である³⁾。IgM-HA抗体陰性、HBs抗原陰性、HCV抗体陰性の急性肝炎の場合、まずはC型肝炎ではないかと疑ってみることが重要であり、数カ月前に覚醒剤の使用やピアス、tattoo、針刺し事故などの問診を十分に行うことも大切である。

b. 臨床症状

発症時の臨床症状は発熱などの感冒様症状に引き続き、全身倦怠感、食欲不振、悪心などの症状をきたし、他のウイルス性急性肝炎と同様であるため、臨床症状のみでの鑑別は困難である。一般にA型肝炎やB型肝炎に比べC型肝炎の臨床症状は軽く、ごく軽度か無症状の場合もある。日本人では黄疸が出現しない場合もある³⁾。HCV感染から発症までの潜伏期間は、5-12週間と考えられているが⁸⁾、感染から発症までを検討した報告では約4週から9週で平均6.8週であった。著者らの針刺し事故患者からの検討では、感染から発症までの期間は約7.3週間(5-12週)であった³⁾。C型肝炎の激症化は最近の報告ではほとんどみられない。一般的にC型肝炎は症状が軽く、重症化例は少ないが、慢性化しやすい。

c. C型肝炎の慢性化

C型肝炎は発症後約3カ月以内に自然治癒する症例もみられる²⁾。また、発症後1-2カ月間、総ビリルビン(T.Bil)、AST、ALTの高値が続き、その後低下することが多い。HCV量は発症時高値のこともあるが、2カ月以内に低下し、その後自然排除して陰性化し自然治癒する場合もある。多くは一度ウイルス量は低下するものの陰性化することもなく、HCV RNAが持続陽性化して、慢性肝炎へとなる。3カ月以上

HCV RNAが持続陽性を続けると、慢性化する確率が非常に高くなる。欧米では黄疸出現症例ほど自然治癒する。黄疸の出現した症例では約50%が慢性化し、黄疸がみられなかった症例では約90%が慢性化した⁴⁾。日本人の場合、必ずしもこのとおりではなく、自然治癒率は低いのではないかと思われる³⁾。日本におけるC型急性肝炎は臨床症状に乏しい症例が多く、黄疸が出現しない症例も多くみられるので、慢性化率は70-80%と考えられ、欧米に比べ高率に慢性化するものと思われる。この違いについては不明である。また、発症後のALTに二峰性以上の変動がみられる場合は、より慢性化すると考えられている。

3. 治療と予後

a. 一般的治療

C型急性肝炎は一過性に経過し、自然経過で緩解し、一般的に予後良好な疾患である。急性期の治療は入院治療が原則である。安静と栄養療法が最も大切で保存的治療が中心となり、2-3カ月で治癒する。安静臥床により肝血流の増加を促し、肝障害の治癒を促す。プロトロンビン時間の改善、トランスアミナーゼ値やビリルビン値の低下、自覚症状の改善が確認できれば、安静度を軽減する。劇症化、重症化はまれであるので、食欲が改善すれば点滴や食事の制限の必要はない。

b. インターフェロン治療

1) インターフェロン治療開始時期

C型急性肝炎は、ALT値の変動が一峰性で、発症後2-3カ月以内にHCV RNAが陰性化する症例がみられるため、発症後2-3カ月の経過観察が必要であるが、その後にHCV RNAが陰性化することは少なく、C型急性肝炎から慢性化が予測された場合は、積極的にインターフェロン治療を行うべきである^{3,5-7)}。著者らの経験ではC型急性肝炎患者34例についてインターフェロンβの8週間連日治療を行い、治療開始時期について検討した。4-12週目以内に治療を開始した16例は全例HCV RNAが持続陰性化し、SVR率は100%であった。13-24週目に治

表1 インターフェロン別、治療期間別のHCV RNA持続陰性化率(文献^{3,5,6,7,9)}より引用)

使用 IFN	治療期間	SVR 率
IFN α ⁵⁾	24W	98%
IFN α ³⁾	4W	87%
Peg-IFN α ⁷⁾	24W	94%
Peg-IFN α ⁹⁾	24W	80%
IFN α ⁶⁾	24W	75%

療を開始した7例中4例がSVRとなり、SVR率は57%であった。25週以降に治療を開始した11症例においてはSVR率は55%であった。12週までに治療を開始すればgenotypeやウイルス量に関係なく全例SVRとなった。C型急性肝炎への治療開始時期は8週間の経過観察を行い、8週目にHCV RNAが陽性であれば12週目までに治療を開始するのが最良の方法である。

2) インターフェロン治療方法

C型急性肝炎へのインターフェロン治療効果は良好である(表1)。24週間治療を行えば約90%前後のSVR率が得られる。インターフェロン単独治療で十分である。従来型のインターフェロン α 製剤やインターフェロン β 製剤を用いるときは、4週間の連続治療が望ましい^{3,5)}。短期治療を行うのであれば、インターフェロン α 製剤やインターフェロン β 製剤を用いて、8週間の連日投与が望ましい。副作用のことを考えるとリバビリンの併用は、エビデンスも認められていないので避けるべきである。また、ペグインターフェロンを使用する場合は、できれば使用期間は24週の使用が望ましい^{7,9,10)}。

c. 予 後

C型急性肝炎は劇症化、重症化する例が少ないので、一般的に予後は良好であるが、慢性化する場合が多い。このためにも慢性化が疑われた場合は、積極的にインターフェロン治療を行うべきである。

おわりに

C型急性肝炎は、毎年ウイルス性急性肝炎の

約 15% を占めている。今後はピアスや tattoo の施行者、覚醒剤使用者などの若年化や増加に伴い、若年者の C 型急性肝炎患者が増加することも考えられる。初期には臨床症状が軽いので、

診断にはまずは C 型急性肝炎ではと疑ってみることが重要である。治療は HCV RNA が 3 カ月間陽性の場合はインターフェロン治療を勧めるべきである。

■ 文 献

- 1) Yano K, et al: Dynamic epidemiology of acute viral hepatitis in Japan. *Intervirology* 53: 70-75, 2010.
- 2) Hofer H, et al: Spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C can be predicted by repeated measurements of serum viral load. *Hepatology* 37: 60-64, 2003.
- 3) Nomura H, et al: Short-term interferon-alfa therapy for acute hepatitis C: a randomized controlled trial. *Hepatology* 39: 1213-1219, 2004.
- 4) Gerlach JT, et al: Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 125: 80-88, 2003.
- 5) Jaeckel E, et al: Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med* 345: 1452-1457, 2001.
- 6) Delwaide J, et al: Treatment of acute hepatitis C with interferon alpha-2b: early initiation of treatment is the most effective predictive factor of sustained viral response. *Aliment Pharmacol Ther* 20: 15-22, 2004.
- 7) Santantonio T, et al: Efficacy of a 24-week course of PEG-interferon alpha-2b monotherapy in patients with acute hepatitis C after failure of spontaneous clearance. *J Hepatol* 42: 329-333, 2005.
- 8) Alter HJ: New kit on the block: evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. *Hepatology* 15: 350-353, 1992.
- 9) Kamal SM, et al: Pegylated interferon alpha therapy in acute hepatitis C: relation to hepatitis C virus-specific T cell response kinetics. *Hepatology* 39: 1721-1731, 2004.
- 10) Kamal SM, et al: Peginterferon alfa-2b therapy in acute hepatitis C: impact of onset of therapy on sustained virologic response. *Gastroenterology* 130: 632-638, 2004.

新しいプロテアーゼ阻害剤：MK7009

野村 秀幸*

索引用語：プロテアーゼ阻害剤，MK7009，C型慢性肝炎，ペグインターフェロン，リバビリン

1 はじめに

1. 日本におけるC型肝炎に対するインターフェロン療法の変遷

C型慢性肝炎に対して1992年からインターフェロン治療が開始された。難治例といわれる日本人に多いジェノタイプ1b型・高ウイルス量例に対しての24週間のインターフェロン単独療法の治療効果(著効率，SVR率：HCV RNAの持続陰性化)は，10%以下であった。2004年からペグインターフェロンとリバビリンによる48週間の併用療法が開始されSVR率は約48%と向上し，現在の標準治療となっている¹⁾。48週間治療では，HCV RNAが12週目以降に陰性化した症例では再燃率が高いため，レスポンスガイド治療を取り入れ72週間治療が推奨され，SVR率が約60%前後まで向上した。しかし，現在の標準療法であるペグインターフェロン・リバビリン併用療法にはいくつかの問題点がある。1)高齢者への治療効果が低い，2)治療期間が48週間から72週間と長い，3)再燃率が

高い，4) SVR率が60%前後である，5)治療中止例のSVR率が低い，などである。治療期間の短縮，再燃率の低下，SVR率の向上を目指すため，現在のペグインターフェロン・リバビリン併用療法にプロテアーゼ阻害剤を追加した3者併用療法の登場が待たれる。

2. 国内におけるMK7009の開発

すでに米国においては，TelaprevirやBoceprevirといったプロテアーゼ阻害剤が発売されており，日本においても2011年末までにはTelaprevirとペグインターフェロン・リバビリンによる3剤併用療法が実施可能の予定である。それらのプロテアーゼ阻害剤に続き，次世代のDAAs (Direct Acting Antiviral Drugs) 製剤として，新たなプロテアーゼ阻害剤も開発が続けられている。MK7009は，次世代のプロテアーゼ阻害として開発されており，日本では第II相試験を経て，2011年には第III相試験が開始されている。

Hideyuki NOMURA : New protease inhibitor: MK7009

*新小倉病院 [〒 803-8505 福岡県北九州市小倉北区金田 1-3-1]

対象：ジェノタイプ1型, 初回治療例

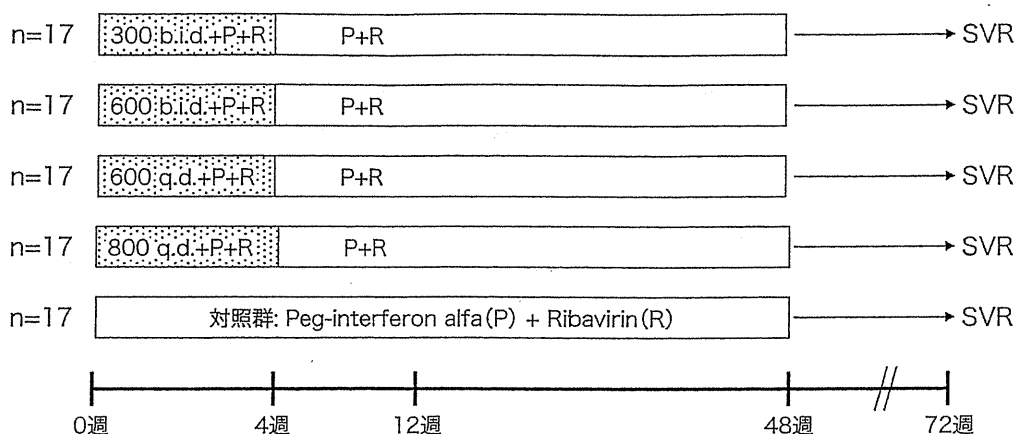


図1 MK-7009 第II相試験(007試験)スタディデザイン

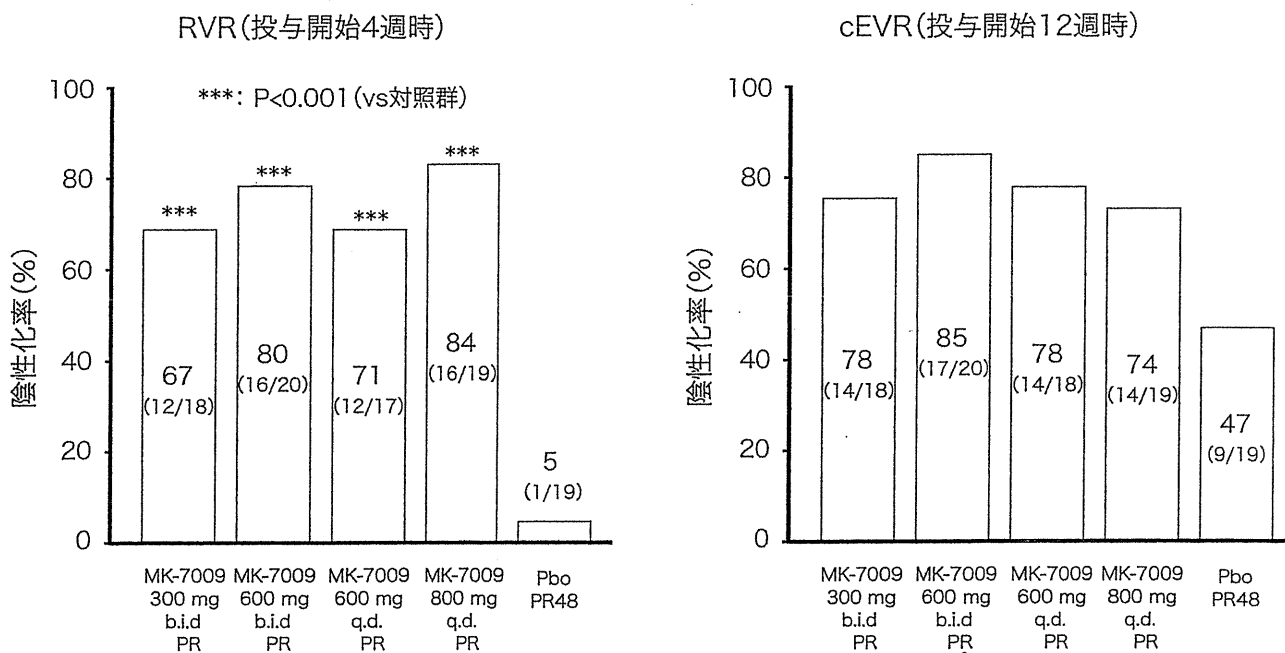


図2 MK-7009 第II相試験(007試験)陰性化率(RVR, cEVR)

2 MK7009のプロファイル

1. 分子構造

プロテアーゼ阻害剤はその分子構造から直鎖状(linear)と大環状(macrocyclic)に分けられるが、第一世代とされるTelaprevirやBoceprevirがlinearであるのに対して、TMC435と同様にMK7009はmacrocyclicに分類される。

2. 作用部位

C型肝炎ウイルス(HCV)は、約3,000アミノ酸からなるopen reading frame (ORF)からなり、Core (C), envelope (E1/2)などで構成される構造蛋白領域と非構造領域(NS2/3/4A/4B5A/5B)がある。非構造領域のひとつであるNS3領域は、非構造蛋白質のプロセッシングに関与するだけでなく、HCVのC末端側のATPase活性およびRNAヘリカーゼ活性によって遺伝子複製に関与

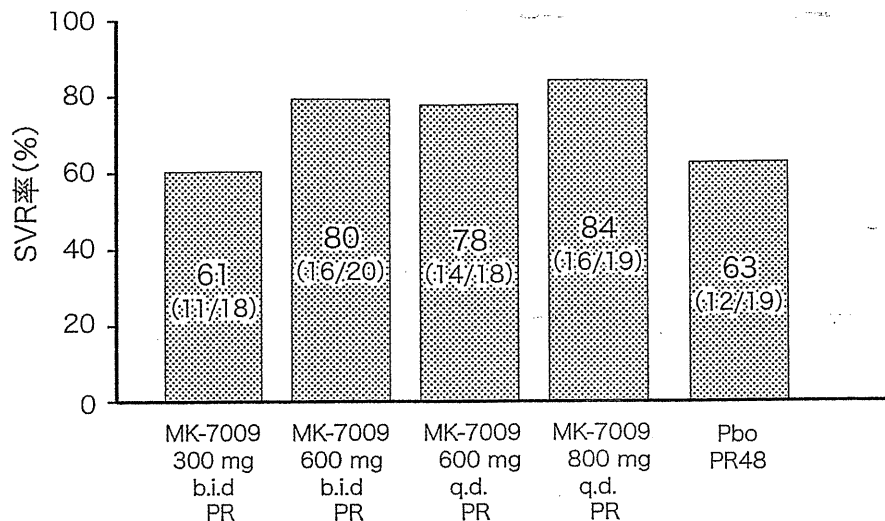


図3 MK-7009 第II相試験(007試験) SVR率

したり、TLR (toll-like receptor)の活性化や ISG (interferon stimulated gene)の発現阻害に関与することも報告される領域でもある。このNS3によりコードされるHCV由来のセリンプロテアーゼは極めて重要な働きがあり、そのセリンプロテアーゼを標的として阻害しウイルス増殖を抑制する薬剤がセリンプロテアーゼ阻害剤である。

MK7009は、NS3/4Aセリンプロテアーゼ阻害剤のひとつであり、NS3/4Aセリンプロテアーゼを選択的に阻害することによりHCV増殖抑制作用を発揮する薬剤である。

3

MK7009の海外試験 (第II相試験) 成績

1. 007試験 (Genotype1, 初回治療例)

欧米においてMK7009は、第II a相試験が実施されており、MK7009の用量検索的な試験として少数の検討結果がAASLD2010で報告されている(図1～図3)²⁾。007試験は、ジェノタイプ1型の初回治療例を対象として実施された試験であり、1群17例ずつで、MK7009を300b.i.d./600b.i.d./600q.d./800q.d.で4週間ペグインターフェロンとリバビリン

に併用し3者併用療法を行い、その後44週間のペグインターフェロン+リバビリン併用療法を行う臨床試験である。その結果、SVR率はMK7009 300 mg b.i.d.群で61% (11/18)、600 mg b.i.d.群で80% (16/20)、600 mg q.d.群で78% (14/18)、800 mg q.d.群で84% (16/19)であり、プラセボ群で63% (12/19)のSVR率に比べて、600 mg b.i.d.、600 mg q.d.群、800 mg q.d.群は高いSVR率が確認されている。

4

MK7009の特異的なメリット

1. 良好な認容性

MK7009の007試験では、有効性の向上が確認されるとともに第一世代のプロテアーゼ阻害剤で認められる特異的に増加する有害事象(皮膚障害、ヘモグロビン値減少)の報告はなく、良好な認容性が確認されている。

皮膚障害：

対照群であるプラセボ+ペグインターフェロン+リバビリン併用療法に比べて、皮膚障害の発現率に有意差はなかった。

ヘモグロビン値減少：

リバビリンに起因すると考えられるヘモグ

表1 ヒト臨床試験および *in vitro* で確認されたNS3プロテアーゼ阻害剤の耐性変異

	V36A/M	T54S/A	V55A	Q80R/K	R155K/T/Q	A156S	A156T/V	D168A/V/T/H	V170A/T
Telaprevir (linear)			*						*
Boceprevir (linear)							*		
SCH900518 (linear)									
BILN-2061** (macrocylic)									
ITMN191/R7227 (macrocylic)						*	*		
MK-7009 (macrocylic)									
TMC435350 (macrocylic)									
BI-201335 (macrocylic?)									

* Mutations associated with resistance *in vitro* but not described in patients so far

** Mutations associated with resistance *in vitro*

ロビン値減少はあるものの、Telaprevirによる3剤併用療法でみられる急激なヘモグロビン値減少は認められなかった。

ビリルビン値上昇：

次世代のプロテアーゼ阻害剤に位置づけられるTMC435では、肝細胞における胆汁トランスポーターシステムへの競合阻害によるものと考えられているビリルビンの上昇が認められているが、MK7009では対照群に比べてもビリルビン値の上昇が認められる報告もなかった。

2. 少ない耐性変異の出現

新しい治療薬として、日常臨床への応用が可能となっているTelaprevirでは、治療効果や安全性に加えて耐性ウイルスの出現についても懸念されている。プロテアーゼ阻害剤には、直鎖状(linear)と大環状(macrocylic)が

あり、それぞれの耐性変異の特性については違いがあることが報告されている³⁾。

つまり、プロテアーゼ阻害剤を単独で投与した場合には、直鎖状プロテアーゼ阻害剤ではNS3領域に起こりうる変異の箇所も種類も多い。一方、大環状プロテアーゼ阻害剤では直鎖状のものに比べて箇所も種類も少ない(表1)。耐性ウイルスが出現した場合、その後にてくるさらに新しい薬剤あるいは違う作用機序を有する薬剤での治療により効果があげられるのかがポイントとなるが、将来的なことを想定した場合においても耐性変異に与える影響が少ない薬剤が望まれると考えられる。

今回現在第Ⅲ相試験が進行中のMK7009について述べた。プロテアーゼ阻害剤を加えたペグインターフェロン・リバビリン3者併用

療法により、高いSVR率を到達することが可能となった。第一世代のプロテアーゼ阻害剤に比べ、副作用の少ない第二世代のプロテアーゼ阻害剤が開発され、副作用のより少ない、治療効果のより高い治療が今後望まれる。しかし、まだ未知の副作用、耐性ウイルスの出現など多くの課題が残されている。今後、現在臨床治験中の抗ウイルス剤の開発を見守って行く必要がある。

文 献

- 1) Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC et al : Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358 : 958-965, 2001
- 2) Michael P Manns et al : AASLD 2010 (abstract, #82)
- 3) Sarrazin C, Zeuzem S : Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 138 : 447-462, 2010

* * *

Fibroblast growth factor-2 enhances NK sensitivity of hepatocellular carcinoma cells

Hinako Tsunematsu^{1*}, Tomohide Tatsumi^{1*}, Keisuke Kohga¹, Masashi Yamamoto¹, Hiroshi Aketa¹, Takuya Miyagi¹, Atsushi Hosui¹, Naoki Hiramatsu¹, Tatsuya Kanto¹, Norio Hayashi² and Tetsuo Takehara¹

¹Department of Gastroenterology and Hepatology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

²Kansai-Rosai Hospital, Amagasaki, Hyogo, Japan

The roles of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the hepatocellular carcinoma (HCC) development are still controversial. In this study, we investigated the expression of FGF-2 in chronic hepatitis (CH) type C patients with or without HCC and the immunoregulation of FGF-2 in NK sensitivity of HCC cells. The FGF-2 expressions were detected in the liver tissues of patients, but not in normal liver. The serum FGF-2 levels of the patients with CH, liver cirrhosis (LC) or HCC were significantly higher than those of healthy volunteers. The serum FGF-2 levels of patients decreased with the progression of chronic liver disease. HCC occurrence of LC patients with high levels of serum FGF-2 was significantly lower than that with low levels of serum FGF-2. Proinflammatory cytokines, such as IL-1 β and IL-6, induced FGF-2 expressions in HCC cells and normal hepatocytes. FGF-2 stimulation resulted in increasing the expression of the membrane-bound major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA), an NK activating molecule, and decreasing that of human leukocyte antigen (HLA) class I, an NK inhibitory molecule, on HCC cells. This did not occur with normal hepatocytes. Adding anti-FGF receptor-2 neutralizing antibody resulted in inhibiting the change of MICA and HLA class I expressions on FGF-2 stimulated HCC cells. FGF-2 stimulation on HCC cells resulted in increasing NK sensitivity against HCC cells. These findings indicate that FGF-2 produced by HCC cells or normal hepatocytes of chronic liver disease may play critical roles in eliminating HCC cells by innate immunity.

Fibroblast growth factor (FGF)-2 is one of a family of FGFs that includes 22 structurally related members.¹ FGF-2 has been shown to exert a potent angiogenic effect by interacting with tyrosine kinase receptors, FGFR1, FGFR2 and FGFR3, in various cancers including hepatocellular carcinoma (HCC).²⁻⁴ Aside from its angiogenic effect, FGF-2 has also been shown to act as a mitogen for HCC cell proliferation via an autocrine mechanism.⁵ Uematsu *et al.* reported that the serum FGF-2 of chronic liver disease patients without

HCC tended to be higher than that of those with HCC.⁶ Decrease of serum FGF-2 could be observed prior to the emergence of HCC, and this suggests that FGF-2 may play a critical role in the surveillance of HCC. However, the immunological significance of elevating the FGF-2 levels in chronic liver disease patients remains unclear.

HCC is one of the leading causes of cancer deaths worldwide. Chronic liver disease caused by hepatitis virus infection and nonalcoholic steatohepatitis leads to a predisposition for HCC, with liver cirrhosis (LC), in particular, being considered a premalignant condition.^{7,8} The liver contains a large compartment of innate immune cells (NK cells and NKT cells) and acquired immune cells (T cells),^{9,10} but the activation process of these immune cells in HCC development remains unclear. A recent study has demonstrated that the innate immune system may play a critical role in tumor surveillance via an NKG2D signal.¹¹ Knowing the details of how to activate the abundant NK cells in the liver could lead to the establishment of attractive new strategies for HCC treatment.

In this study, we investigated the expression of FGF-2 in chronic hepatitis (CH) type C patients with or without HCC and the immunoregulation of FGF-2 in NK sensitivity of HCC cells. Of importance are the findings that serum FGF-2 levels in patients with CH and LC without HCC were significantly higher than that in those with HCC and that FGF-2 enhanced the NK sensitivity of HCC cells. The present study

Key words: FGF-2, hepatocellular carcinoma, NK cells, MICA, HLA class I

Grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan

DOI: 10.1002/ijc.26003

History: Received 27 Sep 2010; Accepted 9 Feb 2011; Online 23 Feb 2011

*H.T. and T.T. contributed equally to this work and share the first authorship.

Correspondence to: Tomohide Tatsumi, Department of Gastroenterology and Hepatology, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, Tel.: +81-6-6879-3621, Fax: +81-6-6879-3629, E-mail: tatsumit@gh.med.osaka-u.ac.jp

Table 1. Clinical backgrounds

	Normal	Hepatitis	Cirrhosis	HCC
Number	24	80	84	112
				Stage I/II 51
				Stage III/IV 61
Sex (M/F)	12/12	45/35	44/40	67/45
Age	64 ± 15	56 ± 13	62 ± 13	66 ± 11
Etiology		HCV	HCV	HCV

Abbreviations: Stage: TNM stage; M: male; F: female; HCV: hepatitis C virus.

sheds light on previously unrecognized immunological effects of FGF-2 on HCC cells and thus suggests a role of FGF-2 in HCC development in patients with CH type C.

Material and Methods

Liver tissues and immunohistochemistry

Human HCC tissues ($n = 6$) and normal liver tissues ($n = 2$) were obtained at surgical resection. CH tissues ($n = 4$) and LC tissues ($n = 4$) were obtained as liver biopsy samples. Informed consent, under an Institutional Review Board-approved protocol, was obtained from all patients before sample acquisition. Liver sections were subjected to immunohistochemical staining using the ABC procedure (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The primary antibody (Ab) was antihuman FGF-2 Ab (Abcam, Cambridge, MA). To confirm the specificity of the staining, the primary antibody was incubated with recombinant human FGF-2 protein (R&D Systems, Minneapolis, MN) for 3 hr and then applied onto liver sections in parallel with staining of the primary antibody as the absorption test.

HCC cell lines

HepG2 and PLC/PRF/5, human hepatoma cell lines, were purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD) and were cultured with Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO/Life Technologies, Grand Island, NY) in a humidified incubator at 5% CO₂ and 37°C.

ELISA

The sera from CH patients ($n = 80$), LC patients ($n = 84$), HCC patients ($n = 112$, Stage I/II $n = 51$ and Stage III/IV $n = 61$) and age-matched healthy volunteers (HVs) ($n = 24$) were subjected to analysis of the FGF-2 level. Clinical backgrounds of patients were summarized in Table 1. Informed consent, under an Institutional Review Board-approved protocol, was obtained from all patients before sample acquisition. The level of FGF-2 and soluble major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) were determined using Quantikine Human FGF basic (R&D Systems) and DuoSet MICA eELISA kit (R&D Systems), respectively.

HCC cells and normal hepatocytes cultures

Both HepG2 and PLC/PRF/5 cells or normal hepatocytes (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA) were cultured for 72 hr in the presence or absence of human interleukin-1 β (IL-1 β) (50 ng/ml, Peprotech, Rocky Hill, NJ), human IL-6 (300 ng/ml, Peprotech), human transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) (50 ng/ml, R&D Systems) and human tumor necrosis factor- α (TNF- α) (100 ng/ml, Peprotech), and the treated cells were harvested and evaluated for expression of FGF-2. In some experiments, HepG2 and PLC/PRF/5 cells were cultured in the presence or absence of recombinant human FGF-2 protein (250 ng/ml, R&D Systems) with or without antihuman FGFR2 neutralizing Ab (10 μ g/ml, R&D Systems) for 48 hr, and the hepatoma cells were harvested and evaluated for the immunological regulation of the NK cells.

Flow cytometry

For the detection of membrane-bound MICA, cells were incubated with anti-MICA specific Ab (2C10, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and stained with Goat F(ab')₂ fragment anti-Mouse IgG(H+L)-PE (Beckman Coulter, Fullerton, CA) as a secondary reagent and then subjected to flow cytometric analysis. For the detection of human leukocyte antigen (HLA) class I, cells were incubated with PE-conjugated antihuman HLA-A,B,C Ab (w6/32, BD Biosciences, San Jose, CA). Flow cytometric analysis was performed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Western blotting

The total cellular protein was electrophoretically separated using sodium dodecyl sulfate-12% polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membranes. The membranes were blocked in Tris-buffered saline-Tween20 containing 5% skim milk for 1 hr and then probed with rabbit polyclonal Ab to FGF-2 (Abcam) at room temperature overnight. Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG and SuperSignal West Pico System (Pierce, Rockford, IL) were used for the detection of blots.

Real-time RT-PCR

Total RNA was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen K.K., Tokyo, Japan) and was reverse transcribed using High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). The mRNA levels were evaluated using ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Ready-to-use assay (Applied Biosystems) was used for the quantification of FGF-2 (ID: Hs00960934_m1), MICA (Hs00792195_m1) and β -actin (Hs:99999903_m1) mRNAs according to the manufacturer's instructions. β -actin mRNA from each sample was quantified as endogenous control of internal RNA.