

1 determined by analyzing 6 samples (including positive and negative controls) in  
2 triplicate during 3 runs (3 different days) with 100% concordant results. Intra-assay  
3 coefficient of variation (CV%) for rs8099917 was 0.1-1.6 (%), and for rs12979860 was  
4 0.5-2.5 (%). Then, inter-assay CV% calculated from the angle of the heterozygous allele  
5 marker was 1.9 and 2.0 (%), respectively (Fig. 2 and Table 2). To evaluate the limit of  
6 detection, 10 samples, including 3 genotypes, were run in triplicate using 3 different  
7 DNA concentrations with no visible confusion in *IL28B* SNP genotyping or signal  
8 intensity, except in the 0.3ng/assay (Fig. 3).

#### 9 10 *IL28B* typing in PEG-IFN- $\alpha$ /RBV-treated patients

11 Of the 512 cases that were analyzed for the rs8099917 genotype, 361 (71%)  
12 were shown to have a major homozygous allele, 144 (28%) had a minor heterozygous,  
13 and 7 (1%) had a minor homozygous allele, which gave concordant results with the  
14 TaqMan assay (Table 3A). In addition, of the 512 cases that were analyzed for the  
15 rs12979860 genotype, 356 (70%) were shown to have a major homozygous allele, 149  
16 (29%) had a minor heterozygous, and 7 (1%) had a minor homozygous allele, with  
17 100% concordant results with the TaqMan assay (Table 3B). Five of the 512 cases (1%)  
18 had haplotype differences, but none of the 512 cases showed differences between the  
19 two genotyping methods.

#### 20 21 *Prediction of a response to PEG-IFN- $\alpha$ /RBV therapy*

22 Of the 272 patients with genotype 1 who were evaluated for the treatment  
23 response, 169 of 203 patients with the major homozygous allele in rs8099917 exhibited  
24 a higher prevalence of a virological response (83.3%), consisting of a SVR and TVR  
25 (responder), compared to those with a minor heterozygous (18/66, 27.3%) or  
26 homozygous allele (1/3, 33.3%) (Table 4). Therefore, the prevalence of responders with  
27 the major homozygous allele was 83.3%, and that of non-responders with the minor

1 heterozygous or homozygous allele was 72.5%. Of the 36 patients with genotype 2a or  
2 2b, patients with a major homozygous allele had 96.7% incidence of virological  
3 response and those with a heterozygous allele had 100%. For all cases, 85.2% of the  
4 patients with a major homozygous allele were responders to PEG-IFN- $\alpha$ /RBV therapy,  
5 and 66.7% of the patients with a minor heterozygous or homozygous allele were  
6 non-responders to that therapy.

7

## 8 Discussion

9

10 The rate of a NVR after 48 weeks of PEG-IFN- $\alpha$ /RBV therapy among patients  
11 infected with HCV genotype 1 is around 20-30%. Previously, there have been no  
12 reliable predictors of a NVR or SVR. Some recent studies have focused on the *IL28B*  
13 polymorphism as one of the most critical factors with a bearing on the prediction of the  
14 treatment response (8, 9, 10). In particular, rs8099917 and rs12979860 were  
15 significantly associated with the treatment regimen; therefore, it would be useful  
16 to examine such genetic markers before IFN-based treatments in clinical practice  
17 because it would avoid the unpleasant side effects that commonly accompany the  
18 treatment. In addition, such an advanced diagnosis would be economically beneficial, as  
19 treatment costs would be reduced.

20 Some SNPs, such as UGT1A1 polymorphism associated with irinotecan  
21 therapy, have already been exploited in clinical practice to avoid severe adverse effects  
22 (12, 13). These tailor-made therapies are expected to become more common in clinical  
23 practice (14). Similarly, *IL28B* polymorphism detection can be used in tailor-made  
24 therapies; thus, it is important to develop a genotyping assay which is a convenient, swift,  
25 accurate, and inexpensive.

26 The Invader Plus genotyping assay *IL28B* SNP test kit to genotype *IL28B* SNPs  
27 (rs8099917 and rs12979860) from DNA samples was developed and evaluated in this

1 study. This assay contains reagents for DNA amplification, including each SNP.  
2 Accuracy was determined by comparing the Invader assay results with the direct  
3 sequencing results. Only one sample (0.95%) showed a discrepant result for rs8099917  
4 by comparing the Invader Plus genotyping assay and direct sequencing, because another  
5 rare SNP existed in the forward primer binding region used for amplification and direct  
6 sequencing (15). Intra-assay (0.1-1.6% for rs8099917 and 0.5-2.5% for rs12979860) and  
7 inter-assay (1.9 and 2.0% respectively) precision were sufficient for clinical practice and  
8 tailor-made therapies. Interestingly, Invader Plus assay is more convenient, swift and  
9 inexpensive than direct sequencing. And Invader Plus assay is better than TaqMan assay  
10 at the specificity because no results come up without tagging both probe and Invader  
11 oligonucleotide on SNP directly.

12 For each or both genotypes, influences on pre-treatment prediction with the  
13 *IL28B* SNP genotype were evaluated. As a result, especially for patients with genotype  
14 1b, the positive predictive value (PPV) for a NVR was 72.5% and the negative  
15 predictive value (NPV) was 83.3%, suggesting that a convenient method using the  
16 Invader assay could be useful to predict the treatment outcome in clinical practice.

17 In conclusion, using the Invader Plus *IL28B* SNP genotyping assay, swift and  
18 accurate selection of the optimum treatment strategy for individual patients can be  
19 improved by combining with other factors.

#### 20 21 **Acknowledgements**

22 This study was supported by a grant-in-aid from the Ministry of Health, Labour,  
23 and Welfare of Japan (H22-kannen-005) and a grant-in-aid for Scientific Research (B)  
24 (23903).

#### 25 26 **Disclosure**

27 All authors have no conflict of interest.

1     **References**

- 2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10     1)     Ray Kim, W. (2002) Global epidemiology and burden of hepatitis C. *Microbes*  
11           *and Infect.* 4: 1219-1225.  
12  
13     2)     Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R., Smith, C., Marinos, G., Goncalves Jr,  
14           F.L., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A.,  
15           Hoffman, J., Yu, J. (2002) Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic  
16           hepatitis C virus infection. *New Engl. J. Med* 347: 975-982.  
17  
18     3)     Manns, M.P., McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Rustgi, V.K., Shiffman, M.,  
19           Reindollar, R., Goodman, Z.D., Koury, K., Ling, M., Albrecht, J.K. (2001)  
20           Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus  
21           ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet*  
22           358: 958-965.  
23  
24     4)     Bruno, S., Camma, C., Di Marco, V., Rumi, M., Vinci, M., Camozzi, M.,  
25           Rebucci, C., Di Bona, D., Colombo, M., Craxi, A., Mondelli, M.U., Pinzello, G.  
26           (2004) Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for naïve patients with genotype 1  
27           chronic hepatitis C: a randomized controlled trial. *J.Hepatol* 41: 474-481.  
28  
29     5)     Akuta, N., Suzuki, F., Hirakawa, M., Kawamura, Y., Yatsuji, H., Sezaki, H.,  
30           Suzuki, Y., Hosaka, T., Kobayashi, M., Kobayashi, M., Saitoh, S., Ayase, Y.,  
31           Ikeda, K., Kumada, H. (2009) A matched case-controlled study of 48 and 72  
32           weeks of peginterferon plus ribavirin combination therapy in patients infected  
33           with HCV genotype 1b in Japan: amino acid substitutions in HCV core region  
34           as predictor of sustained virological response. *J Med Virol* 81: 452-458.  
35  
36     6)     Ghany, M.G., Strader, D.B., Thomas, D.L., Seeff, L.B. (2009) Diagnosis,  
37           management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 49:  
38           1335-1374.  
39  
40     7)     Hoofnagle, J.H., Wahed, A.S., Brown Jr, R.S., Howell, C.D., Belle, S.H. (2009)

- 1  
2  
3  
4  
5  
6 1 Early changes in hepatitis C virus (HCV) levels in response to peginterferon  
7 and ribavirin treatment in patients with chronic HCV genotype 1 infection. *J.*  
8 *Infect. Dis.* **199**: 1112-1120.  
9  
10 3  
11 4 8) Tanaka, Y., Nishida, N., Sugiyama, M., Kurosaki, M., Matsuura, K., Sakamoto,  
12 N., Nakagawa, M., Korenaga, M., Hino, K., Hige, S., Ito, Y., Mita, E., Tanaka,  
13 E., Mochida, S., Murawaki, Y., Honda, M., Sakai, A., Hiasa, Y., Nishiguchi, S.,  
14 Koike, A., Sakaida, I., Imamura, M., Ito, K., Yano, K., Masaki, N., Sugauchi,  
15 F., Izumi, N., Tokunaga, K., Mizokami, M. (2009) Genome-wide association of  
16 IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for  
17 chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* **10**: 1105-1109.  
18  
19 9) Suppiah, V., Moldovan, M., Ahlenstiel, G., Berg, T., Weltman, M., Abate, M.L.,  
20 Bassendine, M., Spengler, U., Dore, G.J., Powell, E., Riordan, S., Sheridan, D.,  
21 Smedile, A., Fragomeli, V., Muller, T., Bahlo, M., Stewart, G.J., Booth, D.R.,  
22 George, J. (2009) IL28B is associated with response to chronic hepatitis C  
23 interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat. Genet.* **10**: 1100-1104.  
24  
25 10) Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J.,  
26 Heinzen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Muir, A.J., Sulkowski, M.,  
27 McHutchison, J. G., Goldstein, D.B. (2009) Genetic variation in IL28B predicts  
28 hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **461**: 399-401.  
29  
30 11) Rauch, A., Kutalik, Z., Descombes, P., Cai, T., Di Iulio, J., Mueller, T., Bochud,  
31 M., Battegay, M., Bernasconi, E., Borovicka, J., Colombo, S., Cerny, A.,  
32 Dufour, J.F., Furrer, H., Gunthard, H.F., Heim, M., Hirschel, B., Malinverni, R.,  
33 Moradpour, D., Mullhaupt, B., Witteck, A., Beckmann, J.S., Berg, T.,  
34 Bergmann, S., Negro, F., Telenti, A., Bochud, P.Y. (2010) Genetic variation in  
35 IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a  
36 genome-wide association study. *Gastroenterology* **138**: 1338-1345.  
37  
38 12) Rouits, E., Boisdron-Celle, M., Dumont, A., Guerin, O., Morel, A., Gamelin, E.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6 1 (2004) Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced  
7  
8 2 toxicity: a molecular and clinical study of 75 patients. *Clin. Cancer Res.* 10:  
9  
10 3 5151-5159.  
11  
12 4 13) Ando, Y., Saka, H., Ando, M., Sawa, T., Muro, K., Ueoka, H., Yokoyama, A.,  
13  
14 5 Saitoh, S., Shimokata, K., Hasegawa, Y. (2000) Polymorphisms of  
15  
16 6 UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic  
17  
18 7 analysis. *Cancer Res* 60: 6921-6926.  
19  
20 8 14) Iadonato, S.P., Katze, M.G. (2009) Genomics: Hepatitis C virus gets personal.  
21  
22 9 *Nature* 461: 357-358.  
23  
24 10 15) Ito, K., Higami, K., Masaki, N., Sugiyama, M., Mukaide, M., Saito, H., Aoki, Y.,  
25  
26 11 Sato, Y., Imamura, M., Murata, K., Nomura, H., Hige, S., Adachi, H., Hino, K.,  
27  
28 12 Yatsunami, H., Orito, E., Kani, S., Tanaka, Y., Mizokami, M. (2011) The  
29  
30 13 rs8099917 polymorphism, determined by a suitable genotyping methods, is a  
31  
32 14 better predictor for response to pegylated interferon- $\alpha$ /ribavirin therapy  
33  
34 15 in Japanese patients than other SNPs associated with IL28B. *J. Clin. Microbiol.*  
35  
36 16 49: 1853-1860.  
37  
38 17  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

Table 1. Primers and allele probes used for Invader Plus genotyping of *IL28B* SNPs

SNP		(5'-3')
rs8099917	forward primer	TCA TCC CTC ATC CCA CTT CTG GAA CA
	reverse primer	CGG GCC ATC TGT TTC CTG CTG
	Major Allele Probe	agg cca cgg acg AAT TGC TCA CAG AAA GGA A
	Minor Allele Probe	cgc gcc gag gCA TTG CTC ACA GAA AGG A
	Invader Oligo	GCT ACC AAA CTG TAT ACA GCA TGG TTC CAA TTT GGG TGA †
rs12979860	forward primer	GGA TGG GTA CTG GCA GCG C
	reverse primer	AGG CGC CTC TCC TAT GTC AGC
	Major Allele Probe	cgc gcc gag gCG AAC CAG GGT TGA AT
	Minor Allele Probe	agg cca cgg acg TGA ACC AGG GTT GAA TT
	Invader Oligo	CCA GGG AGC TCC CCG AAG GCG a

† Lowercase letters in each probe indicate 5' flap region.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Table 2. Simultaneous and daily repeatability of Invader Plus genotyping assay for *IL28B* SNPs (3 times per day and 3 days of measurement).

		Coefficient of variation (%)	
		rs8099917	rs12979860
Hetero (10ng/assay)	day1	0.1	1.4
	day2	1.6	2.5
	day3	1.3	0.5
	total	1.9	2.0



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4

Table 3A. Comparison of the Invader Plus genotyping assay with TaqMan assay for rs8099917

rs8099917	Invader Plus				
	Major	Hetero	Minor	total	
TaqMan probe	Major	361	0	0	361
	Hetero	0	144	0	144
	Minor	0	0	7	7
	total	361	144	7	512

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Table 3B. Comparison of the Invader Plus genotyping assay with TaqMan assay for rs12979860

rs12979860		Invader Plus			
		Major	Hetero	Minor	total
TaqMan probe	Major	356	0	0	356
	Hetero	0	149	0	149
	Minor	0	0	7	7
	total	356	149	7	512

Table 4. Effect of the rs8099917 SNP on response to PEG-IFN/RBV therapy in Japanese patients with HCV genotype 1

	Major (n=203) 74.6%	Hetero (n=66) 24.3%	Minor (n=3) 1.1%	Total (n=272)
Mean age (SD)	57.2 (10.1)	54.9 (10.8)	65.7 (6.5)	56.7 (10.3)
Gender (%)				
Females	102 (50.2%)	35 (53.0%)	2 (66.7%)	139 (51.1%)
Males	101 (49.8%)	31 (47.0%)	1 (33.3%)	133 (48.9%)
Responder	169 (83.3%)	18 (27.3%)	1 (33.3%)	188 (69.1%)
Non-responder	34 (16.7%)	48 (72.7%)	2 (66.7%)	84 (30.9%)

1

2 **Figure Legends**

3

4 Fig.1. Principle of the Invader Plus genotyping assay for *IL28B* SNPs (for rs8099917).5 First, an Invader Oligo and a probe are annealed to amplified target DNA, overlapping  
6 at the SNP position, which clipped out the 5'flap fragment by the cleavase enzyme.7 Second, the released 5'flap anneals to the fluorescence resonance energy transfer  
8 (FRET) cassette and initiates a secondary cleavage reaction that releases the fluorescent9 dye. The signal is only released when the invasive structure is formed on the target  
10 DNA. 'Major allele' is left FAM signal, 'Minor allele' is right Yachima-Yellow (Y.Y)11 signal, and 'Hetero-type' observed both merged signals, respectively. The fluorescent dye  
12 is between major and minor alleles at rs12979860.

13

14 Fig.2. Simultaneous and daily repeatability of Invader Plus genotyping assay for *IL28B*

15 SNPs (3 times per day and 3 days of measurement). Scatter plots of fluorescence data

16 from intra-assay for rs8099917 (upper) and for rs12979860 (lower). Raw fluorescence

17 data are plotted for each sample and control. The x-axis of rs8099917 is the FAM,

18 corresponding to major allele, while y-axis is Yachima-Yellow (Y.Y), corresponding to

19 minor allele. In contrast, the x-axis FAM and y-axis Y.Y of rs12979860 signify minor

20 and major alleles, respectively. The line designates the mean of the angle at the

21 heterozygous allele marker, and the broken line indicates standard deviation +2SD and

22 -2SD.

23

24 Fig.3. Sensitivity of Invader Plus genotyping assay for *IL28B* SNPs. Scatter plots of

25 fluorescence data from intra-assay for rs8099917 (upper) and for rs12979860 (lower). It

26 was defined that major allele is "Major", hetero type is "Hetero", minor allele is

27 "Minor", and Negative control is "Neg", respectively.

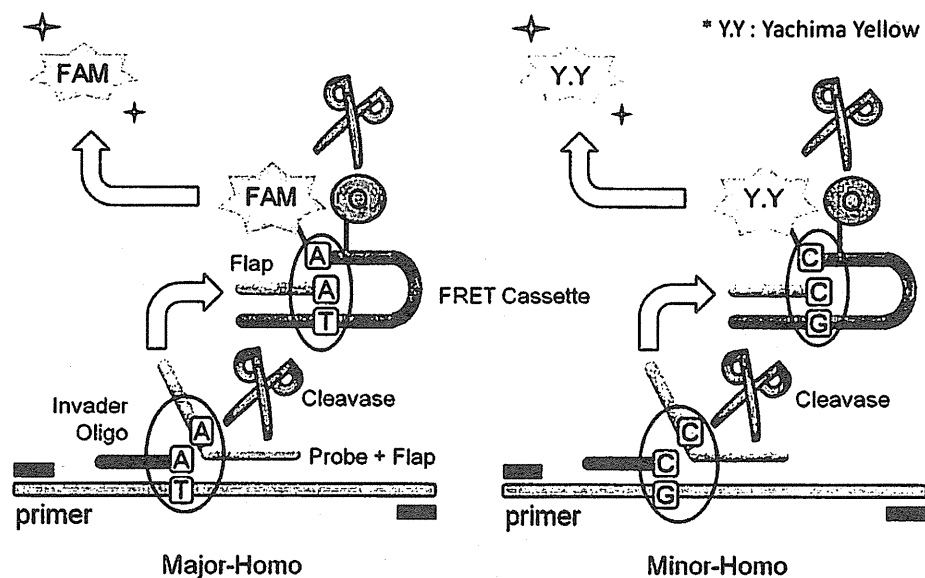


Fig.1. Principle of the Invader Plus genotyping assay for IL28B SNPs (for rs8099917). First, an Invader Oligo and a probe are annealed to amplified target DNA, overlapping at the SNP position, which clipped out the 5'flap fragment by the cleavase enzyme. Second, the released 5'flap anneals to the FRET cassette and initiates a secondary cleavage reaction that releases the fluorescent dye. The signal is only released when the invasive structure is formed on the target DNA. 'Major allele' is left FAM signal, 'Minor allele' is right Yachima-Yellow (Y.Y) signal, and 'Hetero-type' observed both merged signals, respectively. The fluorescent dye is between major and minor alleles at rs12979860.

76x47mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

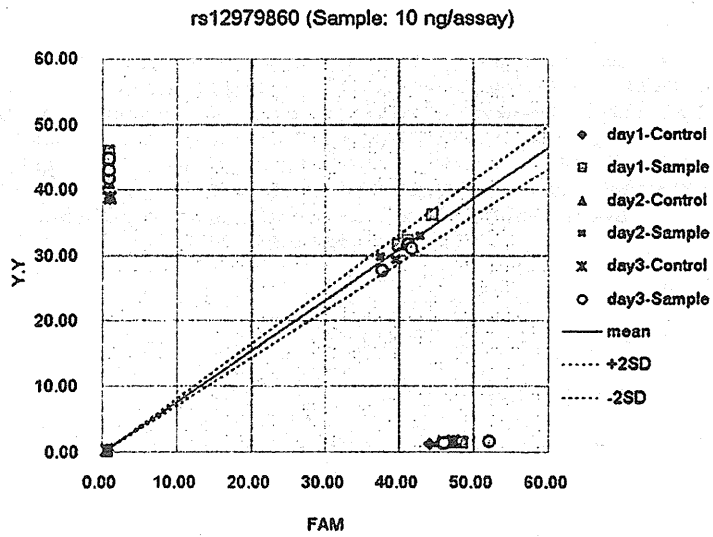
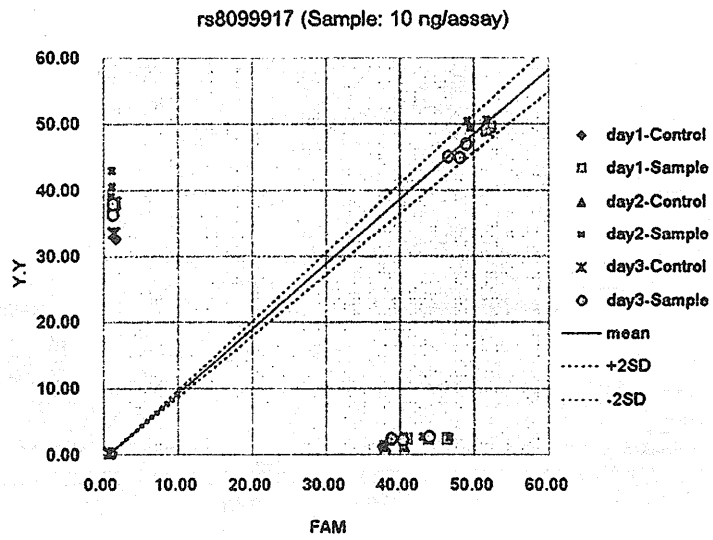


Fig.2  
53x79mm (300 x 300 DPI)

## C型肝炎のウイルス変異と治療効果

*Response to peginterferon and ribavirin combination therapy using mutations in the HCV genome*



坂本 穰 榎本 信幸\*  
SAKAMOTO Minoru ENOMOTO Nobuyuki

肝炎診療の新たな展開

Key words C型肝炎 PEG-IFN+Ribavirin療法 ISDR IRRDR IL28B

C型慢性肝炎に対するインターフェロン療法は、ペグインターフェロン(PEG-IFN)＋リバビリン(Ribavirin: RBV)併用療法の登場により格段に進歩し、最も難治とされる遺伝子型(genotype)1bかつ高ウイルス量症例のウイルス排除(ウイルス持続陰性化: sustained viral response: SVR)率も1年間の治療により50%程度になった<sup>1)2)</sup>。また、genotype 2aないしは2bでは、この併用療法を6ヵ月施行することで90%近いSVR率が得られるようになってい<sup>3)</sup>。しかしその半面、強力な抗ウイルス療法であるがゆえの副作用も多く、貧血やうつ症状、間質性肺炎、脳出血など、生命予後に関わる有害事象も報告され、副作用による薬剤の中止・減量が治療成績を著しく減弱させている。したがって、インターフェロン療法においては、治療開始前の効果予測が、適応症例の選択や治療期間を含めた治療法の決定に必要不可欠であることはもちろん、治療効果と副作用とのrisk-benefit比較や、不要な治療抑止などの面から重要である。このため、これまでにさまざまな検討がなされ、治療効果予測因子として、年齢、性別、肝線維化・脂肪化、インスリン抵抗性などの宿主因子、また最近ではインターフェロン感受性を規定する宿主ゲノムの1塩基多型(SNPs: single nucleotide polymorphism)、遺伝子型やウイルス量を含めたウイルス側の因子が明らかになってきた。さらに治療因子として薬剤の中止・減量、治療期間や薬剤 adherenceなどが明らかになっている。このうち、ウイルス側因子は最も重要で、C型肝炎ウイルス(HCV)の遺伝子型(genotype)やウイルス量は、治療法選択の基本情報であり、厚生労働省の治療標準化に関する研究班から出されている治療ガイドライン<sup>4)</sup>でもこれに応じた場合分けがなされている。すなわち初回治療の場合の高ウイルス量例では、ペグインターフェロン＋リバビリン併用療法が第一選択となり、低ウイルス量症例や、1型以外の症例では、インターフェロン単独療法も選択肢となる。

山梨大学医学部附属病院肝疾患センター センター長・准教授  
\*同 内科学講座第1教室(消化器内科) 教授

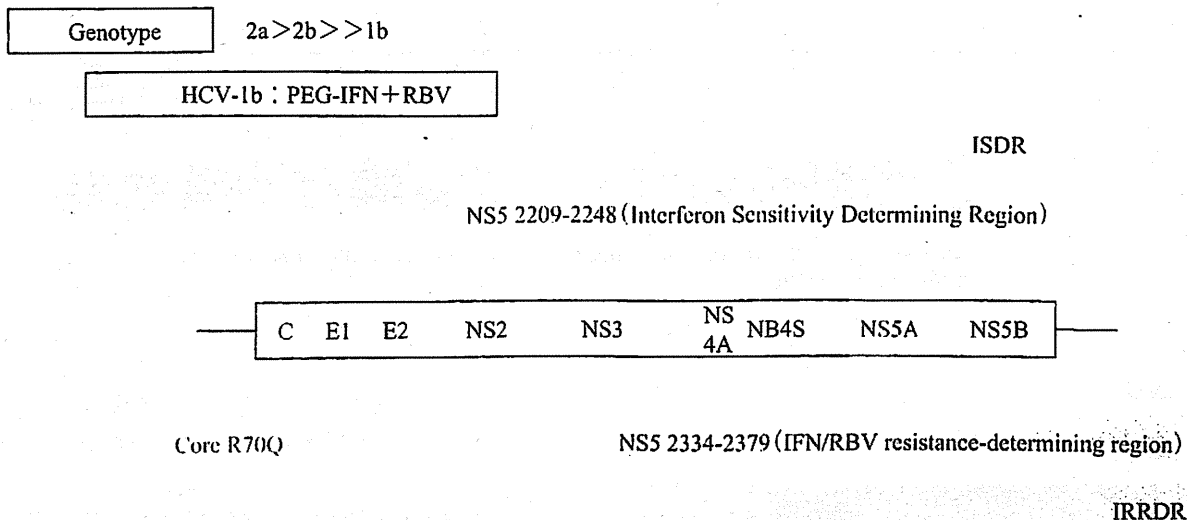


図1 インターフェロン効果を規定する HCV 遺伝子領域

### C型肝炎ウイルス(HCV)の遺伝子構造と治療効果に関わる遺伝子変異

HCVは+1本鎖のRNAウイルスであり、ゲノムの両端に非翻訳領域が存在し、中央部には約3,010個のアミノ酸からなる1本のポリ蛋白前駆体をコードするopen reading frameが存在する。この領域にはHCVの構造蛋白(コア, エンベロープ蛋白)とウイルス増殖に必要な種々の酵素をコードする非構造領域(Nonstructural region: NS)が存在する。HCVはRNAウイルスであるため、遺伝子の修復機構を持たず、約20%の塩基配列が異なる遺伝子型が存在する。これまで、インターフェロンの治療効果規定因子として明らかになっているウイルス側の因子は、遺伝子型、ウイルス量、インターフェロン感受性領域(Interferon sensitivity determining region: ISDR)<sup>5)6)</sup>、コアアミノ酸変異<sup>7)~10)</sup>、IFN/RBV抵抗性領域(IFN/RBV resistance-determining region: IRRDR)<sup>11)</sup>である(図1)。

### 遺伝子型

これまで、世界では少なくとも1~6の遺伝子型(genotype)が存在することが明らかになって

いるが、わが国では、ほとんどが、1b, 2a, 2b, 型であり、1bが70%, 2aが20%, 2bが10%を占める。遺伝子型測定は健康保険の適用ではないため、日常臨床の現場ではセログループ(serogroup)が用いられ、グループ1は1b, グループ2は2a, 2b型に相当する。

遺伝子型ごとのインターフェロン治療効果は大きく異なるが、感受性が最も高いのは2a型で、2b, 1bの順で感受性が劣る。従来のインターフェロン単独療法の治療成績は2aが70%, 2bが50%, 1bが20%程度であり、2aないしは2b型ではインターフェロン単独療法でも非常に高いウイルス排除率が期待できる。一方、インターフェロンの治療効果は、ウイルス量によっても規定され、ウイルス量が少ないと治療効果が高く、多いとウイルス排除率は低い。

現在わが国では、初回治療の場合、高ウイルス量症例のみPEG-IFN+RBV併用療法が認められており、標準治療期間も1b型の場合は48週であるが、2a型ないしは2b型(セログループ2)は24週間である。当科および関連施設で組織する共同研究Y-PERS(Yamanashi-PEG-interferonα2b-Ribavirin Study)で集積された症例の検討<sup>12)</sup>では、高ウイルス量症例に対するPEG-IFN+RBV併用療法のSVR率は、1b型に対する48週治療、2a型および2b型の24週治療で、それぞれ50%



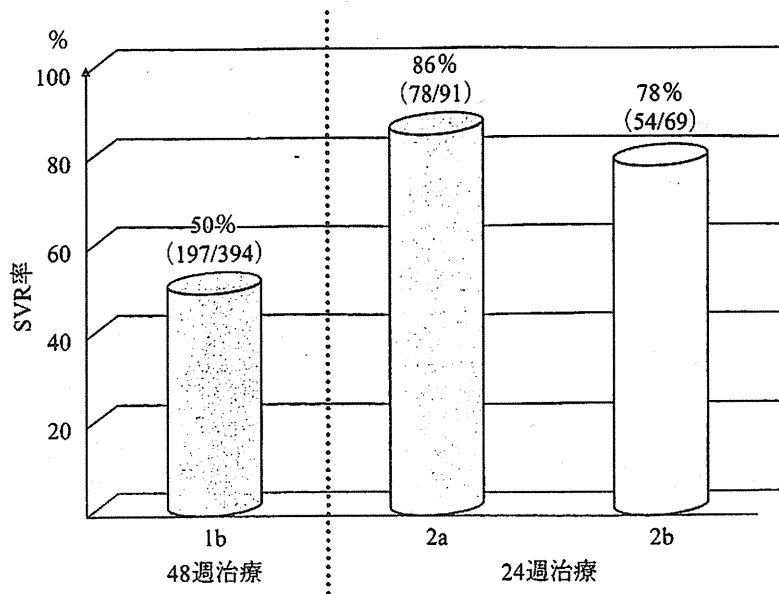


図2 PEG-IFN+RBV療法(高ウイルス量)の治療成績

(197/394), 86% (78/91), 78% (54/69)であった(図2).



### 1b型の全塩基配列からみた治療成績に関連するウイルス遺伝子変異

Genotype 1型ではSVR率は50%程度に過ぎず、治療効果を規定するウイルス側因子についてはこれまでに多くの検討がなされてきた。われわれは、1b型かつ高ウイルス量の症例で、これまでにPEG-IFN+RBV標準治療を行った症例で、HCVゲノムの全アミノ酸配列を決定し、SVRと非SVR症例での異なる遺伝子部位を検討した。この結果1アミノ酸の相違として抽出されたのはコア70番アミノ酸置換のみであった。一方、連続する1から数十個のアミノ酸の相違を検討すると、SVR例と非SVR例で相違が見られたのは、NS5A領域のN末端よりの領域でISDRやEl-Shamyらにより報告されたIRRDR(Interferon-Ribavirin resistance determining region)と一致していた。

そこで、ISDR変異数、IRRDR変異数別に、治療成績を検討するとISDR変異数が0ないし1個の症例と2個以上の症例では有意差( $p < 0.0001$ )をもって治療成績は異なることが明らかになり、

IRRDR変異数では0から3個の症例と4個以上の症例で、有意差( $p = 0.0002$ )がみられた(図3)。一方、ISDRやIRRDRが同じ条件では、コアアミノ酸変異は70番アミノ酸がアルギニン(R)か、これ以外の変異により、治療成績に差が見られたが、われわれの検討ではコア91番アミノ酸の変異は有意な差としてはみられなかった。

これらの因子について多変量解析を行うと、治療効果に最も強く関連するのはIRRDRであり、NS5Aの遺伝子変異がIFNの感受性を規定しているものと考えられた。ISDRやIRRDRを同一条件とした場合には、コア70番アミノ酸置換が有意な因子として抽出されることから、ウイルスの変異としては、両者ともに治療効果と関連すること明らかになった。



### 宿主側因子とIL28B

他方、PEG-IFN+RBV療法の治療効果に関連するゲノムワイド関連解析によって、19番染色体上のIFNラムダ遺伝子近傍のIL28B領域のSNPが同定された。すなわち、IL28B遺伝子座の代表的SNPであるrs8099917のminor allele(T/G+G/G)を持つ症例では、major allele(T/T)をもつ症例に比較して約38倍、無効となりやすいことが

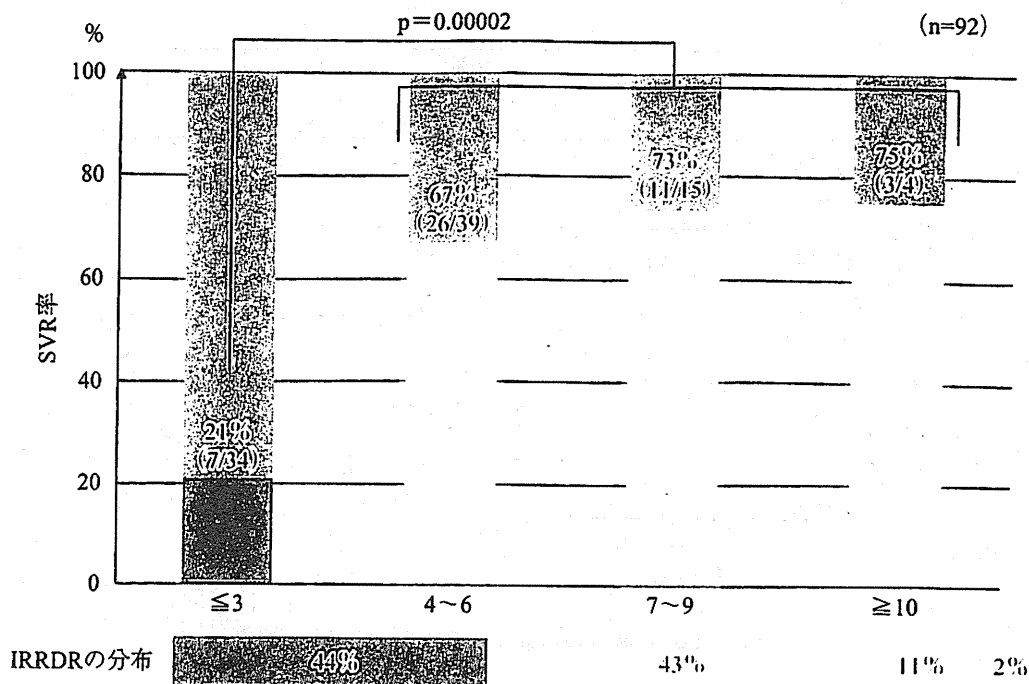


図3 Genotype 1 かつ高ウイルス量例 PEG-IFN+RBV 療法の IRRDR 変異数別 SVR 率

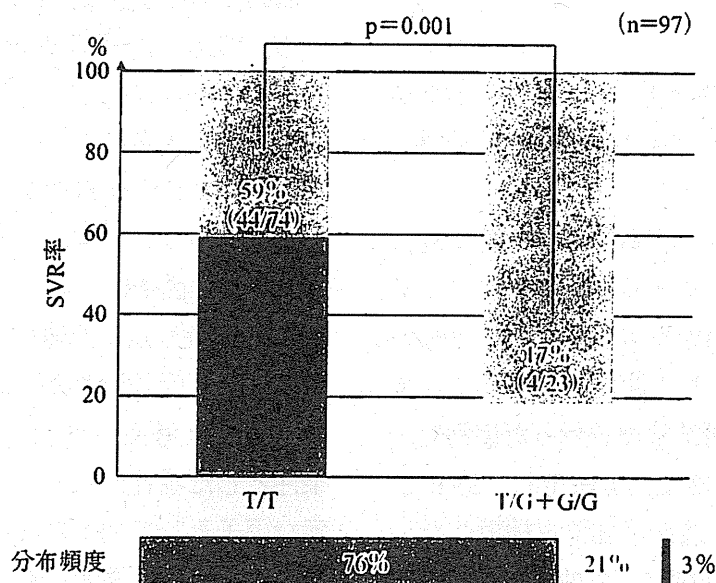


図4 Genotype 1 かつ高ウイルス量例 PEG-IFN+RBV 療法の IL28B SNP (rs8099917) 別 SVR 率

示された<sup>15)~17)</sup>。われわれの検討でも、PEG-IFN+RBV を標準期間治療した97例の検討では、IL28SNP の頻度は T/T が76%、T/G+G/G が21%で、SVR 率はそれぞれ59%、17%で有意に T/T の場合高率であった(p=0.001) (図4)。



### 遺伝子変異と宿主因子からみた治療成績

以上の結果から、年齢・性別・肝線維化、肝機能検査値などとともに、IL28B 遺伝子多型を含めて、治療効果を規定する因子の多変量解析を行ったところ、有意な因子は年齢(60歳未満)、IRRDR 変異数(≥4)、IL28B SNP (T/T) のみで

表1 1b型に対するPEG-IFN+RBV療法(≤52週)のSVRに寄与する因子 (n=283)

	odds比	95% CI	p
年齢	0.148	0.031-0.706	0.0166
IRRDR 変異数	12.825	2.371-69.361	0.0031
IL28B(rs8099917)	28.124	2.962-267.063	0.0037

多変量ロジステック回帰分析

あり、ウイルス側因子であるIRRDRと、宿主因子であるIL28Bは独立して治療効果を規定する因子であることが明らかになった(表1)。多変量解析ではISDR変異数は治療効果規定としては抽出されなかったが、ISDRとIRRDR変異数には強い相関が見られるため、IRRDRを除いて解析するとISDRが同様に抽出される。

そこで、ウイルス側因子とIL28Bとを組合せ検討すると、IL28B多型がmajor allele(TT)の場合、IRRDR変異数4個以上の症例ではSVR率は80%(28/35)であるのに対しIRRDR変異数3個以下の症例では29%(5/17)であり有意差を認めた( $p=0.001$ )。一方、IL28Bがminor allele(TG+GG)の場合は全般にSVR率は低下するが、IRRDR変異数4個以上では27%(3/11)であるのに対しIRRDR変異数3個以下では1例もSVRは見られなかった(図5)。同様の結果はISDRでも見られ

ており、詳細な検討にはISSDRが有用であるが、コマーシャルベースでも測定可能であるISDRを用いても、治療効果予測には十分有用であることが示唆された。一方、コアアミノ酸変異とIL28B変異には相関があり、IL28B majorでは74%の症例でコア70番アミノ酸がRであり、IL28B minorでは73%がR以外であり、IL28Bの多型により、存在するHCV株が異なることが示唆された。



### 個別化医療への応用

以上より、ウイルス側因子、とくにgenotypeやISDR/IRRDRなどと宿主因子であるIL28Bを組合せることで、PEG-IFN+RBV療法の治療効果予測が可能となった。すなわち、genotype 2であれば、現在の標準治療でも高い効果が期待できる一方、genotype 1では、ISDR/IRRDRとIL28Bの測定により、治療効果を予測し治療戦略を検討する必要がある。ISDRに2個以上もしくはIRRDRに4個以上の変異を持つHCVに感染した症例では、現行治療でも高い治療効果が期待できるため、治療効果が現弱しない年齢、とくに女性では50歳にならないうちに治療を開始したほ

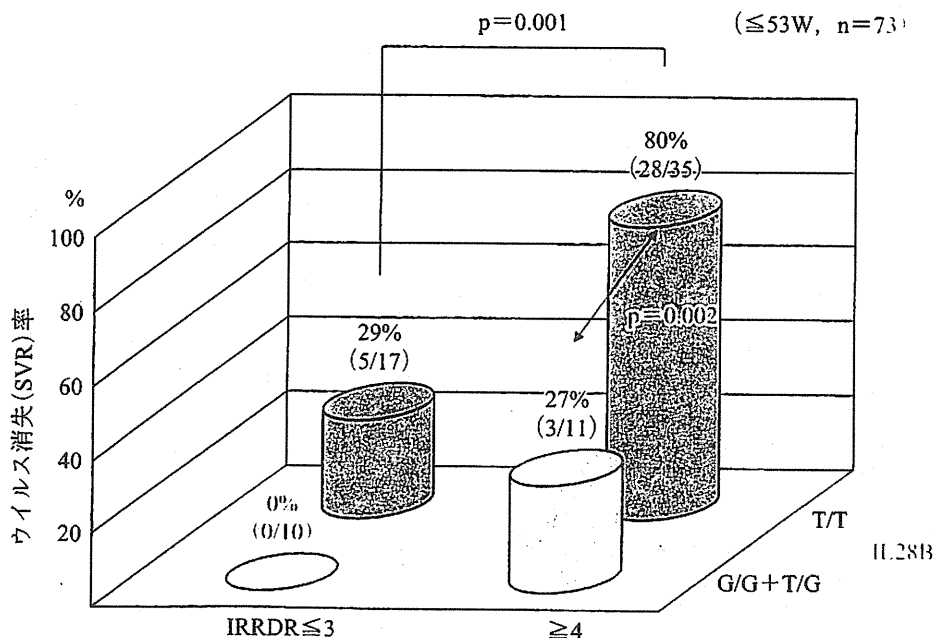


図5 Genotype 1かつ高ウイルス量例PEG-IFN+RBV療法のIRRDRおよびIL28B SNP(rs8099917)別SVR率

HCV genotype	1b		2a/2b
IRRDRまたはISDR	IRRDR ≤ 3 (IRRDR) または ISDR ≤ 1		左以外
IL28B SNP	T/G+G/G	T/T	
治療方針	PEG-IFN+RBV併用療法		IFN単独療法
	P+R併用(延長)療法		
	NS3 protease阻害剤		
	新規非IFN製剤		
	新規治療に期待	総合的判断により治療導入	積極的に治療導入

図6 ウイルス変異と宿主変異からみたC型慢性肝炎に対するインターフェロン治療方針

うが良いと考えられる。

また、ISDR0・1変異ないしIRRDR 3個以下変異症例では、IL28Bがmajor(T/T)の場合は標準治療でもある程度の治療効果が期待できるが、HCV RNAが遅れて陰性化した場合(LVR: late viral response)例では治療期間を延長することで治療効果の向上を期待する必要がある<sup>18)19)</sup>。また、IL28Bがmajor alleleの場合は、基本的にIFNには感受性のため、近い将来使用可能となるNS3 protease阻害剤の併用による、3者併用療法も選択肢の一つになると期待される<sup>20)21)</sup>。しかも、この治療法の治療期間は6ヵ月間に短縮できることが見込まれており、治療法の大きな転換期になる可能性がある。しかしIL28Bがminor allele(T/G+G/G)の症例では、IFNには抵抗性であるため、protease阻害剤を併用しても治療抵抗する可能性も予測される。とくに過去の

IFN療法に対してほとんど感受性を示さないnull responderに対しては、IFNを併用しない新規STAT-Cの組合せによる治療を期待することになる。

以上、C型慢性肝炎のインターフェロン治療にあたっては、ウイルス変異・宿主変異を考慮することが、個別化治療への大きな道となることが予測される。すなわち、現時点で治癒可能な症例、近い将来使用可能となる、PEG-IFN+RBV+NS3 protease阻害剤の3者併用療法で治癒可能な症例を高い予測確率で選択することが可能であり、治療導入時期の決定が可能となる。しかし、難治が予測される症例では現時点での治療必要性を考慮し、時間的余裕がある場合には将来の新規治療法に期待すべきであるし、肝線維化進展例や肝発癌危険群では現時点での治癒可能性を考慮しつつ治療法検討する必要がある(図6)。

文 献

- 1) Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al : Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C : a randomised trial. Lancet 358 : 958-965, 2001.
- 2) Fried NW, Schffman ML, Reddy KR, et al : Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. N Engl J Med 347 : 975-982, 2002.
- 3) Zeuzem S, Hultcratz R, Bourliere M, et al : Peginterfeeron alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with 2 or 3. J Hepatol 40 : 993-999, 2004.
- 4) 平成21年度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(肝炎分野), B型及びC型肝炎ウイルスの感染者に対する治療の標準化に関する臨床的研究. 総括分担報告書.
- 5) Enomoto N, Sukuma I, Asahina Y, et al : Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. N Engl J Med 334 :