

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：72696

研究種目：基礎研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590866

研究課題名（和文）HCV CORE アミノ酸置換の抗ウイルス療法・肝病態における臨床的意義

研究課題名（英文）Clinical significance of HCV core region, to antiviral therapy and clinicopatological features.

研究代表者

芥田 憲夫（AKUTA NORIO）

財団法人 冲中記念成人病研究所・研究員

研究者番号：20469638

研究成果の概要（和文）：HCV genotype 1b における Peginterferon/Ribavirin 併用療法難治要因の Core アミノ酸置換が治療・病態に及ぼす影響を検討した。Core aa70・aa91 置換は Peginterferon/Ribavirin や新規治療の Telaprevir 併用療法の治療効果予測因子として有用であった。更に、IFN 関連療法施行例や自然経過例からの肝発癌や、糖代謝・脂質代謝の肝病態にも影響することが確認された。

研究成果の概要（英文）：Clinical significance of HCV core region, to antiviral therapy and clinicopatological features, was investigated. Substitutions of amino acid 70 and 91 of HCV genotype 1b could predict the response to peginterferon/ribavirin combination therapy and new therapy with Telaprevir. Furthermore, those also affected clinical outcome, including hepatocarcinogenesis, glucose metabolism, and lipid metabolism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

当院では 2002 年から肝細胞の脂肪化の程度が C 型慢性肝炎に対する Interferon (IFN) 単独療法における治療抵抗性に関与していることを報告してきた (Akuta N, et al. J Hepatol 2002;37:831-836)。一方で肝細胞の脂肪化には HCV core region が関与しており (Moriya K, et al. J Gen Virol 1997;78:1527-1531)、ノックアウトマウスを用いた実験では HCV core region は肝細胞脂

肪化のみならず肝発癌にも関与することが示されている (Moriya K, et al. Nature Medicine 1998;4:1065-1067)。そこで我々は少数例の HCV genotype 1b (HCV-1b)・高ウイルス量 (100 KIU/ml 以上) の難治例を用いて肝細胞脂肪化の程度に影響する特徴的な Core アミノ酸置換を指摘出来るか当初は検討していたが、残念ながら脂肪化の程度に影響する特徴的なアミノ酸置換を指摘するまでには至らなかった。但し、Core アミノ酸配列を

Peginterferon (PEG-IFN)/Ribavirin (RBV) 併用療法の治療成績から見てみると治療中に HCV RNA が陰性化しない治療抵抗例 (Non-virological responder [NVR]) では Core region の 70・91 番目のアミノ酸 (Core aa70・aa91) が特徴的な置換を有している可能性が示唆された。特に aa70 は arginine (Wild) から glutamine (Mutant) もしくは histidine (Mutant) に置換され、aa91 は leucine (Wild) から methionine (Mutant) に置換される傾向があることが確認された。よってこの仮説を証明するために当院で PEG-IFN/RBV 併用療法 48 週間を施行した HCV-1b・高ウイルス量の C 型慢性肝炎初回治療例を対象として Core region と治療成績との関係を見てみると Core aa70・aa91 の置換が NVR に寄与する独立要因であることが証明された (Akuta N, et al. Intervirology 2005;48:372-380)。更に、治療終了後 24 週時点で HCV RNA 陰性の状態 (sustained virological response [SVR]) においても、Core aa70・aa91 の置換は SVR に寄与する独立要因であることが証明された (Akuta N, et al. J Hepatol 2007;46:403-410)。また、我々は PEG-IFN/RBV 併用療法における難治要因である Core aa70・aa91 の置換が肝発癌に及ぼす影響についても検討した。IFN 単独療法導入後長期観察された症例で肝発癌に寄与する要因を検討した結果、Core aa70・aa91 の置換は肝発癌に寄与する独立要因であることが確認された (Akuta N, et al. Hepatology 2007;46:1357-1364)。更に、肝発癌の指標である AFP 値との関連を見ると、Core aa70 の置換が有る症例では AFP 値が高いことが確認された (Akuta N, et al. J Med Virol 2008;80:1354-1362)。以上の様な経緯で Core aa70・aa91 は PEG-IFN/RBV 併用療法の治療効果予測因子であると同時に、肝発癌を含む肝病態進行に寄与する独立要因であることが確認された。

2. 研究の目的

HCV core aa70・aa91 置換の抗ウイルス療法・肝病態における臨床的意義を検討した。具体的には、PEG-IFN/RBV 併用療法や新規の抗 HCV 療法である PEG-IFN/RBV/Telaprevir (TVR) 併用療法の治療前効果予測因子をウイルス・宿主・治療要因の多方面から多変量解析で検討し、治療前ウイルス要因とウイルス動態を組み合わせて治療効果予測を行った。更に Core aa70・aa91 置換の肝発癌・糖代謝 (インスリン抵抗性 (IR)) ・脂質代謝を含む肝病態への影響を検討した。

3. 研究の方法

本研究は既に採取された被験者採血検体 (血清) を用いて検討を行うものであり、被験者

の SNP など DNA/ゲノム情報に関連する測定は一切実施しない。Core aa70・aa91 置換と NS5A-ISDR 変異数に関しては HCV-1b の患者血清を用いて HCV RNA 抽出、RT 反応で cDNA 作成、nested PCR 法で DNA 増幅、Dye terminator 法で塩基配列・アミノ酸配列を決定する。

(1) ①: 治療前のウイルス・宿主・治療要因から PEG-IFN/RBV 併用療法と PEG-IFN/RBV/TVR 併用療法の治療効果予測因子を検討した。2001 年から PEG-IFN α 2b/RBV 併用 48 週間投与の予定で治療を開始した HCV-1b の 490 例と、2008 年から PEG-IFN α 2b/RBV/TVR 併用 12~24 週間投与の予定で治療を開始した HCV-1b の 80 例の中で SVR 判定が可能な症例を対象とした。ウイルス要因としては Core aa70・aa91 置換、ISDR 変異数、HCV RNA 量。宿主要因としては性別、年齢、輸血歴、肝疾患家族歴、Body mass index、肝線維化進行度、肝細胞脂肪化の程度、AST、ALT、アルブミン、 γ GTP、ICG R15、AFP、白血球数、ヘモグロビン、血小板数、宿主要因の中でも特に脂質代謝要因として総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪、IR・糖代謝要因として空腹時血糖、空腹時インスリン、HOMA-IR、鉄代謝その他要因として血清鉄、血清フェリチン、尿酸。治療要因としては体重あたりの PEG-IFN 投与量、RBV 投与量、前治療反応性。以上の治療前要因を用いて治療効果判定に寄与する独立要因を多変量解析で検討した。

②: 治療前ウイルス要因である Core aa70・aa91 置換や ISDR 変異数と、PVR (prompt virological response ; 48 時間経過時点の 1 log drop) を含む治療開始後早期のウイルス動態を組み合わせることによって何処まで早期に PEG-IFN/RBV 併用非治療症例の予測が可能であるかを検討した。2001 年から PEG-IFN α 2b/RBV 併用 48 週間投与の予定で治療を開始した HCV-1b 症例の中で SVR 判定が可能な 118 例を対象とした。

(2) ①: Core アミノ酸置換の糖代謝・脂質代謝への影響を検討した。HCV-1b の慢性肝炎 (肝硬変・糖尿病の症例は除外) 130 例を対象に IR の指標である HOMA-IR 上昇に寄与する要因を多変量解析で検討した。HOMA-IR の ≥ 2.5 を IR、特に ≥ 3.5 を高度 IR と定義した。また、HCV-1b で Core アミノ酸置換を評価された 1987 年以降の 2,220 例から Core aa70 置換と関連する代謝・宿主要因を検討した。脂質要因からは肝細胞脂肪化、中性脂肪、LDL コレステロールと Core aa70 置換との関係、糖代謝要因からは空腹時血糖、HOMA-IR と Core aa70 置換との関係について多変量解析で検討した。更に、PEG-IFN/RBV/TVR 併用療法において Core アミノ酸置換が脂質要因に及ぼす影響を検討した。

② : Core aa70・aa91 置換の肝発癌への影響を検討した。IFN 未治療例に関しては、1987 年以降に自然経過観察された HCV-1b の 166 例を対象として肝発癌に寄与する要因を多変量解析で検討した。IFN 治療例に関しては、1999 年以降に 24~48 週間の十分量の RBV 併用療法で non-SVR であった HCV-1b の 352 例と、1987 年以降に IFN 関連療法を導入され SVR に至った HCV-1b の 664 例を対象として肝発癌に寄与する要因を多変量解析で検討した。また、2005 年以降に IFN α 単独療法自己注射を導入された症例を対象として PEG-IFN/RBV 併用療法難治要因である Core aa70・aa91 の置換から見た IFN 治療中の ALT 値・AFP 値の推移を検討した。

4. 研究成果

(1)① : PEG-IFN α 2b/RBV 併用 48 週間の完遂例を対象として SVR・NVR・再燃に寄与するウイルス学的独立要因を多変量解析で検討した結果、SVR に寄与する要因として ISDR 変異数 (≥ 2 個)、NVR に寄与する要因として Coreaa70・aa91 置換 (Mutant)、再燃に寄与する要因として ISDR 変異数 (≤ 1 個) と Coreaa70・aa91 置換 (Mutant) が有力なウイルス学的独立要因として抽出された。更に、Core アミノ酸置換が PEG-IFN/RBV/TVR 併用療法の治療成績に及ぼす影響を検討した。PEG-IFN/RBV/TVR の 24 週間投与例を対象として治療効果に寄与する要因を多変量解析で検討した結果、Core aa70 置換 (Wild) が SVR に寄与するウイルス学的要因として抽出された。更に、難治な前治療無効例を対象として治療効果予測因子を検討した結果、SVR に寄与する要因としては Core aa70 置換 (Wild) と前治療反応性 (Partial response ; HCV RNA 量が 2.0 log 以上低下した NVR)、ETR (治療終了時 HCV RNA 陰性) に寄与する要因としては AFP 値 ($< 10 \mu\text{g/l}$) と前治療反応性 (Partial response) が抽出された。新規治療の TVR 併用療法は治療効果が高い反面、副作用も強いため risk/benefit の観点から治療前効果予測が重要である。Core アミノ酸置換は新規治療にも有用であることが判明した。

② : Core aa70・aa91 置換と PVR を組み合わせて治療効果予測を検討した結果、Core aa70・aa91 置換が Mutant で PVR を達成しない症例の NVR は高率で SVR は低率であり治療抵抗性であることが確認された。

(2)① : HOMA-IR と Core aa70・aa91 置換の検討では、Core aa70・aa91 置換 (Mutant) の HOMA-IR が高値を示した。IR に寄与する要因を多変量解析で検討した結果、Core aa70・aa91 置換 (Mutant) は IR・高度 IR に寄与する独立要因であることが確認された。また、Core aa70 置換に寄与する要因を代謝要因の

みを用いて多変量解析で検討すると、中性脂肪、LDL コレステロール、空腹時血糖という脂質・糖代謝要因が独立要因として抽出された。更に、PEG-IFN/RBV/TVR 併用療法において Core アミノ酸置換が脂質要因に及ぼす影響を検討した。TVR 併用療法中の LDL コレステロールは Core aa70 置換 (Mutant) よりも Core aa70 置換 (Wild) の方が高値を推移していた。更に、Non SVR 例よりも SVR 例の方が LDL コレステロールは高値を推移していた。Core アミノ酸置換は脂質代謝を介して新規治療を含む IFN 治療抵抗性に関与していることが判明した。難治例の治療成績は脂質代謝を標的とした薬剤の追加で更なる改善が期待される。

② : IFN 未治療 (自然経過観察) 例、RBV 併用療法 non-SVR 例、IFN 関連療法 SVR 例からの肝発癌例における Core アミノ酸置換の影響を検討した。多変量解析で肝発癌に寄与する要因を検討した結果、肝線維化進行度から独立して Core aa70・aa91 置換 (Mutant) が抽出された。新規治療は治療効果が高い反面、SVR 後発癌例が増加する可能性がある。Core アミノ酸置換は自然経過観察例からの肝発癌のみならず、新規治療で治癒した症例の経過観察のためにも有用である。更に、肝発癌予防目的の IFN 単独療法を行った症例を対象として Core aa70・aa91 置換の有無別に肝発癌の指標である ALT 正常化率と AFP 低下率を評価すると、Core アミノ酸置換の有無に寄らず ALT 正常化と AFP 低下が得られ、IFN 単独療法の長期的な肝発癌予防における有用性が示唆された。

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 7 件)

- ① Amino acid substitution in HCV core/NS5A region and genetic variation near IL28B gene affect treatment efficacy to interferon plus ribavirin combination therapy. Akuta N, Kumada H (他 13 名, 1 番目). *Intervirolology* 2012;55:231-41. 査読有り
- ② Amino acid substitutions in hepatitis C virus core region predict hepatocarcinogenesis following eradication of HCV RNA by antiviral therapy. Akuta N, Kumada H (他 11 名, 1

- 番号). J Med Virol 2011;83:1016-1022. 査読有り
- ③ Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. Akuta N, Kumada H (他 14 名, 1 番号). Hepatology 2010;52: 412-429. 査読有り
- ④ Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region of genotype 1b affect very early viral dynamics during treatment with telaprevir, peginterferon, and ribavirin. Akuta N, Kumada H (他 12 名, 1 番号). J Med Virol 2010;82: 575-582. 査読有り
- ⑤ Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region of genotype 1b are the important predictor of severe insulin resistance in patients without cirrhosis and diabetes mellitus. Akuta N, Kumada H (他 12 名, 1 番号). J Med Virol 2009;81:1032-1039. 査読有り
- ⑥ A matched case-controlled study of 48 and 72 weeks of peginterferon plus ribavirin combination therapy in patients infected with HCV genotype 1b in Japan: amino acid substitutions in HCV core region as predictor of sustained virological response. Akuta N, Kumada H (他 12 名, 1 番号). J Med Virol 2009;81:452-458. 査読有り
- ⑦ Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 2a high viral load and

virological response to interferon-ribavirin combination therapy. Akuta N, Kumada H (他 12 名, 1 番号). Intervirology 2009;52:301-309. 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

- ① 芥田憲夫. Amino acid substitution in the hepatitis C virus core region of genotype 1b are the important predictor of telaprevir with peginterferon plus ribavirin, and hepatocarcinogenesis. The 62th annual meeting of the American association for the study of liver disease, 2011. 2011 年 11 月 6 日. CA (USA).
- ② 芥田憲夫. C 型肝炎の治療抵抗性と肝発癌に影響するウイルス・宿主要因の検討. 第 15 回日本肝臓学会大会. 2011 年 10 月 20 日. 福岡サンパレス (東京都).
- ③ 芥田憲夫. HCV core アミノ酸置換が肝発癌・代謝要因に及ぼす影響. 第 47 回日本肝臓学会総会. 2011 年 6 月 2 日. ホテルグランパシフィック LE DAIBA (東京都).
- ④ 芥田憲夫. 新規抗 HCV 療法を含めた難治要因の検討と代謝要因への影響. 第 97 回日本消化器病学会総会. 2011 年 5 月 13 日. 京王プラザホテル (東京都).
- ⑤ 芥田憲夫. Amino acid substitutions in HCV core region of genotype 1b are the important viral predictors of treatment resistance and hepatocarcinogenesis. 7th APASL Single Topic Conference "Hepatitis C Virus". 2010 年 12 月 17 日. 幕張メッセ (千葉県).
- ⑥ 芥田憲夫. Core アミノ酸置換と IL28B 遺伝子多型の PEG-IFN/RBV/Telaprevir 併用療法における有用性. 第 38 回日本肝臓学会東部会. 2010 年 12 月 2 日. 京王プラザホテル (東京都).
- ⑦ 芥田憲夫. PEG-IFN/RBV/Telaprevir 併用療法における Core aa70 置換と IL28B 遺伝子多型の有用性. 第 14 回日本肝臓学会大会. 2010 年 10 月 14 日. パシフィコ横浜 (神奈川県).
- ⑧ 芥田憲夫. HCV core アミノ酸置換の新規抗 HCV 療法・肝発癌に及ぼす影響. 第 96 回日本消化器病学会総会. 2010 年 4 月 24 日. 新潟県民会館 (新潟県).
- ⑨ 芥田憲夫. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region of genotype 1b are the important predictor of treatment resistance, insulin resistance, and

hepatocarcinogenesis. The 60th annual meeting of the American association for the study of liver disease, 2009. 2009年11月1日. BOSTON HYNES CONVENTION CENTER (USA).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称:C型肝炎に対するインターフェロン/
リバビリン併用療法の有効性

発明者:熊田博光・芥田憲夫

権利者:同上

種類:特許

番号:特開2007-43985

出願年月日:2005年8月11日

国内外の別:国内

名称:B型肝炎ウイルス量が低下する可能性
を予測する方法

発明者:熊田博光・芥田憲夫

権利者:同上

種類:特許

番号:特願2007-340261

出願年月日:2007年12月28日

国内外の別:国内

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芥田 憲夫 (AKUTA NORIO)

(財) 冲中記念成人病研究所・研究員

研究者番号:20469638

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし