

- Ito, M., Masumi, A., Mochida, K., Kuki-hara, H., Moriishi, K., Matsuura, Y., Yamaguchi, K., and Mizuochi, T. (2010). Peripheral B cells may serve as a reservoir for persistent hepatitis C virus infection. *J. Innate Immun.* 2, 607–617.
- Jacobson, I. M., Cacoub, P., Dal Maso, L., Harrison, S. A., and Younossi, Z. M. (2010). Manifestations of chronic hepatitis C virus infection beyond the liver. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 1017–1029.
- Jiang, J., and Luo, G. (2009). Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J. Virol.* 83, 12680–12691.
- Jirasko, V., Montserret, R., Appel, N., Janvier, A., Eustachi, L., Brohm, C., Steinmann, E., Pietschmann, T., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2008). Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J. Biol. Chem.* 283, 28546–28562.
- Jones, C. T., Murray, C. L., Eastman, D. K., Tassello, J., and Rice, C. M. (2007). Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J. Virol.* 81, 8374–8383.
- Kapadia, S. B., and Chisari, F. V. (2005). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2561–2566.
- Kasama, Y., Sekiguchi, S., Saito, M., Tanaka, K., Satoh, M., Kuwahara, K., Sakaguchi, N., Takeya, M., Hiasa, Y., Kohara, M., and Tsukiyama-Kohara, K. (2010). Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. *Blood* 116, 4926–4933.
- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas, M., Lohmann, V., Luban, J., and Bartenschlager, R. (2009). Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog.* 5, e1000546. doi:10.1371/journal.ppat.1000546
- Kawano, M., Kumagai, K., Nishijima, M., and Hanada, K. (2006). Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J. Biol. Chem.* 281, 30279–30288.
- Koch, J. O., Lohmann, V., Herian, U., and Bartenschlager, R. (1996). In vitro studies on the activation of the hepatitis C virus NS3 proteinase by the NS4A cofactor. *Virology* 221, 54–66.
- Kockx, M., Jessup, W., and Kritharides, L. (2010). Cyclosporin A and atherosclerosis – cellular pathways in atherogenesis. *Pharmacol. Ther.* 128, 106–118.
- Koike, K., Tsutsumi, T., Yotsuyanagi, H., and Moriya, K. (2010). Lipid metabolism and liver disease in hepatitis C viral infection. *Oncology* 78(Suppl. 1), 24–30.
- Krieger, N., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2001). Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J. Virol.* 75, 4614–4624.
- Kukihara, H., Moriishi, K., Taguwa, S., Tani, H., Abe, T., Mori, Y., Suzuki, T., Fukuhara, T., Taketomi, A., Machara, Y., and Matsuura, Y. (2009). Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J. Virol.* 83, 7959–7969.
- Kumagai, K., Yasuda, S., Okemoto, K., Nishijima, M., Kobayashi, S., and Hanada, K. (2005). CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides. *J. Biol. Chem.* 280, 6488–6495.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C., Ikeda, M., Ray, S. C., Gale, M. Jr., and Lemon, S. M. (2005a). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2992–2997.
- Li, X. D., Sun, L., Seth, R. B., Pineda, G., and Chen, Z. J. (2005b). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17717–17722.
- Li, Q., Brass, A. L., Ng, A., Hu, Z., Xavier, R. J., Liang, T. J., and Elledge, S. J. (2009). A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16410–16415.
- Li, X., Lonard, D. M., Jung, S. Y., Malovannaya, A., Feng, Q., Qin, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (2006). The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGgamma proteasome. *Cell* 124, 381–392.
- Lim, Y. S., and Hwang, S. B. (2011). Hepatitis C virus NS5A protein interacts with phosphatidylinositol 4-kinase type IIalpha and regulates viral propagation. *J. Biol. Chem.* 286, 11290–11298.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., Mckeating, J. A., and Rice, C. M. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309, 623–626.
- Lindenbach, B. D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A. J., Mckeating, J. A., Lanford, R. E., Feinstone, S. M., Major, M. E., Leroux-Roels, G., and Rice, C. M. (2006). Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3805–3809.
- Liu, J., Farmer, J. D. Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807–815.
- Loewen, C. J., Roy, A., and Levine, T. P. (2003). A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J.* 22, 2025–2035.
- Lohmann, V., Korner, F., Dobierzewska, A., and Bartenschlager, R. (2001). Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J. Virol.* 75, 1437–1449.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285, 110–113.
- Loo, Y. M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., Akira, S., Gill, M. A., Garcia-Sastre, A., Katze, M. G., and Gale, M. Jr. (2008). Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J. Virol.* 82, 335–345.
- Loo, Y. M., Owen, D. M., Li, K., Erickson, A. K., Johnson, C. L., Fish, P. M., Carney, D. S., Wang, T., Ishida, H., Yoneyama, M., Fujita, T., Saito, T., Lee, W. M., Hagedorn, C. H., Lau, D. T., Weinman, S. A., Lemon, S. M., and Gale, M. Jr. (2006). Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6001–6006.
- Lorenz, I. C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T. G., and Rice, C. M. (2006). Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* 442, 831–835.
- Ma, S., Boerner, J. E., Tongyip, C., Weidmann, B., Ryder, N. S., Cooreman, M. P., and Lin, K. (2006). NIM811, a cyclophilin inhibitor, exhibits potent in vitro activity against hepatitis C virus alone or in combination with alpha interferon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2976–2982.
- Maga, G., Gemma, S., Fattorusso, C., Locatelli, G. A., Butini, S., Persico, M., Kukreja, G., Romano, M. P., Chiasserini, L., Savini, L., Novellino, E., Nacci, V., Spadari, S., and Campiani, G. (2005). Specific targeting of hepatitis C virus NS3 RNA helicase. Discovery of the potent and selective competitive nucleotide-mimicking inhibitor QU663. *Biochemistry* 44, 9637–9644.
- Mannova, P., Fang, R., Wang, H., Deng, B., McIntosh, M. W., Hanash, S. M., and Beretta, L. (2006). Modification of host lipid raft proteome upon hepatitis C virus replication. *Mol. Cell Proteomics* 5, 2319–2325.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T. (2008). Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J. Virol.* 82, 7964–7976.
- Matto, M., Rice, C. M., Aroci, B., and Glenn, J. S. (2004). Hepatitis C virus core protein associates with detergent-resistant membranes distinct from classical plasma membrane rafts. *J. Virol.* 78, 12047–12053.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G., and Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J.* 21, 3980–3988.
- Meertens, L., Bertaux, C., and Dragic, T. (2006). Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J. Virol.* 80, 11571–11578.
- Merz, A., Long, G., Hiet, M. S., Brugger, B., Chlanda, P., Andre, P., Wieland, E., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2011). Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J. Biol. Chem.* 286, 3018–30132.
- Miyazawa, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* 9, 1089–1097.
- Miyoshi, H., Moriya, K., Tsutsumi, T., Shinzawa, S., Fujie, H., Shintani, Y., Fujinaga, H., Goto, K., Todoroki, T., Suzuki, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., Yotsuyanagi, H., and

- Koike, K. (2011). Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polynsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J. Hepatol.* 54, 432–438.
- Monazahian, M., Bohme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S., and Thomssen, R. (1999). Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J. Med. Virol.* 57, 223–229.
- Moriishi, K., Mochizuki, R., Moriya, K., Miyamoto, H., Mori, Y., Abe, T., Murata, S., Tanaka, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Koike, K., and Matsuura, Y. (2007). Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 1661–1666.
- Moriishi, K., Okabayashi, T., Nakai, K., Moriya, K., Koike, K., Murata, S., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. (2003). Proteasome activator PA28gamma-dependent nuclear retention and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 77, 10237–10249.
- Moriishi, K., Shoji, I., Mori, Y., Suzuki, R., Suzuki, T., Kataoka, C., and Matsuura, Y. (2010). Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology* 52, 411–420.
- Moriya, K., Nakagawa, K., Santa, T., Shintani, Y., Fujie, H., Miyoshi, H., Tsutsumi, T., Miyazawa, T., Ishibashi, K., Horie, T., Imai, K., Todoroki, T., Kimura, S., and Koike, K. (2001). Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 61, 4365–4670.
- Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Koike, K. (1997). Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 7), 1527–1531.
- Najda-Bernatowicz, A., Krawczyk, M., Stankiewicz-Drogon, A., Bretner, M., and Boguszewska-Chachulska, A. M. (2010). Studies on the anti-hepatitis C virus activity of newly synthesized tropolone derivatives: identification of NS3 helicase inhibitors that specifically inhibit subgenomic HCV replication. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 5129–5136.
- Nielsen, S. U., Bassendine, M. F., Burt, A. D., Martin, C., Pumeecchockchai, W., and Toms, G. L. (2006). Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J. Virol.* 80, 2418–2428.
- Nishimura, Y., Hayashi, M., Inada, H., and Tanaka, T. (1999). Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane protein-associated (VAMP-associated) proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 21–26.
- Nunez, O., Fernandez-Martinez, A., Majano, P. L., Apolinario, A., Gomez-Gonzalo, M., Benedicto, I., Lopez-Cabrera, M., Bosca, L., Clemente, G., Garcia-Monzon, C., and Martin-Sanz, P. (2004). Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut* 53, 1665–1672.
- Ogino, T., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Kohara, M., and Nomoto, A. (2004). Membrane binding properties and terminal residues of the mature hepatitis C virus capsid protein in insect cells. *J. Virol.* 78, 11766–11777.
- Ohata, K., Hamasaki, K., Toriyama, K., Matsumoto, K., Saeki, A., Yanagi, K., Abiru, S., Nakagawa, Y., Shigeno, M., Miyazoe, S., Ichikawa, T., Ishikawa, H., Nakao, K., and Eguchi, K. (2003). Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer* 97, 3036–3043.
- Okamoto, K., Mori, Y., Komoda, Y., Okamoto, T., Okochi, M., Takeda, M., Suzuki, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2008). Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 82, 8349–8361.
- Okamoto, K., Moriishi, K., Miyamura, T., and Matsuura, Y. (2004). Intramembrane proteolysis and endoplasmic reticulum retention of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 78, 6370–6380.
- Okamoto, T., Nishimura, Y., Ichimura, T., Suzuki, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2006). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBPs and Hsp90. *EMBO J.* 25, 5015–5025.
- Okuda, M., Li, K., Beard, M. R., Showalter, L. A., Scholle, F., Lemon, S. M., and Weinman, S. A. (2002). Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122, 366–375.
- Oomens, A. G., Bevis, K. P., and Wertz, G. W. (2006). The cytoplasmic tail of the human respiratory syncytial virus F protein plays critical roles in cellular localization of the F protein and infectious progeny production. *J. Virol.* 80, 10465–10477.
- Peretti, D., Dahan, N., Shimoni, E., Hirschberg, K., and Lev, S. (2008). Coordinated lipid transfer between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex requires the VAP proteins and is essential for Golgi-mediated transport. *Mol. Biol. Cell* 19, 3871–3884.
- Perlemuter, G., Sabile, A., Letteron, P., Vona, G., Topilco, A., Chretien, Y., Koike, K., Pessayre, D., Chapman, J., Barba, G., and Brechot, C. (2002). Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J.* 16, 185–194.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsouidakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F. L., and Bartenschlager, R. (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7408–7413.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D., and Bartenschlager, R. (2002). Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J. Virol.* 76, 4008–4021.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., and Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282, 938–941.
- Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., De Jong, Y. P., and Rice, C. M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457, 882–886.
- Popescu, C. I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Heliot, L., Rouille, Y., and Dubuisson, J. (2011). NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog.* 7, e1001278. doi:10.1371/journal.ppat.1001278
- Pumeecchockchai, W., Bevitt, D., Agarwal, K., Petropoulou, T., Langer, B. C., Belohradsky, B., Bassendine, M. F., and Toms, G. L. (2002). Hepatitis C virus particles of different density in the blood of chronically infected immunocompetent and immunodeficient patients: implications for virus clearance by antibody. *J. Med. Virol.* 68, 335–342.
- Rahfeld, J. U., Schlierhorn, A., Mann, K., and Fischer, G. (1994). A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 343, 65–69.
- Randall, G., Panis, M., Cooper, J. D., Tellinghuisen, T. L., Sukhodolets, K. E., Pfeffer, S., Landthaler, M., Landgraf, P., Kan, S., Lindenbach, B. D., Chien, M., Weir, D. B., Russo, J. J., Ju, J., Brownstein, M. J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M., Tuschl, T., and Rice, C. M. (2007). Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 12884–12889.
- Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M. S., Longereich, T., Diehl, S., Ramirez, E., Balla, T., Rohr, K., Kaul, A., Buhler, S., Pepperkok, R., Lengauer, T., Albrecht, M., Eils, R., Schirmacher, P., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2011). Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* 9, 32–45.
- Ridgway, N. D., Dawson, P. A., Ho, Y. K., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1992). Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding. *J. Cell Biol.* 116, 307–319.
- Rubbia-Brandt, L., Quadri, R., Abid, K., Giostra, E., Male, P. J., Mentha, G., Spahr, L., Zarski, J. P., Borisch, B., Hadengue, A., and Negro, F. (2000). Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J. Hepatol.* 33, 106–115.
- Sainz, B. Jr., Barretto, N., Martin, D. N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K. A., Yu, X., Chayama, K., Alrefai, W. A., and Uprichard, S. L. (2012). Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat. Med.* doi:10.1038/nm.2581
- Sakamoto, H., Okamoto, K., Aoki, M., Kato, H., Katsume, A., Ohta, A., Tsukuda, T., Shimma, N., Aoki, Y., Arisawa, M., Kohara, M., and Sudoh, M. (2005). Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis

- C virus therapy. *Nat. Chem. Biol.* 1, 333–337.
- Santolini, E., Migliaccio, G., and La Monica, N. (1994). Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 68, 3631–3641.
- Santolini, E., Pacini, L., Fipaldini, C., Migliaccio, G., and Monica, N. (1995). The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J. Virol.* 69, 7461–7471.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Aiali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 21, 5017–5025.
- Schiene-Fischer, C., Habazettl, J., Schmid, F. X., and Fischer, G. (2002). The hsp70 chaperone DnaK is a secondary amide peptide bond cis-trans isomerase. *Nat. Struct. Biol.* 9, 419–424.
- Shavinskaya, A., Boulant, S., Penin, F., Mclauchlan, J., and Bartenschlager, R. (2007). The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J. Biol. Chem.* 282, 37158–37169.
- Shi, S. T., Lee, K. J., Aizaki, H., Hwang, S. B., and Lai, M. M. (2003). Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *J. Virol.* 77, 4160–4168.
- Siekierka, J. J., Hung, S. H., Poe, M., Lin, C. S., and Sigal, N. H. (1989a). A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 341, 755–757.
- Siekierka, J. J., Staruch, M. J., Hung, S. H., and Sigal, N. H. (1989b). FK-506, a potent novel immunosuppressive agent, binds to a cytosolic protein which is distinct from the cyclosporin A-binding protein, cyclophilin. *J. Immunol.* 143, 1580–1583.
- Skehel, P. A., Martin, K. C., Kandel, E. R., and Bartsch, D. (1995). A VAMP-binding protein from *Aplysia* required for neurotransmitter release. *Science* 269, 1580–1583.
- Soriano, V., Peters, M. G., and Zeuzem, S. (2009). New therapies for hepatitis C virus infection. *Clin. Infect. Dis.* 48, 313–320.
- Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Stedman, K., Kocher, H. P., Keller, R., Hiestad, P. C., and Movva, N. R. (1991). A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *J. Biol. Chem.* 266, 10735–10738.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A. H., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2007). Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog.* 3, e103. doi:10.1371/journal.ppat.0030103
- Sumpter, R. Jr., Loo, Y. M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M., and Gale, M. Jr. (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J. Virol.* 79, 2689–2699.
- Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Shoji, I., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., and Suzuki, T. (2009). Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: a ubiquitin-dependent mechanism and a ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent mechanism. *J. Virol.* 83, 2389–2392.
- Tai, A. W., Benita, Y., Peng, L. F., Kim, S. S., Sakamoto, N., Xavier, R. J., and Chung, R. T. (2009). A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* 5, 298–307.
- Tai, A. W., and Salloum, S. (2011). The role of the phosphatidylinositol 4-kinase PI4KA in hepatitis C virus-induced host membrane rearrangement. *PLoS ONE* 6, e26300. doi:10.1371/journal.pone.0026300
- Takikawa, S., Ishii, K., Aizaki, H., Suzuki, T., Asakura, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. (2000). Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.* 74, 5066–5074.
- Targett-Adams, P., Hope, G., Boulant, S., and Mclauchlan, J. (2008). Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *J. Biol. Chem.* 283, 16850–16859.
- Thomssen, R., Bonk, S., Propf, C., Heermann, K. H., Kochel, H. G., and Uy, A. (1992). Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med. Microbiol. Immunol.* 181, 293–300.
- Thomssen, R., Bonk, S., and Thiele, A. (1993). Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med. Microbiol. Immunol.* 182, 329–334.
- Tory, R., Sachs-Barrable, K., Hill, J. S., and Wasan, K. M. (2008). Cyclosporine A and rapamycin induce in vitro cholesteryl ester transfer protein activity, and suppress lipoprotein lipase activity in human plasma. *Int. J. Pharm.* 358, 219–223.
- Tripathi, L. P., Kataoka, C., Taguwa, S., Moriishi, K., Mori, Y., Matsuura, Y., and Mizuguchi, K. (2010). Network based analysis of hepatitis C virus core and NS4B protein interactions. *Mol. Biosyst.* 6, 2539–2553.
- Trotard, M., Lepere-Douard, C., Regeard, M., Piquet-Pellorce, C., Lavillette, D., Cosset, F. L., Gripon, P., and Le Seyec, J. (2009). Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening. *FASEB J.* 23, 3780–3789.
- Tscherne, D. M., Jones, C. T., Evans, M. J., Lindenbach, B. D., McKeating, J. A., and Rice, C. M. (2006). Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J. Virol.* 80, 1734–1741.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., and Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 66, 1476–1483.
- Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. (2002). Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 35, 937–946.
- Tu, H., Gao, L., Shi, S. T., Taylor, D. R., Yang, T., Mircheff, A. K., Wen, Y., Gorbalenya, A. E., Hwang, S. B., and Lai, M. M. (1999). Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* 263, 30–41.
- Vaillancourt, E. H., Pilote, L., Cartier, M., Lippens, J., Liuzzi, M., Bethell, R. C., Cordingley, M. G., and Kukulj, G. (2009). Identification of a lipid kinase as a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* 387, 5–10.
- Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A. H., and Dubuisson, J. (2010). Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J. Virol.* 84, 10159–10168.
- Voisset, C., Lavie, M., Helle, F., Op De Beeck, A., Billiau, A., Bertrand-Michel, J., Terce, F., Cocquerel, L., Wychowski, C., Vu-Dac, N., and Dubuisson, J. (2008). Ceramide enrichment of the plasma membrane induces CD81 internalization and inhibits hepatitis C virus entry. *Cell. Microbiol.* 10, 606–617.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., and Liang, T. J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11, 791–796.
- Wang, C., Gale, M. Jr., Keller, B. C., Huang, H., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Ye, J. (2005a). Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol. Cell* 18, 425–434.
- Wang, P. Y., Weng, J., and Anderson, R. G. (2005b). OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK 1/2 activation. *Science* 307, 1472–1476.
- Watahshi, K., Hijikata, M., Hosaka, M., Yamaji, M., and Shimotohno, K. (2003). Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 38, 1282–1288.
- Watahshi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyazaki, Y., and Shimotohno, K. (2005). Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol. Cell* 19, 111–122.
- Wolins, N. E., Brasasmele, D. L., and Bickel, P. E. (2006). A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett.* 580, 5484–5491.
- Wolk, B., Sansonno, D., Krausslich, H. G., Damasco, F., Rice, C. M., Blum, H. E., and Moradpour, D. (2000). Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J. Virol.* 74, 2295–2304.
- Wozniak, A. L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S. M., and Weinman, S. A. (2010). Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog.* 6, e1001087. doi:10.1371/journal.ppat.1001087
- Yamaga, A. K., and Ou, J. H. (2002). Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *J. Biol. Chem.* 277, 33228–33234.
- Yang, F., Robotham, J. M., Nelson, H. B., Irsigler, A., Kenworthy, R., and Tang, H. (2008). Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. *J. Virol.* 82, 5269–5278.

Ye, J., Wang, C., Sumpter, R. Jr., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Gale, M. Jr. (2003). Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 15865–15870.

Zhang, Z., and Zhang, R. (2008). Proteasome activator PA28 gamma regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation. *EMBO J.* 27, 852–864.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T., and Chisari, F. V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 9294–9299.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that

could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 01 December 2011; accepted: 31 January 2012; published online: 14 February 2012.

Citation: Moriishi K and Matsuura Y (2012) Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbio.* 3:54. doi: 10.3389/fmicb.2012.00054

This article was submitted to *Frontiers in Virology*, a specialty of *Frontiers in Microbiology*.

Copyright © 2012 Moriishi and Matsuura. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited.

Upregulation of nuclear PA28 γ expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma

MOTOI KONDO¹, KOHJI MORIISHI², HIROSHI WADA³, TAKEHIRO NODA³, SHIGERU MARUBASHI³, KENICHI WAKASA⁴, YOSHIHARU MATSUURA², YUICHIRO DOKI³, MASAKI MORI³ and HIROAKI NAGANO³

¹Evidence Based Medical Research Center, Osaka; ²Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka; ³Department of Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka; ⁴Department of Diagnostic Pathology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka, Japan

Received September 16, 2011; Accepted December 2, 2011

DOI: 10.3892/etm.2011.415

Abstract. We previously reported that proteasome activator 28 γ (PA28 γ) is an oncogenic protein in hepatitis C virus (HCV) core protein transgenic mice. The aim of this study was to determine the role of PA28 γ expression at the protein level in the development and progression of human hepatocarcinogenesis and hepatocellular carcinoma (HCC). Samples from tissues representing a wide spectrum of liver disease were analyzed, including histologically normal livers (n=5), HCV-related chronic hepatitis (CH) (n=15) and cirrhosis (n=31). The level of nuclear PA28 γ increased with the progression of liver disease from CH to cirrhosis. The majority of cirrhotic livers (68%; 21/31) displayed high nuclear PA28 γ expression. However, in half of the HCCs (50%; 18/36), little or no nuclear PA28 γ expression was observed, while the remaining 50% (18/36) of the cases displayed high levels of nuclear PA28 γ expression. A clinicopathological survey demonstrated a significant correlation between nuclear PA28 γ expression and capsular invasion in HCC (P=0.026); a striking difference was found between nuclear PA28 γ expression in non-tumor tissues and shorter disease-free survival (P<0.01). Moreover, nuclear PA28 γ expression in non-tumor tissues correlated with the expression of molecules related to the genesis of hepatic steatosis and HCC, such as sterol regulatory element binding protein-1c mRNA. The findings suggest the involvement of nuclear

PA28 γ expression in the progression and relapse of HCC, and suggest that nuclear PA28 γ is a potentially suitable target for the prevention and/or treatment of HCC.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancies worldwide, accounting for approximately 6% of all human carcinomas and 1 million deaths annually, with an estimated number of new cases of over 500,000/year (1). Clinical and experimental evidence suggests a link between infection with hepatitis C virus (HCV) and/or hepatitis B virus (HBV), chronic hepatitis (CH) and cirrhosis, as well as the progression of HCC. Liver cirrhosis is observed in up to 90% of patients with HCC, and HCV is the causative factor in 80% and HBV in 10% of cases in Japan (2-5). In the United States, almost 4 million individuals are infected with HCV each year which progresses to chronic hepatitis C, which could potentially progress to liver cirrhosis. The results are often liver failure or HCC. Chronic hepatitis C is the nation's leading cause of HCC, and according to the American Liver Foundation, is also the leading reason for liver transplantation. In Japan, HCV and/or HBV-based hepatitis and cirrhosis are also serious problems since they progress to HCC at a ratio of 5 to 7% per year (4,5). These findings strongly suggest the existence of a link between hepatocarcinogenesis and HCV/HBV infection and chronic liver inflammation.

Various therapies are currently in use for HCC. These include surgical resection, percutaneous ethanol injection (PEI), systemic or arterial chemotherapy using either single or combination drugs, transcatheter arterial chemoembolization (TACE), hormonal therapy and selective radiotherapy. However, the prognosis of patients with HCC remains poor, as they often develop intrahepatic and/or multicentric tumor recurrence, at a rate of 20-40% within 1 year, and ~80% within 5 years of therapy even when curative treatment is applied (6-9). Liver transplantation offers the best prognosis for patients with small HCC, although its use is limited due to the scarcity of donor organs. Therefore, an effective therapeutic strategy against HCC is required.

Correspondence to: Dr Hiroaki Nagano, Department of Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka E-2, Suita, Osaka 565-0871, Japan
E-mail: hnagano@gesurg.med.osaka-u.ac.jp

Abbreviations: CH, chronic hepatitis; HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; PA, proteasome activator; PBGD, porphobilinogen deaminase; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction

Key words: proteasome activator 28 γ , hepatocellular carcinoma, cirrhosis, western blotting, immunohistochemistry

In a previous study, we reported that proteasome activator 28 γ (PA28 γ) directly enhances the degradation of the HCV core protein and plays a key role in the genesis of hepatic steatosis and HCC in HCV core protein transgenic mice (10). Furthermore, the above events were not observed in PA28 γ -knockout mice. The present study is an extension of our previous study and was designed to assess the utility of PA28 γ expression as a biological marker for HCV-related human liver disease and HCC. The findings showed the presence of high levels of nuclear PA28 γ in multistep hepatocarcinogenesis and HCC invasion, suggesting that selective inhibitors of nuclear PA28 γ may be useful in the prevention and/or treatment of this disease.

Materials and methods

Tissue samples. The study protocol was approved by the Human Ethics Review Committee of Osaka University, and a signed consent form was obtained from each subject for the use of tissue samples for medical research. Tissue samples were obtained from 51 patients with liver tumors, who underwent hepatectomy at the Department of Gastroenterological Surgery, Osaka University Hospital. All patients had HCV infection (28 patients) and some had HCV plus HBV infection (18 patients), but none had only HBV infection. The mean post-treatment follow-up period was 6.2 ± 2.5 years \pm standard deviation (SD). The excised hepatic tissue samples were examined immunohistochemically for PA28 γ expression, including 46 paired HCCs. Non-tumor tissues were also examined, which comprised 15 CH-based livers (5 chronic active hepatitis and 10 chronic inactive hepatitis) and 31 cirrhotic livers. Prior to hepatectomy for HCC, 10 patients were treated with transarterial embolization (TAE). In these cases, histopathological examination showed complete hepatic necrosis. Histologically normal livers were also obtained from patients negative for hepatic viral infections who had liver metastasis secondary to colorectal cancer.

For immunohistochemistry, the tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, processed through graded ethanol and embedded in paraffin. The samples were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C for subsequent analysis by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Histopathological examination. Tissue sections (4 μm thick) were deparaffinized in xylene, rehydrated and stained with hematoxylin and eosin solution. Separation of the tissues into non-tumor and tumor tissues was determined by a pathologist (K.W.) who was blinded to the clinical background. For non-tumor tissues, the presence of inflammation or cirrhotic nodules was examined. Tumor tissues were examined for the following characteristics: cell differentiation (well, moderate, poorly differentiated), number of tumors, capsular formation, septal formation, capsular invasion, portal vein tumor thrombus formation and hepatic vein invasion.

Preparation of anti-human PA28 γ antibody. Chicken anti-human PA28 γ antibody was prepared by immunization using the synthetic peptides of residues from 75 to 88, SHDGLDGPTYKKRR, of human PA28 γ . The antibody was

purified by affinity chromatography using beads conjugated with the antigen peptide.

Immunohistochemistry and evaluation of PA28 γ immunostaining. Formalin-fixed tissues were embedded in paraffin according to the standard procedures. For immunohistochemistry, formalin-fixed tissue sections were boiled in Target Retrieval Solution (Dako, Glostrup, Denmark) and then treated with 3% H_2O_2 . The activated sections were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), blocked with PBS containing 5% bovine serum albumin, and incubated overnight with the purified chicken antibody to PA28 γ , followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-chicken IgG antibody (ICN, Biomedicals, Inc., Aurora, OH, USA) as a secondary antibody. Immunoreactive antigen was visualized with 3,3'-diaminobenzidine substrate. The resulting sections were counterstained with hematoxylin. Staining of endogenous PA28 γ with the antibody was identified in normal mouse liver sections but not in the liver sections from PA28 γ -deficient mice. Pre-immune purified antibody did not react with any other antigen in these sections under the experimental conditions.

For evaluation of PA28 γ immunostaining, each section was scored for nuclear and cytoplasmic staining using a scale from 0 to 2 where 0 represented negative or faint staining, 1 represented moderate staining, and 2 represented strong staining. In general, the nuclei of the bile ducts faintly expressed PA28 γ (Fig. 1a). Thus, the staining level was used as a nuclear inner control within the sample, which was designated arbitrarily as intensity level 0. Also, slightly higher expression was designated arbitrarily as intensity level 1 and clearly higher expression was designated arbitrarily as intensity level 2. PA28 γ expression was very faint or undetectable in the vascular epithelia and nuclei (Fig. 1a), whereas the cytoplasm of bile duct epithelial cells and nuclei devoid of significant inflammation generally expressed faint levels of PA28 γ (Fig. 1a). For semi-quantitative analysis, the latter level of staining was used as a cytoplasmic inner control within the sample, and designated arbitrarily as intensity level 0. Furthermore, a slightly higher expression was designated arbitrarily as intensity level 1 whereas clearly higher expression was designated arbitrarily as intensity level 2. PA28 γ expression was generally heterogeneous in each sample. For assessment of nuclear and cytoplasmic PA28 γ , 4 high-power fields in each specimen were selected at random, and staining was examined under high power magnification. More than 1,000 cells were counted to determine the labeling index, which represented the percentage of immunostained cells relative to the total number of cells. The tissue samples were also categorized as positive (levels 1 and 2) and negative (level 0) for evaluation of the relationship between immunostaining and various clinicopathological factors.

Semi-quantitative RT-PCR. RNA extraction was carried out with TRIzol reagent using the single-step method, and the cDNA was generated with avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA), as described previously (11). Sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) mRNA expression was analyzed semi-quantitatively using the multiplex RT-PCR method. In this assay, the

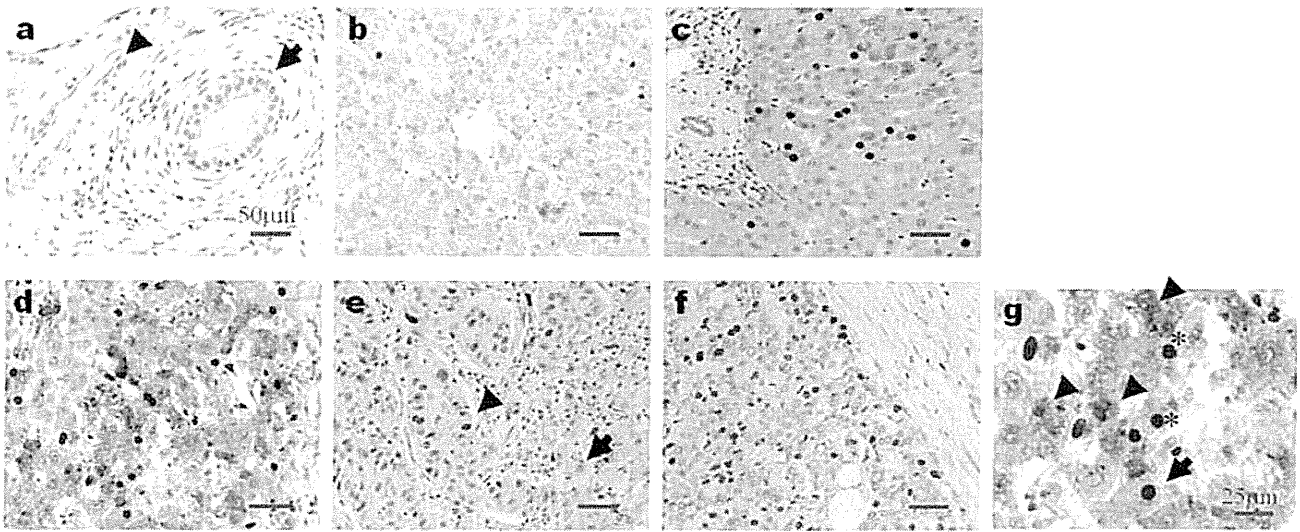


Figure 1. Immunohistochemical staining for PA28 γ . (a-f) Representative samples for bile duct (inner control), vascular epithelium and various liver pathologies: (a) bile duct (arrow), vascular epithelium (arrowhead); (b) normal liver; (c) chronic hepatitis; (d) cirrhotic liver; (e) HCC with high nuclear PA28 γ expression (arrowhead; left side) and non-tumor liver tissue with low nuclear PA28 γ expression (arrow; right side); (f) HCC with low expression of nuclear PA28 γ . Magnification, $\times 200$. (g) High-power view of liver section shown in (d). Note the faint staining of hepatocytes with high expression of nuclear PA28 γ (arrow; hepatocytes, level 0 and nucleus, level 2), moderate staining of hepatocytes with high expression of nuclear PA28 γ (asterisk; hepatocyte, level 1 and nucleus, level 2) and strong staining of hepatocytes with low expression of nuclear PA28 γ (arrowhead; hepatocyte, level 2 and nucleus, level 0). Magnification, $\times 400$. No staining was observed when the primary antibody was substituted by non-immunized rabbit IgG or TBS (data not shown). PA28 γ , proteasome activator 28 γ ; HCC, hepatocellular carcinoma; IgG, immunoglobulin G; TBS, Tris-buffered saline.

housekeeping gene, porphobilinogen deaminase (PBGD), was used as the internal control. This gene is favored over β -actin or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a reference gene for competitive PCR amplification as the presence of pseudogenes for the latter housekeeping genes may produce false-positive signals from genomic DNA contamination (12,13). In addition, in order to minimize possible inter-PCR differences, PCR was performed with SREBP-1c and PBGD primers in an identical tube, under unsaturated conditions. PCR was performed in a 25- μ l reaction mixture containing 1 μ l of the cDNA template, 1X Perkin-Elmer PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.8 mM deoxynucleotide triphosphates, 0.8 μ M of each primer for SREBP-1c and 80 nM PBGD, and 1 unit of TaqDNA polymerase (AmpliTaQ Gold; Roche Molecular Systems, Inc.). The PCR primers used for the detection of SREBP-1c and PBGD cDNAs were synthesized as described previously (14,15). The conditions for multiplex PCR were one cycle of denaturation at 95°C for 12 min, followed by 40 cycles at 95°C for 1 min, 62°C for 1 min and 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. The electrophoresed PCR products were scanned by densitometry, and the relative value of the SREBP-1c band relative to that of PBGD was calculated for each sample.

Statistical analysis. Data were expressed as the means \pm SD. The Chi-square test and Fisher's exact probability test, or the log-rank test, were used to examine the association between PA28 γ expression and the clinicopathological parameters or prognosis. A P-value of <0.05 was considered to indicate a statistically significant difference. Statistical analysis was performed using the StatView-J-5.0 program (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Results

Immunohistochemical analysis of PA28 γ . Immunohistochemical assays were performed on a series of 46 paired HCCs and their matched non-tumor tissues, and 5 normal livers. The labeling index of nuclear PA28 γ showed a wide spectrum and increased from low in the normal livers to strong in the cirrhotic livers (Fig. 1b-d). Specifically, the nuclear PA28 γ labeling index was generally low in the normal liver tissues, but was moderate-strong in HCV-related liver tissues. The nuclear labeling index was markedly higher in the majority of cirrhotic liver tissues. Fig. 2 summarizes the above results and the analysis of cytoplasmic expression of PA28 γ . The difference in the PA28 γ -nuclear labeling index between normal and cirrhotic livers was significant ($P<0.0001$) as was that between CH and cirrhosis ($P<0.0001$) (Fig. 2A). Also, the difference in the proportion of the PA28 γ -cytoplasmic expression labeling index between normal and cirrhotic livers was significant ($P<0.05$) (Fig. 2B). The mean labeling indexes of nuclear PA28 γ expression was 42% in both HCC and HCV-related livers.

To evaluate the relationship between immunohistochemical staining and various clinicopathological factors, we divided the samples into nuclear PA28 γ high index ($\geq 42\%$) and low index ($<42\%$) groups. The labeling index was low in half of the examined HCC cases (50%; 18/36) and markedly high in the other half (50%; 18/36) (Table I). The labeling index was low in 30% (14/46) of HCV-related cases and markedly higher in the remaining 70% (32/46) (Table II). The samples were also divided into 2 groups according to the labeling index of cytoplasmic staining. The mean PA28 γ -labeling index of the HCC and HCV-related cases was 58 and 80%, respectively. The labeling index was low in 47% (17/36) and high in 53% (19/36)

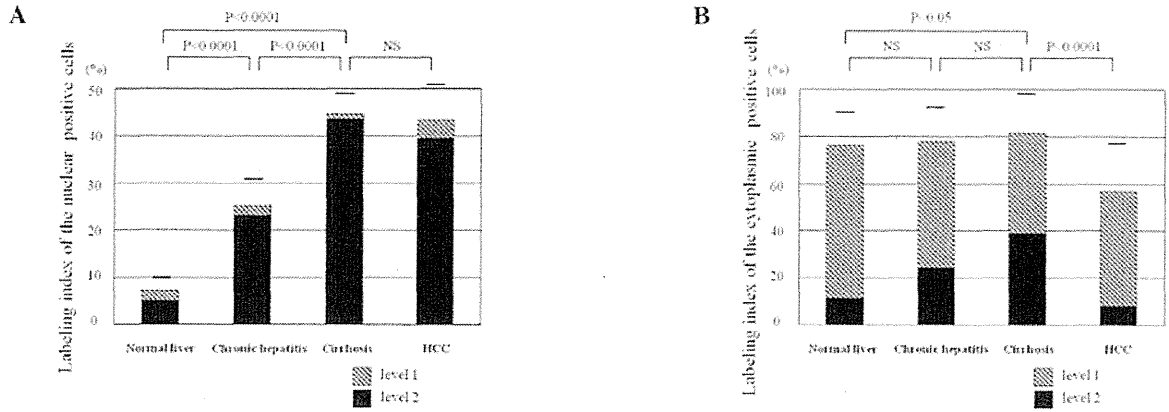


Figure 2. (A) Nuclear PA28 γ expression in multistep hepatocarcinogenesis. The labeling index increased in a stepwise manner with the severity of liver damage and carcinogenesis. Quantitative analysis showed that 25, 10 and 1% of cells of the normal liver, CH and cirrhosis, respectively, were moderately positive (level 1). In HCCs, 10% of cells were evaluated as moderately positive (level 1). (B) Cytoplasmic PA28 γ expression in multistep hepatocarcinogenesis. The expression increased slightly in a stepwise manner. Quantitative analysis showed that 80, 68 and 50% of cells of the normal liver, CH and cirrhosis, respectively, were moderately positive (level 1). In HCCs, 82% of cells were evaluated as moderately positive (level 1). PA28 γ , proteasome activator 28 γ ; CH, chronic hepatitis; HCC, hepatocellular carcinoma. NS, not significant.

Table I. Correlation between nuclear PA28 γ expression and various clinicopathological parameters in patients with HCC.

	n	PA28 γ		P-value
		Low (<42%)	High (\geq 42%)	
Age (years)				
\geq 60	15	7	8	
<60	21	11	10	NS
Gender				
Male	21	10	11	
Female	15	8	7	NS
Tumor size				
\leq 2 cm	8	4	4	
>2 cm	28	14	14	NS
Histological type				
Well/moderately differentiated	5	2	3	
Poorly differentiated	31	16	15	NS
Hepatic vein invasion				
Yes	6	2	4	
No	30	16	14	NS
Portal vein tumor thrombus				
Yes	5	2	3	
No	31	16	15	NS
Number of tumors				
Multiple ^a	3	1	2	
Solitary	33	17	16	NS
Septum formation				
Yes	15	8	7	
No	21	10	11	NS
Capsular formation				
Yes	14	6	8	
No	22	12	10	NS
Capsular invasion				
Yes	8	1	7	
No	6	5	1	0.026

^aThis category includes intrahepatic metastasis and multicentric carcinogenesis. PA28 γ , proteasome activator 28 γ ; HCC, hepatocellular carcinoma; NS, not significant.

Table II. Correlation between nuclear PA28 γ expression and various clinicopathological parameters in non-tumor liver tissues.

	n	PA28 γ		P-value
		Low (<42%)	High (\geq 42%)	
Age (years)				
\geq 60	22	5	17	
<60	24	9	15	NS
Gender				
Male	27	6	21	
Female	19	8	11	NS
HCV	28	9	19	
HBV	0			
HCV plus HBV	18	5	13	NS
Inflammatory status (HAI score)				
Absent-mild (0-3)	22	12	10	
Moderate-severe ($>$ 4)	24	2	22	0.0007
Degree of fibrosis (HAI score)				
Absent-moderate (0-2)	12	11	1	
Severe-cirrhosis ($>$ 3)	34	3	31	<0.0001

NS, not significant; PA28 γ , proteasome activator 28 γ ; HCV, hepatitis C virus; HBV, hepatitis B virus; HAI, histological activity index.

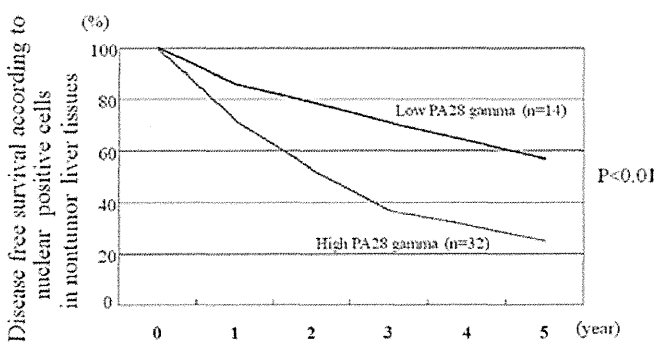


Figure 3. Disease-free survival based on nuclear PA28 γ expression in non-tumor tissues. The disease-free survival was significantly different between patients with high nuclear PA28 γ expression (levels 1 and 2) and those with low nuclear PA28 γ expression (level 0) ($P<0.01$). PA28 γ , proteasome activator 28 γ .

of the HCC cases. The respective values for HCV-related cases were 28% (13/46) and 72% (33/46). All cut-off values used were according to the mean labeling index.

Correlation between nuclear PA28 γ expression and clinicopathological parameters. We examined the correlation between PA28 γ nuclear expression analyzed in 36 HCCs (10 samples with complete necrosis by TAE were excluded from this analysis) and various clinicopathological features (Table I). The cases were divided into two groups based on the labeling index of nuclear expression of PA28 γ , using a cut-off mean value of 42%. There was a significant difference in PA28 γ expression based on capsular invasion (Table I). We also analyzed the relationship between nuclear PA28 γ expression in non-tumor tissues (15 CH and 31 cirrhosis) and

disease-free survival, as the pathologic status of non-tumor tissues has been shown to correlate with the relapse of HCC (16-18). The disease-free survival, but not overall survival ($P=0.052$), was significantly different between high and low nuclear PA28 γ expressors ($P<0.01$) (Fig. 3). In addition, PA28 γ expression in non-tumor tissues correlated closely with active inflammation and fibrosis (Table II).

In univariate analysis, PA28 γ expression in non-tumor liver tissues, portal vein tumor thrombus, inflammatory status and degree of fibrosis in the non-cancerous liver tissue were significant factors for disease-free survival. These variables were subsequently entered into multivariate analysis. The results identified nuclear PA28 γ expression level [95% confidence interval (CI), 1.82-3.22; $P<0.01$], portal vein tumor thrombus (95% CI, 1.33-6.38; $P=0.023$), inflammatory status (95% CI, 2.11-3.58; $P=0.012$) and degree of fibrosis (95% CI, 1.99-7.21; $P<0.01$) as independent factors for disease-free survival (Table III).

SREBP-1c expression. Five CH and five cirrhotic liver tissues were selected to analyze the correlation between nuclear PA28 γ expression and SREBP-1c gene expression in non-tumor liver tissues. Fig. 4 shows a clear correlation between nuclear PA28 γ expression and SREBP-1c gene expression.

Discussion

The present study shows that non-tumor liver tissues commonly express high levels of nuclear PA28 γ protein relative to those of carcinoma tissues. These results are contradictory to those from other studies on other types of cancer, such as thyroid carcinoma; the nuclear PA28 γ level was higher in these tumors compared to non-tumor tissues (19). While the exact reason for

Table III. Multivariate analysis of clinicopathological factors for disease-free survival in patients with HCC.

	n	Relative risk	95% confidence interval	P-value
PA28 γ				
High	32	2.67	1.82-3.22	<0.01
Low	14			
Portal vein tumor thrombus				
Yes	5	2.21	1.33-6.38	0.023
No	31			
Inflammatory status (HAI score)				
Absent-mild (0-3)	22	2.59	2.11-3.58	0.012
Moderate-severe (>4)	24			
Degree of fibrosis (HAI score)				
Absent-moderate (0-2)	12	2.68	1.99-7.21	<0.01
Severe-cirrhosis (>3)	34			

HCC, hepatocellular carcinoma; PA28 γ , proteasome activator 28 γ ; HAI, histological activity index.

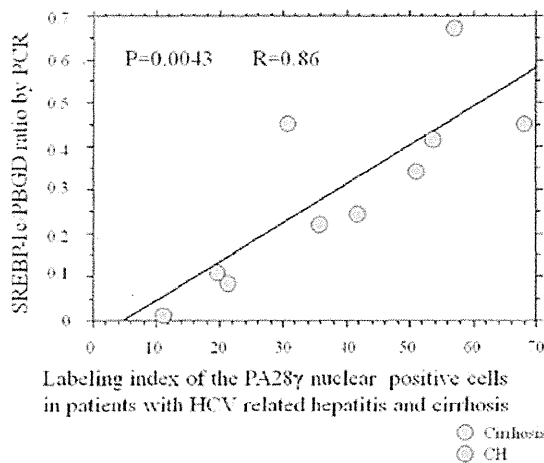


Figure 4. Linear correlation analysis of nuclear PA28 γ expression and SREBP-1c gene expression in patients with cirrhosis and chronic hepatitis (CH) ($P=0.0043$). PA28 γ , proteasome activator 28 γ ; HCV, hepatitis C virus. SREBP-1c, sterol regulatory element binding protein-1c.

the different results is not known at present, it is likely to be related to the type of control tissue used in the present study; the non-tumor tissues were mostly not normal, consisting of HCV-infected CH or cirrhotic tissues. In support of this conclusion, normal liver tissues from patients with metastatic liver tumors from patients with colorectal carcinoma who were negative for HCV/HBV showed low expression of nuclear PA28 γ .

In non-neoplastic liver tissues, we found a wide spectrum of nuclear PA28 γ expression from normal liver to cirrhosis. Our results also show that active inflammation with hepatitis virus induces nuclear PA28 γ in CH and cirrhotic livers (Table II). This is reasonable considering the fundamental action of nuclear PA28 γ as a mediator of inflammation. Another mechanism for the high induction of nuclear PA28 γ in cirrhosis might be related to the degradation of the HCV core protein

by PA28 γ and its translocation from the cytoplasm to the nucleus, based on the results of our previous study (10). In fact, nuclear PA28 γ -expressing cells had no or faint-to-moderate cytoplasmic PA28 γ expression (Fig. 1c and g). Furthermore, the nuclear overexpression could be due to the relatively hypoxic microenvironment in the cirrhotic liver. In this regard, we hypothesized that hypoxia might directly induce PA28 γ , which in turn enhances angiogenesis via the enhanced release of a battery of angiogenic growth factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF). Since the VEGF level is increased in cirrhosis (20), it is possible that nuclear PA28 γ may improve the ischemic/hypoxic microenvironment in the cirrhotic liver through upregulation of angiogenesis. Although cirrhotic nodules occasionally show p53 mutation and increased telomerase activity (21,22), cirrhosis is not considered a premalignant lesion. However, it is apparent from a number of etiological studies that cirrhosis is a strong risk factor for HCC. In this context, nuclear PA28 γ expression in cirrhosis might be a prerequisite for the genesis of premalignant dysplastic nodules or early cancer.

From a clinical point of view, it is interesting to note the correlation between high nuclear PA28 γ expression in non-tumor tissues and the relapse of HCC. The prognosis of HCC is generally unfavorable. Although primary tumors are curatively resected, 50-60% of patients develop relapse within 5 years. This is due to either a newly established tumor from the remnant liver, a process termed multicentric carcinogenesis, or recurrence of the original tumor. One possible mechanism for a link between nuclear PA28 γ and disease relapse is that high expression of PA28 γ in the remnant liver may contribute to carcinogenesis. Nuclear PA28 γ expression highly correlated with the presence of active inflammation ($P<0.0001$). Furthermore, active inflammation in non-tumor tissues has been reported to be associated with relapse of HCC (17,23,24).

In the present study, a clinicopathological survey demonstrated a significant correlation between nuclear PA28 γ protein expression and capsular invasion of the cancer tissue. This

finding is in agreement with a recent study that showed increased expression of PA28 γ protein during cancer progression and its correlation with PCNA labeling index (19). Thus, the results suggest the possible involvement of PA28 γ in HCC progression. Further studies of larger population samples are required to confirm the clinical significance of nuclear PA28 γ in HCC. This is particularly important, as the overall survival of patients with high nuclear PA28 γ expression was worse than that of those with low expression level ($P=0.052$) (data not shown).

Also in our series, the labeling index of cytoplasmic expression of PA28 γ significantly increased from normal liver to cirrhotic liver (Fig. 2b). Further extended studies are required to determine the importance of cytoplasmic expression of PA28 γ in HCC and HCV-related liver.

In conclusion, the present study demonstrates a close correlation between nuclear PA28 γ expression in liver tissue and the development and progression of HCC, as well as its possible involvement in HCC relapse. Further studies are required to examine the therapeutic benefits of the suppression of nuclear PA28 γ expression in HCV-related CH, cirrhosis or HCC.

References

- Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, Dantona F, Terranova A and Castagnetta LA: Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann NY Acad Sci* 963: 13-20, 2002.
- Okuda K: Hepatocellular carcinoma: Recent progress. *Hepatology* 15: 948-963, 1992.
- Kew MC and Popper H: Relationship between hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Semin Liver Dis* 4: 136-146, 1984.
- Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Arase Y, Tsubota A, Chayama K, Kumada H and Kawanishi M: A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: A prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 18: 47-53, 1993.
- Shiratori Y, Shiina S, Imamura M, *et al*: Characteristic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B- and C- viral infection in Japan. *Hepatology* 22: 1027-1033, 1995.
- Nagasue N, Uchida M, Makino Y, *et al*: Incidence and factors associated with intrahepatic recurrence following resection of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 105: 488-494, 1993.
- Ikeda K, Saitoh S, Tsubota A, Arase Y, Chayama K, Kumada H, Watanabe G and Tsurumaru M: Risk factors for tumor recurrence and prognosis after curative resection of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 71: 19-25, 1993.
- Shimada M, Takenaka K, Gion T, *et al*: Prognosis of recurrent hepatocellular carcinoma: a 10-year surgical experience in Japan. *Gastroenterology* 111: 720-726, 1996.
- Kumada T, Nakano S, Takeda I, *et al*: Patterns of recurrence after initial treatment in patients with small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 25: 87-92, 1997.
- Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, *et al*: Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1661-1666, 2007.
- Myers J, Mehta P, Hunter AW, Bernstein SA and Erickson PA: Automated double-label immunohistochemistry. *J Surg Pathol* 1: 105-113, 1995.
- Chretien S, Dubart A, Beaupain D, *et al*: Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6-10, 1988.
- Nagel S, Schmidt M, Thiede C, Huhn D and Neubauer A: Quantification of Bcr-Abl transcripts in chronic myelogenous leukemia (CML) using standardized, internally controlled, competitive differential PCR (CD-PCR). *Nucleic Acids Res* 24: 4102-4103, 1996.
- Kim KH, Hong SP, Kim K, Park MJ, Kim KJ and Cheong J: HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPAR γ . *Biochem Biophys Res Commun* 355: 883-888, 2007.
- Finke J, Fritzen R, Ternes P, Lange W and Dolken G: An improved strategy and a useful housekeeping gene for RNA analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by PCR. *Biotechniques* 14: 448-453, 1993.
- Sasaki Y, Imaoka S, Fujita M, *et al*: Regional therapy in the management of intrahepatic recurrence after surgery for hepatoma. *Ann Surg* 206: 40-47, 2007.
- Ko S, Nakajima Y, Kanehiro H, *et al*: Significant influence of accompanying chronic hepatitis status on recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. Result of multivariate analysis. *Ann Surg* 224: 591-595, 1996.
- Sasaki Y, Imaoka S, Masutani S, Ohashi I, Ishikawa O, Koyama H and Iwanaga T: Influence of coexisting cirrhosis on long-term prognosis after surgery in patients with hepatocellular carcinoma. *Surgery* 112: 515-21, 1992.
- Okamura T, Taniguchi S, Ohkura T, *et al*: Abnormally high expression of proteasome activator- γ in thyroid neoplasm. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1374-1383, 2003.
- El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, *et al*: Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 27: 1554-1562, 1998.
- Raedle J, Oremek G, Truschnowitz M, Lorenz M, Roth WK, Caspary WF and Zeuzem S: Clinical evaluation of autoantibodies to p53 protein in patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 34: 1198-1203, 1998.
- Kishimoto Y, Shiota G, Kamisaki Y, *et al*: Loss of the tumor suppressor p53 gene at the liver cirrhosis stage in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 54: 304-310, 1997.
- Tarao K, Takemiya S, Tamai S, *et al*: Relationship between the recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC) and serum alanine aminotransferase levels in hepatectomized patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis and HCC. *Cancer* 79: 688-694, 1997.
- Ko S, Nakajima Y, Kanehiro H, *et al*: Influence of associated viral hepatitis status on recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *World J Surg* 21: 1082-1086, 1996.

<特別寄稿>

C型肝炎治療ガイドライン (第1版)

日本肝臓学会肝炎診療ガイドライン作成委員会

索引用語: C型肝炎 ガイドライン テラプレビル インターフェロン
リバビリン

日本肝臓学会肝炎診療ガイドライン作成委員会

朝比奈靖浩¹⁾, 泉 並木²⁾, 桶谷 眞³⁾, 熊田 博光⁴⁾,
小池 和彦⁵⁾, 鈴木 文孝⁶⁾, 滝川 一^{6)*}, 田中 篤^{6)*},
坪内 博仁⁷⁾, 林 紀夫⁷⁾, 平松 直樹⁸⁾, 四柳 宏⁹⁾ (五十音順)

- 1) 東京医科歯科大学消化器内科・大学院分子肝炎制御学
- 2) 武蔵野赤十字病院消化器科
- 3) 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
- 4) 虎の門病院 肝臓センター
- 5) 東京大学大学院医学系研究科消化器内科学 (特別委員)
- 6) 帝京大学医学部内科
- 7) 関西労災病院
- 8) 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学
- 9) 東京大学大学院医学系研究科生体防御感染症学

*Corresponding author: a-tanaka@med.teikyo-u.ac.jp

*肝炎診療ガイドライン作成委員会委員長

付記: 本委員会では, 会員の皆様が現在最も必要としているC型肝炎治療に関するガイドラインをまず早急に作成しようと考え, この度, 「C型肝炎治療ガイドライン(第1版)」を取りまとめました。本ガイドラインが, 全国の診療の場において活用されることを望みます。この領域はデータの集積とともに急速に変化する領域ですので, エビデンスレベルもこれにしたがって変化することから, 示さないこととしました。今後, エビデンスの集積に伴い, 適宜改定を行っていく予定です。委員長 滝川 一

C型肝炎治療ガイドライン（第1版）目次

第1章 概 要	357
第2章 IFN 治療	
1 治療薬—インターフェロン	358
2 治療薬—リバビリン	363
3 治療薬—テラプレビル	364
4 初回治療—ゲノタイプ1型・高ウイルス量	368
5 初回治療—ゲノタイプ1型・高ウイルス量以外	373
6 再治療	374
7 肝硬変の治療	376
8 ALT 正常例への対応	379
第3章 肝庇護療法	379
第4章 瀉血療法	380
文 献	381
資料1 治療フローチャート	390
資料2 治療中止基準	392
資料3 ウイルス学的反応の定義	393
資料4 HCV についての外注検査	394

第1章 概要

C型肝炎ウイルス（Hepatitis C virus：HCV）は、1989年、米国のChooらによって発見され¹⁾、従来、非A非B型肝炎と診断されていた患者の9割以上、アルコール性肝障害と診断されていた症例の半数以上がHCVによる肝障害であることが明らかとなった。現在、HCVキャリアは全世界で1億7000万人、本邦で150万～200万人と推定されている。HCV感染が一旦成立すると、健康成人への感染であっても、急性の経過で治癒するものは約30%であり、感染例の約70%でHCV感染が持続し、慢性肝炎へと移行する。慢性化した場合、ウイルスの自然排除は稀であり（年率0.2%）、HCV感染による炎症の持続により肝線維化が惹起され、肝硬変や肝細胞癌へと進展する²⁾。インターフェロン（interferon：IFN）による治療は、1986年、Hoofnagleらが、非A非B型肝炎に対してヒト組み換えIFN α を投与し、トランスアミナーゼの正常化を確認したことに始まり³⁾、欧米で1991年、本邦では1992年から、C型肝炎に対するIFN治療の一般臨床での使用が開始された。その後、PCR法という画期的なウイルス検出法の開発により、IFN治療によってHCV RNAの排除に成功した症例では、肝炎が鎮静化することが示され⁴⁾、さらにこうした症例では、肝病変進展や肝発癌が抑制されることも明らかにされた^{5)~8)}。

C型肝炎治療の目標は、HCV持続感染によって惹起される慢性肝疾患の長期予後の改善、即ち、肝発癌ならびに肝疾患関連死を抑止することにある。ペグインターフェロン（pegylated interferon：Peg-IFN）とリバビリンの併用が標準的な抗ウイルス療法となつて著効（sustained virological response：SVR）率は向上したが、難治性であるHCVゲノタイプ1型・高ウイルス量症例では同療法においてもSVR率が40～50%であり、約半数の症例ではHCVが排除できない。近年、治療効果の向上あるいは副作用軽減を目指して多くの新規抗ウイルス薬が開発され、2011年11月には、第1世代プロテアーゼ阻害剤であるテラプレビルがゲノタイプ1型高ウイルス量例に対して一般臨床で使用可能となった。テラプレビル+Peg-IFN α -2b+リバビリン3剤併用療法により、初回治療のSVR率は約70%と向上し、抗ウイルス効果は増強したが、高度な貧血の進行、重篤な皮膚病変の出現など副作用も増加した^{9)~13)}。一方で、現在、わが国において第2世代プロテアーゼ阻害剤（TMC435¹⁴⁾、MK7009¹⁵⁾、BI-201335）とPeg-IFN+リバビリンとの3剤併用療法、ならびにIFN freeであるプロテアーゼ阻害剤/NS5A阻害剤の内服剤による抗ウイルス療法¹⁶⁾などの臨床試験が進んでいる。こうした次世代DAAs（direct anti-viral agents）は、副作用が非常に少なく、また初回治療のSVR率80%以上と更なる抗ウイルス効果の向上が報告されており、今後期待がもたれる。

C型肝炎の治療方針は、以上の現況を踏まえ、個々の症例における現時点での抗ウイルス療法の適応を十分に考慮した上で決定する必要がある。

1 C型肝炎に対する抗ウイルス療法の治療対象

一般に、HCV持続感染者の肝病変は、ALT上昇を伴って緩やかに進み、線維化の進展とともに発癌リスクも高率になる⁸⁾。逆に、肝に炎症や線維化のない正常肝からの発癌はほとんど認めない。したがって、肝の炎症を反映するALT値が上昇している症例（ALT 30 IU/L超）、あるいは、肝の線維化の程度を反映する血小板数が低下している症例（血小板数15万/ μ l未満）は、原則として全例C型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の治療対象となる。ALT 30 IU/L以内かつ血小板数15万/ μ l以上の症例については、肝発癌リスクが低いことを考慮に入れて抗ウイルス療法の適応を決める必要がある（p379「ALT正常例への対応」参照）。

また、早期のウイルス排除が必要とされるのは、高発癌リスク群である。C型肝炎では、“高齢”、“線維化進展例”、“男性”の3因子が肝発癌に対する独立した危険因子であることが明らかになっている^{5)~7)}。したがって、これらの因子を多くもつ症例では、発癌リスクが特に高く、早期に抗ウイルス療法の導入が考慮されるべきである。

2 C型肝炎に対する基本的治療方針

本ガイドラインではC型肝炎における発癌リスクを考慮して、C型慢性肝炎患者を高齢者・非高齢者、および線維化進展例・軽度例に分けて治療方針を策定した（p390「資料1 治療フローチャート」参照）。C型肝炎における肝発癌解析において、高齢者の定義は、55歳、60歳あるいは65歳以上など一定ではないが、一般に、高齢者の中でも年齢が上昇するにつれて発癌リスクは高い。本ガイドラインでは、テラプレビルの国内臨床試験が65歳以下を

対象としていること¹⁴⁾、および 65 歳を超えると肝発癌率が上昇すること¹⁵⁾などに基づいて、“66 歳以上”を高年齢者と定義した。また、線維化進展例は“肝線維化 F2 以上または血小板数 15 万/ μ l 未満”とするが、このなかでも“肝線維化 F3 以上または血小板数 12 万/ μ l 未満”では特に発癌リスクが高いことに留意する必要がある。

高発癌リスク群（高齢かつ線維化進展例）では、治療への認容性が許せば、可及的速やかに抗ウイルス療法を導入すべきであり、中発癌リスク群（高齢または線維化進展例）においても、早期の抗ウイルス療法の導入が望ましい。ただし、特に発癌リスクの高い高齢者や線維化進展例では治療効果不良例があり、抗ウイルス療法を導入した場合には、副作用や耐性変異ウイルスの出現を防ぐため、治療中止基準を考慮しながら治療を行う必要がある。一方、低発癌リスク群である非高齢かつ非線維化進展例では、速やかな抗ウイルス療法の導入は必ずしも必要でなく、次世代 DAAs への待機が可能な症例もあることから、治療効果、副作用、ならびに肝発癌リスクを考慮に入れて現時点での抗ウイルス療法の適応を決める。

また、いずれの群においても、ウイルス排除を目的とした抗ウイルス療法が現時点で困難であり、ALT が異常値 (30 IU/L 超) の場合は、Peg-IFN (IFN) 少量長期投与 (p358「治療薬—インターフェロン」参照)、あるいは肝庇護剤 (SNMC, UDCA) (p379「肝庇護療法」参照) の投与を行う。こうした治療で十分な効果が得られず、鉄過剰が疑われる場合には、瀉血療法の併用あるいは同療法への変更を考慮する (p380「瀉血療法」参照)。これらの治療によって、ALT を 30 IU/L 以下に保つことを目標とし、できるだけ低値になるようにコントロールする。特に、発癌リスクの高い群では、厳密な ALT コントロールが必要である。なお、Peg-IFN (IFN) 少量投与は、6 か月以内に ALT 値改善 (40 IU/L 以下) あるいは AFP 値改善 (10 ng/ml 以下) を認めない場合は、中止する (p392「資料 2 治療中止基準」参照)¹⁸⁾¹⁹⁾。

【Recommendation】

- 1) ALT 値上昇例 (ALT 30 IU/L 超)、あるいは血小板数低下例 (血小板数 15 万/ μ l 未満) の C 型慢性肝炎患者は、原則として全例抗ウイルス療法の治療対象である。
- 2) ALT 30 IU/L 以内、かつ血小板数 15 万/ μ l 以上の症例については、肝発癌リスクが低いことを考慮に入れて抗ウイルス療法の適応を決める。
- 3) 高発癌リスク群 (高齢かつ線維化進展例) では、治療への認容性を考慮しつつ、可及的速やかに抗ウイルス療法を導入すべきである。
- 4) 高齢者や線維化進展例に抗ウイルス療法を導入する場合には、副作用や耐性変異ウイルスの出現を防ぐため、治療効果不良例を早期に見極める治療中止基準を考慮しながら治療を行う必要がある。
- 5) 低発癌リスク群 (非高齢かつ非線維化進展例) では、治療効果、副作用、ならびに肝発癌リスクを考慮に入れて現時点での抗ウイルス療法の適応を決める。
- 6) ウイルス排除ができない場合、肝病変進展予防あるいは肝発癌予防を目指して、Peg-IFN (IFN) 少量長期投与あるいは肝庇護剤 (SNMC, UDCA) の投与を行う。これらの治療で十分な効果が得られず、鉄過剰が疑われる場合には、瀉血療法の併用あるいは同療法への変更を考慮する。
- 7) 治療中止基準：Peg-IFN (IFN) 少量投与は、6 か月以内に ALT 値改善 (40 IU/L 以下) あるいは AFP 値改善 (10 ng/ml 以下) を認めない場合は、中止する。

第 2 章 IFN 治療

1 治療薬—インターフェロン (interferon ; IFN)

C 型慢性肝炎治療に認可されている IFN には α 型と β 型がある。 α 型にはポリエチレングリコール (polyethylene glycol ; PEG) が IFN に結合しているか否かにより、非 PEG 化製剤と PEG 化製剤がある。前者には天然型 IFN α と遺伝子組み換えの IFN α -2b があり、後者には Peg-IFN α -2a と Peg-IFN α -2b がある。 β 型は天然型 IFN β で非 PEG 化製剤である。

(1) IFN α

PEG 化していない通常型の IFN は不安定で血中半減期は 3~8 時間と短く、24 時間後には検出感度以下となる²⁰⁾。したがって、C 型慢性肝炎治療においては少なくとも週 3 回の投与を必要とする。また、非 PEG 化 IFN は IFN

血中濃度の上昇・下降を繰り返すため発熱・悪寒・頭痛などの副作用をきたしやすい。これらの点において、非PEG化IFNのうち天然型IFN α は自己注射が認可されており、2週毎の通院で良いのみならず、夜間就寝前に自己注射することで血中濃度をコルチゾールの体内変動に適應させることが可能となるため、発熱などの副作用軽減が期待できる^{21)~23)}。

(2) PEG化IFN α

PEGは水溶性の中性分子でそれ自体に毒性はなく、エチレンオキサイド・サブユニットの数で分子量が規定される。IFNをPEG化する目的は、体内での薬物動態を変化させること、宿主の免疫系による認識・排除からIFNを守ることの2点である。Peg-IFNには、IFN α -2aに40kDの分岐鎖PEGを共有結合させたPeg-IFN α -2aと、IFN α -2bに12kDの一本鎖PEGをウレタン結合させたPeg-IFN α -2bがあり、それぞれの最大血中濃度(Cmax)は投与後72~96時間および15~44時間で、単回投与によりそれぞれ約168時間および80時間にわたり治療域の血中濃度が維持される²⁴⁾。このようにIFNに結合するPEGの分子量が大きくなると薬物の体内貯留時間が延長するが、それに反比例して薬効が低下し、Peg-IFN α -2aのIFN活性は非PEG化IFN α -2aの7%であるのに比し、Peg-IFN α -2bでは非PEG化IFN α -2bの28%と後者の方が高い。したがって、実際の抗ウイルス効果は、体内貯留時間とIFN活性のバランスおよび患者の体格や体重などにより複雑に規定される。Peg-IFN α -2aは単独投与およびリバビリンとの併用が健康保険適用となっており、Peg-IFN α -2bはリバビリンとの併用のみが適用となっている。

これら2種類のPEG化IFN α はそれぞれ標準投与量が異なる。Peg-IFN α -2aは標準投与量が180 μ g/週に固定されているが、Peg-IFN α -2bは体重により投与量が異なり、1.5 μ g/kg/週が標準投与量である。

(3) IFN β

IFN β は天然型で、非PEG化製剤が使用可能であり、単独投与またはリバビリンとの併用が保険適用となっている。静注または点滴静注で投与され週3回以上の投与を行う。IFN β はIFN α と共通のI型IFN受容体に結合し抗ウイルス効果はIFN α と同等であるが、副作用のプロフィールがIFN α とは異なる。すなわち、天然型IFN β +リバビリン併用療法を行ったHCVゲノタイプ1b型40例を解析した後ろ向き研究では、Peg-IFN α +リバビリン併用療法に比し副作用中止が低く、血小板数の低下が軽微であった²⁵⁾。また、IFN α による治療をうつ症状のため中止した既往のある症例においても、天然型IFN β +リバビリン併用療法はうつなどの副作用に対する認容性が高いことが示された^{26)~28)}。したがって、うつなどでIFN α が投与できない症例では、天然型IFN β を用いたIFN治療が推奨される。

また、Peg-IFN α +リバビリン療法無効例の15%にIFN α に対する中和抗体が検出されたとの報告がある²⁹⁾。IFN α 中和抗体はIFN β の抗ウイルス活性を阻害しないため、この中和抗体が原因となりPeg-IFN α +リバビリン療法が無効となる症例では、天然型IFN β への切り替えが考慮される。

また天然型IFN β は1日2分割投与で用いられることがあり、HCV動態からみた抗ウイルス効果は1日1回投与に比し強力である³⁰⁾。Peg-IFN α +リバビリン療法の導入療法としてIFN β 2分割投与が試みられている³¹⁾。

(4) IFNの抗ウイルス作用^{32)~34)}

IFNは標的細胞膜上のI型IFN受容体に結合することにより作用する。I型IFN受容体はIFN α , β に共通であり、IFN α または β が受容体に結合することによりチロシン型蛋白質リン酸化酵素であるJAK1が活性化され、IFN受容体の細胞内ドメインのチロシン残基のリン酸化を引き起こす結果、STAT1のリン酸化および2量体形成が起こり、これが核内へと情報を伝達する。核内に情報が伝達されると、IFN誘導遺伝子(IFN stimulated genes: ISGs)が誘導・増強される。ISGは多種多様であり、種々の抗ウイルス遺伝子、免疫調節遺伝子が含まれ、これらの遺伝子が誘導され蛋白が発現することにより、抗ウイルス効果が発揮されると考えられている。

(5) 副作用

IFN治療に関連した副作用はほぼ全ての患者に認められる。中でも全身倦怠感・発熱・頭痛・関節痛などのインフルエンザ様症状は最もよく認められる副作用で、60%~95%の患者に認められる。インフルエンザ様症状に対しては、消炎解熱鎮痛剤の投与により多くはコントロール可能である。血液検査所見では白血球減少がみられ、1000/ mm^3 未満に低下する症例が約60%に認められる。しかし、好中球減少に関わる重篤な感染症は少ないと考えられている³⁵⁾。白血球・好中球と血小板の減少は投与開始4週目までに進行し、その後定常状態になることが多い。抑

うつ・不眠などの精神症状も5%~10%に認められ、うつの既往や治療前精神症状がある症例で起こりやすい³⁶。精神症状は、うつ特異的的症状とうつに関連した自律神経症状に分けられ³⁷⁻³⁹、前者に対しては選択的セロトニン再取り込み阻害薬が効果的である。また、IFNは慢性甲状腺炎などの自己免疫性疾患を惹起または増悪させる可能性があり、自己免疫性疾患合併例ではIFN投与に際し厳重な注意が必要である。間質性肺炎も副作用として報告され、重篤となり生命の危険が生じることがある。治療開始2か月以降や治療後期に起こることが多い。乾性咳や呼吸困難などの呼吸器症状が出現した際には、速やかに胸部CTを行うなど迅速かつ適切な対応が必要である。間質性肺炎の診断に血中KL-6の測定も有用である。その他、心筋症、眼底出血などが副作用として挙げられる。

PEG化IFNの副作用プロフィールは非PEG化製剤と若干異なる。わが国におけるPeg-IFN α -2a単独投与の臨床試験において、非PEG化IFN α -2aよりも発生頻度が高かった副作用は、注射部位の発赤などの皮膚症状と、白血球や血小板などの血球系の減少であった。一方、発熱・関節痛などのインフルエンザ様症状や倦怠感・食欲低下などの軽~中等度の副作用は通常型IFN α -2aより軽度であった⁴⁰。

【Recommendation】

- 1) IFNの副作用には、インフルエンザ様症状、血球減少、精神症状、自己免疫現象、間質性肺炎、心筋症、眼底出血が挙げられる。
- 2) IFNのPEG化によりIFN血中濃度が安定するため、発熱・関節痛などのインフルエンザ様症状は軽減する。
- 3) 天然型IFN α を自己注射により夜間投与することでインフルエンザ様症状が軽減する。
- 4) うつ症状などIFN α 不耐応の症例ではIFN β の投与を考慮する。

(6) Peg-IFN α -2aとPeg-IFN α -2bに違いはあるか~治療効果・副作用~

現在わが国では、PEG-IFN+リバビリン併用療法に対してPeg-IFN α -2aとPeg-IFN α -2bの2種類のPEG化製剤が使用可能である。これら2剤の有効性を比較した海外における代表的な研究としてはMcHutchisonらによる報告が挙げられる⁴¹。この研究では118施設におけるゲノタイプ1型のIFN未治療例3070例を対象としRCTにより比較したところ、SVR率はPeg-IFN α -2a 180 μ g群で40.9%、Peg-IFN α -2b 1.5 μ g/kg群で39.8%と差はなく、認容性についても両製剤間に有意差を認めなかった。一方、イタリアより単施設におけるゲノタイプ1~4型のIFN未治療例441例あるいは320例を対象としたRCTが2報報告されており、これらの結果では有害事象の発現頻度に有意差はなかったが、SVR率はPeg-IFN α -2a群の方がPeg-IFN α -2b群に比し有意に高かった^{42,43}。最近両剤の有効性と安全性について、12報のRCTを検討したsystematic reviewが報告されており⁴⁴、治療中止に至る有害事象では両剤に差を認めなかったが、8報のRCTを基にしたoverallのSVR率は、Peg-IFN α -2a群が47%、Peg-IFN α -2b群が41%であり、Peg-IFN α -2a群では有意に高いことが示された(リスク比1.11, 95%信頼区間1.04-1.19, $p=0.004$)。しかしながら、検討対象としたそれぞれのRCTにはHCVゲノタイプ・人種・PEG-IFN α -2b投与量などのheterogeneityがみられること、さらに症例数や脱落症例などの面でRCTとして必ずしも良質ではないなどの問題が指摘されており、また有害事象に関わるデータも限定的であることから、どちらの製剤を推奨するかの結論には至っていない。わが国においても、両剤を比較したRCTが施行されているが未だ最終的な報告はなされていない。

従って、現時点でPeg-IFN α -2aとPeg-IFN α -2bとは有効性・副作用の観点からほぼ同等と考えられ、実臨床においてはどちらかの製剤を推奨するという明確なエビデンスはない。治療効果のさらなる向上のためには、個々の症例におけるリバビリンなどの薬剤投与量や治療期間の最適化、またそれぞれの症例における治療効果規定因子を考慮した治療計画の策定および副作用のコントロールがより重要であると考えられる。

(7) IFN単独療法の肝細胞癌抑制効果

IFN治療による肝細胞癌抑制効果については、わが国からの報告が多い。Ikedaらは初回IFN単独療法を施行したC型慢性肝炎症例において、治療効果別にみた累積肝細胞癌発症率を後ろ向きに検討し、10年累積発症率は無治療群($n=452$)が12.0%、非SVRかつALT異常のIFN無効群($n=1,076$)が15.0%であったのに対し、SVR群($n=676$)では1.5%と有意に低率であり、また非SVRでもALTが正常化したいわゆる不完全著効群($n=298$)でも10年累積発症率は2.0%と発症抑制効果が認められたと報告した⁶。同様の報告はImaiら⁴⁵やKasaharaら⁷からも報告され、IFN投与によるALT正常化群で発症抑制効果が認められた。また、Yoshidaらは2,890例の大規模後ろ向き研究により、IFN投与およびそれによるSVRが発症抑制因子となることを報告し、ALTが正常の2倍以

下に改善することでも発癌抑制効果があることを示した⁴⁵。また、IFN^α 著効例の肝線維化進展率は平均=0.28/年と計算され、ウイルス駆除により肝線維化が改善することを示し、非著効例でも-0.02/年と線維化の進展抑制が認められることを報告した。また、Okanoue らも線維化進展度別の発癌抑制効果を示し、IFN^α による線維化改善効果を報告している⁴⁶。さらに、Nishiguchi らはC型肝炎患者における前向き検討を行い、IFN^α の投与によるHCV 駆除またはALT 値の持続的正常化により肝癌発生および肝不全発症のリスクを有意に軽減できることを示した⁴⁷。

一方海外では、Di Bisceglie らがHepatitis C Antiviral Long-term Treatment against Cirrhosis Trial (HALT-C 試験)を行い、Peg-IFN^α + リバビリン併用療法の非著効例におけるPeg-IFN^α 少量維持療法の発癌を含む肝疾患関連イベントの抑制効果を、前向きに無作為比較検討した⁴⁸。すなわち、先行するPeg-IFN^α + リバビリン併用療法でウイルス学的著効が得られなかったC型肝炎慢性肝炎線維化進展例および肝硬変例1050例からなるコホートを対象として、これらをPeg-IFN^α-2a 90 μg を3.5年間投与する群と無治療対照群とに無作為割付し、観察期間中における死亡、肝発癌、肝不全の発症、組織学的線維化の悪化をエンドポイントとして比較検討した。その結果、経過観察3.8年の時点でいずれかのエンドポイントに至った症例は計157例で、Peg-IFN^α 少量維持療法群34.1%・無治療群33.8%であり、両群間に有意差を認めなかった(HR 1.01, 95% 信頼区間: 0.81-1.27)⁴⁸。さらに本コホートにおける発癌リスクも検討されており、中央値4.6年(最長6.7年)の観察期間中、48例(4.8%)に肝発癌を認めたが、Peg-IFN^α 少量維持療法群における累積5年肝発癌率は5.4%で、無治療群5.0%との間に有意差はなかった(p=0.78)⁴⁸。したがってこの段階では、Peg-IFN^α + リバビリン併用療法の非著効例におけるPeg-IFN^α 少量維持療法には、肝疾患関連イベント全体および肝発癌の抑制効果はないと結論された。同様の結果は、Peg-IFN^α-2bを用いた検討でも確認されている⁵⁰。

しかし、最近HALT-C試験の追跡結果の報告がLokらによりなされた⁵¹。観察期間を前回の解析よりさらに中央値で6.1年(最大8.7年)まで延長したところ、全体で88例(8.4%)の肝発癌を認めた。肝硬変・非肝硬変全体で見ると累積7年発癌率はPeg-IFN^α 治療群・無治療群それぞれ7.2%と9.6%で有意差を認めず(HR 0.77, 95% 信頼区間: 0.51-1.18, p=0.24)。発癌抑制効果は明らかではなかった。しかし肝硬変患者のみに限って解析すると、累積7年肝発癌率はPeg-IFN^α 治療群で7.8%であったのに対して無治療群では24.2%であり、Peg-IFN^α の少量維持療法群において有意に発癌リスクが低下した(HR 0.45, 95% 信頼区間: 0.24-0.83, p=0.01)。もっともこの効果は非肝硬変患者では有意ではなく、累積7年肝発癌率はPeg-IFN^α 治療群で8.3%、無治療群では6.8%とPeg-IFN^α 治療群でもむしろ高い傾向を認めた(HR 1.44, 95% 信頼区間: 0.77-2.69, p=0.26)⁵¹。

このHALT-C試験の結果を受けて、わが国においてもPeg-IFN^α-2a単独療法の発癌抑制効果が多施設共同研究により検証された。すなわち、59例のPeg-IFN^α-2a単独投与群と年齢、性別、線維化の程度、血小板数および血清ビリルビン値をマッチさせた非IFN^α投与群59例とを比較したところ、累積発癌率はPeg-IFN^α-2a単独投与群で有意に低値であり(p=0.0187)、相対危険度は0.167であった⁵²。Peg-IFN^α-2a単独投与群における発癌率の低下は線維化進展例(F3-4)で特に顕著であった(p=0.0036, 相対危険度0.0847)。さらに、HCV RNAが陰性化しなくとも、投与24週目のALT 40 IU/l未滿、AFP 10 ng/ml未滿のいずれかが達成できた症例において発癌率が有意に低値であった⁵³。Peg-IFN^α-2a単独投与によるALTおよびAFP低下効果は、わが国から報告がなされている^{52,53}。

HALT-C試験の結果は、観察期間を延長することにより肝硬変に限れば海外においてもIFN少量維持療法の発癌抑制効果が証明されたと理解できるが、非肝硬変症例を含めた全症例では明らかではなく、またPeg-IFN少量維持療法の肝発癌抑制効果は4年以上経過しないと現れないことを示唆している。一方わが国では、先に述べたようにIFN治療によってSVRが得られなくともALT値の持続正常化によって肝癌発生が有意に低下することが確認されており、Peg-IFN^α-2a単独療法の多施設共同研究では非肝硬変症例を含めても、またより短期の観察期間でも発癌抑制効果は有意であった。このようにHALT-C試験の結果とわが国における知見は解離しているが、その理由として、従来から、前者における対象の平均年齢が52歳とわが国におけるC型肝炎慢性肝炎患者の平均年齢より若年であり、全体の発癌率も低率であることが指摘されてきた。C型肝炎慢性肝炎においては肝線維化が同程度であっても高齢者の方が若年者に比し明らかに発癌リスクが高い一方、肝硬変では発癌リスクに年齢による有意な差がないことがわが国のAsahiraらにより報告されており¹⁷、わが国と米国におけるC型肝炎慢性肝炎患者の年齢と発癌リスクの差がHALT-C試験における非肝硬変例の結果に影響している可能性は否定できない。さらに、HALT-C試験のコホートからは相

当数の死亡または肝移植イベントが発生しており⁵¹、その頻度が非肝硬変群において Peg-IFN 少量維持療法の有無によって有意に異なることも明らかとなっている。これら死亡または肝移植イベントは発癌のリスク解析においてバイアスを生む原因となる。以上より、HALT-C 試験の結果の解釈には一定の注意が必要である。

(8) 高齢者における IFN 単独療法の発癌抑止効果

上述のように、わが国の C 型肝炎患者の年齢は欧米に比して高齢であり、高齢者では他の発癌リスクを補正しても発癌リスクが高い¹⁷。また高齢者でも SVR によって肝発癌は有意に抑制されるものの、非高齢者に比べて SVR が得られない症例や副作用による中止例が多い¹⁷。このような治療効果や副作用の観点から、わが国では高齢者に対し、ウイルス駆除目的ではなく肝炎の沈静化による肝発癌抑止をめざした IFN 単独長期療法が広く行われている。

高齢者における IFN の発癌抑止効果について、Arase らは 60 歳以上の C 型慢性肝炎または肝硬変患者 120 例に対して天然型 IFN α 3MU 週 3 回投与を平均 2.47 年施行し、年齢と性別をマッチさせた 240 例の非 IFN 投与群と比較した。その結果 10 年発癌率は IFN 治療群 17.3%、非 IFN 治療群 32.8% で、発癌の相対危険度は 0.3 であったとしている¹⁸。とくに、IFN 治療群では有意に AFP が低下し、AFP が 10 ng/ml 未満の症例では発癌が少なかった。また、Nomura らも 60 歳以上の HCV ゲノタイプ 1 型患者 44 例を対象とし、天然型 IFN 3MU 週 3 回投与を 3 年間行い、年齢、性別、肝組織所見をマッチさせた 44 例の非 IFN 治療例と比較した結果、累積発癌率は有意に IFN 治療群において低いことを報告している³³。

【Recommendation】

- 1) IFN 治療により HCV が排除されると肝発癌リスクは低下する。
- 2) HCV が排除されなくても、天然型 IFN α 長期療法または Peg-IFN α -2a 単独長期療法により ALT または AFP が低下した症例では発癌リスクの低下が期待できる。

(9) IFN による肝細胞癌再発抑止効果

IFN は未だ発癌していない C 型慢性肝炎・肝硬変例に対して、発癌抑止を目的として投与されるだけではなく、既に肝細胞癌を発症した症例に対しても、肝癌の局所根治が得られた症例に対して再発抑止、生存率の改善をめざして投与される。Shiratori らはエタノール局注療法で根治した肝細胞癌症例を IFN48 週治療群と非治療群に無作為割付けし、その再発率と予後を検討した³⁶。それによると 1 回目再発は両群間で差がなかったが、2 回目以降の肝癌再発は有意に IFN 治療群で低く生命予後も良好であったことを報告し、肝細胞癌根治後における IFN 療法の有用性を示した。また、Sakaguchi および Kudo らは局所根治が得られた肝細胞癌症例 127 例に対して IFN α -2b または Peg-IFN α -2a による少量長期療法を行い、性別・年齢・血小板数をマッチさせた非 IFN 投与例と比較した結果、初回を除いた 2 回目以降の再発率の有意な低下と生存率の改善を示し、生存に対するリスク比は 0.21 と報告した³⁷⁻³⁸。また、肝動脈塞栓術やラジオ波焼灼術後にリバビリン併用 IFN 治療を行い、半数にウイルス駆除が得られ、再発抑制や生存率向上が認められたとの報告もある³⁹。

【Recommendation】

肝細胞癌根治後の IFN 治療により肝細胞癌の再発抑制と生命予後の改善が期待できる。

(10) SVR が得られた後のフォローアップの必要性

SVR は IFN 治療終了後 24 週時点における HCV RNA の陰性化と定義される (p393「資料 3 ウイルス学的反応の定義」参照)。SVR 例における HCV RNA の陰性化は通常持続的であり、リバビリン併用療法による SVR 例の持続陰性化率は、平均 5.6 年 (1 年～8.3 年) の経過観察において 99%～100% と報告されている⁶⁰⁻⁶¹。一方、2000 年より以前に行われた検討では HCV RNA の持続陰性化率は 96%～98% と報告されやや低率であった⁶²⁻⁶⁶。その要因として、これらの検討では IFN 単独療法が主体であったことや、当時は HCV RNA の検出感度が低く SVR 判定に偽陽性が存在したことが考えられる。

先に述べたように、SVR が達成されると HCV RNA の持続陰性化が得られ、C 型肝炎からの発癌リスクは有意に低下する^{6-8,45-46}。しかしその一方で、SVR 達成例においても経過観察中に肝癌を発症することが報告されている。SVR 後の肝発癌に関してはわが国からの報告が多く^{8,17,46-67-71}、平均観察期間 3.3 年～8.0 年における発癌率は 0.9%～4.2% と報告され、発癌リスクとしては、高齢、男性、線維化進展、飲酒、肝脂肪化、インスリン抵抗性などが挙げられている。SVR が得られてから発癌までの期間の多くは 10 年以内であるが、10 年以上経過した後に発癌した症

例の報告も散見される。従って、SVR 後における肝発癌のスクリーニング期間については、未だ一定の見解はないが、症例毎の発癌リスク要因に応じて、SVR 後5~10年間は肝癌のスクリーニングを行うべきと考えられる。

【Recommendation】

ウイルス学的著効後の発癌リスクとしては、高齢、男性、線維化進展、飲酒、肝脂肪化、インスリン抵抗性などが挙げられ、これらのリスク因子に応じて著効後も肝癌のスクリーニングを継続する必要がある。

2 治療薬—リバビリン (ribavirin)

リバビリンは、グアノシンと化学構造が類似したプリンスクレオシドアナログで、RNA および DNA ウイルスに幅広い抗ウイルス活性を示す⁷²。リバビリンの作用機序として、Th1 優位の免疫誘導作用、ウイルスの変異誘導、RNA ポリメラーゼの抑制、細胞内 GTP の枯渇作用などが推察されている⁷³。C 型慢性肝炎に対するリバビリンの単独投与では、ALT 改善効果はあるものの、HCV RNA 量の低下や肝組織の改善効果は認められない^{74~76}。しかし、IFN α -2b とリバビリンの併用投与は、IFN α -2b 単独投与よりもウイルス排除効果および ALT 改善効果が優れている⁷⁷。

リバビリンは主に PEG 化 IFN 製剤である Peg-IFN α -2a または Peg-IFN α -2b との併用で用いられる。Peg-IFN+リバビリン併用療法では Peg-IFN 単独療法と比べ、より高率に治療終了時の HCV RNA 陰性化が得られるが、最も重要な点はリバビリン併用により治療終了後の再燃率が著明に低下することである^{78,79}。現在、国内では Peg-IFN 製剤の他に、通常型 IFN である IFN α -2b、IFN β との併用が可能である。リバビリンの一日投与量は、投与開始前の Hb が 14 g/dl 以上の場合、体重 60 kg 以下では 600 mg、61~80 kg で 800 mg、80 kg 超では 1,000 mg である^{80,81}。

(1) 治療成績

Peg-IFN とリバビリン併用療法の有効性は 2 つの国内第三相臨床試験で報告されている^{82,83}。国内臨床研究では、ゲノタイプ 1b 型・高ウイルス量 (>100 KIU/ml) 症例に対する Peg-IFN α -2b+リバビリン併用 48 週治療の SVR 率は 48% (121/254) であり、Peg-IFN α -2a+リバビリン併用 48 週治療の SVR 率は 59% (57/96) である^{83,84}。一方、ゲノタイプ 1b 型・高ウイルス量症例以外では、Peg-IFN α -2b+リバビリン併用 24 週投与により、89% (40/45) と高い SVR 率が得られている⁸⁵。

(2) 副作用

リバビリンは 1 日 2 回、朝・夕食後に経口投与する。内服 1~2 時間で血中濃度は最大となり、連日投与では血中濃度が平衡化されるのに約 4~8 週を要する。リバビリンには蓄積性があり、肝臓内、赤血球内、筋肉内に長期間残存する。排泄は主に腎臓で行われるため、腎疾患や腎機能障害のある患者に対しては慎重に投与する必要がある。クレアチニン・クリアランスが 50 ml/min 以下の症例では禁忌である。また、透析ではリバビリンを除去できないことから、透析中の腎不全患者には原則禁忌となっている。

リバビリンの主な副作用は溶血性貧血であり、貧血を有する患者や心疾患（心筋梗塞、心不全、不整脈など）を有する患者では適応を慎重に検討する必要がある。Peg-IFN α -2b+リバビリン併用療法の国内臨床試験では、貧血による副作用のため、20% の症例でリバビリンの減量が、8~11% の症例で治療の中断が必要であった。投与開始前の Hb 濃度 14 g/dl 未満、好中球数 2,000/ μ l あるいは血小板数 12 万/ μ l 未満の患者、および女性では薬剤の減量を要する頻度が高くなる。特に、65 歳以上で Hb 13 g/dl 以下の症例では、80% で Peg-IFN ないしリバビリンの減量が必要であった。治療開始 2 週後に Hb が 2 g/dl 以上減少した症例では貧血による治療中止率が高いため、この時点でリバビリンを 200 mg 減量することが提唱されている⁸⁶。投与中に Hb 低下がみられた場合のリバビリンの減量・中止基準（心疾患のない症例）は、Hb が 10 g/dl 未満で 200 mg（1,000 mg 投与例は 400 mg）減量、8.5 g/dl 未満で中止となっている^{80,81}。なお、国内臨床試験の成績では、Peg-IFN とリバビリンの減量が不要であった場合の SVR 率は 62.5% であったのに対し、Peg-IFN あるいはリバビリンの減量・休薬を必要とした場合の SVR 率は 45.7~53.3%。薬剤の投与中止に至った場合の SVR 率は 19.2% と低下していた⁸³。したがって、SVR を得るためには、Hb の低下を適切に管理しつつ、治療を最後まで中止せず完遂させること、およびなるべく薬剤の減量・休薬を避けることが重要である（p370「初回治療—ゲノタイプ 1 型・高ウイルス量、(1) Peg-IFN+リバビリン併用療法、C. 薬剤投与量と治療効果」参照）。