

上甲 康二

松山赤十字病院 肝胆膵センター 部長

研究課題名

全国赤十字病院で肝細胞癌治療後にインターフェロン療法施行したHCV関連肝細胞癌症例の集計結果

研究分担者名 上甲康二 所属 松山赤十字病院 肝臓・胆のう・膵臓内科

研究要旨：全国の赤十字病院よりデータの提供が得られた肝細胞癌（HCC）の治療後にC型肝炎に対してインターフェロンを投与した69症例について、再発と生存に及ぼす因子の検討を行った。再発抑制に寄与する因子は、腫瘍個数（単発）、HCC治療後インターフェロン投与前のAFP値（30未満）、インターフェロン投与終了時のAFP値（15未満）であった。生存期間延長に寄与する因子は、インターフェロン治療効果（SVRであること、NRでないこと）、インターフェロン終了時のALT値（30未満）とAFP値（15未満）であった。今回の検討では、HCC再発までの期間に関しては腫瘍因子が強く影響するが、生存期間には腫瘍因子よりもIFN治療効果やIFN治療後の肝機能や腫瘍マーカーが強く影響していることが明らかになった。

A. 研究目的

肝細胞癌（HCC）に対する根治的治療後にC型肝炎に対してインターフェロン（IFN）投与を行うことが、HCC再発抑制に効果的であると報告が多くみられる一方、否定的な研究報告も散見される。今回肝癌治療後にIFNが投与された症例につき多施設共同で後ろ向き研究を行い、再発までの期間や生存期間に影響を及ぼす因子の解析を行った。

B. 研究方法

全国の赤十字病院よりデータの提供が得られた肝癌治療後にIFN療法が施行された69症例について、1回目～3回目の再発までの期間や生存期間に及ぼす各種臨床パラメータの影響について検討した。臨床パラメータとしては、腫瘍因子として肝癌の数・大きさ・ステージ・肝癌治療後（IFN投与前）の腫瘍マーカー、肝癌治療法、背景肝の肝機能としてChild-Pugh分類やIFN投与前の肝機能検査結果、IFNの治療効果としてSustained Viral Response(SVR)・NR (Non Responder)・TR(Transient Responder)・IFN治療後の肝機能検査結果・腫瘍マーカーを選択した。これらの検討事項について、統計ソフトはJMP ver. 9.0.2を使用し、カプランマイヤー法とコックス比例ハザード生存モデルにて解析した。

C. 研究結果

初回再発までの期間に影響を及ぼす因子についてコックス比例ハザード生存モデル（単変量）にて解析した結果、初回再発までの期間を延長する因子は腫瘍の数とIFN治療後のAFP値で、2個以上の場合のハザード比は4.50で、IFN後に

AFPが15ng/ml以上であることハザード比は2.99であった（表1）。IFNの治療効果別に検討したが、SVRであることは1回目の再発抑制に寄与しなかった。IFN治療前後の腫瘍マーカーや肝機能にも関与はなかった。

表1. IFN投与前のHCC治療から初回再発までの期間（コックス比例ハザード生存モデル単変量）

予後因子	HR	95% CI	P value
腫瘍数2個以上	4.50	1.52~12.14	0.0085*
腫瘍径2cm超	1.25	0.34~4.56	0.7262
Stage II以上	1.10	0.42~2.82	0.8384
RFA単独	0.76	0.40~1.42	0.3938
TACE+RFA	1.05	0.50~2.07	0.8795
切除	0.69	0.30~1.55	0.3916
Child Pugh A	0.89	0.29~3.89	0.8645
ALT50以上 (IFN前)	1.38	0.70~2.85	0.3544
AFP30以上 (IFN前)	1.53	0.36~4.43	0.5145
SVR	0.70	0.35~1.34	0.2890
ALT30以上 (IFN後)	1.57	0.79~3.10	0.1944
AFP15以上 (IFN後)	2.99	1.31~6.33	0.0101*
RBV 80%未満	0.99	0.42~2.10	0.9884
IFN 80%未満	1.42	0.59~3.08	0.4130

表2. IFN投与前のHCC治療からIFN後2回目再発までの期間（コックス比例ハザード生存モデル単変量）

予後因子	HR	95% CI	P value
腫瘍数2個以上	0.97	0.22~3.17	0.9581
腫瘍径2cm超	0.69	0.19~2.12	0.5249
RFA単独	0.72	0.24~2.01	0.5369
TACE+RFA	2.26	0.75~6.30	0.1384
切除	0.33	0.02~1.66	0.2109
Child Pugh A	0.50	0.12~3.46	0.4321
ALT50以上 (IFN前)	2.30	0.70~10.01	0.1808
AFP30以上 (IFN前)	7.36	1.47~27.08	0.0182*
SVR	2.29	0.82~6.57	0.1130
ALT30以上 (IFN後)	0.76	0.16~2.72	0.6798
AFP15以上 (IFN後)	1.87	0.39~7.17	0.4005

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（肝炎関係研究分野））
分担研究報告書

IFN前のHCC治療からIFN後2回目再発、および1回目の再発から2回目の再発までの期間に影響を及ぼす因子について検討したが、IFN前のHCC治療から2回目の再発までの期間を延長する因子として、IFN治療前のAFP値のみが有意であり、ハザード比7.36であった(表2)。

IFN前のHCC治療からIFN後3回目再発まで、もしくは1回目・2回目再発から3回目再発までの期間に影響を及ぼす因子に関して検討したが有意な項目は認めなかった。

次に生存期間に影響を及ぼす因子について検討を行った。こちらは一転して腫瘍因子の影響は少なく、IFN治療効果（SVR・SVR以外・NR）やIFN治療後のALT値やAFP値が有意であった(表3)。これらの項目を変数として多変量解析を行ったが有意な項目はなかったが、ハザード比はIFN後AFP値が15ng/ml以上であることが11.55で最も高かった(表4)。IFN治療効果別（SVR/NR）でカプランマイヤー法で生存率分析を行うとログランク・Wilcoxonとも有意であった(図1)。

表3. IFN投与前のHCC治療から死亡までの期間
(コックス比例ハザード生存モデル単変量)

予後因子	HR	95% CI	P value
腫瘍数2個以上	3.38	0.46-17.66	0.2010
腫瘍径2cm超	0.61	0.08-3.18	0.5607
Stage II以上	0.81	0.11-4.19	0.8023
RFA単独	0.53	0.07-2.49	0.4323
TACE+RFA	2.57	0.56-13.19	0.2163
切除	0.82	0.04-4.88	0.8501
Child Pugh A	0.33	0.06-2.43	0.2423
ALT50以上 (IFN前)	---	-----	---
AFP30以上 (IFN前)	2.68	0.38-12.55	0.2792
SVR	0.11	0.02-0.87	0.0329*
SVR以外	6.08	1.15-46.06	0.0329*
NR	8.75	1.82-62.55	0.0067*
ALT30以上 (IFN後)	6.13	1.26-44.22	0.0247*
AFP15以上 (IFN後)	10.78	2.26-76.74	0.0029*
RBV 80%未満	0.46	0.06-2.53	0.3868
IFN 80%未満	2.67	0.49-14.61	0.2412

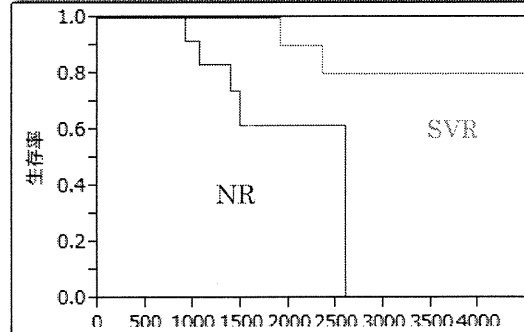
表4. IFN投与前のHCC治療から死亡までの期間
(コックス比例ハザード生存モデル多変量解析)

予後因子	HR	95% CI	P value
SVR以外	2.21	0.12-71.06	0.6162
ALT30以上 (IFN後)	2.15	0.22-25.88	0.5246
AFP15以上 (IFN後)	11.55	0.93-237.80	0.0579

D. 考察

再発抑制に寄与する因子は、1回目の再発は腫瘍個数（単発）、HCC治療後インターフェロン投与前のAFP値（30未満）、2回目の再発はインターフェロン投与終了時のAFP値（15未満）であった。腫瘍個数（単発）、HCC治療後インターフェロン投与前のAFP値（30未満）は腫瘍因子もしくは腫瘍治療後の状態を示す因子であると考えられる。

図1 IFN治療効果別の生存率（カプランマイヤー）



IFN投与前のHCC治療から死亡までの期間(日)

グループ間での検定

検定	カイ2乗	自由度	p値(Prob>ChiSq)
□ログランク	9.0580	2	0.0108*
Wilcoxon	9.0946	2	0.0106*

IFNの再発抑制効果を見るためには、腫瘍側の因子を同じ条件にしてみる必要があると考えられたので、HCC単発例に限定してIFNが初回再発に及ぼす影響について検討したが症例数が少ないためか有意差はなかった。

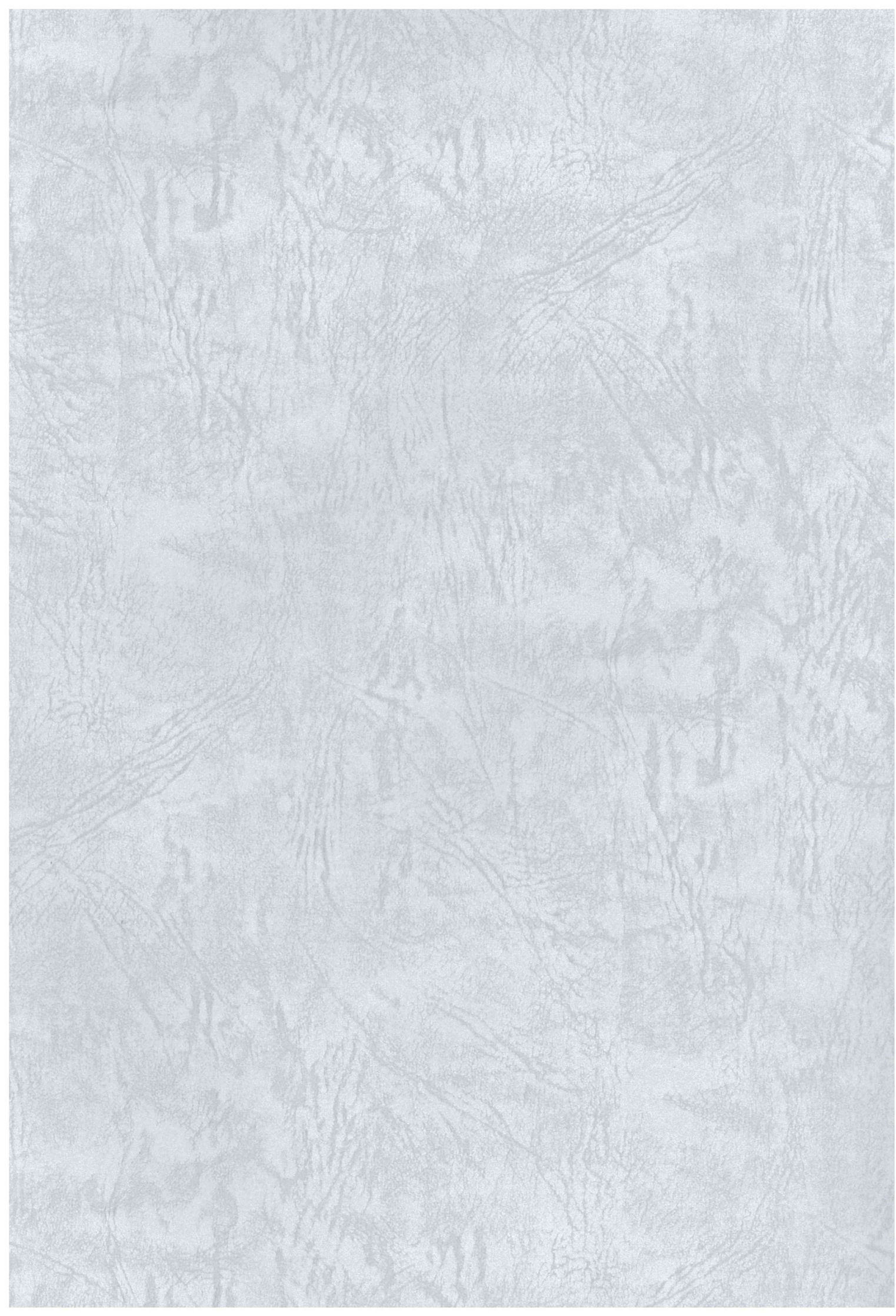
生存期間延長に寄与する因子は、インターフェロン治療効果（SVRであること、NRでないこと）、インターフェロン終了時のALT値（30未満）とAFP値（15未満）であった。これらはIFNによるウイルス排除の状態もしくはIFN治療後の肝の状態を示すものと考えられる。HCCは年間再発率20%といわれ再発が多い癌種ではあるが、IFNでHCV排除して肝機能を良好に保ち、繰り返すHCC再発に対する治療を根気強く行うことで生存期間が延長するという、臨床の現場での実感がそのままデータとなって示されたものと思う。

今回の検討はCase-Control studyではないため、IFN投与例と非投与例での再発率や生存率について検討したものではないが、HCC再発までの期間に関しては腫瘍因子が強く影響することが示され、また生存期間には腫瘍因子よりもIFN治療効果やIFN治療後の肝機能や腫瘍マーカーが強く影響していることが明らかになった。今後も症例数を増やしてさらに詳細な検討を行いたい。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし



2012400/0A(下巻)

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
(肝炎関係分野)

慢性肝炎・肝硬変・肝癌の病態解明と
各病態および都市形態別で求められる医療を考慮した
クリティカルパスモデルの開発のための研究

平成24年度 総括研究報告書 下巻

研究代表者 泉 並木

平成25(2013)年 3月

【分担研究者】

武蔵野赤十字病院 消化器科部長 朝比奈 靖浩	5
・C型慢性肝炎例における宿主IL28BとHCVコア70、91番変異、ISDR変異の地域・年齢分布に関する研究	
大阪赤十字病院 消化器科部長 大崎 往夫	289
・切除不能進行肝細胞癌に対する分子標的治療の予後予測に係る研究—観察研究および biomarker 探索研究—	
高槻赤十字病院 消化器科部長 玉田 尚	555
・データマイニング法を用いた、C型代償性肝硬変に対するペグインターフェロンアルファ-2a及びリバビリン併用治療の効果予測因子の解析	
旭川赤十字病院 消化器内科部長 長谷部 千登美	563
・B型肝炎からの発癌 HBVDNA量別の検討	

朝比奈 靖浩

武蔵野赤十字病院 消化器科部長

首都圏におけるテラプレビル3剤併用療法の実態

研究分担者名 朝比奈靖浩 東京医科歯科大学 教授

研究要旨：【目的】首都圏におけるテラプレビル(TVR)3剤併用療法の治療実態を調査し、より有効で安全な肝炎対策を検討する。【方法】首都圏域の基幹病院における3剤併用療法実施例の患者背景、治療成績を調査し、各種臨床データの解析と安全性の検討をした。【結果】調査した197例のうち65歳以上を25%、F3以上の線維化進展例を26%認めた。SVR4率は85%で、*IL28B*遺伝子多型は治療効果と関連し、特にマイナー・ホモ接合体は治療効果が低かった。50%以上は再治療例で前治療再燃例のSVR4率は96%、無効例は57%であった。65歳以上でも65歳未満とSVR4率は同等であったが、高齢者においては適応症例の厳密な選択と注意深い副作用対策が行われているためと考えられた。副作用は全例で認められ、発熱、貧血、皮疹の他、血中クレアチニン値および血中尿酸値の上昇が高頻度に認められた。24%に1500mg減量開始が行われていたが、SVR4率は2250mgが84%であったのに対し1500mg開始群では89%と有意差を認めなかった。【考察】高齢者においても、宿主・ウイルス因子およびインターフェロン反応性により適応を決定し、投薬調整と副作用対策を十分講じることで、比較的良好な治療効果が得られた。難治例においては投薬調整による副作用回避で安全性を確保しつつ治療継続することが治療成績向上に重要と考える。

A. 研究目的

テラプレビル(TVR)3剤併用療法は次世代プロテアーゼ阻害剤を待機できない症例で導入されることが多く、高齢、高度線維化、HCC治療後など治験対象群に比較して極めて宿主側の条件は厳しいことから、実臨床での効果と安全性の評価が重要である。今回、首都圏におけるTVR 3剤併用療法の治療実態を調査し、より有効で安全な肝炎対策を検討する。

B. 研究方法

首都圏域の基幹病院における治療実態を検討するために、お茶の水Liverカンファレンス共同研究病院における3剤併用療法実施例の3剤併用療法実施例の患者背景、治療成績を調査し、各種臨床データの解析と安全性の検討をした。

C. 研究結果

お茶の水Liverカンファレンス共同研究病院では197例にTVR 3剤併用療法が導入されていた。そのうち65歳以上を25%、F3以上の線維化進展例を26%認め、首都圏域における実臨床では、より発癌リスクの高い高齢者や線維化進展例に多く導入されていた。またこれらの症例は治療効果と言う観点からは難治例であり、副作用出現のリスクも高いと考えられた。全体におけるRVR率は79%でSVR4率は85%で、RVR達成例の91%がSVR4を達成した。*IL28B*遺伝子多型は治療効果と関連し、特にマイナー・ホモ接合体におけるSVR4率は25%と低率であった。

初回治療例のSVR4率は87%であったが、全体の50%以上は再治療例で前治療再燃例のSVR4率は96%、無効例は57%で、前治療無効例では治療効果が低かった。年齢別の検討では、65歳未満のSVR4率が83%であったのに対し、65歳以上でもSVR4率は同等であった。これは、高齢者においては高い治療効果が予測されるなど適応症例の厳密な選択と、治療開始後の注意深い副作用対策が行われているためと考えられた。F3以上の線維化進展例ではSVR4率は71%でF2以下の91%に比し低い傾向を認めた ($p = 0.083$)。副作用は全例で認められ、発熱、貧血、皮疹の他、血中クレアチニン値および血中尿酸値の上昇が高頻度に認められた。症例の76%がTVR 2250mg/日で治療が開始されていたが、ほぼ全例副作用による薬剤減量が行われた。1500mg/日投与開始症例では皮疹および高尿酸血症の出現、治療中止率は低く、SVR4率は89%と2250mg/日投与開始症例の84%と有意差を認めなかった。

D. 考察

首都圏域における実臨床では、より発癌リスクが高く、かつ難治例で副作用出現リスクの高い、高齢者や線維化進展例にTVR 3剤併用療法が多く導入されていた。高齢者における治療効果が、非高齢者のそれと遜色がなかったのは、宿主・ウイルス因子およびインターフェロン反応性により治療効果が期待できる症例を予測し、TVR 3剤併用療法の適応を厳密に決定していたためと考えられた。また、治療に際しても、投薬投与量の調整と副作用対策を十分講じていたためと考えられた。

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（肝炎関係研究分野））
分担研究報告書

E. 結論

高齢者、高度線維化例においても、宿主・ウイルス因子およびインターフェロン反応性により適応を決定し、投薬調整と副作用対策を十分講じることで、比較的良好な治療効果が得られた。難治例においては投薬調整による副作用回避で安全性を確保しつつ治療継続することが治療成績向上に重要と考える。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M: Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology*. 57(1):46-58, 2013.
2. Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S, Sakamoto N, Izumi N: Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in interleukin 28B with antiviral response. *Hepatology*. 55: 20-29, 2012.
3. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fujiki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M: Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. *Hepatology*. 2012; in press.
4. Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Yamada G, Kawai T, Kajiwara E, Okamura Y, Takeuchi T, Yokosuka O, Kariyama K, Toyoda J, Inao M, Tanaka E, Morikawa H, Adachi K, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsushashi H, Oketani M, Kumada H: Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFN α 2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multi-center cooperative study. *J Gastroenterol*. (Epub ahead of print) 2012.
5. Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Ttoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide: Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. *PLoS One* 7(6):e39175, 2012.
6. Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K: No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet*. 13: 47 2012.
7. Tamaki N, Kurosaki M, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Izumi N: Noninvasive estimation of fibrosis progression overtime using the FIB-4 index in chronic hepatitis CN. *J Viral Hepat*. 20(1):72-76, 2012.
8. Toyoda J, Ozeki I, Asahina Y, Izumi N, Takahashi S, Kawakami Y, Chayama K, Kamiya N, Aoki K, Yamada I, Suzuki Y, Suzuki F, Kumada H: Virologic response and safety of 24-week telaprevir alone in Japanese patients infected with hepatitis C virus subtype 1b. *J Viral Hepat*. 20(3):167-173 2012.
9. Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology Research* 2013; 43: 1-34
10. 朝比奈靖浩、泉 並木、桶谷 眞、熊田博光、小池和彦、鈴木文孝、滝川 一、田中 篤、坪内博仁、林 紀夫、平松直樹、四柳 宏（日本肝臓学会肝炎ガイドライン作成委員会）：C型肝炎治療ガイドライン（第1版）肝臓. 53(6)：355-395 社団法人日本肝臓学会，2012

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（肝炎関係研究分野））
分担研究報告書

2. 著書

1. 朝比奈靖浩：肝炎 臨床検査のガイドライン。 272-278 株式会社宇宙堂八木書店, 2012
2. 朝比奈靖浩：C型肝炎ウイルスマーカー 感度と特異度からひもとく 感染症診療のDecision Making 242-247 文光堂, 2012
3. 朝比奈靖浩：C型肝炎の経過と予後 肝炎ウイルス-B型・C型 70-75 医薬ジャーナル社, 2012
4. 朝比奈靖浩：肝発癌抑制を目指したインターフェロン療法 最新！C型肝炎の使いかた。 43-45 診断と治療社, 2012
5. 朝比奈靖浩：4. ウイルス学的検査 A. A型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版。 34 南江堂, 2012
6. 朝比奈靖浩：4. ウイルス学的検査 B. B型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版。 35-40 南江堂, 2012
7. 朝比奈靖浩：4. ウイルス学的検査 C. C型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版。 40-43 南江堂, 2012
8. 朝比奈靖浩：4. ウイルス学的検査 D. D型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版。 43-44 南江堂, 2012
9. 朝比奈靖浩：4. ウイルス学的検査 E. E型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版。 44 南江堂, 2012
10. 朝比奈靖浩：6. C型慢性肝炎 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版。 95-101 南江堂, 2012
11. 朝比奈靖浩：A-2. C型慢性肝炎 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版。 189-219 南江堂, 2012

2. 学会発表

1. Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Katoh T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Izumi N: Suppression of Alpha-fetoprotein by Interferon Therapy Reduces The Risk of Hepatocarcinogenesis in Patients with Chronic Hepatitis C. EASL: The international liver congress 2012. Barcelona, 2012年4月21日

2. Yasuhiro Asahina, Miyako Murakawa, Naoya Sakamoto, Sei Kakinuma, Mina Nakagawa, Seishin Azuma, Yuki Nishimura-Sakurai, Sayuri Nitta, Akiko Kusano-Kitazume, Mamoru Watanabe; Impaired IL28B gene induction and poor IL28B promoter activity influenced by the IL28B minor allele are closely associated with a null response to interferon in chronic hepatitis C patients. 63rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-11-2012, Boston, MA. USA.
3. 朝比奈靖浩、村川美也子、渡辺守：C型肝炎治療不能性に関わる自然免疫分子機構とHCV逃避機構（シンポジウム1）第39回日本肝臓学会東部会 2012年12月6日 東京。
4. 朝比奈靖浩、泉 並木：インターフェロン不応性の予測とプロテアーゼ阻害薬3剤併用療法の治療効果 第98回日本消化器病学会総会 東京, 2012年4月20日
5. 朝比奈靖浩、村川美也子、渡辺守：C型肝炎治療不能性に関わる自然免疫分子機構とHCV逃避機構（シンポジウム1）第39回日本肝臓学会東部会 2012年12月6日 東京。
6. 朝比奈靖浩、泉 並木：インターフェロン不応性の予測とプロテアーゼ阻害薬3剤併用療法の治療効果 第98回日本消化器病学会総会 東京, 2012年4月20日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
朝比奈 靖浩	肝疾患	日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会	臨床検査のガイドライン	株式会社宇宙堂八木書店	東京	2012	272-278
朝比奈 靖浩	C型肝炎ウイルスマーカー	細川 直登	感度と特異度からひもとく感染症診療のDecision Making	文光堂	東京	2012	242-247
朝比奈 靖浩	C型肝炎の経過と予後	熊田 博光	肝炎ウイルスーB型・C型	医薬ジャーナル	大阪	2012	70-75
朝比奈 靖浩	肝発癌抑制を目指したインターフェロン療法	芥田 憲夫 斉藤 聡 角田 圭雄	最新！C型肝炎の使いかた	診断と治療社	東京	2012	43-45
朝比奈 靖浩	4. ウイルス学的検査 A. A型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	34
朝比奈 靖浩	4. ウイルス学的検査 B. B型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	35-40
朝比奈 靖浩	4. ウイルス学的検査 C. C型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	40-43
朝比奈 靖浩	4. ウイルス学的検査 D. D型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	43-44
朝比奈 靖浩	4. ウイルス学的検査 E. E型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	44
朝比奈 靖浩	6. C型慢性肝炎	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	95-101
朝比奈 靖浩	A-2. C型慢性肝炎	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	189-219

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M	Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity.	Hepatology	57(1)	46-58	2013
Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshio Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S, Sakamoto N, Izumi N	Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in interleukin 28B with antiviral response.	Hepatology	55	20- 29	2012
Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fujiki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M	Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells.	Hepatology	in press		2012
Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Yamada G, Kawai T, Kajiwara E, Okamura Y, Takeuchi T, Yokosuka O, Kariyama K, Toyoda J, Inao M, Tanaka E, Morikawa H, Adachi K, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsushashi H, Oketani M, Kumada H	Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFN α 2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multi-center cooperative study.	J Gastroenterol.	Epub ahead of print		2012

Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Ttoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide	Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean.	PLoS One	7(6)	e39175	2012
Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K	No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations.	BMC Med Genet	13	47	2012
Tamaki N, Kurosaki M, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Izumi N	Noninvasive estimation of fibrosis progression overtime using the FIB-4 index in chronic hepatitis CN.	J Viral Hepat	20(1)	72-76	2012
Toyoda J, Ozeki I, Asahina Y, Izumi N, Takahashi S, Kawakami Y, Chayama K, Kamiya N, Aoki K, Yamada I, Suzuki Y, Suzuki F, Kumada H	Virologic response and safety of 24-week telaprevir alone in Japanese patients infected with hepatitis C virus subtype 1b.	J Viral Hepat	20(3)	167-173	2012
Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H	editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection.	Hepatology Research	43	1-34	2013

朝比奈靖浩、泉 並木、桶谷 眞、熊田博光、小池和彦、鈴木文孝、滝川 一、田中 篤、坪内博仁、林 紀夫、平松直樹、四柳 宏（日本肝臓学会肝炎ガイドライン作成委員会）	C型肝炎治療ガイドライン（第1版）	肝臓	53(6)	355-395	2012
---	-------------------	----	-------	---------	------

Association of Gene Expression Involving Innate Immunity and Genetic Variation in Interleukin 28B With Antiviral Response

Yasuhiro Asahina,¹ Kaoru Tsuchiya,¹ Masaru Muraoka,^{1,2} Keisuke Tanaka,^{1,2} Yuichiro Suzuki,^{1,2} Nobuharu Tamaki,¹ Yoshihide Hoshioka,¹ Yutaka Yasui,¹ Tomoji Katoh,¹ Takanori Hosokawa,¹ Ken Ueda,¹ Hiroyuki Nakanishi,¹ Jun Itakura,¹ Yuka Takahashi,¹ Masayuki Kurosaki,¹ Nobuyuki Enomoto,² Sayuri Nitta,³ Naoya Sakamoto,³ and Namiki Izumi¹

Innate immunity plays an important role in host antiviral response to hepatitis C viral (HCV) infection. Recently, single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *IL28B* and host response to peginterferon α (PEG-IFN α) and ribavirin (RBV) were shown to be strongly associated. We aimed to determine the gene expression involving innate immunity in *IL28B* genotypes and elucidate its relation to response to antiviral treatment. We genotyped *IL28B* SNPs (rs8099917 and rs12979860) in 88 chronic hepatitis C patients treated with PEG-IFN α -2b/RBV and quantified expressions of viral sensors (*RIG-I*, *MDA5*, and *LGP2*), adaptor molecule (*IPS-1*), related ubiquitin E3-ligase (*RNF125*), modulators (*ISG15* and *USP18*), and *IL28* (*IFN λ*). Both *IL28B* SNPs were 100% identical; 54 patients possessed rs8099917 TT/rs12979860 CC (*IL28B* major patients) and 34 possessed rs8099917 TG/rs12979860 CT (*IL28B* minor patients). Hepatic expressions of viral sensors and modulators in *IL28B* minor patients were significantly up-regulated compared with that in *IL28B* major patients (≈ 3.3 -fold, $P < 0.001$). However, expression of *IPS-1* was significantly lower in *IL28B* minor patients (1.2-fold, $P = 0.028$). Expressions of viral sensors and modulators were significantly higher in nonvirological responders (NVR) than that in others despite stratification by *IL28B* genotype (≈ 2.6 -fold, $P < 0.001$). Multivariate and ROC analyses indicated that higher *RIG-I* and *ISG15* expressions and *RIG-I/IPS-1* expression ratio were independent factors for NVR. *IPS-1* down-regulation in *IL28B* minor patients was confirmed by western blotting, and the extent of *IPS-1* protein cleavage was associated with the variable treatment response. **Conclusion:** Gene expression involving innate immunity is strongly associated with *IL28B* genotype and response to PEG-IFN α /RBV. Both *IL28B* minor allele and higher *RIG-I* and *ISG15* expressions and *RIG-I/IPS-1* ratio are independent factors for NVR. (HEPATOLOGY 2012;55:20-29)

Infection with hepatitis C virus (HCV) is a common cause of chronic hepatitis, which progresses to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in many patients.¹ Pegylated interferon α (PEG-IFN α) and ribavirin (RBV) combination therapy has been used to treat chronic hepatitis C (CH-C) to alter the

natural course of this disease. However, 20% patients are nonvirological responders (NVR) whose HCV-RNA does not become negative during the 48 weeks of PEG-IFN α /RBV combination therapy.² In a recent genome-wide association study, single nucleotide polymorphisms (SNPs) located near interleukin 28B

Abbreviations: CH-C, chronic hepatitis C; γ -GTP, γ -glutamyl transpeptidase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HCV, hepatitis C virus; HMBS, hydroxymethylbilane synthase; *IL28*, interleukin 28; *IPS-1*, *IFN β* promoter stimulator 1; *ISG15*, interferon-stimulated gene 15; *MDA5*, melanoma differentiation associated gene 5; NVR, nonvirological responders; PEG-IFN α , pegylated interferon α ; SNP, single nucleotide polymorphism; *RIG-I*, retinoic acid-inducible gene I; RBV, ribavirin; *RNF125*, ring-finger protein 125; ROC, receiver operator characteristic; SVR, sustained viral responder; TVR, transient virological responder; *USP18*, ubiquitin-specific protease 18; VR, virological responder.

From the ¹Department of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, Tokyo, Japan; ²First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Yamanashi, Yamanashi, Japan; ³Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

Received May 14, 2011; accepted August 16, 2011.

Supported by grants from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology and the Japanese Ministry of Welfare, Health and Labor. The funding source had no role in the collection, analysis, or interpretation of the data, or in the decision to submit the article for publication.

(*IL28B*) that encodes for type III IFN λ 3 were shown to be strongly associated with a virological response to PEG-IFN α /RBV combination therapy.³⁻⁵ In particular, the rs8099917 TG and GG genotypes were shown to be strongly associated with a null virological response to PEG-IFN α /RBV.³ However, mechanisms involving resistance to PEG-IFN α /RBV have not been completely elucidated.

The innate immune system has an essential role in host antiviral defense against HCV infection.⁶ The retinoic acid-inducible gene I (RIG-I), a cytoplasmic RNA helicase, and related melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5) play essential roles in initiating the host antiviral response by detecting intracellular viral RNA.^{7,8} The IFN β promoter stimulator 1 (IPS-1)—also called the caspase-recruiting domain adaptor inducing IFN β , mitochondrial antiviral signaling protein, or virus-induced signaling adaptor—is an adaptor molecule. IPS-1 connects RIG-I sensing to downstream signaling, resulting in IFN β gene activation.⁹⁻¹² RIG-I sensing of incoming viral RNA has been shown to be modified by LGP2,^{8,13} a helicase related to RIG-I and MDA5 lacking caspase-recruiting domain. The ubiquitin ligase ring-finger protein 125 (RNF125) has been shown to conjugate ubiquitin to RIG-I, MDA5, and IPS-1 and this suppresses the functions of these proteins.¹⁴ Further, these molecules are ISGylated by the IFN-stimulated gene 15 (ISG15), a ubiquitin-like protein,¹⁵ and ISG15 is specifically removed from ISGylated protein by ubiquitin-specific protease 18 (USP18) to regulate the RIG-I/IPS-1 system.^{16,17} Moreover, the NS3/4A protease of HCV specifically cleaves IPS-1 as part of its immune-evasion strategy.^{9,18} Therefore, the RIG-I/IPS-1 system and its regulatory systems have essential roles in the innate antiviral response.

Recently, we demonstrated that baseline intrahepatic gene expression levels of the RIG-I/IPS-1 system were prognostic biomarkers of the final virological outcome in CH-C patients who were treated with PEG-IFN α /RBV combination therapy.¹⁹ We found that up-regulation of *RIG-I* and *ISG15* and a higher expression ratio of *RIG-I/IPS-1* could predict NVR for subsequent treatment with PEG-IFN α /RBV combination therapy.¹⁹ However, association of gene expression involv-

ing innate immunity and genetic variation of *IL28B* has not yet been elucidated. Hence, the aim of this study was to determine gene expression involving the innate immune system in different genetic variations of *IL28B* and elucidate the relation of gene expression to final virological outcome of PEG-IFN α /RBV combination therapy in CH-C patients.

Patients and Methods

Patients. Among histologically proven CH-C patients admitted at the Musashino Red Cross Hospital, 88 patients with HCV genotype 1b and a high viral load (>5 log IU/mL by TaqMan HCV assay; Roche Molecular Diagnostics, Tokyo, Japan) were included in the present study (Table 1). Patients with decompensated liver cirrhosis, autoimmune hepatitis, or alcoholic liver injury were excluded. No patient had tested positive for hepatitis B surface antigen or anti-human immunodeficiency virus antibody or had received immunomodulatory therapy before enrollment. Forty-two patients had been enrolled in a previous study that determined hepatic gene expression involving innate immunity.¹⁹ Written informed consent was obtained from all patients and the study was approved by the Ethical Committee of Musashino Red Cross Hospital in accordance with the Declaration of Helsinki.

Treatment Protocol. The patients were administered subcutaneous injections of PEG-IFN α -2b (PegIntron, MSD, Whitehouse Station, NJ) at a dose of 1.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ week $^{-1}$ for 48 weeks. RBV (Rebetol, MSD) was administered concomitantly over this treatment period, administered orally twice daily at 600 mg/day for patients who weighed less than 60 kg and 800 mg/day for patients who weighed between 60-80 kg. The dose of PEG-IFN α -2b was reduced to 0.75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ week $^{-1}$ when either neutrophil count was less than 750/mm 3 or platelet count was less than 80×10^3 /mm 3 . The dose of RBV was reduced to 600 mg/day when the hemoglobin concentration decreased to 10 g/dL. More than 80% adherence was achieved in all patients.

Measurement of Hepatic Gene Expression. Liver biopsy was performed immediately before initiating

Address reprint requests to: Namiki Izumi, M.D., Ph.D., Chief, Department of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, 1-26-1 Kyonancho 1-26-1, Musashinoshi, Tokyo 180-8610, Japan. E-mail: nizumi@musashino.jrc.or.jp; fax: +81-422-32-9551.

Copyright © 2011 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.24623

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Table 1. Patient Characteristics and *IL28B* Genotype

	<i>IL28B</i> Major*	<i>IL28B</i> Minor†	P-value‡
Patients, n	54	34	
Age (SD), year	58.8 (10.0)	59.1 (10.3)	0.918§
Sex, n (%)			0.051
Male	13 (24.1)	15 (44.1)	
Female	41 (75.9)	19 (55.9)	
BMI (SD), kg/m ²	22.7 (3.5)	23.5 (3.6)	0.193§
ALT (SD), IU/L	61.3 (50.7)	62.4 (44.7)	0.962§
γ-GTP (SD), IU/L	36.7 (25.9)	57.3 (52.4)	0.010§
LDL-cholesterol (SD), mg/dL	103.3 (29.8)	91.8 (26.9)	0.067§
Hemoglobin (SD), g/dL	14.1 (1.4)	14.4 (1.3)	0.186§
Platelet count (SD), ×10 ³ /μL	161 (6.4)	163 (4.4)	0.489§
Fibrosis stage, n (%)			0.532
F1, 2	38 (70.4)	26 (76.5)	
F3, 4	16 (29.6)	8 (23.5)	
Viral load (SD), ×10 ^{6.3} IU/mL	1.7 (1.4)	1.9 (2.0)	0.788§
%HCV core 70 & 91 a.a. double mutation¶	8.9	43.5	0.001
%ISDR wild**	43.5	51.7	0.486
Viral response, n (%)			<0.001
SVR	17 (31.5)	13 (38.2)	
TVR	26 (48.1)	3 (8.8)	
NVR	11 (20.4)	18 (52.9)	

Unless otherwise indicated, data are given as mean (SD).

*rs8099917 TT and rs12979860 CC.

†rs8099917 TG and rs12979860 CT.

BMI, body mass index; ALT, alanine aminotransferase; γ-GTP, γ-glutamyl transpeptidase; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HCV, hepatitis C virus; ISDR, interferon sensitivity determining region; SVR, sustained virological response; TVR, transient virological response; NVR, nonvirological response.

‡Comparison between *IL28B* major and minor genotypes.

§Mann-Whitney U test.

||Chi-square test.

¶HCV core mutation was determined in 68 patients.

**ISDR was determined in 75 patients.

the therapy. After extraction of total RNA from liver biopsy specimens, the messenger RNA (mRNA) expression of the positive and negative cytoplasmic viral sensor (*RIG-I*, *MDA5*, and *LGP2*), the adaptor molecule (*IPS-1*), the related ubiquitin E3-ligase (*RNF125*), the modulators of these molecules (*ISG15* and *USP18*), and *IFNλ* (*IL28A/B*) was quantified by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) using target gene-specific primers. In brief, total RNA was extracted by the acid-guanidinium-phenol-chloroform method using Isogen reagent (Nippon Gene, Toyama, Japan) from the liver biopsy specimen, which was 0.2-0.4 cm in length and 13G in diameter. Complementary DNA (cDNA) was transcribed from 2 μg of total RNA template in a 140-μL reaction mixture using the SYBR RT-PCR Kit (Takara Bio, Otsu, Japan) with random hexamer. Real-time quantitative PCR was performed using Smart Cycler version II (Takara Bio) with the SYBR RT-PCR Kit (Takara Bio) according to the manufacturer's instructions. Assays were performed in duplicate and the expression levels

of target genes were normalized to the expressions of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) gene and hydroxymethylbilane synthase (*HMBS*), an enzyme that is stable in the liver, as quantified using real-time quantitative PCR as internal controls. For accurate normalization, a set of two housekeeping genes was used in the present study. Sequences of the primer sets were as follows: *RIG-I*, 5'-AAAGCATGCA TGGTGTTCAGCA-3', 5'-TCATTCGTGCATGCTC ACTGATAA-3'; *MDA5*, 5'-ACATAACAGCAACATG GGCAGTG-3', 5'-TTTGGTAAGGCCTGAGCTGG AG-3'; *LGP2*, 5'-ACAGCCTTGCAAACAGTACAAC CTC-3', 5'-GTCCCAAATTTCCGGCTCAAC-3'; *IPS-1*, 5'-GGTGCCATCCAAAGTGCCTACTA-3', 5'-CAGC ACGCCAGGCTTACTCA-3'; *RNF125*, 5'-AGGGCA CATATTCGGACTTGTC-3', 5'-CGGGTATTAAAC GGCAAAGTGG-3'; *ISG15*, 5'-AGCGAAGTCTCT TTGCCAGTACA-3', 5'-CAGCTCTGACACCGACA TGGA-3'; *USP18*, 5'-TGTTCTGCTTCAATGACT CCAATA-3', 5'-TTTGGGCATTTCCATTAGCACT C-3'; *IFNλ*: 5'-CAGCTGCAGGTGAGGGA-3', 5'-G GTGGCCTCCAGAACCTT-3'; *GAPDH*, 5'-GCACC GTCAAGGCTGAGAAC-3', 5'-ATGGTGGTGAAGA CGCCAGT-3'; *HMBS*, 5'-AAGCGGAGCCATGTCT GGTAAC-3', 5'-GTACCCACGCGAATCACTCTCA-3'.

Genotyping for *IL28B* (rs8099917 and rs12979860) Polymorphism. Genetic polymorphism in a tagged SNP located near the *IL28B* gene (rs8099917 and rs12979860) was determined by direct sequencing of PCR-amplified DNA. In brief, after extraction from whole blood samples, genomic DNA was amplified by PCR. Sequences of the primer sets were: rs8099917, 5'-ATCCTCCTCTCATCCCTCA TC-3', 5'-GGTATCAACCCCACCTCAAAT-3'; rs129 79860, 5'-GGACGAGAGGGCGTTAGAG-3', 5'-AG GGACCGCTACGTAAGTCAC-3'.

Both strands of the PCR products were sequenced by the dye terminator method using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Chiba, Japan); nucleotide sequences were determined by a capillary DNA sequencer ABI3730xl (Applied Biosystems). Homozygosity (rs8099917 GG and rs12979860 TT) or heterozygosity (rs8099917 TG and rs12979860 CT) of the minor sequence was defined as having the *IL28B* minor allele, whereas homozygosity for the major sequence (rs8099917 TT and rs12979860 CC) was defined as having the *IL28B* major allele.

Western Blotting. Western blotting was performed using samples from 14 patients (six from *IL28B* major patients and eight from *IL28B* minor patients) as described.¹⁹ In brief, liver biopsy specimens of

approximately 10 mg were homogenized in 100 μ L of Complete Lysis-M (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Next, 30 μ g of protein was separated by NuPAGE 4%-12% Bis-Tris gels (Invitrogen, Carlsbad, CA) and blotted on polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were immunoblotted with anti-RIG-I (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) or anti-IPS-1 (Enzo Life Science, Farmingdale, NY), followed by anti- β -actin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). After immunoblotting with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, signals were detected by chemiluminescence (BM Chemiluminescence Blotting Substrate, Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Optical densitometry was performed using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). Naive Huh7 cells were used for a positive control for full-length IPS-1, and cells transfected with HCV-1b subgenomic replicon²⁰ were used for a positive control for cleaved IPS-1.

Definitions of Response to Therapy. A patient negative for serum HCV-RNA during the first 6 months after completing PEG-IFN α -2b/RBV combination therapy was defined as a sustained viral responder (SVR), and a patient for whom HCV-RNA became negative at the end of therapy and reappeared after completion of therapy was defined as a transient virological responder (TVR). A patient for whom HCV-RNA became negative at the end of therapy (SVR + TVR) was defined as a virological responder (VR). A patient whose HCV-RNA did not become negative during the course of therapy was defined as an NVR. HCV-RNA was determined by TaqMan HCV assay (Roche Molecular Diagnostics).

Statistical Analysis. Categorical data were compared using the chi-square test and Fisher's exact test. Distributions of continuous variables were analyzed by the Mann-Whitney *U* test for two groups. All tests of significance were two-tailed and *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Patient Characteristics and IL28B Genotype. Table 1 shows patient characteristics according to *IL28B* genotype. SNPs at rs8099917 and rs12979860 were 100% identical; 54 patients were identified as having the major alleles (rs8099917 TT/rs12979860 CC; *IL28B* major patients) and the remaining 34 had the minor alleles (rs8099917 TG/rs12979860 CT; *IL28B* minor patients). Patients having a minor homozygote (rs8099917 GG or rs12979860 TT) were not found in this study, which is consistent with a recent report

of the rarity of a minor homozygote in Japanese patients.³ *IL28B* minor patients were significantly associated with a higher γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) level and higher frequency of mutations at amino acid positions 70 and 91 of the HCV core region (glutamine or histidine mutation at amino acid position 70; methionine mutation at amino acid position 91). NVR rate was significantly higher in *IL28B* minor patients than in *IL28B* major patients.

Gene Expression Involving Innate Immunity and IFN λ in the Liver. Hepatic expression levels of cytoplasmic viral sensors (*RIG-I*, *MDA5*, and *LGP2*) were significantly higher in *IL28B* minor patients than in *IL28B* major patients (Fig. 1). Similarly, expressions of *ISG15* and *USP18* were significantly higher in *IL28B* minor patients than in *IL28B* major patients (Fig. 1). In contrast, the hepatic expression of the adaptor molecule (*IPS-1*) was significantly lower in *IL28B* minor patients than that in *IL28B* major patients (Fig. 1). Hepatic expression of *RNF125* was similar among *IL28B* genotypes (Fig. 1). *IFN λ* (*IL28A/B*) expression was higher in *IL28B* minor patients, but not statistically significant (Fig. 1). Because expression of *RIG-I* and *IPS-1* were negatively correlated, the expression ratio of *RIG-I/IPS-1* in *IL28B* minor patients was significantly higher than in *IL28B* major patients (Fig. 1).

Next, to assess the relationship between baseline hepatic gene expression and treatment efficacy, we compared levels of gene expression involving innate immunity and *IFN λ* based on the final virological response (Fig. 2). Overall, hepatic expressions of cytoplasmic viral sensors and the *ISG15/USP18* system in NVR patients were significantly higher than those in VR patients. In a similar but opposite manner, hepatic expressions of *IPS-1* and *RNF125* in NVR patients were significantly lower than that in VR patients, and the expression of *IFN δ* was higher in NVR patients, but the differences were not statistically significant. Expression ratio of *RIG-I/IPS-1* was significantly higher in NVR patients than that in VR patients.

Because hepatic expressions of the *RIG-I/IPS-1* and *ISG15/USP18* systems were significantly related both to *IL28B* minor and NVR patients, *RIG-I* and *ISG15* expression levels and the *RIG-I/IPS-1* ratio between VR and NVR patients were further stratified by *IL28B* genotype (Fig. 3). Even in the subgroup of *IL28B* minor patients, the expressions of *RIG-I* and *ISG15* were significantly higher in NVR patients than those in VR patients. Similar tendencies were observed in a subgroup of *IL28B* major patients, in whom the *RIG-I/IPS-1* expression ratio was significantly higher in

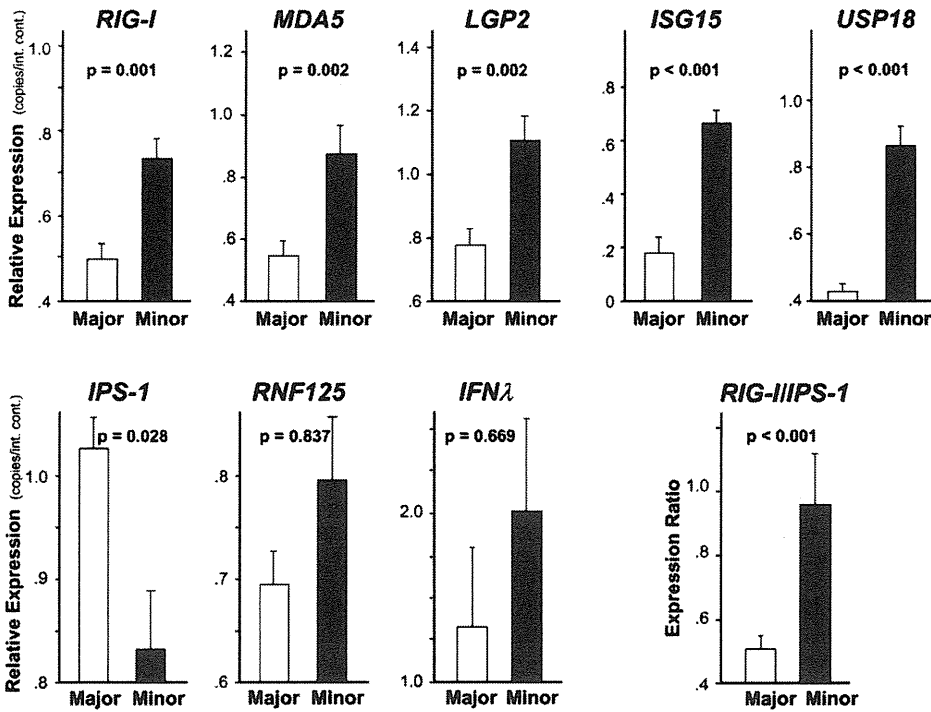


Fig. 1. Comparison of hepatic gene expression levels between *IL28B* major (rs8099917 TT/rs12979860 CC, n = 54) and *IL28B* minor patients (rs8099917 TG/rs12979860 CT, n = 34). Expression levels of cytoplasmic viral sensors (*RIG-I*, *MDA5*, and *LGP2*), modulators (*ISG15* and *USP18*), an adaptor (*IPS-1*), negative regulators (*RNF125*) and *IFNλ*, and expression ratio of the *RIG-I/IPS-1* are shown. Error bars indicate standard error. The *P*-values were determined by the Mann-Whitney *U* test.

NVR patients than in VR patients. However, in patients of the same virological response subgroup, *RIG-I* and *ISG15* expression levels and *RIG-I/IPS-1* ratio were higher in *IL28B* minor patients, and the difference in *ISG15* expression in subgroup of VR and NVR patients and that in *RIG-I/IPS-1* ratio in subgroup of VR patients was statistically significant between *IL28B* genotypes (Fig. 3).

Receiver Operator Characteristic (ROC) Analysis. To determine the usefulness of these gene quantifications and *IL28B* genotyping as predictors of NVR, an ROC analysis was conducted (Fig. 4A). The area under the ROC curve for *RIG-I* and *ISG15* expressions and *RIG-I/IPS-1* expression ratio was 0.712, 0.782, and 0.732, respectively, suggesting that quantification of these gene transcripts is useful for

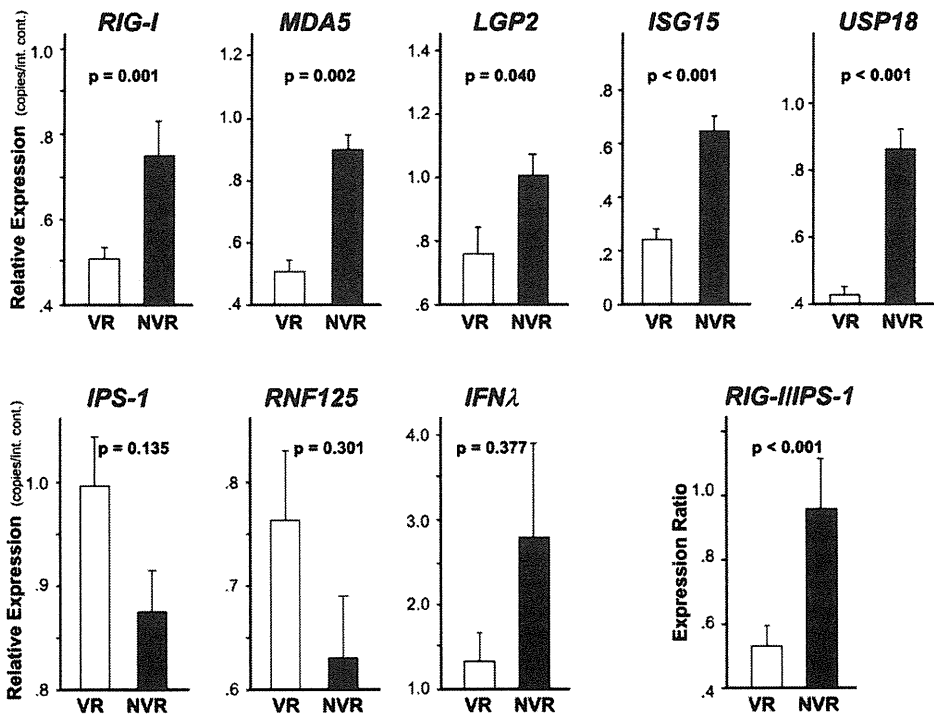


Fig. 2. Comparison of hepatic gene expression levels between virological responders (VR, n = 60) and nonvirological responders (NVR, n = 28). Expression levels of cytoplasmic viral sensors (*RIG-I*, *MDA5*, and *LGP2*), modulators (*ISG15* and *USP18*), an adaptor (*IPS-1*), negative regulators (*RNF125*) and *IFNλ*, and *RIG-I/IPS-1* expression ratio are shown. Error bars indicate standard error. The *P*-values were determined by the Mann-Whitney *U* test.

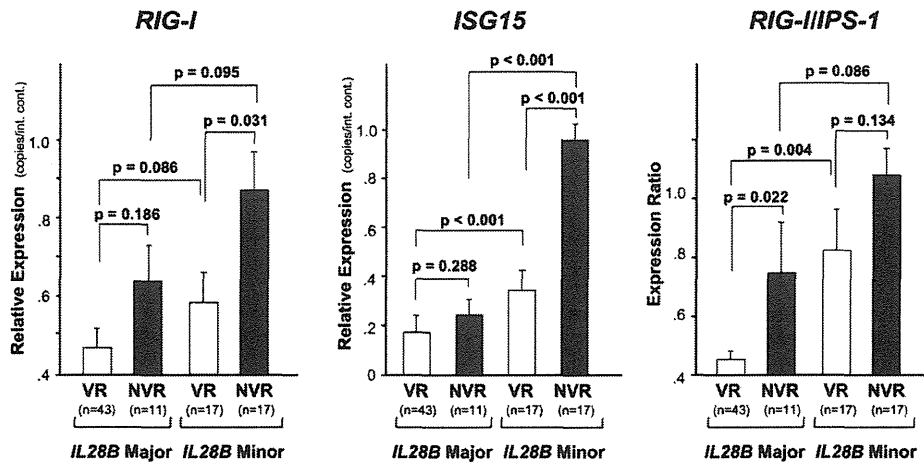


Fig. 3. Comparison of hepatic gene expression levels between virological responders (VR) and nonvirological responders (NVR) in subgroups of the *IL28B* genotype (*IL28B* Major, rs8099917 TT/rs12979860 CC; *IL28B* Minor, rs8099917 TG/rs12979860 CT). Expressions of *RIG-I* and *ISG15* as well as the *RIG-I/IPS-1* expression ratio are shown. Error bars indicate standard error. The numbers of patients in each subgroup are shown in the bottom of the figure.

prediction of NVR (Table 2). The area under the ROC curve for *IL28B* genotype was 0.662, which was lower compared with that for *RIG-I* and *ISG15* expressions and *RIG-I/IPS-1* ratio.

When we stratified the patients by the cutoff value for *RIG-I* and *ISG15* expressions and *RIG-I/IPS-1* ratio, no statistically significant difference was found in

NVR rates among *IL28B* genotypes within the same subgroup (Fig. 4B).

Factors Associated with NVR. In univariate analysis, age, platelet counts, double mutation at amino acid positions 70 and 91 of the HCV core region, *IL28B* minor allele, and hepatic expressions of *RIG-I*, *MDA5*, *LGP2*, *ISG15*, and *USP18*, and *RIG-I/IPS-1* ratio were significantly

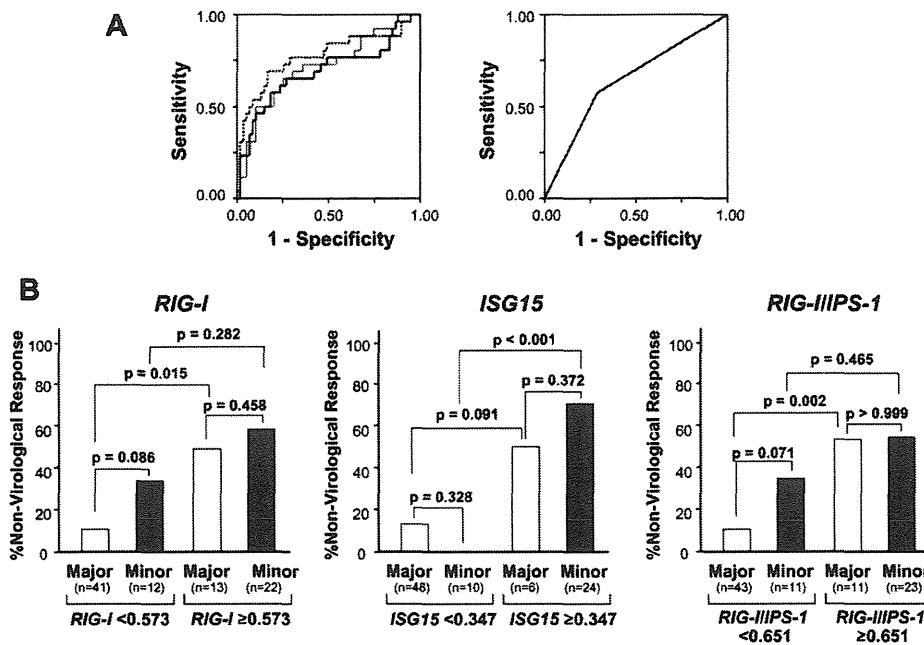


Fig. 4. (A) Receiver operator characteristics (ROC) curve for prediction of nonvirological response. ROC curves were generated to compare *RIG-I* (black line), *ISG15* (dotted line), and *RIG-I/IPS-1* ratio (gray line) (all in the left panel), and *IL28B* genotype (in the right panel). (B) Nonvirological response rate in *IL28B* major (rs8099917 TT/rs12979860 CC) and minor patients (rs8099917 TG/rs12979860 CT) in subgroups divided by the cutoff value of *RIG-I* and *ISG15* expression and the *RIG-I/IPS-1* ratio determined by ROC analysis. Cutoff values of *RIG-I* and *ISG15* expression are expressed as expression copy number normalized to the expression of an internal control. The numbers of patients in each subgroup are shown in the bottom of the figure.