

### 第Ⅲ章

## 変貌したC型慢性肝炎の経過

# 6 C型慢性肝炎の抗ウイルス治療

## ④ 自然免疫系と抗ウイルス治療効果

*Innate Immunity and Anti-viral Response in Patients with Chronic Hepatitis C*

朝比奈靖浩\* \*\* 新田沙由梨\*  
渡辺 守\*

Ⅲ

変貌したC型慢性肝炎の経過

⑥ C型慢性肝炎の抗ウイルス治療  
④

### はじめに

近年、C型肝炎ウイルス(HCV)増殖に重要な働きをもつHCV蛋白を直接阻害する経口投与可能な新規抗ウイルス薬、いわゆるHCV直接阻害薬(direct acting anti-viral agent; DAA製剤)の開発が急速に進んでいる。これらDAA製剤のうちもっとも開発が進んでいるのは、HCVのnon-structural(NS)3/4Aを標的としたプロテアーゼ阻害薬であり、genotype 1b型かつ高ウイルス症例のいわゆる難治性C型慢性肝炎に対して、ペグインターフェロン $\alpha$ (Peg-IFN $\alpha$ )およびリバビリン(RBV)と併用する3剤併用療法が臨床導入され、飛躍的に治療成績が向上した。

しかし、これら新規治療においてもPeg-IFN $\alpha$ +RBV併用療法に対してnull response

となる症例、すなわちIFN不応例における治療成績は十分ではなく、未だHCVの持続感染を完全に制御し疾患を完全に克服するのは困難である。したがって、IFNの応答性を規定する因子やその分子機構を理解しておくことは、最先端の臨床を实践するうえでも重要である。IFNの応答性にはウイルス側要因および宿主側要因の双方が関与すると考えられており、これまで種々の因子が同定されてきた。なかでも宿主要因としては自然免疫系が宿主ゲノムの遺伝子多型とともに大きく関与することが明らかとなり重要である。

本稿ではC型肝炎における宿主自然免疫系の臨床的意義について概説する。

### I HCV感染と自然免疫

HCVが細胞に感染すると、まずHCV由来

**Key words** : innate immunity, RIG-I, IPS-1, STING, interferon stimulated gene

Yasuhiro Asahina/Sayuri Nitta/Mamoru Watanabe

\*東京医科歯科大学消化器内科 \*\*同 大学院医歯学総合研究科肝臓病態制御学 (〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45)

0911-601X/14/JCOPY

臨床消化器内科 Vol. 29 No. 7 2014 (921) 149

のRNAが細胞内のウイルスセンサーであるRIG-I (retinoic acid inducible gene I)によって探知され、そのシグナルがアダプター分子であるIPS-1 (IFN- $\beta$  promoter stimulator-1: 別名 MAVS, Cardif, VISA) を介して核に伝達されIFN $\beta$ およびIFN $\lambda$ が産生される。この宿主自然免疫の作動がHCV感染に際して生体側で起こる最初の防御機構であるとされる。これらHCV感染により誘導されたIFN $\beta$ およびIFN $\lambda$ は、それぞれI型およびIII型IFN受容体に結合しJak-STAT (signal transducer and activator of transcription) 経路を介して多様なIFN誘導遺伝子 (ISG) を誘導し、宿主の抗ウイルス状態を惹起すると考えられている (図1)。

RIG-Iは細胞質に存在するヘリカーゼであり、ウイルス由来の5'の三リン酸構造や3'のポリU配列を認識し、形質細胞様樹状細胞以外のほとんどの細胞においてウイルス感染センサーとして必須の役割を担っている。RIG-Iと構造上非常に類似したファミリー分子であるMDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) も同様の機能を有するウイルスセン

サー分子であることが示されているが、ピコルナウイルスなどRIG-Iとは違ったウイルス種を認識しているとされる。RIG-IまたはMDA5がウイルス由来RNAを探知するとその三次構造が変化し、下流で機能するアダプター分子であるIPS-1と会合する。IPS-1はミトコンドリアにアンカリングしている蛋白であり、RIG-IやMDA5が探知したウイルス感染シグナルを核に伝えるのに必須である。

一方、HCVのNS3/4AセリンプロテアーゼはIPS-1をミトコンドリアと結合している部分で切断することが知られており、HCVはRIG-I/IPS-1系を標的とすることで巧みに宿主の自然免疫系から逃れている可能性が示唆されている (図2)。したがって、RIG-I/IPS-1系は宿主によるHCVの排除およびそれに対するHCVの抵抗性の双方に大きく関与し、治療効果に影響を与えていると考えられる。

## II 自然免疫系遺伝子の肝内発現プロファイルと抗ウイルス効果

われわれはPeg-IFN $\alpha$ /RBV併用療法を施

図1 HCV感染と宿主自然免疫機構

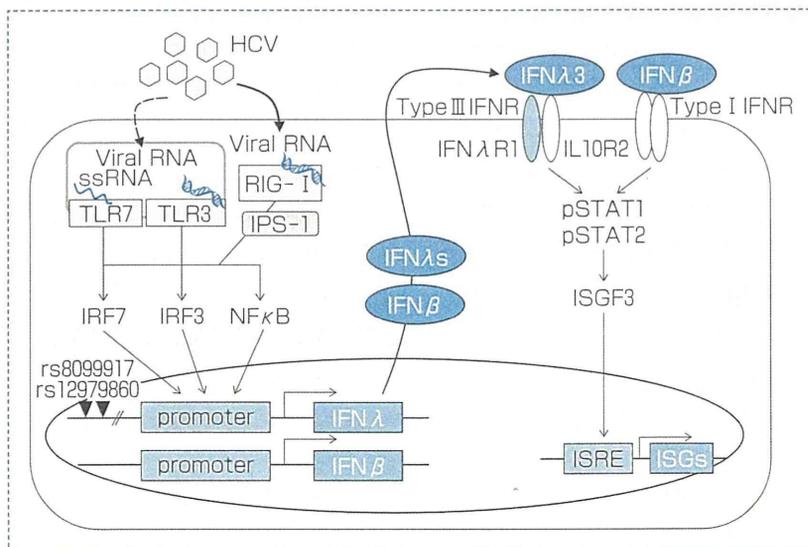


図2 HCV蛋白による自然免疫逃避機構

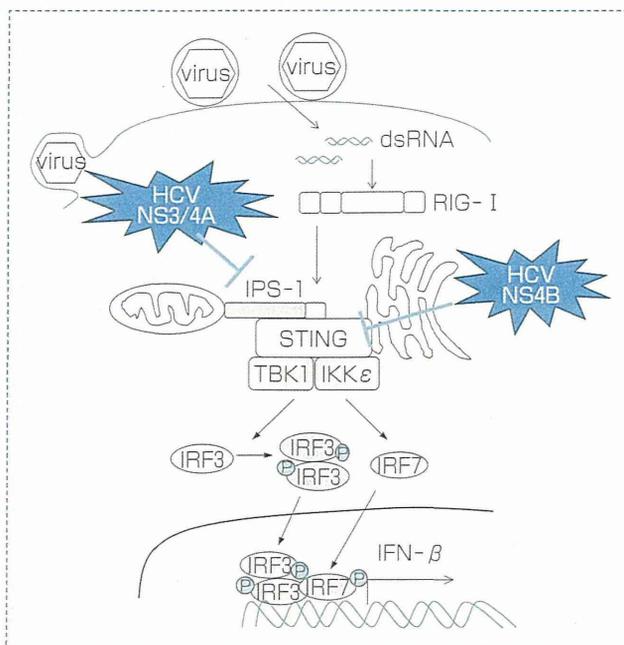
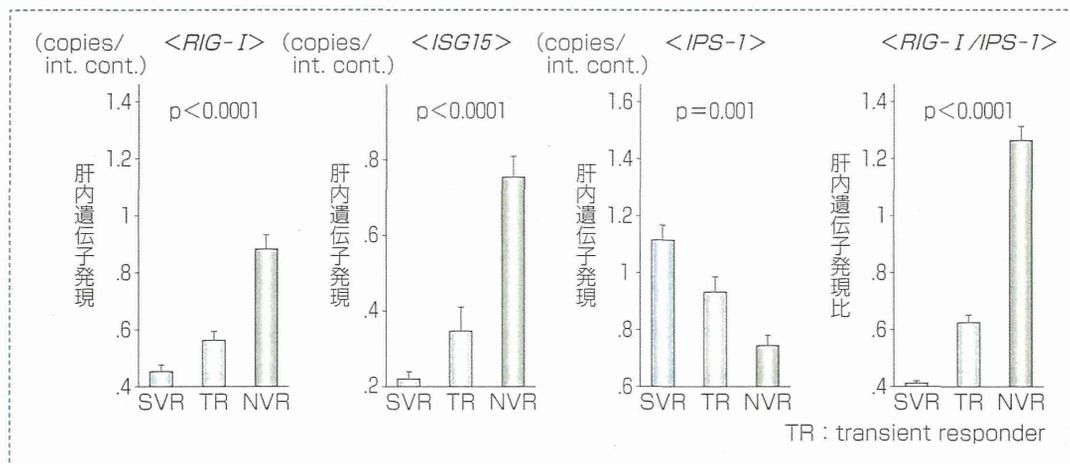


図3 Peg-IFN/RBV 併用療法の最終ウイルス学的治療効果と自然免疫系分子の肝内遺伝子発現

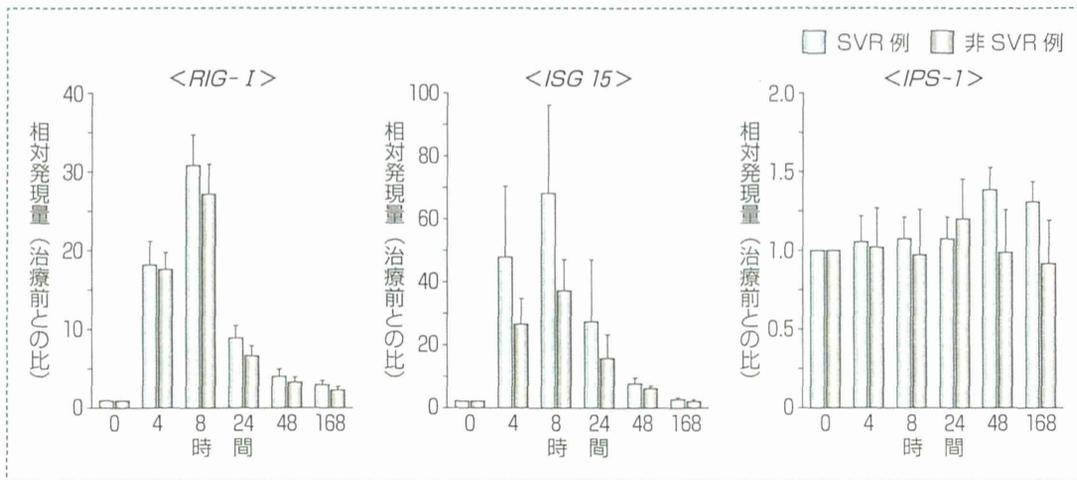


[Asahina, Y., et al. : Gastroenterology 134 : 1396-1405, 2008<sup>1)</sup> より改変・引用]

行した genotype 1b 高ウイルス量の C 型慢性肝炎 74 例を対象として、治療直前に肝生検を施行し、総 RNA を抽出後リアルタイム PCR 法を用いて細胞内ウイルスセンサーである RIG-I や IFN 誘導遺伝子である ISG15 およびアダプター分子である IPS-1 の mRNA の肝内発現を定量した<sup>1)</sup>。それによると、RIG-I

および ISG15 の肝内遺伝子発現は、治療中 HCV が減衰しない non-viral responder (NVR) ではウイルス学的著効例 (sustained viral responder ; SVR) 群に比し有意に高発現しているのに対して、IPS-1 の治療前肝内遺伝子発現は NVR 群で有意に低値で、RIG-I / IPS-1 比は NVR で有意に高かった(図 3)<sup>1)</sup>。したがっ

図4 Peg-IFN/RBV 併用療法治療中における自然免疫系遺伝子の末梢血単核球における発現動態と最終治療効果



[Asahina, Y., et al. : Gastroenterology 134 : 1396-1405, 2008<sup>1)</sup> より改変・引用]

て、*RIG-I* や *ISG15* は HCV 感染による内因性 IFN により肝内に発現誘導され、難治例で up regulate されていることが示唆された。

多変量解析では、*ISG15* 発現および *RIG-I* / *IPS-1* 比と血小板数が NVR に関与する独立因子として有意で、ROC 解析では *ISG15* 発現および *RIG-I* / *IPS-1* 比の area under the curve は 0.9 以上となり、これらの遺伝子の治療前における肝内発現を定量することは Peg-IFN  $\alpha$  / RBV 併用療法の最終治療効果の治療前に予測するのにきわめて有用と考えられた。

### III 自然免疫系遺伝子の経時的発現と治療効果

前述のように、*RIG-I* などの治療前における肝内遺伝子発現は、Peg-IFN  $\alpha$  / RBV 併用療法不応例である NVR で高発現しているが、Peg-IFN  $\alpha$  / RBV 投与による反応性はどのようになっているであろうか。そこで、末梢血単核球中における、*RIG-I*、*ISG15* および *IPS-1* の Peg-IFN/RBV 投与前後における経時的遺伝子発現動態を解析すると、*RIG-I* と *ISG15*

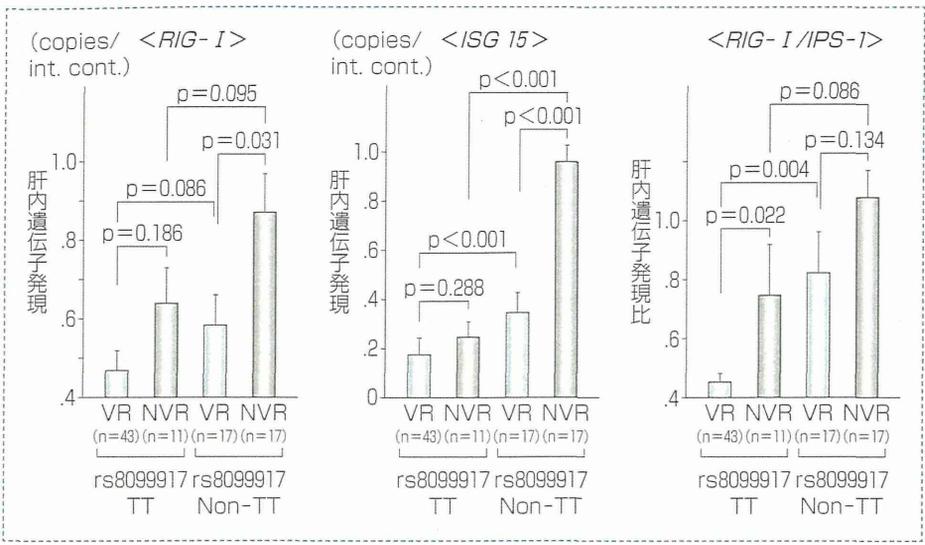
の発現量は、Peg-IFN/RBV 投与の 8 時間後に強く誘導された (図 4)<sup>1)</sup>。さらに、この遺伝子誘導は最終的にウイルスが駆除された SVR 例で高い傾向を認め、外因性 IFN による遺伝子の誘導能と治療効果との間に関連があることが示唆された。一方、*IPS-1* の発現動態は Peg-IFN/RBV 投与により大きく影響は受けないことが観察され、治療中も constitutive に発現していることが示唆された。

以上より、NVR 例では治療前に内因性 IFN により自然免疫系がすでに up regulation されているため、治療薬である外因性 IFN に対する反応性が減弱していることが示唆され、IFN に対する不応性のメカニズムの本質に近い現象と考えられる。

### IV 自然免疫系遺伝子発現プロファイルと *IL28B* 遺伝子多型との関連

最近、genome-wide association study (GWAS) を用いた宿主遺伝子の網羅的解析により、ヒト 19 番染色体上に存在し IFN  $\lambda$  をコードする *IL28B* 近傍の一遺伝子多型 (SNP)

図5 自然免疫系遺伝子の肝内発現と *IL28B* 遺伝子多型およびウイルス学的治療効果



[Asahina, Y., et al. : Hepatology 55 : 20-29, 2012<sup>5)</sup> より改変]

と Peg-IFN $\alpha$ /RBV 併用療法における NVR との関連が明らかとなり、大きな注目を集めている<sup>2)~4)</sup>。そこで、この *IL28B* の SNP (rs8099917) と宿主自然免疫系の遺伝子発現の関連を genotype 1b の C 型慢性肝炎患者で検討すると<sup>5)</sup>、NVR に関与する rs8099917 non-TT の症例では *RIG-I* および *ISG15* の肝内遺伝子発現は rs8099917 TT の症例に比し有意に高値であった。しかし、rs8099917 TT の症例でも NVR となった症例では、ウイルス反応が得られた症例に比し、これらの肝内遺伝子発現は高値で、同様に rs8099917 non-TT でも治療中ウイルス減衰がみられた症例では遺伝子発現が低値であった (図 5)。これらの検討症例における多変量解析では、自然免疫系遺伝子発現と年齢のみが NVR に寄与する有意な独立因子として抽出され、*IL28B* SNP (single nucleotide polymorphism) は抽出されなかった。したがって、宿主自然免疫系は *IL28B* の SNP と密接に関連しつつも独立して IFN 不応性に関連している可能性が示唆された。

### V 宿主自然免疫に対する HCV の逃避機構

これまで述べたように、HCV の排除には *RIG-I/IPS-1* 系を中心とした宿主自然免疫とそれに引き続く IFN 応答が重要であり、*IL28B* SNP とともに密接に治療効果に関連している。これに対して、HCV は自己の NS3/4A セリンプロテアーゼで *IPS-1* を特異的に切断することでこの宿主自然免疫機構を攪乱し、巧みな逃避機構を有していることが知られている。実際、前項に挙げた *IL28B* non-TT 症例においても IFN 感受性を示した症例では *IPS-1* が HCV により cleavage されないことが関連し<sup>5)</sup>、HCV 逃避機構は治療効果と関連していると考えられる。

最近、われわれの研究室では NS3/4A プロテアーゼとは別に HCV の NS4B 蛋白による自然免疫からの逃避機構を明らかにし、その標的分子が *IPS-1* のさらに下流分子である *STING* であることを発見した<sup>6)</sup> (図 2)。さらに本研究では、NS4B 蛋白による宿主自然免疫抑制機構

がNS3/4A プロテアーゼによる阻害機構と協調的に作用し RIG- I 依存性シグナルを遮断していることも明らかとなった。したがって、NS4B 蛋白が HCV の持続感染を終息させるための新たな標的となりうることを示唆しており、今後の研究の発展が期待される。

## おわりに

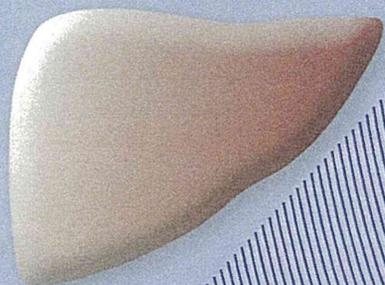
---

これまで述べてきたように、RIG- I /IPS-1 系を中心とする宿主自然免疫系は IFN 不応性の本質と密接に関与しており、抗ウイルス治療効果と関連している。したがって、これらの遺伝子発現プロファイルを解析することは治療効果の予測に有用である。一方、ウイルス側も複数の HCV 蛋白を協調的に利用しシグナル伝達を遮断し宿主自然免疫機構から逃避することで、持続感染を成立させている。今後これら宿主自然免疫とウイルス自然免疫攪乱機構の全貌が明らかとなることで、これらを標的とした治療法が開発され、ウイルス持続感染の終息と肝炎の完全制圧が期待される。

## 文 献

- 1) Asahina, Y., Izumi, N., Hirayama, I., et al. : Potential relevance of cytoplasmic sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology* 134 : 1396-1405, 2008
- 2) Tanaka, Y., Nishida, N., Sugiyama, M., et al. : Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* 10 : 1105-1109, 2009
- 3) Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., et al. : Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461 : 399-401, 2009
- 4) Thomas, D.L., Thio, C.L., Martin, M.P., et al. : Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461 : 798-801, 2009
- 5) Asahina, Y., Tsuchiya, K., Muraoka, M., et al. : Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in interleukin 28B with antiviral response. *Hepatology* 55 : 20-29, 2012
- 6) Nitta, S., Sakamoto, N., Nakagawa, M., et al. : Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG- I -mediated type- I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 57 : 46-58, 2013

# 肝疾患 2014 - 2015 Review



監修 小俣 政男

編集 椎名秀一朗  
坂本 直哉  
丸澤 宏之

## ■肝炎の基礎

HBV培養系と薬剤探索  
IFN- $\lambda$ 産生樹状細胞  
DAA治療マウスモデル  
分泌型microRNA

## ■肝炎の臨床

DAA治療の新展開  
Simeprevir  
Daclatasvir + Asunaprevir併用療法  
チェーンターミネーター:Sofosbuvir  
HCV駆除後の肝発癌  
de novo B型肝炎

## ■肝癌の診断・治療

診断・治療のバイオマーカー  
エビデンスに基づく肝癌画像診断  
腹腔鏡下肝切除術  
ラジオ波治療機器の新展開  
メタボ肝癌  
多様化する放射線治療  
分子標的薬開発の将来展望  
ゲノムからみた肝癌

## ■その他—肝病態理解のために

PBCの発症関連遺伝子  
IgG4関連胆管炎  
肝炎と肝脂肪化  
肥満と肝癌  
iPS細胞と肝再生  
ヒト化肝臓マウス  
肝癌の癌幹細胞



日本メディカルセンター

## 第2部 トピックス

### 2. 肝炎の臨床

# 6 HBs 抗原消失を目指した肝炎治療

朝比奈靖浩

#### point

- ◆ HBV 持続感染者における抗ウイルス療法の長期目標は HBs 抗原の消失である。
- ◆ ペグインターフェロンによる HBs 抗原陰性化率は、治療終了後 24 週時点では 2.3～4.0%、治療終了後 3 年では 8.7～12% であり、HBe 抗原消失や HBV DNA 陰性化が得られた治療反応例で高率である。
- ◆ 核酸アナログ治療は HBV DNA 抑制作用は強力であるが、HBs 抗原消失率は年率 0.33% 程度である。
- ◆ 抗ウイルス療法中の HBs 抗原量のモニターは、治療効果予測に有用である。

#### はじめに

B 型肝炎ウイルス (HBV) 持続感染者に対する抗ウイルス療法の治療目標は、肝炎の活動性と肝線維化進展の抑制による慢性肝不全の回避並びに肝細胞癌の抑止で、それらにより生命予後と QOL を改善することである。この目標を達成するためにもっとも有用な指標は HBs 抗原であり、日本肝臓学会のガイドラインでも HBV 持続感染者における抗ウイルス療法の長期目標は HBs 抗原の消失に設定されている。

HBs 抗原は HBV のエンベロープに存在する抗原であり、血中には Dane 粒子のほかに中空粒子、小型球形粒子、管状粒子として存在し、いずれも肝細胞内の Covalently Closed Circular DNA (cccDNA) から産生される (図 2-2-19)。したがって、HBs 抗原量は肝内 cccDNA 量を反映し

ている。台湾で行われた前向き研究では HBV DNA とともに HBs 抗原が高値なほど肝細胞癌の発症率が増加することが示され、とくに HBe 抗原陰性かつ低ウイルス量の症例では肝細胞癌の発症は HBs 抗原量に相関する<sup>1)</sup>。また、アラスカの前向き研究では HBs 抗原消失後の肝細胞癌の発症率は 0.0368/年であり、HBs 抗原が持続陽性例の 0.1957/年に比し、有意に肝細胞癌の発症率が低下していると報告している<sup>2)</sup>。このように、HBV の自然経過において肝内 cccDNA 量を反映する HBs 抗原量は発癌リスクと密接に関連しているため、B 型慢性肝炎の抗ウイルス治療においても治療の長期目標は HBs 抗原の消失におくべきと考えられる。

#### I. ペグインターフェロン治療

HBV 持続感染者に対する治療は、大きく分け

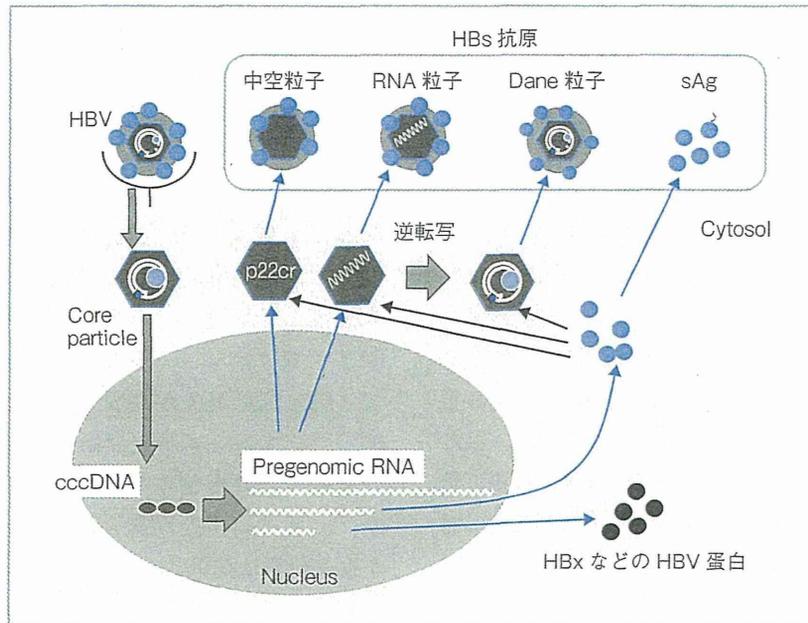


図 2-2-19 HBV の複製と HBs 抗原

てインターフェロン (IFN) 治療と核酸アナログ治療があり、それぞれ特性が異なる。治療の短期目標である ALT 持続正常化率や HBV DNA 抑制率は核酸アナログのほうが良好であるが、長期目標である HBs 抗原陰性化率は HBe 抗原陽性例<sup>3),4)</sup>・陰性例<sup>5)~8)</sup>ともに、ペグインターフェロン (Peg-IFN) のほうが良好である (表 2-2-4)。IFN は、HBV DNA 増殖抑制作用とともに抗ウイルス作用、免疫賦活作用を有しており、治療期間は一定期間に限定され、治療反応例では投与終了後も Drug free で治療効果が持続するという利点がある。

### 1. HBe 抗原陽性例における Peg-IFN の効果

海外において HBe 抗原陽性例 814 例を対象とし、Peg-IFN $\alpha$ -2a 48 週投与群、Peg-IFN $\alpha$ -2a + ラミブジン 48 週併用群、ラミブジン単独 48 週投与群の 3 群比較試験が行われた<sup>3)</sup>。それによると、治療終了後 24 週時点における HBe 抗原セロコンバージョン率は、32%、27%、19%と Peg-IFN $\alpha$ -2a 群で高く、HBs 抗原のセロコンバージョンを 3% に認めた。さらに Peg-IFN $\alpha$ -2b で治療した HBe 抗原陽性 B 型慢性肝炎 172 例の平

表 2-2-4 ペグインターフェロン治療における HBs 抗原消失率

	HBe 抗原陽性例	HBe 抗原陰性例
治療終了後 24 週	2.3~3.0%	2.8~4.0%
治療終了後 3~5 年	11%	8.7~12%

均 3 年間に及ぶ長期経過観察では、全体の 11%、治療終了後 26 週で HBe 抗原陰性となった症例の 30% で HBs 抗原が消失し、14 年では 64% と高率であった<sup>4)</sup>。

### 2. HBe 抗原陰性例における Peg-IFN の効果

HBe 抗原陰性例に対する Peg-IFN 治療では、43~44% の症例で HBV DNA が低下し、25~28% の症例で HBV DNA 4.0 log copies/ml 未満が持続する<sup>5)</sup>。しかし、治療終了後の HBV DNA の陰性化維持は高くなく、治療終了 24 週時点では 19%<sup>6)</sup>、長期経過でも 18~21% にとどまる<sup>5),7)</sup>。一方、HBs 抗原陰性化率は、治療終了後 24 週時点では 2.8~4.0%、治療終了後 3 年では 8.7~12%<sup>5),7)</sup> であり、とくに治療反応例の HBV DNA 陰性化例に限定すれば 3 年で 44%<sup>5)</sup>、治療

終了時の HBs 抗原量が 10 IU/ml 未満の症例に限定すれば 52% と高率である。

Peg-IFN $\alpha$ -2a の長期投与の効果を検討したイタリアの Genotype D 128 例の検討では、Peg-IFN $\alpha$ -2a を 96 週間投与した症例において、ウイルス学的治療効果 (HBV DNA < 2,000 IU/ml) の達成率は 29% であり、48 週治療の 12% に比し有意に高率であった。HBs 抗原消失率も 96 週・48 週それぞれ 6%、0% と、96 週間投与群で良好であった<sup>9)</sup>。したがって、HBe 抗原陰性の B 型慢性肝炎に対する Peg-IFN $\alpha$ -2a 治療では、投与期間を延長するとより高い効果が期待できる可能性があるが、わが国では 48 週を超える投与に対する保険適用はない。

## II. 核酸アナログ治療

核酸アナログ製剤は HBV 自身がコードする逆転写酵素を特異的に阻害し、HBV DNA の合成を強力に抑制する薬剤である。したがって、本治療で血中 HBV DNA 量は速やかに低下し、ALT 値も改善する。しかし、Peg-IFN 治療と比較して HBs 抗原量の低下が少ないことが指摘されている (表 2-2-5)。

エンテカビル治療では、HBV DNA の陰性化は治療開始 48 週時点で 90%<sup>9)</sup>、長期経過では 100% ときわめて高率であり<sup>9)</sup>、治療前因子にかかわらず確実に HBV DNA 陰性化を達成できる。しかし、HBs 抗原の陰性化率は Peg-IFN よりも低率であり、治療開始 48 週時点で 1.7%、3~5 年の治療で 0.6~5.1% である。長期継続治療では、たとえばラミブジンを中心とした核酸アナログ治療では 9 年で 6.9%、アデホビルでは 38 年で 5% に HBs 抗原が陰性化したとの報告があ

表 2-2-5 エンテカビル治療における HBs 抗原消失率

	HBe 抗原陽性例	HBe 抗原陰性例
治療開始後 1 年	1.7%	0%
治療開始後 2~5 年	0.6~5.1%	0%

る<sup>10)</sup>。テノホビルについても同様で、7 年間の欧州における追跡調査では、HBs 抗原の消失は 266 例の HBe 抗原陰性例の 26 例 (10%) に認められた<sup>11)</sup>。

ラミブジンまたはエンテカビルで初回治療を行った 5,409 例の B 型慢性肝疾患を平均 6 年間観察した最近の研究では、110 例が HBs 抗原消失を達成し、消失率は年率 0.33% であった<sup>12)</sup>。核酸アナログによる HBs 抗原消失は概ね持続的で、HBs 抗原消失が達成されると発癌率や生存率が改善する。本研究では HBs 抗原消失例からの発癌は肝硬変例の 2 例のみと報告されているが<sup>12)</sup>、反対に HBs 抗原が消失しても肝硬変などからの発癌は完全には抑えられないことを認識する必要がある。HBs 抗原消失が得られやすい症例は Baseline の ALT 高値例であり、一方、HBe 抗原陽性例、HBV DNA 高値例、肝硬変例では HBs 抗原消失が達成されにくい<sup>12)</sup>。最近では血清 IP-10 値がエンテカビルによる HBs 抗原減衰量と関連していたとの報告がある<sup>13)</sup>。

## III. 核酸アナログと Peg-IFN の併用治療

核酸アナログ中止後の治療効果の持続や HBs 抗原陰性化を目指して、核酸アナログから IFN へ治療を切り替えてから核酸アナログ投与を終了するいわゆる Sequential 療法が試みられている。Ning らは、HBe 抗原陽性例に対してエンテカビルを 4 年間投与し、HBV DNA < 3.0 log copies/ml、HBe 抗原 < 100 PEIU/ml となった 102 例の非肝硬変症例に対して、Peg-IFN $\alpha$ -2a を 8 週間併用後、Peg-IFN 単独に切り替えて 40 週間投与を行う Sequential 療法群と、エンテカビル継続投与群との無作為化比較試験を行い、治療中の HBs 抗原陰性化が Sequential 療法群で高率 (27%, 4/15) であったと報告した。また HBe 抗原陰性例で核酸アナログ投与により HBV DNA が完全に抑制されている症例に対し Peg-IFN を最大 96 週間 Add-on したところ 10 例中 6 例で HBs 抗原の消失が認められ、核酸アナログの中

止が可能であったとの報告や<sup>14)</sup>、Genotype D以外のB型慢性肝炎においてエンテカビルからPeg-IFNへのSequential therapyを施行したところHBsのセロコンバージョンは20% (Peg-IFN単独では0%)であったとの報告もあり<sup>15)</sup>、とくにGenotype Aで成績が良かった。

#### IV. 抗ウイルス療法の治療効果予測とHBs抗原

##### 1. インターフェロン治療

近年可能となったHBs抗原量の高感度測定を用いることにより、治療中のHBs抗原の低下量や低下率が治療効果を予測するうえで有用であることが指摘されている。Peg-IFN $\alpha$ ±ラミブジンで52週間治療したHBe抗原陽性202例の欧州における検討では、HBe抗原の消失かつHBV DNA<10,000 copies/mlが達成された症例において、治療開始12週時点におけるHBs抗原量の低下が、治療終了から平均3年後のHBs抗原消失に有意に関連していた<sup>16)</sup>。他の報告でもPeg-IFN $\alpha$ 治療において治療開始12週時点でHBs抗原量が1,500 IU/ml未満に低下した症例ではHBe抗原の消失率が高く<sup>17),18)</sup>、その後のHBs抗原の消失が期待できる。また、Peg-IFN $\alpha$  ±ラミブジンで32~48週間治療した92例についての香港における検討でも、治療開始12週時点でのHBs抗原量が1,500 IU/ml未満、24週時点で300 IU/ml未満に低下した症例では治療後1年における著効率が高く、とくに24週時点でHBs抗原量が1 log IU/ml以上減少し300 IU/ml以下となった症例では著効率が高かった<sup>19)</sup>。

またHBe抗原陰性例でも、Peg-IFN $\alpha$  48週投与終了後24週におけるHBV DNA未検出を著効と定義した場合、著効例では治療終了時のHBs抗原量が $2.1 \pm 1.2$  log IU/mlと低下しており、治療12週および24週時点のHBs抗原減少量がそ

れぞれ0.5 log IU/ml, 1.0 log IU/ml以上であれば高率に著効が得られると報告されている<sup>20)</sup>。

さらにBrunettoらの検討では、治療中のHBs抗原の低下量が1.1 log IU/ml以上、かつ48週時点におけるHBs抗原が1.0 log IU/ml以下の症例では、治療終了後3年時点でのHBs抗原消失率が有意に高く<sup>21)</sup>、12週時点におけるHBs抗原の10%以上の減少が治療1年後の著効率や、5年後のHBs抗原消失に関連していたとの報告もある。

##### 2. 核酸アナログ

エンテカビル治療中にHBs抗原量が1 log IU/ml以上低下した症例では治療後1年後のHBe抗原消失率が有意に高く<sup>7)</sup>、最近の研究では治療開始後1年間におけるHBs抗原の低下率が1 log IU/ml以上の症例では3年以内のHBs抗原の消失が認められ、反対に1 log IU/ml未満の症例ではHBs抗原の消失例はなかったと報告されている。したがって、核酸アナログ治療においても、HBs抗原をモニターすることは最終治療効果を予測し治療計画を立案するうえで重要である。

#### おわりに

HBV増殖が比較的低レベルに抑制されていてもHBs抗原量が多い状態、すなわちcccDNAからの転写・翻訳活性が高い状態では発癌リスクが少なからずある。B型慢性肝炎の最終治療目標を達成するためには、HBs抗原の陰性化を指標とした治療が必要であるが、現在の治療法では未だ十分満足できるものではない。最近クロマチン修飾酵素に作用する薬剤によりcccDNAを標的としてHBVの複製・翻訳を阻害する新規治療法の開発も進んでおり<sup>22)</sup>、今後HBs抗原の消失、すなわちcccDNAの完全排除を目指した新規クラス治療法の開発が期待される。

#### 文 献

1) Tseng TC, Liu CJ, Yang HC, et al: High levels of hepatitis B surface antigen increase risk of hepato-

cellular carcinoma in patients with low HBV load. *Gastroenterology* 2012; 142: 1140-1149

- 2) Simonetti J, Bulkow L, McMahon BJ, et al : Clearance of hepatitis B surface antigen and risk of hepatocellular carcinoma in a cohort chronically infected with hepatitis B virus. *Hepatology* 2010 ; 51 : 1531-1537
- 3) Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, et al : Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005 ; 352 : 2682-2695
- 4) Buster EH, Flink HJ, Cakaloglu Y, et al : Sustained HBeAg and HBsAg loss after long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with peginterferon alpha-2b. *Gastroenterology* 2008 ; 135 : 459-467
- 5) Marcellin P, Bonino F, Lau GK, et al : Sustained response of hepatitis B e antigen-negative patients 3 years after treatment with peginterferon alpha-2a. *Gastroenterology* 2009 ; 136 : 2169-2179, e1-e4
- 6) Marcellin P, Lau GK, Bonino F, et al : Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 1206-1217
- 7) Lampertico P, Viganò M, Colombo M : Treatment of HBeAg-negative chronic hepatitis B with pegylated interferon. *Liver Int* 2011 ; 31(Suppl 1) : 90-94
- 8) Lai CL, Shouval D, Lok AS, et al : Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006 ; 354 : 1011-1020
- 9) Lampertico P, Viganò M, Di Costanzo GG, et al : Randomised study comparing 48 and 96 weeks peginterferon  $\alpha$ -2a therapy in genotype D HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Gut* 2013 ; 62 : 290-298
- 10) Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, et al : Clearance of hepatitis B surface antigen during long-term nucleot(s)ide analog treatment in chronic hepatitis B : results from a nine-year longitudinal study. *J Gastroenterol* 2013 ; 48 : 930-941
- 11) Marcellin P, Gane EJ, Tsai N, et al : Seven years of treatment with tenofovir DF for chronic hepatitis B virus infection is safe and well tolerated and associated with sustained virological, biochemical and serological responses with no detectable resistance. *Hepatology* 2013 ; 58 : A649
- 12) Kim GA, Lim YS, An J, et al : HBsAg seroclearance after nucleoside analogue therapy in patients with chronic hepatitis B : clinical outcomes and durability. *Gut* 2013 Oct 25. (Epub ahead of print)
- 13) Papatheodoridis G, Goulis J, Manolakopoulos S, et al : Changes of HBsAg and interferon-inducible protein 10 serum levels in naive HBeAg-negative chronic hepatitis B patients under 4-year entecavir therapy. *J Hepatol* 2014 ; 60 : 62-68
- 14) Ouzan D, Pénaranda G, Joly H, et al : Add-on peginterferon leads to loss of HBsAg in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis and HBV DNA fully suppressed by long-term nucleotide analogs. *J Clin Virol* 2013 ; 58 : 713-717
- 15) Boglione L, D'Avolio A, Cariti G, et al : Sequential therapy with entecavir and PEG-INF in patients affected by chronic hepatitis B and high levels of HBV-DNA with non-D genotypes. *J Viral Hepatol* 2013 ; 20(4) : e11-e19
- 16) Sonneveld MJ, Rijckborst V, Boucher CA, et al : Prediction of sustained response to peginterferon alfa-2b for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using on-treatment hepatitis B surface antigen decline. *Hepatology* 2010 ; 52 : 1251-1257
- 17) Ma H, Yang RF, Wei L : Quantitative serum HBsAg and HBeAg are strong predictors of sustained HBeAg seroconversion to pegylated interferon alfa-2b in HBeAg-positive patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2010 ; 25 : 1498-1506
- 18) Piratvisuth T, Lau G, Marcellin P, et al : On-treatment decline in serum HBsAg levels predicts sustained immune control and HBsAg clearance 6 month posttreatment in HBsAg-positive hepatitis B virus-infected patients treated with peginterferon alfa-2a [40kD] (PEGASYS). *Hepatol Int* 2010 ; 4 : 152
- 19) Chan HL, Wong VW, Chim AM, et al : Serum HBsAg quantification to predict response to peginterferon therapy of e antigen positive chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther* 2010 ; 32 : 1323-1331
- 20) Moucari R, Mackiewicz V, Lada O, et al : Early serum HBsAg drop : a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients. *Hepatology* 2009 ; 49 : 1151-1157
- 21) Brunetto MR, Moriconi F, Bonino F, et al : Hepatitis B virus surface antigen levels : a guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009 ; 49 : 1141-1150
- 22) Palumbo GA, Belloni L, Valente S, et al : Targeting the cccDNA by epigenetic drugs inhibitors HBV transcription and replication. *Hepatology* 2013 ; 58 : 650A

## 肝疾患 Review 2014-2015

---

2014年6月2日 第1版1刷発行

---

監修 小俣 政男  
編集 椎名秀一朗／坂本 直哉／丸澤 宏之  
発行者 増永 和也  
発行所 株式会社 日本メディカルセンター  
東京都千代田区神田神保町1-64(神保町協和ビル)  
〒101-0051 TEL 03 (3291) 3901 (代)  
印刷所 株式会社アイワード

---

ISBN978-4-88875-267-1

©2014 乱丁・落丁は、お取り替えいたします。

本書の複写にかかる複製、上映、譲渡、公衆送信（送信可能化を含む）の各権利は株式会社日本メディカルセンターが管理の委託を受けています。

 (財)出版者著作権管理機構 委託出版物)

本書の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつと事前に、(財)出版者著作権管理機構(電話 03-3513-6969, FAX03-3513-6979, e-mail: info@jcopy.or.jp)の許諾を得てください。

Impaired induction of *IL28B* and expression of *IFN $\lambda$ 4* associated with non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C

**Authors:** Miyako Murakawa\*<sup>1</sup>, Yasuhiro Asahina\*<sup>1,2</sup>, Mina Nakagawa<sup>1</sup>, Naoya Sakamoto<sup>3</sup>, Sayuri Nitta<sup>1</sup>, Akiko Kusano-Kitazume<sup>1</sup>, Takako Watanabe<sup>1</sup>, Fukiko Kawai-Kitahata<sup>1</sup>, Satoshi Otani<sup>1</sup>, Miki Taniguchi<sup>1</sup>, Fumio Goto<sup>1</sup>, Yuki Nishimura-Sakurai<sup>1</sup>, Yasuhiro Itsui<sup>1</sup>, Seishin Azuma<sup>1</sup>, Sei Kakinuma<sup>1,2</sup>, and Mamoru Watanabe<sup>1</sup>

\*MM and YA contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

<sup>2</sup>Department of Liver Disease Control, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

<sup>3</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan

**Correspondence:** Yasuhiro Asahina, M.D., Ph.D.

Professor, Department for Liver Disease Control

Department of Gastroenterology and Hepatology

Tokyo Medical and Dental University

1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

Tel: +81-3-5803-5877

---

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/jgh.12902

20141225

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Fax: +81-3-5803-0268

E-mail: asahina.gast@tmd.ac.jp

**Short title :** IFN  $\lambda$  expressions and treatment response

**Word count of the manuscript :** 2997 words.

## ABSTRACT

**Background:** Interferon (IFN)  $\lambda$  plays an important role in innate immunity to protect against hepatitis C viral (HCV) infection. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) near *IL28B* (*IFN $\lambda$ 3*) are strongly associated with treatment response to IFN $\alpha$  therapy in chronic hepatitis C (CHC) patients. Recently, IFN $\lambda$ 4 related to *IL28B*-unfavorable allele was discovered.

However, the impact of IFN $\lambda$ s on CHC is unknown. We aimed to investigate the mechanism underlying responsiveness to IFN-based therapy in CHC associated with SNPs near *IL28B*.

**Methods:** We evaluated the basal mRNA levels and ex-vivo induction of IFN $\lambda$  expression including *IFN $\lambda$ 4* in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 50 CHC patients treated with PEG-IFN $\alpha$ /RBV. Furthermore, we investigated the effect of *IFN $\lambda$ 4* on induction of *IL28B* in vitro.

**Results:** When PBMCs were stimulated with IFN $\alpha$  and poly(I:C), *IL28B* induction was significantly lower in patients with *IL28B*-unfavorable genotype (rs12979860 CT/TT) than those with *IL28B*-favorable genotype (rs12979860 CC;  $p = 0.049$ ). *IL28B* induction was lower in non-responders than in relapsers ( $p = 0.04$ ), and it was also lower in non-SVR patients for triple therapy including NS3 protease inhibitors. *IFN $\lambda$ 4* mRNA was detected in 12 of 26 patients with *IL28B*-unfavorable SNP and *IFN $\lambda$ 4* expression was associated with lower *IL28B* induction in patients with *IL28B*-unfavorable genotype ( $p = 0.04$ ) and non-response to

20141225

This article is protected by copyright. All rights reserved.

IFN $\alpha$  therapy (p = 0.003). Overexpression of *IFN $\lambda$ 4* suppressed *IL28B* induction and promoter activation.

**Conclusions:** Impaired induction of *IL28B*, related to *IFN $\lambda$ 4* expression in PBMCs of *IL28B*-unfavorable patients, is associated with non-response to IFN $\alpha$ -based therapy for HCV infection.

**Keywords:** hepatitis C virus, peripheral blood mononuclear cells, pegylated interferon, NS3 protease inhibitor, type III interferon

**Abbreviations:** HCV, Hepatitis C virus; IFN, interferon; CHC, chronic hepatitis C; PEG-, pegylated; RBV, ribavirin; DAA, direct-acting antiviral agents; SNP, single nucleotide polymorphism; IL, interleukin; TLR, Toll like receptor; RLR, RIG-I like receptor; ISG, IFN-stimulated gene; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; SVR, sustained virological responder; VR, virological responder; NR, non-responder; poly (I:C), polyinosinic-polycytidylic acid; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; BLC, immortalized B lymphocytes; IRF7, interferon regulatory transcription factor 7; ISRE, IFN-stimulated response element; STAT, signal transducers and activator of transcription; BDCA3, blood dendritic cell antigen 3; DC, dendric cell; ALT, alanine aminotransferase;  $\gamma$ -GTP,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; ISDR, IFN sensitivity determining region.

## Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is a common cause of chronic hepatitis, which progresses to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. Interferon (IFN)-based therapy has been used to treat chronic hepatitis C (CHC) over the last two decades and the combination therapy with direct-acting antiviral agents (DAAs) improved the treating effect. However, non-responders [2] to previous pegylated interferon  $\alpha$  (PEG-IFN $\alpha$ ) plus ribavirin (RBV) therapy respond poorly to the triple therapy containing HCV NS3/4A serine protease inhibitors [3, 4]. Moreover, although IFN-free regimen using NS5A inhibitors or NS5B polymerase inhibitors is developed, triple or quadruple therapy including PEG-IFN may still be required to suppress DAA-resistant viruses or difficult-to-treat genotype. Therefore, IFN $\alpha$  responsiveness of host innate immunity remains essential for achieving a good prognosis, and determining the mechanisms responsible for non-response to IFN $\alpha$  is crucial.

In a recent genome-wide association study, single nucleotide polymorphisms (SNPs) located near *interleukin 28B* (*IL28B*) encoding type III IFN (IFN $\lambda$ 3) were found to be strongly associated with the virological response to PEG-IFN $\alpha$ /RBV therapy in CHC patients [5-8]. IFN $\lambda$ 3 is induced by viral infection through stimulation of Toll-like receptors (TLR) and RIG-I like receptors (RLR) [9-12], and it is also induced by type-I IFN signaling [13]. This interferon stimulates the expression of IFN-stimulated genes (ISGs), including numerous antiviral [13, 14] and immunoregulatory genes [15, 16]. Therefore, IFN $\lambda$ 3 induction may play essential roles in the innate antiviral response [17].

Recently, it was reported that high baseline expression levels of intrahepatic RLR, and lower responsiveness of ISGs to exogenous IFN, were significantly associated with unfavorable *IL28B* SNP and poor treatment outcome in CHC patients [18, 19, 20].

Furthermore, RNA sequencing using primary human hepatocytes revealed that unfavorable allele of dinucleotide polymorphisms near *IL28B* generate *IFN $\lambda$ 4* [21]. The ability of IFN $\lambda$ 4 to

20141225

This article is protected by copyright. All rights reserved.

induce ISGs was reported in human liver tissue samples [22]. Based on these findings, we hypothesized that preactivation of IFN signaling by *IFNλ4* prevents further induction of antiviral genes by exogenous type I IFN, particularly the type I IFN-mediated induction of *IFNλs*. However, the expression of *IFNλ4* has never been documented in clinical blood samples from CHC patients.

The study aimed to determine the contribution of *IFNλ* family (IL29 [*IFNλ1*], IL28A [*IFNλ2*], IL28B [*IFNλ3*] and *IFNλ4*) to the poor response of CHC patients to anti-HCV therapy, and to clarify the mechanisms associated with SNPs near *IL28B*. Since peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are major sources of *IFNλ* [9, 10], we measured the expression level and investigated the ex vivo induction of *IFNλs* in PBMCs derived from CHC patients receiving PEG-IFN $\alpha$ /RBV therapy. Furthermore, we studied the impact of *IFNλ4* on *IL28B* expression in vitro.

## Methods

**Patients and Clinical samples.** This study included 50 CHC patients with genotype 1b HCV treated with PEG-IFN $\alpha$ -2b/RBV at the Tokyo Medical and Dental University Hospital. Eleven of these patients were re-treated with telaprevir (TVR) or simeprevir (SMV). Exclusion parameters were alcoholic liver injury, autoimmune hepatitis, and decompensated liver cirrhosis. No patient tested positive for hepatitis B surface antigen or anti-human immunodeficiency virus antibody, or had received immunomodulatory therapy before enrollment. The clinical characteristics of the patients immediately before blood collection are shown in Table 1. Written informed consent was obtained from all patients, and this study was approved by the ethical committee of Tokyo Medical and Dental University in accordance with the Declaration of Helsinki.

20141225

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Blood samples were collected from each patient during off-therapy periods for gene expression analysis. Human genomic DNA was extracted from whole blood, and SNPs located near the *IL28B* gene (rs8099917, rs12979860, and ss469415590) were analyzed using the TaqMan SNP genotyping assay (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) [21, 23]. HCV core mutations and IFN-stimulated response element (ISDR) substitutions were determined before the therapy.

**Definitions of responsiveness to therapy.** The present study used the definition of response to therapy outlined by the AASLD Practice Guideline for Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C [2, 3].

**Generation of *IL28B* mRNA-specific RT-qPCR systems.** For the quantification of *IL28B* mRNA expression, we developed an original real-time quantitative PCR assay that distinguishes *IL28B* from *IL28A*. Gene-specific PCR primers were designed to anneal directly to the cDNA sequences of each gene (Supplementary Table 1).

**Real-time detection RT-PCR analysis for *IL28A*, *IL28B*, and *IL29*.** Immediately after blood collection, PBMCs were separated by gradient centrifugation with Ficoll-Conray, and incubated in the RPMI 1640 medium (Sigma, St. Louis, MO) with 10% fetal calf serum at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. The cells were treated with recombinant IFN $\alpha$ -2b (100 IU/ml) (Schering-Plough, Kenilworth, NJ) for 12 h prior to polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) (Sigma) treatment (10  $\mu$ g/ml) for 8 h. PBMC RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA). Total cell RNA (200 ng) was used to generate 10  $\mu$ l of cDNA from each sample using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The mRNA expression levels were measured using a ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems), and a QuantiTect SYBR Green PCR kit (Quiagen) or TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Expression levels were normalized to the

expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or  $\beta$ -actin. The sequences of the primer sets are provided in Supplementary Table 1.

**Analysis of *IFN $\lambda$ 4* mRNA expression.** Total cell RNA was pre-treated with DNase-I (Nippon Gene, Tokyo, Japan), followed by RT with SuperScript II, and PCR analysis was performed for 45 cycles using 4 sets of primers (Supplementary Table 1). Primer set #1 could detect 1 copy of *IFN $\lambda$ 4* per assay, whereas primer sets #2, 3, and 4 could detect 10 copies of *IFN $\lambda$ 4* per assay (Supplementary Fig. 1). The PCR products corresponding to the size of spliced *IFN $\lambda$ 4* mRNA were extracted and the sequences were confirmed. Only the amplicon with ss469415590- $\Delta$ G (\*) is defined as *IFN $\lambda$ 4* (Supplementary Figs. 1, 2).

**Generation of the *IL28B* promoter-reporter and stably expressing cell lines.** The promoter sequences of human *IL28B* (-1129/+111) were subcloned and the DNA fragment was inserted into the pGL3-basic vector (Invitrogen). The reporter plasmid was transfected into HEK293 cells with pcDNA3.1 (Invitrogen). After cell culture in the presence of the selective antibiotic G418 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), transfected colonies were isolated to establish a cell line stably expressing the *IL28B*-Fluc-reporter (HEK293/*IL28B*-luc).

**Cell culture.** HEK293T, Huh7, HepG2, and HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's Medium (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (37°C; 5% CO<sub>2</sub>). The maintenance medium for the *IL28B*-promoter-reporter-harboring cell line (HEK293/*IL28B*-luc) was supplemented with 500  $\mu$ g/ml of G418 (Nacalai Tesque).

Immortalized B lymphocytes (BLC) were generated in-house from human PBMCs by EBV transformation, and maintained in RPMI1640 medium (Sigma) with 10% fetal calf serum and 200 ng/ml Cyclosporin-A (Sigma). The HuS/E-2 cells were kindly provided by Dr. Hijikata (Kyoto University, Kyoto, Japan) and cultured as previously described [24].

**Expression plasmids and transfections.** The expression construct for *IFN $\lambda$ 4* (p179) was kindly provided by Dr. Prokunina-Olsson (National Cancer Institute, Bethesda, MD). The