

만성 C형 간염 환자에서 인터페론과
리바비린 병합요법에 의한 치료효과와
ISDR 염기서열의 관련성

연세대학교 대학원

의 학 과

윤 준 호

만성 C형 간염 환자에서 인터페론과
리바비린 병합요법에 의한 치료효과와
ISDR 염기서열의 관련성

지도 예 병 일 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2006년 7월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

윤 준 호

윤준호의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2006년 7월 일

감사의 글

먼저 이 논문이 완성되기까지 많은 관심과 격려로 지도를 해주신 예병일 교수님께 진심으로 감사를 드리며, 항상 아낌없는 지원과 격려를 보내주신 최종환 교수님과 김현원 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다.

저의 미흡한 논문을 자상하게 심사해 주시고 많은 조언을 해주신 백순구 교수님과 최선주 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다. 실험실 생활을 큰 어려움 없이 잘할 수 있도록 모든 면에서 많은 도움을 주신 이현우 선생님과 손준형 선생님께도 감사의 마음을 전합니다. 도움을 주신 모든 선생님들께 앞으로 더욱 열심히 노력하여 발전된 모습으로 보답하고자 하겠습니다.

하늘에 계신 아버님께서도 함께 기뻐하실 거라 생각하며 다시 한번 감사의 마음을 전해드리고 싶습니다. 그 동안 변함없는 마음으로 지켜봐 주신 장인어른과 장모님께도 감사드리며, 항상 자신의 자리에서 흔들림 없이 열심히 생활하는 동생 준철과 정이에게도 고마운 마음을 전합니다.

언제나 변함없는 마음으로 저를 믿고 후원해준 사랑하는 아내 은영에게 그 동안의 모든 노고에 진심으로 깊은 감사를 드립니다. 끝으로 세상에 나온 지 얼마 안된 아들 태건과 귀여운 딸 서진과 함께 조그만 기쁨을 나누고자 합니다.

2006년 7월

저 자 씀

차 례

그림 차례	i
표 차례	ii
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 재료	7
2. HCV RNA 분리 및 cDNA 제조	8
3. HCV의 ISDR과 PePHD 부위의 염기서열 결정	9
4. HCV RNA 정량	9
5. 통계 분석	11
III. 결과	12
1. 환자 구분	12
2. HCV의 ISDR과 PePHD 부위의 염기서열 확인	12
3. 인터페론과 리바비린 병합요법의 예측인자 확인	18
IV. 고찰	20
V. 결론	25
참고문헌	27
영문요약	40

그림 차례

Fig. 1. ISDR sequences(2209–2248) of HCV in complete response group	15
Fig. 2. ISDR sequences(2209–2248) of HCV in no–response group	16
Fig. 3. PePHD sequences(659–670) of HCV in complete response group and no–response group	17

표 차례

Table 1. Primer sequences to amplify ISDR and PePHD	10
Table 2. Primer sequences to determine HCV RNA titer	10
Table 3. Characteristics of the complete response group patients before IFN- α and ribavirin treatment	13
Table 4. Characteristics of the no-response group patients before IFN- α and ribavirin treatment	14
Table 5. Statistical analysis of Age, ALT, and HCV RNA titer . .	19
Table 6. Statistical analysis of ISDR	19

국문요약

만성 C형 간염 환자에서 인터페론과 리바비린 병합요법에 의한 치료효과와 ISDR 염기서열의 관련성

현재 만성 C형 간염의 치료에는 인터페론과 리바비린의 병합요법이 사용되고 있으나 치료비가 과중하고 부작용이 커서 환자에게 큰 부담이 되고 있다. 또한 모든 대상 환자에서 좋은 결과를 얻을 수 없으므로 치료효과를 볼 수 있는 환자를 선택하여 치료효과의 극대화를 가져올 수 있는 방안이 절실히 요구되고 있다. 한편 고빈도변이 부위(hypervariable region) 염기서열의 다양성과 같이 치료효과를 예측하기 위해 사용할 수 있는 여러 가지 인자들에 대한 연구가 진행되어 왔으나 연구자들에 따라 서로 다른 결과가 보고되곤 했다.

본 연구의 목적은 한국의 만성 C형 간염 환자에서 interferon sensitivity determining region (ISDR)의 염기서열이 인터페론과 리바비린 병합요법의 치료효과와 어떤 상관성을 지니는지를 알아보려는 것이다. C형 간염 바이러스에는 여러 가지 형이 존재하고 있고, 각 형태에 따라 치료결과가 다르게 나타난다는 보고가 있으므로 본 연구에서는 한국에서 C형 간염의 원인으로 60-80%를 차지하는 1b형을 선택하여 실험을 진행하였다. 또한 ISDR 염기서열과 함께 여러 다른 인자들과의 비교 분석을 통하여 치료효과를 예측할 수 있는 방법을 확립하고자 했다. C형 간염 환자들을 대상으로 인터페론과 리바비린 병합요법 후 치료효과를 얻은 군과 치료효과를 얻지 못한 군으로 나누어서 HCV RNA의 ISDR 부위 염기서열을 포함한 여러 인자와의 상관관계를 분석하였다.

본 연구 결과 만성 C형 간염 환자에서 인터페론과 리바비린 병합요법의

치료효과에 대한 예측인자들은 환자의 나이, 치료 전 HCV RNA titer, ISDR 부위 염기서열이 사용될 수 있음을 확인 하였다. 치료효과를 얻은 실험 군에서 환자의 나이가 치료효과를 얻지 못한 실험 군에 비해 낮게 확인되었으며, 치료 전 HCV RNA titer도 치료에 효과를 보인 실험 군에서 낮게 확인 되었다. ISDR 부위 염기서열은 변이발생 빈도가 높을수록 병합 요법에 의한 치료가능성이 높게 나타남을 알 수 있었다. 특히 예측인자로 확인된 환자의 나이와 치료 전 HCV RNA titer를 고려하여 ISDR type과 치료 가능성을 비교해 볼 때 mutant type에서 인터페론과 리바비린 병합 요법에 의한 치료 가능성은 wild type에 비해서 8.1 배로 확인되었다.

이상의 실험 결과를 토대로 볼 때 C형 간염 바이러스 1b 형에 의한 간염 환자에서 ISDR 염기서열과 치료 전 HCV RNA titer, 환자의 나이 등을 인터페론과 리바비린의 병합요법 시 치료효과를 예측할 수 있는 인자로 이용한다면 사회적 경제적인 손실을 줄일 수 있는 방법의 하나가 될 것으로 사료된다.

핵심되는 말: C형 간염 바이러스, 인터페론, 리바비린, interferon sensitivity determining region (ISDR), 예측 인자

만성 C형 간염 환자에서 인터페론과 리바비린 병합요법에 의한 치료효과와 ISDR 염기서열의 관련성

<지도교수 예 병 일>

연세대학교 대학원 의학과

윤 준 호

I. 서 론

C형 간염은 Hepatitis C Virus (HCV)에 의해서 매개되며, 만성 간질환과 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. C형 간염은 급성 간염 발병 후 50-70% 에서 만성화하고, 이 중 20% 이상에서 간경변증으로 진행되며 원발성 간암과도 높은 상관관계를 가지고 있다^{1, 2}. 전 세계적으로 약 1억 7천만 명 이상의 C형 간염 바이러스 보균자가 있는 것으로 추정되고 있으며³, 선진국 만성 간염의 약 70%, 우리나라 만성 간질환의 약 15-20%에서 관련이 있는 것으로 보고되어 있다^{4, 5}. 따라서 C형 간염 치료는 만성 간질환의 발생을 예방하기 위하여 매우 중요하다.

C형 간염의 치료에는 인터페론과 리바비린이 이용되고 있다. 치료효과는 인터페론을 단독으로 사용한 치료법보다 병합요법이 높게 나타나지만, 병합요법의 경우도 47% 정도에 불과한 치료효과를 보이고 있다⁶⁻⁸. 이러한 치료효과의 차이는 HCV의 유전자형이 관여한다고 알려져 있다^{9, 10}. HCV의 치료는 경제적인 비용과 부작용이 크다는 점에서 환자에게 많은 부담이 되므로, 치료효과를 예측하기 위한 방법들이 요구되고 있는 상황이다. 치료효과를 예측하기 위한 인자에 대한 연구는 각 나라 연구진에 따라 그 상관관계가 다르게 나타나고 있다¹¹⁻¹³. 그것은 시료의 수가 적고, HCV 아형

에 따른 구분을 제대로 하지 않았기 때문으로 생각되며, 지역별, 인종별에 따른 차이 때문일 수 있으나 지금까지의 연구는 단편적으로 적은 수의 시료를 이용하여 단편적인 인자만을 찾기 위한 연구를 진행하였기에 명확한 결과를 얻지 못한 것으로 판단된다. 그러므로 본 연구는 HCV 1b형 만성 간염환자에서 인터페론과 리바비린 병합요법에 대한 치료효과 예측인자를 찾아내고자 진행하였다.

만성 C형 간염의 치료효과 예측을 위한 연구는 크게 환자(host) 측면과 바이러스 측면으로 구분할 수 있다. 환자 측면에서 고려될 사항으로는 환자의 나이, 음주습관, 수혈경력 및 기타 감염여부 등이 있고, 바이러스 측면에서는 치료 전 바이러스의 농도 및 감염된 HCV 유전자형과 이형성 등이 있다¹⁴. 이 중 HCV 1b형 유전자 구조에서 NS5A 영역 내 codon 2209-2248의 아미노산 서열에 변이가 존재할수록 인터페론 치료반응성이 향상된다고 알려져 있으며, 이 부위는 interferon sensitivity determining region (ISDR)으로 명명되어 있다^{15, 16}. HCV 1b형의 NS5A 단백질은 인터페론의 항바이러스 작용에 필수적인 double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)와 결합하여 PKR의 활성도를 억제하며, ISDR에 다수의 아미노산 변이가 있는 경우 이 결합이 저해된다고 보고되고 있다^{17, 18}. 이 부위의 변이 정도와 인터페론 치료효과는 일본인이 대상인 일부 연구에서는 긴밀한 관계가 있다고 보고되기도 했으나, 유럽과 미국에서는 ISDR의 변이 정도와 인터페론 치료효과와는 관련성이 확실치 않다고 보고되는 등¹⁹⁻²¹ 명확한 결론을 내리기 힘든 실정이다.

HCV 유전자는 9.6 kb의 positive-strand RNA를 가지며 약 3000개의 아미노산으로 구성되어 있다²². 이 유전자로부터 합성된 polyprotein은 세 개의 구조 단백질(core, E1, E2)과 여섯 개의 비구조 단백질(NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)로 구분되어 기능을 하게 된다²³. HCV는 크게 여섯 종의 유전자형과 50개 이상의 아형이 있으며, 유전자형과 아형간

에는 염기서열의 차이를 보인다. HCV 감염 후 만성화가 많은 이유는 HCV 유전자 이형성(genetic heterogeneity)과 바이러스에 대한 T 림프구의 면역반응이 활발하지 않기 때문인 것으로 추정하고 있다. 뿐만 아니라 유전자 이형성은 예방백신 개발을 어렵게 하고 인터페론 치료에 대한 반응의 차이를 가져오기도 한다. 인터페론 치료에 대한 비 반응성과 관련이 있다고 보고된 단백질들은 (ISDR을 포함하는) NS5A 외에 외피단백질인 E2와 serine protease로 작용하는 NS3/4A가 있다. E2 단백질은 *in vitro* 에서 PKR의 활성도를 억제할 수 있다고 보고되었으며, C 말단에 있는 PKR/eIF2 α phosphorylation homology domain (PePHD) 부위가 PKR과의 상호작용에 의해 인터페론 치료에 저항성을 증가시킬 수 있다는 가설이 제시되기도 하였다^{24, 25}. 그러나 몇몇 연구자들에 의한 후속 연구에서는 E2 PePHD 부위의 아미노산 변이 여부가 HCV 유전자형에 따른 치료효과와 연관성이 없다고 보고되었다²⁶⁻²⁹. 최근에는 NS3/4A 단백질이 interferon regulatory factor 3 (IRF-3)의 nuclear translocation과 phosphorylation을 저해할 수 있다고 보고되기도 했다³⁰.

C형 간염을 치료하는 궁극적인 목표는 HCV를 체내에서 제거하여 질환의 진행과 합병증을 예방하는 것이다. 인터페론을 이용한 C형 간염 치료에 따른 부작용으로는 백혈구 감소증, 혈소판 감소증, 우울증, 갑상선 기능이상, 집중장애, 기억장애, 시각장애, 피로, 근육통, 두통, 오심, 구토, 피부자극, 경도의 발열, 체중감소, 불면증, 청각장애, 이명 등이 있는데, 특히 독감과 유사한(Flu-like) 증상과 우울증이 주로 나타난다^{31, 32}. 또한 병합요법에 사용하는 리바비린과 관련된 부작용은 용혈성 빈혈, 피로, 소양증, 발진, 부비동염, 통풍 등이 있지만, 가장 중요한 것으로 선천성 기형이 유발될 수 있으므로 세심한 주의가 필요하다³³. 이러한 여러 가지 부작용과 치료환자의 절반 정도에 이르는 치료효과 때문에 치료효과를 극대화시킬 수 있도록 환자를 잘 선택해야 할 필요가 있다.

본 연구에서는 연세대학교 원주의과대학 부속 원주기독병원에 내원한 환자들 중 임상적으로 만성 간염이 의심되는 환자들을 대상으로 먼저 HCV 감염을 확인하고, 만성 C형 간염으로 확진된 환자의 혈청을 실험재료로 사용하였다. C형 간염 바이러스 감염환자의 치료방법 중 인터페론과 리바비린 병합요법으로 치료한 다음 치료효과를 얻은 군과 치료효과를 얻지 못한 군으로 나누어 실험에 이용하였다. 이를 위해 치료 전과 치료 후에 채혈을 통해 얻은 혈청을 실험에 사용하였으며, 이 환자들의 혈청으로부터 HCV RNA를 분리한 후 ISDR 부위의 염기서열을 확인하고 다른 예측인자들과의 상호관계 및 치료효과와의 상호관계를 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에 사용한 환자들의 혈청은 연세대학교 원주의과대학 부속 원주 기독병원에 내원한 환자들 중 임상적으로 만성 간염이 의심되는 환자들을 대상으로 하였다. 검체는 HCV 항체를 이용한 제 3세대 ELISA 방법으로 진단하여 양성으로 판명된 환자의 혈청을 이용하였고, HCV 1b 형에 의한 감염 환자의 혈청만을 선택하여 실험에 이용하였다. 실험 군은 C형 간염 바이러스 감염환자를 대상으로 인터페론(interferon- α , Roche, 스위스)과 리바비린(ribavirin, 한국유나이티드, 한국) 병합요법을 시행하여 치료 효과를 얻은 군과 치료효과를 얻지 못한 군으로 나누어 비교하였고, 각각 치료전과 치료 후에 채혈한 혈청을 실험에 사용하였다.

모든 환자들에 대한 치료방법은 인터페론을 6개월 동안 이틀마다 300만 단위(units)씩 피하주사 하였고, 리바비린은 같은 기간 동안 하루 900 mg 씩 투여하였다. 치료효과는 치료기간 종료 후 alanine aminotransferase (ALT) 수치를 측정하여 A 군은 ALT 수치가 정상수준으로 떨어진 치료된 군(complete response, CR), B 군은 ALT 수치 변화가 없는 치료되지 않은 군(no-response, NR)으로 구분하였다.

모든 환자들에 대하여 각각 수혈경력, 나이, 성별 등의 기본정보를 수집하였고, 인터페론과 리바비린의 병합치료전과 치료 후에 각각 채혈한 혈청으로부터 임상검사를 수행하여 ALT 수치를 확인하였다.

2. HCV RNA 분리 및 cDNA 제조

Poel의 방법에 따라 환자의 혈청으로부터 C형 간염 바이러스의 RNA를 분리하였다³⁴. 혈청 50 μ l에 RNA 추출 완충용액 (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM EDTA, 0.1 M sodium chloride, 2 % sodium dodecyl sulfate) 150 μ l와 1 % (w/v) proteinase K 4 μ l를 혼합한 후 DEPC(diethyl pyrocarbonate)를 처리한 재증류수 200 μ l를 첨가한 다음 37 °C에 40분간 보관하였다. 여기에 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1)을 동량 섞은 후 관을 위아래로 서서히 흔들어 용액이 잘 혼합되도록 하였다. 이를 10,000 \times g 속도로 5분간 원심 분리하여 상층 액을 새로운 미세원침관으로 옮겨 담은 후 다시 한 차례 phenol-chloroform-isoamylalcohol 추출을 시행하였다. 이 용액에 glycogen 10 μ g과 2.5배 부피의 99 % 에탄올을 첨가하고 -70 °C에 보관한 다음 필요할 때마다 침전시켜 실험에 이용하였다.

HCV의 cDNA 제조는 Sambrook의 방법을 응용하여 실시하였다³⁵. 먼저 -70 °C에 보관된 RNA를 꺼내어 12,000 \times g로 15분간 원심 분리한 후 상층 액을 제거하고 70 % 에탄올 1 ml를 가하여 한 차례 씻은 후 다시 12,000 \times g로 15분간 원심 분리하여 상층 액을 제거한 다음 진공 상태에서 완전히 건조시켰다. 여기에 DEPC를 처리한 재증류수 7 μ l와 5 \times 역전사완충용액 (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM potassium chloride, 50 mM dithiothreitol, 50 mM magnesium chloride, 2.5 mM spermidine) 2 μ l 및 cDNA 제조용 primer 10 pmole(1 μ l)을 혼합한 후 65 °C에 5분간 보관하여 RNA가 일차구조를 이루도록 하였다. RNA가 변성되면 5 \times 역전사 완충용액 2 μ l, 10 mM dNTP 1 μ l, avian myeloblastosis virus (AMV) 역전사효소 (Promega, Madison, Wisconsin, USA) 10 unit와 RNase inhibitor 20 unit에 DEPC를 처리한

증류수를 합하여 전체 20 μ l가 되도록 한 다음 37 °C에서 1시간 반응시켜 cDNA가 제조되도록 하였다. 반응이 종료된 다음 95°C 에서 5분간 방치하여 효소의 활성을 제거하였다. 제조된 cDNA는 -20 °C에 보관하였다가 필요할 때마다 사용하였다.

3. HCV의 ISDR과 PePHD 부위의 염기서열 결정

각 환자의 HCV RNA로부터 제조된 cDNA를 주형으로 Okamoto의 방법에 따라 HCV typing을 실시하여 1b형인 것을 선택하였고³⁶, ISDR 부위와 PePHD 부위를 증폭시키기 위한 primer를 제작하여 nested PCR을 시행하였다. 염기서열 확인을 위하여 각 환자의 PCR 반응이 종료된 후 원하는 DNA가 증폭되었는지 알아보기 위해 agarose gel 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 남은 PCR 산물은 T-vector (Promega, Madison, Wisconsin, USA)에 subcloning하여 형질전환 실험을 시행하였고, α -complementation을 통해 확인된 집락을 채취하고 이를 증식시킨 다음 DNA를 분리하여 DNA 염기서열을 결정하였다(Table 1).

4. HCV RNA 정량

HCV RNA titer를 확인하기 위해서 인터페론과 리바비린 병합요법 전에 각각 제조된 cDNA를 주형으로 Choo 등의 방법을 이용한 QC-PCR (quantitative and competitive-polymerase chain reaction)을 시행하였다³⁷. 실험에 사용한 primer는 HCV 유전자의 5' -UTR (untranslated region)에 존재하는 특정부위의 염기서열을 이용하였다(Table 2).

Table 1. Primer sequences to amplify ISDR and PePHD

Region	Primer direction	Sequence (5' to 3')	Nucleotide no.
ISDR	Outer sense	TGGATGGAGTGC GGTTGCACAGGTA	6703–6727
	Outer antisense	TGTA AACGACGGCCAG	7296–7320
	Inner sense	TCTTTCTCCGTGGAGGTGGTATTGC	6722–6741
	Inner antisense	CAGGAAACAGCTATGACC	7275–7294
PePHD	Outer sense	TGACTACCCATACAGGCTCT	2180–2199
	Outer antisense	AAGGAAGGAGAGATTGCCAT	2725–2744
	Inner sense	AAGGTTAGGATGTATGTGGG	2238–2257
	Inner antisense	ATTGAGGACCACCGAGTTCT	2689–2708

Table 2. Primer sequences to determine HCV RNA titer

Region	Primer direction	Sequence (5' to 3')	Nucleotide no.
5' – UTR	Outer sense	CCACCATAGATCACTCCCCTGT	15–36
	Outer antisense	TTGAGGTTTAGGATTCGTGCTCAT	348–325
	Inner sense	CTGTGAGGAACTACTGTCTTCA	33–54
	Inner antisense	ACTCGCAAGCACCTATCAGGC	320–301

5. 통계 분석

위의 방법으로 얻은 여러 자료들을 바탕으로 각 인자들과 ISDR 부위의 염기서열이 인터페론과 리바비린 병합요법의 치료효과와 어떤 상관관계를 가지는지 통계적으로 분석하였다. 결과 값은 평균±표준편차로 표시하였고, t test와 odds ratio로 검증하여 p value가 0.05 미만인 경우를 유의하다고 판정하였다.

III. 결 과

1. 환자 구분

HCV 유전자형이 1b 형으로 확인된 환자 50명에 대해서 6개월 동안 인터페론과 리바비린 병합요법을 실시하였다. 치료 종료 후 ALT 수치가 정상범위로 변화된 21명의 환자들을 A군으로 구분하였고, 주요 임상 기록 및 실험결과를 비교하였다(Table 3). 또한 치료 종료 후 ALT 수치가 정상으로 확인되지 않은 29명의 환자들에 대해서는 B군으로 구분하여 주요 임상기록 및 실험결과를 비교하였다(Table 4). 각 실험 군의 결과에서 ISDR 부위의 변이는 type 별로 구분하여 비교하였고, PePHD 부위는 변형된 아미노산 개수를 비교하였다.

2. HCV의 ISDR과 PePHD 부위의 염기서열 확인

각 군별 ISDR 부위의 염기서열(2209-2248)을 DNA 염기서열 결정법을 통해서 확인할 수 있었고, 염기서열 결과를 아미노산으로 전환하여 비교하였다. A 군에서는 1~10 개의 아미노산이 변형되어 있는 것을 확인할 수 있었고(Fig. 1), B 군에서는 1~8 개의 아미노산이 변형되어 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). ISDR 부위 염기서열은 변이 개수에 따라서 type 별로 구분하고, 치료효과 여부에 따라 type별 차이가 있는지를 확인하였다. 또한 A, B 두 군 모두에서 HCV의 E2 PePHD (659-670) 부위의 염기서열을 비교 분석해 본 결과 1~2개의 아미노산 변형이 존재하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

Table 3. Characteristics of the complete response group patients before IFN- α and ribavirin combination treatment

	Age	Sex	ALT	Transfusion history[†]	HCV RNA titer*	ISDR type	No. of Amino Acid Mutations of PePHD
A-1	50	M	178	×	3.92	1	0
A-2	49	F	135	○	3.27	1	1
A-3	40	M	106	×	4.16	1	1
A-4	45	M	218	○	5.48	1	0
A-5	51	F	92	×	4.04	1	0
A-6	41	M	143	×	3.75	2	0
A-7	56	F	167	×	4.24	2	0
A-8	58	M	86	×	5.26	2	0
A-9	49	M	99	○	5.12	2	1
A-10	40	F	129	○	4.41	2	0
A-11	54	F	201	×	3.73	2	1
A-12	53	M	179	×	4.21	2	1
A-13	52	M	234	×	4.25	2	0
A-14	47	M	311	×	5.11	2	0
A-15	49	M	86	×	6.12	3	1
A-16	53	F	220	×	5.91	3	0
A-17	47	F	194	×	4.82	3	0
A-18	49	M	246	×	5.44	3	1
A-19	51	M	441	○	5.22	3	2
A-20	47	F	305	○	4.85	3	0
A-21	55	M	119	×	3.73	3	0

All of the samples were diagnosed by 3rd generation ELISA.

[†]○ indicates history of transfusion and × indicates no history of transfusion.

* The unit of HCV RNA titer before treatment is log copies/ml.

ISDR type : 1 (wild type, no amino acid substitution), 2 (intermediate type, 1~3 amino acid substitutions), 3 (mutant type, ≥4 amino acid substitutions)

Table 4. Characteristics of the no-response group patients before IFN- α and ribavirin combination treatment

	Age	Sex	ALT	Transfusion history [†]	HCV RNA titer [*]	ISDR type	No. of Amino Acid Mutations of PePHD
B-1	53	M	185	×	5.25	1	0
B-2	48	M	320	×	6.11	1	0
B-3	44	F	125	○	4.88	1	0
B-4	49	F	175	×	5.72	1	0
B-5	54	M	151	○	6.21	1	0
B-6	58	F	190	×	5.14	1	0
B-7	62	F	212	×	6.35	1	0
B-8	64	M	252	○	7.11	1	0
B-9	45	M	145	×	6.82	1	0
B-10	49	M	138	×	4.95	1	0
B-11	42	F	120	○	5.54	1	0
B-12	55	M	95	×	6.25	1	0
B-13	53	M	142	×	6.73	1	0
B-14	55	F	185	×	6.76	1	0
B-15	57	M	258	×	4.85	1	0
B-16	53	F	175	○	6.33	2	0
B-17	49	M	241	×	5.81	2	0
B-18	44	M	183	×	6.32	2	0
B-19	59	F	167	×	5.89	2	0
B-20	54	M	171	○	6.14	2	0
B-21	52	F	217	×	6.23	2	0
B-22	55	M	222	×	5.88	2	0
B-23	63	F	235	×	6.32	2	0
B-24	47	F	161	×	6.47	2	0
B-25	51	M	96	○	5.31	2	0
B-26	54	F	80	×	5.85	2	0
B-27	55	F	192	○	6.42	3	0
B-28	58	M	234	×	5.93	3	0
B-29	48	M	341	×	4.98	3	0

All of the samples were diagnosed by 3rd generation ELISA.

[†]○ indicates history of transfusion and × indicates no history of transfusion.

^{*} The unit of HCV RNA titer before treatment is log copies/ml.

ISDR type : 1 (wild type, no amino acid substitution), 2 (intermediate type, 1~3 amino acid substitutions), 3 (mutant type, ≥4 amino acid substitutions)

2209								2248
	PSLKA	TCTTH	HDSPD	ADLIE	ANLLW	RQEMG	GNITR	VESEN
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6	---R-	-----	--N--	P----	-----	-----	-----	-----
7	-----	----R	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	V----	-----	-----	-----	-----
9	-----	-----	-----	P----	-----	-----	-----	-----
10	-----	----R	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11	-----	---C	-----	-----	-----	-----	-----	-----
12	-----	----R	-----	V----	-----	-----	-----	-----
13	L-----	-----	-----	I---D	-----	-----	-----	-----
14	-----	-----	-----	L----	-----	-----	-----	-----
15	V-----	AYI--	-----	-----	-----	-----	-----	-----
16	--S-T	-YI--	RG---	-----	-----	-----	-D---	-----
17	L-----	A---N	-----	V----	-----	-----	-S---	-----
18	V-----	A-----	-----	-----	-----	---K-	-T---	----K
19	L-----	--RR-	-----	--D--	-----	W--K-	-----	-----
20	L-----	---R-	N--V-	-----	-----	-----	-----	-----
21	O-S-T	-YI-Q	Y-G--	V-----	-----	-----	-D---	-----

Fig. 1. ISDR sequences (2209–2248) of HCV in complete response group. Dashes indicate the amino acid residues identical to the sequences on the top in each panel.

2209	PSLKA	TCTTH	HDSPD	ADLIE	ANLLW	RQEMG	GNITR	2248 VESEN
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
15	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
16	-----	----R	-----	-----	-----	-----	-----	-----
17	-----	----R	-----	-----	-----	-----	-----	-----
18	-----	----R	-----	-----	-----	-----	-----	-----
19	-----	----C	-----	-----	-----	-----	-----	-----
20	--M--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
21	-----	----C	-----	-----	-----	-----	-----	-----
22	-----	----R	-V---	-----	-----	-----	-----	-----
23	---R-	----R	-----	-----	-----	-----	-----	-----
24	L-----	---P-	-----	-----	-----	W-----	-----	-----
25	-----	----R	-V---	-----	-----	-----	-----	-----
26	-----	-----	-----	P-----	-----	-----	-----	-----
27	L-----	A--AR	-GFI-	-----	-----	-----	-E---	-----
28	-----	-G---	-----	---D	-----	P-----	-D---	-----
29	L-----	--RR-	-----	V-----	-----	-----	-----	-----

Fig. 2. ISDR sequences (2209–2248) of HCV in no–response group. Dashes indicate the amino acid residues identical to the sequences on the top in each panel.

	Complete response group			No-response group		
	RS	ELSPL	LLSTT	RS	ELSPL	LLSTT
1	--	-----	-----	--	-----	-----
2	-A	-----	-----	--	-----	-----
3	-Q	-----	-----	--	-----	-----
4	--	-----	-----	--	-----	-----
5	--	-----	-----	--	-----	-----
6	--	-----	-----	--	-----	-----
7	--	-----	-----	--	-----	-----
8	--	-----	-----	--	-----	-----
9	-A	-----	-----	--	-----	-----
10	--	-----	-----	--	-----	-----
11	-E	-----	-----	--	-----	-----
12	-Q	-----	-----	--	-----	-----
13	--	-----	-----	--	-----	-----
14	--	-----	-----	--	-----	-----
15	--	A-----	-----	--	-----	-----
16	--	-----	-----	--	-----	-----
17	--	-----	-----	--	-----	-----
18	--	Q-----	-----	--	-----	-----
19	-A	Q-----	-----	--	-----	-----
20	--	-----	-----	--	-----	-----
21	--	-----	-----	--	-----	-----
22				--	-----	-----
23				--	-----	-----
24				--	-----	-----
25				--	-----	-----
26				--	-----	-----
27				--	-----	-----
28				--	-----	-----
29				--	-----	-----

Fig. 3. PePHD sequences (659–670) of HCV in complete response group (n=21) and no-response group (n=29). Dashes indicate the amino acid residues identical to the sequences on the top in each panel.

3. 인터페론과 리바비린 병합요법의 예측인자 확인

각 군별 환자의 나이, 성별, ALT 수치, 수혈경험 여부, 치료 전 HCV RNA titer, ISDR type, PePHD 부위의 아미노산 변이 수와 치료효과와의 관계를 통계적으로 분석하였다. 환자의 나이와 치료 전 HCV RNA titer가 낮은 경우 완전히 치료된 군 (A)에서 치료되지 않은 군 (B)에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었다(Table 5). 이 결과로부터 인터페론과 리바비린의 병합치료효과 예측인자로서 환자의 나이와 치료 전 HCV RNA titer의 사용가능성을 확인할 수 있었다. 그러나 두 실험 군에서 치료 전 ALT 수치와 PePHD 부위의 아미노산 변이는 통계적으로 유의한 차이를 확인할 수 없었다.

다음으로 ISDR 부위의 염기서열과 치료효과를 비교 분석하기 위하여 ISDR type에 따라 환자를 구분하고 치료효과와의 연관성 여부를 odds ratio를 통해서 확인하였다. 그 결과 아미노산 변이가 존재하는 intermediate type에서 wild type과 비교하여 치료 가능성이 2.5배로 높게 나타나는 것으로 확인되었고, mutant type에서는 치료 가능성이 7.0배로 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 환자의 나이와 치료 전 HCV RNA titer를 고려하여 보정해 본 결과 mutant type에서의 치료 가능성은 8.1배로 더 크게 나타남을 확인할 수 있었다(Table 6).

Table 5. Statistical analysis of Age, ALT and HCV RNA titer before treatment

	M:F	Age	ALT	HCV RNA titer before treatment
A	13:8	49.3±5.0*	185.2±89.1	4.62±0.8**
B	16:13	52.8±5.7*	186.5±61.7	5.95±0.6**

A : complete response group. B : no-response group.

†The data of age, ALT and HCV RNA titer before treatment are shown in average±SD form.

*P-value was 0.032.

**P-value was 0.001.

Table 6. Statistical analysis of ISDR

ISDR Type [†]	Crude OR	95% CI	Adjusted OR*	95% CI*
Wild	1.00		1.00	
Intermediate	2.46	0.64~9.39	2.90	0.59~14.25
Mutant	7.00	1.29~37.91	8.10	1.05~62.61

†ISDR wild type has no mutation. Intermediate type has 1 to 3 mutations and mutant type has more than 4 mutations.

*After adjustment for age and HCV RNA titer before treatment.

OR : odds ratio

CI : 95% confidence interval

IV. 고 찰

C형 간염 바이러스는 1989년에 non-A, non-B형으로 분류된 간염 환자로부터 cDNA를 cloning하는데 성공하여 그 정체가 밝혀진 RNA 바이러스로서, 과거에 만성 non-A, non-B형 간염으로 분류되었던 환자의 대부분이 C형 간염으로 밝혀졌다^{38, 39}. 급성 간염의 특징을 보이는 A형 및 E형 바이러스와는 달리 C형 간염은 만성화의 가능성이 크며⁴⁰⁻⁴², 특히 B형 간염보다도 만성화 경향이 더 큰 것으로 알려져 있어^{1, 43, 44} 만성 간질환의 관리에 중요한 의미를 지닌다.

C형 간염 바이러스가 지속적인 감염을 일으키는 기전과 간세포를 손상시키는 기전은 아직 완전히 규명되지 않고 있다. 현재까지 C형 간염에 효과적인 백신이 개발되지 않고 있으므로 최선의 관리는 감염되지 않는 것이지만, 이미 감염된 경우에는 항바이러스제를 이용한 치료를 할 수밖에 없는 상황이다. C형 간염 치료에 이용되는 대표적인 항바이러스제는 인터페론이다. 인터페론을 단독으로 치료한 경우에는 약 50%의 환자에서 HCV RNA의 소실을 보인다고 알려져 있지만⁷ 치료 후 재발이 흔하게 일어나기 때문에 실제 치료 효율은 10-20% 정도에 불과하다⁴⁵⁻⁴⁷. 따라서 만성 C형 간염의 치료효과를 높이기 위하여 인터페론 외에 리바비린과 같은 새로운 약제의 병합요법이 이용되고 있다. 그러나 이러한 병합요법의 경우도 47% 정도의 치료효과를 보이고 있을 뿐이다⁶⁻⁸, 이와 같이 치료효과를 보이는 경우와 그렇지 못한 경우의 가장 큰 원인으로서는 HCV의 유전자형이 거론되고 있다⁹.

한국에서 가장 흔한 HCV 유전자형은 1b로서 전체의 약 60-80%를 차지한다^{48, 49}. 그런데 이 유전자형은 치료효과가 낮은 것으로 보고되고 있어 문제가 된다. 인터페론과 리바비린을 이용한 병합요법은 환자의 입장에서 볼 때 치료비가 많이 들고, 환자에게 육체적인 고통을 요구하는 여러

가지 부작용이 나타날 수 있다는 사실이 이 치료방법을 선택하기에 큰 부담으로 작용하고 있다. 현재까지 치료효과의 예측인자에 대한 연구는 크게 환자 측면과 바이러스 측면으로 진행되고 있는데, 각 나라 연구진에 따라 그 상관관계가 다르게 나타나고 있으며¹¹⁻¹³, 이 차이가 유전적으로 종족별 차이인지 인종별 차이 때문인지는 아직 규명되지 않고 있다.

ISDR은 HCV 1b형 유전자의 NS5A 부위에 위치하는 서열로서 인터페론에 대한 치료효과 예측인자로서 알려져 있다¹⁵. 일본에서 처음 발표한 논문에 의하면 이 부위의 아미노산에 변이가 존재하게 되면 인터페론 단독 치료에 의한 치료효과가 높게 나타난다고 한다. 즉 HCV 1b형 바이러스에 의한 만성 감염의 경우 ISDR 부위의 아미노산 변이 개수가 증가할수록 인터페론에 의한 치료효과가 높게 나타난다고 보고되었다^{50, 51}. 한편 미국과 유럽에서 이루어진 연구결과에 의하면 ISDR 부위의 아미노산 변이 개수와 치료효과와의 연관성이 낮은 것으로 확인되었다^{11, 13, 46, 52-55}. 이러한 차이점의 원인을 찾기 위해서 미국과 유럽에서는 대규모의 코호트 연구를 시작하였으며, 그 결과 유럽과 미국에서 확인된 HCV type 1형의 경우 ISDR 부위의 변이가 드물게 나타나는 것을 알 수 있었다⁵⁶⁻⁶⁰. 한편 각 지역별로 인터페론을 이용한 치료 방식의 차이 때문에 ISDR과 치료효과의 연관성이 다르게 나타나는 이유가 될 수도 있다. 그러나 치료방식과 지역적인 차이에 대한 원인은 아직 정확히 모르고 있다. 즉 ISDR 부위의 아미노산 변이 개수가 적은 경우에는 인터페론 치료효과와의 연관성을 설명하기에는 어려움이 있다. 최근에는 HCV E2 부위의 PePHD에서 아미노산 변이가 발견되었고²⁴, 인터페론 치료에 대한 반응 예측인자로서 연구되고 있다^{29, 61}. 그러나 HCV 2a 형과 2b 형의 경우에 PePHD 부위의 변이와 치료효과가 연관성이 있는 것으로 보고되었고^{62, 63}, HCV 1b 형과 3a 형의 경우에 치료효과와의 연관성이 낮은 것으로 보고되었다^{26, 64-66}. 국내에서의 치료효과 예측인자에 대한 연구는 2000년도에 ISDR과 인터페론 단독치료에 대한

상관관계 여부가 보고되었으나 그 연관성은 낮은 것으로 확인되었다⁶⁷. 한편 이 논문에서 이용한 C형 간염 환자의 시료 수는 모두 12개였으며, 이후 인터페론과 리바비린 병합요법에 의한 치료방식이 도입되었고 현재까지 병합요법에서 환자의 나이, 치료 전 HCV RNA titer, ALT 수치, ISDR type, PePHD 부위의 변이 여부 등 여러 가지 예측인자들에 대한 종합적인 분석은 이루어지지 않았다.

본 연구에서는 만성 C형 간염 환자에서 인터페론과 리바비린 병합요법에 대한 치료효과와 ISDR을 중심으로 한 여러 가지 예측인자들의 상관관계를 확인하고자 하였다. 인터페론과 리바비린을 6개월 동안 병합치료 후 치료효과를 얻은 군과 치료효과를 얻지 못한 군을 비교한 결과, 환자들의 나이가 적을수록, 치료 전 HCV RNA titer가 낮을수록 치료효과가 좋은 것으로 확인되었다. 치료 전 HCV RNA titer는 치료효과와 연관성이 깊은 것으로 알려져 있었으며⁶⁸, 환자의 나이는 본 실험에서 두 그룹간에 유의한 차이를 보이는 것으로 확인되었다(Table 5). ISDR type에 대한 분석결과는 mutant type의 경우 치료 가능성이 더 큰 것으로 확인되었으며, 이러한 결과는 국내에서 보고된 결과와는 다소 상반된 것으로 볼 수 있다. 한편 일본의 경우 HCV 1b 형의 ISDR type과 치료효과와의 상관관계는 유럽의 경우와 비교하여 매우 큰 것으로 보고되고 있으며⁶⁹, 본 연구 결과에서는 국내의 HCV 1b 형의 경우도 일본의 경우와 유사한 특징을 갖는 것으로 확인되었다. 이전에 수행된 국내 연구결과와의 차이점은 인터페론만을 이용한 단독 치료방법을 사용하였고 실험대상자의 수가 적은 것들을 들 수 있다. 또한 본 실험에서 HCV E2의 PePHD 부위에 존재하는 아미노산 변이 여부를 확인해 본 결과 치료효과를 얻은 군과 치료효과를 얻지 못한 군의 관계에서 통계적으로 유의한 차이점을 확인할 수 없었다. 그러나 특이한 점은 치료효과를 보인 실험 군에서만 1~2개의 아미노산 변이가 확인되었다는 점이다. PePHD에 대한 이전 실험결과들 중 이 부위의 아미

노산들이 매우 보존적이라는 보고가 있었으며^{28, 70}, 본 연구 결과도 이와 유사한 결과를 확인할 수 있었다. 이 부위가 인터페론과 리바비린 병합 치료효과와의 연관성은 통계적으로 낮게 나타났지만 변이 발생이 치료효과를 증가시킬 가능성에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다.

ISDR 부위의 아미노산 변이가 어떤 방식으로 인터페론에 의한 치료효과에 영향을 주는 지에 대해서는 아직 잘 모르고 있다. 그러나 NS5A가 *in vitro* 에서 PKR과 결합에 의해서 PKR의 활성을 저해하며, 특히 ISDR 부위의 변이가 존재할 경우 PKR 과의 결합이 일어나지 않는다는 보고가 있었다⁷¹. 만일 PKR과 NS5A의 결합에 의해서 PKR의 기능이 억제 될 경우 항바이러스 작용을 제대로 할 수 없게 될 것이다. 그리고 NS5A 내의 ISDR 변이 정도에 따라서 인터페론 치료에 대한 치료효과가 향상된다는 보고도 있었다^{19-21, 57-59}. 결국 ISDR 부위의 변이가 존재하지 않는 NS5A가 인터페론에 의한 항바이러스 작용을 억제할 수 있다고 볼 수 있다. 이러한 특징은 특히 1b 형의 경우 1a 형 보다 더 크게 나타난다는 보고도 있다^{72, 73}. 이외에 *in vitro*에서 NS5A를 과 발현 시킨 HeLa 세포에서 IL-8의 발현이 증가되어 인터페론의 작용을 저해한다는 보고가 있었으며⁷⁴, 실제 HCV 1b 형 감염 환자들의 혈청 내 IL-8의 농도가 낮은 경우 인터페론 치료효과가 높게 나타나는 것이 확인 되기도 하였다⁷⁵. 이러한 사실들을 종합해 볼 때 ISDR 부위에 변이가 존재하는 NS5A의 경우 환자 측면에서 일어나는 항바이러스 작용이 잘 일어 날 수 있음을 추측할 수 있다.

지금까지 만성 C형 감염 환자에 대한 인터페론과 리바비린의 병합요법이 시작된 후 인터페론의 단독치료에 비해 치료성적이 향상되었지만 HCV 1b 형에 대한 치료효율은 여전히 낮은 상태이다. 최근 인터페론의 반감기를 향상시킨 페그인터페론(PEG-IFN)이 출시되면서 페그인터페론과 리바비린의 병합요법이 이용되어 좋은 치료효과를 보여주고 있지만 몇 가지 문

제점이 제시되고 있다. 즉 약제의 반감기가 길어지면서 치료효과가 좋아지기는 했지만 새로운 약제 사용으로 인한 가격 상승, 주사제이므로 사용이 편리하지 않은 점, 부작용이 개선되지 않은 점 등이 그것이다. 아직도 치료에 대해서 반응이 없는 환자가 45% 내외로 높고⁷⁶ 이들에 대한 효과적인 치료법이 없다는 점이 문제점으로 제시되고 있다. 결국 효과적인 치료제 및 치료법의 등장이 절실히 요구되고 있다. 치료효율의 향상을 위한 한 방법으로 치료 가능한 예측인자들을 비교하여 치료 전에 치료의 가능성을 확인할 수 있는 방법을 제시할 수 있다면 경제적 사회적으로 많은 도움이 될 것이다.

본 연구에서는 50명의 치료자를 대상으로 각각의 치료예측인자와 치료효과의 연관성을 비교해 보았다. 그리하여 1b형 만성 C형 간염환자에서 인터페론과 리바비린 병합요법의 치료효율을 향상시킬 수 있는 예측인자들의 확인을 통해서 치료대상자를 선별할 수 있는 방법을 찾아내고자 했다. 연구결과 환자의 나이, 치료 전 HCV RNA titer, ISDR type은 각각 독립적으로 예측인자로서의 가능성을 확인 하였지만, 실제 임상에 적용하기 위해서는 3가지 예측인자들의 종합적인 연관성 여부가 통계적으로 확인되어야 할 것이다. 이를 위해서는 좀더 큰 집단에서의 연구가 이루어져야 할 필요가 있으며, 치료 지침이 될 수 있는 기준이 확립되어야 할 것이다. 본 연구결과는 HCV 1b형 만성 C형 간염환자에서 인터페론과 리바비린 병합요법의 치료효율을 향상시킬 수 있는 예측인자들의 확인을 통해서 치료대상자의 선별에 유용한 참고자료로 활용될 수 있으리라 사료된다.

V. 결 론

HCV 1b형 만성 C형 간염 환자들을 대상으로 인터페론과 리바비린을 6개월 동안 병용 투여한 후 치료효과를 얻은 군과 치료효과를 얻지 못한 군의 혈청을 대상으로 HCV RNA의 PePHD와 ISDR 부위의 염기서열을 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 환자의 나이, 치료 전 HCV RNA titer, ISDR type은 HCV 1b형 만성 C형 간염에서 인터페론과 리바비린 병합요법 치료효과의 예측인자로 이용될 수 있다.
2. HCV E2의 PePHD 부위 아미노산 변이는 치료효과를 얻은 A 군에서 총 8 명의 환자에서 1~2개의 변이가 발견되었으며, 치료효과를 얻지 못한 B 군에서는 아미노산 변이가 확인되지 않았으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.
3. 인터페론과 리바비린 병합요법 치료효과에 대한 예측인자로서 환자의 나이, 치료 전 HCV RNA titer를 고려하여 볼 때 mutant ISDR type의 odds ratio는 8.10 이었고, 95 % confidence interval은 1.05~62.61로 확인 되었다.

이상의 결과들로부터 HCV 1b형 만성 C형 간염환자에 대하여 인터페론과 리바비린 병합요법의 치료효과에 대한 예측인자들은 환자의 나이, 치료 전 HCV RNA titer, ISDR type 이 사용될 수 있음을 확인 할 수 있었다. 치료효과를 얻은 실험 군에서 환자의 나이가 치료효과를 얻지 못한 실험 군에 비해 낮게 나타났으며, 병합 치료 전 HCV RNA titer도 치료효과를

연구는 실험 군에서 낮게 나타났다. ISDR type에 따라서 환자들의 치료효과를 구분하여 볼 때, mutant type에서 병합요법에 의한 치료가능성이 높게 나타남을 알 수 있다. 특히 예측인자로 확인된 환자의 나이와 치료 전 HCV RNA titer를 고려하여 ISDR type과 치료 가능성을 비교해 볼 때 mutant type에서 인터페론과 리바비린 병합요법에 의한 치료 가능성은 wild type에 비해서 8.1 배로 확인되었다.

참 고 문 헌

1. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
2. Takahashi M, Yamada G, Miyamoto R, Doi T, Endo H, and Tsuji T. Natural course of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1993;88:240-243.
3. Lauer GM and Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41-52.
4. Kim BS and Park YM. Prevalence of hepatitis c virus related to liver diseases in Korea. *Gastroenterologia Japonica* 1993;28:17-22.
5. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999;341:556-562.
6. Lai MY, Kao JH, Yang PM, Wang JT, Chen PJ, Chan KW, et al. Long-term efficacy of ribavirin plus interferon alfa in the treatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1996;111:1307-1312.
7. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C.

- Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339:1485–1492.
8. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998;352:1426–1432.
 9. Martinot–Peignoux M, Marcellin P, Pouteau M, Castelnau C, Boyer N, Poliquin M, et al. Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995;22:1050–1056.
 10. Chang YJ and Byun KS. Treatment of chronic hepatitis C. *Korean J Gastroenterol* 2004;44:301–307.
 11. Khorsi H, Castelain S, Wyseur A, Izopet J, Canva V, Rombout A, et al. Mutations of hepatitis C virus 1b NS5A 2209–2248 amino acid sequence do not predict the response to recombinant interferon–alfa therapy in French patients. *J Hepatol* 1997;27:72–77.
 12. Squadrito G, Orlando ME, Cacciola I, Rumi MG, Artini M, Picciotto A, et al. Long–term response to interferon alpha is unrelated to 'interferon sensitivity determining region' variability in patients with chronic hepatitis C virus–1b infection. *J Hepatol* 1999;30:1023–1027.

13. Chung RT, Monto A, Dienstag JL, and Kaplan LM. Mutations in the NS5A region do not predict interferon-responsiveness in American patients infected with genotype 1b hepatitis C virus. *J Med Virol* 1999;58:353–358.
14. Davis GL. Prediction of response to interferon treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1994;21:1–3.
15. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996;334:77–81.
16. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995;96:224–230.
17. Gale M, Jr., Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, et al. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 1998;18:5208–5218.
18. Gale M, Jr., Kwieciszewski B, Dossett M, Nakao H, and Katze MG. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol* 1999;73:6506–6516.
19. Kurosaki M, Enomoto N, Murakami T, Sakuma I, Asahina Y, Yamamoto C, et al. Analysis of genotypes and amino acid

- residues 2209 to 2248 of the NS5A region of hepatitis C virus in relation to the response to interferon-beta therapy. *Hepatology* 1997;25:750-753.
20. Komatsu H, Fujisawa T, Inui A, Miyagawa Y, and Onoue M. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon therapy in young patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *J Med Virol* 1997;53:361-365.
 21. Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Okamoto K, Hashimoto M, Miyano Y, et al. Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1997;25:745-749.
 22. Major ME and Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;25:1527-1538.
 23. Forns X and Bukh J. The molecular biology of hepatitis C virus. Genotypes and quasispecies. *Clin Liver Dis* 1999;3:693-716, vii.
 24. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, and Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-110.
 25. Taylor DR, Tian B, Romano PR, Hinnebusch AG, Lai MM, and Mathews MB. Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation sites in the RNA-binding domain. *J Virol* 2001;75:1265-1273.
 26. Abid K, Quadri R, and Negro F. Hepatitis C virus, the E2

- envelope protein, and alpha-interferon resistance. *Science* 2000;287:1555.
27. Berg T, Mas Marques A, Hohne M, Wiedenmann B, Hopf U, and Schreier E. Mutations in the E2-PePHD and NS5A region of hepatitis C virus type 1 and the dynamics of hepatitis C viremia decline during interferon alfa treatment. *Hepatology* 2000;32:1386-1395.
 28. Polyak SJ, Nousbaum JB, Larson AM, Cotler S, Carithers RL, Jr., and Gretch DR. The protein kinase-interacting domain in the hepatitis C virus envelope glycoprotein-2 gene is highly conserved in genotype 1-infected patients treated with interferon. *J Infect Dis* 2000;182:397-404.
 29. Sarrazin C, Kornetzky I, Ruster B, Lee JH, Kronenberger B, Bruch K, et al. Mutations within the E2 and NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 3a and correlation with treatment response. *Hepatology* 2000;31:1360-1370.
 30. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Jr., Ikeda M, Lemon SM, et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003;300:1145-1148.
 31. Cotler SJ, Wartelle CF, Larson AM, Gretch DR, Jensen DM, and Carithers RL, Jr. Pretreatment symptoms and dosing regimen predict side-effects of interferon therapy for hepatitis C. *J Viral Hepat* 2000;7:211-217.
 32. Haeuber D. Recent advances in the management of biotherapy-related side effects: flu-like syndrome. *Oncol Nurs Forum* 1989;16:35-41.

33. Chutaputti A. Adverse effects and other safety aspects of the hepatitis C antivirals. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15 Suppl:E156–163.
34. Van der Poel CL, Cuypers HT, Reesink HW, Weiner AJ, Quan S, Di Nello R, et al. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four–antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 1991;337:317–319.
35. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Amplification of DNA generated by reverse transcription of mRNA. In: Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T eds. *Molecular Cloning, A laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory; 1989a. p.4.20–14.21.
36. Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type–specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 1992;73(Pt3):673–679.
37. Choo SH, So HS, Cho JM, and Ryu WS. Association of hepatitis C virus particles with immunoglobulin: a mechanism for persistent infection. *J Gen Virol* 1995;76(Pt 9):2337–2341.
38. Villarejos VM, Visona KA, Eduarte CA, Provost PJ, and Hilleman MR. Evidence for viral hepatitis other than type A or type B among persons in Costa Rica. *N Engl J Med* 1975;293:1350–1352.
39. Jeffers LJ, Hasan F, De Medina M, Reddy R, Parker T, Silva M, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus among patients with cryptogenic chronic hepatitis and cirrhosis.

- Hepatology 1992;15:187-190.
40. Uchida T, Shimojima M, Gotoh K, Shikata T, Tanaka E, and Kiyosawa K. "Silent" hepatitis B virus mutants are responsible for non-A, non-B, non-C, non-D, non-E hepatitis. *Microbiol Immunol* 1994;38:281-285.
 41. Uchida T, Shimojima S, Gotoh K, Shikata T, and Mima S. Pathology of livers infected with "silent" hepatitis B virus mutant. *Liver* 1994;14:251-256.
 42. Linnen J, Wages J, Jr., Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996;271:505-508.
 43. Alberti A, Chemello L, Cavalletto D, Tagger A, Dal Canton A, Bizzaro N, et al. Antibody to hepatitis C virus and liver disease in volunteer blood donors. *Ann Intern Med* 1991;114:1010-1012.
 44. Esteban JI, Lopez-Talavera JC, Genesca J, Madoz P, Viladomiu L, Muniz E, et al. High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 1991;115:443-449.
 45. Davis GL, Balart LA, Schiff ER, Lindsay K, Bodenheimer HC, Jr., Perrillo RP, et al. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. A multicenter randomized, controlled trial. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1989;321:1501-1506.
 46. Hofgartner WT, Polyak SJ, Sullivan DG, Carithers RL, Jr., and

- Gretch DR. Mutations in the NS5A gene of hepatitis C virus in North American patients infected with HCV genotype 1a or 1b. *J Med Virol* 1997;53:118–126.
47. Poynard T, Leroy V, Cohard M, Thevenot T, Mathurin P, Opolon P, et al. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose and duration. *Hepatology* 1996;24:778–789.
 48. Lee DS, Sung YC, and Whang YS. Distribution of HCV genotypes among blood donors, patients with chronic liver disease, hepatocellular carcinoma, and patients on maintenance hemodialysis in Korea. *J Med Virol* 1996;49:55–60.
 49. Yeh BI, Kim HW, Kim HS, Lee JY, Lee KH, Lee KM, et al. The prediction of interferon-alpha therapeutic effect by sequence variation of the HCV hypervariable region 1. *Yonsei Med J* 1999;40:430–438.
 50. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *Journal of Clinical Investigation* 1995;96:224–230.
 51. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *New England Journal of Medicine* 1996;334:77–81.

52. Squadrito G, Leone F, Sartori M, Nalpas B, Berthelot P, Raimondo G, et al. Mutations in the nonstructural 5A region of hepatitis C virus and response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Gastroenterology* 1997;113:567–572.
53. Zeuzem S, Lee JH, and Roth WK. Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa. *Hepatology* 1997;25:740–744.
54. Odeberg J, Yun Z, Sonnerborg A, Weiland O, and Lundeberg J. Variation in the hepatitis C virus NS5a region in relation to hypervariable region 1 heterogeneity during interferon treatment. *J Med Virol* 1998;56:33–38.
55. McKechnie VM, Mills PR, and McCrudden EA. The NS5a gene of hepatitis C virus in patients treated with interferon- α . *J Med Virol* 2000;60:367–378.
56. Pawlotsky JM, Germanidis G, Neumann AU, Pellerin M, Frainais PO, and Dhumeaux D. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* 1998;72:2795–2805.
57. Saiz JC, Lopez-Labrador FX, Ampurdanes S, Dopazo J, Fornis X, Sanchez-Tapias JM, et al. The prognostic relevance of the nonstructural 5A gene interferon sensitivity determining region is different in infections with genotype 1b and 3a isolates of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 1998;177:839–847.
58. Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, et al. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients

- chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999;30:1004–1013.
59. Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Ruster B, Kronenberger B, Roth WK, et al. Mutations in the protein kinase-binding domain of the NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 1a are associated with treatment response. *J Infect Dis* 2000;181:432–441.
 60. Witherell GW and Beineke P. Statistical analysis of combined substitutions in nonstructural 5A region of hepatitis C virus and interferon response. *J Med Virol* 2001;63:8–16.
 61. Chayama K, Suzuki F, Tsubota A, Kobayashi M, Arase Y, Saitoh S, et al. Association of amino acid sequence in the PKR-eIF2 phosphorylation homology domain and response to interferon therapy. *Hepatology* 2000;32:1138–1144.
 62. Saito T, Ito T, Ishiko H, Yonaha M, Morikawa K, Miyokawa A, et al. Sequence analysis of PePHD within HCV E2 region and correlation with resistance of interferon therapy in Japanese patients infected with HCV genotypes 2a and 2b. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1377–1383.
 63. Watanabe H, Nagayama K, Enomoto N, Itakura J, Tanabe Y, Sato C, et al. Amino acid substitutions in PKR-eIF2 phosphorylation homology domain (PePHD) of hepatitis C virus E2 protein in genotype 2a/2b and 1b in Japan and interferon efficacy. *Hepatol Res* 2003;26:268–274.
 64. Berg T, Marques AM, Hohne M, Wiedenmann B, Hopf U, and Schreier E. Mutations in the E2-PePHD and NS5A region of

- hepatitis C virus type 1 and the dynamics of hepatitis C viremia decline during interferon alfa treatment. *Hepatology* 2000;32:1386–1395.
65. Polyak SJ, Nousbaum JB, Larson AM, Cotler S, Carithers R.L, Jr., and Gretch DR. The protein kinase–interacting domain in the hepatitis C virus envelope glycoprotein–2 gene is highly conserved in genotype 1–infected patients treated with interferon. *J Infect Dis* 2000;182:397–404.
 66. Sarrazin C, Kornetzky I, Ruster B, Lee JH, Kronenberger B, Bruch K, et al. Mutations within the E2 and NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 3a and correlation with treatment response. *Hepatology* 2000;31:1360–1370.
 67. Bae SH, Park YM, Yoo DG, Choi JY, Byun BH, Yang JM, et al. Mutations of hepatitis C virus 1b NS5A 2209–2248 amino acid sequence is not a predictive factor for response to interferon–alpha therapy and development of hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci* 2000;15:53–58.
 68. Yeh BI, Han KH, Lee HW, Sohn JH, Ryu WS, Yoon DJ, et al. Factors predictive of response to interferon–alpha therapy in hepatitis C virus type 1b infection. *J Med Virol* 2002;66:481–487.
 69. Nakano I, Fukuda Y, Katano Y, Nakano S, Kumada T, and Hayakawa T. Why is the interferon sensitivity–determining region (ISDR) system useful in Japan? *J Hepatol* 1999;30:1014–1022.
 70. Hung CH, Lee CM, Lu SN, Lee JF, Wang JH, Tung HD, et al.

Mutations in the NS5A and E2–PePHD region of hepatitis C virus type 1b and correlation with the response to combination therapy with interferon and ribavirin. *J Viral Hepat* 2003;10:87–94.

71. Gale MJ, Jr., Korth MJ, and Katze MG. Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol* 1998;10:157–162.
72. Paterson M, Laxton CD, Thomas HC, Ackrill AM, and Foster GR. Hepatitis C virus NS5A protein inhibits interferon antiviral activity, but the effects do not correlate with clinical response. *Gastroenterology* 1999;117:1187–1197.
73. Polyak SJ, Paschal DM, McArdle S, Gale MJ, Jr., Moradpour D, and Gretch DR. Characterization of the effects of hepatitis C virus nonstructural 5A protein expression in human cell lines and on interferon-sensitive virus replication. *Hepatology* 1999;29:1262–1271.
74. Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, et al. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095–6106.
75. Mihm U, Herrmann E, Sarrazin U, von Wagner M, Kronenberger B, Zeuzem S, et al. Association of serum interleukin-8 with virologic response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2004;40:845–852.

76. Hadziyannis SJ, Sette H, Jr., Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon- α 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-355.

Abstract

The relationship between ISDR sequences and interferon–ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C patients

Joonho Yoon

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Byung–Il Yeh)

Interferon- α (IFN- α) and ribavirin combination therapy is a treatment currently available for chronic hepatitis C virus (HCV), but is not so effective for a number of patients. In addition, this treatment is so costly and provokes many side-effects. Therefore, it's very important to distinguish those patients for whom the combination therapy would be effective before beginning the treatment.

One of the Japanese scientists found a small region of the nonstructural protein 5A (NS5A) gene product of HCV is correlated with the IFN responsiveness and named this sequence interferon sensitivity determining region (ISDR). Many researchers reported similar results, while other studies concluded this correlation meaningless.

This study was performed to confirm such a correlation in Korean patients with chronic hepatitis C virus type 1b and to find the

predictive factors for interferon- α and ribavirin combination therapy.

The patients are grouped by effectiveness of this therapy. Group A consists of completely responded patients for chronic hepatitis and group B no-responded patients. This study focused on clinical findings and ISDR sequences, and we found age, HCV RNA titer before treatment and ISDR type may be used as predictive factors for interferon- α and ribavirin combination therapy. After adjustment of age and HCV RNA titer before treatment, the ISDR sequence may be a more potent predictive factor. If these factors are used to predict the effectiveness of interferon- α and ribavirin combination therapy, it would be very helpful for patients.

Key words: hepatitis c virus, interferon- α , ribavirin, interferon sensitivity determining region (ISDR), predictive factor