

図4 Hepcidin合成関連分子の発現レベル (BMIが $25\text{kg}/\text{m}^2$ 未満)

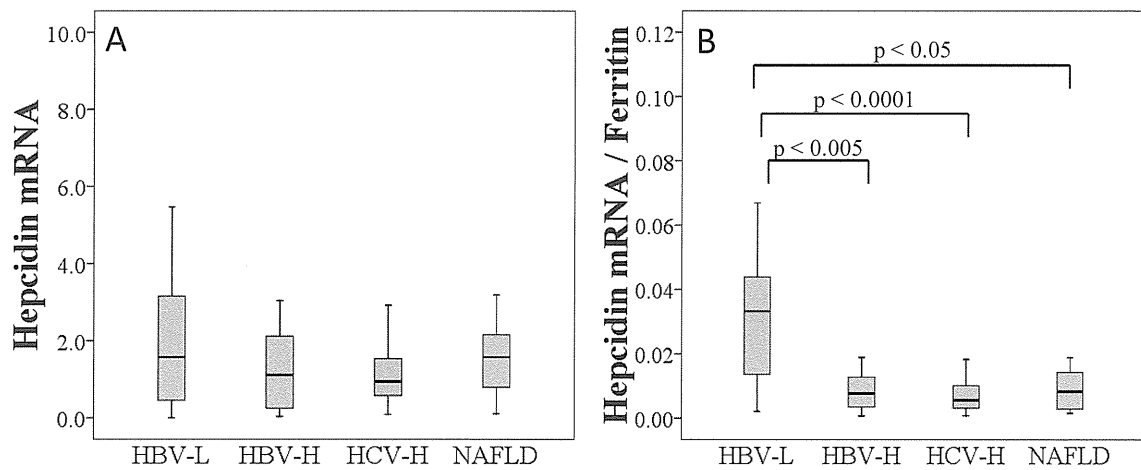


図5 Hepcidin mRNAレベル (BMIが $25\text{kg}/\text{m}^2$ 以上)

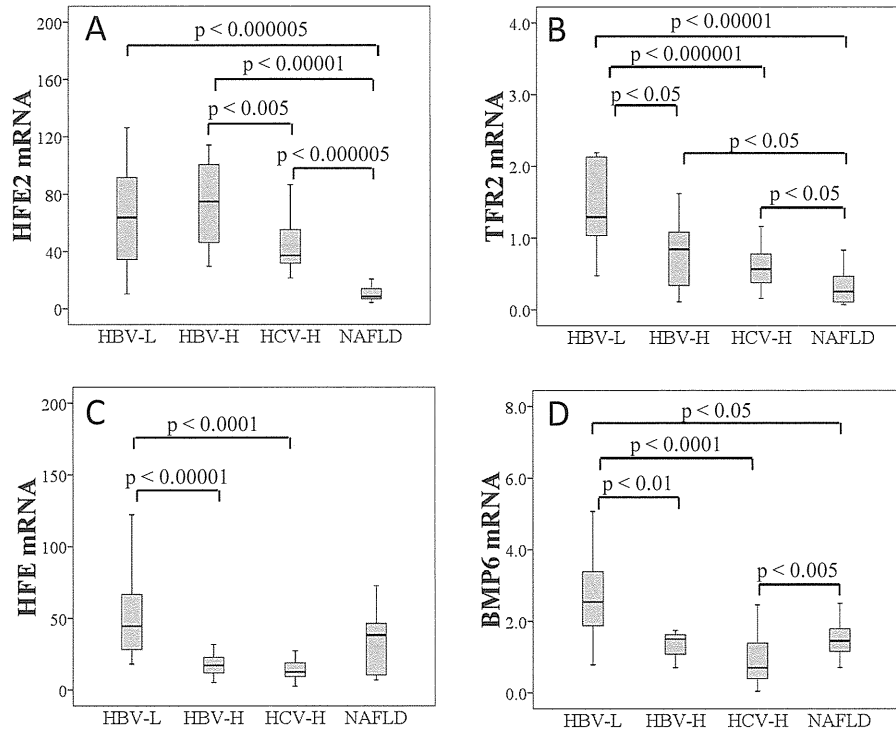


図6 Hepcidin合成関連分子の発現レベル (BMIが25kg/m<sup>2</sup>以上)

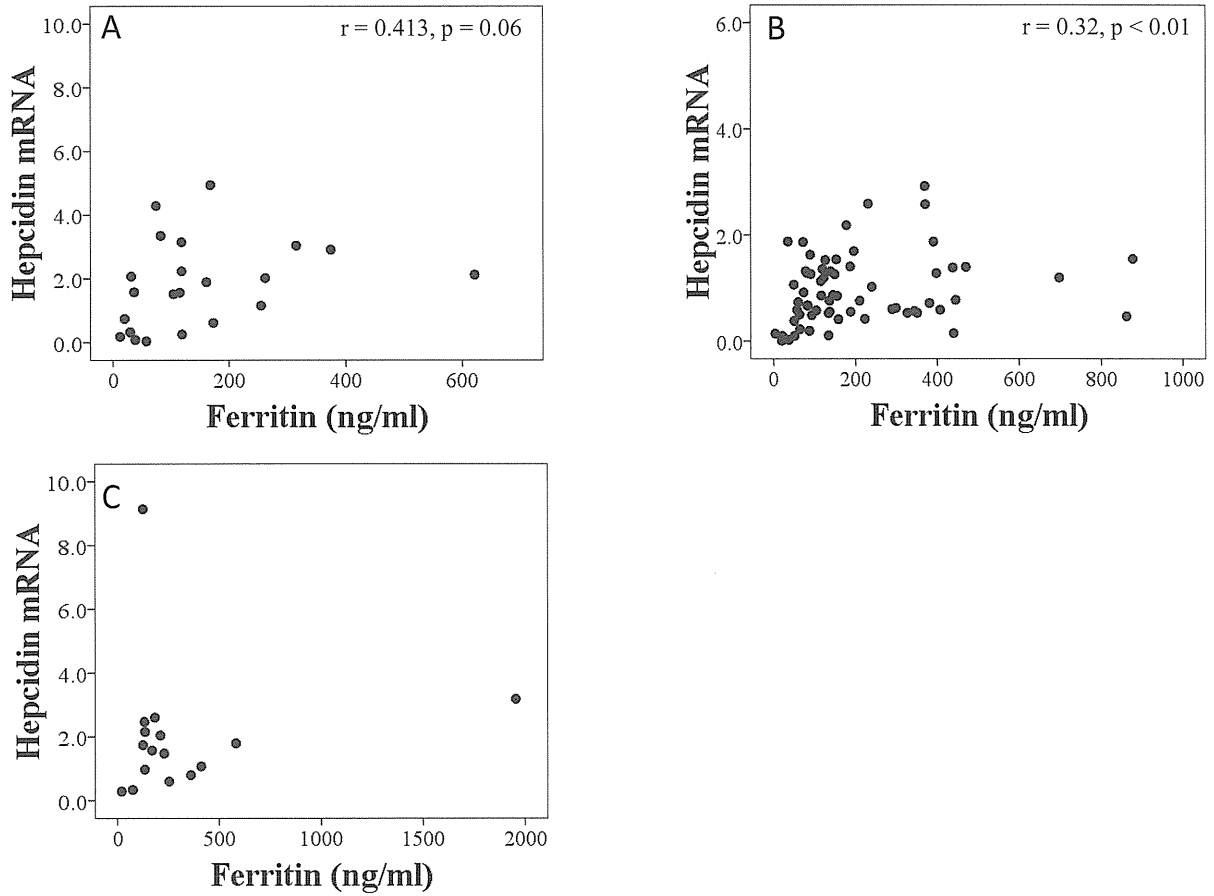


図7 Hepcidin mRNAと血清フェリチンの相関

表2 鉄蓄積スコアと組織学的進展度

肝細胞鉄蓄積

		Stage			
		1	2	3	4
Score	0	36	19	7	3
	1	16	8	6	0
	2	9	9	7	2
	3	6	6	0	1
	4	0	4	0	0

		Grade			
		0	1	2	3
Score	0	4	36	20	5
	1	0	18	10	2
	2	0	10	12	5
	3	0	7	5	1
	4	0	0	4	0

		Steatosis			
		0	1	2	3
Score	0	34	16	11	4
	1	20	5	4	1
	2	11	9	2	5
	3	4	4	5	0
	4	3	1	0	0

p = 0.02 (Chi-square test)

網内皮系細胞鉄蓄積

		Stage			
		1	2	3	4
Score	0	54	23	10	0
	1	9	14	5	3
	2	4	9	5	3

p = 5.0×10<sup>-6</sup> (Chi-square test)

		Grade			
		0	1	2	3
Score	0	4	55	24	4
	1	0	12	16	3
	2	0	4	11	6

p = 1.6×10<sup>-6</sup> (Chi-square test)

		Steatosis			
		0	1	2	3
Score	0	53	18	13	3
	1	11	13	4	3
	2	8	4	5	4

p = 0.003 (Chi-square test)

	NONE (n = 57)	HC (n = 30)	MIX (n = 44)	REC (n = 8)	ANOVA
Age	54.6 ± 11.7	54.6 ± 8.8	56.0 ± 11.9	59.4 ± 12.8	0.661
Sex (male/female)	14/43	14/16	31/13	4/4	6.62 × 10 <sup>-5</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.4 ± 4.2	23.8 ± 3.7	24.3 ± 3.6	25.2 ± 4.1	0.502
DM (yes/no)	4/53	4/26	3/41	0/8	0.479
HCV genotype:					0.095
1a/1b/2a/2b	0/23/11/3	0/17/3/1	1/14/3/11	0/4/1/1	
HCV serotype:					0.514
G1/G2	12/8	7/2	12/3	1/1	
HCV-RNA (logIU/ml)	6.1 ± 1.0	6.3 ± 0.8	6.3 ± 0.7	6.2 ± 0.9	0.500
AST (IU/L)	45.5 ± 33.6	47.8 ± 36.7	68.0 ± 38.6 <sup>a</sup>	66.9 ± 42.7	0.011
ALT (IU/L)	53.4 ± 51.6	57.7 ± 38.7	97.2 ± 75.6 <sup>b,c</sup>	83.9 ± 85.5	0.003
γ-GTP (IU/L)	44.7 ± 56.7	53.6 ± 69.4	78.0 ± 75.7	57.6 ± 32.3	0.088
Plt (×10 <sup>4</sup> /μL)	19.0 ± 4.6	17.7 ± 4.6	15.2 ± 4.6 <sup>d</sup>	13.9 ± 4.4	0.0002
Total cholesterol (mg/dl)	184.9 ± 26.9	180.7 ± 31.1	179.6 ± 33.7	180.1 ± 37.0	0.846
Triglyceride (mg/dl)	120.3 ± 120.6	111.3 ± 77.5	108.6 ± 49.8	104.6 ± 26.8	0.937
IRI (μU/ml)	11.9 ± 13.9	9.1 ± 4.0	10.8 ± 5.8	11.7 ± 7.5	0.815
Glucose (mg/dl)	106.9 ± 36.3	99.5 ± 15.0	103.1 ± 17.7	100.1 ± 17.2	0.639
HOMA	4.2 ± 7.6	2.4 ± 1.2	2.7 ± 1.5	3.0 ± 2.3	0.627
HbA1c (%)	5.9 ± 1.5	5.4 ± 0.7	5.2 ± 0.5	5.1 ± 0.3	0.210
Ferritin (ng/ml)	86.2 ± 65.6	201.6 ± 126.4 <sup>e</sup>	379.4 ± 231.1 <sup>f,g</sup>	252.8 ± 174.0	4.73 × 10 <sup>-14</sup>

<sup>a</sup> p = 0.02 vs NONE, <sup>b</sup> p = 0.009 vs NONE, <sup>c</sup> p = 0.023 vs HC, <sup>d</sup> p = 0.0007 vs NONE, <sup>e</sup> p = 0.0005 vs NONE

<sup>f</sup> p = 1.34×10<sup>-8</sup> vs NONE, <sup>g</sup> p = 0.001 vs HC (Dunnett T3 test)

図8 蓄積パターン別による背景因子の比較

	Stage 1-2 (n = 113)	Stage 3-4 (n = 26)	univariate	multivariate
Age	54.6 ± 11.6	58.6 ± 8.7	0.052	-
Sex (male/female)	47/66	16/10	0.052	-
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.2 ± 3.5	26.8 ± 4.4	0.001	0.013
DM (yes/no)	6/107	5/21	0.033*	0.265
HCV genotype:			0.246*	-
1a/1b/2a/2b	0/48/16/14	1/10/2/2		
HCV serotype:			0.556*	-
G1/G2	24/11	8/3		
HCV-RNA (logIU/ml)	6.1 ± 0.9	6.5 ± 0.6	0.021	0.151
AST (IU/L)	50.1 ± 37.0	72.8 ± 34.7	0.005	0.227
ALT (IU/L)	64.6 ± 61.7	93.3 ± 63.3	0.043	0.140
γ-GTP (IU/L)	49.8 ± 54.4	93.0 ± 96.0	0.035	0.086
Total cholesterol (mg/dl)	183.1 ± 29.0	178.3 ± 35.7	0.530	-
Triglyceride (mg/dl)	97.6 ± 41.6	171.7 ± 162.9	0.046	0.302
IRI (μU/ml)	9.8 ± 9.7	15.3 ± 11.8	0.095	-
Glucose (mg/dl)	100.1 ± 23.8	119.2 ± 31.9	0.007	0.317
HOMA	2.9 ± 4.7	5.2 ± 7.3	0.220	-
HbA1c (%)	5.5 ± 1.2	5.5 ± 0.7	0.963	-
Ferritin (ng/ml)	204.9 ± 199.9	222.8 ± 166.7	0.661	-
Steatosis (0/1/2/3)	66/27/15/5	6/8/7/5	0.0002*	0.399
HC iron (0/1/2/3/4)	55/24/18/12/4	10/6/9/1/0	0.849*	-
REC iron (0/1/2/3)	77/23/13	10/8/8	0.003*	0.004

univariate: Student's t-test, \* Chi-square test, multivariate: Logistic regression

図9 線維化進展因子の解析

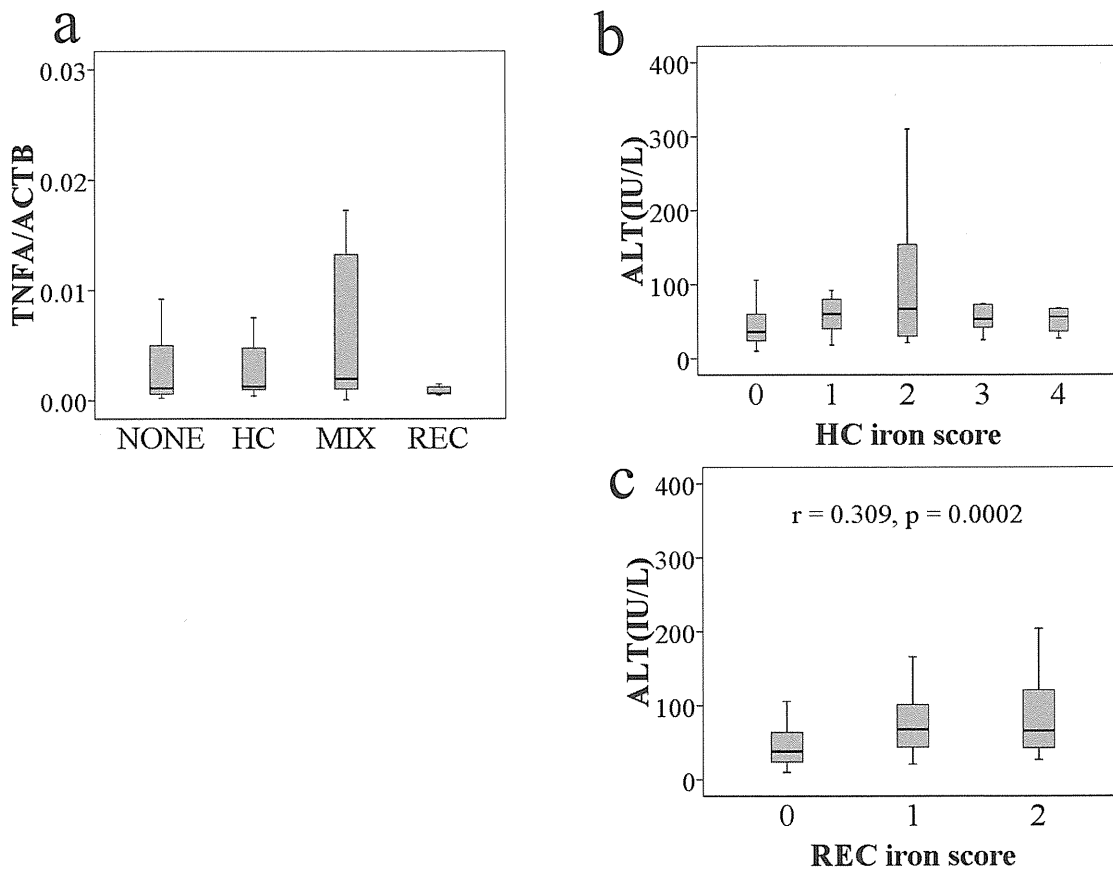


図10 鉄蓄積パターンと肝炎の活動性

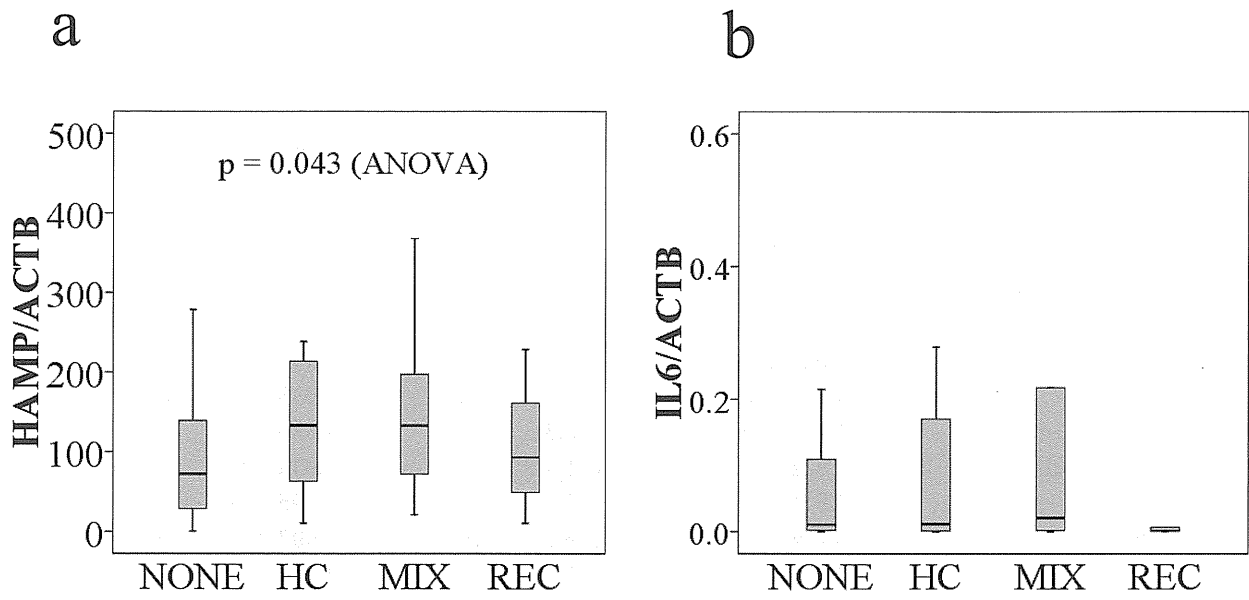


図11 蓄積パターンとhepcidinの発現レベル

## HCV coreアミノ酸置換が代謝・病態・治療に及ぼす影響

研究分担者 熊田 博光 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 分院長

研究要旨：Peginterferon/Ribavirin 併用療法難治要因の HCV-1b core アミノ酸置換が治療・代謝・病態に及ぼす影響を検討した。新規治療の Telaprevir 併用療法の効果予測因子として有用であるばかりでなく、肝発癌を含む肝病態進行にも影響することが確認された。更に、Core アミノ酸置換は糖/脂質代謝(代謝要因)や *IL28B* 遺伝子多型(宿主要因)とも関係し、特に Core アミノ酸置換は *IL28B* に影響されながら経時的に Major clone が変化している可能性も示唆された。Core アミノ酸置換と宿主・代謝要因の関係を解析することが将来の新規抗 HCV 療法の開発と肝病態進行メカニズムの解明につながると思われる。

### A. 研究目的

当院では HCV-1b core アミノ酸置換が Peginterferon (PEG-IFN)/Ribavirin (RBV) 併用療法難治要因であることを報告してきた。今回は、Core アミノ酸置換が新規抗 HCV 療法である PEG-IFN/RBV/Telaprevir (TVR) 3 剤併用療法の治療効果に及ぼす影響や、宿主・代謝要因と肝病態(肝線維化進行度・肝発癌)に及ぼす影響について検討した。

### B. 研究方法

Core アミノ酸置換 [aa70 の Arg70 (Wild) から Gln70/His70 (Mutant) への置換、aa91 の Leu91 (Wild) から Met91 (Mutant) への置換] はダイレクトシーケンス法でアミノ酸配列を決定。Arg70 (Wild) かつ Leu91 (Wild) の症例を Double wild type と定義した。

[検討 A : Core アミノ酸置換と新規治療]

Core アミノ酸置換の PEG-IFN/RBV/TVR 併用療法への影響を検討した。難治な前治療無効例に対して PEG-IFN  $\alpha$  2b/RBV/TVR (初期 12 週間は PEG-IFN/RBV/TVR の 3 剤併用投与し、その後の 12 週間は PEG-IFN/RBV の 2 剤併用投与) を施行された HCV genotype 1 の 15 例 (1a 1 例, 1b 14 例) を対象として SVR 予測因子を検討した。治療効果予測因子としては *IL28B* rs8099917 遺伝子多型, Core aa70 置換, 前治療反応性を検討した。更に、Core aa70 置換から見た 3 剤併用療法中の LDL-C 推移や、最終の治療成績から見た治療中の LDL-C 推移についても検討した。

[検討 B : Core アミノ酸置換と宿主・代謝要因]

Core アミノ酸置換と脂質/糖代謝要因・

*IL28B* 遺伝子多型を含む宿主要因との関係を検討した。

B-①：HCV-1b の慢性肝炎(肝硬変・糖尿病の症例は除外)130 例を対象にインスリン抵抗性(IR)の指標である HOMA-IR 上昇に寄与する要因を 27 個の因子を用いて多変量解析で検討した。HOMA-IR の $\geq 2.5$  を IR、特に $\geq 3.5$  を高度 IR と定義した。

B-②：HCV-1b で Core アミノ酸置換を評価された 2,220 例から Core アミノ酸置換と関連する代謝・宿主要因を検討した。脂質要因からは肝細胞脂肪化, 中性脂肪, LDL コレステロールと Core aa70 置換との関係、糖代謝要因からは空腹時血糖, HOMA-IR と Core aa70 置換との関係について検討した。宿主要因では *IL28B* rs8099917 遺伝子多型と Core aa70 置換との関係について検討した。代謝・宿主要因を含む 17 個の因子を用いて Core aa70 置換に関連する因子を多変量解析で検討した。

[検討 C：Core アミノ酸置換と肝病態]

Core アミノ酸置換が肝発癌を含む肝病態に及ぼす影響を検討した。

C-①：HCV-1b で 75 歳以上の高齢初発 C 型肝癌 62 例における糖・脂質・鉄代謝の特徴を 50 歳未満の若年初発 C 型肝癌 34 例と比較した。更に、高齢初発肝癌治療後の生命予後に寄与する要因を 28 個の因子を用いて多変量解析で検討した。

C-②：24~48 週間の十分量の RBV 併用療法で non-SVR であった HCV-1b の 352 例を対象として肝発癌に寄与する要因を 18 個の因子を用いて多変量解析で検討した。

(倫理面の配慮)

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

[検討 A：Core アミノ酸置換と新規治療]

前治療無効例の SVR は 27%。SVR に寄与する要因は、単変量解析(Fisher's exact probability test)で Core aa70(Wild) ( $P=0.015$ )、前治療反応性(partial response; RNA 量が 2 log 以上低下した無効例) ( $P=0.077$ ) が重要な要因であった。特に、前治療無効例で Core aa70 に前治療反応性を組み合わせて SVR 率を検討すると Core aa70(Wild)かつ前治療 partial response の症例では SVR が 80%であった。一方、Core aa70(Mutant)の症例では当院から SVR 例は確認されなかった。3 剤併用療法中の LDL-C は Core aa70(Mutant)よりも Core aa70(Wild)の方が高値を推移していた。更に、最終の治療成績から LDL-C の推移を見ると Non SVR 例よりも SVR 例の方が高値を推移していた。

[検討 B：Core アミノ酸置換と宿主・代謝要因]

B-①：Core aa70/91 置換と HOMA-IR の関係を検討すると、Non double wild type

の症例 (median 2.8) は、Double wild type の症例 (median 2.4) よりも HOMA-IR 高値を示し (Mann-Whitney U test;  $P=0.015$ )、Core aa70/91 置換が IR に影響する結果が得られた。更に、高度 IR に寄与する要因は、単変量解析で肝細胞脂肪化 ( $\geq 5\%$ ) ( $P=0.006$ )、Core aa70/91 置換 (Non double wild type) ( $P=0.021$ )、年齢 ( $\geq 55$  歳) ( $P=0.013$ )、BMI ( $\geq 23.0\text{kg/m}^2$ ) ( $P=0.013$ )、中性脂肪 ( $\geq 100\text{mg/dl}$ ) ( $P=0.041$ ) が統計学的有意差を示し、多変量解析 (Multiple logistic regression analysis) でも肝細胞脂肪化 ( $\geq 5\%$ ) ( $P=0.004$ )、Core aa70/91 置換 (Non double wild type) ( $P=0.027$ ) は高度 IR に寄与する独立要因として抽出された。

B-②：脂質要因では、肝細胞脂肪化の程度が強くなると Core aa70 (Mutant) の頻度が上昇することが単変量解析 (Chi-squared test) で確認された ( $P=0.022$ )。また、Core aa70 (Mutant) では中性脂肪が高値 ( $P=0.015$ )、LDL コレステロールが低値 ( $P=0.006$ ) を示すことも単変量解析 (Mann-Whitney U test) で確認された。糖代謝要因では、糖尿病合併例を除外した検討において HOMA-IR 値が高くなると Core aa70 (Mutant) の頻度が上昇する傾向が単変量解析 (Chi-squared test) で確認された ( $P=0.072$ )。また、Core aa70 (Mutant) では空腹時血糖が高値を示す傾向があることも単変量解析 (Mann-Whitney U test) で確認された ( $P=0.050$ )。宿主要因の *IL28B* rs8099917 と Core aa70 置換との関係を検討すると、TT かつ Wild を示す症例の頻度

(72%) は TT かつ Mutant (28%) より高率で、non-TT かつ Mutant (59%) も non-TT かつ Wild (41%) より高率であった (Chi-squared test) ( $P<0.001$ )。最終的に Core aa70 (Mutant) と関連する要因を多変量解析 (Multiple logistic regression analysis) で検討すると、*IL28B* rs8099917 (non-TT) (OR6.4,  $P<0.001$ ) が独立要因として抽出された。また、*IL28B* 遺伝子多型を除外した代謝要因のみで Core aa70 (Mutant) と関連する要因を検討すると、中性脂肪 ( $\geq 100\text{mg/dl}$ ) (OR1.6,  $P=0.001$ )、LDL-C ( $<85\text{mg/dl}$ ) (OR1.4,  $P=0.037$ )、空腹時血糖 ( $\geq 126\text{mg/dl}$ ) (OR1.8,  $P=0.042$ ) という脂質/糖代謝要因が独立要因として抽出された。

[検討 C：Core アミノ酸置換と肝病態]

C-①：高齢初発肝癌の特徴は若年肝癌と比較して女性・輸血歴が多く、肝疾患家族歴が少なく (Fisher's exact probability test;  $P<0.05$ )、肝機能 (総ビリルビン低値, ALT 低値, PT 高値) が維持されていた (Mann-Whitney U test;  $P<0.05$ )。また、高齢肝癌では糖 (空腹時インスリン低値, HOMA-IR 低値)・脂質 (HDL-C 高値) の代謝機能も保たれていた (Mann-Whitney U test;  $P<0.05$ )。しかし、鉄代謝機能 (血清鉄, フェリチン) は高齢・若年の間で統計学的に有意差を認めなかった。結局、HCV-1b 高齢初発肝癌の特徴としては女性の慢性肝炎の症例が多く認められた。更に、高齢初発肝癌治療後の生命予後に寄与する独立要因を多変量解析 (Cox proportional hazard model) で検討すると、男性



(P=0.021), Core aa91 置換 (Met91) (P=0.012), 非根治療法 (P=0.085) の症例で生命予後が不良である結果が得られた。

C-②: RBV 併用療法 non-SVR 例からの肝発癌に寄与する要因は、単変量解析で Core aa70 (Mutant), Core aa91 (Wild), ISDR 変異数 (2 個以上) が有意差を示し、多変量解析では Core aa70 (Mutant) (HR5.5, P=0.040) のみが独立要因として抽出された。

#### D. 考察

トランスジェニック・マウスによる動物実験では HCV core 蛋白による肝細胞脂肪化・IR といった脂質/糖代謝への影響やそれらを介した肝発癌を含む肝病態進行への影響が報告されてきた。当施設の検討は、このような基礎的な検討を臨床面から支持する成績であるといえる。特に、脂質/糖代謝・肝発癌に寄与する要因としてウイルス要因の Core アミノ酸置換が抽出されたことは HCV の肝病態への直接的な関与を示唆する重要な成績であるといえる。

Core aa70 置換は難治な前治療無効例に対する PEG-IFN/RBV/TVR 併用療法の治療効果予測因子としても重要であることが示された。治療中の LDL-C は難治要因の Core aa70 (Mutant) で低値を推移し、Non SVR でも同様に低値を推移していた。この結果は、難治要因の Core aa70 置換が脂質要因を介して治療抵抗性に関与することを示す成績と言える。また、前治療無効例の治療成績は脂質代謝を標的とした薬剤の追加で更なる効果改善が期待されることを示す成績と

言える。

高齢化社会における C 型肝炎症例の高齢化現象が認められる。このような高齢肝発癌の特徴を明らかにすることで妥当な肝発癌予防目的の抗 HCV 療法を選択出来る様になると思われる。特に、高齢初発肝発癌で Core aa91 置換 (Mutant) の症例では肝癌治療後の生命予後が不良であることが確認された。更に、従来 IFN 単独療法施行例からの肝発癌に Core aa70/91 置換が関与することを当施設では報告してきたが、今回はより強力な抗 HCV 療法の RBV 併用療法で治癒しなかった症例でも Core aa70 置換が肝発癌に関与することが確認された。よって、このような risk factor を持つ症例には IFN 少量間歇投与等の積極的な肝発癌予防策を行っていく必要が有るとと思われる。

Core aa70 置換が脂質/糖代謝要因以外に *IL28B* 遺伝子多型とも関連している可能性が示唆された。特に、Core aa70 置換と *IL28B* の分布を考えると、*IL28B* に影響されながら Core aa70 の Major clone が経時的に変化している可能性が考えられる。この様に、Core アミノ酸置換と *IL28B* 遺伝子多型との関連や、Core アミノ酸置換の脂質/糖代謝要因への影響を解析することが将来の新規抗 HCV 療法の開発と肝病態進行メカニズムの解明につながるとと思われる。

#### E. 結論

HCV-1b core アミノ酸置換は PEG-IFN/RBV/TVR 併用療法の治療効果予測因子として有用であるだけでなく、肝発癌を含む肝病態進行にも影響する。更に、Core アミノ酸置換は糖/脂質代謝 (代謝要因) や

*IL28B*(宿主要因)とも関係し、特に Core アミノ酸置換は *IL28B* に影響されながら経時的に Major clone が変化している可能性も示唆された。Core アミノ酸置換と宿主・代謝要因の関係を解析することが将来の新規抗 HCV 療法の開発と肝病態進行メカニズムの解明につながると思われる。

#### F. 健康危険情報

今回の研究内容については特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Akuta N, Suzuki F, Tsubota A, Suzuki Y, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Efficacy of interferon monotherapy to 394 consecutive naive cases infected with hepatitis C virus genotype 2a in Japan; Therapy efficacy as consequence of tripartite interaction of viral, host and interferon treatment-related factors. *J Hepatol* 2002;37:831-836.
- 2) Akuta N, Suzuki F, Suzuki Y, Sezaki H, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Hepatocyte steatosis is an important predictor of response to interferon (IFN) monotherapy in Japanese patients infected with HCV genotype 2a. Virological features of IFN-resistant cases with hepatocyte steatosis. *J Med Virol* 2005;75:550-558.
- 3) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Watahiki S, Sato J, Matsuda M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology* 2005;48:372-380.
- 4) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Watahiki S, Sato J, Matsuda M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Predictive factors of virological non-response to interferon-ribavirin combination therapy for patients infected with hepatitis C virus of genotype 1b and high viral load. *J Med Virol* 2006;78:83-90.
- 5) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: Amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol* 2007;46:403-410.
- 6) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Miyakawa Y, Kumada H. Prediction of response to pegylated interferon and ribavirin in hepatitis C by polymorphisms in the viral core protein and very early dynamics of viremia. *Intervirology* 2007;50:361-368.
- 7) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M,

- Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Predictors of viral kinetics to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol* 2007;79:1686-1695.
- 8) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region are the important predictor of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2007;46:1357-1364.
- 9) Okamoto K, Akuta N, Kumada H, Kobayashi M, Matsuo Y, Tazawa H. A nucleotide sequence variation detection system for the core region of hepatitis C virus-1b. *J Virol Methods* 2007;141:1-6.
- 10) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Substitution of amino acid 70 in the hepatitis C virus core region of genotype 1b is an important predictor of elevated alpha-fetoprotein in patients without hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2008;80:1354-1362.
- 11) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Efficacy of low-dose intermittent interferon-alpha monotherapy in patients infected with hepatitis C virus genotype 1b who were predicted or failed to respond to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy. *J Med Virol* 2008;80:1363-1369.
- 12) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. A matched case-controlled study of 48 and 72 weeks of peginterferon plus ribavirin combination therapy in patients infected with HCV genotype 1b in Japan: Amino acid substitutions in HCV core region as predictor of sustained virological response. *J Med Virol* 2009;81:452-458.
- 13) 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 are the important predictor of severe insulin resistance in patients without cirrhosis and diabetes mellitus. *J Med Virol* 2009;81:1032-1039.
- 14) 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* 2009;44:952-963.
- 15) Ogura S, Akuta N, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Virological and biochemical

- features in elderly HCV patients with hepatocellular carcinoma: amino acid substitutions in HCV core region as predictor of mortality after first treatment. *Intervirology* 2009;52:179-188.
- 16) Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Hosaka T, Sezaki H, Kobayashi M, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Watahiki S, Mineta R, Iwasaki S, Miyakawa Y, Kumada H. Influence of amino-acid polymorphism in the core protein on progression of liver disease in patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol* 2010;82:41-48.
- 17) Kawamura Y, Arase Y, Ikeda K, Hirakawa M, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Yatsuji H, Sezaki H, Akuta N, Suzuki F, Suzuki Y, Kumada H. Diabetes enhances hepatocarcinogenesis in noncirrhotic, interferon-treated hepatitis C patients. *Am J Med* 2010;123:951-956.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in hepatitis C virus core region predict hepatocarcinogenesis following eradication of HCV RNA by antiviral therapy. *J Med Virol* 2011;83:1016-22.
- 21) Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy. *Gut* 2011;60:261-7.
- 22) 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;53:415-21.
- 23) 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.

24) 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]

25) 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]

H. 知的所有権の出願・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。

## C型肝炎ウイルス持続感染例に対する抗ウイルス療法における IL28B遺伝子多型とインスリン抵抗性の 抗ウイルス効果への影響に関する研究

研究分担者 古庄 憲浩 九州大学大学院 感染環境医学 准教授  
研究協力者 林 純 九州大学大学院 感染環境医学 教授  
村田 昌之 九州大学病院 総合診療科 臨床准教授  
小川 栄一 九州大学病院 総合診療科 助教

### 研究要旨：

(平成21年度) HCV持続感染は、頸動脈アテローム性動脈硬化症に対する脂質降下剤治療の効果を妨げる。

(平成22年度) HCV持続感染は、心筋障害を示すヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメントが高値であり、心不全との関連がある。

(平成23年度) HCV持続感染例に対する抗ウイルス療法において、インターロイキン28B TTはHCV genotypeに共通した治療有効因子であるものの、インスリン抵抗性はHCV genotype 1型に対して独立した負の効果因子である。

### A. 研究目的

(平成21年度) 肺炎クラミジア（肺炎クラミドフィラ）感染が脂質降下剤の抗動脈硬化効果作用を減弱させることを既に報告しているが、C型肝炎ウイルス（HCV）持続感染について同様に検討した。

(平成22年度) C型肝炎ウイルス（HCV）と動脈硬化性疾患の結果生じるとされる心不全との関連が報告されている。心筋障害

の鋭敏なマーカーであるヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメント（NT-proBNP）を用いて、HCV感染における心筋障害の影響について検討した。

(平成23年度) C型肝炎ウイルス（HCV）持続感染例に対するペグインターフェロン（PEG-IFN） $\alpha$ ・リバビリン（RBV）治療効果とインターロイキン28B（IL28B）遺伝子多型、インスリン抵抗性について検討した。

## B. 研究方法

(平成21年度) 対象は、165例の無症候性血清脂質異常症患者で、脂質降下剤のプロブコール (500mg/日、82例) またはプラバスタチン (10mg/日、83例) の内服治療の2群に無作為割付けし2年間の観察を行った。観察終了時の頸動脈超音波の頸動脈内膜中膜複合体厚 (IMT) の改善を主要エンドポイントとした。

(平成22年度) 心疾患を指摘されることがないHCV感染患者90例 (男性43例、女性47例、平均年齢 58.4 ±5.4才) を、性、年齢をマッチさせた対照180例と比較し解析を行った。

(平成23年度) 対象は当施設でPEG-IFN $\alpha$ ・RBV治療を受けたHCV持続感染421例で、HCV 1型が328例、2型が93例で、IL28B遺伝子多型のTT群は296例 (70.3%)、TG/GG群は125例 (29.7%) であった。治療前に空腹時の血糖およびインスリン値から、インスリン抵抗性を評価するHOMA-IRを測定し治療効果(治療後持続的HCV血症消失、SVR)と検討した。

(倫理面の配慮)

当病院の倫理委員会、ヒトゲノム遺伝子解析研究委員会の承認を得た。すべての患者へ十分なインフォームド・コンセントを行い、文書にて承諾を得た。

## C. 研究結果

(平成21年度)

1. HCV感染および非感染においても脂質降下剤による血清脂質値は有意に低下した。
2. 脂質降下剤による最大IMTの改善率において、HCV非感染例は-10.9%と有意に改善したが、HCV感染例は-0.3%で改善を認めなかった。
3. 治療薬群間において血清脂質値および最大IMT値の改善に差を認めなかった。
4. 多変量解析にて、HCV感染と肺炎クラミドフィラ感染が最大IMT値に関する独立した負の因子であった。

(平成22年度)

1. HCV感染群は、対照群と比べ、糖尿病、脂質異常症の罹患率が低く、NT-proBNP値が有意に高値であった。
2. 心疾患の存在が疑われるNT-proBNP $\geq$ 125pg/mlを認めたのは、HCV感染群では20%であり、対照群0.6%に比べ有意に高率であった。
3. 多変量解析にて、NT-proBNP $\geq$ 125pg/mlに関する因子として、HCV持続感染とBMI値が抽出された。
4. 多変量解析にて、HCV感染例におけるproBNP $\geq$ 125pg/mlに関する因子として、収縮期血圧値、中性脂肪値、血清HCV RNA量が抽出された。

(平成23年度)

1. HCV 1型および2型ともにIL28B遺伝子TT例は、TG/GG例に比べ有意にSVR率が高率であった。
2. 肥満例、 $\gamma$ GTP高値例、高HCV RNA量例、血小板低値例、AFP高値例および血

清IV型コラーゲン高値例、空腹時インスリン高値例およびHOMA-IR高値例、規定治療量が不十分例、早期ウイルス消失例などが治療効果の負の因子であったが、多変量解析にて、IL28Bと独立してインスリン抵抗性が治療効果に影響を及ぼした。

#### D. 考察

(平成21年度)

HCV感染とアテローム性動脈硬化症の関係を説明することができるかもしれない。第一に、HCV感染はときに免疫性血管炎を合併することがある。第二に、HCV感染は酸化ストレスの増加と関係している。第三に、HCV感染はインスリン抵抗性を誘導することによってアテローム発生を加速する可能性がある。疫学研究および臨床研究においては、高LDLコレステロール値がアテローム性動脈硬化症の発症に非常に重要であり、LDLコレステロール値を低下させることで冠動脈疾患や心筋梗塞の進展を低下させることもできる。積極的な脂質降下剤による治療には血清脂質を低下させるだけでなく、動脈でのプラークを安定させることも分かっている。HCV感染でも、総コレステロール値とLDLコレステロール値が積極的治療によって低下したにもかかわらず、非HCV感染に起こったような頸動脈IMT値の改善は認めなかった。これらの現象は、HCV感染がアテローム性動脈硬化症の進行の危険因子のひとつであることを示唆する。

(平成22年度)

HCV感染例が対象例に比べ、NT-proBNP値が有意に高値であることが示され、心疾患の存在が示唆されるNT-proBNP $\geq$ 125pg/mlをきたす因子として、HCV感染が抽出された。このことは、HCV感染は、肝臓内での持続感染のみならず、心筋内での持続感染の結果生じたものではないかと考えられる。一般に肝内でのHCV持続感染の臨床経過は、一連の増悪と寛解を呈し、最終的に肝硬変、肝不全、肝臓癌と進展する特徴がある。心臓でのHCV持続感染の経過も、心筋内への慢性感染ののち、一部が心筋の線維化をきたし、またその一部が拡張型心筋症や肥大型心筋症へと進展する可能性が考えられている。

(平成23年度)

HCV 1型は、HCV 2型に比べ、抗ウイルス効果が低い原因についてはいまだ明らかになっていない。一方、IL28B遺伝子多型は、HCV 1型および2型ともに抗ウイルス効果に関与した。最近の知見として、Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3)の細胞内高発現が、HCV持続感染のインスリン抵抗性と抗ウイルス効果に関与することが示唆されている。肥満やHCV感染自体が、SOCS3の高発現を来し、そのため、細胞内のインターフェロンシグナルの発現が低下と関与することが、治療効果が低下することにつながると報告されている。一方で、HCV持続感染例が抗ウイルス療法で持続的にHCV血症消失した場合、HCV 1型ではインスリン抵抗性が改善するが、HCV 2型では改善しないという報告もある。本研究で、



HCV 1型においてインスリン抵抗性は抗ウイルス効果に関わるが、HCV 2型ではその現象を認められなかった点については、HCV genotype差があることを示しており、今後HCV genotype特異性の研究が必要である。

#### E. 結論

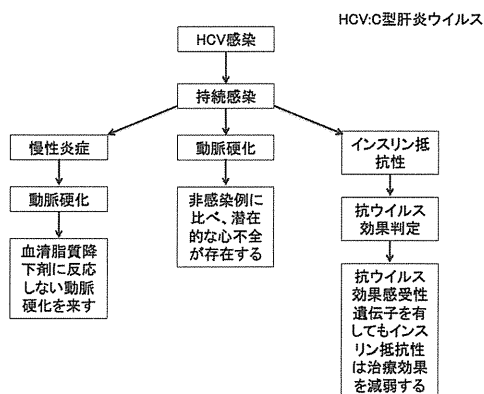
(平成21年度) HCV持続感染は、頸動脈アテローム性動脈硬化症に対する脂質降下剤治療の効果を妨げる。

(平成22年度) HCV持続感染は、心筋障害を示すヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメントが高値であり、心不全との関連がある。

(平成23年度) HCV持続感染例に対する抗ウイルス療法において、インターロイキン28B TTはHCV genotypeに共通した治療有効因子であるものの、インスリン抵抗性はHCV genotype 1型に対して独立した負の効果因子である。

以上をシェーマにまとめた。

肝炎ウイルスと代謝・免疫系の相互作用に関する包括的研究



F. 健康危険情報：なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) **Furusyo N**, Murata M, Ogawa E, Toyoda K, Ihara T, Ikezaki H, Hayashi T, Koga T, Kainuma M, Hayashi J. Ribavirin concentration in the later stages of 48-week pegylated interferon-alfa 2b plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C is useful for predicting virological response. J Antimicrob Chemother 2011; 66: 1127-1139.
- 2) Ikezaki H, **Furusyo N**, Ihara T, Hayashi T, Ogawa E, Toyoda K, Taniai H, Kainuma M, Murata M, Hayashi J. Abbott RealTime PCR Assay is useful for evaluating virological response to antiviral treatment for Chronic Hepatitis C. J Infect Chemother 2011; 17: 737-743.
- 3) **Furusyo N**, Walaa AH, Eiraku K, Toyoda K, Ogawa E, Ikezaki H, Ihara T, Hayashi T, Kainuma M, Murata M, Hayashi J. Eradication treatment of Helicobacter pylori infection for chronic hepatitis C patients. Gut and Liver 2011; 5: 447-453.
- 4) Ogawa E, **Furusyo N**, Murata M, Ohnishi H, Kazuhiro T, Tania H, Ihara T, Ikezaki H, Hayashi T, Kainuma M, Hayashi J. Longitudinal assessment of liver stiffness by transient elastography for chronic hepatitis B patients treated with nucleoside analog. Hepatol Res 2011; 41: 1178-1188.
- 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 Group. An evaluation of the adverse effect of premature discontinuation of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin treatment for chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* (in press)
- 6) Kainuma M, Furusyo N, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Shimono J, Shimoda S, Hayashi J, Pegylated interferon  $\alpha$ -2b plus ribavirin for older patients with chronic hepatitis C, *World Journal of Gastroenterology* 2010; 16: 4400-4409.
- 7) Ogawa E, Furusyo N, Toyoda K, Taniai H, Otaguro S, Kainuma M, Murata M, Sawayama Y, Hayashi J, Excellent superiority and specificity of COBAS TaqMan HCV assay in an early viral kinetic change during pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin treatment, *BMC Gastroenterology* 2010; 10: 38.
- 8) Maeda S, Sawayama Y, Furusyo N, Shigematsu M, Hayashi J. The association between fatal vascular events and risk factors for carotid atherosclerosis in patients on maintenance hemodialysis: Plaque number of dialytic atherosclerosis study. *Atherosclerosis* 2009; 204: 549-555.
- 9) Sawayama Y, Kikuchi K, Tatsukawa M, Hayashi S, Taira Y, Furusyo N, Hayashi J. Association of chlamydia pneumoniae DNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells and IgA Antibody with Atherosclerotic Diseases. *Fukuoka Acta Med* 2009; 100: 305-312.
- 10) Ogawa E, Furusyo N, Toyoda K, Takeoka H, Maeda S, Hayashi J. The longitudinal quantitative assessment by transient elastography of chronic hepatitis C patients treated with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin. *Antiviral Research* 2009; 83: 127-134.
- H.知的所有権の出願・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

## 自己免疫疾患としての心血管疾患に関する研究

研究分担者 石坂 信和 大阪医科大学内科学講座内科学Ⅲ・教授

### 研究要旨：

C型慢性肝炎と動脈硬化性疾患をむすぶメカニズムについて、代謝および免疫学的な異常の両面からのアプローチを試みた。C型慢性肝炎においては、インスリン抵抗性が亢進している一方で、そのことが血糖や血清脂質のパラメータに反映されにくいことより、「隠れインスリン抵抗性」状態を呈していると考えられる。一方、健診受診者のデータの経年的変化を検討した研究から、体重の増減がインスリン抵抗性の増減に反映される程度は、C型慢性肝炎症例と非肝炎症例で差を認めないことが明らかになった。

冠動脈疾患における免疫学的異常についての知識は、臨床の場において限定的である。そこで、IgG4関連疾患の観点から、自己免疫と冠動脈病変の関連について検討した。組織学的にIgG4陽性形質細胞の冠動脈周囲への著明な浸潤が証明された2例では、ステロイド治療にもかかわらず拡大傾向を示す冠動脈瘤や、冠動脈周囲の偽性瘤に高度内腔狭窄が併存していた。冠動脈造影が施行された連続286例の検討では、血清IgG4値は、冠動脈狭窄の独立した危険因子であった。代謝異常に加えて、免疫学的な異常がC型慢性肝炎の冠動脈疾患をむすぶファクターであるかどうか、さらなる検討が必要である。

### A.研究目的

われわれは、C型慢性肝炎症例において、早期動脈硬化病変の頻度が高い可能性について報告したが、その後も、関連した類似の報告がさまざまな施設からなされている。今回のわれわれの目標は、C型慢性肝炎と動脈硬化性疾患を結ぶ背景にある病態として、どのようなものがあるかについて、本研究班の趣旨に従い、代謝異常および免疫学的機序の観点から検討を行った。

3年にわたる研究の前半では、インスリン

抵抗性の観点から、代謝面に焦点を当てた検討を行った。インスリン抵抗性の亢進は、その表現型である血糖や中性脂肪の高値、HDLコレステロールの低値などとともに、動脈硬化のリスクを増大することから、C型慢性肝炎症例におけるインスリン抵抗性について検討した。人間ドックを受診した症例において、HCVコア蛋白陽性の症例について、食前インスリン値・血糖値からHOMA-IRを計算した。また、肝炎症例においては、糖・脂質プロファイルの問題は

少ない、と考えられているため、インスリン抵抗性と、血中の糖・脂質プロファイルの間に解離がある可能性について検討した。さらに、解離がある場合については、対象の肥満度から推定されるインスリン抵抗性が、非肝炎症例と比べて高いかどうかについて、やはり、HOMA-IR を計算することで検討した。

研究の後半では、心血管疾患では、免疫・炎症機転が発症・進展に関与する可能性について、臨床的な報告がほとんど存在しないことから、IgG4 関連の(自己)免疫、という観点から、免疫・炎症と冠動脈疾患の関連について、症例レベルの血清学的・組織学的な検討に加えて、冠動脈造影が施行された症例を対象として、血清中の IgG4 値と冠動脈狭窄の関連について解析した。

## B.研究方法

C 型慢性肝炎症例のインスリン抵抗性について、2004 年 1 月から 2009 年 12 月に、人間ドックを 2 年連続で受診した 3852 名(男性 2541 名、女性 1311 名)を対象に検討した。また、HCV コア蛋白(抗原)陽性の症例を C 型慢性肝炎群と判断した。HCV コア蛋白陽性の慢性 C 型肝炎症例は 33 症例、陰性症例は、3819 症例であった。体格指数(BMI)などの体格指数とインスリン抵抗指数(HOMA-IR)間の関連、および、これらのパラメータの年次変化の間の関連について検討し、各パラメータの年次変化率は(「2 回目受診時の値」-「初回受診時の値」)/「初回受診時の値」×100 (%)で求め、以下の表記とした。

BMI の変化率

%dBMI

HOMA-IR の変化率

%dHOMA

IgG4 関連の自己免疫と冠動脈疾患の関連についての検討は、症例ベースの検討に加えて、冠動脈造影が施行され、血中バイオマーカーの測定に承諾が得られた症例を対象にして、血清 IgG4 値の測定を行うことで検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、三井記念病院と東京大学医学部、大阪医科大学の共同研究プロジェクトであるが、いずれの施設においても、倫理委員会の承諾を得ており、個人情報の取り扱いにも細心の注意を払っている。

## C.研究結果

### ■C 型慢性肝炎症例のインスリン抵抗性の検討

2 年連続で健診を受けた対象症例の各受診間の平均は  $376 \pm 66$  日であった。平均年齢は非肝炎症例の  $60 \pm 10$  歳に比較し、C 型肝炎症例の平均年齢は  $66 \pm 11$  歳と有意に高齢であった。C 型慢性肝炎症例では、非肝炎症例に比較して、BMI 低値(肝炎 vs. 非肝炎： $26 \pm 2$  vs.  $23 \pm 3$ kg/m<sup>2</sup>)、中性脂肪低値(肝炎 vs. 非肝炎： $90 \pm 29$  vs.  $118 \pm 83$ mg/dL)、HOMA-IR 高値(肝炎 vs. 非肝炎： $2.8 \pm 2.4$  vs.  $1.7 \pm 1.3$ )、であった。肝炎症例、非肝炎症例ともに、BMI と HOMA-IR の間には、正の相関が存在し、散布図から、肝炎症例において、BMI の増加による HOMA-IR の増加が非肝炎症例より大きいことが見て取れたが、統計的な有意差には至らなかった。次に、BMI のパーセント変