

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
（総括・分担）研究報告書

インターフェロン(IFN)レセプター発現と IFN の抗ウイルス効果に関する研究

分担研究者 小林 健一 金沢大学医学部第1内科

研究要旨

我々は今までにC型慢性肝炎に対するインターフェロン（以下IFN）治療効果規定因子の一つとして、IFNレセプター量の関与を報告してきた。今回このIFNレセプターの発現量をより簡便に、また、より定量的に計測できるreal-time PCR法を確立し、末梢血単核球中IFNレセプター発現とIFN治療効果との関連を検討した。

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対するインターフェロン（以下IFN）治療効果規定因子の一つとして、近年IFN $\alpha/\beta$ レセプター量の関与が報告されている。これまで我々は、C型慢性肝炎に対するIFN治療によりトランスアミナーゼ値が正常化し、IFN投与終了6ヶ月後までトランスアミナーゼ値正常が持続するIFN治療著効群では、無効群に比し、治療前肝生検組織中IFN $\alpha/\beta$ レセプターmRNA発現量が有意に高値であることを報告してきた。今回、患者由来ヒト末梢血単核球（以下PBMC）中IFNレセプター発現とIFN治療効果との関連を検討した。

B. 研究方法

対象は肝生検を施行し、その後IFN治療を行ったC型慢性肝炎5例。IFN投与前、1時間、2時間、6時間、24時間、48時間、1週間、2週間、4週間、6週間、投与終了時にPBMCを採取し、IFNレセプターのサブユニットであるIFN $\alpha$ レセプター、IFN $\alpha/\beta$ レセプターのmRNAをreal-time PCR法を用いて定量した。

また、それぞれの症例に対し、採取血液中の末梢血単核球を本検討に供することを説明し同意を得た。

C. 研究結果

IFN治療著効群では、投与前IFN $\alpha$ レセプター、IFN $\alpha/\beta$ レセプターmRNA発現量が無効群に比し、高値である傾向を示した。一方IFN投与中および投与終了時におけるIFNレセプター発現量には相関が認められなかった。また、HCV RNA量、genotype等のIFN治療効果との関与が知られているウイルス側因子とIFNレセプター発現量とも関連は認められなかった。

D. 考察

我々の研究ではIFN治療著効群では、投与前IFNレセプターmRNA発現量が無効群に比し、高値である傾向を示した。このことはPBMCでのIFNレセプター発現量が、IFN治療効果に関与する宿主側因子の1つである可能性を示唆している。IFNは細胞膜上の特異的レセプターに結合し、細胞内情報伝達を介して、その抗ウイルス効果を発揮する。PBMCにおけるIFNレセプター発現量がC型慢性肝炎におけるサイトカインネットワークに影響を及ぼして、IFN治療効果に関与するのかもしれない。

E. 結論

PBMCでのIFNレセプター発現量が、IFN治療効果予測因子になりうるか、今後さらに多数例での研究が必要と考えられた。

肝癌切除症例における癌部と非癌部のミトコンドリア DNA における  
塩基変異に関する研究

分担研究者 大阪市立大学第三内科 西口修平

**研究要旨** 肝癌におけるミトコンドリア DNA の塩基変異の有無を検討し、非癌部と比較した。この結果、肝癌では多数の塩基変異が生じており、組織型が悪性度を増すにつれ変異数が増加していることが判明した。個々の症例における塩基変異数に関して非癌部と癌部との密接な相関関係が認められ、発癌に至るまでの過程でミトコンドリア DNA の異常が蓄積されていることが推定された。

**A. 研究目的**

発癌課程における遺伝子異常の検索は染色体を中心に検討されており、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常の蓄積が発癌のメカニズムであると考えられている。近年、この説の提案者である Vogelstein らは大腸癌におけるミトコンドリア DNA の塩基変異を検討し、非癌部に比し癌部に数個の塩基変異を認め、癌化の過程にミトコンドリア DNA の異常が reactive oxygen species (ROS) の増加を介して関与するのではないかという考え方を示した。ミトコンドリア DNA は染色体 DNA と異なり、ヒストンなどの防御蛋白を有さず ROS の攻撃に直接さらされており、また変異遺伝子の十分な修復システムも持たない。このため、慢性の炎症の後に発癌する肝癌においてはミトコンドリア DNA の異常が集積している可能性が考えられる。今回、外科での切除肝組織を用いて癌部と非癌部のミトコンドリア DNA の変異について検討した。

**B. 研究方法**

大阪市立大学第二外科にて外科切除した肝癌 78 例の肝組織を用いて検討を行った。正常肝 7 例は、大腸癌肝転移、肝内結石の非病変部を採取し、肝癌症例 71 例については癌部と非癌部のそれ

それから肝組織を採取した。なお、これらの対象者には事前に研究目的と内容について説明を行い、同意を得た。研究の遂行にあたってはヘルシンキ宣言を遵守した。ミトコンドリア DNA の塩基配列は、特異的な primer を設定し PCR を行い、ABI sequencer を用いて direct sequence 法にて PCR 産物の塩基配列を決定した。一部の症例においては、ミトコンドリア DNA の全配列を決定したが、他の症例についてはその際最も塩基変異の集積していた D-loop 領域のみを検討した。

**C. 研究結果**

ミトコンドリア DNA の全配列を決定した。その結果、肝癌では非常に多数の塩基変異が蓄積していた（各症例において 60-70 ケ所）[図 1]。これらの塩基変異の大部分は、非癌部でも多くは共通した変異が存在した（図の\*または\$印は共通した塩基変異箇所）。最も塩基変異の集積していた D-loop 領域のみを検討し、各症例を比較したところ、肝癌の組織型が悪性度を増すにつれ変異数が増加していることが判明した [図 2]。さらに、個々の症例における塩基変異数に関して、非癌部と癌部との密接な相関関係が認められ、発癌まで

の過程でミトコンドリア DNA の異常が蓄積していることが推定された。

#### D. 考察

今回の検討で、炎症を発生母地とする肝癌では、癌部および非癌部において非常に多数のミトコンドリア DNA 変異が蓄積していることが判明した。肝発癌には肝炎ウイルスの持続感染が深く関連すると考えられているが、これらのウイルスの存在だけでは発癌に至らず、慢性炎症が存在して初めて発癌のスイッチが入るとというのが現在の定説となっている。

肝臓における高癌化状態の特徴は、持続する炎症による活性酸素種が直接および間接的に DNA を傷害して肝細胞の壊死・再生の繰り返し（長期に持続する不規則再生）が起こっていることである。本現象により慢性的に変異が誘発され、長い発癌過程のなかで critical な DNA が傷害されて発癌に至るものと考えられているが、今回明らかとなったミトコンドリア DNA 変異が、これらの仮説を裏付ける重要な一因になると認識している。

#### E. 結論

肝癌において、癌部に多数のミトコンドリアの DNA 変異を認め、その多くは非癌部にも存在した。本変異が肝発癌の原因であるか、あるいは結果であるのかは現段階では推測の域を出ない。さらなる検討により、本変異の基礎医学的および臨床医学的意義を確立することが必要である。

#### F. 研究発表

論文発表

(1) Nishikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S et al. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in

individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* in press.

(2) Nishikawa M, Sato E, Kashiba M et al. Macrophage-derived nitric oxide induces apoptosis of rat hepatoma cells *in vivo*. *Hepatology* 28, 1474-1480, 1998

(3) Nishikawa M, Sato E, Utsumi K et al. Oxygen-dependent regulation of energy metabolism in ascites tumor cells by nitric oxide. *Cancer Res.* 56, 4535-4540, 1996

图 1

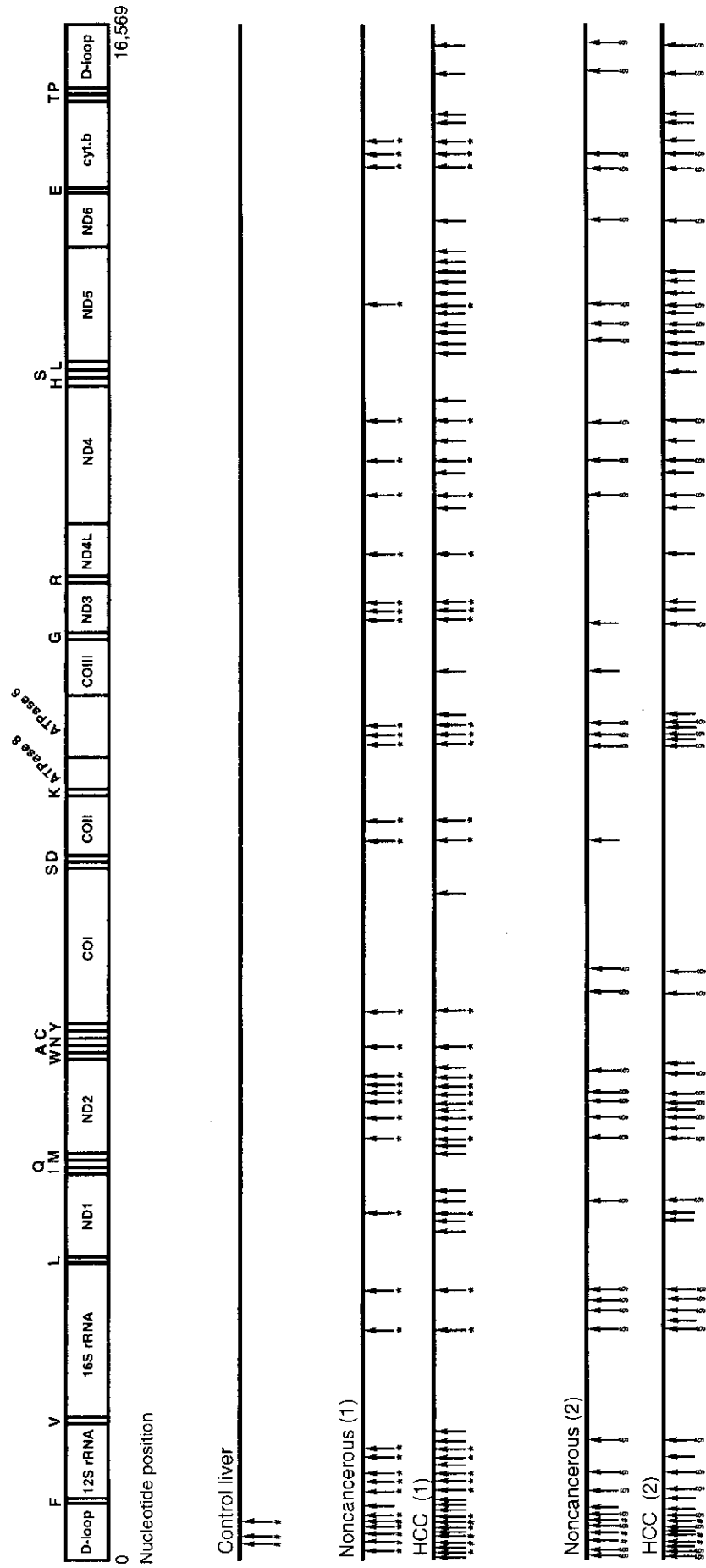
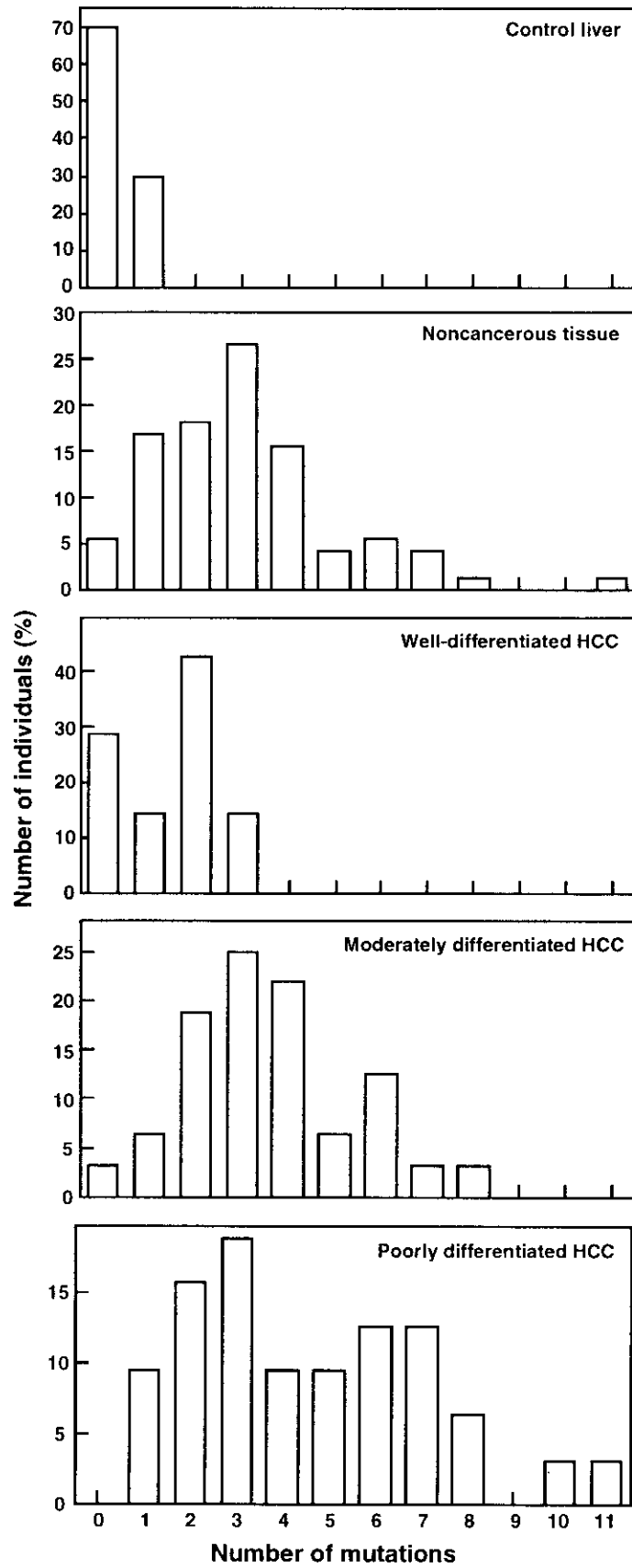


Figure 2



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

ミトコンドリア DNA 塩基変異に対する IFN 投与の影響に関する研究

分担研究者 大阪市立大学第三内科 西口修平

**研究要旨** 我々は既に、肝癌において、癌部に多数のミトコンドリア DNA 塩基変異が存在し、その多くは非癌部の肝組織にも共通していることを明らかにした。今回、IFN 治療した C 型慢性肝炎の IFN 投与前後の肝組織におけるミトコンドリア DNA 変異を検索した。その結果、肝癌を有さない純然たる慢性肝炎の肝組織においても、すでに多数のミトコンドリア DNA 塩基変異が生じていること、さらに IFN 投与によりこれらの変異が減少することが判明した。

**A. 研究目的**

我々は、既に、肝癌では多数のミトコンドリア DNA 塩基変異が生じており、組織型が悪性度を増すにつれ変異数が増加することを明らかにしてきた<sup>1</sup>。さらに、個々の症例における塩基変異数は、非癌部は癌部と良好な相関関係が認められ、発癌までの過程において非癌部においてもミトコンドリア DNA の異常が蓄積していることが推定された。

今回、肝発癌過程におけるミトコンドリア DNA 塩基変異を解析するため、慢性肝炎 27 例の肝ミトコンドリア DNA 変異を解析した。さらに本変異に対するインターフェロン(IFN)投与の影響を解析した。

**B. 研究方法**

大阪市立総合医療センターにて IFN- $\beta$  の投与前と投与直後（2 ヶ月後）に 2 回の経皮的肝生検を実施した慢性肝炎 27 例を対象とした。これらの対象者には事前に研究目的と内容について説明を行い、同意を得た。研究の遂行にあたってはヘルシンキ宣言を遵守した。ミトコンドリア DNA の塩基配列は、特異的な primer を設定して PCR を行い、ABI sequencer を用いて direct sequence 法にて PCR 産物の塩基配列を決定した。一部の症例においては、ミ

トコンドリア DNA の全配列を決定したが、他の症例についてはその際最も塩基変異の集積していた D-loop 領域のみを検討した。

**C. 研究結果**

慢性肝炎において、すでに多数のミトコンドリア DNA 変異が蓄積していることが判明した[図 1]。これらの塩基変異数は、既に解析している肝癌症例の非癌部に匹敵する変異数であり、肝癌発症のかなり前から、慢性炎症によってミトコンドリア DNA の異常が蓄積していることが明らかになった。さらに、IFN 投与により、投与前のミトコンドリア変異数が 3 以上（D-loop 領域）の症例では IFN によって変異数の減少が 14 例中 10 例に認められた。しかし、変異数が 2 以下の症例では 12 例中 3 例にのみ変異数の減少が生じた[図 2]。IFN による変異数の減少と後の IFN の治療効果とは関連性が認められなかった。

**D. 考察**

今回の検討で、慢性肝炎の時期において既に、ミトコンドリア DNA 変異が存在することが明らかとなった。ミトコンドリア DNA の変異は持続する炎症による DNA の不安定化（高癌化状態）を明確に表しているものと考えられる。

さらに、IFN 投与でミトコンドリア DNA 変異が改善することが判明した。しかし、IFN による塩基変異の改善は IFN 投与によるその後の HCV 消失や肝機能の改善の有無とは関係なく、投与前の組織において変異数の多い症例では無効例であっても減少していた。この結果は、IFN 投与歴のある肝癌症例の検討結果と一部乖離した。すなわち、IFN が著効もしくは肝機能が改善した症例では、その後数年経って発癌した際の非癌部のミトコンドリア変異数は癌部に比し減少しているが、IFN 無効例では癌部と非癌部に変異数の著しい差が認められなかった。さらに、IFN の有効例での術後再発は IFN を投与していない症例に比し低率であった<sup>2</sup>。これらの結果から、IFN 投与中はその後のウイルス学的な効果に関わりなく IFN はあまねくミトコンドリア DNA の変異を減少させるが、IFN 投与後肝障害が持続する症例では再び変異の蓄積が始まるものと推測された。今後、同一症例における検証が必要である。IFN によって肝発癌が抑制されることは周知の事実であるが<sup>3</sup>、個々の症例における肝発癌のリスクを評価する指標はなく、IFN によってどの程度リスクが減少したのかは個別には評価できない。ミトコンドリア DNA の変異数の臨床的な意義についてさらに、検討が必要である。

#### E. 結論

ミトコンドリア DNA 変異が肝発癌においてどのような役割を担っているのかは不明であるが、非常に密接に関連していることは事実である。IFN のミトコンドリア DNA に対する作用を細胞生物学・分子生物学的に裏付けることにより、より理論的かつ有効な IFN 治療を確立する必要がある。

#### F. 研究発表

#### 論文発表

1. Nishikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S et al. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2001 in press.
2. Kubo S., Nishiguchi S., Hirohashi K., et al. Influence of previous interferon therapy on recurrence after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* 2001; 92: 59-66.
3. Nishiguchi S., Shiomi S., Nakatani S., et al. Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic active hepatitis C and cirrhosis. *Lancet* 2001; 357: 196-197.

Figure 1. Number of mutation in D-loop

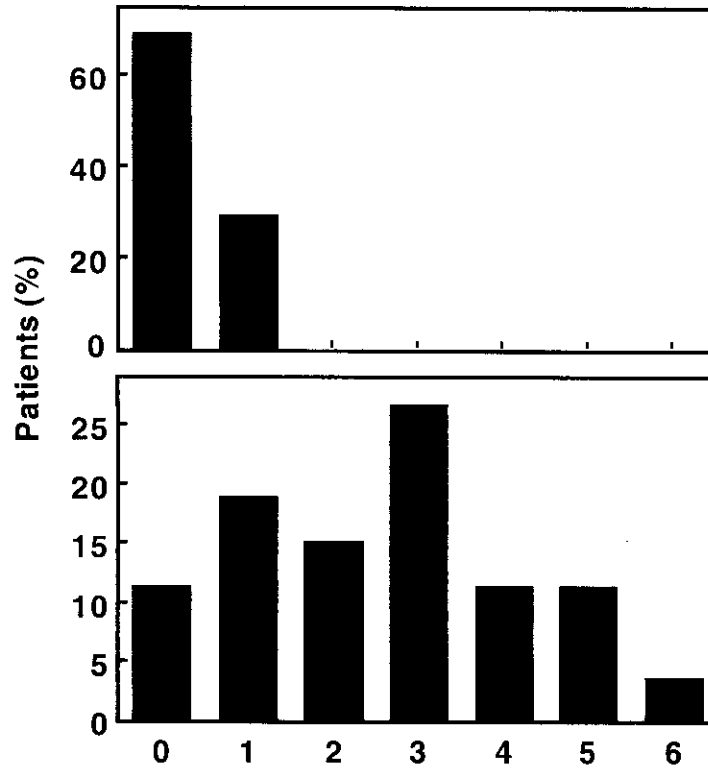
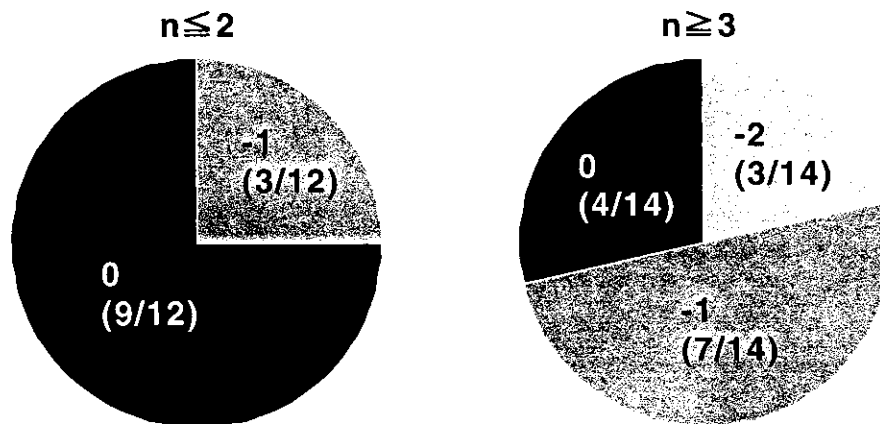


Figure 2. Changes in mtDNA mutations by IFN therapy

mtDNA mutation  
in pre-IFN therapy (n)





## HCV 粒子の血中存在様式、特に不完全ウイルス粒子の検討

分担研究者 清澤研道 信州大学医学部第二内科教授  
共同研究者 田中栄司 信州大学医学部第二内科講師

**研究要旨：** HCV 感染血清を蔗糖密度勾配で分画後 HCV RNA と HCV コア抗原を定量的に測定し、不完全ウイルス粒子の存在を検討した。HCV RNA と HCV コア抗原はそれぞれ低比重と高比重の分画に 2 つのピークを作り分布した。低比重分画は HCV RNA とコア抗原のピークはほぼ一致したが、高比重分画では HCV RNA に比べコア抗原はさらに高比重であった。HCV RNA を 5' UTR に加え NS1、NS3、NS5b のプライマーで測定したが、いずれのピークも全く一致した。HCV コア粒子を個々のコア抗原まで分解する前処理では RNA を含まないコア抗原分画が一番低比重の分画の移動した。これに対し、エンベロープを取る条件の前処理ではこのコア抗原のピークはさらに高比重となった。以上の成績より、HCV 感染者の血清中には HCV 遺伝子のみを欠損した不完全ウイルス粒子が存在することが予測される。この不完全ウイルス粒子の解析は、今後 HCV 感染症の病態解明に役立つこと考えられる。

### A. 研究目的

超遠心による密度勾配の解析では、HCV 粒子はいくつかの比重の分画に分かれて存在することが知られている。この現象は血清蛋白との結合で説明されている。すなわち、低比重の HCV 粒子 (<1.08g/ml) は low-density lipoproteins (LDL) と結合し、高比重の HCV 粒子 (>1.15g/ml) は免疫複合体を形成しているとされている。しかし、不完全ウイルス粒子の存在を示唆する報告もみられている。今回、この不完全ウイルス粒子の存在を証明するため、HCV 感染血清を蔗糖密度勾配で分画し、HCV RNA と HCV コア抗原を定量的に測定して検討した。

### B. 研究方法

C 型慢性肝炎 1 例の血清を超遠心による蔗糖密度勾配で分画した。HCV RNA は real time PCR 法にて、HCV コア抗原は第二世代の超高感度測定系を用いて定量した。血清検体の使用に際しては各患者より文書による同意を得た。

### C. 研究結果

蔗糖密度勾配で解析した結果を図 1 に示した。HCV RNA と HCV コア抗原はそれぞれ低比重と高比重の分画に 2 つのピークを作り分布した。低比重分画は HCV RNA とコア抗原のピークはほぼ一致したが、高比重分画では HCV RNA に比べコア抗原はさらに高比重であった。HCV RNA を 5' UTR に加え NS1、NS3、NS5b のプライマーで測定したが、いずれのピークも全く一致した。

高比重のコア抗原の分画を取り出し、前処理後再び蔗糖密度勾配にて分画した（図 2）。コア粒子を個々のコア抗原まで分解する前処理（assay pretreatment）ではコア抗原が一番低比重の分画の移動した。これに対し、エンベロープを取る条件の前処理（NP-40 treatment）ではコア抗原のピークはさらに高比重となった。

### D. 考案

蔗糖密度勾配による HCV 感染血清の分画では、HCV RNA の量に比してコア抗原量が明らかに多い高比重の分画が検出された。HCV 遺伝子の 4 つの領域のプライマーで HCV RNA を検出してもこの高比重コア抗原分画には HCV RNA は検出されず、

HCV 遺伝子を全く含まないことが予測される。さらに、高比重コア抗原分画を2種類の前処理で検討すると、コア抗原は粒子を形成しており、さらにエンベロープを被っていることが示唆された。以上の成績より、HCV 感染者の血清中には HCV 遺伝子のみを欠損した不完全ウイルス粒子 (図3) が存在することが予測される。

C 型肝炎の病態により HCV 粒子の血清中の存在様式が変化することが知られている。このため、今後、欠損ウイルスの解析は HCV 感染症の病態解明に役立つと考えられる。

### E. 結論

C 型肝炎の患者血清中には HCV の不完全ウイルス粒子が存在することが強く示唆された。この不完全ウイルス粒子の解析は HCV 感染症の病態解明の一助となると考えられる。

### F. 研究発表

1. Aoyagi K, Ohue C, Iida K, et al. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1802-1808.
2. Tanaka E, Ohue C, Aoyagi K, et al. Evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis C virus (HCV) core antigen with clinical sensitivity approximating that of genomic amplification of HCV RNA. *Hepatology* 2000;32: 388-393.

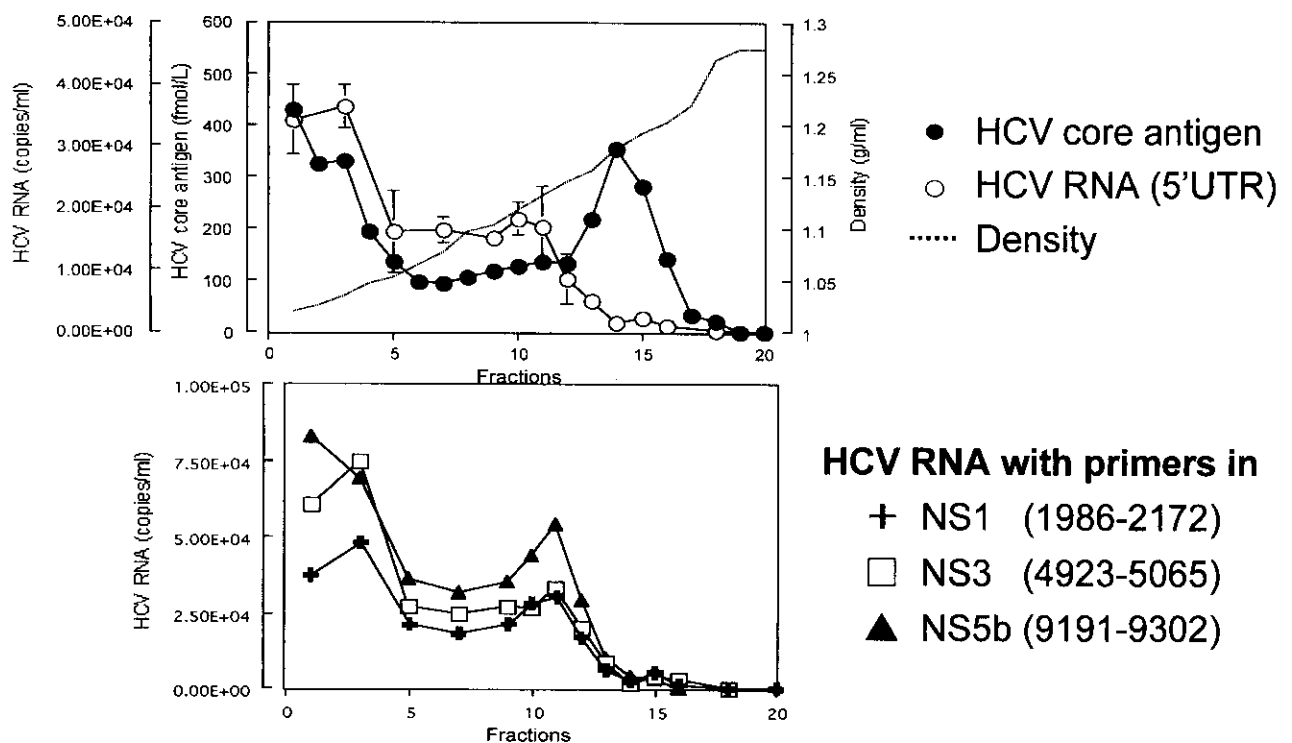


図1. HCV感染血清の蔗糖密度勾配による分画とHCV RNAおよびHCVコア蛋白の測定

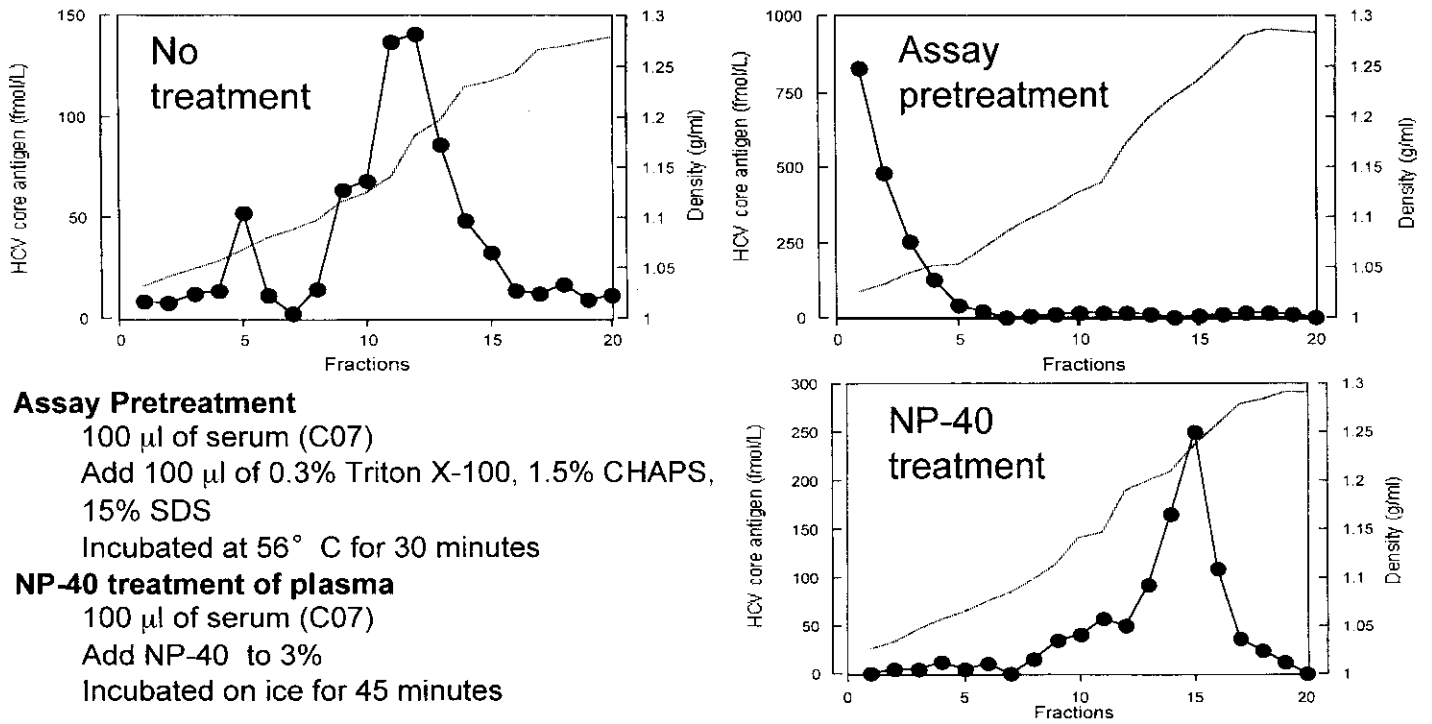
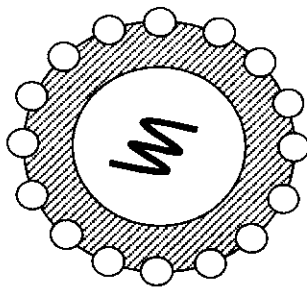
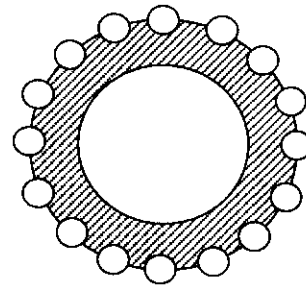


図2. 前処理によるHCVコア抗原分画（蔗糖密度勾配）の移動



完全ウイルス粒子



不完全ウイルス粒子

図3. 完全ウイルス粒子と不完全ウイルス粒子

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

肝組織中のC型肝炎ウイルスに関する研究

分担研究者 小林 健一 金沢大学医学部第1内科

研究要旨

肝組織中の顕微鏡レベルのC型肝炎ウイルス（HCV）の動態に関する詳細な検討はない。マイクロダイセクション法を用いて、肝組織小葉内の領域別にHCV量を検討した。小葉内におけるHCVの分布には、一定の傾向は認められなかった。

A. 研究目的

HCVには多様性(quasispecies)が存在し、インターフェロン療法の反応性にも関連があることが知られている。我々はこれまでに肝内の異なる部位においてもこの多様性が認められる事を確認し、線維化が進展した症例では多様性が大きくなることを明らかにしてきた。しかし従来の方法では肝組織サンプルをhomogenizeして、HCV RNAを抽出しているために、肝細胞以外の細胞成分の混入を回避できず、また肝組織サンプル内では炎症或いは線維化の程度が異なっているにも関わらず、これをまとめて組織内HCV RNAとして検討せざるを得なかった。最近、Laser capture microdissection 法が開発されたが、この方法では最小7.5  $\mu$ m径の範囲で組織を採取することが可能であり、肝組織においても、他の細胞成分を混入させずに、顕微鏡直視下に任意の肝細胞を切り出すことができる。今回この方法を利用して、HCVの動態を、肝組織中の小葉内の異なる領域毎に検討し、比較を試みた。

B. 研究方法

慢性C型肝炎8症例を対象とした。OCT compoundに包埋し-80度で保存した肝生検組織を、スライドガラスに薄切固定し、染色後、LCM200システムにて顕微鏡

直視下に、肝小葉内の門脈域周囲、中心静脈周囲、中間の部位毎にそれぞれ2から3カ所ずつ、1症例につき計8から9カ所、ある程度の面積を統一してlaserを照射し、異なる領域の肝細胞（約30個）を選択的に転写フィルムに採取した。その後、フィルム上に転写した細胞からRNAを抽出し、得られた抽出液を3等分し、うち2検体をそれぞれHCV RNA量およびGAPDH量をreal-time PCR法を用いて測定した。また、生検組織を使用するにあたっては、それぞれの症例に対し肝生検前に、採取肝組織を本検討に供することを説明し同意を得た。

C. 研究結果

GAPDH量は症例によって若干のばらつきはあるものの安定して測定可能であり、本系における組織採取やRNAの抽出過程には再現性があるものと考えられた。一方HCV-RNA量は症例によって異なり、採取した全標本において測定感度以上であった症例が2症例認められた一方で、全標本で感度以下であった症例も3症例認められた。また、GAPDH量が一定であってもHCV-RNA量は採取場所によってばらつきが認められた。しかし、HCV-RNA量の多寡と領域の間に一定の関連性は明らかではなかった。

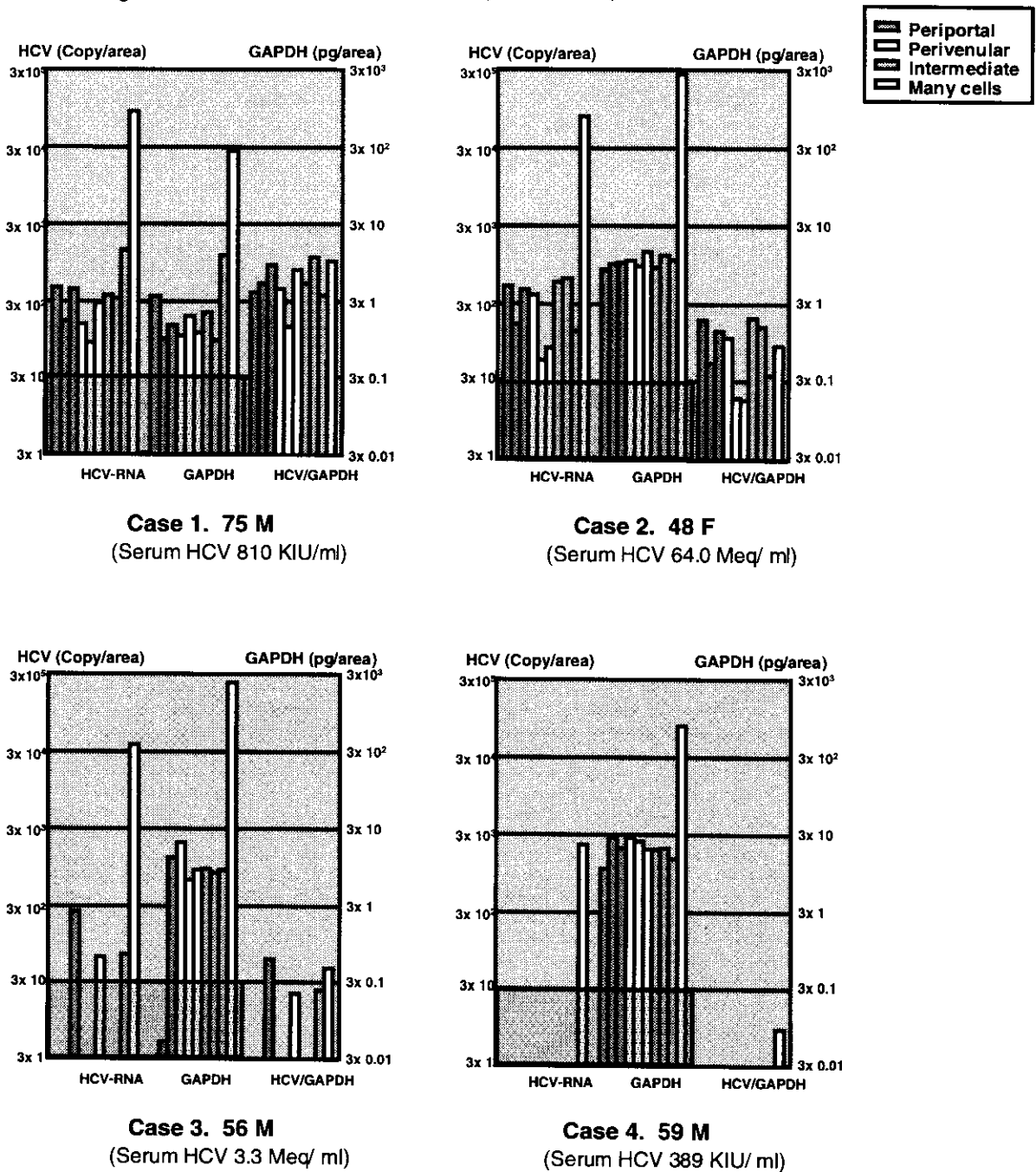
### D. 考察

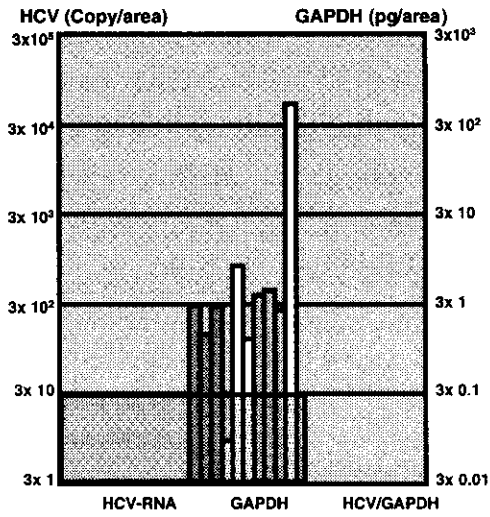
慢性C型肝炎8症例の検討では、小葉内の部位によるHCV-RNA量に一定の傾向は認められなかった。今回は、線維化の程度、炎症細胞浸潤の程度などに関しては未検討であり、今後の課題と思われる。

### E. 結論

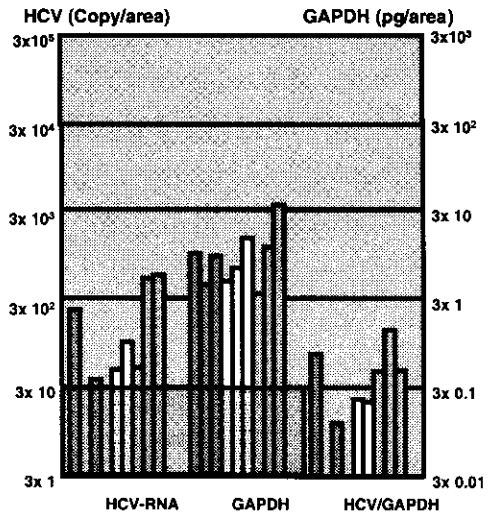
マイクロダイセクション法を用いて採取標本中に含まれるGAPDHやHCV-RNAの量を測定することが可能であった。今回の検討では、小葉内の部位によるHCV-RNA量にはばらつきはあるものの一定の傾向は認められなかった。

Fig 1. HCV-RNA and GAPDH in samples from eight cases

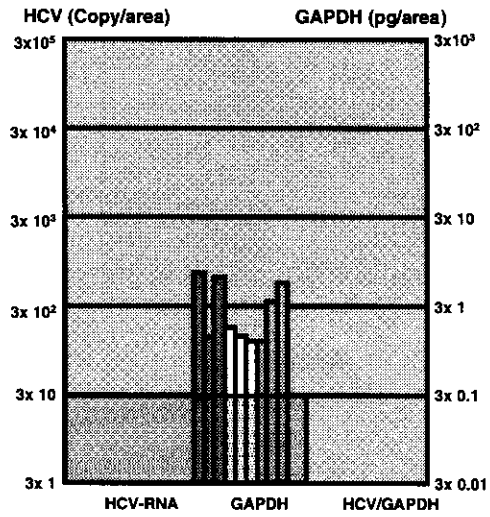




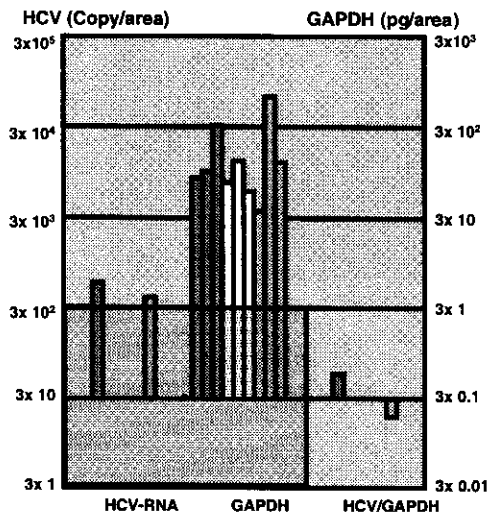
**Case 5. 50M**  
(Serum HCV 180 KIU/ ml)



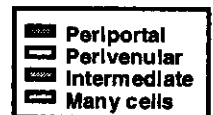
**Case 6. 68 F**  
(Serum HCV 4.5Meq/ ml)



**Case 7. 68 M**  
(Serum HCV not examined)



**Case 8. 35 M**  
(Serum HCV 12.0Meq/ ml)



分担研究報告書

C型肝炎ウイルス超可変領域におけるアミノ酸変異の拘束性

分担研究者 沖田 極 山口大学医学部第一内科教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の超可変領域（HVR）は中和抗体のエピトープを含有すると推定されているが、HCVに不可欠な領域か否かはいまだ明らかではない。そこで、genotype 1b型のC型慢性肝炎患者11名から得られた865クローン中互いに異なる169のアミノ酸配列のアミノ酸の変異パターンについて検討し、HVRのウイルス学的意義について検討した。HVRのアミノ酸変異数は部位によって明らかに異なっており、E2蛋白のN端から数えて2, 6, 7, 23, 24番目のアミノ酸は完全あるいは殆ど保たれ、かつ24番目を除いていずれも親水性残基のアミノ酸が占めていた。一方 1, 11, 18, 26, 27番目のアミノ酸変異数は様々であったが、親水性残基のアミノ酸が殆どを占めていた。これに対し、16, 19, 20番目のアミノ酸もアミノ酸変異数は様々であったが、その殆どが疎水性残基を有するアミノ酸で占められていた。HVRの予測二次構造はE2蛋白のN端から3～6番目まで、ならびに20番目あたりを中心とした数個のアミノ酸がbeta-strand構造を示し、その間はコイル構造を中心に一部にbeta-strand構造やhelical構造をとるものが殆どであった。これらの構造は経時的にもあまり変化せず、比較的保存されていると考えられた。以上より、HVRはHCVにとってウイルス学的に重要な役割を果たしているのではないかと推察された。

分担研究者 沖田 極  
山口大学医学部第一内科  
教授

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の超可変領域（HVR）はその名が示すごとく、HCVの遺伝子のなかで最もアミノ酸変異の著しい領域であるとともに、中和抗体のエピトープも含むと考えられ、それゆえHCVが液性免疫から逃避するのに重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、HCVに不可欠な領域か否かはいまだ明らかではない。一方でヨーロッパのグループよりHVRのアミノ酸変異は任意に起きているのではなく、一定の制約があることが報告されている。そこでHVRのウイルス学的意義を検討する目的で、C型慢性肝炎患者より経時的に得られた血清よりHVRのアミノ酸変異の拘束性の有無について検討した。

B. 研究方法

genotype 1b型のC型慢性肝炎患者11名（IFN治療群：4名、非治療群：7名）におけるHVRの遺伝子の多様性（quasispecies）を経時的に比較検討した際に得られた865クローンについて、そのアミノ酸の変異パターンについて検討した。さらにこのうち8名（IFN治療群：3名、非治療群：5名）についてはRobsonの方法で二次構造予測を行い、HVRの二次構造の保存性の有無についても検討した。

C. 研究結果

得られた865クローン中169の異なるアミノ酸配列を認めた。図1はこれら169の配列からみたHVRの各アミノ酸positionでのアミノ酸変異数と親水性残基、疎水性残基の占める割合を表したものである。HVRのアミノ酸変異数は部位によって明らかに異なっており、E2蛋白のN端から数えて2, 6, 7, 23, 24番目のアミノ酸は完全あるいは殆ど保たれ、かつ24番目を除いていずれも親水性残基のアミノ酸が占めていた。

一方 1, 11, 18, 26, 27番目のアミノ酸変異数は様々であったが、親水性残基のアミノ酸が殆どを占めていた。これに対し、16, 19, 20番目のアミノ酸もアミノ酸変異数は様々であったが、その殆どが疎水性残基を有するアミノ酸で占められていた。さらに、IFN非治療群からの125配列、IFN治療群44配列について同様の検討を行った(表1)。IFN治療群はHVR内の全てのpositionでのアミノ酸の変異率が非治療群にくらべて高かったが、IFN治療に関係なく1, 2, 6, 7, 11, 18, 23, 26, 27番目は親水性残基のアミノ酸により、16, 19, 20番目は疎水性残基を有するアミノ酸により占められていた。

HVRの二次構造はE2蛋白のN端から3~6番目まで、ならびに20番目あたりを中心とした数個のアミノ酸がbeta-strand構造を示し、その間はコイル構造を中心に一部にbeta-strand構造やhelical構造をとるものが殆どであった。これらの構造は経時的にもあまり変化せず、比較的良好に保存されていると考えられた。

#### D. 考察

HVR内のアミノ酸変異は部位によっては強く拘束され、殆ど完全に保存されているアミノ酸も存在した。さらに広い範囲にわたって、親水性、疎水性のprofileが決まっている部位が観察された。これらのHVR内におけるアミノ酸変異の拘束性を反映するかのよう、アミノ酸配列から予測された二次構造は経時的に多少の変化は認められるものの、比較的良好に保存されていた。

HVRはこれまで中和抗体のエピトープの一部と考えられ、その著しいアミノ酸変異が液性免疫からのエスケープを可能していると推察されていたが、その機能についてはこれまでのところあまり明らかにされていない。今回の検討からHVRは単に中和活性から逃れるおとりとしての働きだけでなく、HCVが増殖していくためには不可欠な領域ではないかと推察された。

#### E. 結論

C型肝炎ウイルスのHVRのアミノ酸変異には拘束性があり、その二次構造も比較的保存されていると推察された。

#### F. 参考文献

- 1) Smith DB. Evolution of the hypervariable region of hepatitis C virus. J Viral Hepat 1999 Suppl:41-6.
- 2) McAllister J, Casino C, Davidson F, et al. J Virol 1998;72:4893-905.

#### G. 研究発表

学会発表

第36回 日本肝臓学会総会  
平成12年6月8-9日、於 福岡

51st Annual Meeting of the American  
Association for the Study of Liver Diseases  
October 27-31, 2000 Dallas



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

C型肝炎ウイルス感染における末梢血単核球のアポトーシス異常に関する研究

分担研究者 小林 健一 金沢大学医学部第1内科

研究要旨

C型慢性肝疾患患者の末梢血単核球は、無血清培養下でアポトーシスの亢進を認めた。また、末梢血Tリンパ球は、単球との相互作用による間接的な機序によってアポトーシスが亢進した。末梢血単核球のアポトーシスの異常がC型慢性肝疾患の進展に関与する因子のひとつであると考えられた。

A. 研究目的

慢性ウイルス肝疾患における病態の進展、肝発癌に抗ウイルス、抗腫瘍免疫能の低下が関与することが示唆されるが、詳細な機序は明らかでない。最近、慢性ウイルス感染や担癌状態において直接的、間接的な機序によって末梢血単核球のアポトーシスが亢進することが報告されている。そこで、C型慢性肝疾患において、末梢血単核球分画の中でもこれらの免疫能に深く関与するTリンパ球と単球のアポトーシス感受性について検討した。

B. 研究方法

C型慢性肝疾患（慢性肝炎、肝硬変、肝癌）患者およびC型陰性対照者より得られた末梢血単核球を磁気ソーティングを用いてCD4 および CD8 陽性Tリンパ球、CD14 陽性単球分画に分離した。各細胞分画を単独または共培養し、各種刺激にて誘導されるアポトーシスの割合をフローサイトメトリーを用いて定量した。同時にアポトーシスに促進的なFasおよびTNF経路の関与について、中和抗体を用いて検討した。さらにアポトーシス抑制タンパクBcl-2の細胞質における発現を定量した。それぞれの症例に対し、採取血液中の末梢血単核球を本検討に供することを説明し同意を得た。

C. 研究結果

各細胞分画を単独に培養して直接的なアポトーシス感受性を検討すると、肝硬変、肝癌患者血球を無血清培養した場合にアポトーシスの亢進を認めた。この機序としてFas、TNFの関与はみられず、細胞質Bcl-2発現の低下が観察された。またTリンパ球分画を単球と共培養することによって誘導される間接的なアポトーシスの検討においては、C型肝疾患患者においてアポトーシスが亢進していた。この単球依存性アポトーシスの機序として、Fas、TNF経路が一部関与していることが示されたが、細胞間の接触によるその他の機序の関与も示唆された。

D. 考察

C型慢性肝疾患患者の末梢血Tリンパ球は、単球との相互作用による間接的な機序によってアポトーシスが亢進した。さらに肝硬変、肝癌患者においてはBcl-2発現の低下が直接的に末梢血単核球のアポトーシス感受性を亢進することによって、免疫能の低下に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

末梢血単核球のアポトーシスの異常がC型慢性肝疾患の進展に関与する因子のひとつであると考えられた。

非A非B肝炎の臨床的総合研究に関する研究

分担研究者 恩地森一 愛媛大学医学部第三内科 教授

研究要旨：昨年度、我々はHCVトランスジェニックマウスを用いて骨髄より単離した未成熟なDCにHCV遺伝子を発現させ、HCV発現によるDCの機能低下を報告した。さらにマウス骨髄より未成熟なDCを単離し、HCVを発現させ、DCの成熟に伴う影響について検討した。その結果、HCV発現によりDC表面のMHC class-I（とりわけH-2D）の発現が低下することを報告した。今年度は、さらにその発現低下の機序を探るため、DCの成熟に伴うH-2Dの細胞内局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。HCVが発現したDCでは、樹状細胞内のH-2D, lamp-2の局在に変化が見られ、DC内の蛋白輸送障害を引き起こしている可能性が考えられた。以上よりHCVがDCのMHC class-I蛋白発現を阻害し、抗原提示機能を障害している可能性が示唆された。

HCVによる樹状細胞抗原提示能異常の検討

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)による肝障害はHCV抗原に特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)により引き起こされることが報告されている(1)。CTLの活性化に樹状細胞(DC)は不可欠(2)であり、DCはC型肝炎の病態に重要な影響を及ぼしている可能性がある。昨年度、我々はHCVトランスジェニックマウス(3)を用いて骨髄より単離した未成熟なDCにHCV遺伝子を発現させ、HCV発現によるDCの機能変化を検討した。さらにマウス骨髄より未成熟なDCを単離し、HCVを発現させ、DCの成熟に伴う影響について検討した。その結果、HCV発現によりDC表面のMHC class-I（とりわけH-2D）の発現が低下することを報告した。今年度は、さらにその発現低下の機序を探るため、DCの成熟に伴うH-2Dの細胞内局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

B. 研究方法

東京都臨床医学総合研究所感染生体防御研究部門 小原道法博士が開発した2系統(CN2-8, CN2-29)のHCVトランスジェニックマウス(3)を用いて実験を行った。マウス骨髄幹細胞をサイトカインの刺激によりDCに分化誘導する方法(4)を用いて未成熟なDCを単離し、未成熟な状態でHCV遺伝子を発現した。その後サイトカイン誘導下にてDCの成熟に伴うH-2D, lamp-2 (5), HCV抗原の細胞内局在の変化

を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

C. 研究結果

コントロールウイルスを感染させたDCでは成熟とともにH-2Dは細胞表面に強発現し、lamp-2はperinuclear regionに局在した。しかし、HCVを発現させたDCでは2系統のマウスともに成熟に伴うH-2Dの表面の発現低下し、同時にlamp-2の局在変化も阻害された。

D. 考察

樹状細胞にHCVを発現した場合、MHC class I（とりわけH-2D）の発現低下を認め、このことからHCVによりDCの抗原提示機能が阻害されている可能性が考えられた。また、HCVが発現したDCでは、樹状細胞内のH-2D, lamp-2の局在に変化が見られ、DC内の蛋白輸送障害を引き起こしている可能性が考えられた。

今後さらに検討をすすめ、HCVがDCのMHC class Iなど蛋白輸送傷害をきたす機序を解明し、HCVが樹状細胞機能異常を引き起こす原因を究明したい。そしてHCVに対する免疫療法の開発に結びつけたい。

文献

1. Cerny A, Chisari FV, Hepatology 30, 595 (1999).

2. Banchereau J, Steinman RM,  
Nature 392, 245 (1998).
3. Wakita T, Taya C, Katsume A,  
et al., J Biol Chem 273, 9001 (1998).
4. Inaba K, Inaba M, Romani N,  
et al., J Exp Med 176, 1693 (1992).
5. Pierre P, Turley SJ, Gatti E,  
et al. Nature 388, 787 (1997).

E. 結論

HCV遺伝子発現によりDC表面のMHC class-I蛋白の発現低下が見られ、DC細胞内のMHC class-I, lamp-2の蛋白輸送傷害が観察された。

このことからHCVがDCのMHC class-I蛋白発現を阻害し、抗原提示機能を障害している可能性が示唆された。

F. 健康保険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

Y Hiasa, et al; Inhibition of class-I molecule transport on dendritic cells and T cell stimulation caused by hepatitis C virus.  
51 th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. (2000.10)

分担研究報告書

C型慢性肝疾患の臨床的鑑別法とC型慢性肝疾患からの発癌率予測性の向上

虎の門病院消化器科 熊田博光

【研究要旨】

C型慢性肝炎168例とC型肝炎硬変37例との鑑別を、簡便な臨床的指標を用いて多変量解析で行った。実用的な判別関数は $z=0.124 \times \gamma$ グロブリン(%) $+0.001 \times$ ヒアルロン酸( $\mu$ g/L) $-0.059 \times$ 血小板(万/mm<sup>3</sup>) $-2.005$ で、z値が正值であれば肝硬変、負値であれば慢性肝炎と判別でき、慢性肝炎の91.7%、肝硬変の86.5%が正しく判別された。

発癌高危険群であるC型肝炎硬変症例のなかで、多変量解析で求めた4つの指標を用いて、個々の患者の発癌リスクの計算を試みた。高齢(55歳以上)、男性、高AFP値(20ng/ml以上)、低血小板数(10.0万/mm<sup>3</sup>未満)の4条件がそろえば最も発癌率が高く5年53%、10年84%と予測され、一方上記の4条件が全て有利条件であると、5年12%、10年26%と最も低く算出された。

A.研究目的

I.C型肝炎と肝硬変との臨床的鑑別:C型肝炎ウイルス感染患者について、慢性肝炎と肝硬変とが信頼性高く区別できると、インターフェロン治療適応、インターフェロン治療効果予測、慢性肝炎からの肝硬変移行時期の判定、肝硬変進行率の算出、高発癌群としての肝硬変の発見など、臨床的な意義が大きい。このため、臨床的に簡便に使用できる一般的な血液生化学的検査から、多変量解析による判別式を作成する。

II.C型肝炎硬変患者での詳細な発癌率予測とシミュレーション:肝癌発癌の高危険群であるC型肝炎硬変患者のなかで、一層発癌率の高い群(超高危険群)の予測が可能のように、臨床的に簡便な指標を用いて、個々の患者に対して具体的な発癌率を多変量解析の手法から明らかにする。

B.研究方法

I.C型肝炎と肝硬変との臨床的鑑別

1998年から1999年にかけての1年間に当院に入院し、腹腔鏡肝生検で確定診断したC型肝炎168例と同一期間に入院精査したC型肝炎硬変37例を検討した。全例HBs抗原陰性・HCV抗体陽性・HCV-RNA陽性であった。肝硬変患者の中に肝細胞癌など悪性腫瘍合併例は含まれていない。

判別式はFisherの線型判別分析を用い、患者背景・血液生化学的検査として、性別・GOT/GPT比・アルブミン・ビリルビン・血小板数・ヒアルロン酸・ICGR15などの20項目、および対数変換(常用対数)を行った6項目を用いた。

II.C型肝炎硬変患者での詳細な発癌率予測とシミュレーション

対象は、1974年から1999年までの間にC型肝炎硬変と診断した763例とした。全例、肝硬変と診断した時点の保存血清でHBs抗原陰性、HCV抗体陽性が確