

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590764

研究課題名（和文）難治性C型肝炎に対する細胞免疫制御に基づく個別化治療の開発

研究課題名（英文）Developmental research of tailored immune-modulation therapy against refractory chronic hepatitis C.

研究代表者 笠原 彰紀（KASAHARA AKINORI）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70214286

研究成果の概要（和文）：C型慢性肝炎患者に対するPEG-IFN α /リバビリン併用療法において、樹状細胞（DC）などの免疫細胞頻度・機能と治療効果との関連を検討した。単変量解析ではミエロイドDC頻度、終了時DC機能が、多変量解析では血小板数とプラスマサイトイドDC頻度が、独立したSVR規定因子として抽出された。PEG-IFN α /リバビリン併用療法において、免疫細胞マーカーに基づく個別化治療が可能になる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：It is reported that approximately 50% of chronic hepatitis C patients with HCV genotype 1 and high titer are successfully treated with 48-week peg-IFN- α and ribavirin therapy. In this research project, we aimed to clarify how immune responses are involved in HCV eradication, and elucidate if dynamics of immune cells could serve as predictor of therapeutic response in the treatment. In univariate analyses, pretreatment MDC frequency and DC function at the end of treatment were significantly higher in the SVR group than those in the non-SVR one. Multivariate analyses based on viral and host factors and drug adherence revealed that platelet counts and PDC frequency were independently contributed to the SVR. Therefore, “immune response-guided therapy” is rational in the establishment of a tailored treatment for chronic hepatitis C patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：C型肝炎、ペグインターフェロン α 、リバビリン、樹状細胞、制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

原発性肝癌の約8割はC型肝炎を基礎に発症する。肝癌の一次予防のためには慢性肝炎から肝硬変への進展を抑制することが重要であり、そのためにはC型肝炎ウイルス(HCV)の排除が望まれる。現在C型肝炎に対する強力な抗ウイルス療法として、ペグインターフェロン α (Peg-IFN α)とリバビリン(Rib)の併用療法が可能となりHCV排除率は改善した。しかしHCV genotype 1型、高ウイルス量の難治例に対しては、HCV排除率は約50%にとどまっており、依然として約半数以上の患者は肝硬変・肝癌の高リスク群として残されている。これらの患者に対しては、1) 抗ウイルス療法抵抗性の機序の解明とその解除方法の開発、2) 現行のPeg-IFN α /Rib治療の改良によるHCV排除率の向上、3) 新たな治療方法の開発を目標とする必要がある。

C型肝炎患者において、Peg-IFN α /Rib療法によってHCVが排除された症例では、HCV特異的なTh1反応が活性化されている。Th1反応誘導にはDCが重要であり、HCV排除に患者のDC機能の活性化が関与していると考えられる。我々の検討により、実際にIFN α /Rib治療によりHCVが排除された症例では、治療前のDCのIFN α /RibによるTh1誘導能はHCV非排除例よりも有意に高いことが示されている。したがってPeg-IFN α /Rib治療の抵抗性や治療効果に、DCなどの患者個々の免疫応答の差異が関与している可能性が高い。

C型肝炎に対するPeg-IFN α /Rib療法において、治療開始早期のHCV量の減少効果とHCV排除や治療後の再燃との関連性が明らかになっている。しかしEVRのみで治療効果を予測することは困難である。したがってPeg-IFN α /Rib療法において、ウイルス学的治療反応性以外にも、患者個々の免疫学的治療反応性に関連する指標の同定が必要である。HCV陰性化時期に加えて、免疫学的反応性を評価することで、より正確な治療効果予測と、それに基づく治療計画が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

C型肝炎難治例の完治を目指して、患者個々の治療反応性に応じた個別化治療を確立するために、治療効果に関連する免疫学的指標を明らかにすること、治療抵抗性や治療効果発現における免疫応答の分子機序を

解明し、その制御方法の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

Peg-IFN α /Rib治療における治療効果予測のための免疫細胞マーカーの探索

C型肝炎におけるPeg-IFN α /Rib療法の治療効果、抵抗性に、患者個々の免疫系の反応性の差異が関与すると考えられる。Peg-IFN α /Rib療法前後と治療経過中に、ミエロイドDC (MDC)、プラスマサイトイドDC (PDC)、Th1、Th2、NK細胞、NKT細胞、制御性T細胞 (Treg)、HCV特異的CTLの頻度と表現型を経時的に解析することで、HCV排除効果や治療抵抗性と関連する免疫細胞マーカーを同定する。

C型肝炎に対するPeg-IFN α /Rib治療におけるInnate immunityの意義の解明

ウイルス感染のSensorとして働くToll様受容体(TLR)、RIG-IはDCにも発現しており、HCV感染においてもIFN誘導系や獲得免疫系の活性化に関与すると考えられる。C型肝炎患者DCにおけるTLR、RIG-Iの発現と機能、Peg-IFN α /Rib治療経過に伴う発現動態と機能変化を解析し治療効果との関連を明らかにする。またTLRシグナル関連分子群の遺伝子発現を網羅的に非感染者と比較し、HCVによるシグナル阻害の標的分子を同定する。

4. 研究成果

C型肝炎患者の樹状細胞(DC)では、IFN α によって誘導される成熟化やTh1誘導能の亢進が非感染者のDCに比べ低下しており、DCのIFN α 反応性が低下していた。しかしRibによってDCのTh1誘導能が回復する症例では、IFN α /Rib併用療法によって高率にHCVが排除された。

難治性C型肝炎患者に対するPEG-IFN α /Rib併用療法において、ウイルス反応性、薬剤投与量(Adherence)、免疫学的反応性と治療効果との関連を検討した。PEG-IFN α /Rib併用48週投与において、4週から12週までに陰性化した症例(EVR)の約30%、12週から24週までに陰性化した症例(LVR)では約70%が再燃した。LVR例に対しては、治療期間を72週へ延長することで再燃率が低下し著効率が向上した。薬剤Adherenceに関しては、PEG-IFN α が投与開始量の80%以上の症

例では EVR は有意に高かった。一方、EVR 例においては、Rib 投与量の減少に伴って再燃率が有意に上昇した。従って、EVR を得るためには PEG-IFN α を開始量の 80% 以上に維持すること、また再燃を抑えるためには Rib を可能な限り開始量に維持することが肝要である。

ウイルス反応性のみでは、EVR 例の中での再燃例や、生化学的著効 (BR) が得られ肝発癌抑制効果が期待できる症例を判別することは困難である。免疫反応性の評価が、これらの予測に有用か否かを明らかにするために、樹状細胞 (DC) や制御性 T 細胞 (Treg) の頻度と DC 機能を解析した。治療中の DC の頻度が高く、終了時に DC の T 細胞刺激能が回復している症例では終了後の再燃率が低かった。一方、仮に EVR が得られても、終了時の DC 機能が回復していない群では再燃率が高かった。Treg 頻度が治療中に増加する症例では、HCV 排除の有無に関らず終了後に ALT が正常化した。以上の結果より、免疫細胞の解析をウイルス反応性や薬剤 Adherence に加味することで、個々の治療反応性に応じた抗ウイルス治療を提供することが可能となることが明らかになった。

更に、樹状細胞 (DC) や制御性 T 細胞 (Treg) の頻度と DC 機能などを、ウイルス因子、宿主因子、薬剤投与量などに加えて多変量解析を行った。その結果、血小板数と PDC 頻度が、48 週投与での独立した SVR 規定因子として抽出された。以上の結果は、HCV 陰性化時期のみならず、免疫細胞マーカーの反応性を指標にすることで、治療効果の予測が可能になることを示している。

C 型慢性肝炎患者の MDC では、各 TLR や RIG-I に対するアゴニスト刺激による IFN- β 、TNF- α 、IL-12 などの産生は非感染者に比べ低下していた。TLR/RIG-I 下流シグナルやアダプター分子の遺伝子発現を網羅的に解析すると、C 型慢性肝炎患者 MDC では TRIF、TRAF6 の発現が低下していた。C 型慢性肝炎患者 MDC は HCV NS3/4A プロテアーゼ阻害剤の処理によって、TLR3 刺激後の TRIF、TRAF6 の発現が部分的に回復し、IFN- β 、TNF- α 産生能が亢進し、CD4+T 細胞増殖刺激能が回復した。以上の結果より、HCV NS3/4A プロテアーゼ阻害剤は、その HCV 複製抑制作用のみならず、MDC における TLR/RIG-I 系の機能回復による免疫賦活作用も期待できることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

① Ito, I., Kanto, T. Kakita, N., Takebe,

S., Inoue, M., Higashitani, K., Miyazaki, M., Miyatake, H., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N. Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis. *Journal of Viral Hepatitis* 16: 846–852, 2009 査読有

② Hiramatsu, N., Oze, T. Yakushijin, T., Inoue, Y., Igura, T., Mochizuki, K., Imanaka, K., Kaneko, A., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Nagase, T., Ito, T., Inui, Y., Hijioka, T., Katayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H., Imai, Y., Kato, M., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N. Ribavirin dose reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with hepatitis C responding to pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin. *Journal of Viral Hepatitis* 16: 586–594, 2009 査読有

③ Kurashige N., Ohkawa, K. Hiramatsu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Hosui, A., Miyagi, T., Ishida, H., Tatsumi, T., Kanto, T., Takehara, T. and Hayashi, N., Two types of drug-resistant hepatitis B viral strains emerging alternately and their susceptibility to combination therapy with entecavir and adefovir *Antiviral Therapy* 14: 873–877, 2009 査読有

④ Imai, Y., Tamura, S., Tanaka, H., Hiramatsu, N., Kiso, Y., Doi, Y., Inada, M., Nagase, T., Kitada, T., Imanaka, K., Fukuda, K., Takehara, T., Kasahara, A., and Hayashi, N. Reduced risk of hepatocellular carcinoma after interferon therapy in aged patients with chronic hepatitis C is limited to sustained virological responders. *Journal of Viral Hepatitis* 2009(in press) 査読有

⑤ Kitazume, S., Oka, R. Ogawa, K., Futakawa, S., Hagiwara, Y., Takigawa, H., Kato, M., Kasahara, A., Miyoshi, E., Taniguchi, N., and Hashimoto, Y. Molecular insights into (beta)-galactoside (alpha)2,6-sialyltransferase secretion in vivo. *Glycobiology* 19: 479–487, 2009 査読有

⑥ Inoue, Y., Hiramatsu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Hagiwara,

H., Oshita, M., Mita, E., Fukui, H., Inada, M., Tamura, S., Yoshihara, H., Hyashi, E., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Miyagi, T., Hoshui, A., Ishida, M., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takeghara, T., and Hayashi, N. Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses. *Journal of Viral Hepatitis* 2009 (in press) 査読有

⑦ Kurokawa, M., Hiramatsu, M Oze, T., Mochizuki, K., Yakushijin, T., Kurashige, N., Inoue, Y., Igura, T., Imanaka, K., Yamada, A., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Ito, T., Inui, Y., Hijioka, T., Yoshihara, H., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Kiso, S., Kanto, T., Takehara, T., Kasahara, A., and Hayashi, N. Effect of interferon alpha-2b plus ribavirin therapy on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis. *Hepatology Research* 39: 432–438, 2009 査読有

⑧ Kurashige, N., Ohkawa K. Hiramatsu, N., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Oze, T., Kiso, S., Kanto, T., Takehara, T., Kasahara, A., Doi, Y., Yamada, A., Fukuda, K., Oshita, M., Mita, E., Fukui, H., Nagase, T., Yoshihara, H., Imai, Y., Kato, M., Kashiwara, T., and Hayashi N. Lamivudine-to-entecavir switching treatment in type B chronic hepatitis patients without evidence of lamivudine resistance. *Journal of Gastroenterology* 44: 864–870, 2009 査読有

⑨ Kasahara A, Kita K., Tomita E, Toyota J, Imai Y, Kumada H. Repeated administration of recombinant human serum albumin caused no serious allergic reactions in patients with liver cirrhosis - a multicenter clinical study *Journal of Gastroenterology* 43:464–472, 2008 査読有

⑩ Tanaka H., Imai Y. Hiramatsu N, Ito Y, Imanaka K, Oshita M, Hijioka T, Katayama K, Yabuuchi I, Yoshihara H, Inoue A, Kato M, Takehara T, Tamura S, Kasahara A, Hayashi N, Tsukuma H. Declining incidence of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan, from 1990–2003. *Annals of Internal Medicine* 148: 820–826, 2008 査読有

⑪ Nakano M., Nakagawa T. Ito T, Kitada T, Hijioka T, Kasahara A, Tajiri M, Wada Y, Taniguchi N, Miyoshi E. Site-specific analysis of N-glycans on haptoglobin in

sera of patients with pancreatic cancer: A novel approach for the development of tumor markers. *International Journal of Cancer* 122: 2301–2309, 2008 査読有

⑫ Hiramatsu N, Kurashige N, Oze T, Takehara T, Tamura S, Kasahara A, Oshita M, Katayama K, Yoshihara H, Imai Y, Kato M, Kawata S, Tsubouchi H, Kumada H, Okanoue T, Kakumu S, Hayashi N. Early decline of hemoglobin can predict progression of hemolytic anemia during pegylated interferon and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology Research* 38: 52–59, 2008 査読有

⑬ Miyazaki M., Kanto T., Inoue, M., Itose, I., Miyatake, H., Sakakibara, M., Yakushijin, T., Kakita, N., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N. Impaired cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-I *Journal of Medical Virology* 80: 980–988, 2008 査読有

⑭ Toyama T., Hiramatsu N, Yakushijin, T., Oze, T., Nakanishi, F., Yasumaru, M., Mochizuki, K., Kanto, T., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma including recurrent cases: a study of 861 patients in a single institution. *Journal of Clinical Gastroenterology* 42: 317–322, 2008 査読有

⑮ Kurashige N., Hiramatsu N, Ohkawa, K., Oze, T., Inoue, Y., Kurokawa, M., Yakushijin, T., Igura, T., Kiso, S., Kanto, T., Takehara, T., Tamura, S., Kasahara, A., Oshita, M., Hijioka, T., Katayama, K., Yoshihara, H., Hayashi, E., Imai, Y., Kato, M. and Hayashi, N. Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine. *Hepatology Research* 38: 450–456, 2008 査読有

⑯ Miyatake H., Kanto T., Inoue, M., Sakakibara, M., Kaimori, A., Yakushijin, T., Itose, I., Miyazaki, M., Kuzushita, N., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N. Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T cell response in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* 14: 404–412,

2007 査読有

⑰Itose I., Kanto T., Inoue, M., Miyazaki, M., Miyatake, H., Sakakibara, M., Yakushijin, T., Oze, T., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N. Involvement of dendritic cell frequency and function in virological relapse in pegylated interferon- α 2b and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. **Journal of Medical Virology** 79: 511–521, 2007 査読有

⑱Kanto, T. and Hayashi, N. Innate immunity in hepatitis C virus infection: Interplay among dendritic cells, natural killer cells and natural killer T cells. **Hepatology Research** 37 Suppl: 3S319–326, 2007 査読有

⑲Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Yamaguchi, S., Sakamori, R., Hiramatsu, N., Kanto, T., Ohkawa, K. and Hayashi, N. Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4 CD25 T cells with PD-1-dependent regulatory activities **Immunology** 120: 73–82, 2007 査読有

[学会発表] (計14件)

①Kanto T., et al. Dynamics of plasmacytoid dendritic cells as a predictor of relapse regardless of virological response in pegylated interferon- α and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. **The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course** 10.30–11.3, 2009, Boston, MA, USA

②Kakita N, Kanto T., et al. Feasibility of IL-10-producing regulatory Type 1 cells for the monitoring of viable hepatocellular carcinoma through local ablation therapy. **The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course** 10.30–11.3, 2009, Boston, MA, USA

③Miyazaki M, Kanto T., et al. Myeloid dendritic cells as a therapeutic target for immune restoration by HCV NS3 protease inhibitor in chronic hepatitis C patients **The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course** 10.30–11.3, 2009, Boston, MA, USA

④Son C, Hiramatsu N., et al. Reduced drug doses in genotype 1 patients with chronic hepatitis C during treatment with pegylated interferon α -2B plus ribavirin delays the timing of HCV RNA negativity or prevents its attainment; A propensity score-matched study. **The Liver**

Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course 10.30–11.3, 2009, Boston, MA, USA

⑤Inoue Y, Hiramatsu N., et al. Prediction of early response to pegylated interferon and ribavirin in chronic hepatitis C based on amino acid substitutions in the viral core region. **The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course** 10.30–11.3, 2009, Boston, MA, USA

⑥Inoue Y, Hiramatsu N., et al. Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon α -2B and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses. **The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course** 10.30–11.3, 2009, Boston, MA, USA

⑦Itose I., Kanto T., et al. Dynamic changes of regulatory T cell subsets in patients with chronic HCV infection in relation to the degree of liver inflammation **The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)** Nov 2, 2008, San Francisco, CA, USA

⑧Takebe S., Kanto T., et al. IL-7 as a booster of Th2-differentiation by modulating myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection **The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)** Nov 2, 2008, San Francisco, CA, USA

⑨Kakita N., Kanto T., et al. Natural regulatory T cells as biomarker for the assessment of hepatocellular carcinoma in local ablation therapy **The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)** Nov 2, 2008, San Francisco, CA, USA

⑩Kurokawa M., Hiramatsu N., et al. Effect of interferon α -2b plus ribavirin therapy on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis **The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)** Nov 2, 2008, San Francisco, CA, USA

⑪Oze T., Hiramatsu N., et al. Extended treatment with peginterferon α -2b and ribavirin combination therapy can suppress the relapse rate after treatment of chronic hepatitis C genotype 1 patients with late viral relapse **The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)** Nov

2, 2008, San Francisco, CA. USA

⑫ **Oze T., Hiramatsu N, et al** Ribavirin dosage reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with chronic hepatitis C responding to pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin **The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)** Nov 2, 2008, San Francisco, CA. USA

⑬ **Kanto T.** Dendritic cell as a versatile controller of innate and adaptive immune response against hepatitis C virus **The 10th International Symposium on Dendritic Cells** Oct 1-5, 2008 Kobe, Japan

⑭ **Miyazaki M. Kanto T et al.** Impaired TLR/RIG-I-mediated innate immunity in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C patients **The 10th International Symposium on Dendritic Cells** Oct 1-5, 2008, Kobe, Japan

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院医学系研究科

消化器内科学ホームページ:

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 彰紀 (KASAHARA AKINORI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 70214286

(2) 研究分担者

考藤 達哉 (KANTO TATSUYA)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号: 80372613

平松 直樹 (HIRAMATSU NAOKI)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号: 30362700

(3) 連携研究者

なし