

ることが示唆された。臨床材料から得られた肝癌組織においては、ミスマッチ修復異常は少ないとされているが、用いられているアッセイ法などにも問題があると言われていることから、ミスマッチ修復異常が少なからず肝発がんに関与している可能性もある。今後、今回見出した現象が他の肝細胞においても観察されるかどうかを検討すると同時に、その分子機構についてさらに追跡する必要がある。また、ミスマッチ修復系ばかりでなく、塩基除去修復系におけるHCV蛋白質の影響についても解析を進める予定である。また、最近、HCVゲノムの自己複製（レプリコン）細胞も京都大学ウイルス研究所下遠野邦忠氏との共同研究により使用可能となったことから、これらの細胞も実験系として使用して検討する予定である。

E. 結論

(1) マイクロサテライトに関するミスマッチ修復能を培養細胞レベルで測定することのできるアッセイ系を新たに開発した。

(2) この新たなアッセイ系を用いて、HCVコア蛋白質にマイクロサテライトに関するミスマッチ修復能を低下させる効果があることを明らかにした。この効果はHCVの遺伝子型により異なり、1b型と2a型では同様の効果が観察されたが、1a型、2b型および3a型のコア蛋白質にはこのような効果は認められないことを明らかにした。

F. 研究発表

1. Kato, N., Nozaki, A., Naganuma, A., Ikeda, M. and Tanaka, K. Antiviral activity of lactoferrin. *Cur. Top. Biochem. Res.*, (2001) 3, 163-173.
2. Kato, N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med. Okayama*, (2001) 55, 133-159.
3. Kato, N. Hepatitis C virus as a promoter in hepatocarcinogenesis. *Biotherapy*, (2001) 15, 573-578.
4. Nozaki, A. and Kato, N. Quantitative method of intracellular hepatitis C virus RNA using LightCycler PCR. *Acta Med. Okayama*, in press (2002).
5. Alam, S.S., Nakamura, T., Naganuma, A., Nozaki, A., Nouse, K., Shimomura, H. and Kato, N. Hepatitis C virus quasispecies in cancerous and noncancerous hepatic lesions: The core protein-encoding region. *Acta Med. Okayama*, in press (2002)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

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性 cDNA クローンに関する研究

分担研究者 東京都臨床医学総合研究所 感染生体防御研究部門

室長 小原道法

研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）の感染複製過程及びウイルス粒子形成過程はまったく明らかとなっていない。HCVの感染複製過程を明らかとするために、全長遺伝子cDNAクローンの構築をおこなった。この全長cDNAを動物細胞に導入し発現させたところ、遺伝子の複製中間体であるマイナス鎖RNAも検出された。これを用いて in vitro および小型原猿類のツパイに感染実験を行ったところ効率よく感染、複製をした。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の感染、複製過程、細胞外への放出機構は、効率のよい in vitro 感染系がないために、全く明らかになっていない。本機構を解析するために、HCV 感染性 cDNA クローンを樹立し、肝細胞で発現させ、ウイルス粒子成熟過程および細胞外への放出機序およびこれに関わる因子および再感染過程を解析することを目的とした。

B. 研究方法

チンパンジーに HCV 感染者の血清を接種し、PCR 価が高く、かつ感染価との差の小さい検体を選び HCV 全遺伝子のクローニングを行った。HCV 全遺伝子の cDNA あるいは RNA を細胞にトランスフェクションし、HCV 蛋白質を発現させた。遺伝子複製効率については RTD-PCR 法により、粒子形成の有無については培養上清の密度勾配遠心および免疫電子顕微鏡法により検討を行った。さらにこの培養上清を用いて再感染実験を行った。

（倫理面への配慮）

施設内の動物実験委員会において研究計画について承認を受けて実施した。

C. 研究結果

これらの検討から、細胞質内に 50-60nm のウイルス様粒子が認められた。培養上清を蔗糖密度勾配遠心にかけ、分画のコア蛋白質量および RNA 量を測定したところ、1.10、1.25 の密度にピークが観察され、免疫電子顕微鏡による検討から 50-60nm の抗エンベロップ抗体と特異的に反応するウイルス様粒子が認められた。培養上清中には 10^{8-9} copy/ml と多量のウイルス粒子が産生され、これを用いて in vitro および小型原猿類のツパイに感染実験を行ったところ効率よく感染、複製をした。

D. 考察

HCV 全長遺伝子より産生されたウイルス粒子が再感染増殖性を示したことから、reverse genetics による HCV 遺伝子機能及び宿主因子との相互作用の解析が可能となった。

E. 結論

今後、ウイルス複製を担うウイルス側および細胞側因子を同定し、ウイルスゲノムとウイルス蛋白質および細胞側因子との相互作用を明らかにすべく研究を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) M. Matsumura, M. Ijichi, Y. Shiratori, G. Togo, Y. Hikiba, K. Inoue, M. Kohara and M. Ornata : Simple quantitative assay of alpha-petoprotein mRNA in liver tissue using the real-time detection polymerase chain assay - Its application for clinical use-. *Hepatology Research*. 20: 84-96, 2001

2) S. Ishida, M. Kaitou, M. Kohara, K. Tsukiyama-Kohara, N. Fujita, J. Ikoma, Y. Adachi and S. Watanabe : Icosahedral hepatitis C virus core particles detected by immunoelectron microscopy and rotation technique. *Hepatology Research*. 20: 335-347, 2001

3) K. Machida, K. Tsukiyama-Kohara, E. Seike, S. Ione, F. Shibasaki, M. Shimizu, H. Takahashi, Y. Hayashi, N. Funada, C. Taya, H. Yonekawa and M. Kohara : Inhibition of cytochrome C release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. *J. Biol. Chem.* 276 (15): 12140-12146, 2001

4) T. Hügler, F. Fehrmann, E. Bleck, M. Kohara, H-G. Kräusslich, C. M. Rice, H. E. Blum and D. Moradpour : The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology*. 284: 70-81, 2001

5) T. Ito, K. Yasui, J. Mukaigawa, A. Katsume, M. Kohara and K. Mitamura : Acquisition of Susceptibility to Hepatitis C Virus Replication in HepG2 Cells by Fusion with Primary Human Hepatocytes : Establishment of a Quantitative Assay for HCV Infectivity in a Cell Culture System. *Hepatology* 34:566-572, 2001.

6) K. Tsukiyama-Kohara, F. Poulin, M. Kohara, C. I. DeMaria, A. Cheng, Z. Wu, A. C. Gingras, A. Katsume, M. Elchebly, B. M. Spiegelman, M-E. Harper, M. L. Tremblay and N. Sonenberg : Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. *Nature Med.* 7:1128-1132, 2001.

2. 学会発表

1) K. Tsukiyama-Kohara, M. Kohara : Replicable full-length HCV RNA upregulates hepatocarcinogenesis by activation of NF- κ B-cdk-Rb-E2F pathway. 8th International Symposium on Hepatitis C & Related viruses. 2001.9.2-5. Paris

G. 知的所有権の取得状況

なし

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

HCV 感染回復期血清中の HCV 粒子に対する抗体に関する研究

分担研究者 岡本宏明 自治医科大学助教授

研究要旨

免疫沈降法および HCV RNA 定量測定法を用い、HCV 感染後の回復期血清中に HCV 粒子と結合しうる抗体が存在し、その特異性は多様であること、そして異なる個体から得られた回復期血清を混合することにより HCV 粒子との結合活性は増強することを実証した。したがって、passive immunization への応用を想定した場合、複数の回復期血清をプールして用いることによりその効果は増大するものと期待される。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス(HBV)の感染予防については、能動免疫を担う HB ワクチンが開発され、受動免疫を担う高力価ヒト HBs 抗体含有免疫グロブリン製剤 (HBIG: hepatitis B immune globulin)が用いられ、母児間感染防御や院内感染予防などに於いて期待通りの成果が得られている。それに対して、C 型肝炎ウイルス(HCV)感染に於いては、このウイルスが多様性に富み、しかもインフルエンザウイルスや HIV のように変異しやすいウイルスであることも一因となり、予防手段の要であるワクチン開発は難航している。受動免疫を担う HCV 中和抗体含有免疫グロブリン製剤、HCIG の研究開発も進んでいない。培養や発現系によるウイルス粒子の産生は研究途上にあつて、大量入手が困難で、ウイルス粒子表面に対する抗体(中和抗体)をルーチンに測定する系も確立されていないのが現状である。そこで、現時点で実施可能な手法を用いて、ウイルス粒子に対する抗体が HCV 感染回復期患者血清中に存在することを実証し、その性状を解析することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

1. 遊離型 HCV 粒子含有血清

HCV キャリア血清中の HCV 粒子はほと

んどの例で 90%以上の粒子が血中 IgG や IgM 分子と結合した、いわゆる immune complex (免疫複合体)として存在している。そこで、HCV 粒子と結合する抗体を免疫沈降法(後述)により測定することを目的として、immune complex 型の HCV 粒子をほとんど含まず、主として遊離型 (free form) の virions から構成されている HCV 感染初期の患者血清 2 検体 (HC1, HC2)を用いた。両検体は第 2 世代 HCV 抗体 (HCV core 蛋白や非構造蛋白としての NS3, NS4 蛋白などに対する抗体) が陰性で、HCV RNA は高力価陽性であった (HC1: 2.8×10^7 copies/ml; HC2: 1.1×10^7 copies/ml)。また、HCV genotype は HC1 が II (1b)型、HC2 が IV (2b)型であった。なお、これら 2 検体の HCV がほとんど free HCV virions として血清中に存在していることは、既報 (Biochem Biophys Res Commun 279: 718-724, 2000)の免疫沈降法によって確認した。また、これら 2 検体の HCV sequence は、hypervariable region (HVR)を含む HCV E1 および HCV E2 の塩基配列 (528-534 nt)を既報(Hepatology 16:619-624, 1992)の方法に基づいて 10 クローンずつについて決定した結果、それぞれ均一であることが分かった。

2. HCV 感染回復期血清

HCV 感染回復期血清として、HCV 抗体

が高力価陽性(PHA titer: $2^{10} \sim 2^{14}$)で HCV RNA が陰性の 25 検体を用いた。HCV RNA は血清 1ml より核酸を抽出し、nested RT-PCR 法により測定した(Hepatology 20:1131-1136, 1994)。コントロールとして、HCV 抗体および HCV RNA がともに陰性の血清 10 検体を用いた。

3. 免疫沈降法

遊離型 HCV 粒子含有血清を生食で 10 倍に希釈し、10%溶液とした HCV RNA 陽性血清 10 μ l に 5% HCV 感染回復期血清(生食で 20 倍希釈した HCV 抗体陽性血清) 50 μ l を加え、37°C で 2 時間反応したのち、ヒト IgG に対するヤギ抗血清(goat antiserum to human IgG [Cappel]) 50 μ l 添加し、37°C で 30 分間反応した。10,000 回転で 5 分間遠心し分離したのち、上清と沈澱から別々に核酸を抽出し、HCV RNA を定量測定した。コントロールとして、抗ヒト IgG ヤギ血清の代わりに正常ヤギ血清(normal goat serum)を用いた。

4. HCV RNA の定量測定

Trizol LS 試薬(Gibco-BRL)を用いて RNA を抽出し、LightCycler System (Roche)を用いて real-time detection PCR 法 (Hepatology 2002, in press)により HCV RNA を定量的に測定した。すなわち、反応容量 20 μ l の glass capillary のなかで 60°C、30 分間の逆転写反応を行ったあと、95°C で 60 秒間 denature し、合計 49 サイクルの PCR 反応(最初の 1 サイクルは 94°C で 0 秒に設定して denature を行い、62°C で 15 秒間の annealing-extension、あとの 48 サイクルは 90°C で 0 秒に設定した denature、62°C で 15 秒間の annealing-extension)を行った。反応に用いた primers と蛍光標識 probe は 5'非翻訳領域の高保存域に由来する HC503 (sense: 5'-CTA GCC GAG TAG YGT TGG GT-3') と HC504 (antisense: 5'-TGC ACG GTC TAC GAG ACC TC-3')、および HC505-P (5'-[Fam]-AAG GCC TTG TGG TAC TGC CTG ATA GGG-[Tamra]-3')である。

5. HCV 抗体の serotype の測定

既報(Hepatology 16:886-891, 1992)に準拠

し、HCV core 領域の 2 種類の type-specific peptides (sub-1: IPKARRPEGRTWAQPGY; sub-2: IPKDRRSTGKSWGKPGY)を抗原として、horseradish peroxidase 標識抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体を用いた EIA 法により HCV 抗体の serotype を判定した。

倫理面への配慮：研究用血清検体の採取に際して、インフォームドコンセントが得られている。そして、検体提供者は不特定化されているため、個人のプライバシーを侵害することはなく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1. 免疫沈降反応の特異性の検討

Genotype 1b の free HCV virions を高力価で含む HC1 血清に回復期血清(No. 166)を反応させ、さらに抗ヒト IgG ヤギ血清を添加し、遠心分離したところ、HCV RNA の 74.2% は上清で、25.8% は沈澱分画で回収された。それに対して、抗ヒト IgG ヤギ血清の代わりに正常ヤギ血清を添加した場合には、上清でのみ HCV RNA が検出され、回復期血清の代わりに HCV 抗体および HCV RNA が陰性の正常血清を反応させた場合にも 99.7% の HCV RNA が上清で検出された。以上の実験結果から、回復期血清添加による沈澱反応は HCV 粒子に対する特異的な反応であると考えられ、沈澱分画で回収された HCV RNA の割合、25.8% をこの血清中抗体(IgG)の HCV 粒子に対する結合活性とした。

2. 回復期血清中抗体の HCV 粒子に対する結合活性

回復期血清 25 検体について、HC1 血清中の HCV 粒子に対する結合活性を測定したところ、検体によってその値は大きく異なり、ほとんど活性が認められないものから最高 61.1% の活性を示すものもあった。次にこれら 25 検体について 5 検体ずつの 5 つのプール (Pool 1~Pool 5) を作製し、その結合活性を検討したところ、38.5% から 67.1% の結合活性が認められ、それぞれ単

独の場合よりも結合活性が高くなることが分かった。Genotype 2b の free HCV を高力価で含む HC2 血清を用いて、各プール血清の結合活性を測定したところ、全体的に低い値を示し、15.2%~31.5%に分布した。しかも、HC1 血清との反応では Pool 2 が最も高い値を示したのに対して、それと異なる genotype の HCV 粒子を含有する HC2 血清では Pool 2 が最も低い値(15.2%)を示し、最高値を示したのは Pool 5 であった。したがって、以上の結果から回復期血清中の抗体の特異性は多様であり HCV 粒子によって反応性が異なることが示唆された。

そこで、HCV 粒子の type (genotype) と回復期血清中の HCV 抗体の type (serotype) を一致させ、その反応性を検討した。すなわち、感染源の HCV の genotype が 1b であったと推測される serotype 1 の回復期血清 4 検体と genotype 1b の HCV 粒子を含む HC1 血清との反応性を検討した結果、その結合活性は 39.7%~62.4% であった。それに対して、それらの回復期血清を genotype 2b の HCV 粒子を含む HC2 血清と反応させたところ、抗体の結合活性は 3.7%~19.9% に過ぎなかった。

D. 考察

今回、HCV 感染初期の患者由来の free HCV virions を抗原とし、免疫沈降法を用いて回復期血清中に HCV 粒子に対する抗体が存在することを実証することができた。しかし、患者血清からの精製 HCV 粒子の入手は現時点では困難であり、血清蛋白を多く含む HCV 陽性血清をそのまま使い、しかも免疫沈降反応での非特異反応をなくするためにそれ自体希釈を要し、反応させる回復期血清も 20 倍に希釈せざるを得なかった。回復期血清の希釈倍数を 100 倍、500 倍と高めることにより、結合活性はほぼ直線的な関係をもって低下したことから、回復期血清原液での検討が可能である場合には、より高い結合活性が認められるものと予測される。

今回検討した HCV 粒子表面に対する抗

体は、conformational epitopes に対する抗体が主体であり、その反応を linear epitopes を担う HCVE1 あるいは E2 発現蛋白や合成ペプチドで阻止することは必ずしも容易ではないと推測されるが、linear epitopes を担うことが知られている HVR peptides などを用いた結合阻止実験等により、今回検討した HCV 粒子の免疫沈降反応の特異性を確認することは重要であると思われる。また、HCV 粒子への回復期血清中の抗体の結合がウイルスの中和を意味するか否かの検討は今後の研究課題として重要である。

E. 結論

1. HCV 感染回復期血清中に HCV 粒子と結合する抗体が存在することを免疫沈降法により実証した。
2. 異なる HCV 感染者から得られた回復期血清を混合することにより、HCV 粒子との結合活性は増強した。
3. 回復期血清中の抗体の特異性は多様であり、感染源の HCV 粒子との反応性が最も強いと考えられた。

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 型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法時の HCV dynamics、Th1/Th2 cytokine chemokine receptor の検討

分担研究者 岡上 武 京都府立医科大学第三内科学教室 助教授

共同研究者 伊藤義人、盛田篤広、藤井秀樹、牧山明子
京都府立医科大学第三内科学教室

研究要旨: C 型慢性肝炎患者 (CH-C) では、肝炎の増悪時に、ケモカイン IP-10 が血清中で増加し、末梢血リンパ球 (PBMC) で IP-10 のレセプターである CXCR3 陽性細胞が増加した。インターフェロン (IFN) 治療を受けた CH-C の PBMC でも、CXCR3 陽性細胞の増加する症例が見られ、Th1/Th2 バランスの Th1 側への変位が想定された。IFN 単独治療や IFN+リバビリン治療を受ける CH-C 患者で、C 型肝炎ウイルス (HCV) 減少曲線の第二相における HCV 量の変化 (HCV dynamics) を、CXCR3 陽性、かつ、CCR4 陰性細胞の比率の変化や Th1/Th2 (IFN γ /IL-4 産生) 細胞の比率の変化と合わせて評価することは、IFN 単独治療や IFN+リバビリン治療の生体の免疫応答に与える影響の解析に役立つのみならず、治療効果判定予測につながる可能性があるものと考えられた。

A. 研究目的

インターフェロン (IFN) 治療が無効であった C 型慢性肝炎患者 (CH-C) では、肝病変が進展し、著効例や一過性有効例に比し肝発癌率が高くなる。従って、CH-C に対するより効果的な治療法の開発が必要とされており、そのためには、IFN 治療時の CH-C の免疫応答を明らかにすることが重要である。

本年度の研究目的は、CH-C の末梢血リンパ球 (PBMC) 表面で、I 型ヘル

パー T (Th1) 細胞に高率に表出される CXCR3 (ケモカイン IP-10 のレセプター) を、肝炎の経過や IFN 治療との関連において検討することである。

B. 研究方法

Ficoll-Hypaque を用いて、肝炎患者の PBMC を採取し、10%FCS 含有 PBS に浮遊させ 4×10^6 cell/ml に調整、human IgG でブロッキング後、anti-CD3 (PE)、anti-CXCR3 (FITC)、

isotype 抗体と 30 min 4°C で反応させ、2 回洗浄。1X10⁶ cell/ml に調整後、flow cytometer (FACScalibur) で測定。CD3 陽性、かつ、CXCR3 陽性細胞（主として Th1 細胞）の比率を求める。

（倫理面への配慮）

本研究計画は、既に、京都府立医科大学における人間を対象とする医学研究審査委員会において承認（MCHS-72）されている。本研究においては、協力者（肝炎患者）に研究の目的、医学的意義、侵襲の程度を十分に説明する。さらに、研究結果の匿名性のみならず、いつでも同意を撤回できること、研究への同意は診療内容には一切関係しないこと、研究終了後は検体を破棄することについても説明し、予め、同意書に署名・捺印を得た後、研究を始めることとしている。

C. 研究結果

我々は、既に、慢性肝炎患者の肝組織においてケモカイン IP-10 が発現していることを報告している（data not shown）。また、CH-C では、肝組織の炎症の程度に並行して血清中のケモカイン IP-10 が増加することも報告している（表 1）。

CH-C では、血清 ALT 値が 200 IU/l 程度の上昇を示す肝炎の増悪時に、ケモカイン IP-10 が血清中で増加し、

IP-10 のレセプターである CXCR3 陽性細胞が PBMC で増加していた（表 2）。

IFN 治療を受けた CH-C の PBMC では、CXCR3 陽性細胞の増加する症例が見られた（表 3）。

D. 考案

CH-C に対する抗ウイルス療法においては、C 型肝炎ウイルス (HCV) の排除が最も重要な治療目的であり、それには Th1 細胞を介した宿主の免疫応答が深く関わっていることが知られている。

また、Th1 細胞の表面にはケモカイン IP-10 のレセプターである CXCR3 が表出されており、IP-10 などのケモカインが産生される炎症の局所に向かって遊走し、局所における免疫応答に寄与しているものと考えられている。

本年度の研究結果から、CH-C では、肝炎の増悪時にケモカイン IP-10 が血清中で増加し、PBMC で IP-10 のレセプターである CXCR3 陽性細胞が増加していることが示された。IFN 治療を受けた CH-C の PBMC でも、CXCR3 陽性細胞の増加する例が見られた。

CD4 陽性で CXCR3 陽性、かつ、CCR4 陰性細胞に Th1 細胞が多いことが知られている。従って、IFN 治療を受ける CH-C 患者では、IFN 投与後の HCV 減少曲線の第二相における HCV 量の変化

(HCV dynamics) が治療効果判定に重要であることを考慮すると、この時相における CXCR3 陽性、かつ、CCR4 陰性細胞の比率の変化や Th1/Th2 (II 型ヘルパー T 細胞) の比率の変化を HCV dynamics と合わせて評価することは、IFN 単独療法や IFN+リバビリン治療の生体の免疫応答に与える影響の解析のみならず、治療効果判定予測につながる可能性があるものと考えられた。

次年度の研究においては、IFN 単独治療のみならず、IFN+リバビリン治療において、HCV dynamics と CXCR3 陽性、かつ、CCR4 陰性細胞の比率の変化や、Th1/Th2 (IFN γ /IL-4 産生) 細胞の比率の変化との関連を検討する。

E. 結論

1) CH-C では、肝炎の増悪時にケモカイン IP-10 が血清中で増加し、PBMC で、IP-10 のレセプターである CXCR3 陽性細胞が増加していた。

2) IFN 治療を受けた CH-C の PBMC では、CXCR3 陽性細胞の増加する例が見られた。

F. 研究発表

1 論文発表

1) Itoh Y, Morita A, Nishioji K, et al .

Time course profile and cell-type specific production of monokine induced by interferony (MIG) in Concanavalin A-

induced hepatic injury in mice: comparative study with interferon-inducible protein-10 (IP-10). Scand J Gastroenterol 36(12): 1344-51, 2001

2) Itoh Y, Morita A, Nishioji K, et al .

Clinical significance of elevated serum interferon-inducible protein-10 levels in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum transaminase levels.

J Viral Hepat 8(5); 341-8, 2001.

3) Nishioji K, Okanoue T, Itoh Y, et al .

Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA in hepatocytes. Clin Exp Immunol 123(2); 271-279, 2001.

4) Okanoue T, Itoh Y, Sakamoto M, et al.

Transient biochemical response in interferon therapy decreases the development of hepatocellular carcinoma for five years and improves the long-term survival of chronic hepatitis C patients.

Hepatol Res (in press).

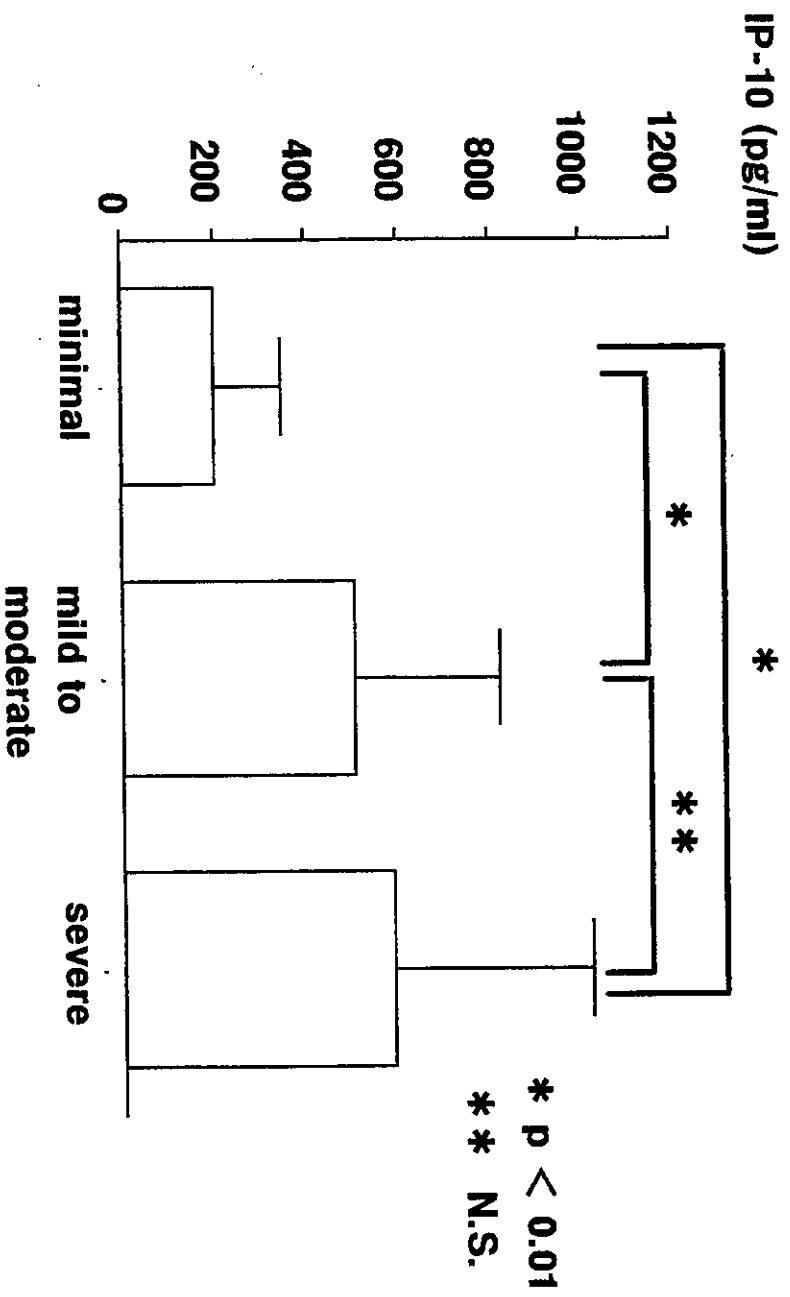
2 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

Fig 1 Serum levels of IP-10 in chronic hepatitis C



Serum levels of IP-10 were compared in 45 chronic hepatitis C patients according to the classification by Desmet et al.
 minimal = minimal hepatitis,
 mild to moderate = mild hepatitis or moderate hepatitis,
 severe = severe hepatitis

Fig 2 Expression of CXCR3 on CD3 positive T cells in chronic hepatitis C

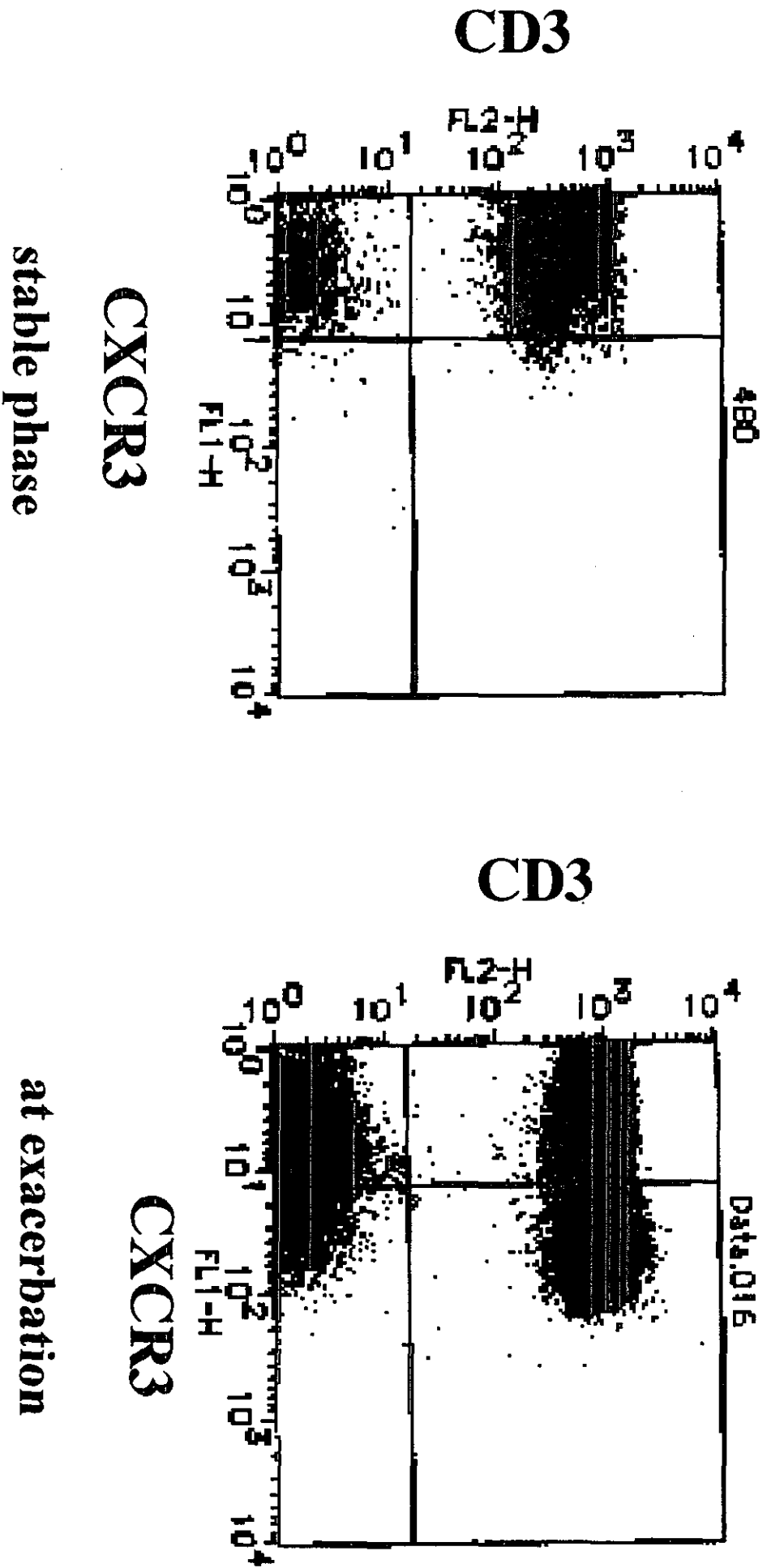
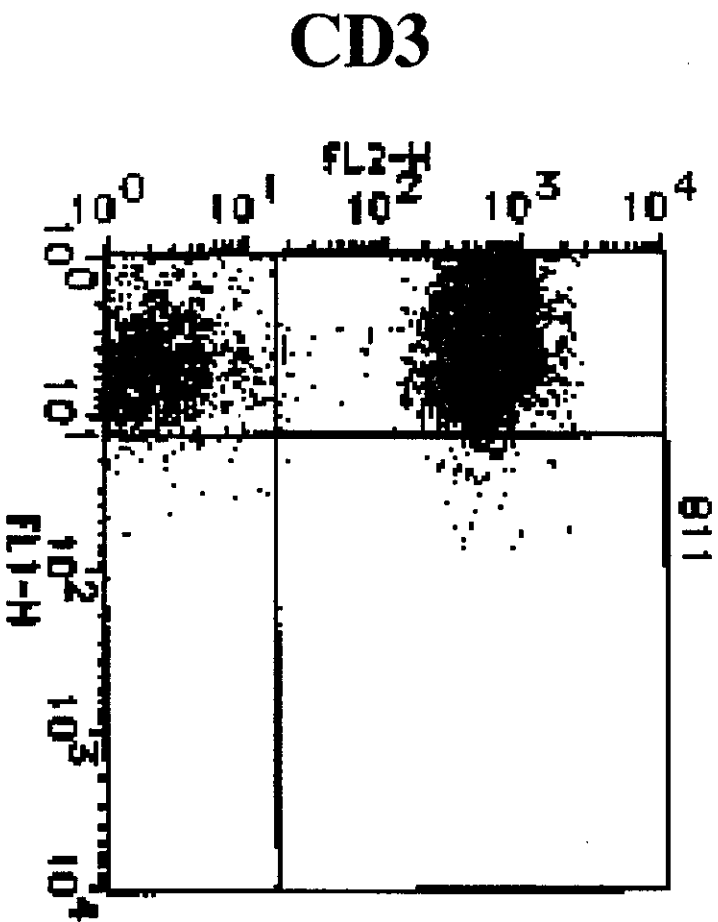
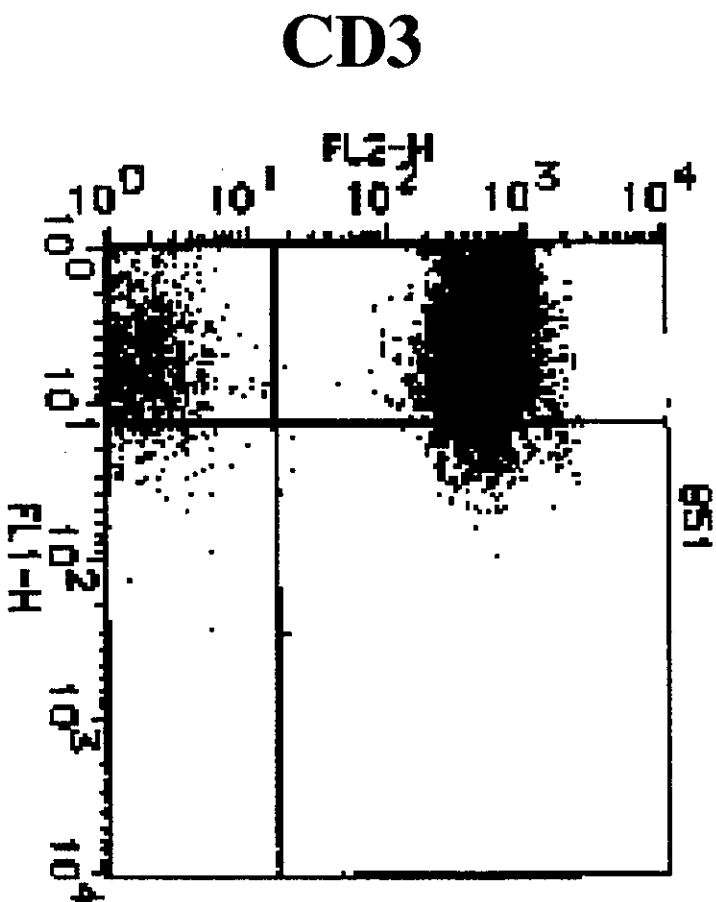


Fig 3 Expression of CXCR3 on CD3 positive T cells during IFN therapy in chronic hepatitis C



CXCR3

prior to IFN therapy



CXCR3

during IFN therapy

CDAА 食飼育ラット肝より単離した osteoactivin の意義

分担研究者 坪内博仁 宮崎医科大学第二内科 教授

研究要旨

コリン欠乏アミノ酸置換(CDAА)食飼育2ヶ月目のラット肝にて発現亢進している遺伝子群から osteoactivin (OA)遺伝子を単離した。OAはCDAА食飼育ラット肝で早期から強発現し、ヒト肝硬変および肝癌組織においても発現していた。また OA 強発現は肝癌細胞の浸潤および転移能を亢進させた。OAは肝硬変を背景に発生する肝細胞癌において、その発癌過程および進展に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝癌のほとんどが肝硬変を背景に発生するが、肝発癌に直接関与する遺伝子は不明である。本研究ではコリン欠乏アミノ酸置換(CDAА)食飼育早期に発現亢進している遺伝子群を解析した。

B. 研究方法

(1) CDAА食飼育2ヶ月目のラット肝にて発現亢進している遺伝子を suppression subtractive hybridization 法にて単離した。(2) 単離した osteoactivin (OA)遺伝子の発現をCDAА食飼育ラット肝、ヒト肝癌組織を用いて検討した。(3) OA遺伝子を肝癌細胞株に導入し、OA発現の浸潤および転移能に及ぼす影響を検討した。

C. 研究成果

(1) transferrin, NF- κ B, uncoupling protein-2 および OA 遺伝子を単離した。(2) OAはCDAА食飼育早期の肝臓で強く発現し、以後持続したが、18ヶ月目に発生した肝癌においても発現していた。また OAはヒト硬変肝組織および肝癌組織において発現していた。(3) OA強発現は肝癌細胞の浸潤および転移能を亢進させたが、細胞増殖には影響を与えなかった。

D. 考案

OAはCDAА食飼育ラット肝において早期に発現亢進し、肝硬変および発癌に至る過程で強い発現が持続した。また OA導入は肝癌細胞の浸潤・転移能を亢進させたことから、肝硬変における肝細胞の脱落および再生(組織修復)に関与し、肝発癌および進展の微小環境に影響している可能性が示唆された。

E. 結論

OAは肝硬変を背景に発生する肝細胞癌において、その発癌過程および進展に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

第5会 日本肝臓学会大会(2001年)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

コホートを用いた HCV による肝細胞障害機序の解明

宮崎医科大学第二内科

坪内博仁

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) 高侵淫地区の T 町住民の追跡調査により、HCV による肝細胞障害機序を明らかにすることである。

B. 研究方法

対象は 1993~2000 年に住民検診により HCV 抗体陽性 (第二世代で測定) が判明している宮崎県 T 町住民 1,087 名 (男性 417 名;38.3%、女性 670 名;61.6%、平均年齢 69 才)。1994 年から年 1 回の超音波検査を行ってきたが、さらに 1)肝障害ならびに肝癌の発症における HCV の特異因子 (第三世代 HCV 抗体価、ウイルス負荷、遺伝子型)、2)B 型肝炎ウイルスおよびヒト T リンパ球向性ウイルス (HTLV-1) の重複感染、飲酒および喫煙が肝疾患の進展に与える影響、3)ヒト組織適合性抗原タイプ、HCV 特異性細胞免疫応答で示される宿主の免疫状態と肝疾患の進行や HCV の持続感染性との関連性についての評価を行う。

(倫理面の配慮) a.個人の人権の擁護: 1)検診時に研究内容について十分な説明を行い、研究への参加は任意であること、研究に参加しない場合でも、従来通り超音波検診を受けることができることを示す。2)参加者は肝疾患について詳細なフォローアップを得ることができる。さらに、超音波検査終了後、検査結果報告書と担当医への依頼書を手渡し、参加者にはかかりつけ医または地域の中核病院を受診するようにアドバイスするので、参加者の利益となる。3)参加者のデータは、厳重な秘密保持のもとに管理されるので、本研究のデータが参加者に不当な負荷を及ぼすことはないと考えられる。b.個人情報の管理: 1)ID 番号、氏名、住所、電話番号などの個人を特定できる情報を除いたものを作製し、新たな番号を付与し、本研究にはこの番号のみを用い、個人が特定できる名前などを用いない。2)対象者由来の血液サンプルは個人が同定できる情報を消去して、番号を付与する。c.対象者に理解を求め同意を得る方法: 検診時に宮崎医科大学第二内科の担当医および T 町看護婦より、研究内容について説明を行ない、書面による同意を得る。d.研究等によって生じる個人への不利益: 超音波検査や静脈穿刺は侵襲性のあるものではなく、被験者に不当な危険が生じることはない。個人のプライバシーに関わる点については上記のように十分な配慮を行い、対象者の不利益が生じないようにする。

C. 研究成果

1)検診参加者: 検診対象者 1,087 名 中、今年度の検診参加者は 737 人 (68%)、男 275 名、女 462 名。採血を 691 名で実施し、HCV 抗体陽性者は 616 名であった。抗体陽性者の中で

HCV RNA 陽性者は 454 名 (73.7%: 男 168 名;37%、女 286 名;63%) であった。HCV RNA

陽性者 454 名のうち、肝機能正常者は 189 名 (41.6% : 男 53 名;28%、女 136 名;72%)
であった。HBs 抗原陽性が 0.7% (T 町における HCV 抗体陰性者と有意差なし)、HTLV-
1 陽性が 18.3% (宮崎県の一般陽性率 5%) であった。今後、9 年間の肝機能検査、
HCV RNA の成績より、HCV RNA 陽性・肝障害あり、HCV RNA 陽性・肝障害なし、
HCV RNA
陰性・肝障害なしの三群に分け、肝細胞障害の危険因子の解析を行う予定である。

D. 考察

HCV 感染者のうち、男性の方が肝細胞障害を有する頻度が高かった。今後、飲酒歴、
喫煙歴などの生活環境の調査も進めていきたい。HTLV-1 の重複感染が肝細胞障害進展
の危険因子の一つとして示唆された。

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型肝炎ウイルスによる肝炎・肝硬変および肝がんの病態解明に関する研究
（分担） 研究者 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科助教授

研究要旨 C型肝炎ウイルス関連の肝がん発症の分子機序を明らかにする目的で、慢性肝炎組織および肝がん組織における包括的な発現遺伝子解析をおこなった。C型肝炎ウイルスによる慢性肝炎の発現遺伝子プロファイルは、B型肝炎ウイルスによる慢性肝炎をはじめとする他の病態とは異なる発現遺伝子プロファイルを有していた。

A. 研究目的

我が国における肝細胞がんの多くは、HCVの持続感染によって引き起こされる慢性肝炎を背景として発症することが明らかにされている。しかし、その発症にいたる分子機序は十分に解明されていない。本研究では包括的に発現遺伝子解析を行い、慢性肝炎から肝発がんに至る分子機序を解析する。

B. 研究方法

肝組織および肝細胞がん組織を対象に、serial gene expression analysis (SAGE)法およびDNAチップを用いて、発現遺伝子解析を行った。SAGE法では、正常肝組織1例、HCV感染慢性肝炎組織1例、HCV関連肝細胞がん1例、HBV感染慢性肝炎1例、HBV関連肝細胞がん1例を解析した。DNAチップ法は14例のC型慢性肝炎(CHC)、12例のB型慢性肝炎(CHB)、および対照として9例の正常肝組織(normal)および13例の原

発性胆汁性肝硬変(PBC)、10例の自己免疫性肝炎(AIH)を解析した。科学技術会議生命倫理委員会「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、研究を行った。

C. 研究結果

臨床生化学及び病理学所見から正常肝と診断された肝臓組織を用いてSAGE法を行った。全31,287の遺伝子tagを得た。解析の結果この正常肝臓内においては8,598の異なる遺伝子が発現していた。個々の遺伝子で最も多く発現していた遺伝子はalbuminで、1,088回出現し全体の3.5%の発現量であった。これらSAGE法による発現量が正しく細胞内の発現量を表していることをRT-PCR法により確認した。次に慢性肝炎および肝細胞がんのSAGE法により遺伝子発現プロファイルを作製した。正常肝、HBV感染およびHCV感染慢

性肝炎，及び肝細胞がんの発現プロファイルの違いが明らかとなった。DNA チップ解析では、クラスター解析の結果、発現遺伝子プロファイルはウイルス性慢性肝炎および自己免疫性肝炎の 2 グループに大きく、分類された。ウイルス性肝炎では HBV 感染と HCV 感染の 2 グループに分類され、CHC および CHB が異なる発現遺伝子プロファイルを有していることが示された。

D. 考察

HCV と HBV は、生化学的あるいは病理学的に同様に慢性肝炎あるいは肝硬変を引き起こすものの、慢性肝炎例の発現遺伝子群は異なっており、肝細胞がんを合併する分子機序が両者において異なる可能性が示唆された。

E. 結論

SAGE 法および DNA チップを用いることにより、HCV の持続感染によって引き起こされる慢性肝炎および関連肝細胞がんの発現遺伝子プロファイルがえられた。正常肝組織および HBV 感染肝組織における発現プロファイルとの比較を行った。

F. 研究発表

1. T Yamashita, S Kaneko, S Hashimoto, T Sato, S Nagai, N Toyoda, T Suzuki, K Kobayashi, and K Matsushima. Serial Analysis of Gene Expression in

Chronic Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 282, 647-654, 2001.

2. Y Shirota, S Kaneko, M Honda, H F Kawai, and K Kobayashi. Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. Hepatology 33, 832-840, 2001.
3. M Honda, S Kaneko, H F Kawai, Y Shirota, and K Kobayashi. Differential Gene Expression between Chronic Hepatitis B and C Hepatic Lesion. Gastroenterology 120: 955-966, 2001.
4. H F Kawai, S Kaneko, M Honda, Y Shirota, and K Kobayashi. Alpha-fetoprotein-producing hepatoma cell lines share common expression profiles of genes in various categories demonstrated by cDNA microarray analysis. Hepatology 33: 676-691, 2001.

G. 知的所有権の取得状況
無し

C 型慢性肝炎における樹状細胞サブセットの解析

主任研究者 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科 分子制御治療学教授

研究要旨：C 型慢性肝炎患者では樹状細胞(DC)とそのサブセット(PreDC1,PreDC2)が健康成人に比べて減少しており、T 細胞の刺激能も低下していた。キャリア群では preDC2 数が保たれており、肝炎発症の抑制に preDC2 が関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

樹状細胞(Dendritic cell, DC)は強力な抗原提示細胞であり、ウイルス、癌などに対する免疫応答の中心的役割を果たしている。我々は既にC型肝炎患者では単球由来のDC機能が低下しており、これがHCVの持続感染に関与することを報告した。近年機能的に異なるDCサブセットの存在が明らかになり、中でもPreDC2/Interferon producing cell (IPC)はウイルス感染に際して多量のI型インターフェロン(IFN)を産生し、抗ウイルス免疫の賦活、調節に関与すると考えられている。本研究ではC型肝炎の病態におけるpreDC2/IPCの意義を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

C型慢性肝炎患者25例と健康成人20例を対象とした。PBMCを分離した後、FACSを用いてLineage陰性かつHLA-DR陽性の細胞群をDCとし、更にCD11cとCD123の染色性からpreDC1とpreDC2を決定した。各細胞群がPBMCに占める割合から、preDC1とpreDC2の数を計算した。各サブセットの機能を解析するためにpreDC1とpreDC2を別々にsortingし、naïve CD4 T細胞の刺激能と、CpGオリゴの刺激によるIFN α の産生能を両群で比較検討した。

(倫理面への配慮)対象者には研究の意義、目的、匿名性の確保につき事前に説明し、同意を得た。

C. 研究結果

C型肝炎患者では、DC、preDC1、preDC2の数(/ μ l)は6.5 (median) (2.4-19.8)、3.0 (0.47-10.4)、1.2 (0.1-3.9)と、健康成人での数14.5 (8.6-22.1)、6.9 (5.0-10.9)、2.8 (1.2-5.6)に比べて有意に低値であった。患者由来のpreDC2は健康成人のpreDC2に比べてT細胞の増殖刺激能は低く、IFN産生も低値であった。更にC型肝炎患者群を、長期間ALT正常のキャリア群とALT異常を伴う肝炎群に分けて比較すると、DC数、preDC1数、preDC2数全てキャリア群で高値であったが、その差はpreDC2で顕著であった。

D.E. 考察、結論

C型慢性肝炎患者では健康成人に比べてDCサブセットが減少しており、preDC2の機能低下が認められた。キャリア群では肝炎群に比べてpreDC2が高値であったことより、preDC2が肝障害に抑制的に働く可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kanto T. et al. J Immunol 162: 5584-5591, 1999.

Kanto T. et al. J Immunol 167: 3773-3784, 2001.

G. 知的所有権の取得状況

なし。

C型肝炎ウイルスマウスモデルにおける細胞障害性T細胞の誘導とその標的抗原に関する研究

分担研究者 脇田 隆字 財団法人 東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門・副参事研究員

研究要旨

我々が開発したC型肝炎ウイルス（HCV）トランスジェニックマウスによる肝障害モデルにおいて、ウイルス蛋白質特異的細胞障害性T細胞（CTL）が誘導される。本年度はこのCTLの標的となるウイルス蛋白質とマウスのH2抗原との関係、およびウイルス株による交差反応性を明らかにした。コア蛋白質はH2に関わらず、CTLの標的とはならなかったが、NS2蛋白質はどのH2でも標的となった。また、トランスジェニックマウスに誘導されたCTLはトランスジーンと同じ遺伝子型1bの他のHCV株を発現する細胞は認識したが、1aおよび2aのHCV株を発現する細胞は認識しなかった。

脇田 隆字・(財)東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門・副参事研究員

宮本 道子・同・研究員

加藤 孝宣・同・研究員

を報告した^{1,2)}。CTLが認識する標的抗原とCTLの交差反応性について解析する。

B. 研究方法

マウス：HCVトランスジェニックマウスはCN2マウスを用いた^{1,2)}。トランスジーンを図1に示す。このマウスはBALB/cマウス（H2^d）から作られたので、他のH2を持つC57BL/6（H2^b）およびC3H/He（H2^k）に5世代以上それぞれ戻し交配した。肝炎モデル：Creを発現する組み換えアデノウイルス（Ax CANCre）³⁾を 1×10^9 pfu 尾静脈から投与した。投与後10日目のマウスの脾臓から脾細胞を分離した。

A. 研究目的

我々はC型肝炎ウイルス（HCV）が持続感染化して慢性肝障害を引き起こし、肝発癌にいたる病原性に興味を持ち研究を進めてきた。HCVによる肝障害とウイルスの排除に細胞障害性T細胞の働きが重要であると考えられている。我々が開発したHCVトランスジェニックマウスの肝障害モデルにおいて、ウイルス蛋白質特異的CTLが誘導されること

HCV cDNA : トランスジーンに用いたのはHCV R 6株¹⁾(遺伝子型1b)である。また、同じ遺伝子型1bのHCV TH株⁴⁾、遺伝子型1aのHCV H 77株⁵⁾、遺伝子型2aのHCV J 6CF株⁶⁾のウイルス遺伝子cDNAのコア領域からNS2領域遺伝子を使用した。

HCV発現細胞 : トランスジーンと同じHCV cDNAをHuman Elongation Factor 1 alphaのプロモーターの下流に挿入した²⁷⁾。この発現ベクターは哺乳細胞での選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を持つ。この発現ベクターをマウス由来でH2の判明している細胞株、P815 (H2^d)、EL4 (H2^b)、SVE C4-10 (H2^k)にトランスフェクションして、G418存在下で生存してくる細胞を選択した。HCV蛋白質の発現は特異抗体による蛍光免疫染色法およびウエスタンブロット法により解析した。

CTLアッセイ : HCV蛋白質発現細胞をマイトマイシンCで処理した。トランスジェニックマウスから分離した脾細胞をマイトマイシンC処理細胞と共に5日間培養した後、回収してエフェクター細胞とした。HCV蛋白質発現細胞を⁵¹Crで37℃1時間ラベル後洗浄し標的細胞とした。エフェクター : 標的細胞比 (E :

T比)は40 : 1、10 : 1、2.5 : 1とした。エフェクター細胞と標的細胞を37℃4時間混合培養し、培養終了時の上清中の⁵¹Crをガンマカウンターで測定した。

C. 研究結果

マウス肝障害モデル : 我々が以前報告したようにCN2トランスジェニックマウスはAxCANCreを投与後肝障害を発症する^{1,2)}。コントロールマウスに比ベトランスジェニックマウスにおいてより強い肝障害が認められた。AxCANCre投与後10日目のBALB/cおよびC3H/Heでの血清ALT値を図2に示す。

HCV特異的CTL活性 : AxCANCre投与後7日目の脾細胞によるHCV蛋白質発現細胞に対する細胞障害活性を測定した。その結果を図3に示す。BALB/c、C57BL/6、C3H/HeのどのストレインでもHCV特異的CTL活性を検出することができた。

CTLの標的抗原 : コア、E1、E2、NS2蛋白質を個別に発現する細胞を標的としてCTL活性を測定した。その結果を表1にまとめた。コアはH2に関わらず標的とはならなかった。しかし、NS2は調べた3種類のH2すべてで標的となることが判明した。

HCV特異的CTLの交差反応性 :

トランスジェニックマウスに誘導されたCTLの他のHCV株に対する交差反応性を検討した。用いたのは遺伝子型1 a、1 b、2 aのHCV株である。トランスジェニックマウスのトランスジーンは1 bに属するR 6株で、R 6株と他のHCV株とのアミノ酸レベルでのホモロジーは1 bで91.3%、1 aで82.9%、2 aで67.5%であった。BALB/cおよびC57BL/6でCTL活性を測定した。結果を表3にまとめた。同じ遺伝子型1 bのHCV株に対しては反応したが、1 aおよび2 aのHCV株に対しては反応しなかった。

D. 考察

HCVによる肝障害の主なエフェクターはCTLであると考えられる。また、急性感染期により多くのエピソードに対するCTLが誘導されることがウイルス排除につながると考えられている⁸⁾。本研究においてトランスジェニックマウスの肝障害モデルで誘導されるCTLの標的となるウイルス蛋白質はマウスのH2により異なることが判明した。コア蛋白質は今回検討した3種類のH2では標的とならなかった。コア蛋白質に対するCTL活性はこれまでによく研究されてきている。我々も、コア領域遺伝子を用いて、BALB/cマウ

スにCTLが誘導できることを報告した⁹⁾。しかし、今回はコアに対するCTL活性は検出できなかった。この理由は不明だが、コア単独ではなくE1、E2、NS2などと、共に免疫されるとより強い標的抗原のみに対するCTLが誘導された可能性が考えられる。また、NS2はすべてのH2でCTLが誘導された。以上の結果から、CTLワクチンの設計において、コア、E1、E2、NS2などを単独の免疫源としてではなくより大きな領域を用いた方がよいと考えられる。近年開発されたヒトHLAトランスジェニックマウスを用いてヒトHLAでのCTLの拘束性をマウスで解析することが可能となった¹⁰⁾。我々のマウスモデルにおいても、HLAトランスジェニックマウスを導入して、HCVのCTLをさらに解析する予定である。

また、誘導されたCTLの他のHCV株に対する交差反応性の検討では同じ遺伝子型1 bのHCV株にはCTLは反応したが、1 a、2 aの株には反応しなかった。これはアミノ酸レベルでのホモロジーとの関係が考えられる。さらにウイルス株を増やして検討する必要があるが、遺伝子型が同じ場合はCTLに対する反応性が保存されていることが示唆さ