

III. 血液感染するウイルス肝炎

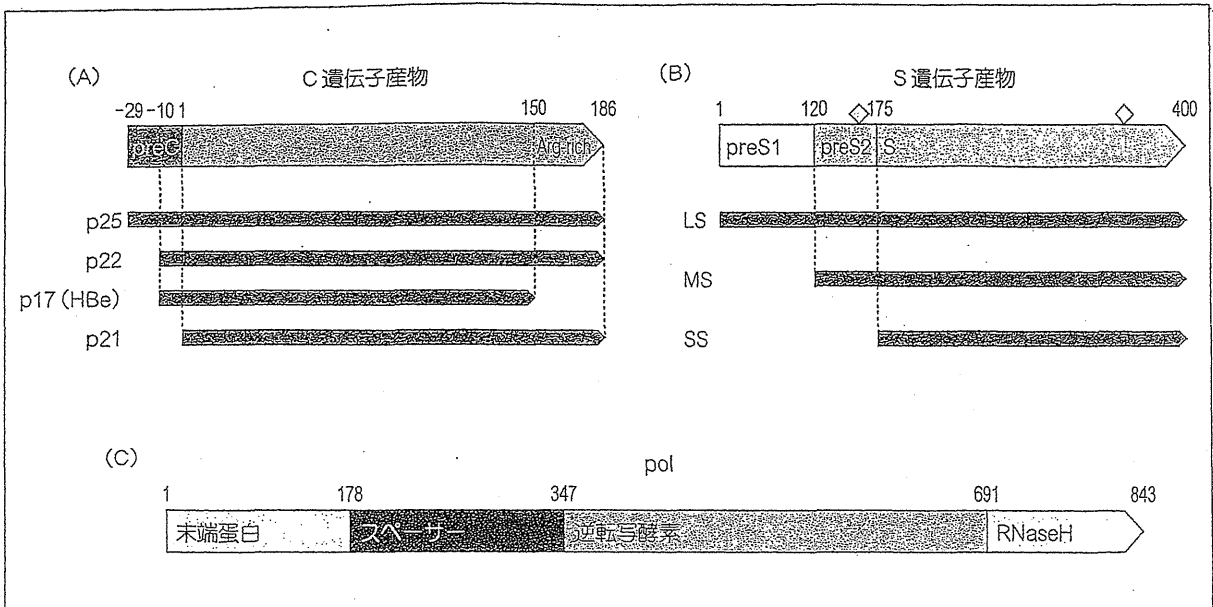


図2 コア (C), S, pol の産物と機能領域

(A) C 遺伝子産物。読み取り枠は preC-C と C の2つであるが、実際発現されるタンパクは最低4種類あると考えられている。p25 は preC-C の前駆体として発現し、N 端の分泌シグナル (-29 ~ -9aa) (p22) と 150aa 以降のアルギニンに富む領域がプロセスされて p17 として分泌される。コア粒子の産生には p21 がかわると考えられる。(B) S 遺伝子産物。SS 部分を共通として preS2 が加わった MS, さらに preS1 が加わった LS が産生される。preS2 と SS の C 端の◇は糖鎖付加部分を示す。(C) HBV pol タンパクの機能構造。N 端からタンパクプライミング逆転写にかかわる末端タンパク、機能領域を連結させるスペーサー、酵素活性を担う逆転写酵素領域、RNA 分解反応にかかわる RNaseH 領域からなる。

(文献5より)

IV pol

HBV ゲノム複製の根幹的役割を果たす因子である。845aa 前後からなり、末端タンパク領域、tethering 領域 (もしくは spacer 領域)、逆転写酵素活性領域、RNaseH 領域という各ドメインから構成されると考えられる (図2B)。前述のコアタンパクにはレトロウイルスの gag-pol 融合タンパクのようにプロテアーゼの活性を担う領域はなく、HBV pol がプロセスを受けて各ドメインに分解され、機能を発揮する可能性はないと考えられる^{5) 9)}。

HBV は逆転写過程をもつ DNA ウイルスであり、逆転写過程をもつ RNA ウイルスであるレトロウイルスの生活環と根本的な違いが

ある。すなわち、レトロウイルスは感染後、細胞内侵入後に逆転写過程が始まり、最終的には2本鎖 DNA となり宿主染色体に組み込まれ、遺伝子発現、複製過程が進行する。

一方、HBV では感染後、転写産物として合成されたプレゲノム RNA を鋳型に粒子形成過程で逆転写が進行する。また、HBV の生活環には宿主染色体に組み込まれる過程は本質的にはない (感染肝細胞の増殖過程で非特異的に組み込みが起こることは知られており、初期段階ではレトロウイルスゲノムの末端部位の LTR [long terminal region] に相当する DR [direct repeat] が 5', 3' の両端に位置するほぼ完全な形で頻りに組み込みが起こることが知られている)¹⁰⁾。

LTR (long terminal region) DR (direct repeat)

V preS-S 遺伝子産物

HBV 粒子外殻を構成する膜タンパクである。Small S (SS もしくは HBs) を共通部分として、preS1 (108 ~ 120aa) 翻訳開始コドンから翻訳されると large S (LS, 389 ~ 401aa), preS2 (55aa) 翻訳開始コドンから翻訳されると middle S (MS), SS (226aa) 翻訳開始コドンから翻訳されると SS が産生される (図 2C)。これらの違いは転写の開始がどこから始まるかで決定されると考えられているが、SS をコードする転写産物が圧倒的に多い。SS にはそれ自体で粒子形成・分泌能があり、感染能をもつ Dane 粒子に比し約 1,000 倍の量で SS 粒子 (もしくは HBs 粒子) として大量に分泌される。

Dane 粒子の形成には SS に加え、LS が必要であり、コア粒子を内包する過程で粒子サイズや機能の点からも重要な役割を担っていると思われる。MS は Dane 粒子形成に必ずしも必要ではないと思われるが、分泌を促進する過程で機能していると考えられ、やはり、LS, MS, SS の量比は Dane 粒子形成を促進するか、subviral 粒子としてののみ分泌されるかの点で鍵になっているものと考えられる^{11) 12)}。

VI X 遺伝子産物

HBV ゲノムの塩基配列が決定されたとき、機能未知の翻訳読み取り枠 (ORF: open reading frame) として同定された。約 0.8kb の固有の転写産物から翻訳されると考えられる (図 1B) 細胞内シグナル伝達や、ウイルス宿主遺伝子の転写活性を修飾する機能が数々報告されている。こういった機能面での重要ポイントは、DHBV には X 遺伝子が存在せず、DHBV 感染アヒルでは肝がんが発症しない点に着目した X 遺伝子機能と肝発がんとの関連である。実際、HBV X トランスジェニッ

クマウスで肝発がんが促進される¹³⁾。哺乳類へパドナウイルスでは感染能に影響を与えるとの報告もあるが、感染そのものに影響があるのか、転写活性化に原因があるのかなど不明な点も多い。

X タンパクはさまざまな機能をもつが、培養細胞を用いた大量かつ一過性発現系から得られたものである¹⁴⁾。X タンパクは哺乳類細胞系でも難溶性であり、実際の生活環の中でどの程度発現し、その発現程度に見合った機能は何なのか、また、大量に発現される事態があるとすると、それは一体どういう局面なのか、実際何が起こるのか、疑問は尽きない。

VII HBV の生活環 (図 3) と複製 (図 4)

HBV の生活環はおもに、DHBV の初代培養肝細胞感染系や個体レベルでの感染系を用いた解析で一般的には次のように考えられている⁵⁾。

まず、細胞表面の特異的感染受容体を介して付着・侵入し、感染を成立させる。HBV のゲノムは前述のごとく、 Θ 鎖 DNA の 5' に末端タンパク (pol) が共有結合しているが、これが取り除かれ、また、末端タンパク付着部位近傍の重複配列部分もトリミングされる。 Θ 鎖 DNA の RNA プライマーも取り除かれ、完全長が複製される。最終的にはギャップはすべて埋め尽くされ結合されて、プラスミド型の環状 2 本鎖 DNA (covalently closed circular DNA: cccDNA) となる。この過程に HBV pol が必要かどうかはまだ議論のあるところである。

cccDNA はエピゲノムとなり、HBV 関連 mRNA (3.5kb mRNA: プレゲノム RNA [C, pol], preC- プレゲノム RNA [preC-C, pol?], 2.4kb mRNA [LS], 2.2kb mRNA [MS], 2.1kb mRNA [SS], 0.8kb mRNA [X]) が転写される (図 1B, 3)。この他にも、

III 血液感染するウイルス肝炎

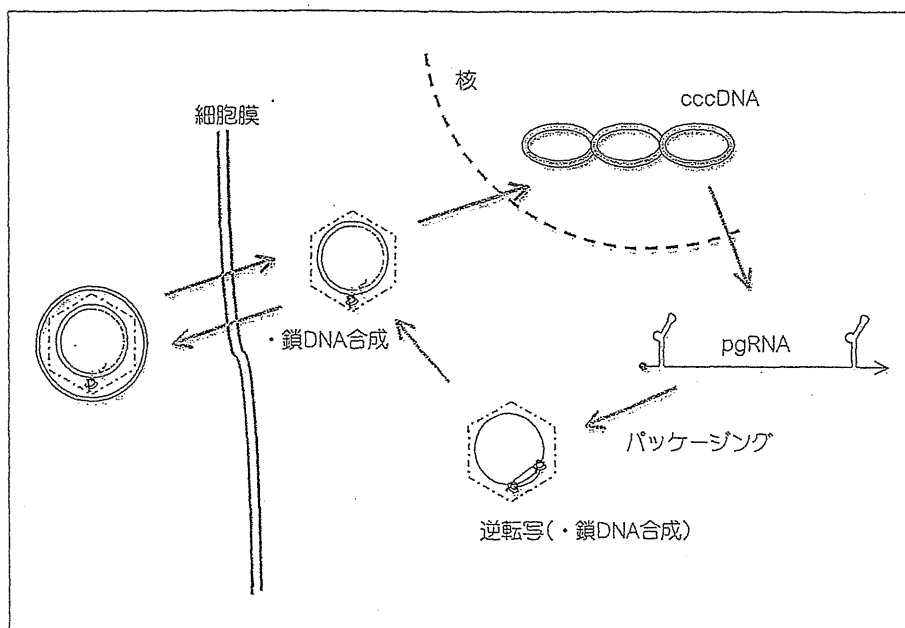


図3 HBVの生活環

HBVの生活環の概略を示した。HBV感染粒子は想定される受容体に結合後、細胞膜上もしくはエンドゾームで膜融合を起こし、コア粒子が細胞質へ取り込まれる。コア粒子は核へ移送されると仮定されているが、このプロセスでゲノムDNAのギャップは埋められ、末端タンパクは取り外されて、核内ではプラスミド型の閉環状cccDNAとなる。このエピゾームは被転写鏡合型であり、HBV関連転写物が発現される。ゲノム合成に供与されるRNAはpgRNAであり、コア粒子のアセンブリーと共役して、パッケージング、逆転写反応が進行する。分泌された感染性HBV粒子のゲノムは完全なHBVゲノム構造をとっており、⊕鎖DNA合成は膜粒子に取り込まれるまでに完了していると考えられている。

HBV：B型肝炎ウイルス

(文献9より改変)

C遺伝子の後半からpreSにかけてスプライスされた2.3kb前後のmRNA(機能不明)も産生される¹⁹⁾。これらのmRNAはすべて⊕鎖極性をもつもので、⊖鎖極性をもつ転写産物は基本的には知られていない。プレゲノムRNAはゲノムサイズより長く、5'と3'が重複配列になっていることが特徴であり、また、逆転写複製に不可欠である。

プレゲノムRNAから翻訳されたpolはプレゲノムRNAのパッケージングシグナルεに結合し、タンパクプライミングによって⊖鎖DNAの合成を開始する(HBVの場合は63番目のチロシンからチミンが合成開始の発端になる)(図4A)。εからDR1、5'の配列はプレゲノムRNAの3'にも存在するため、こ

こまで合成された⊖鎖DNAはプレゲノムRNA3'と同様の相補的な配列に転座して、さらに、5'までの両端の重複した完全長の⊖鎖DNAを完成する。プレゲノムRNA自体は⊖鎖DNA合成が進むに連れてpol自身のRNaseH活性により分解されるが、5'のDR1を含む短い配列部分が最終的に⊖鎖DNAのDR2に相補的に結合することが⊕鎖DNAのプライミングになる。⊖鎖DNAの5'のDR1辺りまで合成された⊕鎖DNAは3'のDR1に転座して、さらに⊕鎖DNA合成を進める。この⊕鎖DNA合成はS遺伝子ORFとX遺伝子のORF辺りで停止している。粒子内での基質が枯渇してくることが理由のひとつかもしれない⁹⁾(図4B)。

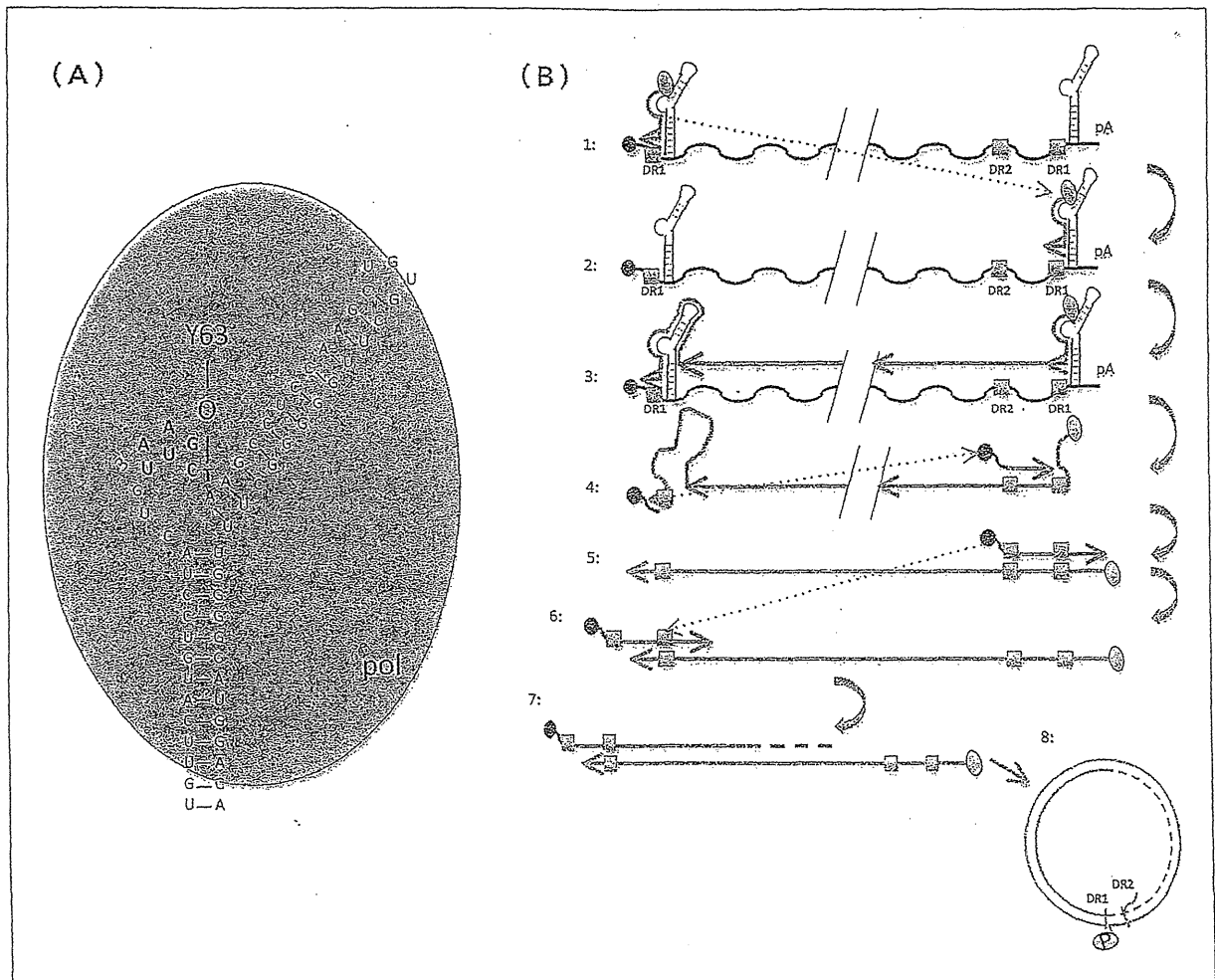


図4 HBVパッケージングシグナル(ε)と逆転写複製メカニズム

(A) HBV HBVパッケージングシグナル(ε)。RNAによくみられる pseudo-not 構造をとると考えられている。HBV pol 末端タンパク領域で認識されることが考えられていて、部分的に1本鎖となる膨らみ(bulge)の根元のアデニンと相補的にHBV polの63番目のチロシンからプライミングされる。(B) HBV複製メカニズム。① εから開始した逆転写産物は5' DR1まで合成されると、② 3' DR1に転座することで全長⊖鎖DNA合成が可能となる。③ 5' DR1まで⊖鎖DNA合成が進行するにともない、④ 鋳型pgRNAはHBV polのRNaseH活性により順次分解される。キャップ構造～DR1をもつ5'の短いpgRNA部分は完全なDNA-RNAハイブリッドにならないため分解を免れ、この部分のRNAが3'に近いDR2領域に相補的に転座することで⊖鎖DNA合成のプライマーとして機能する(レトロウイルスの⊖鎖DNA合成のプライマーとなる polypurine tract [ppt]に相当する)。⑤ ⊖鎖DNA合成は⊖鎖DNA5'まで進み、⑥ その後、3' DR1に転座することで、⑦ さらに⊖鎖DNA合成が進む。この反応過程で、⑧ DR領域の相補的な配列をもとに環状化構造をとる。⊖鎖DNA合成は確固とした理由は定かではないが、50～80%くらいのところで合成が停止している。本図では末端タンパクを独立した因子として描いているが、HBV polは機能構造に分解されないため、末端タンパク～合成酵素活性はひとつのタンパクとして機能している。

HBV: B型肝炎ウイルス

(文献9より)

HBVの逆転写(⊖鎖DNA合成)から⊕鎖DNA合成といった一連のHBVゲノム複製がコア粒子内で行われると考えられており、ゲ

ノムを含むコア粒子はERに分子集合している膜タンパクに内包されてERを經由して細胞外に分泌されると思われる。コア粒子の

III 血液感染するウイルス肝炎

ERでの内包から分泌の過程にどのような宿主因子がかかわり、ウイルス因子がどのように機能しているのか、受動的なものなのか、能動的な移送・分子集合なのか、いまだ謎だらけである。

HBV 研究の将来

HBV感染者は世界に2～3億人、わが国でもいまだ150万人存在すると考えられている。このような巨大感染症はワクチン回避変異体を生み、慢性化率の高いゲノタイプが蔓延しつつある。HBV慢性肝炎の治療はインターフェロンによるseroconversionを目指した治療が最良であるが³、効果は限定的である。したがって、HBV増殖を抑えることに主眼がおかれるが³、抗HBV剤は抗HIV剤のたらい回しの利用で変異株とのいたちごっこである。

HBVの研究は分子生物学的手法を主体になされ、各遺伝子の機能が明らかにされて来た。しかし、これまでの報告がHBVの本質的なウイルス学をどこまで正確に記述しているのかを検討する必要がある。すなわち、少なくとも培養細胞を利用した*in vitro*感染系で、可能であればマウス等を利用した個体感染モデルでの実証が必要である。これらの感染系の樹立はHBVのウイルス学を発展させるに留まらず、病態発症機構の解明や、その事実に基づく治療法の開発へと発展することを約束する。

そこで、今後のHBV研究を進める上でもっとも大きな問題点を2つあげておきたい。①HBV感染受容体を分離・同定し、その性質を明らかにしつつ、有用かつ簡便な*in vitro*, *in vivo*感染系を樹立すること、②HBV polの簡便なアッセイ系によるhigh-throughput抗HBV剤スクリーニングシステムを確立することの2点である。これらの問題はウイルス学に託された最難問である。

IX HBV感染受容体の分離・同定と感染系の確立

ウイルスの発見からすでに半世紀足らず、HBVの感染受容体はそのかけらもわかっていないに等しい。本来の感染宿主実質肝細胞に感染増殖するが³、肝実質細胞由来の培養肝がん細胞にはほとんど感染しない。もちろん、培養肝がん細胞が元々の正常の肝実質細胞の性質を維持していないことは想定される。初代培養ヒト肝実質細胞の系では確かにHBV感染が確認されるが³、倫理的な側面、調達の煩雑さを考えると、研究室での使用にはまったく耐えない。

C型肝炎ウイルスに起因すると思われる肝がんから樹立されたHepaRGという培養肝がん細胞がHBVにも感染感受性を示すことが示された¹⁶⁾。しかし、感受性を得るために2～3週間程度の分化誘導が必要なこと、感染効率は最大で30%程度で、しかもディッシュ1枚当たり10万円以上する高価な細胞株であることなどから汎用性に耐えない(増殖維持は特許の関連で制限されている)。iPSから分化させた肝細胞の利用もひとつのアイデアではあるかもしれないが³、その誘導から維持の手間を考えると、HBV研究者が低コストで簡便・自由に使用できる状況にはない。

そこでやはり、HBV感染受容体の分離・同定とその応用としての感染系の樹立が必要不可欠と考えている。とは言っても、半世紀近い研究でまったく成果が出なかった対象である。ウイルス感染機構の概念を根本から変える非常識的なアイデアが必要となると、かえってかなり厄介であるが³、斬新なスクリーニング方法を考案しつつ、ウイルス感染の基本に立って地道な同定作業を続けている。

X HBV pol アッセイシステム

タンパクプライミング逆転写が³、パッケージングシグナル ϵ 、コア粒子のアセンブリー

1. B型肝炎 (1) B型肝炎のウイルス学

と共役して活性化するなどの特殊性や、発現タンパクの可溶化が困難であるなど、試験管内反応系を拒む問題点が立ちはだかる。High-throughput/mass screening システムの構築、立体構造から *in silico* 解析を行うにしても純度の高い評品が大量に必要である。いかに活性を維持した状態でこういった評品を得るか、種々のアイデアをもとに試行錯誤を続けている。

XI おわりに

抗HBVワクチンが開発されて、わが国では特段HBV感染症に対する意識が下がったのか、わが国におけるHBVの基礎研究者はほとんど影を潜めてしまった。わが国の150万人強の患者、世界に数億人の感染者をもってして、容易に減少していく感染症ではないと考える。HBVウイルス学もHBV肝炎、肝がんもよくわからないことだらけである。一見きわめて単純なウイルスのようにみえるが、逆に抗ウイルス標的材料が少なく、種々の側面からの治療薬の開発も難しい。本ウイルスの基本的な問題を解決することが、いろいろな意味で新たな展開を生むかもしれない。



- 1) Blumberg BS, et al : A "new" antigen in leukemia sera. JAMA 191 : 541-546, 1965.
- 2) Blumberg BS, et al : A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. Ann Intern Med 66 : 924-931, 1967.
- 3) Okochi K., Murakami S : Observation on Australia antigen in Japanese. Vox Sang 15 : 374-385, 1968.
- 4) Schaefer S : Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotype. World J Gastroenterol 13 : 14-21, 2007.
- 5) Seeger C, et al : Hepadnaviruses. "Fields Virology" Knipe DM and Howley PM ed. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia. p2977-3029, 2007.
- 6) Liang TK : Hepatitis B : The Virus and Disease. Hepatol 49 : S13-S21, 2009.
- 7) Wynne SA, et al : The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. Mol Cell 3 : 771-780, 1999.
- 8) Watts NR, et al : The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. EMBO J 21 : 876-884, 2002.
- 9) Beck J, Nassal M : Hepatitis B virus replication. World J Gastroenterol 13 : 48-64, 2007.
- 10) Yang W, Summers J : Integration of Hepadnavirus DNA in infected liver : evidence for a linear precursor. J Virol 73 : 9710-9717, 1999.
- 11) Bruss V, Ganem D : The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. Proc Natl Acad Sci USA 88 : 1069-1063, 1991.
- 12) Ueda K, et al : Three envelope proteins of hepatitis B virus : large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. J Virol 65 : 3521-3529, 1991.
- 13) Kim CM, et al : HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. Nature 351 : 317-320, 1991.
- 14) Wei Y, et al : Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. Pathologie Biologie 58 : 267-272, 2010.
- 15) Suzuki T, et al : Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with the hepatitis B virus genome. Proc Natl Acad Sci USA 86 : 8422-8426, 1989.
- 16) Gripon P, et al : Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 15655-15660, 2002.

遺伝子挿入HBVを用いた感染レセプターの探索

上田 啓次*

索引用語：HBVベクター，HBV psuedotype，HBVレセプター，HBV感染系

要旨：B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) が同定されてから、約半世紀が過ぎようとしている。日本には今なお130万人前後、世界的には3.6億人の感染患者が存在するが、本感染症の抜本的な克服手段は今もって存在しないといっても過言ではない。その根本的な理由のひとつが、本ウイルスには簡便な *in vitro* あるいは *in vivo* 感染系が存在しないことによると思われる。このことは逆にHBV感染レセプターの同定を阻んでいると思われるが、世界中で展開されている多くのデータの積み重ねにも関わらず謎は深まるばかりである。ウイルス学的にもまたその感染による病態発症機構の解明、治療法やその評価系の考案には、*in vitro* あるいは *in vivo* 感染系の構築が必須であると考えられる。しかしながら、このような経緯を克服し、HBV感染レセプターを同定、感染系を樹立するにはかなりの創意工夫が必要と思われる。本稿では、これまで進展してきたHBV *in vitro* 感染系、HBV感染レセプターに関する研究を総括し、今後のHBV感染レセプター同定と感染系樹立へ向けた遺伝子挿入HBVの作製とそれを用いたレセプターの同定戦略を概説する。

1 はじめに

1964年にBlumbergがオーストラリア抗原として、世界で初めてHBVの存在を示してから、約半世紀が迫ろうとしている。HBVは肝炎、肝硬変、肝癌の発症に関わる社会的にも重要視されるウイルスであり、その克服のため、さまざまな観点からウイルス学的、臨床医学的研究が展開されてきた。

HBVは、複製に逆転写過程をもち、3.2 kb

の部分二重鎖DNAにコードされたたった4つの遺伝子で、ほぼ特異的に肝実質細胞において生活環を全うするウイルス学的にも特異的なウイルスである²⁾。分子生物学的手法の開眼と相まって、ゲノムクローニング、塩基配列解析、HBV関連遺伝子解析、組込みと病態解析などが展開され、ワクチンの開発やインターフェロン、抗HIV剤の流用による治療法の進展もあったことも事実である。こういった経緯を背景にし、基礎ウイルス学的に

Keiji UEDA : Separation and identification of the hepatitis B virus receptors with recombinant HBV technology

*大阪大学大学院医学系研究科感染免疫医学講座ウイルス学 [〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2]

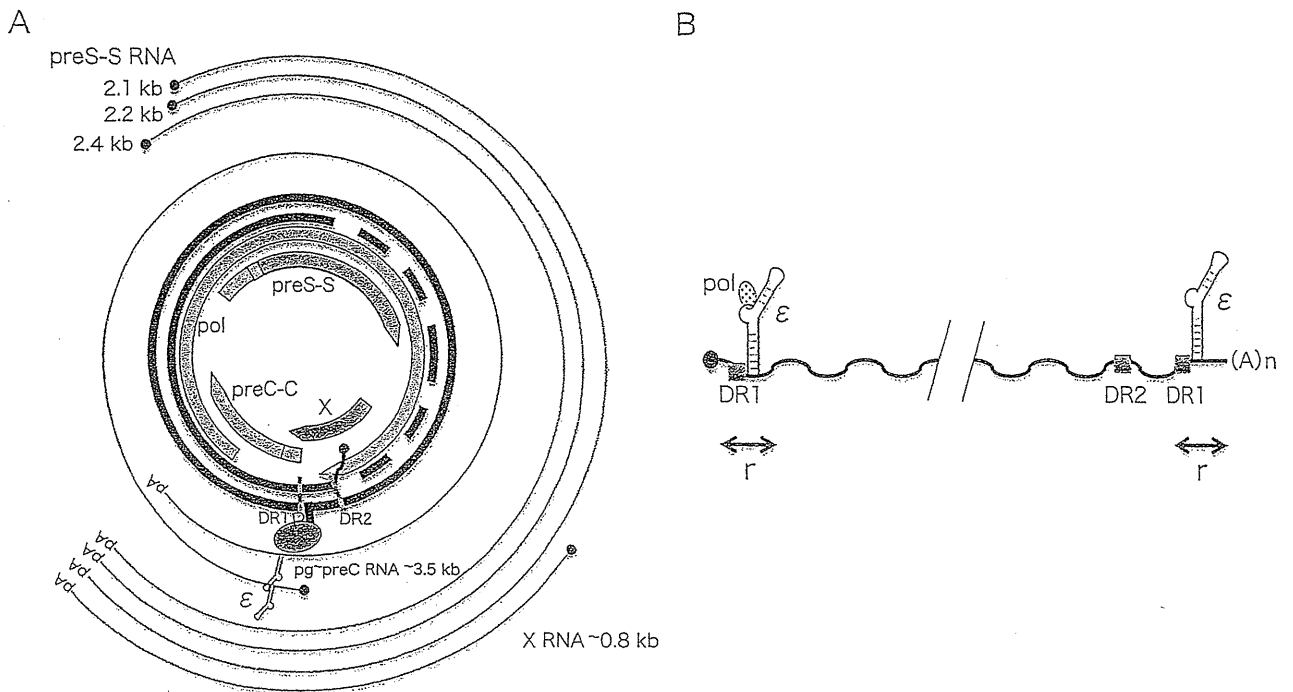


図1 HBVゲノム構造と遺伝子転写産物

- A: HBVのゲノム構造を太線, 太破線で示す。⊖鎖DNA末端にpolが付着する。DR1およびDR2の位置を示した。その内側にHBV関連遺伝子産物の読取り枠を示している。遺伝子は基本的にpreCore-Core (preC-C), preS-S, pol, Xの4つである。3.5 kb mRNAがpreCのATGを含む場合, preCore-Coreとして翻訳され, 分泌過程でN末の分泌シグナルおよびC末が切断されてHBe抗原(p17)となる。preCのATGを含まない場合がpregenome RNA (pgRNA)である。pgRNAは逆転写の鋳型となる重要な機能をもつと同時にcore蛋白, polの翻訳に利用される。preS-S遺伝子はmRNAの開始部位の違いにより, 2.4 kb mRNAからlarge S (preS1-preS2-small S [SS]) (LS), 2.2 kb mRNAからmiddle S (preS2-SS) (MS), 2.1 kb mRNAからSSが翻訳される。この内最も産生量として多いのはSSである。X遺伝子は固有のmRNA (0.8 kb)から翻訳される。●はキャップ構造を示す。
- B: pgRNAの構造。両端は重複した配列(r)となる。DR配列, パッケージングシグナル(ε), polのプライミングする位置を示す。

はもはややり尽された感があったのか, ここ10年間, 日本のHBVの基礎研究は暗黒の時代であった。しかし, 現在なお日本国内に約130万人, 世界的には3.6億人の巨大感染症を形成する人類史上最も危惧すべき感染症のひとつであり, その克服にはHBVの本質を詳細に解析できる*in vitro*あるいは*in vivo*感染系が何としても必要であり, 感染系を土台とした病態発症機構の解明とそれらに基づくウイルス排除へ向けた抜本的な治療法の開発が重要であると考えている。

HBVは本来の宿主であるヒト若しくはチンパンジーなどのヒト近縁類人猿にしか感染

しない。これらの初代培養肝細胞はHBV感染系としての効率が高いが, その調達は倫理的にも不可能に近く, できたとしてもその手間を考えると, とても日々の実験に容易に用いられる感染系とはいえない。

類人猿に感染するHBVを除いたanimal hepadnaviruses (アヒルB型肝炎ウイルス [duck hepatitis B virus = DHBV]³⁾, ウッドチャック肝炎ウイルス [woodchuck hepatitis virus = WHV]⁴⁾, 地リス肝炎ウイルス [ground squirrel hepatitis virus = GSHV])を用いた分子ウイルス学的アプローチは, 確かに多くの事実を明らかにしてきたと思うが, それに

しても、感染レセプター、感染系、cccDNA (covalently closed circular DNA) 生合成とその維持機構、動態、病態との関連、HBVポリメラーゼのアッセイ系、詳細な複製メカニズムなど、多くの謎が残されたままである。

HBV感染レセプターの分離・同定は、初代培養アヒル肝細胞(primary duck hepatocyte = PDH)を用いたDHBVを中心に進められた。HBV吸着因子を含め、候補にあげられた因子は、重合アルブミンレセプター⁵⁾から始まって、gp120⁶⁾、gp180⁷⁾などいくつかあるが、繰り返し述べたように感染系の構築には至っていない。これ程までに困難なHBV感染レセプターの分離・同定に向けてどのようなアプローチが必要なのか、遺伝子挿入HBVの作製とそれを用いたレセプターの同定戦略を考案した。

2 *In vitro* HBV感染系

前述のごとく、簡便な特に*in vitro*感染系が存在しないことが、HBV感染レセプターの分離・同定にとって決定的な障壁となっていることはいうまでもないが、*in vitro* HBV感染系(初代培養肝細胞を除く)構築の努力は続けられている。当然のことながら、HBVは正常肝実質細胞へ高親和性を示し、増殖能を発揮することから、肝実質細胞由来と考えられるHepG2、HuH7などのヒト肝癌培養細胞株が感染系として試されてきた。これらの細胞はHBVの複製サイクルと考慮して構築したHBV発現ベクターをトランスフェクションすることにより、感染性粒子を産生することがわかっている^{8,9)}。生体においてどのような形質をもつ肝実質細胞に感染するのか全く検討もつかないが、一般的に正常肝細胞は高分化状態にあると考えられるため、これらの細胞をステロイド、インスリ

ン、dimethyl sulfoxide (DMSO)を用いて分化誘導し、感染実験を試みたという報告がある¹⁰⁾。またこれらの細胞を用いて、肝臓という臓器状態をできるだけ再現する目的で高密度三次元培養によるHBV感染系の構築の試みもあるが、感染効率、コストパフォーマンスを考えるとHBV感染系としての価値は評価するレベルにないといわざるを得ない。

一般培養細胞系感染系としては、最近(といっても、すでに10年も経過する)樹立されたHCV感染肝癌から樹立されたHepaRGを用いたHBV感染系が唯一であると思われる¹¹⁾。この細胞を2~4% DMSOで数週間分化誘導すると20%程度のHBV感染効率を得られるとされる。しかしながら、一般的な培養肝癌細胞ながら商業用で直径約10 cmのディッシュで10万円強もする高価な細胞であり、とても日常的に使用できる細胞ではない。cccDNA形成など、本来の感染サイクルが進行していると思われるが、Dane様粒子の存在が示されている一方、感染性粒子を排出できないなどの問題点もある¹²⁾。

HBV感染レセプターの分離・同定から、感染系の構築を目指す場合にこのHepaRGの有用性が議論されている¹³⁾。最近の報告¹⁴⁾では、小管構造の形成に関わる肝細胞の側底側細胞膜(basolateral membrane)側からHBVは感染する。初代培養ヒト肝細胞(primary human hepatocyte = PHH)では接着細胞の表面側一面に小管構造マーカーであるmultidrug resistance protein 2 (MRP2)の発現がみられ、8000 multiplicity of genome equivalent (mge)以上でほぼ100%のHBV感染性がみられるのに対し、DMSO分化誘導HepaRGでは、限られた集属する領域にMRP2の発現がみられ、同じmgeを用いた感染実験でその集団の周辺部にHBV感染が観

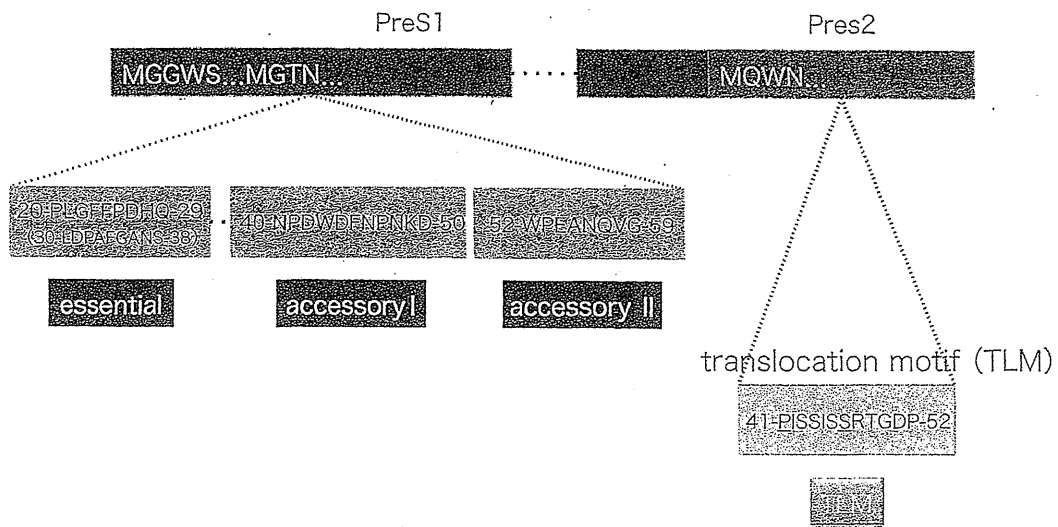


図2 preSの機能配列

preS1内の付着・侵入に必須な機能配列(20～29aa), 付随的機能配列(accessory IおよびII)とpreS2内の侵入過程で重要なTLMを示す。

察されることや、この現象がEGTAで促進される、集団の内部へも感染が確認できるようになる、ことから導き出された。本知見は生体における肝実質細胞の形質は、培養肝癌細胞株に比べ著しい高分化状態にあり、培養肝癌細胞では容易には達成し難い形質を有することを想像させる。この高分化状態がHBV感染レセプターの発現に関わるのか、活性に関わるのか定かではないにせよ、興味深い問題である。

3 付着・融合・侵入に関わるHBV因子

培養肝癌細胞のひとつ、HepG2細胞のHBV感染効率はないに等しいと考える研究者は多いと思われるが、当初はこの細胞を用いたHBV感染粒子の付着機構に関する研究は多々報告された^{15,16)}。最近ではD型肝炎ウイルス(HDV)なども利用してHepaRG細胞を用いた研究が多い¹⁷⁾。HBVの感染性粒子の形成には所謂small S (SS若しくは単にHBs)膜蛋白とmiddle S (MS)膜蛋白に加え、large S (LS)膜蛋白が必須の因子となるが、感染性HBV粒子の細胞への付着に関し

て、特にpreS1領域の機能が重要視されている¹⁸⁾。preS1領域は部分的にアミノ酸配列の相同性の低いところがあるが、おおむね高い相同性があると考えて良く、付着・膜融合に関わる必須な領域、2つの付随的な領域が存在すると考えられている。preS2領域も相同性は高く、細胞内侵入に関わると思われる領域(translocation motif = TLM)が想定されている。またSS膜蛋白N末にも膜融合に関わる領域が予測されている。

以上のような情報をもとにして、preS1内の必須領域を介して、肝細胞膜表面因子に結合(付着)し、レセプター分子集合・構造変化、SS膜蛋白N末を加えたHBV粒子膜-細胞膜融合が起こり、TLMを介した細胞内侵入といったHBVの付着・膜融合・侵入機構が想像される。

6 HBV感染レセプターの分離・同定

さて、HBV感染レセプターの分離・同定は倫理的な制約も絡んで、PDH-DHBV系を中心に行われてきた。DHBVにはHBVのMSに相当する膜蛋白はなく、すなわちpreS2に

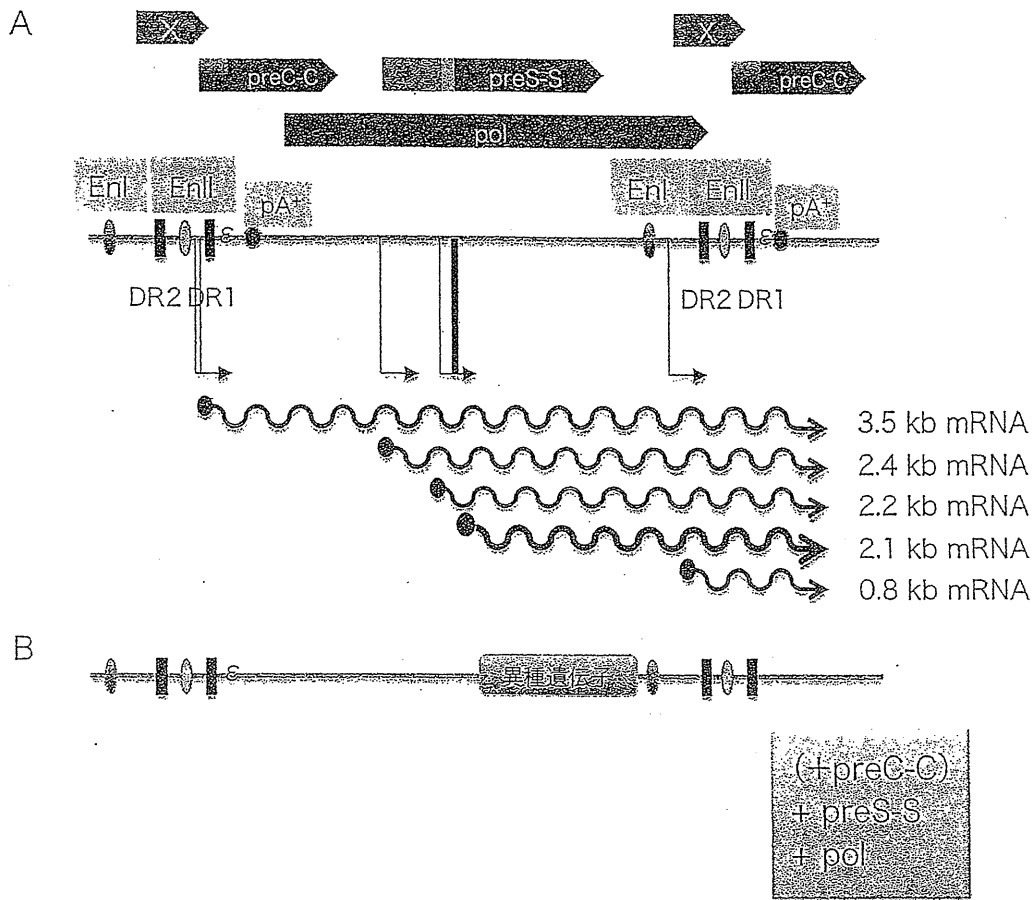


図3 HBVベクター型遺伝子挿入HBVデザイン

- A: HBVゲノムを直鎖状に描いている。上段のボックス矢印はORFを示す。pgRNAを発現するための必須基本ユニットを示した。En: エンハンサー。pA: ポリA付加シグナル。鍵矢印は各転写産物の開始部位、波線は転写産物を示す。
- B: SSの位置に異種遺伝子を挿入したデザインを示した。この場合、挿入により、preC-C遺伝子、X遺伝子を除くそのほかのHBV関連遺伝子はすべて破壊されるため、トランスに供給する必要がある。挿入部位によってはpreC-Cの供給も必要となる

該当する領域は存在しない。LS内のpreS領域に付着・膜融合に関わる必須な領域、2つのTLMに相当する領域が同定されている。

DHBVで同定された最も有力なDHBV付着因子はgp180 (carboxypeptidase D)であった¹⁹⁾。本因子は膜表面をビオチン化したPDHをDHBVと付着させた後、抗DHBV膜蛋白抗体を用いて免疫沈降することによって分離・同定されたものである。本因子の同定は、HBVの付着・膜融合・侵入に関わるHBV感染レセプターの本質にも迫る因子として期待されたが、LMH細胞(chicken由来

の培養肝癌細胞株でDHBV感染を許容しない)をDHBV感染許容細胞へ変化させることはできなかつたし、またgp180に対する抗体もアヒル初代培養肝細胞へのDHBV感染を阻止するに至らなかつた。

付着因子の存在が報告されているHepG2細胞からもHBV感染が許容される分化誘導したHepaRG細胞からも、依然としてHBV感染レセプターの本体に迫る因子の分離・同定はされていない。現時点における生化学、分子生物学などの技術を駆使しても、確固としたHBV膜蛋白結合因子すらこれらの細胞

から同定されないのはなぜであろうか？—ますますHBV感染レセプターの謎は深まり、逆に興味深くもあるが、HBV感染レセプターの分離・同定には相当の工夫と努力とを余儀なくされると思われる。

7 遺伝子挿入HBVの作製

これまでの経緯から、HBV感染レセプターの分離・同定へ向けた新たな局面を拓くために遺伝子挿入HBV—いわば、組換え型HBV或はpseudotype HBV作製を試みている。この2つの遺伝子挿入HBVは、前者のごとくHBVの複製機構を理解したHBVベクター型か、膜粒子のみをHBV型に変えたpseudotype HBV型に分けられる。本アプローチはこれまでに試みられなかったHBV感染性粒子を基盤にした感染性を指標にするアッセイ系の構築を可能にする。

1. HBVベクター型

本ベクターの構築には、HBVの複製過程を正確に理解する必要がある。HBVは、部分二重鎖DNAという独特のゲノム構造をもつことは勿論、さらに蛋白プライミングによって逆転写複製を行うという極めて特徴的な複製サイクルをもつ²⁰⁾。

HBVは感染成立後、部分二重鎖DNAを修復し、いわゆるcccDNAというエピゲノムを形成する。本ゲノムは肝実質細胞核内にあって、転写許容構造体として逆転写の鋳型となる3.5 kbプレゲノムRNAをはじめ、いくつかのHBV関連転写産物産生の鋳型として機能する。3.5 kbプレゲノムRNAはpreC翻訳領域内でDR1 (direct repeat 1)を含む形で転写され、3'側にDR2、さらに5'のDR1を含んだやや下流でpolyA付加シグナルが認識されて、すなわち5'と3'が重複される形で集結する。

本稿ではHBV複製サイクルの詳細については省略するが、このベクター構築上最低限必要なエレメントとして、プレゲノムRNA転写開始部位を含めた転写開始装置、5' DR1、 ϵ 、DR2、3' DR1配列の基本情報を残しておく必要がある、またどの転写unitを使うか考慮する必要がある(図3A, B)。ウイルス蛋白因子として、実際の逆転写過程から部分二重鎖DNA合成に関わるHBVポリメラーゼ(HBVpol)、コア粒子を供給するHBVコア蛋白(HBV-C)、膜粒子を構成するpreS-S蛋白(HBV preS-S)を適宜トランスに供給する必要がある(図3B)。またゲノムサイズも厳密に影響すると思われるし、プレゲノムRNAの転写効率を上げるために適宜異種遺伝子エンハンサーを考慮する必要があるかもしれない。

このタイプの遺伝子挿入型HBVはHBVの生活環を踏襲するので、理論上は感染後速やかにcccDNAが形成され遺伝子発現が可能となると予測される。蛍光蛋白遺伝子などで感染をモニターすることにより、HBV感染レセプターの遺伝子の分離・同定に役立てることが可能である。ただし、HBVcccDNAには γ ヘルペスウイルスにみられる潜伏感染複製オリジン(ori-P)は存在せず、細胞分裂の際に複製・分配・維持されることなくしだいに希釈されていくと想定される。

私どもは肝実質細胞を標的とした遺伝子治療を達成する目論見で、約20年前に本タイプの遺伝子挿入HBVベクターの開発に挑んだ経緯がある。その後Schallarらを中心として本タイプの遺伝子挿入HBVベクターが作製可能であることが示されている²¹⁾。

2. HBV pseudotype particles (HBVpp)型

このタイプの遺伝子挿入型HBVは、VSV-Gを使った pantropic retrovirus、あるいは lenti-

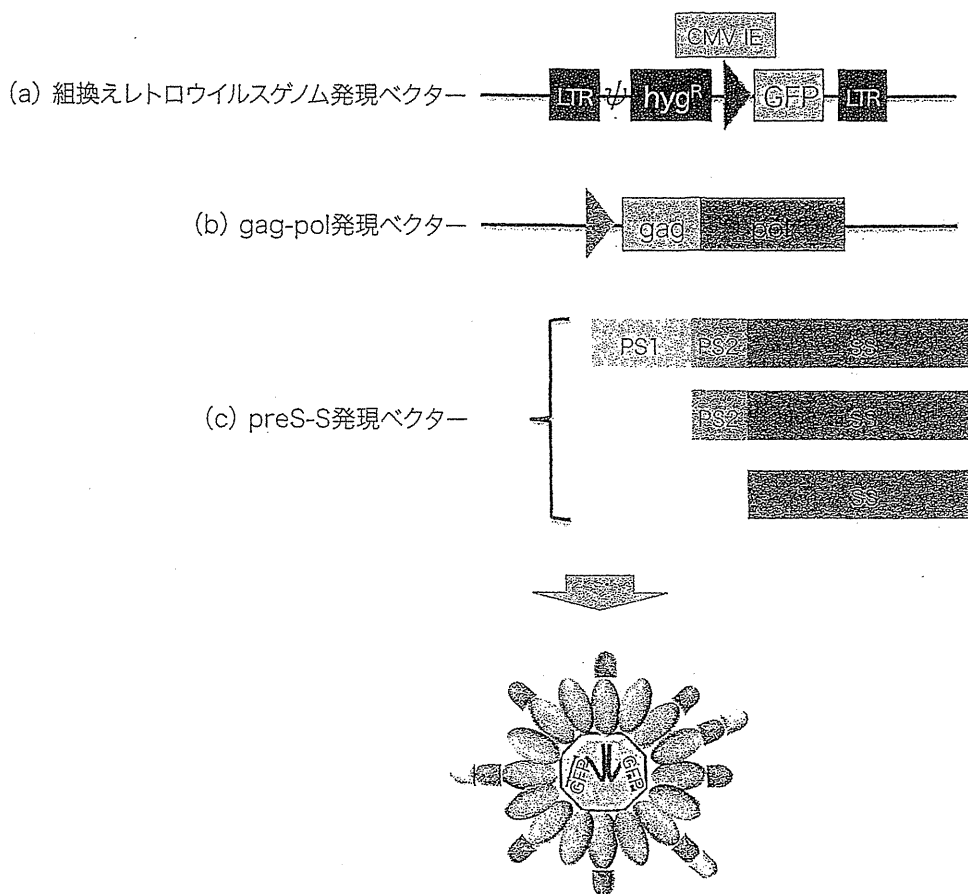


図4 HBVpp型のデザイン

このタイプではレトロウイルスのRNAゲノムを供給する発現ベクター (a), コア粒子と逆転写過程からプロウイルス合成に必要な pol を供給する gag-pol 発現ベクター, HBV 膜粒子を供給する HBV の 3 つの膜蛋白を供給する発現ベクターが必要となる. (b) に HIV 型を用い, (a) に HIV (レンチウイルス) 型のゲノムを供する rev responsive element (RRE) などの必要なエレメントを携えておけば, レンチウイルス型のレトロウイルスベクターとなる. (a) あるいは (b) をあらかじめ安定型培養細胞株として樹立してパッケージング細胞として使用することも可能である. LTR: long terminal repeat. hyg^R : hygromycin resistance gene. CMV IE: cytomegalovirus immediate early enhancer-promoter. GFP: green fluorescent protein. ψ : レトロウイルスパッケージングシグナル. \triangleright : エンハンサー-プロモーター.

virus において VSV-G を HBV 膜蛋白に変えた pseudo-HBV である. HCV でも pseudotype particles (HCVpp) として試みられている²²⁾. HBVpp は付着・侵入は HBV の過程を辿り, それ以降の過程はレトロウイルスの生活環に従う. 最終的には逆転写過程を経て, プロウイルスとして安定的に感染宿主細胞ゲノムに組み込まれるので, 培養細胞など, 継代が基本的に可能な細胞を用いた場合, ウイルス遺伝子として蛍光蛋白遺伝子や薬剤耐性遺伝子

を挿入しておけば, 感染細胞はクローン化できることになる.

問題となるのは, 通常のレトロウイルスベクターを用いた場合, 感染後, プロウイルスを形成し, 安定的な挿入遺伝子の発現まで数日から1週間程度の時間を要する点である. この意味で lentivirus 型のレトロウイルスをベースにした HBVpp が望ましいかもしれない.

私どもの研究室では, 肝実質細胞の cDNA

ライブラリーを培養肝癌細胞へ導入後、HBVppの感染性を指標にしたHBV感染レセプターの分離・同定を試みる戦略で通レトロウイルス型HBVppの構築を独自に試みた。まずレトロウイルスのgag-pol遺伝子を発現する細胞にEGFP (EGFP)とハイグロマイシン耐性遺伝子(HygR)を挿入したレトロウイルスベクターゲノムを組込んだパッケージング細胞を作製し、この細胞に3つのHBV膜蛋白を発現させることで培養上清中にHBV膜蛋白を被ったウイルス粒子が産生されるかどうかを検討した。抗HBs抗体による免疫沈降、ウイルスゲノム抽出、RT-PCRで免疫沈降したサンプルに挿入したEGFP遺伝子が確認された。セシウム密度勾配超遠心法でもHBV粒子密度に近い1.22 g/ml近傍に粒子が集積することや、電顕によっても粒子形成されていることが確認された²³⁾。なお、本HBVppの感染能についていくつかの知見を得ているが本稿では差し控えたい。

8 おわりに

以上、遺伝子挿入HBVベクターについて概説した。HBVベクタータイプもHBVppタイプも作製可能であり、それぞれの利点を活かしたHBV感染レセプターの分離・同定における利用価値は高いと思われる。またこれら2つの遺伝子挿入HBVベクターは感染性を指標にしたアッセイ系を組み立てることにより、HBV感染レセプター分離・同定後の*in vitro*、および*in vivo*におけるHBV生活環や病態解析解明、治療法の開発とその評価系の構築に有用性は極めて高いものと思われる。

文 献

- 1) Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S : A "New" Antigen in Leukemia Sera. JAMA 191 : 541-546, 1965
- 2) Seeger C, Zoulim F, MASON WS : Hepadnaviruses. In "Fields Virology". 5th ed , 2007, pp2977-3029
- 3) Funk A, Mhamdi M, Will H et al : Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism. World J Gastroenterol 13 : 91-103, 2007
- 4) Menne S, Cote PJ : The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol 13 : 104-124, 2007
- 5) Hellström U, Sylvan S : Human serum albumin and the enigma of chronic hepatitis type B. Scand J Immunol 23 : 523-527, 1986
- 6) Li JS, Tong SP, Wands JR : Characterization of a 120-Kilodalton pre-S-binding protein as a candidate duck hepatitis B virus receptor. J Virol 70 : 6029-6035, 1996
- 7) Kuroki K, Cheung R, Marion PL et al : A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles. J Virol 68 : 2091-2096, 1994
- 8) Tsurimoto T, Fujiyama A, Matsubara K : Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA. Proc Natl Acad Sci USA 84 : 444-448, 1987
- 9) Sells MA, Chen ML, Acs G : Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. Proc Natl Acad Sci USA 84 : 1005-1009, 1987
- 10) Bchini R, Capel F, Dauguet C et al : In vitro infection of human hepatoma (HepG2) cells with hepatitis B virus. J Virol 64 : 3025-3032, 1990
- 11) Gripon P, Rumin S, Urban S et al : Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 15655-15660, 2002
- 12) Hantz O, Parent R, Durantel D et al : Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. J Gen Virol 90 : 127-135, 2009
- 13) Marion MJ, Hantz O, Durantel D : The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. Methods Mol Biol 640 : 261-272, 2010
- 14) Schulze A, Mills K, Weiss TS et al : Hepatocyte

- polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus. *Hepatology* 55 : 373-383, 2012
- 15) Neurath AR, Kent SB, Strick N et al : Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 46 : 429-436, 1986
 - 16) Petit MA, Dubanchet S, Capel F et al : HepG2 cell binding activities of different hepatitis B virus isolates: inhibitory effect of anti-HBs and anti-preS1 (21-47) . *Virology* 180 : 483-491, 1991
 - 17) Blanchet M, Sureau C : Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J Virol* 80 : 11935-11945, 2006
 - 18) Glebe D, Urban S : Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 13 : 22-38, 2007
 - 19) Kuroki K, Eng F, Ishikawa T et al : gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family. *J Biol Chem* 270 : 15022-15028, 1995
 - 20) Beck J, Nassal M : Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 13 : 48-64, 2007
 - 21) Protzer U, Nassal M, Chiang PW et al : Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 10818-10823, 1999
 - 22) Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM et al : Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446 : 801-805, 2007
 - 23) Ueda K, Ohsaki E, Omori H : submitted.

*

*

*

Comparison of the Efficacy of Ribavirin Plus Peginterferon Alfa-2b for Chronic Hepatitis C Infection in Patients With and Without Coagulation Disorders

Takashi Honda,¹ Yoshiaki Katano,^{1*} Teiji Kuzuya,¹ Kazuhiko Hayashi,¹ Masatoshi Ishigami,¹ Akihiro Itoh,¹ Yoshiki Hirooka,¹ Isao Nakano,¹ Tetsuya Ishikawa,¹ Hidenori Toyoda,² Takashi Kumada,² Koji Yamamoto,³ Tadashi Matsushita,³ Tetsuhito Kojima,³ Junki Takamatsu,⁴ and Hidemi Goto¹

¹Department of Gastroenterology and Hepatology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

²Department of Gastroenterology, Ogaki Municipal Hospital, Ogaki, Gifu, Japan

³Department of Transfusion Medicine, Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan

⁴Aichi Blood Center Japanese Red Cross, Seto, Japan

Many patients with coagulation disorders are infected with hepatitis C virus (HCV) that advances to end stage liver disease, resulting in an increased number of deaths. The efficacy of ribavirin and peginterferon combination therapy for chronic HCV infection in patients with coagulation disorders has not been clarified fully. The aim of this study was to evaluate the efficacy and tolerability of combination therapy in this patient population compared with patients who are infected with HCV and do not have coagulation disorders. A total of 226 consecutive chronic hepatitis C patients were treated with combination therapy and divided into two groups: patients with ($n = 23$) and without coagulation disorders ($n = 203$). Clinical characteristics, sustained virological response rates obtained by an intention-to-treat analysis, and combination therapy discontinuation rates were compared between the two groups. The sustained virological response rates did not differ significantly between patients with and without coagulation disorders (65.2% vs. 47.8% by intention-to-treat analysis). According to a multivariate analysis, age, alanine aminotransferase, gamma-glutamyltransferase, and HCV genotype were associated significantly with a sustained virological response, whereas whether a patient had a coagulation disorder did not affect the sustained virological response. In conclusion, combination therapy for chronic hepatitis C was comparably effective between patients with and without coagulation disorders and did not result in adverse bleeding. *J. Med. Virol.* 85:228–234, 2013. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: chronic hepatitis C; interferon; ribavirin; coagulation disorders; hemophilia

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection is a widespread viral infection that often leads to chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Until the 1980s, most patients with coagulation disorders became infected with HCV because of the extensive use of untreated factor concentrate. Some of these patients were infected with both hepatitis C and human immunodeficiency virus (HIV) [Brettler et al., 1990; Troisi et al., 1993; Yee et al., 2000; Franchini et al., 2001]. These patients with liver diseases and persistent abnormal transaminase progress to end stage liver disease, resulting in an increased number of liver disease-related deaths. In cases of co-infection with the HIV, the progression of liver disease is more rapid [Sanchez-Quijano et al., 1995; Soto et al., 1997; Benhamou et al., 1999; Ragni and Belle, 2001; De Luca et al., 2002] with a higher mortality rate than

Grant sponsor: Health Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

*Correspondence to: Yoshiaki Katano, Department of Gastroenterology and Hepatology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsuruma-Cho, Showa-Ku, Nagoya 466-8550, Japan E-mail: ykatano@med.nagoya-u.ac.jp

Accepted 10 September 2012

DOI 10.1002/jmv.23444

Published online 14 November 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

during HCV mono-infection [Darby et al., 1997; Yee et al., 2000]. The need for treating infection with HCV in patients with coagulation disorders is increasing worldwide.

Sustained virological responders who are negative for serum HCV RNA 6 months after the end of treatment with interferon (IFN) are likely to remain in virological and biochemical remission with histologic improvement [Marcellin et al., 1997; Shiratori et al., 2000]. In addition, IFN therapy reduces the risk of hepatocellular carcinoma among virological or biochemical responders [Imai et al., 1998; Ikeda et al., 1999; Yoshida et al., 1999]. Ribavirin is now used generally in combination with IFN or pegIFN to treat chronic hepatitis C and combination therapy is more effective than IFN monotherapy [Lai et al., 1996; McHutchison et al., 1998; Poynard et al., 1998; Manns et al., 2001].

Previous studies have investigated the efficacy of IFN monotherapy in patients with coagulation disorders and chronic hepatitis C [Makris et al., 1991], and the efficacy of combination therapy with ribavirin and PegIFN in patients with coagulation disorders [Fried et al., 2002a; Mancuso et al., 2006; Posthouwer et al., 2007]. However, there are no reported comparisons of this combination therapy between patients infected with HCV with and without coagulation disorders. In this study, the efficacy and tolerability of ribavirin plus pegIFN were evaluated retrospectively in patients with coagulation disorders and chronic hepatitis C and the results were compared with the responses of patients infected with HCV but without coagulation disorders.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Methods

A total of 226 consecutive patients with chronic hepatitis C and a high viral load (serum HCV RNA levels greater than 100 kilo-international units [KIU]) were treated with a combination of pegIFN and ribavirin between December 2004 and March 2007 at Nagoya University Hospital and Ogaki Municipal Hospital. These patients included 23 patients with coagulation disorders (17 with hemophilia A, 4 with hemophilia B, and 2 with von Willebrand disease). All patients were under 75 years old, were anti-HCV antibody-positive, and had serum HCV RNA levels greater than 100 KIU/ml by quantitative PCR assay (Amplicor GT-HCV Monitor Version 2.0; Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) within 12 weeks preceding the therapeutic period. Patients were excluded if they had pre-treatment hemoglobin (Hb) levels <10 g/dl, tested positive for serum hepatitis B surface antigen, a history of drug addiction, alcohol abuse, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, a serious psychiatric or medical illness, or were pregnant. To exclude patient bias, only complete cohorts from each hospital were enrolled. HCV genotypes were determined by PCR using genotype-specific primers [Okamoto et al., 1994; Simmonds et al., 1994].

All patients were treated with 1.5 µg/kg of pegIFN α-2b (Peg-Intron[®], MSD, Tokyo, Japan) once weekly for 24 weeks in patients infected with HCV genotype 2 or 3 and for 48 weeks in patients infected with HCV genotype 1 or 4. For the 17 patients infected with HCV genotype 1, the treatment duration was extended to 72 weeks because of higher efficacy compared to that obtained after 48 weeks of treatment, but only in cases in which HCV RNA was positive at 12 weeks and negative at 24 weeks from the start of therapy. Treatment was discontinued when a patient's Hb concentration fell below 8.5 g/dl because of drug-induced hemolytic anemia or when a patient's white blood cell count fell below 1,000/mm³, neutrophil count fell below 500/mm³, or platelet count fell below 50,000/mm³. Some patients discontinued treatment because the virus could not be eradicated after 24 weeks, as determined by the physician. The pegIFN α-2b dose was reduced to 50% of the assigned dose when the white blood cell count was below 1,500/mm³, the neutrophil count below 750/mm³ or the platelet count below 8,000/mm³. Oral ribavirin (Rebetol[®], MSD, Tokyo, Japan) was administered for the same duration as pegIFN at 600 mg/day for patients who weighed 60 kg or less, 800 mg/day for those who weighed more than 60 kg but less than 80 kg, and 1,000 mg/day for those who weighed more than 80 kg during the treatment period. The ribavirin dose was reduced by 200 mg/day when the patient's Hb concentration fell below 10 g/dl because of drug-associated hemolytic anemia. Ribavirin was discontinued when pegIFN therapy was discontinued. Informed consent was obtained from each patient and the study was performed in accordance with the 1975 Declaration of Helsinki.

Liver Histology

Pretreatment liver biopsy specimens were classified based on a fibrosis scale of F0 to F4 (F0, no fibrosis; F1, portal fibrosis without septa; F2, few septa; F3, numerous septa without cirrhosis; and F4, cirrhosis) and in terms of necroinflammatory activity on a scale of A0 to A3 (A0, no histological activity; A1, mild activity; A2, moderate activity; and A3, severe activity) [Bedossa and Poynard, 1996; Fried et al., 2002b]. In patients with coagulation disorders, a liver biopsy was performed using factor concentrate, provided the patients gave informed consent.

Assessment of Efficacy

The virological response was assessed by a qualitative HCV RNA assay with a lower sensitivity limit of 100 copies/ml (Amplicor HCV version 2.0; Roche Molecular Systems). According to the qualitative HCV RNA results, responses were defined as a sustained virological response if no HCV RNA was detected at the end of the 24-week follow-up period after the treatment was completed. A patient was considered to have an end of treatment virological response if no HCV RNA was detected at the end of treatment.

Comparison of Characteristics and Treatment Efficacy Between Patients With and Without Coagulation Disorders

Sex ratio, age, body weight, body mass index (BMI), baseline serum alanine aminotransferase (ALT) levels, gamma-glutamyltransferase (GGT), pretreatment Hb level, platelet counts, HCV genotype and viral load, histologic activity, and fibrosis were compared between patients with and without coagulation disorders. The sustained virological response rates obtained by an intention-to-treat analysis and per-protocol analysis, ribavirin and pegIFN dose reduction rates, and combination therapy discontinuation rates were compared between the two groups. The end of treatment virological response rate was obtained by intention-to-treat and per-protocol analyses and then compared between the two groups. Next, the variable accession method in a multivariate analysis was used to examine factors associated with a sustained virological response after combination therapy, including the following factors: sex, age, BMI, baseline serum ALT, GGT, platelet counts, genotype, HCV RNA concentration, and presence of a coagulation disorder.

Because efficacy differed by the HCV genotype and the patient age, and since all coagulation disorder patients were male, the analysis focused on male, age-matched patients infected with HCV genotype 1. The characteristics and efficacy of treatment were compared in males, and age-matched patients with and without coagulation disorders who were infected with HCV-genotype 1.

Statistical Analysis

Values are expressed as the means \pm SDs. Between-group differences in mean quantitative values were analyzed by Student's *t*-test, and differences in nonparametric data were analyzed by the Mann-Whitney *U*-test. Differences in proportions were examined by the Chi-squared test. Multiple logistic regression analysis was used to identify factors

related to a sustained virological response. All statistical analyses were performed using SAS software (SAS Institute, Cary, NC). All *P* values were two-tailed, and *P* < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Patient Characteristics

The patients included 127 men and 99 women aged 22–74 years (mean \pm SD, 54.7 \pm 11.6). The mean age of patients without coagulation disorders was 56.3 \pm 10.9 years and most patients were in their 50s and 60s. In contrast, the mean age of patients with coagulation disorders was 41.5 \pm 9.8 years with an age distribution ranging from 20 to 50 years. The clinical characteristics of the two study groups are shown in Table I. All patients with coagulation disorders in this study were male because of inherited, sex-linked hemophilia, and two patients in this study had male von Willebrand disease. Patients with coagulation disorders were significantly younger than patients without coagulation disorders (*P* < 0.0001). Although body weight was not different between the two groups, patients with coagulation disorders had a significantly lower BMI than patients without coagulation disorders. Patients without coagulation disorders were infected with HCV genotypes that are not unique to Japan, such as genotypes 1a, 3a, and 4a. Four patients with coagulation disorders were infected with human immunodeficiency virus and one of these patients had achieved a sustained virological response.

Response to Therapy

The ribavirin dose reduction rate tended to be higher in patients without coagulation disorders than in patients with coagulation disorders (*P* = 0.0643). The treatment discontinuation rate did not differ significantly between the two groups. As a result, the sustained virological response rate by an intention-to-treat analysis did not differ significantly between the

TABLE I. Clinical Characteristics of Patients Treated With Combination Therapy

	Total patients (n = 226)	Patients without coagulation disorders (n = 203)	Patients with coagulation disorders (n = 23)	<i>P</i> value
Sex ratio (male/female)	127/99	104/99	23/0	<0.0001
Age (years)	54.7 \pm 11.6	56.3 \pm 10.9	41.5 \pm 9.8	<0.0001
Body weight (kg)	60.2 \pm 11.1	60.5 \pm 11.5	60.5 \pm 8.1	0.9972
Body mass index	22.9 \pm 3.1	23.1 \pm 3.1	21.5 \pm 2.5	0.0226
Baseline serum ALT (IU/L)	63.3 \pm 56.8	60.9 \pm 54.9	84.4 \pm 69.1	0.0598
GGT (IU/L)	54.2 \pm 63.9	51.4 \pm 62.2	78.6 \pm 74.4	0.0526
Hemoglobin (g/dl)	14.1 \pm 1.3	14.1 \pm 1.3	14.4 \pm 1.3	0.2714
Platelets ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	17.8 \pm 5.2	17.7 \pm 5.2	19.0 \pm 5.6	0.2597
Genotype (1a/1b/2a/2b/3a/4a)	7/160/40/15/3/1	0/150/39/14/0/0	7/10/1/1/3/1	<0.0001
HCV RNA (KIU/ml)	1,898.0 \pm 1,448.3	1,923.1 \pm 1,464.5	1,676.6 \pm 1,305.1	0.4404
Activity (A0/A1/A2/A3)	2/108/71/11	2/101/64/11	0/7/7/0	0.3442
Fibrosis (F0/F1/F2/F3)	17/104/49/22	16/97/45/20	1/7/4/2	0.5351

ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyltransferase; HCV RNA, hepatitis C virus RNA; KIU, kilo-international units.

TABLE II. Efficacy of Combination Therapy

	Total patients (n = 226)	Patients without coagulation disorders (n = 203)	Patients with coagulation disorders (n = 23)	P value
SVR rate (intention-to-treat)	49.6 (112/226)	47.8 (97/203)	65.2 (15/23)	0.1130
SVR rate (per-protocol)	54.4 (111/204)	52.7 (97/184)	70.0 (14/20)	0.1405
ETR rate (intention-to-treat)	84.1 (190/226)	84.7 (172/203)	78.3(18/23)	0.4218
ETR rate (per-protocol)	89.1 (179/201)	89.6 (163/182)	84.2 (16/19)	0.4772
Ribavirin dose reduction rate	44.2 (100/226)	46.3 (94/203)	26.1 (6/23)	0.0643
PegIFN dose reduction rate	34.1 (77/226)	33.5 (68/203)	39.1 (9/23)	0.5891
Combination therapy discontinuation rate	9.8 (22/226)	9.4 (19/203)	13.0 (3/23)	0.5722

SVR, sustained virological response; ETR, end of treatment virological response; PegIFN, peginterferon.

two groups. The sustained virological response rate of patients with coagulation disorders by a per-protocol analysis was higher than that of patients without coagulation disorders, but there was no significant difference. In addition, based on both intention-to-treat and per-protocol analyses, the end of treatment virological response rate did not differ significantly between the two groups (Table II).

Factors associated with a sustained virological response in combination therapy were determined by a multivariate analysis. HCV genotype 1 and 4 versus 2 and 3 ($P = 0.001$, odds ratio 4.353 [95% CI, 1.810–10.469]), baseline serum GGT ($P = 0.003$, odds ratio 1.018 [1.006–1.030]), age ($P = 0.006$, odds ratio 1.053 [1.015–1.093]), and baseline serum ALT ($P = 0.014$, odds ratio 0.991 [0.983–0.998]) were associated significantly with a sustained virological response, but whether or not a patient had a coagulation disorder was not associated significantly with a sustained virological response.

Characteristics and Response of Male, Age-Matched Patients Infected With HCV Genotype 1

The clinical characteristics of the two study groups in the male, age-matched patients infected with HCV genotype 1 are shown in Table III. Body weight, BMI, and Hb levels were significantly lower in patients

with coagulation disorders than patients without coagulation disorders ($P = 0.0003$, 0.0027 , and 0.0103 , respectively).

The treatment discontinuation rate of patients with coagulation disorders did not differ between the two groups. The sustained virological response rate by intention-to-treat and per-protocol analyses did not differ significantly between the two groups (Table IV). Factors associated with a sustained virological response in the male, age-matched, genotype 1 patients treated with combination therapy were determined by a multivariate analysis. BMI ($P = 0.036$, odds ratio 1.810 [1.041–3.145]) and baseline serum GGT ($P = 0.037$, odds ratio 0.981 [0.963–0.999]) were associated significantly with a sustained virological response, but whether or not a patient had a coagulation disorder was not associated significantly with a sustained virological response.

Adverse Events

The reasons for discontinuing combination therapy and the times at which the therapy was discontinued are shown in Table V. Once treatment was discontinued, therapy was not restarted even after the initial symptoms or illness disappeared. There were no bleeding episodes in the patients with coagulation disorders, including patients who received a liver biopsy.

TABLE III. Clinical Characteristics of Male, Age-Matched Patients With Genotype 1 Treated With Combination Therapy

	Total patients (n = 36)	Patients without coagulation disorders (n = 18)	Patients with coagulation disorders (n = 18)	P value
Age (years)	42.8 ± 8.0	44.9 ± 5.9	40.7 ± 9.3	0.1136
Body weight (kg)	66.1 ± 11.0	73.4 ± 9.3	60.4 ± 8.7	0.0003
Body mass index	22.7 ± 2.8	24.3 ± 2.3	21.4 ± 2.5	0.0027
Baseline serum ALT (IU/L)	69.8 ± 54.3	63.5 ± 31.7	76.2 ± 70.5	0.4919
GGT (IU/L)	72.7 ± 64.2	74.3 ± 71.1	71.2 ± 58.5	0.8869
Hemoglobin (g/dl)	14.9 ± 1.2	15.4 ± 1.0	14.4 ± 1.2	0.0103
Platelets (×10 ⁴ /μl)	19.3 ± 5.4	18.8 ± 4.5	19.8 ± 5.6	0.5773
HCV RNA (KIU/ml)	2,050.8 ± 1,273.4	2,322.8 ± 1,249.1	1,778.8 ± 1,273.5	0.2044
Activity (A0/A1/A2/A3)	0/12/11/0	0/6/5/0	0/6/6/0	0.6723
Fibrosis (F0/F1/F2/F3)	2/11/8/2	1/5/4/1	1/6/4/1	0.9392

ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyltransferase; HCV RNA, hepatitis C virus RNA; KIU, kilo-international unit.

TABLE IV. Efficacy of Combination Therapy in Male, Age-Matched Patients With Genotype 1

	Total patients (n = 36)	Patients without coagulation disorders (n = 18)	Patients with coagulation disorders (n = 18)	P value
SVR rate (intention-to-treat)	58.3 (21/36)	61.1 (11/18)	55.6 (10/18)	0.7353
SVR rate (per-protocol)	69.0 (20/29)	64.7 (11/17)	75.0 (9/12)	0.5551
ETR rate (intention-to-treat)	77.8 (28/36)	83.3 (15/18)	72.2 (13/18)	0.4227
ETR rate (per-protocol)	93.1 (27/29)	88.2 (15/17)	100.0 (12/12)	0.2182
Ribavirin dose reduction rate	22.2 (28/36)	16.7 (3/18)	27.8 (5/18)	0.7175
PegIFN dose reduction rate	36.1 (13/36)	27.8 (5/18)	44.4 (8/18)	0.2979
Combination therapy discontinuation rate	5.6 (2/36)	0 (0/18)	16.7 (3/18)	0.0704

SVR, sustained virological response; ETR, end of treatment virological response; PegIFN, peginterferon.

DISCUSSION

A previous randomized trial in patients infected with HCV with inherited bleeding disorders showed that the sustained virological response rate improved significantly for patients who were treated with IFN and ribavirin compared to those treated with IFN alone [Fried et al., 2002a]. In addition, both chronic hepatitis C patients with and without coagulation disorders responded similarly to pegIFN and ribavirin combination therapy [Franchini et al., 2006; Posthouwer et al., 2006]. However, the efficacy and tolerability of this combination therapy differed based on the HCV genotype as well as the age, gender, and race of the patients; therefore it is difficult to compare patients with and without coagulation disorders under the same conditions. No report has examined that patients infected chronic hepatitis C with and without coagulation disorders at the same institution and during the same observation period. In addition, there are no reports on the efficacy of combination therapy in patients with chronic hepatitis C with and without coagulation disorders in age-matched patients infected with HCV genotype 1. Therefore, a retrospective

study was conducted to evaluate the efficacy and tolerability of ribavirin plus pegIFN in chronic hepatitis C patients with and without coagulation disorders. In the per-protocol analysis, there were no significant differences, but the sustained virological response rate was higher in patients with coagulation disorders than in patients without coagulation disorders. Mancuso et al. [2006] reported that combination therapy with pegIFN alfa-2b plus ribavirin is highly efficacious in hemophiliacs with chronic hepatitis C. In an overall analysis, patients with coagulation disorders had a lower mean age than patients without coagulation disorders. In addition, the BMI of the patients with coagulation disorders was lower than that of patients without coagulation disorders. A multivariate analysis showed that the HCV genotype, baseline serum GGT, age, and baseline ALT were factors associated significantly with a sustained virological response and whether patients had coagulation disorders was not associated with a sustained virological response. Age, especially younger than 40 years old, was a good predictive factor for a sustained virological response, as was reported previously [Poynard et al., 2000; Fried et al., 2002b].

TABLE V. Reasons for Discontinuing Combination Therapy

Reason	Number	Weeks after starting treatment
Patients with coagulation disorders		
Peritonitis due to appendicitis	1	16
Pneumoniae	1	18
No HCV eradication	3	24, 28, 29
IDDM	1	44
Patients without coagulation disorders		
Fatigue	5	1, 2, 4, 9, 19
Bleeding from duodenal varices	1	8
Dizziness	1	12
Palpitation	1	13
Cholecystitis	1	16
Symptom of Parkinson's disease	1	16
Fundal hemorrhage	1	17
Hepatocellular carcinoma	2	19, 21
Suspicion of Interstitial pneumonia	1	20
Gastric cancer	2	21, 36
Self-discontinuation	1	24
Neutropenia	1	25
Eruption	1	25
No HCV eradication	7	24, 25, 25, 27, 28, 29, 29