

厚生労働科学研究費補助金（肝炎緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

- 61th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Oct-29-2010, Boston, MA.
20. Francis J. Eng, Yusuke Funaoka, Mamoru Watanabe, Martina Kopp, Maria-Teresa Catanese, Naoya Sakamoto, Charles M. Rice and Andrea D. Branch: Point Mutations in the HCV Core Gene that Predict Treatment Failure and Liver Cancer May Act by Regulating the Expression of the Newly-discovered HCV Minicore Proteins. 61th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Oct-29-2010, Boston, MA.
21. Yasuhiro Itsui, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Yuko Osajima, Megumi Fujita, Yuki Sakurai, Goki Suda, Yuko Karakama, Kako Mishima, Machi Yamamoto, Yusuke Funaoka, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Tsunehito Yauchi, and Mamoru Watanabe: Antiviral effects and molecular mechanisms of interferon-induced proteins GBP-1 against Hepatitis C virus. 61th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Oct-29-2010, Boston, MA.
22. Yasuhiro Tanaka, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Hiroshi Yatsuhashi, Shuhei Nishiguchi, Nobuyuki Enomoto, Nao Nishida, Katsushi Tokunaga, Masao Honda, Kiyooki Ito, Masashi Mizokami: ITPA gene variants protect against anemia induced by pegylated interferon-alfa and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. 61th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Oct-29-2010, Boston, MA.
23. Masayuki Kurosaki, Yasuhiro Tanaka, Nao Nishida, Masaya Sugiyama, Kentaro Matsuura, Yasuhiro Asahina, Fuminaka Sugauchi, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Mamoru Watanabe, Akito Sakai, Masao Honda, Shuichi Kaneko, Kiyooki Ito, Naohiko Masaki, Katsushi Tokunaga, Namiki Izumi1, Masashi Mizokami: Pretreatment Prediction of Response to Pegylated-Interferon Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C: impact of SNPs near the IL28B gene and mutations in the ISDR of HCV revealed by data mining analysis. 61th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Oct-29-2010, Boston, MA.
24. Yung-Ju Yeh, Ching-Ping Tseng, Sheng-Da Hsu, Yu-Ling Chang, Naoya Sakamoto, Hsien-Da Huang, Ju-Chien Cheng: A liver-abundant miRNA directly targets HCV viral genome and regulates hepatitis C virus RNA accumulation. 17th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-9-2010, Yokohama, Japan.
25. Yasuhiro Itsui, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Yuko Sekine-Osajima, Megumi Tasaka-Fujita, Yuki Nishimura-Sakurai, Goki Suda, Yuko Karakama, Kako Mishima, Machi Yamamoto, Takako Watanabe, Mayumi Ueyama, Yusuke Funaoka, Cheng-Hsin Chen, Sei Kakinuma, Tsunehito Yauchi and Mamoru Watanabe: Antiviral effects of interferon-induced proteins GBP-1 and its interactions with hepatitis C virus NS5B protein. 17th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-9-2010, Yokohama, Japan.
26. Akiko Kusano-Kitazume, Naoya Sakamoto, Yuko Sekine-Osajima, Seishin Azuma, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Yuki Nishimura-Sakurai, Yukiko Okuno, Masatoshi Hagiwara, and Mamoru Watanabe: Identification of Novel Small Molecules Inhibitors of Hepatitis C Virus Replication Using a Cell-Based High-Throughput Screen. 17th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-9-2010, Yokohama, Japan.
27. Takako Watanabe, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Yuki Nishimura-Sakurai, Megumi Tasaka-Fujita, Yuko Sekine-Osajima, and Mamoru Watanabe: The inhibitory effect of triterpenoid compound with or without interferon $\alpha$  on Hepatitis C virus infection. 17th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-9-2010, Yokohama, Japan.

厚生労働科学研究費補助金（肝炎緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

28. Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Tamori A, Izumi N: PREDICTIVE MODEL OF RESPONSE TO PEGINTERFERON IN CHRONIC HEPATITIS C: IMPACT OF MUTATIONS IN ISDR AND CORE REGION REVEALED BY CLASSIFICATION AND REGRESSION TREE ANALYSIS. J Hepatol 2010; 52:S113. 45th. Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Apr-14-2010, Wien, Austria.
29. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Honda M, Sugauchi F, Izumi H, Tokunaga K, Mizokami M: GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY IDENTIFIES IL28B ASSOCIATED WITH RESPONSE TO PEGYLATED INTERFERON-ALFA AND RIBAVIRIN THERAPY FOR JAPANESE PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C. J Hepatol 2010; 52:S455. 45th. Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Apr-14-2010, Wien, Austria.
30. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Asahina Y, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Watanabe M, Sakai A, Honda M, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M: GENETIC POLYMORPHISM IN IL28B PREDICTS NULL VIROLOGICAL RESPONSE TO PEGYLATED-INTERFERON PLUS RIBAVIRIN THERAPY FOR CHRONIC HEPATITIS C. J Hepatol 2010; 52:S451-452. 45th. Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Apr-14-2010, Wien, Austria.
31. Yuki Nishimura-Sakurai, Naoya Sakamoto, Kaoru Mogushi, Satoshi Nagaie, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Yuko Sekine-Osajima, Megumi Tasaka-Fujita, Yuko Onuki-Karakama, Gouki Suda, Kako Mishima, Machi Yamamoto, Mayumi Ueyama, Yusuke Funaoka, Takako Watanabe, Cheng-Hsin Chen, Sei Kakinuma, Kiichiro Tsuchiya, Hiroshi Tanaka, Nobuyuki Enomoto, Mamoru Watanabe: Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells. J Hepatol 2010; 52:S258. 45th. Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Apr-14-2010, Wien, Austria.
32. Naoya Sakamoto: IL-28B SNPs and HCV genetic profiles, NS5A-ISDR and Core mutations are significant predictors of PEG-interferon plus ribavirin treatment outcomes. 20th. Conference of the APASL March-27-2010 Beijing, China.
33. Yusuke Funaoka, Naoya Sakamoto, Goki Suda, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Kako Mishima, Yuko Karakama, Machi Yamamoto, Cheng-Hsin Chen-Azuma, Sei Kakinuma and Mamoru Watanabe: In-vitro replication and interferon sensitivity of core aa 70 and 91 mutant HCV cell culture. 60th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Oct-30-2009, Boston, MA.
34. Goki Suda, Naoya Sakamoto, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Kako Mishima, Yuko Karakama, Machi Yamamoto, Cheng-Hsin Chen, Sei Kakinuma, Kazuaki Chayama, Michio Imamura and Mamoru Watanabe: In-vitro and in-vivo Characterization of a new genotype 2b HCV clone and 2b/JFH1 intergenotypic chimera and analyses of the factor that regulate interferon sensitivity. 60th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Oct-30-2009, Boston, MA.
35. Yasuhiro Itsui, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Yuko Sekine-Osajima, Megumi Tasaka-Fujita, Yuki Nishimura-Sakurai, Gouki Suda, Yuko Karakama, Kako Mishima, Machi Yamamoto, Takako Watanabe, Mayumi Ueyama, Yusuke Funaoka, Cheng-Hsin Chen, Sei Kakinuma, Tsunehito Yauchi and Mamoru Watanabe: Antiviral effects of interferon-induced proteins GBP-1 and its interactions with hepatitis C virus NS5B protein. 60th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Oct-30-2009, Boston, MA.

厚生労働科学研究費補助金（肝炎緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

36. Kako Mishima, Naoya Sakamoto, Yuko Sekine-Osajima, Mina Nakagawa, Megumi Tasaka, Yuki Nishimura-Sakurai, Yasuhiro Itsui, Takaji Wakita, and Mamoru Watanabe: Establishment and genetic analyses of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by plaque-forming assay. 16th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Oct-3-2009, Nice, France.
37. Yung-Ju Yeh, Ching-Ping Tseng, Sheng-Da Hsu, Yen-Ju Chen, Yu-Ling Chang, Naoya Sakamoto, Hsien-Da Huang, Ju-Chien Cheng: Liver Abundant MicroRNAs Modulate Hepatitis C Virus Gene Expression in HCV Replicon Cells. 16th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Oct-3-2009, Nice, France.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号：特願 2011-194082

発明の名称：C型肝炎ウイルスの  
増殖を抑制する医薬組成物

発明者：坂本直哉、渡辺守、北詰晶子、  
萩原正敏、奥野友紀子

特許出願人：東京医科歯科大学

提出日：平成 23 年 9 月 6 日

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
（総合） 研究報告書

PEG-IFN/RBV 難治例のウイルス学的特徴と新規抗ウイルス療法

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

研究要旨：PEG-IFN/RBV/TVR 併用療法の治療前効果予測因子としては *IL28B* 遺伝子多型と Core aa70 置換が重要である。Core 置換は治療開始後 24 時間以内、*IL28B* はより遅い時期のウイルス動態に關与する。前治療歴別治療成績は初回治療例(76%),前治療再燃例(90%)で良好な SVR 率が期待出来るが、難治な前治療無効例(27%)の SVR 予測には Core aa70 置換の組み合わせが有用である。前治療無効例において、PEG-IFN/RBV 併用療法の延長投与で効果改善が期待される ETR(治療終了時点の RNA 陰性)予測には AFP・前治療反応性の組み合わせが有用である。特に、AFP 低値の partial response は ETR 88%であったが、AFP 高値で ETR は確認されず TVR 耐性ウイルスの出現に注意を要する。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。TVR 減量群の最終的な治療成績は今後の検討課題である。

A. 研究目的

新規抗 HCV 療法の PEG-IFN/RBV/Telaprevir(TVR)併用療法で良好な SVR 率が期待されるが、前治療無効例に対する SVR 率は依然十分と言えない状況である。更に、TVR 耐性ウイルスや貧血の問題を解決していく必要がある。今回は、この様な新規治療を効果的かつ安全に行うためにも治療効果予測因子・早期ウイルス動態の解析や、貧血・TVR 耐性ウイルスの問題点に注目して検討した。

B. 研究方法

臨床治験で PEG-IFN  $\alpha$ 2b/RBV/TVR を当院で施行された HCV genotype 1 の 81 例(1a 1 例,1b 80 例)を対象として治療効果予測因子を検討した。20 例が 12 週間 study(PEG-IFN/RBV/TVR の 3 剤併用 12 週間投与)、61 例が 24 週間 study(初期 12 週間は PEG-IFN/RBV/TVR の 3 剤併用投与し、その後の 12 週間は PEG-IFN/RBV の 2 剤併用投与)を導入された。更に、製造承認後に当院で PEG-IFN/RBV/TVR を導入された 30 例も含めて検討した。ウイルス要因は Core aa70/91 置換・NS5A-ISDR 変異数・TVR 耐性ウイルス、宿主要因は *IL28B*(rs8099917,rs12979860) 遺伝子多型を含めて検討した。Core aa70/91

[Arg70(Wild)から Gln70/His70(Mutant)への置換、Leu91(Wild)から Met91(Mutant)への置換]・NS5A-ISDR(aa2209-2248)・NS3 領域の V36,T54,R155,A156(既報の TVR 耐性ウイルス)はダイレクトシーケンシング法でアミノ酸配列を決定した。Arg70(Wild)かつ Leu91(Wild)の症例を double wild type と定義した。

[検討 A：治療効果予測因子]

臨床治験における当院の全体成績と過去の治療歴別に見た SVR 率を検討。更に、SVR に寄与する独立要因を治療前の 26 因子(ウイルス・宿主・治療要因)を用いて多変量解析で検討した。更に、24 週間 study を施行された HCV genotype 1 の前治療無効例 15 例(1a 1 例,1b 14 例)を対象として PEG-IFN/RBV 延長投与が有効な可能性のある ETR(治療終了時点の RNA 陰性)予測因子を検討した。治療効果予測因子として *IL28B* rs8099917,Core aa70 置換,AFP 値,前治療反応性を検討した。

[検討 B：早期ウイルス動態予測因子]

治療開始後 24 時間以内の HCV RNA 量低下,治療中の RNA 陰性化(TaqMan HCV;検出せず)に寄与する要因を多変量解析で検討した。

[検討 C：TVR 減量投与の検討]

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

[検討 D：TVR 耐性ウイルス対策]

当院で TVR 単独療法 12 週間 study を導入され、NS3 耐性ウイルス出現後に治療中止となり、その後に PEG-IFN/RBV 併用療法を導入された HCV genotype 1b の 5 例の治療成績を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報への守秘義務、患者の権利

保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した(新GCPに遵守)。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

### C. 研究結果

#### [検討A: 治療効果予測因子]

全体のSVR 64%。12週間studyのSVR 45%、24週間studyのSVR 70%。初回治療例のSVR 76%、前治療再燃例のSVR 90%、前治療無効例のSVR 27%。SVRに寄与する因子は、単変量解析(Chi-squared test)でCore aa70(Wild)( $P=0.007$ )、rs8099917(TT)( $P<0.001$ )、rs12979860(CC)( $P<0.001$ )が有意差を示し、多変量解析(Logistic regression analysis)ではCore aa70(Wild)( $P=0.040$ )、rs8099917(TT)( $P<0.001$ )が独立要因として抽出された。特に、前治療無効例においてIL28B遺伝子多型にCore aa70置換を組み合わせてSVR率を検討すると、難治が予測されるnon-TTではWildが43%であるのに対して当院のMutantの症例からSVR例は確認されなかった。

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

#### [検討B: 早期ウイルス動態予測因子]

経時的RNA陰性化率は、1週1%、2週34%、4週81%、6週91%、8週95%、12週90%。24時間で3log以上RNA量が低下する頻度は、Core aa70/91置換のdouble wild typeではnon double wild typeよりも高率であり単変量解析(Chi-squared test)で有意差を認めた( $P=0.004$ )。8週( $P=0.035$ )、12週( $P=0.039$ )でRNA陰性化する頻度は、rs8099917のTTではnon-TTよりも高率であり単変量解析(Chi-squared test)で有意差を認めた。多変量解析(Logistic regression analysis)でCore aa70/91置換(non double mutant type)は24時間で3log以上RNA量の低下( $P=0.015$ )に寄与する独立要因であり、rs8099917(TT)は12週のRNA陰性化( $P=0.042$ )に寄与する独立要因であった。

#### [検討C: TVR減量投与の検討]

TVR投与量別に12週間以内のHb減少量

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

#### [検討D: TVR耐性ウイルス対策]

TVR耐性出現例に対するPEG-IFN/RBV併用投与の治療成績は、SVR 40%、NVR 20%で通常の治療成績が得られた。

### D. 考察

HCV core蛋白はSTATに結合しその活性化を抑制してIFNシグナル伝達経路を阻害することが報告されているが、HCV-1b core アミノ酸置換はこの様な経路を介した治療抵抗性メカニズムに関与している可能性が考えられる。PEG-IFN/RBV/TVR 3剤併用療法における治療効果予測因子に関する詳細な検討はこれまで行われていなかった。今回の結果から、3剤併用療法でもIL28B遺伝子多型とCore aa70置換が治療効果予測因子として重要であった。特に、難治が予測される前治療無効例こそCore aa70を測定することが有用であることが確認された。3剤併用療法においてCore置換は24時間以内、IL28B遺伝子多型はより遅い時期のウイルス動態に関与することも確認された。この様に、2つの要因がウイルス動態の異なる経時ポイントに影響する可能性を考えると、これら要因の組み合わせで治療前効果予測を行うことの重要性を裏付ける成績であると言える。

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

PEG-IFN/RBV/TVR 併用療法の治療前効果予測因子としては *IL28B* 遺伝子多型と Core aa70 置換が重要であり、Core 置換は治療開始後 24 時間以内、*IL28B* はより遅い時期のウイルス動態に関与していた。前治療歴別治療成績は初回治療例(76%)、前治療再燃例(90%)で良好な SVR 率が期待出来るが、難治な前治療無効例(27%)の SVR 予測には Core aa70 置換の組み合わせが有用である。前治療無効例で、ETR 予測には AFP・前治療反応性の組み合わせが有用である。特に、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 耐性ウイルスの出現に注意を要する。更に、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) Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, Sezaki H, Yatsuji H, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Mineta R, Iwasaki S, Watahiki S, Kobayashi M, Miyakawa Y, Kumada H. Rapid loss of hepatitis C virus genotype 1b from serum in patients receiving a triple treatment with telaprevir (MP-424), pegylated interferon and ribavirin for 12 weeks. *Hepatology* 2009;39:1056-1063.

2) Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Yatsuji H, Arase Y, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Iwasaki S, Kumada H. Sustained virological response in a patient with chronic hepatitis C treated by monotherapy with the NS3-4A protease inhibitor telaprevir. *J Clin Virol* 2010;47:76-8.

3) 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 hepatitis

C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 2010;52:421-429.

4) 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, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region of genotype 1b affect very early viral dynamics during treatment with telaprevir, peginterferon, and ribavirin. *J Med Virol* 2010;82:575-582.

5) Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Chayama K, Kamatani N, Nakamura Y, Miyakawa Y, Kumada H. Influence of ITPA polymorphisms on decreases of hemoglobin during treatment with pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir. *Hepatology* 2011;53:415-421.

6) Chayama K, Hayes CN, Abe H, Miki D, Ochi H, Karino Y, Toyota J, Nakamura Y, Kamatani N, Sezaki H, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H. IL28B but not ITPA polymorphism is predictive of response to pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir triple therapy in patients with genotype 1 hepatitis C. *J Infect Dis* 2011;204:84-93.

7) 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;83:1016-1022.

8) 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]

9) 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 substitutions in the

hepatitis C virus core region of genotype 1b are the important predictor of treatment resistance, insulin resistance, and hepatocarcinogenesis. The 60th annual meeting of the American association for the study of liver disease, 2009. Boston, USA.

2) Akuta N. Amino acid substitutions in HCV core region of genotype 1b are the important viral predictors of treatment resistance and hepatocarcinogenesis. 7th APASL Single Topic Conference "Hepatitis C Virus". Chiba, Japan, 2010.

3) 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。

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 陽性肝硬変症において脾臓を中心とした免疫担当細胞の評価を行い、脾臓摘出が T 細胞応答に与える影響を検討し、肝硬変症への脾摘の意義を考察した。肝硬変症では特に脾臓で疲弊化 T 細胞が増加しており、これが肝硬変症での免疫機能の低下の一因と考えられた。また脾臓では T 細胞に抗原を提示する単核球での疲弊化を増強させるリガンド発現が亢進していた。脾臓摘出は末梢での T 細胞反応性を回復させた。また、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

フローサイトメトリーにて CD4+CD25+foxP3+ の制御性 T 細胞 (regulatory T cell ; Treg) の解析を行った。

A. 研究目的

HCV 陽性肝硬変症における脾臓での免疫担当細胞の亜集団の構成や機能を評価する。  
また、HCV 陽性肝硬変症患者における脾臓摘出が末梢 T 細胞応答に与える影響を検討する。

B. 研究方法

当科で IFN 療法導入目的にて摘出した HCV 陽性肝硬変症群 (15 例) および対象群 (7 例) の脾臓・末梢血を用いた。摘出脾臓および末梢血より、フィコール・ハイパックを用いた密度勾配遠心分離法にて単核球を採取した。CD4+T 細胞は、CD4+T 細胞 isolation kit (Miltenyi Biotech, Abcam, CA, USA.) を用いた negative selection 法にて抽出した。

1) CD4+T 細胞の解析

1. 非特異的刺激下の CD4+T 細胞の反応性  
10  $\mu$ 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 $\times$ 10<sup>5</sup> 個/穴の CD4+T 細胞を、10 単位/ml の IL-2 存在下に 5 日間培養し、細胞培養上清を回収。IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 を ELISA にて測定した。細胞増殖能は、培養中の細胞にトリチウムチミジン (1.0  $\mu$  Ci/穴) でパルスし、12 時間培養、回収した細胞をベータシンチレーションカウンターにて測定した。

3. CD4+T 細胞における副刺激分子の検討

フローサイトメトリーにて CD4 陽性細胞での副刺激分子 (活性化マーカーとして CD28、CD154、抑制性マーカーとして CTLA-4、PD-1) の発現を検討した。

4. 制御性 T 細胞の検討

2) PD-1 リガンドの解析

1. 単核球における PD1-ligand 発現の検討  
単核球での PD1-ligand (PD-L1, PD-L2) の発現をフローサイトメトリーにて解析した。

2. 免疫組織化学染色における脾での PD-1/PD1-ligand 発現の検討

脾臓組織のパラフィン包埋を用いて抗 PD-L1, PD-L2 抗体を用いて免疫組織化学染色を施行した。陽性細胞の判定は、病理医により、盲目的に 3 段階 (陰性; スコア 0、陽性; スコア 1、強陽性; スコア 2) に判定した。

3. PD1-ligand 阻害下での T 細胞応答性の検討

各々の単核球を、10  $\mu$ g/ml の抗 PD-L1 抗体と抗 PD-L2 抗体の存在下に 37 $^{\circ}$ C にて 45 分間インキュベート。コントロールは、アイソタイプコントロール存在下にインキュベートした。細胞を回収し洗浄。10  $\mu$ g/ml の CD3 に対するモノクローナル抗体にてコーティングした 96 穴プレートに、各々 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 個/穴の CD4+T 細胞を、10 単位/ml の IL-2 存在下に 5 日間培養。細胞はトリチウムチミジンをパルスし、細胞増殖能を測定した。

3) 脾摘前後での解析

8. 非特異的刺激下の CD4+T 細胞の反応性の変化を検討

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  $\mu$ 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 $\times$ 10<sup>5</sup> 個/穴の CD4+T 細胞を、10 単位/ml の IL-2 存在下に 5 日間培養、培養上清を回収し ELISA にてサイトカイン (IFN- $\gamma$ 、IL-10) を測定した。また、細胞



はトリチウムチミンをパルスし、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を検討

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。

#### 4) 倫理面への配慮

個人情報の保護をはじめ、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

1)HCV 陽性肝硬変症脾臓での CD4 陽性 T 細胞においては、TCR を介する非特異的刺激下での細胞増殖能、IFN- $\gamma$  産生量が低値であった。

HCV 陽性肝硬変症脾臓での CD4 陽性 T 細胞において、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 の有意な発現亢進を認めた。

2)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 の発現亢進を認めた。PD1-ligand を阻害した際に、PD-1/PD1-ligand の発現が亢進している HCV 陽性肝硬変症脾臓において細胞増殖能・IFN- $\gamma$  産生量が回復しやすい現象を認めた。

3)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- $\gamma$  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

HCV 特異的免疫応答をさらに詳細に検討することが必要であると考え。

今後は HCV 陽性肝硬変症患者において、脾臓摘出後の IFN 療法の治療成績や、免疫学的プロフィールを検討することにより、脾臓摘出術を推奨するエビデンスを構築する。

### 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いることが示された。

### 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. *Hepatology 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  $\alpha$ -2b plus ribavirin for Japanese chronic hepatitis C patients with normal alanine aminotransferase. *Hepatology 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 *Hepatology 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<sup>+</sup> T cell responses following splenectomy in hepatitis C virus-related liver cirrhosis. *Clin Exp Immunol*. 165:243-50, 2011.

9) Shimoda S, Harada K, Niino 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 $\alpha$  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 型肝炎ウイルスの増殖に対する宿主細胞内マイクロ RNA の影響  
と

C 型肝炎における 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、C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染に対する宿主側の応答を包括的に理解する必要がある。本研究において我々は以下の 2 点について検討を行った。(1) HCV 感染に伴って宿主細胞内で変動するマイクロ RNA (miRNA) の HCV 増殖に対する影響についての解析、(2) NK 細胞の二つのサブセット、CD56<sup>bright</sup> と CD56<sup>dim</sup> とにおける C 型慢性肝炎がおよぼす IFN- $\alpha$ シグナル伝達への影響についての解析。

本研究において以下のことが明らかになった。(1) 肝癌細胞株 Huh7 細胞に HCV を感染させると、増加する miRNA として、mir-192, -194, -215 が、減少するものとして mir-320, 491 が同定された。mir-192, -215, -491 は HCV の増殖を促進していた。mir-491 は宿主細胞内の Akt 活性を抑制することにより HCV 増殖を促進していた。(2) 細胞内 STAT1 発現量は、CD56<sup>bright</sup>、CD56<sup>dim</sup> 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<sup>dim</sup> サブセットで顕著であった。*in vitro* での IFN- $\alpha$ 刺激で誘導されるリン酸化 STAT の程度が、CD56<sup>bright</sup> 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<sup>dim</sup> 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。

マイクロ RNA を標的とすることで HCV の増殖を制御できる可能性が示唆された。また、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 細胞サブセット間で異なった違いがあることが見出され、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

石田 永 大阪大学樹状細胞制御治療学

寄付講座助教

宮城琢也 大阪大学消化器内科学 助教

#### A. 研究目的

C 型肝炎における慢性化の成立機序およ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、宿主肝細胞および免疫担当細胞におけるシグナル伝達や遺伝子発現の制御について包括的に理解する必要がある。

マイクロ RNA (miRNA) は、遺伝子発現を転写後の段階で負に制御し細胞機能の調整に関与している。肝特異的な mir-122 が C 型肝炎ウイルス (HCV) の増殖に促進的に作用しているとの報告や IFN- $\beta$  により誘導される mir-196, -296, -351, -431, -448 が C 型肝炎ウイルスの増殖を抑制するとの報告、また、C 型肝炎患者の肝における mir-122 発現量と IFN 治療効果とが相関するとの報告がある。そこで、(1) HCV 感染に伴って宿主細胞内で変動する miRNA の同定と HCV 増殖に対する影響について解析することとした。

また、ウイルス感染に対する免疫応答において重要な役割を果たす NK 細胞は、二つのサブセット、CD56<sup>bright</sup> と CD56<sup>dim</sup> 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。そこで、(2) 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

肝癌細胞株 Huh7 細胞に細胞感染性 HCV を感染させる。その後、細胞から RNA を回収し、mirVana bioarray V9.2 (Ambion) を用いて miRNA の変動を解析した。HCV 感染により変動がみられた miRNA に関して、それらを HCV サブゲノムレプリコン細胞 Huh-RepSI もしくは HCV 感染 Huh7 細胞に導入し、HCV のコアもしくは NS5A のタンパク量と RNA 量を評価した。さらに、細胞増殖レベルを測定した。細胞内シグナルの活性化として、ERK、Akt のリン酸化を評価した。

C 型肝炎患者 (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- $\alpha$  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) HCV 感染時に 1.5 倍以上増加する miRNA として mir-192、-194、-215 が、0.66 倍以下に低下するものとして mir-320、-491 が同定された。mir-192、-215、-491 の 3 種類において、HCV タンパク量並びに RNA 量の増加が認められた。また、HCV を感染させた Huh7 細胞においても同様に、これら miRNA によりウイルス増殖が増加した。Akt のリン酸化レベルは mir-491 を導入した細胞において非常に強い抑制が認められた。

(2) CD56<sup>dim</sup> 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。NK 細胞活性化レセプターである NKG2D の発現が CD56<sup>bright</sup>、CD56<sup>dim</sup> 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<sup>bright</sup> 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。細胞内 STAT1 発現量が、CD56<sup>bright</sup>、CD56<sup>dim</sup> 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<sup>dim</sup> サブセットで顕著であった。in vitro での IFN- $\alpha$  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<sup>bright</sup> 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<sup>dim</sup> 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

miRNA は転写後レベルにおける遺伝子発現調節因子として注目されている。今回、HCV 増殖を制御するものとして mir-192, -,215, -491 が同定されたが、mir-192/215 は HCV 感染により増加し、mir-491 は減少したことから、HCV に対する影響に一定の方向性がみられなかった。しかし、HCV の感染は、細胞にとってはそれを防御する反応としての mir-491 の減少と、また増加した mir-192/215 を HCV が活用して増殖を促進するという両面が存在しており、そのバランスによって HCV の増殖が調節されているものと考えられた。

今回の検討により HCV の増殖を制御する miRNA が新たに同定されており、これら miRNA の誘導もしくは抑制を介した HCV 増殖の制御による治療への応用の可能

性が示唆された。

一方で、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<sup>dim</sup> 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<sup>bright</sup> における STAT4 リン酸化経路の減弱が IFN- $\gamma$  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。

HCV 感染に対する宿主側の応答を包括的に理解することにより、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つながるものとする。

#### E. 研究発表

##### 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* 54: 604-611, 2011.
2. 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 Bak/Bax-deficient mice. *Hepatology* 54: 240-251, 2011.
3. 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. 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.
  4. Miyagi T, Shimizu S, Nishio K, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. Differential alteration of CD56-bright and CD56-dim NK cells in frequency, phenotype and cytokine response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 46: 1020-1030, 2011.
  5. 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, 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.
  6. 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: 3343-3356, 2011.
  7. 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* 46: 1335-1343, 2011.
  8. 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, Hoshui 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* 17: 336-344, 2010.
9. Imai Y, Tamura S, Tanaka H, Hiramatsu N, Kiso S, Doi Y, Inada M, Nagase T, Kitada T, Imanaka K, Fukuda K, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Reduced risk of hepatocellular carcinoma after interferon therapy in aged patients with chronic hepatitis C is limited to sustained virological responders. *J Viral Hepat* 17: 185-191, 2010.
  10. 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.
  11. Miyagi T, Takehara T, Nishio K, Shimizu S, Kohga K, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Altered interferon-alpha-signaling in NK cells from the patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 53: 424-430, 2010.
  12. Kurokawa M, Hiramatsu N, Oze T, Mochizuki K, Yakushijin T, Kurashige N, Inoue Y, Igura T, Imanaka K, Yamada A, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Hijioka T, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Kato M, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Effect of interferon alpha-2b plus ribavirin therapy on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis. *Hepatol Res* 39: 432-438, 2009.
  13. Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Inoue Y, Igura T, Mochizuki K, Imanaka K, Kaneko A, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Nagase T, Ito T, Inui Y, Hijioka T, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, Kato M, Yoshida Y, Tatsumi T, Ohkawa K, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. Ribavirin dose reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with hepatitis C responding to pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin. *J Viral Hepat* 16: 586-594, 2009.
  14. Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Kurokawa M, Igura T, Mochizuki K, Imanaka K, Yamada A, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Hijioka T, Tamura S, Yoshihara H, Hayashi E, Inoue A, Imai Y, Kato M, Yoshida Y, Tatsumi T, Ohkawa K, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. Pegylated interferon alpha-2b (Peg-IFN alpha-2b) affects early virologic response dose-dependently in patients with chronic hepatitis C genotype 1 during

- treatment with Peg-IFN alpha-2b plus ribavirin. *J Viral Hepat* 16: 578-585, 2009.
15. Kurashige N, Hiramatsu N, Ohkawa K, Yakushijin T, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Doi Y, Yamada A, Oshita M, Mita E, Hagiwara H, Nagase T, Yoshihara H, Hayashi E, Imai Y, Kato M, Kashihara T, Hayashi N. Factors contributing to antiviral effect of adefovir dipivoxil therapy added to ongoing lamivudine treatment in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 44: 601-607, 2009.
16. Kurashige N, Ohkawa K, Hiramatsu N, Yakushijin T, Mochizuki K, Oze T, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Doi Y, Yamada A, Fukuda K, Oshita M, Mita E, Fukui H, Nagase T, Yoshihara H, Imai Y, Kato M, Kashihara T, Hayashi N. Lamivudine-to-entecavir switching treatment in type B chronic hepatitis patients without evidence of lamivudine resistance. *J Gastroenterol* 44: 864-870, 2009.
17. Kurashige N, Ohkawa K, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Mochizuki K, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Tatusmi T, Kanto T, Takehara T, Hayashi N. Two types of drug-resistant hepatitis B viral strains emerging alternatively and their susceptibility to combination therapy with entecavir and adefovir. *Antivir Ther* 14:873-877, 2009.
18. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Anti-cancer therapy inhibits MICA ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 69: 8050-8057, 2009.
- 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.
  - The American Association for the Study of Liver Diseases, 60th Annual Meeting AASLD, October 30-November 3, 2009, Boston, MA, USA.
  - #97 Thrombocytopenia deteriorates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. Kodama T, Takehara T, Shimizu S, Hikita H, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N.
  - #1310 Let-7 family negatively regulates Bcl-xL expression and induces apoptosis in cooperation with sorafenib in human hepatocellular carcinoma. Shimizu S, Takehara T, Kodama T, Hikita H, Yamamoto M, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N.
  - #1373 Interferon- $\alpha$  signaling in natural killer cells is impaired in chronic hepatitis C infection. Miyagi T, Takehara T, Shimizu S, Kumiko N, Kohga K, Tatsumi T, Hayashi N.
- 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型肝炎難治例に対する Peg-IFN/Ribavirin 併用療法の治療効果と効果予測について

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：

平成 21 年度は、腎移植後 C 型肝炎に対する Peg-IFN/Ribavirin (RBV) 併用療法について検討した。Peg-IFN/RBV 併用療法導入後、治療に対して無反応であった症例に対して、Peg-IFN を  $0.67 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$  より  $1.11 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$  へ増量することにより、HCV-RNA 量が漸減し、12 週後には HCV-RNA は検出感度以下となった。現在、Peg-IFN の至適量  $1.2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$  を目標投与量とした臨床研究が進行中である。

平成 22 年度は、高齢者 C 型肝炎に対する Peg-IFN/RBV 併用療法について検討し、Genotype 1 型高ウイルス量群でも EVR が得られれば治療効果は非高齢者と遜色なく、また LVR 例では長期投与によって著効率が向上することが示された。一方、Genotype 1 型高ウイルス量以外の群では、高齢者でも良好な著効率が得られ、良い適応と考えられた。

平成 23 年度は、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。IL28B major allele における著効率は、minor allele に比し有意に高率であった。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、血小板数、IL28B SNP 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。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るが、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

本研究班では、C 型肝炎難治例である腎移植後症例あるいは高齢者に対する Peg-IFN/Ribavirin (RBV) 併用療法の抗ウイルス効果について検討を行い、また難治例における治療効果に寄与する因子について検討した。

B. 研究方法

1. 腎移植後 C 型肝炎（平成 21 年度）

Peg-IFN  $\alpha$  2b/RBV 併用療法において、Peg-IFN を標準投与量の  $1/6$  量 ( $0.25 \mu$

$\text{g}/\text{kg}/\text{week}$ ) より開始後に増量する方法で治療された 10 例では、急性拒絶反応、著明な腎機能悪化は認めなかったが、HCV-RNA 陰性化は、Genotype 1b 群 8 例中 2 例、Genotype 2a 群 2 例中 2 例であり、とくに Genotype 1 型に対しては HCV-RNA 陰性化率が低く、治療効果不良と考えられた。一方、大阪大学を含む多施設共同研究において、治療開始 12 週での HCV-RNA 陰性化の達成には、Peg-IFN 投与量が  $1.2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$  未満の場合、Peg-IFN が用量依存性に関与するため、ウイルス陰性化までは、Peg-IFN 投与量  $1.2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$  (以上) を目

標とする必要があることが示されてきた。以上を踏まえて、同療法導入後、反応性不良であった腎移植後C型肝炎症例に対して、PegIFNを増量し、治療への反応性を検討した。

## 2. 高齢者C型肝炎(平成22年度)

Peg-IFN/Rib併用療法を開始登録されたC型肝炎慢性肝炎3064例のうち、genotype1型高ウイルス量(1H)1435例(65-69歳/70歳以上=169/46、男性/女性=770/663)、genotype1型高ウイルス量以外(non-1H)498例(65-69歳/70歳以上:37/15、M/F=252/246)を対象とし、高齢者における治療効果と中止率について検討した。

## 3. Peg-IFN/RBV併用療法の治療効果予測(平成23年度)

Peg-IFN/RBV併用療法を施行し、IL28B SNPを測定しえたC型肝炎1型高ウイルス量645例(平均年齢56.9±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。

## C. 研究結果

### 1. 腎移植後C型肝炎

生体腎移植後C型肝炎症例(71歳女性)に対し、Peg-IFN $\alpha$ 2b 30 $\mu$ g/week (0.67 $\mu$ g/kg/week)+RBV 200mg/dayより治療が開始されたが、治療開始4週にて、ウイルス量の低下なく軽度上昇(6.5LogC/ml)を認めたため、6週目よりPeg-IFN $\alpha$ 2b 50 $\mu$ g/week (1.11 $\mu$ g/kg/week)に増量したところ、以後、HCV-RNA量漸減し、Peg-IFN増量後12週にて検出感度以下となった。

### 2. 高齢者C型肝炎

1H群の副作用中止率は全症例で16%であったが、65-69歳25%、70歳以上32%と高く、non-1H群でも65-69歳16%、70歳以上26%と、高齢になるにつれて中止率が増加した。治療完遂例における著効率は、1H群(48週投与)で60歳未満52%、60-64歳47%、65-69歳37%、70歳以上31%と高齢になるにつれて低下したが、EVR(12週迄のHCV-RNA陰性化)例では、60歳未満の81%(260/323)に比し、65歳以上の高齢者においても79%(48/61)と、著効率の低下を認めなかった。また、65歳以上のLVR(13~24週のHCV-RNA陰性化)例の著効率は、48週投与で17%(4/23)、72週投与で53%(19/36)と72週投与により著効率は改善した(p<0.01)。一方、non-1H群(24週投与)では、60歳未満83%、60-64歳77%、65-69歳83%、70歳以上80%と高齢者においても比較的良好な著効率が得られた。

### 3. Peg-IFN/RBV併用療法の治療効果予測

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)。

## D. 考察

腎移植後C型肝炎に対するPegIFN/RBV併用

療法では、急性拒絶や高度貧血進行などの副反応に注意しながら、PegIFN の至適量  $1.2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$  を目標投与量として考慮すべきであり、今後、症例を重ねた検討が必要である。

高齢者 C 型肝炎に対する Peg-IFN/Rib 併用療法では、IH 群では副作用中止率が高く、著効率も低かったが、EVR が得られれば治療効果は非高齢者と遜色なく、また LVR 例では長期投与によって著効率が向上した。逆に、48 週投与で著効を得るためには、また、Non-IH 群においても高齢者の副作用中止率は高かったが、治療完遂例では良好な著効率が得られ、Peg-IFN/Rib 併用療法の良い適応と考えられた。

一方、難治性 C 型肝炎に対する Peg-IFN/RBV 併用療法の治療効果予測では、治療開始 4 週の時点で治療への反応性が不良な症例では、副作用出現の程度いかんにより、この時点で中止を考慮する必要があると考えられた。

#### E. 結論

腎移植後 C 型肝炎あるいは高齢者 C 型肝炎などの難治例に対する PegIFN/RBV 併用療法において、著効を達成するためには、治療早期のウイルス陰性化が重要であり、このためには、PegIFN の至適量  $1.2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$  を目標投与量とすることが重要である。治療効果予測には、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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表:

- 1) Kurokawa M, Hiramatsu N, Oze T, et al. Effect of interferon alpha-2b plus ribavirin therapy on incidence of

hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 2009 May;39 (5) :432-8.

- 2) Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, et al. Peginterferon alfa-2b affects early virologic response dose-dependently in patients with chronic hepatitis C genotype 1 during treatment with pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin. *J Viral Hepat.* 2009 Aug;16 (8) :578-85.
- 3) Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, I et al. Ribavirin dose reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with hepatitis C responding to pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin. *J Viral Hepat.* 2009 Aug;16 (8) :586-94.
- 4) Inoue Y, Hiramatsu N, Oze T, et al. 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. in press*
- 5) 平松直樹、小瀬嗣子、林紀夫. C型肝炎に対する Peg-IFN/RBV 治療と新規抗ウイルス治療薬の開発状況. *Annual review 2009 消化器* 中外医学社 2009; 117-128.
- 6) Sakamori R, Takehara T, Tatsumi T, et al. STAT3 signaling within hepatocytes is required for anemia of inflammation in vivo. *J Gastroenterol.* 2010;45 (2) :244-8.
- 7) Miyagi T, Takehara T, Nishio K, et al.