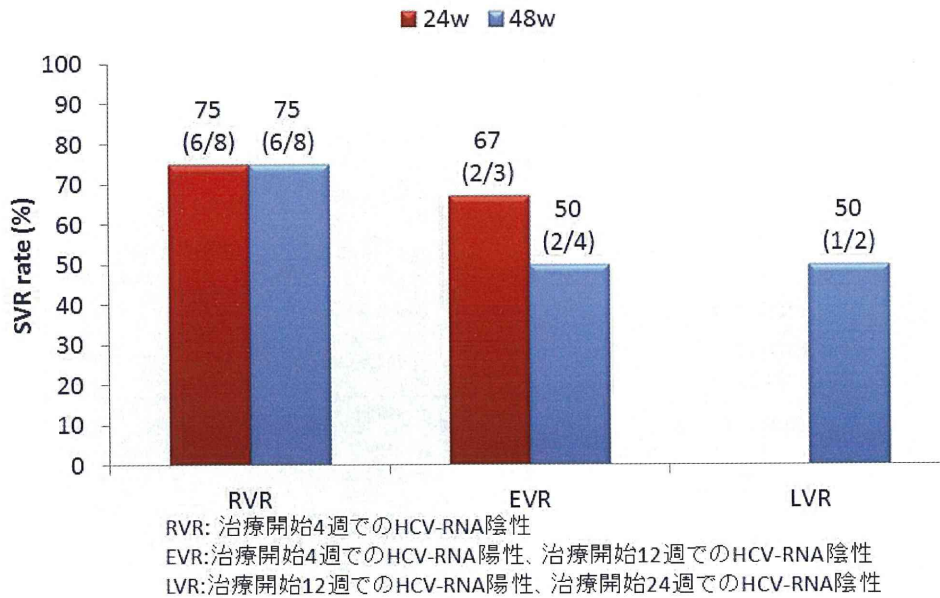


パネル1 1

Peg-IFN/RBV再治療効果 (serotype2)
(再治療反応性別、再治療期間別)



パネル1 2

前治療再燃例における
再治療での薬剤投与量・投与期間と治療効果

<前治療: Relapse → 再治療: Relapse>

Factor	前治療	再治療	P-value
Peg-IFN dose α2b	1.12 ± 0.26	1.18 ± 0.23	0.50
Ribavirin dose	10.25 ± 1.78	10.04 ± 1.37	0.69
Treatment duration	23.9 ± 0.45	33.4 ± 11.0	0.036

<前治療: Relapse → 再治療: SVR>

Factor	前治療	再治療	P-value
Peg-IFN dose α2b	1.35 ± 0.29	1.32 ± 0.30	0.58
Ribavirin dose	9.72 ± 2.02	10.27 ± 2.30	0.40
Treatment duration	24.3 ± 1.3	36.9 ± 12.0	0.001

パネル 13

初回治療副作用中止例

初回治療副作用中止：28例

再治療

中止理由	症例数		
発疹	4例	HCV serotype: 1型:21例、2型:7例	
倦怠感	3例	完遂症例: 25例(89%) (初回PLT減少:2例→摘脾術施行を含む)	
好中球減少	3例	治療効果:	SVR:11例 (8/3) Relapse:3例 (2/1) NR:6例 (6/-)
血小板減少	2例	著効率:	1型: 50% (8/16) 2型: 75% (3/4)
うつ症状	2例	中止症例: 3例	
AST/ALT上昇	2例	中止理由:	α2a:RA(初回:発疹) α2b:発疹(初回:発疹) 倦怠感(初回:鬱)
肺炎	2例		
Hb減少、精神症状、関節痛、食欲不振、嘔吐、咳嗽、腹水、注射部反応、肛門周囲膿瘍、RA症状悪化	1例		

Ⅲ. 分担研究報告

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

血小板減少による肝線維化増悪の分子機序

研究代表者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨：血小板減少は慢性肝炎/肝硬変患者に高頻度に併発する合併症であり、血小板数と肝線維化の間には強い負の相関関係が認められる。血小板数の低下は C 型肝炎に対する Peg-IFN/RBV 治療の非奏効に強く関与するのみならず、肝臓に対する侵襲的治療を行う際の障害になる等肝疾患診療上の重要な問題であるが、血小板減少自体が肝線維化の病態形成にどのような影響を与えるかは十分に理解されていない。そこで本研究では血小板減少が肝線維化に与える影響を検討すると共に、血小板の肝疾患における役割について遺伝子改変マウスを用いて検討を行った。平成 21 年度において、我々は血小板の寿命を制御する分子である Bcl-xL を血小板特異的に欠損させることで血小板減少マウスを作成し、血小板減少が胆汁鬱滞性肝障害モデルにおいて肝線維化を増悪させることを明らかにした。また血小板の肝線維化抑制作用として、活性化した血小板から放出される HGF が肝星細胞の I 型コラーゲン産生を抑制することを見出した。平成 22 年度は、血小板減少状態では胆汁鬱滞性肝障害において HGF/Met 経路の十分な活性化が生じず、このことが血小板減少による肝線維化増悪の原因である事を証明した。平成 23 年度は、ヒト血小板がマウスと同様肝星細胞の I 型コラーゲン産生抑制という抗線維化作用を有している事を明らかにした。更に、我々は血小板特異的 HGF 欠損マウスを作成し、血小板由来 HGF の欠損により劇症肝炎モデルにおいて肝障害が増悪し生存率が低下することを明らかにした。これらの研究結果から、血小板減少が肝線維化の増悪因子であり、血小板は肝線維化や劇症肝炎等の肝疾患に対して肝保護的に作用していることが示された。またそれらの分子機序として血小板由来 HGF が重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

共同研究者

小玉 尚宏 大阪大学消化器内科学

慢性肝炎/肝硬変は肝線維化を病態の中心とする疾患であり、進展すると肝不全や肝細胞がんなどの致死的な疾患を引き起こすことから、その進行を阻止することは喫緊

A. 研究目的

の重要な課題である。一方、慢性肝炎/肝硬変では、病態の進行に伴い血小板が減少し、肝線維化と血小板数は非常に密接な負の相関関係にあることが知られている。この血小板減少は、門脈圧亢進に伴う二次性脾機能亢進症により脾臓における血小板破壊が亢進することや、肝臓での TPO (Thrombopoietin) 産生低下に起因しており、つまり肝線維化が進行した結果であると考えられている。血小板数の低下は C 型肝炎に対する Peg-IFN/RBV 治療の非奏効に強く関与するのみならず、肝癌に対する侵襲的治療を行う際の障害になる等肝疾患診療上の重要な問題であるが、この血小板減少自体が肝線維化の病態形成にどのような影響を与えるかは十分に理解されていない。近年、血小板はその生理学的な凝固・止血機能のみならず、組織修復、血管新生など多彩な機能を有していることが明らかにされており、肝臓領域においても炎症や再生に関与することが報告されているが、肝線維化に対する血小板の作用は明らかにされていない。そこで本研究では血小板減少が肝線維化に与える影響を検討すると共に、血小板の肝疾患における役割について遺伝子改変マウスを用いて検討を行った。

B. 研究方法

1. 血小板の寿命を制御する分子である Bcl-xL を血小板特異的に欠損させる為に Pf4-Cre bcl-xf1/fl マウスを血小板減少マウスとして bcl-xf1/fl マウスを対照マウスとして、これらのマウスに総胆管結紮術（以下 BDL）を施行し、10 日後に犠死させ試料を採取した。肝線維化について肝組織シリウスレッド染色並びに real time RT-PCR 法に

よる肝組織 I 型コラーゲン遺伝子発現にて評価した。また、血清 HGF 濃度を ELISA 法にて、肝組織での Met のリン酸化を WB 法に検討した。

2. *in vitro* において、C57BL/6J マウスから単離した肝星細胞と血小板を 6 時間共培養し、肝星細胞の I 型コラーゲン遺伝子発現について検討した。また、培養上清中の HGF 濃度並びに肝星細胞の Met のリン酸化を検討した。Met 並びに negative control siRNA を導入した肝星細胞と血小板を 6 時間共培養し、肝星細胞の I 型コラーゲン遺伝子発現について検討した。

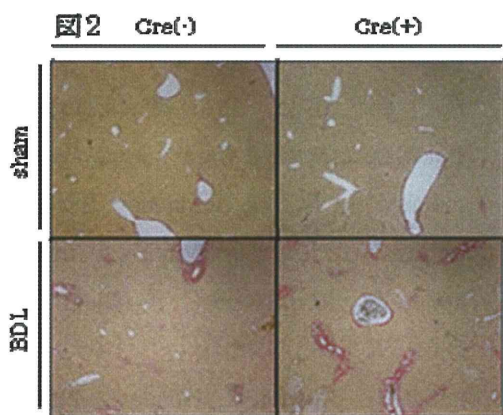
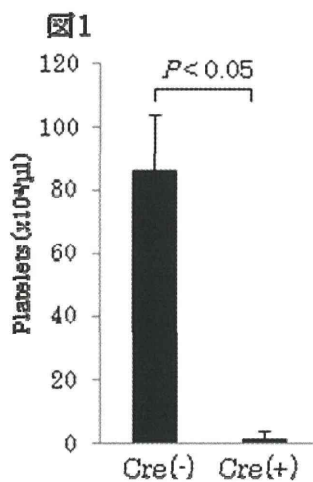
3. 治療実験として血小板減少マウス並びに対照マウスに対して BDL 施行後、ヒト HGF あるいは vehicle の 10 日間連日腹腔内投与を行い、肝線維化について評価した。

4. 健常人から抽出した血小板とヒト肝星細胞株 (LI90) を 6 時間共培養し、LI90 細胞での I 型コラーゲン遺伝子発現について検討した。

5. Pf4-Cre HGF fl/fl マウスと HGF fl/fl マウスを交配し、前者を血小板特異的 HGF 欠損マウス、後者を対照マウスとして実験に使用した。これらのマウスに LPS 0.4ug/kg+GalN 800mg/kg の腹腔内投与を行い、6 時間後犠死させ試料を採取した。肝障害について血清 ALT 値を測定し評価を行った。また、これらのマウスに対して LPS 10ug/kg+GalN 800mg/kg を腹腔内投与し、その後の生存率について検討した。

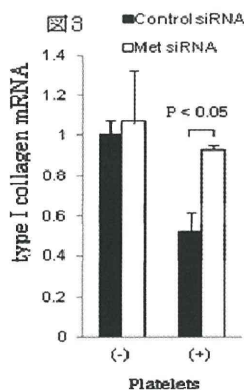
C. 研究成果

血小板特異的 Bcl-xL 欠損マウスは正常に発育し、著明な血小板減少を呈したが、他の血球系や肝臓に異常を認めなかった (図



BDLにより、血小板減少マウスでは対照マウスと比しI型コラーゲンの遺伝子発現が有意に増加し、肝線維化が増悪した(図2)。

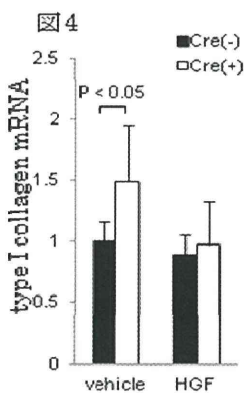
*in vitro*において、肝星細胞と血小板の共培養により、血小板濃度依存的に肝星細胞のI型コラーゲン遺伝子発現は減弱した。また、血小板と肝星細胞の共培養により、培養上清中のHGF濃度が増加し、肝星細胞のMetが活性化した。肝星細胞へのMet siRNAの導入により、血小板との共培養により生じた肝星細胞でのI型コラーゲン遺伝子発現減弱は消失した(図3)。



ことから血小板は、肝星細胞との共培養によりHGFを放出して、Met依存的に肝星細胞のI型コラーゲン産

生を抑制することが示された。野生型マウスではBDL後血清HGF値が有意に増加したが、血小板減少マウスではこの上昇を認めなかった。また、野生型マウスではBDL後に肝臓内Metの活性化を認めたが、血小板減少マウスでは認めなかった。血小板減少マウスに対するHGFの連日投与によりBDL後の肝線維化の増悪は対照マウスのレベルにまで改善した(図4)。

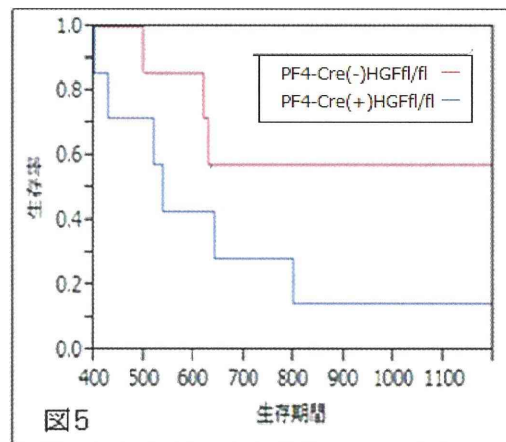
ヒト血小板とLI90細胞との共培養により、



LI90細胞でのI型コラーゲン遺伝子発現は減弱した。

LPS/GalNの腹腔内投与により、血小板特異的HGF欠損マウス、対照マウス共に著明な肝障害を認め、

ALT値は血小板特異的HGF欠損マウスにおいて有意に高値を呈した。また、LPS/GalN投与後の生存率は血小板特異的HGF欠損マウスにおいて低値であった(図5)。



D. 考察と結論

血小板には、活性化によりHGFを放出し、Met依存的に肝星細胞のI型コラーゲン産

生を抑制するという新規の抗線維化作用が存在することが明らかとなり、この制御機構は生体レベルでも働いていることが示された。また、血小板減少自体が肝線維化を増悪させることが示され、かつヒト血小板が肝線維化抑制作用を有することから、慢性肝炎/肝硬変患者に併発する血小板減少は肝線維化進展抑制を目指した治療標的になる可能性があると考えられた。更に、血小板は肝線維化のみならず劇症肝炎においても肝保護的に作用している事が明らかとなり、それらの分子機序として血小板由来 HGF が重要な役割を果たしている事が示された

E. 研究発表

論文発表

1. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Ohkawa K, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. The let-7 family of microRNAs negatively regulates Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. **J Hepatol** **52**: 698-704, 2010.
2. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Tadokoro S, Ido A, Tsubouchi H, Hayashi N. Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. **Gastroenterology** **138**: 2487-2498, 2010.
3. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ishida H, Miyagi T, Hosui A, Hayashi N. Sorafenib inhibited the shedding of MICA on hepatocellular carcinoma cells by downregulating ADAM9. **Hepatology** **51**: 1264-1273, 2010.
4. Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. **Hepatology** **52**: 1310-1321, 2010.
5. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Yin XM, Hayashi N, BH3-only activator proteins, Bid and Bim, are dispensable for Bak/Bax-dependent thrombocyte apoptosis induced by Bcl-xL deficiency: Molecular requisites for the mitochondrial pathway to apoptosis in platelets. **J Biol Chem** **286**:13905-13913, 2011
6. Ishida H, Tatsumi T, Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N Takehara T. Alterations in microRNA expression profile in HCV-infected hepatoma cells: Involvement of miR-491 in regulation of HCV replication via the PI3 kinase/Akt pathway. **Biochem Biophys Res Commun** **412**:92-97, 2011
7. Shigekawa M, Takehara T, Kodama T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Involvement of STAT3-regulated hepatic soluble factors in attenuation of stellate cell activity and liver fibrogenesis in mice. **Biochem Biophys**

- Res Commun** 406:614-620, 2011
8. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Shigekawa M, Tsunematsu H, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Kubota S, Takigawa M, Tomimaru Y, Tomokuni A, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N, Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. **J Clin Invest** 121:3343-56, 2011
 9. Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Shimizu S, Tsujimoto Y, Hayashi N, Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bax/Bak-deficient mice. **Hepatology** 54: 240-251, 2011
 10. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Hiramatsu TK, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. **Int J Cancer**, in press
 11. Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Li W, Shigekawa M, Tanaka S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Morii E, Hayashi N, Takehara T. Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. **J Hepatol**. In press.
- 学会発表
- The 60th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease, Oct 30-Nov 3, 2009, Boston**
Thrombocytopenia deteriorates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. *Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Tadokoro S, Ido A, Tsubouchi H, Hayashi N.*
- The 61st Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease Oct 29-Nov 2, 2010 Boston**
ABT-737, a Bad mimetic Bcl-xL inhibitor, enhances the anti-tumor effect of sorafenib against hepatocellular carcinoma. *H. Hikita; T. Takehara; S. Shimizu; T. Kodama; W. Li; M. Shigekawa; A. Hosui; T. Miyagi; H. Ishida; T. Tatsumi; T. Kanto; N. Hiramatsu; N. Hayashi*
- Digestive Disease Week 2011 May 7~May 10, 2011 Chicago**
A crucial role of hepatocyte p53 in liver fibrogenesis. *Takahiro Kodama, Tetsuo Takehara, Satoshi Shimizu, Hayato Hikita, Minoru Shigekawa, Hinako Tsunematsu, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Hisashi Ishida, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi*
- elayed onset of caspase-dependent liver failure induced by Fas stimulation in Bak and Bax double knockout mice. *Hayato Hikita, Takahiro*

Kodama, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Atsushi Hosui, Takuya Miyagi, Hisashi Ishida, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi, Tetsuo Takehara.

The 62nd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease

Nov 4~Nov 8, 2011 San Francisco

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

Continuous hepatocyte apoptosis is sufficient for liver cancer development. *Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Satoshi Tanaka, Atsushi Hosui, Takuya Miyagi, Hisashi Ishida, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi, Tetsuo Takehara*

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

「C型慢性肝炎に対する宿主遺伝子多型とウイルス変異による治療効果」

研究分担者：泉 並木 武蔵野赤十字病院副院長

研究要旨：わが国の Genotype 1b かつ高 HCVRNA の C 型慢性肝炎症例では、ペグインターフェロンと利バビリン併用治療によってウイルス排除が約半数に得られる。宿主遺伝子多型が治療効果に関与するため、解析した。IL28B の minor allele では治療中に HCVRNA が陰性化しない無反応例が 54%であるが、SVR が 16%にみられた。IL28B が Major allele の症例では SVR が 54%であった。ITPA が minor allele の場合はリバビリンの投与量が十分確保できるため、SVR が得られると考えられる。これらの宿主要因を加味して治療戦略を考えることが重要である。この中で 15%は治療中に HCVRNA が陰性化しない無反応 (Null-Response; NR) である。この NR では新規プロテアーゼを用いた 3 剤併用療法によるウイルス排除 (Sustained Virological Response: SVR) 率が 11.8%と低い。NR 例では、宿主遺伝子が IL-28B が minor allele であることが最も重要であったが、それ以外に肝線維化と血小板低下が関与していた。データマイニング解析を行うと、5 年以内の肝発癌率や治療を受けたときに SVR が得られる率が個々の症例で評価でき、どの DAA でいつ治療するのかの重要な根拠が得られる。

A. 研究目的

これまでの研究で、Genotype 1b 型の C 型慢性肝炎ではペグインターフェロン (PEGIFN) とリバビリン (RBV) 併用での抗ウイルス効果が宿主遺伝子多型と関連することが報告されている。また、RBV による貧血と ITPA 遺伝子多型が関連することが判明している。最近、C型肝炎の治療薬として直接ウイルス増殖に作用する薬剤の開発が進み、いつどの薬剤で治療を受けるのかが重要になっている。肝癌発生や肝硬変への進行を防止するために、肝臓からウイルスを排除することが最も有用である。第一世代のプロテアーゼ阻害薬であるテラプレビルでは、SVR 率が 73%に向上したが、IL-28B が minor allele の例や前治療が null-response であった場合には効果が低く、さらに耐性ウイルスが出現するリスクがある。ペグインターフェロン

とリバビリン治療を受けた症例を解析し null-response に関与する因子の同定や、肝発癌リスクを個々の症例で検討し、指標となるものを作成することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 2004年以降に当院でPEGIFNとRBV併用によって治療を受けたGenotype 1b型かつ高HCVRNA量のC型肝炎で、宿主遺伝子であるIL28Bの多型を測定しえた865例を対象にした。IL28Bはrs12979860とRs8099917の両者を測定した。ITPA遺伝子多型はrs1127354を測定し、CCをmajor allele, CAまたはAAをminor alleleと分類した。
(2) 治療前のHCVコア70と91変異、およびISDR変異を直接塩基配列決定法によって測定した。治療中にHCVRNAが一度も陰性化しない症例をnull responder (NVR)、一度陰性化した例が再燃した例をrelapserとし、治療終了6カ月後までHCVRNAが陰性になっていた例をsustained virological response (SVR) と判定した。全例治療開始前に肝生検を行い、新犬山分類で肝組織所見を評価した。

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

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

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

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

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

(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

(1) PEGIFN α 2b と RBV 併用治療で、409 例の治療効果判定が行えており、SVR が intention-to-treat (ITT) で 41%、perprotocol (PPS) で 65%であった。治療中 HCVRNA が陰性化しない NVR が 13%、一度 HCVRNA が陰性化するが再燃する relapse 例が 22%であった。

(2) C 型慢性肝炎全体で、re 8099917 が major allele の TT であったのが 73.1%、minor allele の TG が 25.3%、GG が 1.6%であった。major allele の症例では SVR が 54%にみられていたが、relapse が 39%、NVR が 7%であった。一方、minor allele の症例では SVR は 16%であり、relapse は 28%、NVR が 54%であった。

(3) genotype 1b 型でペグインターフェロンとリバビリン併用療法を行って 24 週間目までに HCVRNA が陰性化しなかった NVR に関与

する因子を解析した。単変量解析では、 γ GTP が高いこと、血小板数が低値であること、肝生検で線維化が F3 または F4 の進展例であること、HCVRNA が 6 log IU/mL 以上と高いこと、ISDR の変異数が 1 箇所以下で少ないこと、コア aa70 番が His や Gln に変異していること、IL-28B が TG または GG の minor allele であることが有意であった。

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

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

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

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

D. 考察

わが国では、genotype 1b かつ高 HCVRNA 量の難治性 C 型慢性肝炎が 7 割を占め、治療抵抗性であることが問題となっている。高い発癌率を改善するために治療効果を改善する

ことが重要である。最近、宿主の遺伝子である IL28B の遺伝子多型が、PEGIFN α と RBV 併用療法の効果と関連することが認められ、治療前に測定して治療戦略をたてる必要がある。今後 C 型慢性肝炎では、直接ウイルス増殖を抑制する薬剤とインターフェロン+リバビリン治療が主体になるが、ペグインターフェロンとリバビリン併用療法の無効率では 3 剤併用の効果がでにくい。テラプレビルを含む 3 剤併用療法で治療を行うか否かを決めるために、ペグインターフェロン+リバビリン併用で NVR となるか否かを治療前に予測することが重要となる。

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

E. 結論

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. Predictions of virological response to a combination therapy with pegylated interferon plus ribavirin including virus and host factors. Hepat Res Treat 2010;2010:703602.

(4) Asahina Y, Izumi N et al. Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection. Hepatology 2010;52:518-27.

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 4. 朝比奈靖浩他. 第 46 回日本肝臓学会総会シンポジウム、平成 22 年 5 月 27 日、山形.

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) ペグインターフェロン・リバビリン (PEG-IFN/RBV) 併用療法の簡便な治療前効果予測式の作成とその検証：

48週間のPEG-IFN/RBV併用療法を受けた1型高ウイルス量のC型慢性肝炎患者230例において簡便な治療前治療効果予測式として男性 2点+HCV RNA 量 <1000 KIU/mL 3点+ \geq 血小板15万1点+年齢<60歳1点を作成し著効 (SVR) 率を検討した。0～1点23.8% (10/42)、2～4点48.1% (63/131)、5～7点70.2% (40/57)であった。さらに、108例でこの予測式の妥当性を検証したところ、SVR率が0～1点7.1% (1/14)、2～4点38.6% (22/57)、5～7点70.3% (26/37)と妥当性が示され、それぞれ、低反応群、中等度反応群、中等度～高度反応群と考えられた。また、ISDRとコアのアミノ酸置換とを加味した男性3点+低HCV RNA 量3点+血小板高値1点+低年齢1点+ISDRアミノ酸変異2個以上2点+コア70のアミノ酸変異野生型2点とする治療前治療効果予測式を作成するとSVR率は0～3点4.8% (1/21)、4～7点40% (27/62)、8～12点84% (21/25)であり、さらに精度の高い簡便な予知式が作成されたものと考えた。

2) 難知性のC型慢性肝炎に関する検討：

(Genotype 1型のcEVR症例への延長投与の有用性) Genotype 1型のC型慢性肝炎でPEG-IFN/RBV併用療法にcEVRを示した症例における延長投与の有効性を検討した。48週治療例全体では女性は男性に比して有意 ($P=0.004$) にSVR率が低かったが、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く ($P=0.413$)、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た。

(Genotype 2型での難治要因の検討) Genotype 2型のC型慢性肝炎における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と考えた。

3) 血清ALT持続正常C型慢性肝炎の10年以上の経過と治療成績： わが国における血清ALT持続正常C型慢性肝炎患者の10年以上の長期予後とその治療成績について検討した。44例のALT持続正常C型慢性肝炎患者を13.3 [10.1-18.3] 年間経過観察したところ、5/44例 (11.4%) はALT値持続正常値を続け、28/44例 (11.4%) は一過性ALT値異常、11/44例 (25.0%) は持続的な肝機能異常が出現した。抗ウイルス療法のSVR率はGroup 1で50% (3/6)、Group 2で100% (7/7) であった。

A. 研究目的

1. ペグインターフェロン・リバビリン (PEG-IFN/RBV) 併用療法の簡便な治療前効果予測式の作成

我が国では、1b高ウイルス量のC型慢性肝炎患者数が最も多く、また高齢化しており、安全で経済的・効率的な治療指針の樹立が必要である。そのためには、肝臓非専門医が利用しやすい簡便な治療前の効果予測式で著効が期待される例・難治例を選別することが有用である。我々は約600例の過去のPEG-IFN/RBV併用療法の治療成績をもとに、性別、肝組織の線維化、HCV RNA 量、HCV core やISDRの変異がPEG-IFN/RBV 併用療法の治療成績に密接に関わることを明らかにしてきた。今回、簡便な治療指針の樹立のため、日常臨床で利用可能な因子を含んだPEG-IFN/RBV併用療法の簡便な治療前効果予測式を作成し、その妥当性を前向きに検証した。

2. Genotype 1型C型慢性肝炎に対する治療法の検討 (延長投与の有用性の検討)

現在、難治性のC型慢性肝炎に対しては、最も有効とされるPEG-IFN/RBV 併用療法でも完治例は約半数にしかすぎない。我々の検討では、女性の治癒率が極めて悪くその原因の探求と対策の樹立が急務である。

我々の過去の治療成績では、女性に対してはPEG-IFN/RBV の長期投与が治癒率向上に有用であった。現在、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%と良好であるが女性の治癒率は十分ではない。しかし、cEVR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。この点を明らかにすべく検討を行った。

3. 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、Genotype 2型のC型慢性肝炎患者難治例に対する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。

4. 血清ALT持続正常C型慢性肝炎の10年以上の経過と治療成績

血清ALT持続正常C型慢性肝炎患者の治療の要否については以前より議論されていたところであるが、米国肝臓学会や我が国の肝臓学会の治療ガイドラインにおいては、血清ALT値にとらわれず治療適応を個別に評価することが提唱されている。一方、わが国における血清ALT持続正常C型慢性肝炎患者の10年以上の長期予後は治療指針の樹立に寄与すると考えられるも、その点に関する報告は少なく、今回その予後と治療成績について検討した。

B. 研究方法

1. ペグインターフェロン・リバビリン (PEG-IFN/RBV) 併用療法の簡便な治療前効果予測式の作成

京都府立医大消化器内科と共同研究施設で48週間のPEG-IFN/RBV併用療法を受け、すでに治療効果判定が終了した1b高ウイルス量のC型慢性肝炎患者338例を対象とした。まず、A群(230例)を著効(SVR)例と非SVR例に分類し、単変量・多変量解析をもとに治療前治療効果予測式を作成した。次に、B群(108例)で予測式の妥当性を検証した。さらに、C型

肝炎ウイルスのISDR・Core70の変異の有無を加えた治療前治療効果予測式を作成した。

2. Genotype 1型C型慢性肝炎に対する治療法の検討(延長投与の有用性の検討)

京都府立医大消化器内科と関連施設でPEG-IFN/RBV併用療法を受け、治療効果判定でcEVRと判定されたGenotype 1型高ウイルス量のcEVR患者のうち、48週間投与を受けた約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。

3. 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% \lt (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。

4. 血清ALT持続正常C型慢性肝炎の10年以上の経過と治療成績

血清ALT値持続正常C型慢性肝炎患者44例に関して10年以上の長期予後と抗ウイルス療法の治療成績を検討した。

(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. PEG-IFN/RBV併用療法の簡便な治療前効果予測式の作成

48週間のPEG-IFN/RBV併用療法を受け、すでに治療効果判定が終了した1b高ウイルス量のC型慢性肝炎患者のうち、A群(230例)を著効(SVR)例と非SVR例に分類し、両群間で有意差のあった項目を多変量解析し、オッズ比をもとにSVR予測スコアを作成した。性別、年齢、HCV RNA量、血色素量、血小板値のオッズ比が比較的高く、男性2点+低HCV RNA量(1000KIU/ml以下)3点+血小板高値(15万/ μ l以上)1点+低年齢(60歳以下)1点とした。SVR率は1点以下23.8%(10/42)、2~5点48.7%(74/152)、6~7点80.6%(29/36)であった。今回、B群(108例)10でこの予測式の妥当性を検証したところ、1点以下7.1%(1/14)、2~4点38.6%(22/57)、5~7点70.3%(26/37)であり、それぞれ、低反応群、中等度反応群、中等度~高度反応群と考えられ、予測式の妥当性が示された。また、HCVのISDRとコアのアミノ酸置換とを加味し、単変量解析で有意差の得られた項目に対して多変量解析を行い、男性3点+低HCV RNA量3点+血小板高値1点+低年齢1点+ISDRアミノ酸変異2個以上2点+コア70のアミノ酸変異野生型2点とする治療前治療効果予測式を作成した。SVR率は0~3点4.8%(1/21)、4~7点40%(27/62)、8~12点84%(21/25)であり、さらに精度の高い簡便な予知式が作成されたものと考えた。

2. Genotype 1型のC型慢性肝炎に対する治療法の検討(延長投与の有用性の検討)

Genotype 1型のC型慢性肝炎でPEG-IFN/RBV併用療法において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。

4. 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型慢性肝炎患者への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。

5. 血清ALT持続正常C型慢性肝炎の10年以上の経過と治療成績

44例のALT持続正常C型慢性肝炎患者を13.3[10.1-18.3]年間経過観察した。5/44例(11.4%)はALT値持続正常値を続け、28/44例(11.4%)は一過性ALT値異常、11/44例(25.0%)は持続的な肝機能異常が出現した。また、登録時に血清ALT値が20 IU/L以上であった症例では早期にALT値異常となる傾

向にあった。血清ALT値異常を認めた症例に対する抗ウイルス療法のSVR率はGroup 1で50% (3/6)、Group 2で100% (7/7)であった。

D. 考察

C型慢性肝炎患者の高齢化に伴い、安全で経済的・効率的な治療指針の樹立が必要である。そのためには、治療前に効果予測を行い、著効例・難治例を選別することが重要である。また、肝臓専門医以外の一般内科医が利用しやすい簡便な治療前の効果予測式で著効が期待される例・難治例を選別することは潜在的な要治療患者の拾い上げに貢献するものと考えられる。我々は、今回、過去のPEG-IFN/RBV併用療法の治療成績をもとに作成したSVR予測スコアを検証し、その有用性を示した。また、C型肝炎ウイルスのISDR・Core70の変異の有無を加えた治療前治療効果予測式が、さらに有用であることを示した。最近、IL28BのSNPsがPEG-IFN/RBV併用療法の無効例の予測に有用であるとの報告があり、今後、さらに優れた治療前効果予測式が作成可能となるものと考えられる。

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の減量を強いられても治療期間の延長が有用と考えられた。

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% \lt (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、2型の治癒率向上のために重要な所見と考えられた。5年間の経過観察を行った血清ALT持続正C型慢性肝炎に関する我々の以前の検討で5年間ALT値持続正常であったものは14%であった。今回10年以上の経過観察をし得た症例のうちALT値持続正常であった症例は11%で5年間の経過観察を行った場合の成績と大きな差はみられなかった。しかし、登録時に血清ALT値が20 IU/L以上であった症例は早期にALT高値になる傾向があるため治療が勧められる。米国肝臓学会の治療ガイドラインで血清ALT値にとらわれず治療適応を個別に評価することが提唱されているが、血清ALT持続正常のC型慢性肝炎の約90%にALT異常がみられることより、今後ALT正常例においても積極的に治療に踏み込むことが重要と考えられた。

E. 結論

1. PEG-IFN/RBV 併用療法を受けた 1b 高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者の SVR 予測スコアを作成しその有用性を示した。
2. 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。
3. 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。

4. 血清 ALT 持続正常の C 型慢性肝炎患者は 10 年間の経過観察で約 90% に ALT 異常がみられることより、特に ALT 値が 20 IU/L 以上の症例では今後積極的に治療を行うことが勧められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Zen K, Yasui K, Nakajima T, Zen Y, Zen K, Gen Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Mitsufuji S, Tanaka S, Itoh Y, Nakanuma Y, Taniwaki M, Arii S, Okanoue T, Yoshikawa T. ERK5 is a target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulating mitotic entry. *Genes Chromosomes Cancer*. 48:109-20, 2009.
- 2 Gen Y, Yasui K, Zen K, Nakajima T, Tsuji K, Endo M, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Tanaka S, Taniwaki M, Arii S, Okanoue T, Yoshikawa T. A novel amplification target, ARHGAP5, promotes cell spreading and migration by negatively regulating RhoA in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett*. 275(1):27-34, 2009.
- 3 Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 39(4):366-73, 2009.
- 4 Nishikawa T, Nakajima T, Katagishi T, Okada Y, Jo M, Kagawa K, Okanoue T, Itoh Y, Yoshikawa T. Oxidative stress may enhance the malignant potential of human hepatocellular carcinoma by telomerase activation. *Liver Int* 29(6):846-56, 2009.
- 5 Zen K, Yasui K, Gen Y, Dohi O, Wakabayashi N, Mitsufuji S, Itoh Y, Zen Y, Nakanuma Y, Taniwaki M, Okanoue T, Yoshikawa T. Defective expression of polarity protein PAR-3 gene (PAR3) in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 28(32):2910-8, 2009.
- 6 Okanoue T, Itoh Y, Hashimoto H, Yasui K, Minami M, Takehara T, Tanaka E, Onji M, Toyota J, Chayama K, Yoshioka K, Izumi N, Akuta N, Kumada H. Predictive values of amino acid sequences of the core and NS5A regions in antiviral therapy for hepatitis C: a Japanese multi-center study. *J Gastroenterol*. 44(9):952-63, 2009.
- 7 Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- alpha and ribavirin

- therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet.* 41(10):1105-9, 2009.
- 8 Endo M, Yasui K, Nakajima T, Gen Y, Tsuji K, Dohi O, Zen K, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Taniwaki M, Tanaka S, Arii S, Okanoue T, Yoshikawa T. Infrequent amplification of JUN in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 29(12) 4989-94, 2009.
 - 9 Yasui K, Harano Y, Mitsuyoshi H, Tsuji K, Endo M, Nakajima T, Minami M, Itoh Y, Zen Y, Nakanuma Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Steatosis and hepatic expression of genes regulating lipid metabolism in Japanese patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 45:95-104, 2010.
 - 10 Park H, Ishigami A, Shima T, Mizuno M, Maruyama N, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. Hepatic senescence marker protein-30 is involved in the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 45(4): 426-34, 2010.
 - 11 Tsuji K, Yasui K, Gen Y, Endo M, Dohi O, Zen K, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Taniwaki M, Tanaka S, Arii S, Okanoue T, Yoshikawa T. PEG10 is a probable target for the amplification at 7q21 detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 198(2) 118-25, 2010.
 - 12 Nakajima T, Nakashima T, Okada Y, Jo M, Nishikawa T, Mitsumoto Y, Katagishi T, Kimura H, Itoh Y, Kagaea K, Yoshikawa T. Nuclear size measurement is a simple method for the assessment of hepatocellular aging in non-alcoholic fatty liver disease: comparison with telomere-specific quantitative FISH and p21 immunohistochemistry. *Pathol Int.* 60:175-183, 2010.
 - 13 Namiki I, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu A, Hayashi N, Kudo M. Management of hepatitis C; Report of the consensus meeting at the 45th annual meeting of Japan Society of Hepatology (2009). *Hepatol Res* 40: 347-368, 2010.
 - 14 Yamaguchi K, Itoh Y, Yokomizo C, Nishimura T, Niimi T, Fujii H, Okanoue T, Yoshikawa T. Blockade of interleukin-6 signaling enhances hepatic steatosis but improves liver injury in methionine choline deficient diet-fed mice. *Lab Invest* 90: 1169-1178, 2010.
 - 15 Fujii H, Itoh Y, Ohnishi N, Sakamoto M, Ohkawara T, Yamaguchi K, Minami M, Sawa Y, Ohkawara Y, and Yoshikawa T. Relapse of Hepatitis C in a Peginterferon alpha2b plus Ribavirin-Treated Sustained Virological Responder. *Hepatol Res*

40: 654-660, 2010.

- 16 Sumida Y, Yonei Y, Kanemasa K, Hara T, Inada Y, Sakai K, Imai S, Hibino S, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Yasui K, Minami M, Itoh Y, Naito Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Lower circulating levels of dehydroepiandrosterone, independent of insulin resistance, is an important determinant of severity of nonalcoholic steatohepatitis in Japanese patients. *Hepatol Res* 40: 901-910, 2010.
- 17 Park H, Hasegawa G, Shima T, Fukui M, Nakamura N, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Kitawaki J, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. The fatty acid composition of plasma cholesteryl esters and estimated desaturase activities in patients with nonalcoholic fatty liver disease and the effect of long-term ezetimibe therapy on these levels. *Clin Chim Acta*. 411: 1735-40, 2010.
- 18 Gen Y, Yasui K, Zen Y, Zen K, Dohi O, Endo M, Tsuji K, Wakabayashi N, Itoh Y, Naito Y, Taniwaki M, Nakanuma Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Gen SOX2 identified as a target gene for the amplification at 3q26 that is frequently detected in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 202: 82-93, 2010.
- 19 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.
- 20 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.
- 21 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.
- 22 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.
- 23 Sumida Y, Kanemasa K, Inada Y, Hara T, Saikai K, Imai s, Yoshinda N, Yadsui K, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Impact of amino acid substitutions in the Hepatitis C virus genotype 1b core