

201125020A

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

ウイルス性肝炎からの発がん及び肝がん再発の
抑制に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 紀夫

平成24(2012)年 3月

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

ウイルス性肝炎からの発がん及び肝がん再発の
抑制に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 紀夫

平成24(2012)年 3月

ウイルス性肝炎からの発がん及び肝がん再発の抑制に関する研究

班員名簿

班長	林 紀夫	独立行政法人労働者健康福祉機構 関西労災病院 消化器内科学	病院長
班員	坪内 博仁	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 消化器疾患・生活習慣病学	教授
	野村 秀幸	国家公務員共済組合連合会 新小倉病院 肝臓センター	部長
	上田 啓次	大阪大学大学院医学系研究科 ウイルス学	教授
	片野 義明	名古屋大学医学部附属病院 消化器内科学	講師
	江口 潤一	昭和大学大学院医学部 消化器内科学	助教
	中本 安成	福井大学医学部医学科 病態制御医学講座内科学（2）領域	教授
	竹原 徹郎	大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学	教授
	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
	考藤 達哉	大阪大学大学院医学系研究科 樹状細胞制御治療学	寄附講座准教授

目 次

I. 総括研究報告書

- ウイルス性肝炎からの発がん及び肝がん再発の抑制に関する研究・・・・・・・・・・ 1
林 紀夫

II. 分担研究報告書

1. 肝炎の進展過程における炎症の調節因子オステオアクチビンの役割・・・・・・・・ 5
坪内 博仁
2. PEG-IFN/RBV 治療後の肝細胞癌発癌についての検討・・・・・・・・・・ 8
野村 秀幸
3. HBV 感染受容体同定に向けたアプローチ・・・・・・・・・・ 11
上田 啓次
4. C 型肝炎における PEGIFN/Ribavirin 併用療法後の発癌に関連する・・・・・・・・ 13
臨床的背景因子の解析
片野 義明
5. 樹状細胞と抗 PD-1 抗体を用いた肝癌に対する免疫療法の検討・・・・・・・・ 18
江口 潤一
6. ウイルス性肝炎・肝がんにおける抗原特異的な免疫制御に関する研究・・・・・・・・ 21
中本 安成
7. ソラフェニブによる肝がん細胞のオートファジー誘導について・・・・・・・・ 23
竹原 徹郎
8. ALT 正常 C 型肝炎に対する Peg-IFN/Ribavirin 併用療法の・・・・・・・・ 27
肝発癌抑制効果について
平松 直樹
9. 原発性肝癌における TIE2 陽性単球の意義・・・・・・・・・・ 29
考藤 達哉

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・ 31

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・ 39

I. 総括研究報告

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）
総括研究報告書

ウイルス性肝炎からの発がん及び肝がん再発の抑制に関する研究

研究代表者： 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： ウイルス性肝炎からの発がん及び肝がん再発の抑制を目指して、Peg-IFN/RBV 併用治療時代の肝発がんの実態と肝がんの分子・免疫病態を解明することを目的に研究を行う。Peg-IFN/RBV 併用療法後の C 型肝炎からの肝発がんに関与する因子について、大阪地区、名古屋地区、九州地区の 3 つの大規模コホートを用いて解析を行った。肝がんの診断マーカーとして TEM の有用性、肝がんの分子標的薬剤耐性機構のひとつとしてオートファジー誘導の重要性、肝がんに対する免疫応答として広汎な CTL レスポンスの存在などが示された。

A. 研究目的

ウイルス性肝炎、特に C 型肝炎からの発がんは我が国の肝がんの 4 分の 3 を占めている。2004 年 12 月以降、C 型肝炎に対する抗ウイルス治療は Peg-IFN/RBV の併用投与が標準であるが、なおウイルス排除に至らない症例が存在する。C 型肝炎は早期に発見され、根治的な治療が行われたとしても高率に再発し、患者の予後を不良なものとしている。

本研究課題では Peg-IFN/RBV 治療が臨床に登場し 7 年が経過した現時点における我が国の発がんの実態を 8,000 例以上の Peg-IFN/RBV 治療開始登録データベースをもとに解析を行う。このような検討を行うことにより、慢性肝炎、肝硬変、肝がん根治後の各段階からの発がんの実態が解明さ

れるとともに、Peg-IFN/RBV 治療が発がんをどの程度抑止し得るのが明らかになる。また、Peg-IFN/RBV 併用を行うことにより、IFN 単独治療時代に比べ、高齢者、線維化進展例などのより難治群から SVR が得られるようになったが、このことは SVR からの発がんが従来よりも上昇している可能性を示唆している。さらに、non-SVR 例に対する肝庇護療法や IFN 少量長期投与が発がんを抑止しているか否かについては明らかにされていない。このような問題に関しても、正確なエビデンスを提示することが可能となる。さらに、肝生検試料を用いた分子生物学的解析、末梢血単核球を用いた免疫学的解析を行うことにより、C 型肝炎からの発がんに関連する分子・免疫病態を検討する。Peg-IFN/RBV 治療によるウイルス排除や

IFN 少量長期投与、肝庇護療法による肝炎の鎮静化がこのような分子・免疫病態を改善するかどうかについて解明を目指す。

C 型肝炎からの発がん/再発に影響する臨床的背景因子、分子免疫病態を明らかにすることは、ハイリスク群の患者を囲い込み、さらに発がん抑止の戦略を構築する上で有用であると考えられる。本研究の成果は、医療の均てん化、医療費の効率的な運用、C 型肝炎患者の QOL と生命予後の改善に資するものと考えられる。

B. 研究方法

1) Peg-IFN/RBV 併用時代における C 型肝炎からの発がん実態の解明：大阪地区 (Osaka Liver Forum)、名古屋地区 (名古屋 Hepatitis セミナー)、九州地区 (KULDS) の Peg-IFN/RBV 併用治療開始登録データベースより、発がんについての解析を行う。

2) B 型肝炎の感染機構：HBV 膜蛋白粒子外領域をプローブとした大腸菌発現ライブラリーのスクリーニングにより HBV 付着因子を探索する。

3) 炎症と肝発がん：動物モデルを用いて肝障害におけるオステオアクチピンの意義について検討する。

4) 肝がんに対する免疫応答と免疫治療：肝がんにおける TIE2 陽性単球 (TEM) の意義を検討するため、末梢血での同細胞の頻度と病態の関係を解析する。肝がん患者における CTL レスポンスを ELISPOT 法で解析し、治療介入との関連を解析する。動物モデルを用いて PD-1 阻害の抗腫瘍効果について検討する。

5) 肝がんにおける分子標的薬剤耐性機構：肝がん細胞株にソラフェニブを投与し、オートファ

ジーの誘導とその意義を検討する。

C. 研究成果

1) Peg-IFN/RBV 併用時代における C 型肝炎からの発がん実態の解明

(大阪地区)

ALT 正常 C 型肝炎例の抗ウイルス治療ガイドラインにおける各群の抗ウイルス療法による発がん抑制効果を明らかにし、治療適応の妥当性について検証するために、Peg-IFN/RBV 治療を行った 4,640 例について解析を行った。Genotype1 型では血小板 15 万/ μ L 以上の群(A 群+C 群)に比し、血小板 15 万/ μ L 未満の群(B 群+D 群)では有意に著効率が低かった。血小板 15 万/ μ L 未満の群では ALT 値にかかわらず、NR 症例に比し、SVR 症例、Relapse 症例で有意に発がんが抑制された。

(名古屋地区)

Peg-IFN/RBV 併用療法後の発がん率は、1 年 0.7%、3 年 4.5%、5 年 8.0%であった。発がん例は非発がん例に比し、有意に年齢が高く、肝線維化進展例が多く、Alb 値が低値であり、非 SVR 例であった。SVR が得られても高齢者、男性、線維化進展例は発がんに留意する必要がある。高齢者でも SVR、Relapser は発がん率を低下させた。血小板数低値の高齢者において発がん率が高くなるが、SVR が得られた場合にはより強い発がん抑制効果が見られた。

(九州地区)

C 型慢性肝炎に対する Peg-IFN/RBV 治療後の肝がん発症における有意な危険因子は血小板数低値・AFP 高値・non-SVR であった。Peg-IFN/RBV 治療で SVR となることが、肝がん発症抑制には重要であるが、

SVR 症例においても血小板数低値(15 万/μl 未満), AFP 高値(20 ng/ml 以上)の患者には慎重な follow-up が必要である。

2) B 型肝炎の感染機構

肝がん培養細胞株 (HepG2) に発現していると考えられる HBV 付着因子 (PS1~SSN) の pull-down 法により幾つかの結合因子の存在が示唆された。

3) 炎症と肝発がん

OA は 障害肝の修復期に浸潤する CD68 陽性マクロファージに発現した。障害肝の修復期に浸潤するマクロファージを欠損させると肝障害が遷延化した。OA は 肝硬変モデルにおいても CD68 陽性マクロファージに発現していた。肝がん細胞を肝内に接種すると、肝がん結節周囲に OA 陽性マクロファージが集簇した。

4) 肝がんに対する免疫応答と免疫治療

HCC 患者では、末梢血と癌組織で TEM が増加していた。TEM の頻度は HCC 組織での micro-vessel density と相関しており、TEM の血管新生への関与が示唆された。TEM は肝がんでの血管新生を反映する診断細胞 marker として有用である。

治療モデルでは樹状細胞と抗 PD-1 抗体併用療法で野生株腫瘍の増大が優位に抑制された。樹状細胞と抗 PD-1 併用療法では、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞および CD11c 陽性細胞が多く浸潤し、抗腫瘍効果への関与が示唆された。樹状細胞療法に抗 PD-1 療法を併用することで、腫瘍特異的 T 細胞反応が増強された。

肝がん患者において、CTL 陽性反応を高率に誘導するペプチドエピトープ (cyclophilin B, SART2, SART3, p53, MRP3, AFP, hTERT) がスクリーニングされ

た。GMP グレードのペプチドワクチンを作製して肝がん患者に対する安全性臨床研究を施行した。臨床研究において、NCI-CTC グレード 3 以上の有害事象が出現しないことを確認した。

5) 肝がんにおける分子標的薬剤耐性機構

ソラフェニブ投与により、肝がん細胞株 (Huh7, PLC/PRF/5) においてオートファジーの増強が認められた。Atg7 のノックダウンによりオートファジーを阻害すると肝がん細胞のアポトーシスが増強された。ヌードマウスの皮下腫瘍モデルに対してソラフェニブとクロロキン (オートファジー阻害剤) の併用治療を行うと、ソラフェニブ単独に比し抗腫瘍効果が増強した。

D. 考察と結論

Peg-IFN/RBV 併用療法後の C 型肝炎からの肝発がんに関与する因子について、3 つの大規模コホートを用いて解析した。

肝発がんと炎症・免疫応答、肝がんに対する抗がん剤治療の分野で研究の進展がみられた。

II. 分担研究報告

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(病態班)）
分担研究報告書

肝炎の進展過程における炎症の調節因子オステオアクチビンの役割

研究分担者 坪内博仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座
座 消化器疾患・生活習慣病学 教授

研究要旨:オステオアクチビンは傷害組織においてマクロファージなどの抗原提示細胞で発現し、炎症の調節、傷害組織の再生・修復に関与していることが推測されている。本研究では、四塩化炭素肝障害モデルを用いて、肝炎の進展過程におけるオステオアクチビンの役割を解析した。四塩化炭素を単回投与した急性肝障害モデルでは、オステオアクチビンの発現は肝障害のピークに遅れて亢進し、肝組織の壊死巣周囲に浸潤したマクロファージにオステオアクチビンの発現がみられた。浸潤マクロファージのほぼ全てが CD68 陽性で、オステオアクチビン発現細胞の 90%以上が CD68 陽性であることから、マクロファージを欠損させたところ、肝障害が遷延化し、障害部位の修復が抑制された。さらにオステオアクチビン陽性マクロファージは肝硬変モデルでも線維形成部位周囲に浸潤し、また肝内に接種した肝癌結節周囲にも集簇していた。以上の結果から、オステオアクチビンは、傷害組織の修復過程において重要な役割を果たしておりことが考えられた。また、オステオアクチビンの有する炎症の調節(抗炎症)および障害組織の再生・修復促進作用が、慢性炎症と繰り返す組織障害とその再生・修復を背景に発生する肝発癌および肝癌の発育・進展の微小環境に深く関与していることが推測された。

共同研究者

井戸章雄 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患生活習慣病学

宇都浩文 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 講師

桶谷 真 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 講師

森内昭博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 助教

玉井 努 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 特任助教

熊谷公太郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学

呉 建 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学

梶 一晃 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学

A. 研究目的

オステオアクチビンは大理石骨症ラットから単離された遺伝子で骨芽細胞の分化に関与している。我々は、コリン欠乏アミノ酸置換食飼育ラット肝臓において発現亢進している遺伝子群から同遺伝子を単離し、ヒト肝硬変および肝細胞癌組織においても発現していることを見出した。さらに、ヒト肝癌組織および非肝癌硬変肝組織においてもオステオアクチビンが発現増強し、肝癌細胞に強発現させたオステオアクチビンはその浸潤、転移を促進することを報告した。

オステオアクチビンはヒト乳癌細胞から単離された glycoprotein nmb (gpnmb) および マウス樹状細胞から単離された DC-HIL のラットホモログであり、最近、急性肝障害モデルの肝マクロファージにおいて発現していることが報告され、さらにマクロファージなどの抗原提示細胞で発現されるオステオ

アクチピンは炎症のフィードバック調節因子として作用していること、また乳癌や多形性膠芽腫に発現するオステオアクチピンはその転移、進展に関与していることも報告されている。以上の知見から、オステオアクチピンは傷害組織に浸潤した抗原提示細胞に発現し、炎症の持続、傷害組織の再生・修復に関与するとともに、持続する炎症と繰り返される傷害組織の再生・修復を背景に発生する炎症性発癌に関与し、さらに癌細胞で発現するオステオアクチピンはその進展にも関与していることが推測される。

本研究の目的は、持続する肝炎から肝硬変、さらに肝発癌に到る過程において、障害肝のマクロファージに発現し、また肝硬変を背景に発生する肝癌で発現するオステオアクチピンの役割を明らかにすることである。

B. 研究方法

1. 急性肝障害モデルにおけるオステオアクチピンの発現

8週齢の C57BL/6 マウスに四塩化炭素 1 ml/kg を単回腹腔内投与し、下記の検討を行った。

(1) 血清 ALT および組織学的検討

(2) オステオアクチピンの発現: real-time RT-PCR、ウェスタン法、免疫組織化学染色、

(3) オステオアクチピン発現細胞の解析: 蛍光二重染色および肝臓より単離した単核細胞の FACS 解析

2. 浸潤マクロファージの肝障害およびその修復に及ぼす影響

8週齢の C57BL/6 マウスに四塩化炭素 1 ml/kg を単回腹腔内投与し、その48時間後に Clodronate 200 μ L を腹腔内投与して下記の検討を行った。

(1) 血清 ALT、組織学的検討

(2) 免疫組織化学染色によるオステオアクチピンおよび CD68 の発現

3. 肝硬変モデルにおけるオステオアクチピン発現マクロファージの検討

8週齢の C57BL/6 マウスに Thioacetamide (TAA) 100 mg/kg を週 2 回、8週間腹腔内投与し、下記の

検討を行った。

(1) 血清 ALT および組織学的検討

(2) オステオアクチピンの発現: real-time RT-PCR、ウェスタン法、免疫組織化学染色、

4. 肝癌モデルにおけるオステオアクチピン発現マクロファージの検討

8週齢の C57BL/6 マウスに syngeneic なマウス肝癌細胞 Hepa1-6 株 2×10^6 cells を脾注し、肝内に多発肝癌結節を作製、下記の検討を行った。

(1) 免疫組織化学染色によるオステオアクチピンの発現

C. 研究結果

1. 急性肝障害モデルにおけるオステオアクチピンの発現

(1) 四塩化炭素投与 48 時間後にみられた血清 ALT の上昇は 96 時間後には低下した。組織学的には投与 48 時間後にみられた炎症細胞浸潤、巣状壊死は 96 時間後には改善傾向を示した。

(2) オステオアクチピンは、投与 48 時間から 96 時間にかけて発現が増強した。免疫組織化学染色では、組織学的に改善を認めた 96 時間後に、門脈域および壊死巣周囲に集簇しているマクロファージにオステオアクチピンの発現を認め、オステオアクチピン陽性マクロファージには貪食像が認められた。

(3) 蛍光二重染色および肝臓より単離した単核細胞の FACS 解析では、浸潤したマクロファージ (F4/80 陽性) のほぼ全てが CD68 または CD11b 陽性であり、オステオアクチピン陽性細胞 90% 以上が CD68 陽性/CD11b 陰性であり、CD68 陽性細胞ではその約 50% にオステオアクチピンが発現していた。

2. 浸潤マクロファージの肝障害およびその修復におよぼす影響

(1) 四塩化炭素投与 48 時間後に Clodronate にて浸潤マクロファージを欠損させると、四塩化炭素投与 96 時間後も ALT が優位に上昇しており、組織学的にも広範な壊死巣が残存しており、肝障害が

遷延化していることが考えられた。

- (2) 免疫組織化学染色では、CD68 およびオステオアクチビン、いずれの発現細胞も欠損していた。
3. 肝硬変モデルにおけるオステオアクチビン発現マクロファージの検討
 - (1) 8週間のTAA反復投与において、血清ALT値は漸増し、組織学的にも線維化が誘導された
 - (2) オステオアクチビンの発現は血清ALT値に平行して漸増し、TAA投与終了2週間後まで発現が増強していた。免疫組織化学染色および蛍光二重染色では、オステオアクチビンは線維形成部位周囲に浸潤したCD68陽性マクロファージに発現していた。
4. 肝癌モデルにおけるオステオアクチビン発現マクロファージの検討
 - (1) Hepa 1-6を接種すると多数の肝癌結節が肝内に発生した。免疫組織化学染色では、肝癌結節周囲に浸潤するマクロファージにオステオアクチビンの発現が認められた。

D. 考 察

炎症性サイトカインの産生を抑制するオステオアクチビンは、急性肝障害モデルにおいては肝障害の極期に遅れて、むしろその修復過程において肝マクロファージに発現亢進していることが明らかとなった。一方、オステオアクチビン陽性マクロファージの約90%がCD68陽性であり、また肝障害の修復期に浸潤するマクロファージの大部分がCD68陽性であることから、マクロファージを欠損させたところ、肝障害が遷延化し、その修復が顕著に抑制された。一方、TAAで誘導した肝硬変モデルにおいても肝細胞障害(線維形成)部位にOA発現マクロファージが浸潤していた。以上の結果から、オステオアクチビン発現マクロファージは肝障害の修復過程において重要な役割を果たしていることが考えられた。

また肝内に接種した肝癌結節周囲にもオステオアクチビン発現マクロファージが集簇していたことから、オステオアクチビンの抗炎症および障害組織の再生・修復誘導作用が、肝癌が発生あるいは発育・

進展する微小環境に深く関与していることが推測された。

E. 結 論

オステオアクチビンは組織傷害の極期に遅れて、CD68陽性の貧食能優位のマクロファージに発現していることから、炎症の調節(抗炎症)および傷害組織の再生・修復過程に重要な役割を果たしていることが考えられた。さらに、慢性持続性、かつ繰り返される組織傷害とその再生・修復という肝発癌の微小環境にも深く関与していることが推測された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 熊谷公太郎, 井戸章雄, 呉建, 高見陽一郎, 佐々木文郷, 小田耕平, 最勝寺晶子, 橋口正史, 馬渡誠一, 玉井努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷眞, 坪内博仁. 肝炎の進展過程における炎症の調節因子オステオアクチビンの役割 第47回日本肝臓学会総会. 2011年6月. 東京
2. 熊谷公太郎, 井戸章雄, 呉建, 梶一晃, 大野香織, 小田耕平, 最勝寺晶子, 今中大, 馬渡誠一, 玉井努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷眞, 坪内博仁. 肝炎進展に伴い発現するオステオアクチビンは肝マクロファージの食食に関与する 第15回JDDW2011. 2011年10月. 福岡
3. 熊谷公太郎, 井戸章雄, 呉建, 梶一晃, 大野香織, 小田耕平, 最勝寺晶子, 今中大, 馬渡誠一, 玉井努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷眞, 坪内博仁. 障害肝において発現するオステオアクチビンは肝マクロファージの食食に関与する 第48回日本消化器免疫学会総会. 2011年7月. 金沢

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

PEG-IFN/RBV 治療後の肝細胞癌発癌についての検討

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：PEG-IFN/RBV 治療後、治療効果判定が可能であった高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者 474 例を対象とした。1 型は 319 例、2 型は 155 例であった。PEG-IFN/RBV 治療後の患者に 6 ヶ月に 1 回以上腹部超音波または腹部 CT を行い、肝細胞癌と診断された 23 症例と非発癌の 451 例について検討した。肝発癌患者 23 例中男性は 16 例、女性は 7 例で男性が多かった。PEG-IFN/RBV 開始時平均年齢は 62.8 歳であった。肝発癌時の平均年齢は 65.4 歳であった。治療終了から肝発癌までの平均期間は 18.8 ヶ月間であった。平均年齢、性別 (M/F)、治療効果 (SVR/non-SVR)、治療前のデータ：血小板数、アルブミン (Alb) 値、HCV-RNA 量、 α -フェトプロテイン (AFP) 値が肝癌発癌症例と非発癌症例間で有意差がみられた。SVR の発癌率は 2.2% で、non-SVR (TR+NVR) に比べ有意に低かった ($p < 0.001$)。治療後の判定 (SVR, non-SVR) 別の累積発癌曲線では、1 年目 (0.3%, 0.7%)、3 年目 (0.7%, 1.8%)、5 年目 (1.1%, 2.8%) で、有意に non-SVR 群が高かった ($p < 0.001$)。肝発癌に寄与する因子の多変量解析結果 (multiple logistic regression) は、治療効果 (SVR/non-SVR)、治療前の血小板数、AFP 値が、それぞれ有意な因子であった ($p: 0.0002, 0.0274, < 0.0001$)。【結論】今回の検討では、SVR からの発癌は有意に低く、PEG-IFN/RBV 治療により SVR となることが肝癌発癌の阻止につながると考えられる。

共同研究者

谷本博徳	新小倉病院肝臓内科	医長
山下信行	新小倉病院肝臓内科	部長
河野聡	北九州医療センター	医長
下田慎治	九州大学医学部修復内科学	

A. 研究目的

PEG-IFN/RBV 治療が約 10 万人以上の C 型慢性肝炎患者に施行されたものの、治療後の肝癌発癌が散見される。PEG-IFN/RBV 治療効果が肝癌発癌の阻止に寄与しているかについて検討した。

B. 研究方法

PEG-IFN/RBV 併用療法が施行され、治療効果判定が可能であった高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者 474 例 (1 型は 319 例、2 型は 155 例) を対象とした。登録期間は、2004 年 12 月～2009 年 8 月で、観察期間は 2 年～6 年 3 ヶ月、平均 4 年 8 ヶ月であった。治療後 6 ヶ月以降に、6 ヶ月に 1 回以上の US または CT を行い、肝癌と診断された 23 例 (肝癌群) と発癌を認めない 451 例 (コントロール群) に分けて検討した。累積発癌曲線は、 Kaplan-Meier 法を用い、肝発癌に寄与する因子の多変量解析は、multiple logistic regression を行った。本研究においては、新小倉病院の研究審査委員会、倫理委員会の承認を得た。患者へは十分なインフォームド・コンセントを行った。

C. 研究結果

1. 対象者の背景

対象者は、23 例の肝癌発癌症例と 451 例の非発癌症例に分けて検討した。それぞれの平均年齢、性別 (M/F)、serotype (1/2)、治療効果

(SVR/non-SVR)、治療前のデータ：hemoglobin、血小板数、Alb、ALT、AFP、HCV-RNA 量は以下の通りであった。平均年齢 (63.3, 55.1 歳; $p < 0.001$)、性別 (M/F) (16/7, 214/237; $p < 0.05$)、serotype (1/2) (19/4, 300/151)、治療効果 (SVR/non-SVR) (6/17, 279/172; $p < 0.001$)、治療前のデータ：hemoglobin (13.5, 14.0 g/dl)、platelet (11.8, 17.4 万/ μ L; $p < 0.0001$)、Alb (3.8, 4.1 g/dl; $p < 0.001$)、ALT (78.4, 70.0 IU/l)、HCV-RNA 量 (7.0, 6.0 logIU/ml; $p < 0.001$)、AFP (29.2, 8.6 ng/ml; $p < 0.0001$) であった。平均年齢、性別 (M/F)、治療効果 (SVR/non-SVR)、治療前のデータ：血小板数、Alb、HCV-RNA 量、AFP が肝癌発癌症例と非発癌症例間で有意差がみられた。

2. 各因子の経時的累積発癌率

1) 年齢別 (65 歳以上、65 歳未満) の累積発癌曲線では、1 年目 (2.1%, 0.3%)、3 年目 (10.3%, 2.0%)、5 年目 (14.5%, 5.3%) で、有意に 65 歳以上が高かった ($p = 0.0018$)。

2) 治療前の Alb 値別 (4.0g/dl 以上、4.0g/dl 未満) の累積発癌曲線では、1 年目 (0.4%, 1.6%)、3 年目 (1.5%, 10.0%)、5 年目 (4.4%, 15.3%) で、有意に Alb 値が 4.0g/dl 未満群が高かった ($p = 0.0008$)。

3) 治療前の血小板数値別 (15 万/ μ L 以上、15 万/ μ L 未満) の累積発癌曲線では、1 年目 (0.0%, 2.0%)、3 年目 (1.3%, 8.5%)、5 年目 (1.3%, 17.1%) で、有意に血小板数が 15 万/ μ L 未満群が高かった ($p < 0.0001$)。

4) 治療前の AFP 値別 (20ng/ml 以上、20ng/ml 未満) の累積発癌曲線では、1 年目 (2.9%, 0.6%)、3 年目 (22.0%, 2.1%)、5 年目 (38.3%, 3.8%) で、有意に血小板数が AFPng/ml 以上群が高かった ($p < 0.0001$)。

5) 治療後の判定 (SVR, non-SVR) 別の累積発癌曲線では、1年目 (0.3%, 0.7%)、3年目 (0.7%, 1.8%)、5年目 (1.1%, 2.8%) で、有意に non-SVR 群が高かった ($p < 0.001$)。

3. 肝発癌に寄与する因子 (多変量解析)

肝発癌に寄与する因子の多変量解析結果 (multiple logistic regression) は、治療効果 (SVR/non-SVR)、治療前の血小板数、AFP 値が、それぞれ有意な因子であった ($p = 0.0002$, $p = 0.0274$, $p < 0.0001$)。

D. 考察

C型慢性肝炎患者の肝発癌阻止には、HCVの持続感染を断ち切ることが重要である。今回の検討でも PEG-IFN/RBV 治療により、SVR に到達しても肝発癌がみられるものの、non-SVR に比べ有意に低下した。多変量解析からみた PEG-IFN/RBV 治療後の肝発癌因子は、治療効果不十分 (non-SVR)、治療前の血小板数減少症例、AFP 値高値症例であった。これらは、HCV 持続感染が肝発癌の有力な因子であることを証明している。また、男性、高齢者が肝発癌の有力な因子であるが、多変量解析では、血小板数減少症例や AFP 高値症例が有意な因子であった。肝発癌阻止には、PEG-IFN/RBV 治療により HCV を除去することが最も重要であるが、HCV が除去されても、血小板数減少症例や AFP 高値症例へは、厳重な観察が必要である。また、PEG-IFN/RBV 治療にて HCV が除去できなかった症例 (non-SVR) に対しては、肝炎の炎症の軽減や AFP 値の低下を期待して、IFN 単独少量治療などの治療も必要であると思われる。

E. 結論

今回の検討では、SVR からの発癌は有意に低く、PEG-IFN/RBV 治療により SVR となることが肝発癌の阻止につながると考えられる。また、SVR に到達しても、血小板数減少症例や AFP 高値症例は厳重な観察が必要である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuura K, Tanaka Y, Kusakabe A, Hige S, Inoue J, Komatsu M, Kuramitsu T, Hirano K, Ohno T, Hasegawa I, Kobashi H, Hino K, Hiasa Y, Nomura H, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. Recommendation of lamivudine-to-entecavir switching treatment in chronic hepatitis B responders: Randomized controlled trial. *Hepatol Res.* 41: 505-511, 2011.
- 2) Ito K, Higami K, Masaki N, Sugiyama M, Mukaide M, Saito H, Aoki Y, Sato Y, Imamura M, Murata K, Nomura H, Hige S, Adachi H, Hino K, Yatsushashi H, Orito E, Kani S,

Tanaka Y, Mizokami M. The rs8099917 polymorphism, when determined by a suitable genotyping method, is a better predictor for response to pegylated alpha interferon/ribavirin therapy in Japanese patients than other single nucleotide polymorphisms associated with interleukin-28B. *J Clin Microbiol.* 49: 1853-1860, 2011.

3) Chayama K, Hayes CN, Yoshioka K, Moriwaki H, Okanoue T, Sakisaka S, Takehara T, Oketani M, Toyota J, Izumi N, Hiasa Y, Matsumoto A, Nomura H, Seike M, Ueno Y, Yotsuyanagi H, Kumada H. Factors predictive of sustained virological response following 72 weeks of combination therapy for genotype 1b hepatitis C. *J Gastroenterol.* 46: 545-555, 2011.

4) Kainuma M, Furusyo N, Azuma K, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Shimoda S, Hayashi J; the Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. Pegylated interferon α -2b plus ribavirin for Japanese chronic hepatitis C patients with normal alanine aminotransferase. *Hepatol Res.* 42: 33-41, 2011.

5) Ogawa E, Furusyo N, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Dohmen K, Shimoda S, Hayashi J; The Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. An evaluation of the adverse effect of premature discontinuation of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin treatment for chronic hepatitis C virus infection: Results from Kyushu University Liver Disease Study (KULDS). *J Gastroenterol Hepatol.* 18: , 2011.

6) Nomura H, Miyagi Y, Tanimoto H, Yamashita N, Ohashi S, Nishiura S. Occurrence of clinical depression during combination therapy with pegylated interferon alpha or natural human interferon beta plus ribavirin *Hepatol Res.* : 42(3), 2012.

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。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

HBV 感染受容体同定に向けたアプローチ

研究分担者 上田 啓次 大阪大学院医ウイルス学 教授

B型肝炎ウイルス（HBV）の感染・増殖機構や治療法など HBV 問題の根本的解決策を見出すためには、ウイルス学的な知見を集積するとともに病態発症機構の解明や、治療法の開発に結びつける必要がある。しかしながら、HBV の *in vitro* 感染系は存在せず、肝実質細胞に感染・増殖する HBV が肝実質細胞由来の肝癌細胞株に感染できない理由は全く不明である。

こういった問題を解決するには、HBV 感染受容体を分離・同定し簡便な *in vitro* 感染系を樹立することが不可欠である。本研究計画では、HBV pseudotype の作製を試み、感染性を指標にした HBV 感染受容体の分離・同定を試みた。その研究過程において、肝癌由来細胞株には少なくとも付着因子として機能する因子が存在し、その活性化過程に問題があることが示唆された。

A. 研究目的

HBV による肝実質細胞への感染メカニズムと H 病態発症機構は不明な点が多く、治療法自体 HBV の性質に基づく根本的治療が展開されているとは言い難い。ウイルス学上の最大の謎で HBV 学に残された最大の難問の一つである HBV 感染受容体を同定し、*in vitro*、*vivo* 感染系を構築することにより、HBV の感染メカニズムを明らかにし、HBV による病態発症機構を解明することで HBV の性質に立脚した治療法の開発をめざす。

B. 研究方法

感染受容体に対する HBV 側のリガンドが存していると考えられた。HBV 膜蛋白の PS1-SSN 在すると考えられる HBV 膜蛋白粒子外領域をと特異的に結合する宿主因子を分離・同定し、（PreS1 から HBs 蛋白 N 末領域）プローブとしその活性化を探ることで現存の培養肝癌細胞株の大腸菌発現ファージライブラリーのス胞を HBV 感染系として活用することが可能にクリーニング、培養肝癌細胞株発現蛋白の pull-down 法-MS 解析による分離・同定を試みた。

C. 研究結果

大腸菌発現ファージライブラリーのスクリーニングでは #1-3-2、#4-2-1、#9-6-1、#9-6-2、#12-4-3、#15-4-1（都合により詳細は省略）が候補因子として挙げられた。現在、HBV 膜蛋白粒子外領域を（PreS1 から HBs 蛋白 N 末領域：PS1-SSN）との相互作用を検討している。

これまで別途進めてきた HBV pseudotype の作製と感染実験から培養肝

がん細胞 HepG2 には HBV 付着因子の存在と、この付着因子はある処理（この場合は哺乳類細胞発現 cDNA ライブラリーの導入処理）により、活性化するのではないかと示唆が得られた。

そこで HBV 膜蛋白の粒子外領域に相当する領域（PreS1 から HBs 蛋白 N 末領域）をプローブとして用い、付着因子の分離を試み、幾つかの特異的な因子の存在を確認している。

D. 考察

培養肝癌細胞には HBV 付着因子自体は存在するが、何らかの理由で感染促進活性を欠如

していると考えられる。HBV 膜蛋白の PS1-SSN 在すると考えられる HBV 膜蛋白粒子外領域をと特異的に結合する宿主因子を分離・同定し、（PreS1 から HBs 蛋白 N 末領域）プローブとしその活性化を探ることで現存の培養肝癌細胞株の大腸菌発現ファージライブラリーのス胞を HBV 感染系として活用することが可能にクリーニング、培養肝癌細胞株発現蛋白の pull-down 法-MS 解析による分離・同定を試みた。

E. 結論

HBV 膜蛋白の PreS1、PreS2、SS の N 端にそれぞれ特異的に結合する宿主因子の同定から HBV 感染受容体の同定に迫ることが可能であると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., and Watanabe, S. "Kaposi's sarcoma-associated Virus governs

- gene expression profiles toward B cell transformation.” In-Tech “Herpesviruses”, Magel, D. G. ed., in press.
2. Ueda, K., Ohsaki, E., Nakano, K., and Zheng, X. “Characterization of Kaposi’s sarcoma-associated virus-associated lymphomas by DNA array analysis.” In “Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD). in press.
 3. Ohsaki, E. and Ueda, K. “Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency.” Frontiers in Virology. in press.
 4. Nakano, K., Katano, H., Tadagaki, K., Sato, Y., Ohsaki, E., Mori, Y., Yamanishi, K., and Ueda, K. “Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman’s Disease; Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II.” Virology in press.
 5. 上田啓次. “B型肝炎のウイルス学” 『ウイルス肝炎のすべて』 (小池和彦編) 化学療法の領域. (印刷中)
 6. 上田啓次. HHV-8 「病原細菌・ウイルス図鑑」新居志郎ら編、北海道大学出版会 (編集中).
- 日～4日. 大阪アカデミア. 大阪
3. 中野和司、大崎恵理子、上田啓次. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の vIRF-3 が誘導する IFN シグナルを vIRF-1 が直接結合し抑制する. 第8回 EBV 研究会. 7月8日. 大阪大学大学院 銀杏会館.
 4. 大崎恵理子、中野和司、Xin Zheng、Zunlin Yang、上田啓次. KSHV LANA と核マトリックス因子 NuMA のキメラ蛋白による ori-P 複製能の検討. 第8回 EBV 研究会. 7月8日. 大阪大学大学院 銀杏会館.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

学会発表

1. 中野和司、大崎恵理子、上田啓次. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の vIRF-3/LANA2 が誘導する IFN シグナルを vIRF-1 が抑制する. 第26回ヘルペスウイルス研究会. 6月2日～4日. 大阪アカデミア. 大阪
2. 大崎恵理子、中野和司、Xin Zheng、Zunlin Yang、上田啓次. KSHV ゲノム複製における LANA の機能的役割と書く内骨格構造の重要性. . 第26回ヘルペスウイルス研究会. 6月2

ウイルス性肝炎からの発がんおよび肝がん再発の抑制に関する研究
C型肝炎における PEGIFN/Ribavirin 併用療法後の発癌に関連する
臨床的背景因子の解析

片野義明 名古屋大学医学部附属病院消化器内科・講師

研究要旨:IFN 治療後においても発癌例はあり、発癌症例の特徴を解明することは、治療後のフォローアップの仕方を考えるうえで有用である。PegIFN α /Ribavirin 併用療法を行った C 型慢性肝炎患者のうち、本年度は発癌の有無につき追跡調査しえた 1437 例(男/女:759/678、1 型 66.6%、平均年齢 53.6 歳)を対象とし、発癌症例と非発癌症例との背景因子を比較検討した。PEGIFN α /RBV 併用療法後の全体での発癌率は、1 年 0.7%、3 年 4.5%、5 年 8.0%であり、59 例で発癌が認められた。発癌例は非発癌例に比し、有意に男性が多く、年齢が高く、肝組織進展例が多く、Alb 値が低く、非 SVR 例が多かった。発癌に関与する最も有意な因子は年齢であった。高齢者では有意に累積発癌率が高かったが、高齢者であっても SVR が得られると発癌率は低下した。高齢者における PEGIFN/Ribavirin 併用療法の有用性と SVR が得られても高齢者は十分注意を要することを明らかにした。

A.研究目的

PegIFN/Ribavirin (RBV) 治療例における発癌症例と非発癌症例との背景因子を比較し、どのような症例で発癌しやすいかを検討する。またウイルスが駆除できた (Sustained virologic response:SVR) 症例と非 SVR 症例における発癌例の背景因子を比較し SVR となっても発癌した症例の特徴を解明し、PegIFN/REV 治療で SVR が得られた後のフォローアップの仕方の検討を行う。

また、65 歳以上を高齢者として、高齢者においても同様の検討を行い、高齢者で SVR が得られることのメリットがどの程度あるのかを検討する。

B.研究方法

2004 年 12 月から 2010 年 5 月の間に名古屋大学および関連施設において、PegIFN α /RBV 併用療法を行い、発癌の有無につき追跡調査しえた C 型慢性肝炎 1437 例(男/女:759/678、1 型/2 型:957/480、平均年齢 53.6 歳、観察期間中央値 149.6 週)を対象とし、発癌に関与する宿主因子およびウイルス因子を Cox 比例ハザードモデルおよび Kaplan-Meier を用いて解析した。

C.研究結果

C 型慢性肝炎に対する PEGIFN α /RBV 併用療法の治療効果は、全体での SVR 率は 57.8%であり、1 型の SVR 率は 48.5%、2 型の SVR 率は 76.3%であった。

PEGIFN α /RBV 併用療法後の全体での発癌率は、1 年 0.7%、2 年 2.0%、3 年 4.5%、4 年 6.3%、5 年 8.0%であった。

59 例で発癌が認められた。発癌例は非発癌例に比し、有意に男性が多く、年齢が高く、肝組織進展例

が多く、1型が多く、血小板数が低く、Alb値が低く、ヒアルロン酸値が高く、非SVR例が多く、治療終了24週後のALT値が低かった。治療効果に大きく関与するIL28B遺伝子多型は有意差を認めなかった。また、1型においては、有意にCore70アミノ酸が変異している例が多かった。多変量解析では年齢のみが有意な因子であった。

SVR例では11例に発癌が認められた。SVR例における発癌例と非発癌例の比較では、発癌例は有意に男性が多く、年齢が高く、線維化が進展しており、フェリチン値が高値であった。非SVR例では48例に発癌が認められ、やはり発癌例は男性の割合が高く、年齢が高く、線維化進展例が多かった。その他に血小板数が低値で、Alb値が低値であった。1型におけるCore70アミノ酸変異はSVR例では症例数が少ないこともあり有意差はなかったが、非SVR例では発癌例で有意に変異例の比率が高かった。

肝線維化別の5年発癌率は、F0-1 1.5%、F2 10.8%、F3-4 27.6%であり、肝線維化が進行するのにしたがい有意に上昇した($p<0.0001$)。PEGIFN α /RBV併用療法の治療効果別5年発癌率は、SVR例で2.2%であったが、再燃例13.12%、無効例17.9%であり、再燃例と無効例には有意差はみられなかった。年齢別5年発癌率は、65歳未満例が4.2%であったのに対し、65歳以上例では23.0%と有意に高かった($p<0.0001$)。

65歳以上の高齢者におけるPEGIFN α /RBV併用療法のSVR率は、1型で33.5%、2型で62.5%であり、非高齢者に比し低かった。高齢者における治療効果別発癌率は、SVR例で5年6.3%であったが、再燃例28.3%、無効例44.7%であり、再燃例と無効例にも有意差がみられた($p=0.0061$)。高齢者におけるPEGIFN α /RBV併用療法後の発癌に関与する因子は、治療効果が最も有意($p=0.0245$)であり、その他 γ GTP、血小板数であった。血小板数が16万未満では、SVRが得られると有意に発癌が抑制される($p<0.0001$)が、高齢者においてもSVR例の5年発癌率が5.6%であるのに対し、非SVR例は45.9%で有意差がみられた($p=0.0049$)。

D. 考察

今回PEGIFN/RBV併用療法後の発癌に関して解析できたのは、PEGIFN/RBV併用療法を行った患者のうち約50.5%であるが、患者背景の各因子はほぼ同等であり、母集団を反映しているものと考えられる。PEGIFN/RBV併用療法後でも、IFN治療歴のない患者と同様男性、高齢者、肝線維化進展例は発癌率が高い。

PEGIFN/RBV治療後の経過については、今回は治療終了24週後のALT値で検討したが、ALT値が低い方が発癌率は低く、再燃、無効例においてもALT値を低く維持する必要がある。

1型のPEGIFN/RBV併用療法におけるSVRに関与する因子として、ウィルス側ではcore70アミノ酸変異の有無、宿主側ではIL28B遺伝子多型の比重が大きい。今回測定しえた症例の中ではIL28B遺伝子多型については発癌の関与は見られなかったが、非SVR例における発癌例ではcore70アミノ酸変異例が多く、自然経過例と同様これらの症例はより発癌には注意を要すると思われた。

高齢者は非高齢者に比し、SVR率は低値であり、また有意に累積発癌率が高かった。しかし、高齢者であってもSVRが得られると発癌率は低下した。血小板数低値例は線維化が進展していると考えられるが、SVRが得られると高齢者においてはより発癌率が低下した。また、全体では再燃例と無効例では発癌率に有意差が見られなかったが、高齢者においては再燃例でも無効例に比し発癌率は有意に抑制さ

れていた。SVR が得られやすいのは、年齢が低く、肝線維化が軽度で、血球数が多く、十分量の治療ができる患者であり、発癌抑制を考えると、早期に IFN 治療を考慮することが望ましいが、忍容性があれば高齢者でも PEGIFN/RBV 併用療法は試みるべきと考えられた。

一方、SVR が得られても発癌に年齢の因子は大きく関与しており、高齢者においてはよりきめ細かなフォローアップが必要である。また、治療前の値ではあるがフェリチン値が高値であり、酸化ストレスの関与も示唆された。

E. 結論

忍容性があれば高齢者でも PEGIFN/RBV 併用療法は試みるべきであるが、SVR 例でも高齢者、肝線維化進展例は発癌に十分注意する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishizu Y, Katano Y, Honda T, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Goto H. Clinical impact of HFE mutations in Japanese patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. In press

Toyoda H, Kumada T, Tada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Predictive value of early viral dynamics during peginterferon and ribavirin combination therapy based on genetic polymorphisms near the IL28B gene in patients infected with HCV genotype 1b. *J Med virol*. In press

Yokozaki S, Katano Y, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Goto H. Mutations in two PKR-binding domains in chronic hepatitis C of genotype 3a and correlation with viral loads and interferon responsiveness. *J Med Virol*. 83: 1727-1732. 2011

Hayashi K, Katano Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Association of interleukin 28B and mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus with response to peg-interferon and ribavirin therapy. *Liver Int*. 31: 1359-1365. 2011.

Toyoda H, Kumada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Antiviral combination therapy with peg-interferon and ribavirin dose not induce a therapeutically resistant mutation in the HCV core region regardless of genetic polymorphism near the IL28B gene. *J Med Virol*. 83: 1559-1564. 2011.

Hayashi K, Katano Y, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b and correlation with response to pegylated-interferon- alpha 2b and ribavirin combination therapy. *J Viral Hepat*. 18: 280-286. 2011.

2. 学会発表

Honda T, Katano Y, Hayashi K, Ishigami M, Ito A, Hirooka Y, Goto H. Additional effect of ribavirin during peginterferon and ribavirin combination therapy in coagulation factor. DDW2011 American Association for the Study of Liver Diseases Chicago 2011.5