

201320035A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）

肝細胞への取り込み機構に着目したC型およびB型肝炎
治療薬新規奏功因子の同定

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 降幡 知巳

平成26（2014）年 5月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）

肝細胞への取り込み機構に着目したC型およびB型肝炎治療薬新規奏功因子の同定

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 降幡 知巳

平成26（2014）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

肝細胞への取り込み機構に着目したC型およびB型肝炎治療薬新規奏功因子の同定 降幡 知巳	-----	3
--	-------	---

II. 分担研究報告

1. C型肝炎治療薬リバビリン輸送体主要mRNA分子種同定によるリバビリン薬理ゲノム学的解析基盤の確立

千葉 寛	-----	10
------	-------	----

2. 前治療無効日本人C型肝炎患者における三剤併用療法奏効関連因子の同定

坪田 昭人	-----	14
-------	-------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	21
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	25
-----------------	-------	----

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）） 総括研究報告書

肝細胞への取り込み機構に着目したC型およびB型肝炎治療薬新規奏功因子の同定

研究代表者 降幡 知巳

研究要旨

新薬の登場により肝炎の治療奏効率は近年飛躍的に向上している。しかし、未だ残り数十%の患者では十分な治療効果が得られず、またその要因は明らかとなっていない。本研究事業では、難治性肝炎の奏効率を向上させるため、B型およびC型肝炎治療薬の取り込み輸送体（トランスポーター）の機能に着目することにより、肝炎治療に貢献する新規宿主因子を明らかにすることを主目的としている。これに準じ、平成25年度は肝取り込み輸送体を軸に、個別化治療発展に貢献しうる肝炎治療薬の肝内濃度規定因子の解明、肝取り込み輸送体薬理ゲノム学的解析の基盤となる遺伝子構造解析、治療効果や副作用発現と関連する肝炎治療薬の薬物間相互作用プロファイルの解明、肝炎患者の臨床的知見の的確な把握と治療応答性の特徴解明をおこなった。本報告書では、各項目の担当研究者より主に得られた成果について報告する。

研究分担者

千葉大学大学院薬学研究院薬物学研究院
教授 千葉 寛

東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター
臨床医学研究所
教授 坪田 昭人

A. 研究目的

本研究事業では、B型およびC型肝炎治療薬の取り込みトランスポーターの機能に着目することにより、肝炎治療に貢献する新規宿主因子を明らかにすることを主目的としている。これに準じて平成25年度は（1）肝炎治療薬の肝内濃度規定因子の解明、（2）肝取り込み輸送体薬理ゲノム学的解析のための基盤となる遺伝子構造解析、（3）治療効果や副作用発現と関連する肝炎治療薬の薬物間相互作用プロファイル解明、（4）肝炎患者の臨床的知見の的確な把握と治療応答性の特徴解明をおこなった。上記のうち降幡が担当した（3）に該当する項目について、主な研究成果が得られたのでここに報告する。

慢性C型肝炎患者はしばしば他の薬剤を併用することがあることから、直接作用型C型肝炎治療薬（direct-acting antiviral agent, DAA）は併用薬との薬物間相互作用（drug-drug interaction,

DDI）に十分注意する必要があると考えられている。近年ではDAAによる有機アニオントランスポーター（organic anion transporting polypeptide, OATP）の機能阻害を介したDDIも着目されている。

OATP1B1および1B3は肝臓特異的に発現する薬物取り込みトランスポーターである。OATP1Bは内因性物質に加え幅広い薬物を基質とし、その体内動態を規定する因子として働くことが知られている。したがって、OATP1B機能阻害効果を有する薬物は、OATP1Bによる肝取り込みを主要消失経路とする薬物との間にDDIを生じる可能性が高いと考えられている。

そこで、本研究では第二世代DAAであるシメプレビル（SMV）、アスナプレビル（ASV）、ダクラタスビル（DCV）およびソフォスブビル（SFV）のOATP1B機能阻害を介した*in vivo* DDIリスクを明らかにするため、これら薬剤のOATP1B機能阻害プロファイルを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

試薬

テラプレビル（TLV）はShanghai Biochempartner（Shanghai, China）より購入した。SMV、ASV、DCVおよびSFVはそれぞれChemScene LLC（Monmouth Junction, NJ, USA）、AduoQ BioScience LLC（Irvine,

CA, USA)、ChemScene LLCおよびMedchemexpress LLC (Princeton, NJ, USA) より購入した。OATP1B機能阻害剤である rifampicin (RIF)、Bromosulphophthalein (BSP) およびCsAはそれぞれ和光純薬工業 (大阪)、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) および東京化化成工業株式会社 (東京) より購入した。すべてのDAAはdimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。

OATP1B complimentary DNA (cDNA) クローニング およびOATP1B発現用プラスミドベクターの作製

OATP1B1発現用プラスミド (OATP1B1/pcDNA3.1 Zeo) は当研究室で以前に作製したものをを用いた。OATP1B3発現用プラスミド (OATP1B3/pcDNA3.1 Neo) についても当研究室で以前に作製したものをを用いた。OATP1B1発現ベクターにはpcDNA3.1(-) (Zeo または Neo) vector (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) をそれぞれ用いた。

OATP1B1またはOATP1B3安定発現Human embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞の樹立および細胞培養

ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞はHUMAN SCIENCE (東京) より入手し、Dulbecco's modified Eagle's medium (*In vitro*gen, Carlsbad, CA, USA) に、10% (v/v) 非働化fetal bovine serumおよび50 units/mL penicillin - 50 µg/mL streptomycinを加えた培地で培養した。

OATP1B1安定発現HEK293細胞 (OATP1B1/HEK293) および空ベクター導入 HEK293 細胞 (Mock Zeo/HEK293) は既報にしたがって樹立した。また、OATP1B3安定発現HEK293細胞 (OATP1B3/HEK293) および空ベクター導入 HEK293 細胞 (Mock Neo/HEK293) は、OATP1B3/pcDNA3.1 (-) Neoまたは pcDNA 3.1 (-) Neo vector を reverse transfection法により HEK293細胞に導入し、G418 disulfate salt (Sigma-Aldrich) で薬剤選択をおこなうことにより樹立した。また、細胞単一化はコロニーフォーメーション法によりおこなった。樹立したOATP1B1/HEK293およびMock Zeo/HEK293は上記培養培地にZeocin (*In vitro*gen, San Diego, CA, USA) を300 µg/mLの濃度で添加して培養し、OATP1B3/HEK293 およびMock Neo/HEK293はG418 disulfate salt (Sigma-Aldrich) を400 µg/mLの濃度で添加して培養した。上記細胞は全て5% CO₂ / 95% airを気相とした37°CのCO₂インキュベーターで培養した。

Total RNA抽出およびcDNA合成

OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293 およびMock (ZeoまたはNeo)/HEK293のtotal RNA抽出はISOGEN with spin column (Nippon Gene, 東京) を用いてプロトコールにしたがいおこなった。Total RNA中のゲノムDNAの混入の有無は、human glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のプロモーター領域を検出するプライマーを用いたPCR反応により確認した。ゲノムDNAの混入が認められた場合にはDNaseI処理により除去した。cDNA合成はtotal RNA (1.0 µg) を鋳型とし、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits with random primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いてプロトコールにしたがいおこなった。

Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

上記で調製したcDNAをテンプレートとし、PCR反応によりOATP1B1/HEK293におけるOATP1B1 mRNA、OATP1B3/HEK293におけるOATP1B3 mRNA、および両細胞におけるGAPDH mRNAの発現を解析した。

OATP1B1/HEK293およびOATP1B3/HEK293における基質取り込み活性解析

作製したOATP1B1/HEK293およびOATP1B3/HEK293における基質取り込み活性は既報の方法をもとに解析した。OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293または Mock/HEK293 を collagen type-I (Sigma-Aldrich) でコートした24-well plateにそれぞれ 4.0×10^5 cells/mLで播種し、24時間後に sodium butyrate (Sigma-Aldrich) を最終濃度10 mMで曝露し、その24時間後にtransport assayをおこなった。

Transport assayにおけるOATP1B1の基質溶液としてNa⁺-plus Krebs-Hesselei buffer (Na⁺-KHB) に [³H]estradiol-17 β -glucuronide (E₂G) (1850 GBq/mmol) (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA) および非標識 E₂G (Sigma-Aldrich) を溶解し、既報にしたがい最終基質濃度0.1 µM、最終放射線濃度0.10 µCi/mLとした。OATP1B3の基質溶液としてNa⁺-plus KHBに [³H]cholecystokinin-octapeptide sulfated (CCK-8) (2960 GBq/mmol) (PerkinElmer Life Science, Boston, MA, USA) および非標識CCK-8 (株式会社ペプチド研究所, 大阪) を溶解し、既報にしたがい最終基質濃度0.01 µM、最終放射線濃度0.25 µCi/mLとした。阻害実験では、OATP1B1またはOATP1B3に対する典型的阻害剤として、RIFまたはBSPをそれぞれ最終阻害剤濃度10 µMまたは100 µMとなるように加えた。

Transport assayでは、細胞を37°CのNa⁺-plus KHBで1回リンスした後、上記の基質溶液200 μL/wellを加えて37°Cで取り込み反応を開始した。E₂GおよびCCK-8の取り込み時間はそれぞれ予備検討において基質取り込み活性に線形性が認められた3分間および5分間とした。その後、細胞を氷冷したNa⁺-plus KHBで速やかにリンスし、0.2% sodium dodecyl sulfate加え細胞溶解液とした。細胞溶液中の放射活性は液体シンチレーションカウンター(LSC-6100, Aloka, 東京)にて測定した。また、タンパク質濃度はPierce® BCATM Protein Assay Kit (タカラバイオ、滋賀)を用いて測定した。基質取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は式[1]を用いて算出した。

式[1]

$$[\text{取り込み活性 (pmol/ mg protein/ min)}] \\ = [\text{放射能 (dpm)}] / [\text{基質溶液放射能 (dpm/nmol)}] / [\text{採取量 (mL)}] \times [\text{全量 (mL)}] \\ \times [1000 \text{ (pmol/nmol)}] / [\text{タンパク濃度 (mg protein/mL)}] \times [\text{全量 (mL)}] / [\text{取り込み時間 (min)}]$$

DAAの共存下OATP1B機能阻害活性解析

Transport assayの阻害剤にはTLV (0.1, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 10, 20および100 μM)、SMV (0.01, 0.04, 0.1, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0および10 μM)、ASV (0.01, 0.04, 0.1, 0.4, 0.6, 1.0, 4.0および10 μM)、DCV (0.1, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 10, 40および100 μM) およびSFV (1.0, 2.0, 4.0, 10, 20, 40または100 μM) を用いた。コントロールとしてDAAの溶媒であるDMSOを最終濃度0.1%で細胞に曝露した。また、DAAのOATP1B1およびOATP1B3に対する50%阻害濃度 (IC₅₀, μM) は式[2]を用いて算出した。

式[2]

$$[\text{取り込み活性 (\%)}] = [100 / (1 + I / IC_{50})]$$

ここで、取り込み活性値はそれぞれについてOATP1Bを介した基質取り込み活性値からMock/HEK293における基質取り込み活性値を減じた後、コントロールの基質取り込み活性値に対する相対値 (%) を算出することにより得た。また、I (μM) はDAAの濃度を示す。

DAAの持続的OATP1B機能阻害活性解析 (濃度依存性解析)

DAA前処理による持続的OATP1B機能阻害活性の濃度依存性は既報の方法をもとに解析した。DAA

(0.1, 1.0または10 μM) またはコントロールとして0.1% DMSOを含むNa⁺-KHBで細胞を30分間、37°Cで培養した後、37°CのNa⁺-KHBで2回リンスし、DAA非存在下にてtransport assayをおこなった。取り込み活性はコントロールの取り込み活性の相対値 (%) とした。本解析では持続的OATP1B機能阻害効果が認められているCsAを参照化合物として用いた。

DAAの持続的OATP1B機能阻害活性解析 (時間依存性解析)

DAA前処理による持続的OATP1B機能阻害活性の時間依存性は既報の方法をもとに解析した。DAA (1.0 μM) またはコントロールとして0.1% DMSOを含むNa⁺-KHBで細胞を30分間、37°Cで培養し、3に示す抗生物質不含の培養培地で一度リンスした後、再び同培養培地にて37°Cで培養した。一定時間 (0, 1または3時間) 培養後、37°CのNa⁺-KHBで2回リンスし、DAA非存在下にて6-1と同様の方法でtransport assayをおこなった。取り込み活性値は各時間におけるコントロールの取り込み活性の相対値 (%) とした。本解析では持続的OATP1B機能阻害効果が認められているCsA (1.0 μM) を参照化合物として用いた。

DAAの持続的機能阻害効果が共存下OATP1B機能阻害効果に及ぼす影響の解析

DAAの持続的機能阻害効果が共存下OATP1B機能阻害作用に及ぼす影響は、既報の方法をもとに解析した。DAA (0.1, 0.4または1.0 μM) またはコントロールとして0.1% DMSOを含むNa⁺-KHBで細胞を30分間、37°Cで培養した後、37°CのNa⁺-KHBで二回リンスし、DAA (0.1, 0.4 または1.0 μM) の存在下にてtransport assayをおこなった。取り込み活性 (%) はコントロールの取り込み活性の相対値とした。

R値の算出

OATP1B機能阻害を介した*in vivo* DDIリスク指標であるR値は既報にしたがい、式[3]により算出した。

式[3]

$$R = 1 + [(f_u \times I_{in, max}) / IC_{50}]$$

ここで、f_uは阻害剤のタンパク非結合分率を、I_{in, max} (μM) は肝細胞近傍における推定阻害剤最大濃度を示しており、既報にしたがい、式[4]より算出した。また、IC₅₀ (μM) は式[2]より算出した値を用

いた。

式[4]

$$I_{in, max} = I_{max} + [(F_a \times Dose \times K_a) / Q_h]$$

ここで、 I_{max} (μM)は阻害剤の最大血中濃度を、 F_a は消化管吸収率を、 $Dose$ (nmol)は臨床投与量をモル換算したものを、 K_a (min^{-1})は最小胃内容排出時間を、 Q_h (mL/min)は肝血流量をそれぞれ示す。既報と同様に、 F_a は1、 K_a は 0.03 min^{-1} 、 Q_h は $1500 \text{ mL}/\text{min}$ とした。

統計解析

二群間における平均値の差の検定はStudent's t-testによりおこなった。統計計算にはExcel統計ソフトStatcel第3版(東京)を使用した。

倫理面への配慮

本研究におけるヒト由来試料の使用については事前に千葉大学大学院薬学研究院倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

OATP1B mRNA発現解析

OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293またはMock/HEK293より調製したcDNAを用いて、OATP1B1、OATP1B3およびGAPDH mRNA発現をRT-PCR法により解析した。その結果、OATP1B1/HEK293においてOATP1B1 mRNA発現が、OATP1B3/HEK293においてOATP1B3 mRNA発現がそれぞれ認められた。また、Mock/HEK293においてはOATP1B1およびOATP1B3 mRNA発現は認められなかった。いずれの細胞においてもGAPDH mRNA発現が認められた。

OATP1Bを介した基質取り込み活性解析

OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293またはMock/HEK293におけるOATP1Bを介した基質取り込み活性を、OATP1B1、OATP1B3のそれぞれの典型的基質であるE2G ($0.1 \mu\text{M}$)、CCK-8 ($0.01 \mu\text{M}$)を用いて解析した。その結果、OATP1B1/HEK293およびMock Zeo/HEK293におけるE2G取り込み活性値はそれぞれ、 2.8 ± 0.48 、 $0.16 \pm 0.04 \text{ pmol}/\text{mg protein}/\text{min}$ であり、このOATP1B1を介したE2G取り込み活性は $10 \mu\text{M}$ RIFの存在下で完全に消失した。また、OATP1B3/HEK293およびMock Neo/HEK293におけるCCK-8取り込み活性値はそれぞれ、 56.9 ± 8.0 、 6.5

$\pm 1.1 \text{ fmol}/\text{mg protein}/\text{min}$ であり、このOATP1B3を介したCCK-8取り込み活性は $100 \mu\text{M}$ BSPの存在下で完全に消失した。したがって、OATP1B1/HEK293およびOATP1B3/HEK293はともにMock/HEK293と比較して高い基質取り込み活性を有していることが明らかとなった。

DAAの共存下OATP1B機能阻害プロファイル解析

OATP1B1を介したE₂G、またはOATP1B3を介したCCK-8取り込み活性におよぼすTLV、SMV、ASV、DCVおよびSFV (0.01 - $100 \mu\text{M}$)の影響をtransport assayにより解析した。その結果、TLV、SMV、ASV、DCVおよびSFVのOATP1B1に対するIC₅₀値 (μM)はそれぞれ 1.36 ± 0.58 、 0.30 ± 0.06 、 0.79 ± 0.21 、 1.50 ± 0.33 および 16.5 ± 7.6 であり、OATP1B3に対するIC₅₀値 (μM)はそれぞれ 9.69 ± 3.10 、 0.22 ± 0.07 、 0.46 ± 0.11 、 3.27 ± 0.57 および 61.9 ± 31.6 であった。

I_{max}/IC₅₀値およびR値の算出

DAAのOATP1B機能阻害を介した*in vivo* DDIリスクを解析するため、ITCのdecision treeにしたがい、I_{max}/IC₅₀値およびR値を算出した。その結果、OATP1B1およびOATP1B3に対するI_{max}/IC₅₀値は、TLVでは 4.04 および 0.57 、SMVでは 19.5 および 26.6 、ASVでは 0.85 および 1.46 、DCVでは 1.55 および 0.71 、SFVでは 0.07 および 0.02 であった。さらに、R値の算出が推奨されるI_{max}/IC₅₀> 0.1 であったTLV、SMV、ASVおよびDCVについてOATP1B1および1B3に対するR値を算出したところ、TLVおよびSMVでは 1.25 以上(それぞれ 8.50 および 2.05 、 1.33 および 1.44)であったが、ASVでは 1.08 および 1.13 、DCVでは 1.03 および 1.01 であった。

DAAの持続的OATP1B機能阻害効果の解析(濃度依存性解析)

DAAの持続的OATP1B機能阻害プロファイルを明らかとするため、OATP1B1を介したE₂G、またはOATP1B3を介したCCK-8取り込み活性におよぼすTLV、SMV、ASV、DCVおよびSFV (0.1 、 1.0 および $10 \mu\text{M}$)前処理の影響をtransport assayにより解析した。その結果、DDAsの持続的OATP1B機能阻害効果には以下の濃度依存性が認められた。

SMV前処理後のOATP1B1を介したE₂G取り込み活性値はそれぞれコントロールの 99.4 ± 20.8 、 38.2 ± 13.1 、 $21.1 \pm 12.0\%$ 、OATP1B3を介したCCK-8取り込み活性値はそれぞれコントロールの 72.3 ± 8.42 、 12.6 ± 5.29 、 $7.78 \pm 1.79\%$ であり、両分子種に対し

て大きな持続的機能阻害効果が認められた。ASV前処理後のOATP1B1の活性値はそれぞれコントロールの 74.6 ± 9.47 、 58.6 ± 2.39 、 $35.5 \pm 14.7\%$ であり、全ての濃度でOATP1B1に対する持続的機能阻害効果が認められたが、OATP1B3の活性値は10 μM においてのみコントロールの $36.1 \pm 6.09\%$ と持続的機能阻害効果が認められた。また、DCV前処理後のOATP1B1およびOATP1B3の活性値は10 μM においてのみ $36.1 \pm 6.09\%$ 、 $35.3 \pm 10.5\%$ と持続的機能阻害効果が認められた。一方、TLVおよびSFV ではないずれのOATP1B分子種においても顕著な持続的機能阻害効果は認められなかった。また、CsA (0.1, 1.0または10 μM) においては既報と同様にOATP1B1およびOATP1B3に対する強い持続的機能阻害効果が認められた。

DAAの持続的OATP1B機能阻害効果の解析（時間依存性解析）

上記において強い持続的OATP1B機能阻害効果が認められたSMVおよびASVについて、持続的OATP1B機能阻害効果の時間依存性を解析した。その結果、SMVおよびASV(1.0 μM)の持続的OATP1B機能阻害効果には以下の時間依存性が認められた。SMVの前処理から0、1または3時間後におけるOATP1B1を介したE₂G取り込み活性値はそれぞれコントロールの 36.8 ± 5.6 、 69.5 ± 8.2 、 $100.4 \pm 8.4\%$ と、前処理3時間で阻害効果が消失したのに対し、OATP1B3では、CCK-8取り込み活性値はそれぞれコントロールの 14.9 ± 5.0 、 26.3 ± 6.7 、 $53.3 \pm 2.4\%$ とOATP1B1に対するよりも長い持続的機能阻害効果が認められた。また、ASVの前処理から0、1または3時間後におけるOATP1B1の活性値はそれぞれコントロールの 37.6 ± 21.0 、 86.1 ± 5.5 、 $98.0 \pm 1.9\%$ とSMVの阻害プロファイルと類似していた。OATP1B3に対しては、5で得られた結果と同様に本濃度では阻害効果は認められず、CCK-8取り込み活性値はそれぞれコントロールの 107.0 ± 7.7 、 99.8 ± 14.0 、 $100.7 \pm 13.8\%$ であった。一方で、CsA (1.0 μM) については既報と同様に3時間以上の持続的機能阻害効果が認められた。

DAAの持続的機能阻害効果の共存下OATP1B機能阻害効果への影響解析

SMVおよびASVについて、持続的機能阻害効果が共存下OATP1B機能阻害効果に及ぼす影響を明らかにするため、SMVまたはASV (0.1, 0.4, 1.0 μM) 前処理後の、SMVまたはASV (0.1, 0.4, 1.0 μM) 存在下におけるOATP1B1を介したE₂G、またはOATP1B3を介したCCK-8取り込み活性をtransport assayに

より解析した。その結果、DMSO (0.1%) 前処理後のSMV共存下におけるE₂G取り込み活性値、またはSMV前処理後のSMV共存下におけるE₂G取り込み活性値はそれぞれコントロールの 89.5 ± 16.1 、 51.0 ± 1.43 、 $22.5 \pm 5.56\%$ 、または 77.2 ± 22.6 、 29.9 ± 9.48 、 $16.7 \pm 3.99\%$ であり、持続的機能阻害効果による共存下機能阻害効果の増強が認められた。SMVのOATP1B3活性に対する影響についても同様であり、CCK-8取り込み活性値はそれぞれコントロールの 47.3 ± 6.12 、 19.0 ± 5.25 、 $16.8 \pm 6.81\%$ 、または 34.9 ± 2.64 、 10.9 ± 2.98 、 $8.87 \pm 3.09\%$ であった。一方で、DMSO (0.1%) 前処理後のASV共存下におけるE₂G取り込み活性値、またはASV前処理後のASV共存下におけるE₂G取り込み活性値はそれぞれコントロールの 79.7 ± 2.71 、 48.6 ± 10.4 、 28.4 ± 15.6 、または 53.0 ± 11.2 、 31.5 ± 7.40 、 $27.6 \pm 19.9\%$ であり、持続的機能阻害効果による共存下機能阻害効果の増強が認められた。また、上記5の結果と同様に、本濃度ではOATP1B3に対して共存下機能阻害効果を増強させる持続的機能阻害効果を発揮しなかった。

D. 考察

本研究の結果、解析したすべての第二世代DAAは異なるプロファイルで共存下OATP1B機能阻害効果を有することが明らかとなった。これまでに第一世代DAAのTLVおよびBOCについては、*in vitro*における共存下OATP1B機能阻害活性解析と*in vivo*におけるDDI解析がおこなわれている。たとえば、TLVのOATP1B1に対するIC₅₀値および推定R値はそれぞれ 2.15 ± 0.13 μM および5.74であるという報告があり、この値は本研究と概ね一致している。現在、Food and Drug Administration (FDA) およびInternational Transporter Consortium (ITC) はOATP1B機能阻害効果が認められる薬剤について、*in vivo* DDI解析の必要性の有無を判断する基準をR>1.25と設定している。これによると、TLVはOATP1B機能阻害を介した*in vivo* DDIを生じる可能性が高いと判断され、実際に*in vivo*においてTLVはATVのAUCを約8倍上昇させることが報告されている。BOCについても、そのOATP1B1に対するR値が1.5であることから*in vivo*におけるOATP1Bを介したDDIが予測されており、実際にBOCによりATVのAUCが約2.3倍上昇することが報告されている。したがって、第二世代DAAのうち、OATP1B1および1B3に対するR値がそれぞれ1.33および1.44であるSMVはOATP1B機能阻害を介した*in vivo* DDIのリスクが高いと考えられる。一方で、共存下OATP1B機能阻害効果が著しく低いSFV、およびR値が1.25を下回るASVおよびDCVはそのようなDDIの可能性は低い

と考えられる。

しかしながら、これまでに *in vivo* において SMV は併用する ATV および rosuvastatin (RSV) の AUC を 2-3 倍上昇させるという報告があり、この上昇率は SMV の OATP1B に対する R 値から得られる予測値より大きい。また、ASV についても、OATP1B に対する R 値が 1.25 を下回っているにもかかわらず、併用した RSV の AUC を約 1.4 倍上昇させるという臨床報告がある。これらのことから、OATP1B に対する R 値のみを用いた *in vivo* DDI の予測では、SMV および ASV の *in vivo* における DDI リスクを過小評価する傾向があると考えられる。

これまでも OATP1B に対する R 値を用いた *in vivo* DDI の定量的予測に関しては、いくつかの問題点があることが指摘されている。たとえば、CsA は持続的 OATP1B 機能阻害効果により、その共存下 OATP1B 機能阻害効果を増強させることが報告されている。このことから、持続的 OATP1B 機能阻害効果を有する薬剤においては、共存下 OATP1B 阻害活性解析により得られた IC_{50} 値以上の機能阻害が生じていると考えられ、SMV および ASV についてもまた、*in vivo* においては、一般に薬剤は OATP1B による肝取り込み以外にも複数の消失経路を有しており、上述の ATV および RSV に関しても OATP1B による肝取り込みを主消失経路としているものの、CYP3A4 などの代謝酵素や、breast cancer resistance protein などの排泄トランスポーターも、それらの薬物動態に寄与する可能性が考えられている。以上のことから、SMV および ASV の *in vivo* DDI の定量性を向上させるためには、それらの持続的 OATP1B 機能阻害効果を加味した R 値の算出法を確立するとともに、併用薬の薬物動態を規定する諸因子に対する R 値を明らかとし、包括的な *in vivo* DDI 予測をする必要があると考えられる。持続的 OATP1B 機能阻害効果を定量化するためには、その特徴や機序の詳細を明らかとする必要があると考えられる。現在までに、持続的 OATP1B 機能阻害効果を有する薬剤はほとんど同定されていないが、興味深いことに、本研究において解析した DAA はそれぞれ異なるプロファイルで持続的 OATP1B 機能阻害効果を有することが明らかとなった。

たとえば、SMV および ASV は同程度の共存下 OATP1B3 機能阻害効果を有しているものの、SMV と ASV とでは OATP1B3 に対する持続的機能阻害効果のプロファイルが異なる。したがって、少なくとも SMV と ASV は異なる機序で持続的機能阻害効果を示していると考えられる。また、その持続的 OATP1B 機能阻害効果は共存下 OATP1B 機能阻害効果とは関連しないことから、DAA の有する持続的 OATP1B1 機能阻害効果の強度は共存下 OATP1B1 機能阻害効果の強度からは判断できないといえる。このことは、

強力な共存下 OATP1B1 機能阻害効果を有している rifampicin が持続的 OATP1B1 機能阻害効果を示さない一方で、比較的弱い OATP1B1 阻害剤である saquinavir (SQV) および ritonavir が持続的 OATP1B1 機能阻害効果を有しているという報告とも一致している。

これまで持続的 OATP1B 機能阻害効果の詳細な機序については明らかとなっていないが、CsA についてはその前処理から約 18 時間にわたって CsA およびその代謝物が細胞内に蓄積していることが明らかとなっており、持続的 OATP1B 機能阻害は細胞内に蓄積した CsA (およびその代謝物) に起因している可能性が指摘されている。SMV および ASV についても、その持続的 OATP1B 機能阻害効果が細胞内蓄積により規定されている可能性が考えられ、また、その蓄積性の差異が異なるプロファイルを生じる原因である可能性がある。また、これまでに CsA および SQV については持続的 OATP1B1 機能阻害効果の速度論的解析が行われており、CsA による持続的 OATP1B 機能阻害効果が競合阻害様式である一方で、SQV については非競合阻害様式であることが明らかとなっている。このことから、持続的 OATP1B1 機能阻害効果にはいくつかの阻害様式が存在すると考えられる。以上より、今後は SMV および ASV の細胞内蓄積解析や速度論的解析をおこなうことで持続的 OATP1B 機能阻害の差異の特徴や機序が明らかになる可能性があると考えられる。

E. 結論

本研究の結果から、解析したすべての第二世代 DAA は異なるプロファイルで共存下 OATP1B 機能阻害効果を有していることが明らかとなった。さらに、SMV および ASV は他剤と比較して強い持続的 OATP1B 機能阻害効果を有していることも明らかとなった。したがって、SMV は *in vivo* における OATP1B 機能阻害を介した DDI リスクが高いと考えられ、また、ASV についても SMV と比較して弱いものの OATP1B 機能阻害を介した *in vivo* DDI の可能性は否定できないと考えられた。一方で、DCV および SFV については、そのようなリスクは低いと考えられた。これらのことより、SMV または ASV を用いた C 型肝炎治療においては、OATP1B を主要消失経路とする薬剤との併用に十分注意する必要があると考えられる。また、今後持続的 OATP1B 機能阻害効果の機序を明らかとし、持続的機能阻害効果を反映した予測法を確立することができれば、従来よりも高い精度で DAA による OATP1B 機能阻害を介した *in vivo* DDI リスクの定量的予測が可能になることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Furihata T, Kishida S, Sugiura H, Kamiichi A, Iikura M, Chiba K. Functional analysis of purine nucleoside phosphorylase as a key enzyme in ribavirin metabolism. Drug Metab Pharmacokinet. 2014;29:211-214.

Furihata, Matsumoto S, Fu Z, Tsubota A, Sun Y, Matsumoto S, Kobayashi K, Chiba K. Different interaction profiles of direct acting anti-hepatitis C virus agents with human organic anion transporting polypeptides, in revision.

2. 学会発表

降幡知巳、坪田昭人、本間真人、千葉寛. 肝炎・膵がん個別化治療の基盤確立に向けた治療薬トランスポーターの遺伝子機能解明 第134回日本薬学会年会（熊本、2014年3月）

付 中国、降幡知巳、松本渉吾、鈴木雄基、坪田昭人、千葉寛. 第二世代直接作用型C型肝炎治療薬のOrganic anion transporting polypeptide 1B1阻害プロファイル 第134回日本薬学会年会（熊本、2014年3月）

H. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

II. 分担研究報告 (1)

厚生労働科学研究費補助金 (肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))
分担研究報告書

C型肝炎治療薬リバビリン輸送体主要mRNA分子種同定によるリバビリン薬理ゲノム学的解析基盤の確立

研究分担者 千葉 寛

研究要旨

C型肝炎治療薬リバビリンは equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) によりヒト肝細胞に取り込まれて薬効を発揮する。本分担研究では、リバビリン薬理ゲノム学的解析基盤の確立のため、ヒト肝細胞に発現する主要 ENT1 mRNA 分子種の同定を目的とした。ヒト肝細胞および肝がん由来細胞を用いて検討をおこなった結果、ENT1c1 および d3 mRNA が他の mRNA 分子種と比較し顕著に高発現しており、これらがヒト肝細胞の主要な ENT1 mRNA 分子種であることが明らかとなった。さらにこの分子機序として、これら主要 mRNA 分子種の転写にかかわるオルタナティブプロモーター領域がヒト肝細胞において強く転写活性化されることも明らかとなった。これら知見は、リバビリン薬効発現における ENT1 遺伝子薬理ゲノム学的解析の基盤となると考えられ、今後 C型肝炎治療における治療効果予測因子の同定へと応用されることが期待される。

A. 研究目的

本研究では、難治性肝炎の奏効率を向上させるため、B型およびC型肝炎治療薬の取り込み輸送体の遺伝情報と肝炎治療臨床経過との関連解析を計画している。

我々はこれまでに、リバビリンのヒト肝細胞内取り込みは、主に核酸トランスポーター equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) が担うことを明らかとしてきた。リバビリン細胞内取り込みの変動を伴う ENT1 機能の個人差は、主に ENT1 発現量の変動により生じると考えられるが、肝細胞における ENT1 発現プロファイルは明らかになっていない。

そこで本分担研究では、ヒト肝細胞における主要な ENT1 mRNA 分子種を同定することを目的として検討をおこなった。

B. 研究方法

細胞および細胞培養

単一ドナー由来白人種凍結肝細胞 (HH187、225、229、268、278、283、291、314) はKAC (京都) より購入した。白人種50検体混合凍結肝細胞 (hep50) はCelsis (Baltimore, MD) より購入した。ヒト肝がん由来細胞株であるHepG2細胞およびHuh7細胞

は、東北大学加齢医学研究所附属医用細胞センター (仙台) より入手し、FLC7細胞は永森静志教授 (杏林大学、東京) よりご恵与賜った。各細胞は入手元からのプロトコールにしたがい培養した。

mRNA発現量の測定

ヒト肝細胞およびヒト肝がん由来細胞から total RNAを抽出し、ランダムヘキサマーを用いた逆転写反応によりcDNAを合成した。これらcDNAを鋳型とし、SYBR green法によるreal-time PCRによりヒト肝細胞およびヒト肝がん由来細胞における各ENT1 mRNA分子種の発現量を解析した。プライマーは各mRNA分子種群 (ENT1a1、b1-4、c1-3およびd1-4) 特異的に設計した。相対定量法では、各ENT1 mRNAと同様の条件で定量した glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA発現量を用いて解析した。

Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)

RT-PCRによるENT1c1-3およびENT1d1-4 mRNA発現プロファイルの解析は、2で作製したヒト肝細胞およびヒト肝がん由来細胞cDNAをテンプレートとしてENT1c1-3およびENT1d1/3、d2/4を個別に検出可能なプライマーを設計しておこなった。

RNA ligase-mediated 5' -rapid amplification of cDNA ends (RLM-5' -RACE)

RLM-5' -RACEは、GeneRacer RLM-RACE Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA)を用い、プロトコールにしたがっておこなった。HepG2細胞およびヒト肝細胞よりtotal RNAを抽出し、RLM-5' -RACE用のcDNAを調製した。これを鋳型としてRT-PCRをおこない、得られたPCR産物の塩基配列を解析することにより、主要転写開始点の同定をおこなった。

クロマチン免疫沈降アッセイ

クロマチン免疫沈降法は、ChIP-IT® Express Magnetic Chromatin Immunoprecipitation Kit & Sonication Shearing Kit (ACTIVE MOTIF, Carlsbad, CA)によりおこなった。HepG2細胞またはFLC7細胞のクロマチン溶液はソニケーション法により調製した。

免疫沈降には、コントロールIgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、抗ヒストン H3抗体ChIPグレード (Abcam, Cambridge, UK)、抗ヒストンH3リジン9アセチル化抗体 (Millipore, Billerica, MA)を用いた。また、これら抗体による沈降操作をおこなわない試料より回収したDNAをinputとした。

各プロモーター領域および遺伝子3' 下流領域の沈降DNA量は、real-time PCR法により解析した。各沈降DNA量はinputに対する相対量として算出した。また、抗H3抗体による沈降DNA量に対する抗H3K9抗体による沈降DNA量の比 (H3K9ac/H3) を算出した。

ルシフェラーゼアッセイ

ENT1遺伝子の各プロモーター領域を含むreporter vectorとpGL4.70 vector (Promega, Madison, WI)をHepG2細胞、FLC7細胞、またはHuh7細胞のいずれかにトランスフェクションした。その24時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。Firefly luciferase活性はpGL4.70 vector由来のrenilla luciferase活性により補正した。

倫理面への配慮

ヒト肝細胞の使用については事前に千葉大学大学院薬学研究院倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

ヒト肝細胞およびヒト肝がん由来細胞におけるENT1 mRNA 分子種の発現

HepG2細胞、FLC7細胞、Huh7細胞およびヒト肝細胞 (hep50) のcDNAを用いて、各mRNA分子種群 (ENT1a1, b1-4, c1-3およびd1-4) の発現量をreal-time PCR法により解析した。その結果、いずれの細胞においてもENT1cおよび1d mRNA群の発現が同程度に高く認められ、1a1および1b mRNA群の発現量は著しく低かった。

また、個人間におけるENT1cおよび1d mRNA群の発現プロファイルを明らかにするため、ヒト肝細胞7検体におけるこれら分子種群の発現量をreal-time PCR法により解析した。その結果、いずれの検体においてもENT1cおよび1d mRNA群の発現が認められ、それらの検体間差は1c mRNA群で最大3.1倍、1d mRNA群で最大9.2倍であった。また図には示していないが、これら全ての検体においてENT1a1および1b mRNA群の発現量は極めて低かった。

各プロモーター領域の転写活性化能の解析

肝細胞におけるP1、P2およびP3各プロモーター領域の転写活性を明らかにするため、HepG2細胞、FLC7細胞、Huh7細胞を用いてルシフェラーゼアッセイをおこなった。その結果、HepG2細胞においてそれぞれENT1cおよび1d mRNA群を発現させるP2およびP3プロモーターは、コントロール (empty pGL4.17) と比べ高い転写活性化を示した。一方で、P1プロモーター領域を介した転写活性化はほとんど認められなかった。また、FLC7細胞およびHuh7細胞を用いた解析においても上記と同様の結果が認められた。

ENT1遺伝子各プロモーター領域におけるヒストンH3K9アセチル化状態の解析

転写活性化されている遺伝子の転写開始点付近ではヒストンH3K9アセチル化 (H3K9ac) の存在比が上昇することが報告されている。そこで、HepG2細胞およびFLC7細胞の各プロモーター領域の転写開始点近傍におけるH3K9のアセチル化状態を解析した。

その結果、HepG2細胞におけるP2およびP3プロモーター領域のH3K9acレベルは、ENT1遺伝子3' 下流側領域 (コントロール) と比較して約3倍高値を示した。しかしながら、P1プロモーター領域ではコントロール領域と同程度のH3K9acレベルであった。また、FLC7細胞を用いた検討においても、これらと同様の結果が得られた。

ヒト肝由来細胞における主要ENT1cおよび1d mRNA分子種の同定

ENT1cおよびENT1d mRNA群にはそれぞれ複数のmRNA分子種が存在する(ENT1c1-3、ENT1d1-4)。そこでヒト肝細胞における主要mRNA分子種の同定をおこなった。RLM-5' RACEの結果、HepG2細胞およびヒト肝細胞いずれにおいてもENT1c1/2 mRNAが検出され、c3 mRNAの発現は認められなかった。さらにRT-PCRにより、c1 mRNAがc2 mRNAよりも高く発現していることが明らかとなった。ENT1d mRNA分子種については、主にd3/4 mRNAに由来する転写開始点が同定された。さらに、ENT1d3およびd4 mRNAを区別するためRT-PCRをおこなったところ、ENT1d3 mRNAの発現量が顕著に高いことが明らかとなった。

D. 考察

本研究の結果、ヒト肝細胞における主要なENT1 mRNA分子種はc1およびd3 mRNAであることが明らかとなった。したがって、肝ENT1発現量は、オルタナティブプロモーターを駆使して転写されるこれらmRNA分子種により規定されていると考えられる。

これまでENT1遺伝子の発現制御に関する研究はENT1a1 mRNAを転写するP1プロモーターを対象としておこなわれてきており、また、これまでの当研究室における検討においても肝臓cDNAからENT1a1 mRNAに相当する転写開始点を同定している。したがって、P1はプロモーター機能を有すると考えられる。しかしながら、本研究結果からP1プロモーターとP2およびP3プロモーター間ではヒストンH3K9のアセチル化の割合およびルシフェラーゼ転写活性化能が異なっており、P1プロモーターとP2・P3プロモーターとの間には肝細胞における転写活性化機構に大きな差があると考えられる。

肝細胞におけるこれらプロモーター間の転写活性化能の差異の詳細な機序は明らかとなっていないが、これらプロモーター構造の違いに起因する可能性がある。P2およびP3プロモーターはTATAボックスがないCpGプロモーター構造を有しており(それぞれnormalized CpG 値は0.83, 0.57)、これはハウスキーピング遺伝子のプロモーター領域によく認められる特徴である。一方、P1プロモーターにはTATA-boxが推定され、CpG配列数は少ない(normalized CpG 値は0.18)。これは組織特異的な発現を示すプロモーターの特徴と類似する。したがって、ヒト肝細胞においてP2およびP3はハウスキーピング遺伝子のプロモーターと同様の機構により転写が活性化されるのに対し、P1の機構が

標的とする組織は肝臓ではない可能性が考えられる。

このようなプロモーターの使い分けは他の遺伝子においても認められている。例えば、hemoglobin γ A遺伝子は、コア構造の異なるオルタナティブプロモーターを使用して発生段階特異的な遺伝子発現調節をおこなうことが報告されている。したがって、ENT1遺伝子の発現においてもP1とP2/P3の使い分けがおこなわれていると考えられる。さらにP2とP3両プロモーターのCpG配列や転写因子結合領域の数が異なっていること、本検討においてヒト肝細胞の検体間でENT1cおよび1d群mRNA発現プロファイルに大きな個人差が認められたことから、P2とP3プロモーター間の転写活性化機構にも差異があると考えられる。

本研究により同定したヒト肝主要ENT1 mRNA分子種およびそれらを転写させるP2・P3プロモーターに着目した研究を進展させることにより、今後、リバビリン治療効果の個人差のメカニズムの一端を明らかにすることができる可能性が考えられる。治療効果と関連するENT1遺伝子多型(rs760370およびrs6932345)はイントロン領域に存在しており、これら多型の変異型を持つヒトでは、末梢血単核球の全ENT1 mRNAの発現量が野生型の約0.6倍になることが報告されている。したがって、これら遺伝子多型はENT1c1または/および1d3 mRNAの発現量に影響をおよぼす可能性が考えられる。また、これまでにENT1遺伝子の1c1 mRNAの5'非翻訳領域には複数の遺伝子多型の存在が報告されており、ENT1c1 mRNAの発現量やその翻訳効率はこの影響を受けている可能性も考えられる。さらに遺伝子多型以外にも、薬剤投与など環境因子によってもENT1c1やd3の発現量は特異的に変動する可能性がある。今後、上述のような可能性を考慮したENT1遺伝子発現制御研究を遂行することにより、P1/ENT1a1 mRNAを対象とするのみでは見つけられなかったENT1発現変動因子を同定することができる可能性がある。

E. 結論

本研究の結果より、P2、P3領域が特異的に転写活性化される機序により、ヒト肝細胞ではENT1c1およびENT1d3 mRNAが発現することが明らかとなった。したがって、肝臓におけるENT1発現量は主にこれらmRNA分子種により規定されていると考えられる。今後は、P2/ENT1c1 mRNAおよびP3/ENT1d3 mRNAに着目してそれぞれの転写、翻訳制御機構を明らかにするとともに、ENT1c1およびd3 mRNA発現量の個人差の要因解明をおこなうことが必要であると考えられる。それら解析から得られる成果は、

ENT1遺伝子薬理ゲノム学的解析の基盤的知見となり、今後リバビリン取り込みの変動機序の解明やその薬効発現予測因子同定に貢献できると期待される。

3. その他
該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Furihata T, Mizuguchi M, Suzuki Y, Matsumoto S, Kobayashi K, Chiba K. Identification of primary equilibrative nucleoside transporter 1 mRNA isoforms resulting from alternative promoter usage in human hepatocytes. Drug Metab Pharmacokinet. 2014, in press.

Chiba K. Perspective of humanized mouse models for assessing PK/PD and toxic profile of drug candidates in preclinical study. Drug Metab Pharmacokinet. 2014;29:1-2.

2. 学会発表

鈴木雄基、降幡知巳、水口美紗、松本渉吾、飯倉南、千葉寛. 選択的なプロモーター活性化により生じるヒト肝ENT1主要mRNA分子種の同定 第8回トランスポーター研究会(熊本、2013年6月)

松本渉吾、降幡知巳、水口美紗、鈴木雄基、小林カオル、千葉寛. Identification of the primary human equilibrative nucleoside transporter 1 mRNA isoforms resulting from its alternative promoter usage in the liver 10th International ISSX meeting (トロント、2013年10月)

鈴木雄基、降幡知巳、松本渉吾、鈴木嘉治、本間真人、水口美紗、本橋新一郎、千葉寛. 選択的プロモーター活性化により生じる種々のヒトがん細胞ENT1 mRNA発現プロファイル 第57回日本薬学会関東支部大会(東京、2013年10月)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

II. 分担研究報告（2）

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）） 分担研究報告書

前治療無効日本人C型肝炎患者における三剤併用療法奏効関連因子の同定

研究分担者 坪田 昭人

研究要旨

肝炎治療においては種々の宿主側・ウイルス側要因が治療奏効に影響を及ぼすが、それら要因は治療法ごと、患者集団ごとに異なっている。本分担研究ではテラプレビルを用いたC型肝炎三剤併用療法の治療奏効に影響する要因を明らかとすることを目的とした。治療期間は全24週間または全48週間で設定し、従来併用療法に対する部分応答または不応答患者群に分けて、治療奏効関連因子解析をおこなった。その結果、全24週間治療においては、前治療に対する応答、IL28B遺伝子多型野生型、eRVR達成、非肝硬変が強い治療奏効関連因子であった。全48週間治療においては治療全体のSVR率が全24週間治療よりも高かったため影響は小さかったものの、上記因子とSVRとの関連傾向は認められた。本研究より得られた治療奏効関連因子をまとめると、総じて全48週間治療は全24週間治療より有効であり、前治療不応答患者およびIL28B遺伝子変異型の前治療部分応答患者では全48週間治療が推奨される。一方で、IL28B遺伝子野生型の前治療部分応答患者では、全24週間治療も選択肢となると考えられる。また、前治療歴が不明な患者においては、IL28B遺伝子多型情報やeRVRが治療奏効予測の指標として有用であると考えられた。これらの治療効果規定因子を勘案することで、過剰な治療を軽減・回避でき、かつ効率的に治療奏効率を上昇させることができる。第一世代direct-acting antiviral agents (DAAs)による治療結果と有力な治療効果規定因子に関する知見は次世代DAA治療へ活かせるとともに、説明できない治療効果に影響する機序や副作用機序の解明につながると考えられた。

A. 研究目的

本研究では、難治性肝炎の奏効率を向上させるため、B型およびC型肝炎治療薬の取り込み輸送体の遺伝情報と肝炎治療臨床経過との関連解析を計画している。本解析遂行のために、分担研究では肝炎患者の臨床的知見の的確な把握と治療応答性の特徴解明を目的の一つとしている。ここでは初年度に得られた成果のうち、日本人C型肝炎患者初回治療不応群の三剤併用療法に対する治療効果とその関連因子を報告する。

B. 研究方法

患者

テラプレビルを含む三剤併用療法（後述）による治療を受けたC型肝炎ウイルス（HCV）1b型感染日本人患者（2011年12月～2013年3月）のうち、次(1-14)の条件を満たす103名の前治療不応・部分応答例(null and partial responders)を対象とした。条件は、(1)C型肝炎患者である；(2)6カ月以上継続して血清中にHCV RNAが検出される；(3)感染HCV

の遺伝子型が1bである；(4)24週間のペグインターフェロン・リバビリン併用治療（後述）に対し不応答であった、もしくは部分応答であり血中からHCV RNAが検出され続けていた；(5)18-75歳である；(6)治療開始時に35 kg以上の体重がある；(7)非代償性肝硬変でない；(8)HBs抗原または抗HIV抗体陽性でない；(9)肝がん発症歴がない；(10)他の肝疾患がない；(11)腎疾患がなく腎機能が良好である；(12)ヘモグロビンレベルが12 g/dL以上、白血球数 $2000/\mu\text{L}$ 以上、好中球数 $1500/\mu\text{L}$ 以上、血小板数 $8.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ 以上である；(13)うつ、統合失調症、自殺企図やその発症歴がない；(14)妊娠中またはその予定がない；である。

これら103名において、前治療不応群と比較し前治療部分応答群では血小板量が多い、 α フェトプロテイン量が低いという特徴が認められたが、性別、体重、年齢、ヘモグロビン量その他解析指標において統計的に優位な差異は認められなかった。

治療法

テラプレビル（テラビック、田辺三菱製薬）（Tとする）は、8時間毎（500または750 mg）または

12時間毎（750または1125 mg）に食後に服用とした。ペグインターフェロン α -2b (PEG-Intron, MSD) (Pとする)は1.5 μ g/kg/weekの用量で皮下投与とした。リバビリン (レベトール, MSD) (Rとする)は、体重換算により600、800、または1000 mg/dayとした。また、ヘモグロビン値が13 g/dL以下の患者ではリバビリン投与量は200 mg/dayとした。

治療方法は、上記投与設計に基づき患者背景を考慮の上で決定した。前治療不応例46名のうち31名については、12週間の三剤併用療法後に12週間のPR併用療法をおこない (T12PR24)、15名については、12週間の三剤併用療法後に36週間のPR併用療法をおこなった (T12PR48)。前治療部分応答例57名のうち50名についてはT12PR24をおこない、7名についてはT12PR48をおこなった。各薬剤は、深刻な副作用の発現状況に応じて減量した。また、副作用発現の有無によらず、以下の項目に該当する患者においては、薬剤耐性ウイルス発現および治療不応答の可能性が高いことから治療を中止した (治療4週目における血中HCV RNAが3 \log_{10} IU/mL以上である、治療12週目における血中HCV RNAの検出可能である、または治療12週目において血中HCV RNA が2 \log_{10} IU/mL以上上昇した)。

治療応答の定義

Sustained virological response (SVR、治療終了後24週間血中HCV RNAが検出されないこと)を達成した症例は、「治療奏功」として定義し、治療中にHCV RNAが検出されなくなったものの治療中止後に検出されるようになった症例は「Relapse」として定義した。治療中にHCV RNAが検出されなくなったものの治療完遂前に検出されるようになった症例は、「Viral breakthrough (VBT)」と定義した。また、治療期間中血中HCV RNAが検出され続けた症例は「治療不応答」と定義し、治療開始後4週と12週目に血中HCV RNAが検出されなかった症例をextended rapid virological response (eRVR)とした。

HCV RNA測定法

治療前および治療中 (4週に1回)、治療後の血中HCV RNAレベルはCOBAS AmpliPrep/ COBAS Taqman HCV Test (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)により定量した。本法によるHCV RNA定量範囲は1.2-7.8 \log_{10} IU/mLである。

HCV遺伝子型決定と変異解析法

ウイルスの遺伝子型はNS5B領域のダイレクトシ

ークエンスによる配列情報に基づいて決定した。コアタンパク質70番目アミノ酸変異の有無 (野生型はアルギニン、変異型はグルタミンまたはヒスチジン)も、ダイレクトシークエンスによる配列情報に基づいて決定した。また、インターフェロン感受性領域におけるアミノ酸変異は、ダイレクトシークエンスによりNS5A領域内の40アミノ酸 (aa2209-2248)を解析し、HCV-Jの配列と比較することにより同定した。本解析では、変異数0-1ヶ所を野生型、変異数2ヶ所以上の場合を変異型と定義した。

遺伝子多型解析

患者ゲノムDNAは全血よりMagNa Pure LC and a DNA Isolation Kit (Roche Diagnostics)により抽出した。インターロイキン28B (IL28B) 遺伝子における多型rs8099917 (野生型はTTであり、変異型はTGまたはGG)は、TaqMan SNP Genotyping Assaysにより7500 Fast Real-Time PCR System (ともにApplied Biosystems, Foster City, CA)を用いて解析した。

統計解析法

連続変数は平均値 (標準偏差)により示した。連続変数はノンパラメトリックMann-Whitney U-testにより解析した。カテゴリーデータはYates correctionまたはFischer's exact testと χ^2 検定により解析した。SVRと関連する因子の同定には、単変量解析および多変量解析を用い、オッズ比 (95%信頼区間)の計算もおこなった。統計計算結果はP値 (両側)により示し、本値が<0.05を統計的優位とし、<0.15を傾向あり、とした。以上の統計計算にはSPSS (ver. 17.0, IBM-SPSS, Chicago, IL)を用いた。

倫理面への配慮

本研究で解析した臨床検体は、参画組織における倫理委員会の承認のもと、全てインフォームドコンセントを取得した後に採取した。検体の個人情報情報は外部に洩れることのないよう厳重に管理し、その試料等は個人情報管理者及び分担管理者を設け連結可能匿名化することにより、研究者に患者の特定ができないよう配慮した。また、本研究成果の発表にあたっては、患者の氏名などは一切公表しない。

C. 研究結果

治療成績

テラプレビルを用いた三剤併用療法全体として、58名 (56.3%) の症例でSVRが認められ、23名 (22.3%) の症例でRelapse、16名 (15.5%) の症例でVBT、6名 (5.8%) の症例で治療不応答であった。

前治療部分応答群において、T12PR24療法を受けた50名のうち35名 (70%) でSVRを達成したが、12名 (24.0%) の症例でRelapse、3名 (6.0%) の症例でVBTであった。また、T12PR48療法を受けた7名のうち6名 (85.7%) がSVRとなったが、1名がVBTとなった。三剤併用療法間で比較すると、T12PR48療法の方がややSVR達成率は高かった ($P=0.68$)。

一方、前治療不応答群において、T12PR24療法を受けた31名のうち7名 (22.6%) でSVRを達成したが、7名 (22.6%) の症例でRelapse、11名 (35.5%) の症例でVBT、6名 (19.4%) の症例で治療不応答であった。また、T12PR48療法を受けた15名のうち10名 (66.7%) がSVRとなったが、4名がRelapse、1名 (6.7%) がVBTとなった。三剤併用療法間で比較すると、T12PR48療法の方が優位にSVR達成率が高かった ($P=0.0037$)。

患者群間の比較では、前治療部分応答群の方が不応群よりもSVR達成率は優位に高かった ($P=0.0004$)。

SVR予測因子

SVR達成と関連する因子を同定するため、まず単変量解析をおこなった。その結果、前治療における部分応答 ($P=0.0005$)、IL28遺伝子型野生型 (TT、 $P=0.0015$)、コアタンパク質70番目アミノ酸野生型 ($P=0.0118$)、eRVR達成 ($P=0.0002$)、白血球数高値 ($P=0.0418$)、血小板高値 ($P=0.0132$)、AST低値 ($P=0.0126$) とSVRとの間に優位な関連が認められた。また、肝硬変非進行例 ($P=0.112$)、T12PR48療法 ($P=0.0858$)、高ヘモグロビン値 ($P=0.0813$)、初回peginterferon α 2b投与量 ($P=0.1237$)、初回テラプレビル投与量 ($P=0.1411$)、低ALT値 ($P=0.1418$)、低 γ GTP値 ($P=0.0954$) および低HCV RNA値 ($P=0.0803$) とSVRとの間にも関連傾向が認められた。

そこで、上記項目について多変量解析をおこなったところ、IL28遺伝子型TT ($P=0.0005$ 、OR = 10.38、95% CI = 2.78-38.84)、eRVR達成 ($P=0.0008$ 、OR = 7.02、95% CI = 2.25-21.97)、T12PR48療法 ($P=0.0016$ 、OR = 9.31、95% CI = 2.32-37.38)、前治療における部分応答 ($P=0.0022$ 、OR = 5.89、95% CI = 1.89-13.31) がSVRと関連

する因子として同定された。

SVR達成率に対する治療法またはIL28B遺伝子多型の影響

まず前治療部分応答群を対象として解析をおこなった。T12PR24療法におけるIL28B遺伝子多型と治療効果との関連を解析したところ、TT型患者では、非TT型患者よりも優位に高いSVR達成率が認められた (89.5% vs. 58.1%、 $P=0.0262$)。しかしながら、T12PR48療法においてはIL28B遺伝子型の治療効果に対する影響は認められなかった ($P=1.0$)。また、統計上の優位性は得られなかったものの、非TT患者においてはT12PR48療法の方がT12PR24療法よりも治療奏効率は高かった。

一方、前治療不応答群を対象としてIL28B遺伝子多型の解析をおこなったところ、T12PR24療法の治療効果はTT型患者において非TT型患者よりも優位に高いSVR達成率が認められた (55.6% vs. 9.1%、 $P=0.0118$)。また上記と同様、T12PR48療法においてはIL28B遺伝子型の治療効果に対する影響は認められなかった ($P=1.0$)。一方、非TT患者においては、T12PR48療法の方がT12PR24療法よりも治療奏効率は優位に高かった (66.7% vs. 9.1%、 $P=0.0009$)。

全体として、IL28遺伝子TT型患者では、治療法によるSVR達成率の差は認められず、IL28遺伝子非TT型患者においてのみ、治療法による差 (T12PR48療法の方が高効果) が認められる結果であった。

SVR達成率に対するeRVR達成およびIL28B遺伝子多型の影響

まず前治療部分応答群を対象として解析をおこなった。T12PR24療法をおこなったIL28B遺伝子TT型患者において、eRVR達成患者のSVR率92.9%に対してeRVR非達成患者のSVR率は80.0%であり、SVR達成率とeRVR達成率との間に関連は認められなかった ($P=0.4678$)。しかしながら、T12PR24療法をおこなったIL28B遺伝子非TT型患者においては、非eRVR達成患者と比べ、達成患者では高いSVR達成率が得られる傾向が認められた (66.7% vs. 28.6%、 $P=0.0994$)。

また、T12PR48療法をおこなったIL28B遺伝子非TT型患者においてはeRVR達成とSVR達成には関連が認められず ($P=1.0$)、TT型患者3名ではeRVRとSVRともに認められた。

一方、T12PR24療法をおこなった前治療不応答群のIL28B遺伝子TT型患者において解析をおこ

なったところ、eRVR非達成患者と比べ、達成患者において高いSVR達成率が得られる傾向が認められた(100% vs. 33.3%, $P=0.1667$)。同様の傾向は、T12PR24療法をおこなった前治療不応答群非TT型患者においても認められた(25% vs. 0%, $P=0.1212$)。

また、T12PR48療法をおこなった前治療不応答群のIL28B遺伝子TT型患者では、eRVRを達成した66.7%の症例でSVRの達成が認められ、非TT患者においてもeRVRを達成した症例において高いSVR達成率が得られる傾向が認められた($P=0.5475$)。

D. 考察

本研究では、前治療(PR)部分応答患者におけるT12PR24療法の奏効率は70.0%であるのに対し、前治療不応答患者では22.6%であり、前治療不応答患者の三剤併用療法に対する応答性は著しく低いことが明らかとなった。これまでの本邦における臨床試験においても、前治療不応答患者ではT12PR24療法の奏効率が低いこと(27-46%)が報告されており、今回の結果と一致している。しかしながら本研究の結果、日本人において初めて、T12PR48療法をおこなうことにより前治療不応答患者のSVR率が大きく上昇することが明らかとなった。したがって、前治療不応答患者においてはT12PR48療法を選択することが推奨されると考えられる。

従来併用療法(PR)では、IL28B遺伝子の遺伝子多型(rs8099917およびrs12979860)は極めて強い治療効果関連因子であることが広く知られている。一方、未治療患者および前治療歴を有する患者におけるT12PR24療法においては、これら遺伝子多型と治療奏効率との間に関連が認められるとする報告があるものの、T12PR48療法においては患者の前治療歴に係らず治療効果とこれら遺伝子多型との関連はほとんど認められないとする報告もある。本研究においては、T12PR24療法において前治療部分応答群および不応答患者群ともにrs8099917野生型と治療奏功との関連が認められるものの、T12PR48療法ではその影響が認められず、IL28B遺伝子多型の臨床的意義は治療法限定的であると考えられた。したがって、三剤併用療法におけるIL28B遺伝子多型の臨床的意義は従来療法時と比較して小さくなったと言える。しかしながら、実際の臨床現場においては前治療に対する部分応答と不応答を判別することが難しい(または不可能)ことも多いことから、そのような患者においてIL28B遺伝子多型解析は、ある程度の治療応答予測指標となると考えられる。

さらに本研究結果からは、eRVRもT12PR24療法における治療奏功指標として有用であることが明らかとなり、さらにeRVRに加えIL28B遺伝子多型も考慮することにより優れた治療奏功の予測が可能となると考えられた。しかしながら、eRVRについてもT12PR48療法ではその臨床的意義は小さくなる傾向にある。したがって、上述のIL28B遺伝子多型の場合と同じく、前治療歴を指標とできない患者においてeRVRは治療奏功を予測する指標の一つとして有用であると考えられる。

以上をまとめると、前治療不応答患者およびIL28B遺伝子非野生型の前治療部分応答患者ではT12PR48療法が推奨され、またIL28B遺伝子野生型の前治療部分応答患者では、T12PR24療法が現実的な治療選択と成り得ると考えられる。一方で、本研究において前治療不応答患者でもIL28B遺伝子野生型でeRVRを達成した症例では高いSVR達成率が認められていることから、このような患者においてはT12PR24療法も適応可能である可能性がある。

上述のとおり、本研究の結果は、個々の患者に対する適切なテラプレビル三剤併用療法の施行に有用な知見となると考えられる。今後は、症例数をさらに増やして解析をおこなうことにより、治療歴やIL28B遺伝子多型、eRVR等と治療効果との関連を更に詳細に明らかとし、それに基づいた治療選択ガイドラインを確立していく必要があると考えられる。また、今回は各治療法においてランダム化していないことも考慮すべき事項であり、上述のような今後の関連解析においては患者のランダム化も必要となると考えられる。

さらに、近い将来テラプレビルに次ぐ多くの次世代直接作用型抗HCV薬が臨床で使用可能となると予想される。つい最近、本邦では世界に先駆けてシメプレビルが承認され、治療に用いられ始めている。次世代直接作用型抗HCV薬は概してテラプレビルよりも高い治療効果が期待されており、治験成績ではシメプレビル12週間+PR48週間の治療で前治療部分応答例で68%および不応答例で56%の奏効率が得られている。したがって今後は、個々の次世代直接作用型抗HCV薬についてテラプレビルとの治療効果比較をおこない、より優れた治療法を明らかとするとともに、治療法毎の奏功関連因子を明らかとする必要がある。

E. 結論

PRによる前治療無効例の1b型日本人C型肝炎患者において、T12PR48療法は優れたSVR達成率が期待できることが明らかとなった。特に、前治療不応答例およびIL28B遺伝子多型変異型患者に

おいては、T12PR48療法が強く推奨される。

今後は、次世代直接作用型C型肝炎治療薬を用いた三剤併用療法と本研究結果を比較し、治療奏功関連要因を明らかとしてC型肝炎個別化治療の発展を目指す必要がある。また、本研究において治療方法や種々の患者背景が治療奏効関連因子となりうる事が明らかとなったことから、上述のような今後の臨床試験および当該研究事業における関連解析においても、患者背景を十分に考慮した計画・解析が必要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tsubota A, Mogushi K, Aizaki H, Miyaguchi K, Nagatsuma K, Matsudaira H, Kushida T, Furihata T, Tanaka H, Matsuura T. Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p in Poor Virologic Response to Interferon-Based Combination Therapy for Chronic Hepatitis C. *PLoS One*. 2014; 9:e97078.

Shimada N*, Tsubota A*, Atsukawa M, Abe H, Ide T, Takaguchi K, Chuganji Y, Toyoda H, Yoshizawa K, Ika M, Sato Y, Kato K, Kumada T, Sakamoto C, Aizawa Y, Sata M. (*equally contributed) A 48-week telaprevir-based triple combination therapy improves sustained virological response rate in previous non-responders to peginterferon and ribavirin with genotype 1b chronic hepatitis C: A multicenter study. *Hepatol Res*. 2014, in press.

Atsukawa M*, Tsubota A*, Shimada N, Kondo C, Itokawa N, Nakagawa A, Fukuda T, Matsushita Y, Narahara Y, Osada Y, Yamaguchi H, Nakatsuka K, Iwakiri K, Kawamoto C, Sakamoto C. (*equally contributed) Effect of fluvastatin on 24-week telaprevir-based combination therapy for hepatitis C virus genotype 1b-infected chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014, in press.

Atsukawa M*, Tsubota A*, Shimada N, Kondo C, Itokawa N, Nakagawa A, Hashimoto S, Fukuda T, Matsushita Y, Narahara Y, Iwakiri K, Nakatsuka K, Kawamoto C, Sakamoto C. (*equally contributed) Serum 25-hydroxy-vitamin D3 levels affect treatment outcome in pegylated-interferon/ ribavirin combination therapy for compensated cirrhotic patients

with HCV genotype 1b and high viral load. *Hepatol Res*. 2014, in press.

Atsukawa M*, Tsubota A*, Shimada N, Kondo C, Itokawa N, Nakagawa A, Hashimoto S, Fukuda T, Matsushita Y, Kidokoro H, Narahara Y, Nakatsuka K, Iwakiri K, Kawamoto C, Sakamoto C. (*equally contributed) Efficacy of alfacalcidol on PEG-IFN/ribavirin combination therapy for elderly patients with chronic hepatitis C: a pilot study. *Hepat Mon*. 2013;13:e14872.

Tsubota A*, Furihata T, Matsumoto Y, Chiba K. Sustained and rapid virological responses in hepatitis C clinical trials. *Clinical Investigation*. 2013;3:1083-93.

Shimada N, Toyoda H, Tsubota A, Ide T, Takaguchi K, Kato K, Kondoh M, Matsuyama K, Kumada T, Sata M. Baseline factors and very early viral response (week 1) for predicting sustained virological response in telaprevir-based triple combination therapy for Japanese genotype 1b chronic hepatitis C patients: a multicenter study. *J Gastroenterol*. 2013.

Shimada N*, Tsubota A*, Atsukawa M, Abe H, Ika M, Kato K, Sato Y, Kondo C, Sakamoto C, Tanaka Y, Aizawa Y. (*equally contributed) α -Fetoprotein is a surrogate marker for predicting treatment failure in telaprevir-based triple combination therapy for genotype 1b chronic hepatitis C Japanese patients with the IL28B minor genotype. *J Med Virol*. 2014;86:461-72.

Tsubota A*, Shimada N, Atsukawa M, Abe H, Kato K, Ika M, Matsudaira H, Nagatsuma K, Matsuura T, Aizawa Y. Impact of IL28B polymorphisms on 24-week telaprevir-based combination therapy for Asian chronic hepatitis C patients with hepatitis C virus genotype 1b. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29:144-50.

Aizawa Y, Shimada N, Abe H, Seki N, Aida Y, Ishiguro H, Ika M, Kato K, Tsubota A. Serum lipoprotein profiles and response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic HCV genotype 1b infection. *Hepat Mon*. 2013;13:e8988.

Yoshizawa K, Abe H, Aida Y, Ishiguro H, Ika M, Shimada N, Tsubota A, Aizawa Y. Serum apolipoprotein B-100 concentration predicts the virological response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients infected with chronic hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol.* 2013;85:1180-90.

Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M; Japanese AHB Study Group (Appendix; Tsubota A). Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology.* 2014;59:89-97.

Nagatsuma K, Hano H, Murakami K, Shindo D, Matsumoto Y, Mitobe J, Tanaka K, Saito M, Maehashi H, Owada M, Ikegami M, Tsubota A, Ohkusa T, Aizawa Y, Takagi I, Tajiri H, Matsuura T. Hepatic stellate cells that coexpress LRAT and CRBP-1 partially contribute to portal fibrogenesis in patients with human viral hepatitis. *Liver Int.* 2014;34:243-52.

Abe H, Aida Y, Ishiguro H, Yoshizawa K, Seki N, Miyazaki T, Itagaki M, Sutoh S, Ika M, Kato K, Shimada N, Tsubota A, Aizawa Y. New proposal for response-guided peg-interferon-plus-ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C virus genotype 2 infection. *J Med Virol.* 2013;85:1523-33.

Kanda T, Kato K, Tsubota A, Takada N, Nishino T, Mikami S, Miyamura T, Maruoka D, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Platelet count and sustained virological response in hepatitis C treatment. *World J Hepatol.* 2013;5:182-8.

Kanda T, Nakamoto S, Nishino T, Takada N, Tsubota A, Kato K, Miyamura T, Maruoka D, Wu S, Tanaka T, Arai M, Mikami S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 2 who failed

previous interferon therapy. *Int J Med Sci.* 2013;10:43-9.

Itokawa N, Atsukawa M*, Tsubota A*, Kondo C, Hashimoto S, Fukuda T, Matsushita Y, Kidokoro H, Kobayashi T, Narahara Y, Nakatsuka K, Kanazawa H, Iwakiri K, Sakamoto C. (*equally contributed) Lead-in treatment with interferon- β /ribavirin may modify the early hepatitis C virus dynamics in pegylated interferon alpha-2b/ribavirin combination for chronic hepatitis C patients with the IL28B minor genotype. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28:443-9.

Atsukawa M*, Tsubota A*, Kondo C, Itokawa N, Narahara Y, Nakatsuka K, Hashimoto S, Fukuda T, Matsushita Y, Kidokoro H, Kobayashi T, Kanazawa H, Sakamoto C. (*equally contributed) Combination of fluvastatin with pegylated interferon/ribavirin therapy reduces viral relapse in chronic hepatitis C infected with HCV genotype 1b. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28:51-6.

2. 学会発表

加藤慶三, 島田紀朋, 豊田秀徳, 井出達也, 坪田昭人, 高口浩一, 佐田通夫, 泉 並木, 熊田 卓. 早期ウイルス動態からのTelaprevir 3 剤併用療法の治療効果予測の検討. 第17回日本肝臓学会大会 (2013. 10. 9 東京).

厚川正則, 島田紀朋, 坪田昭人, 近藤千紗, 糸川典夫, 中川 愛, 福田 健, 檜原義之, 安部 宏, 相澤良夫, 岩切勝彦, 坂本長逸. 脾腫を伴う血小板低値のC型慢性肝炎に対するPSE先行 3 剤併用療法の検討. 第17回日本肝臓学会大会 (2013. 10. 9 東京).

相澤良夫, 安部 宏, 關 伸嘉, 会田雄太, 石黒晴哉, 島田紀行朋, 坪田昭人. 血清アポリポプロテインE (apoE) 値はHCV持続感染の病態に関与するか? 第17回日本肝臓学会大会 (2013. 10. 9 東京).

中川 愛, 厚川正則, 島田紀朋, 坪田昭人, 糸川典夫, 近藤千紗, 福田 健, 松下洋子, 檜原義之, 中塚雄久, 長田祐二, 岩切勝彦, 坂本長逸. C型慢性肝炎に対するTelaprevirを含む 3 剤併用療法における治療成績. 第17回日本肝臓学会大会 (2013. 10. 9 東京).