

明らかとなった。また、JFH-1 株のレプリコンは Huh7 細胞以外の肝癌細胞 (HepG2 および IMYN9 細胞) や非肝癌細胞 (HeLa および 293 細胞) でも複製可能であることが判明した。さらに JFH-1 株のインターフェロンの感受性を検討すると遺伝子型 1b のレプリコンよりもインターフェロンに抵抗性を示した。

D. 考察

HCVRNA は劇症肝炎株を用いることにより、効率良く複製できることが判明した。特に JFH-1 株は複製効率が高く、様々な細胞で複製が可能であり、HCVRNA 複製機構の解析や抗ウイルス薬の開発に有用な実験系になると考えられる。インターフェロンの感受性が臨床のデータと異なることに関してはさらに解析を進める必要がある。

E. 結論

遺伝子型 2a の HCV レプリコンの複製に関して解析した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, Wakita T. Efficient Replication of the Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic

Replicon. *Gastroenterology*

2003, 125:1808-1817.

2) Takaku S, Nakagawa Y, Shimizu M, Norose Y, Maruyama I, Wakita T, Takano T, Kohara M, Takahashi H. Induction of hepatic injury by hepatitis C virus-specific CD8⁺ murine cytotoxic T lymphocytes in transgenic mice expressing the viral structural genes. *Biochem Biophys Res Commun.*

2003 301:330-337

3) Zhao Z, Wakita T, Yasui K.

Inoculation of plasmids encoding Japanese encephalitis virus PrM-E proteins with colloidal gold elicits a protective immune response in BALB/c mice. *J Virol* 2003 77:4248-4260

4) Kato T, Miyamoto M, Furusaka A, Date T, Yasui K, Kato J, Matsushima S, Komatsu T, Wakita T. Processing of Hepatitis C Virus Core Protein is regulated by its C-terminal Sequence. *J Med Virol* 2003 69:357-366

2. 学会発表

1) 脇田隆字、伊達朋子、加藤孝宣、宮本道子、遺伝子型 2a の C 型肝炎ウイルスレプリコンの複製、日本ウイルス学会題 5 1 回学術集会、京都 (2003, 10.28)

2) 宮本道子、加藤孝宣、伊達朋子、脇田隆字、遺伝子型 1b と 2a の C 型肝炎ウイルスレプリコンの比較、日本ウイルス学会第 5 1 回学術集会、京都 (2003, 10.28)

3) 加藤孝宣、脇田隆字, HCV Genotype 2a Replicon System の構築, 第7回日本肝臓学会大会 シンポジウム 肝炎ウイルスの新展開, 大阪 (2003, 10.16)

4)

Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Wakita, T., Efficient replication of hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon isolated from fulminant hepatitis, 54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 米国、ボストン (2003, 10.26)

5) Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Yasui, K., Wakita, T., Efficient replication of hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon in hepatic and non hepatic cultured cell lines., 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 京都 (2003, 12.3)

6) Wakita, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Yasui, K., Comparison of genotype 1b and 2a hepatitis C virus subgenomic replicons., 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 京都 (2003, 12.10)

H. 知的財産出願状況

1. 特願 2003-148242 遺伝子型 2a の C 型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム由来の核酸を含む核酸構築物、及び該核酸構築物を導入した細胞

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

インターフェロン抵抗性 HCV レプリコン細胞株に関する研究

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：これまでに樹立された HCV レプリコン細胞はいずれもインターフェロン (IFN) に高感受性を示す。しかし、この性質と C 型慢性肝炎患者体内に存在する HCV が IFN 抵抗性を示す事実とは大きく解離している。この解離の理由を明らかにし IFN の有効な使用法の開発を目的として、IFN に高感受性を示すレプリコン細胞から IFN 抵抗性レプリコン細胞の樹立を試みた。50-1 レプリコン細胞に低用量の IFN- α を長期間 (半年) に渡って添加しても、G418 耐性を保ったまま増殖してくる細胞を選択した。選択された細胞由来の RNA を再度 Huh-7 細胞に導入して、再び G418 耐性コロニーを作成する作業を行った。得られたコロニーに対して添加する IFN の濃度を徐々に上げていくことにより IFN 抵抗性細胞を選択した。その結果、1000 IU/ml 以上の IFN- α 、或いは IFN- α 存在下でも G418 耐性を保ったまま増殖する細胞がそれぞれ 5 種類および 4 種類得られた。得られた IFN 抵抗性細胞では IFN のシグナルが伝わりにくくなっており、レプリコンの遺伝子解析の結果、IFN 抵抗性クローンに共通した変異の存在を明らかにした。

A. 研究目的

HCV レプリコンシステムは 1999 年に初めて登場して以来、HCV の複製増殖機構や癌化機構の解析や HCV 特異的薬剤の開発のために有用な実験系になっている。これまでに、1b 遺伝子型のもの 4 系統、1a 遺伝子型のもの 1 系統の樹立が報告されており、このうちの 2 系統 (50-1 および 1B-2R1) は我々のグループが独自に樹立に成功したものである。しかしながら、これまでに樹立されたレプリコン細胞はいずれもインターフェロン (IFN) に高感受性を示し、わずかに数国際単位 (IU) の IFN 添加によっても細胞内のレプリコン RNA 量は著しく低下することが明らかになっている。この現象は、C 型慢性肝炎患者体内で増殖している HCV が IFN に抵抗性を示す事実とは大きく解離している。

この解離の理由を明らかにすることは、IFN による治療効果を高めるためにも、非常に重要であると考えられる。我々が樹立したレプリコン細胞は IFN に高感受性を示すが、IFN の持続的感作により IFN 抵抗性への変化が起こるのではないかと考えた。また、IFN 抵抗性レプリコン細胞を樹立して、IFN 高感受性レプリコン細胞との詳細な比較解析を行うことにより、IFN 抵抗性獲得機序の解明や IFN の抗 HCV 作用機序の解明ができるのではないかと考えた。そこで、今年度は、50-1 レプリコン細胞から IFN 抵抗性レプリコン細胞の樹立を行い、得られたレプリコン細胞の性状解析を行った。

B. 研究方法

平成 14 年度に京都大ウイルス研究所の下遠野邦忠教授との共同研究により開発し

た HCV レプリコン細胞 (50-1) に 100 IU/ml の IFN- α を 4-5 日置きに添加し、G418 存在下、数カ月間に渡って細胞を培養した。

細胞よりレプリコン RNA を含む total RNA を回収して、ヒト肝 Huh-7 細胞内に electroporation により導入して G418 抵抗性細胞のコロニーを形成させた。

レプリコン細胞内のレプリコン RNA の量は半定量的 RT-PCR 法により解析した。レプリコン由来の HCV 蛋白質は、抗 NS5B 抗体を用いた Western blot 解析により検出した。

レプリコン細胞への IFN 処理は、長期に及ぶ場合は、4 日ごとの培地交換に合わせて所定の濃度になるように添加した。

レプリコン RNA の量的解析を行う場合は、IFN 添加後 2 日目の RNA を用いた。NS5B 蛋白質の量的解析を行う場合は IFN 添加後 5 日目の蛋白質を用いた。

レプリコン細胞から RNA を調製し、fidelity の高い KOD-plus DNA polymerase を用いた RT-PCR 法によりレプリコン RNA を増幅回収した。増幅産物（前半部の Neo^r や IRES などを含む 2 kb と後半部の HCV NS 領域を含む 6 kb）を pBR322 ベクターにクローン化しそれらの塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのため倫理面への配慮は特に必要がない。

C. 研究成果

低用量の IFN- α を持続的に数カ月間作

用させ経代培養（5ヶ月間）を繰り返すことにより生き残った細胞からレプリコン RNA を含む total RNA を回収した。Huh-7 細胞にこの RNA を再度導入して G418 で選択することにより G418 抵抗性の細胞コロニーを多数得た。これらのコロニーをプールして、IFN- \cdot や \cdot の濃度を徐々に増加させ、生き残る細胞の選択作業を行った。その結果、最終的に IFN- \cdot (1,000-2,000 IU/ml) に抵抗性を示す 5 系統 (1 \cdot R, 3 \cdot R, 4 \cdot R, 5 \cdot R および R2 \cdot R) と IFN- \cdot (1,000 IU/ml) に抵抗性を示す 4 系統 (1 \cdot R, 3 \cdot R, 4 \cdot R および 5 \cdot R) の細胞が得られた。

得られた IFN 抵抗性レプリコン細胞のそれぞれの系統に 500 IU/ml の IFN- \cdot と IFN- \cdot をそれぞれ添加して IFN 抵抗性の程度を解析した。親株の 50-1 細胞を IFN 高感受性細胞として解析に用いた。その結果、1 \cdot R, 3 \cdot R, 4 \cdot R, 5 \cdot R および R2 \cdot R 細胞では IFN 添加後レプリコン RNA や NS5B 蛋白質量は低下するものの、50-1 細胞に比較して低下率が低いことが確認された。さらに、1 \cdot R, 3 \cdot R, 4 \cdot R および 5 \cdot R 細胞では、IFN- \cdot や IFN- \cdot 添加によるレプリコン RNA や NS5B 蛋白質量の低下がわずかであることが分かり、これらの系統では、ほぼ完全に IFN 抵抗性を示すことが判った。

得られた IFN 抵抗性レプリコン細胞における IFN 抵抗性がウイルス側因子に起因する可能性を考え、IFN 抵抗性レプリコン RNA にのみ見られる特異配列がないかどうかを検討した。それぞれのレプリコン細胞から得られたそれぞれ 3 クローンについて塩基配列を決定し、original

の配列 (pNNRZ2RU) や単純継代培養 (12 ヶ月) により得られた塩基配列と比較した。その結果、NS4B 領域に単純継代培養を 12 ヶ月間行っても出現しない変異が 1箇所認められた。それ以外には、IFN- γ 抵抗性レプリコンにのみ NS5A 領域にそれぞれの系統に特異なアミノ酸置換が認められた。

次に、これらの IFN 抵抗性レプリコン細胞において IFN のシグナルが伝わるかどうかを ISRE 配列を有する promoter を用いた luciferase reporter assay を行った。その結果、IFN- γ や IFN- β の処理により、50-1 や \cdot R シリーズの細胞では、数百倍 luciferase の活性が上昇したが、1 \cdot R、4 \cdot R および 5 \cdot R ではまったく luciferase の活性上昇が認められず、IFN に応答しないことが分った。ただ、3 \cdot R では 100-200 倍 luciferase の活性上昇があり

1 \cdot R などとは少し異なっていた。

そこで、これらの \cdot R シリーズについて、IFN が受容体に結合した後に sequential に起こる JAK-STAT 系因子のリン酸化状態がどうなっているかを、Western blotting 法により調べた。その結果、luciferase reporter assay の結果とほぼ一致して、1 \cdot R、4 \cdot R および 5 \cdot R では IFN を添加しても JAK1、Tyk2、STAT1 および STAT3 のリン酸化はほとんど起こらなかったが、3 \cdot R では弱いリン酸化が認められた。従って、 \cdot R シリーズでは IFN のシグナルが細胞内にほとんど伝わらないことが分った。

NS4B と NS5A 蛋白質の変化が IFN 抵抗性の獲得に寄与しているかどうかを検討す

るために、1 \cdot R 細胞由来のレプリコン RNA を人工的に作成して、親株の Huh-7 細胞に導入し、G418 耐性のコロニーを作成した。得られたコロニーをプールした細胞と親株の 50-1 細胞を 10^5 個用意して、これらの細胞に G418 存在下、400 IU/ml の IFN- γ を 4 日置きに添加したところ、1 ヶ月後、50-1 細胞の方はすべて死滅したが、1 \cdot R 細胞由来のレプリコン RNA を導入した細胞の場合には、IFN- γ に抵抗性のコロニーが得られてくることが分った。このことから、ウイルス側因子が IFN 抵抗性の獲得を容易にしていることが示唆された。

D. 考察

これまでに開発された HCV レプリコン細胞はすべて IFN に高感受性であることから、実際の肝炎患者体内に存在する IFN 抵抗性の HCV に対するモデル系とはなりにくい一面があったが、今回樹立に成功した IFN 抵抗性を示すレプリコン細胞は IFN の改良或いは併用を目的とした薬剤の有用なスクリーニング系になるものと考えられる。しかしながら、3 \cdot R 以外で IFN- γ や IFN- β に強く抵抗性を示すレプリコン細胞では IFN のシグナルがまったく伝わらない状況になっていることから、この現象が IFN 抵抗性レプリコンに認められた NS4B や NS5A 領域における変異によるものであるかどうかを明らかにする必要がある。1 \cdot R 由来のレプリコンを作成して細胞に導入した今回の実験では、IFN 抵抗性の獲得に NS4B や NS5A 領域の変異が関与していることが示唆される結果を得たが、最終的な結論を得るためには、他の 3 \cdot R、4 \cdot R 或いは

5・Rでも同様の結果が得られるかどうかを調べる必要があり、現在、この点を検討中である。今回樹立した IFN 抵抗性レプリコン細胞を用いて抵抗性獲得の分子機構を明らかにすることは、HCV を効率よく排除する新たな方法の開発につながるものと期待される。

E. 結論

IFN- α や β に著しく抵抗性を示す HCV レプリコン細胞の樹立に成功した。

IFN-抵抗性を示すレプリコンに共通の変異が NS4B 領域に見い出された。

IFN- α 抵抗性レプリコン細胞においては、IFN のシグナルが伝わらないように変異していることが分った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Naganuma, A., Dansako, H., Nakamura, T., Nozaki, A., and Kato, N. Promotion of microsarellite instability by hepatitis C virus core protein in human non-neoplastic hepatocyte cells. *Cancer Res.*, (2004) in press.
2. Kato, N., Sugiyama, K., Namba, H., Dansako, H., Nakamura, T., Takami, M., Naka, K., Nozaki, A., and Shimotohno, K. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2003) 306, 756-766.
3. Suzuki, K., Aoki, K., Ohnami,

S., Yoshida, T., Kazui, T., Kato, N., Inoue, K., Kohara, M., and Yoshida, T. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon alpha improves dimethinitro-samine-induced liver cirrhosis in rat model. *Gene Ther.*, (2003) 10, 765-773.

4. Suzuki, K., Aoki, K., Ohnami, S., Yoshida, K., Kazui, T., Kato, N., Inoue, K., Kohara, M., and Yoshida, T. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon α inhibits hepatitis C virus replication in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2003) 307, 814-819 (2003)
5. Nozaki, A., Ikeda, M., Naganuma, A., Nakamura, T., Inudoh, M., Tanaka, K., and Kato, N. Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. *J. Biol. Chem.*, (2003) 278, 10162-10173.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

C型肝炎ウイルスタンパク質の複製および細胞増殖に及ぼす機能解析

分担研究者 下遠野 邦忠 京都大学ウイルス研究所

研究要旨：HCV タンパク質のうち、コアタンパク質による細胞増殖に対する影響を解析してコアがホルモンによる細胞増殖の制御に関与することを明らかにした。また、HCV ゲノム複製培養細胞を樹立しそれを用いて抗ウイルス活性を示す物質の探索を行った。その結果、臓器移植の際に汎用されている免疫抑制作用物質のひとつであるサイクロスポリンに抗 HCV 作用があることを見出した。また、抗 HCV 作用はサイクロスポリンの免疫抑制作用によるのではなく、サイクロスポリンの持つ別の機能によることを明らかにした。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染による肝疾患はわが国の肝臓疾患の8割を占めており、国民病ともいわれるほどになっている。毎年、約3万人近くがHCV感染と考えられる肝臓がんで死亡している。さらにはHCV感染と関連する肝硬変、あるいは肝疾患以外の病気により日常的な生活を犠牲にしているHCV感染者もいる。このような状況の下で、本研究分担者はHCV感染がどのようにして感染細胞の増殖を変化させるか、また、HCV感染を遮断する方法の開発に向けた研究を行うために、HCVの複製を解析する系の開発を目的とした。

B. 研究方法

(1) HCVタンパク質のうち、コアタンパク質について細胞増殖制御の観点から解析を行う。コアタンパク質についてはこれまでに、細胞のアポトーシスを抑制する働きがあることを示してきたが、昨年度にはホルモン（レチノイド）処理したコア発現細胞においてはアポトーシスを亢進することを見出した。この効果がコアタンパク質の何により引き起こされるかについての解析を進める。

(2) HCVゲノム自己複製細胞の樹立とそれを用いたウイルスゲノム複製機構の解析。

HCVゲノムが自己複製する細胞を樹立した。この細胞を用いてウイルス複製の分子機構を解明することを試みている。本年度には本HCV自己複製細胞を用いてウイルスの増殖を抑制する働きのある薬剤の探索をおこなう。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材

料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのため倫理面への配慮は特に必要がない。

C. 研究成果

(1) HCVコアタンパク質によるアポトーシスの誘導と核内転写因子の活性化

コアタンパク質による細胞増殖制御のうち、NF- κ B活性化機構についてこれまでに集中的に解析を行い、コアタンパク質が小胞体膜上に局在することが本転写因子の活性化に重要であることを見出している。HCVタンパク質産生細胞におけるアポトーシス感受性に関する研究を進めている過程でレチノイン酸のひとつ all trans retinoic acid (ATRA) がコア産生細胞のアポトーシスを強く促進することを見出した。コアタンパク質によるアポトーシスの亢進作用を解析し、コアが核内受容体の一種を活性化すること、その活性化には細胞性因子のSP110bの機能阻害を介することなどを明らかにした。これまでにコアタンパク質を発現するトランスジェニックマウスにおいては肝がんの発症が観察されている。この肝がんの発症には脂肪代謝異常が見られる。コアによる核内ホルモン受容体の活性化、その下流に位置する脂肪代謝に関する遺伝子の活性化を考えると、コアを発現するトランスジェニックマウスにおける肝がん機構のひとつとして核内ホルモン受容体の活性化が考えられる。

(2) HCVゲノム自己複製細胞を用いたHCVゲノム複製の分子機構の解析および抗HCV作用物質の探索。

D. 考察

コアタンパク質および NS5A が細胞の増殖に対してプラスに働いていることを示した。コアはアポトーシス抑制作用を小胞体膜上に局在し、NF- κ B を活性化することにより働く。コアによる NF- κ B 活性化が HCV 感染による肝炎などの疾患とどのように関連するかは明らかでないが、本転写因子の活性化は細胞を増殖の方向にむけるので、ウイルスの持続感染と関連するかも知れない。肝がん細胞などでは NF- κ B が活性化されている場合が多いので、HCV の感染が病態の変化に NF- κ B の活性化を通して寄与している可能性が考えられる。もしそうだとしたら、NF- κ B の活性を肝がん特異的に抑制させることは病気の治癒あるいは緩和に役立つかも知れない。NS5A が PKR の機能を抑制する反面 PKR が NS5A の機能をリン酸化を通して逆に抑えていることを示唆する成果は、インターフェロンによる治療を考えるとき重要である。インターフェロンを中心とした慢性肝炎の治療は今後もしばらくの間継続すると考えられるが PKR が NS5A を機能的抑制するとするならば、この抑制作用を抑える働きを持つ薬剤の開発が有効であると期待される。そのためには PKR によりどのようにして NS5A の機能が抑制されるかについての解析が必要になる。

E. 結論

HCV たんぱく質コアおよび NS5A が細胞の増殖に及ぼす影響を調べて、異なるルートを使って細胞の増殖にプラスに働いていることを示した。また、これらの経路を遮断あるいは抑制することができれば疾患の予防あるいはある程度の治療効果を上げる可能性があると考えられる。これらの情報を蓄積することにより疾患に対する予防、治療の開発に道が拓かれるようになると期待されるので、HCV の他のタンパク質についても細胞増殖との関連で解析を進めてゆく必要があると考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology.* 38 :1282-1288. 2003
2. Watashi K, Hijikata M, Tagawa A, Doi T, Marusawa H, Shimotohno K. Modulation of retinoid signaling by a cytoplasmic viral protein via sequestration of Sp110b, a potent transcriptional corepressor of retinoic acid receptor, from the nucleus. *Mol Cell Biol.* 23 :7498-7509. 2003
3. Kato N, Sugiyama K, Namba K, Dansako H, Nakamura T, Takami M, Naka K, Nozaki A, Shimotohno K. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 306:756-66.
4. Miyanari Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotohno K. Hepatitis C virus Non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral RNA replication. *J Biol Chem.* 2003
5. Ohshima T, Shimotohno K. TGF- β mediated signaling via the p38 MAP kinase pathway activates Smad-dependent transcription through SUMO-1 modification of Smad4. *J Biol Chem.* 2003

H. 知的所有権の取得状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（分担）研究報告書

樹状細胞サブセットに対する C 型慢性肝炎ウイルス感染機構の解析
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：Pseudo-HCV や患者血清中 HCV は樹状細胞(DC)サブセットのミエロイド DC に感染し、プラズマサイトイド DC には感染しないことが明らかになった。これは C 型慢性肝炎患者で認められる DC の減少や機能の低下機序として重要である。

A. 研究目的

樹状細胞 (DC) には機能的に異なる myeloid DC (MDC) と plasmacytoid DC (PDC) のサブセットが存在する。C 型肝炎患者で末梢血の MDC、PDC が数的・機能的に低下する機序として HCV の DC への感染が想定されるが、各サブセットへの tropism などの詳細は明らかでない。本研究では、HCV の E1E2 蛋白を介した細胞への侵入を評価できる擬似 HCV (pseudo HCV) を用いて DC サブセットへの感染性を明らかにし、HCV の DC への感染に関与する分子の性質と感染を制御する方法を解明することを目的とした。

B. 研究方法

Pseudo HCV は HCV の E1E2 を envelope とし、vesicular stomatitis virus の遺伝子に GFP が組み込まれている。非感染者の血液から分離した単球、MDC、PDC、またそれぞれをサイトカイン存在下で分化成熟させた DC に pseudo HCV を添加し 24 時間後、蛍光顕微鏡と FACS にて GFP 陽性細胞 (pseudo HCV 感染細胞) を検出した。また患者血清中の HCV を同様に添加し、24 時間後 DC 中の HCV RNA を Real-time PCR にて定量した。CD34 陽性細胞、肝癌細胞 (HepG2) にも同様の検討を行った。(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

検討した細胞種では pseudo HCV は HepG2 (GFP 陽性細胞 80-90%)、MDC (20-25%) と単球由来 DC (MoDC) (1-9%) に感染したが、PDC、CD34 陽性細胞や他の血球細胞には感染しなかった (<0.2%)。患者由来の HCV でも同様に MDC への感染が確認された。HCV の DC への感染防御を目的としてサイトカイン等をウイルス添加前に加えると、CpG オリゴ、CD40 リガンドにより MDC への感染が抑制された。また mannan は濃度依存性に HCV の MDC への感染を抑制したが、HepG2 への感染には影響しなかった。これより MDC に発現するレクチンが HCV の感染に重要であり、HCV の感染機序は MDC と肝癌細胞とで異なることが明らかになった。

D.E. 考察、結論

HCV は血中の免疫細胞の中で MDC に選択的に感染し、MDC の減少や機能低下の原因となることが示唆された。また CpG オリゴなどにより MDC を HCV 感染から保護することで、C 型肝炎患者における抗 HCV 免疫応答を賦活化できる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表：第7回日本肝臓病学会大会 (大阪、2003年)

G. 知的所有権の取得状況
なし。

C型肝炎と糖代謝異常に関する研究

分担研究者 小池和彦 東京大学医学部（病）・助教授

研究要旨：疫学的研究によってC型慢性肝炎と2型糖尿病の関連性が示唆されているが、肥満、加齢、肝硬変といった要素の存在のため、HCVとDMの明確な関連性は示されていない。HCV遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(TgM)を用いてこれらの関連性を検討した。コア遺伝子TgMでは、1-2ヶ月齢の若齢から正常マウスに比べて有意なインスリン抵抗性を示した。血糖値は正常マウスに比べて高めであったが有意差はなかった。しかし、高脂肪食負荷を加えることによってコア遺伝子TgMは糖尿病を発症した。コア遺伝子TgMにおけるインスリン抵抗性は主として肝由来であり、インスリンによるインスリン受容体基質(IRS)-1のチロシンリン酸化の抑制が認められた。抗TNF- α 抗体の投与によってインスリン抵抗性は改善し、C型肝炎におけるTNF- α の高値が原因のひとつと考えられた。HCV蛋白とインスリン抵抗性のダイレクトな関連性が示された。肝発がんを含めたC型慢性肝炎患者の病態解明において極めて重要な所見と考えられる。

A. 研究目的

疫学的研究によってC型慢性肝炎と2型糖尿病の関連性が示唆されているが、肥満、加齢、肝硬変といった要素の存在のため、HCVとDMの明確な関連性は示されていない。また、その発生機序については全く不明であり、ヒトでの臨床疫学的検討では機序解明に迫ることは難しい。我々はHCVコア遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(TgM)を樹立し、C型肝炎における病態を検討してきている。このマウスモデルを用いてC型肝炎における糖代謝を検討し、C型肝炎と糖代謝異常との関連性を明らかにする。糖尿病は、現在、生活習慣病として社会的に大きな問題となっているが、C型肝炎によるインスリン抵抗性・糖尿病発生の機序を明らかにすることで、その予防も可能となり厚生労働行政上の意義は極めて大きいと考えられる。

B. 方法

HCVのコア遺伝子を導入されたトランスジェニックマウスを用いて、糖代謝に関して以下のような解析を行なった。

マウスはSPF下で通常の餌を与えられた。対照として正常littermateが用いられた。必要に応じて高カロリー（脂肪）食（Oriental Yeast Co, Ltd. Tokyo, Japan）を2ヶ月間与えた。カロリーは高カロリー食では4.70 kcal/g、普通食は3.56 kcal/gであった。グルコース負荷テスト、インスリン負荷テスト、骨格筋によるグルコースの取り込み試験、高インスリン正常血糖クランプ法がグルコース代謝の解析のために行われた。

なお、動物実験にあたっては、当施設のガイドラインに則り動物愛護上の配慮を十分に払い、倫理面で問題が生じないように行なった。

C. 結果

コア遺伝子 TgM においては、血糖値は正常マウスに比べて高めであったが有意差はなかった。しかし、1-2ヶ月齢の若齢から正常マウスに比べて有意な高インスリン血症を示し、インスリン負荷試験にて有意なインスリン抵抗性を示した。さらに、高脂肪食負荷を加えることによってコア遺伝子 TgM は糖尿病を発症した。

コア遺伝子 TgM におけるインスリン抵抗性は主として中心性（肝性）であり末梢性（筋性）の因子は認められなかった。肝においてインスリン受容体基質 (IRS)-1 のインスリンによるチロシンリン酸化が抑制されていた。ヒト慢性 C 型肝炎患者と同様に、コア遺伝子 TgM の肝では TNF- α が高値を示した。抗 TNF- α 抗体の投与によってインスリン抵抗性は改善し、TNF- α の高値が C 型肝炎における原因のひとつと考えられた。

D. 考察

疫学的研究によって C 型慢性肝炎と 2 型糖尿病の関連性が示唆されているが、肥満、加齢、肝硬変といった要素の存在のため、HCV と DM の明確な関連性は示されていない。今回の私達の検討によって、HCV 蛋白とインスリン抵抗性のダイレクトな関連性が示された。最近の NASH (非アルコール性脂肪性肝炎) の研究などから、インスリン抵抗性が肝線維化に一定の作用をもつことが推定されている。また、慢性 C 型肝炎においてもインスリン抵抗性と肝線維化の間に関連性があるとする報告もあり、インスリン抵抗性と C 型肝炎の問題は病態に密接に関連した重要な事象と考えられる。肝発がんを含めた C 型慢性肝炎患者の病態解明において極めて重要な所見と考えられ、今後の更なる検討が待たれるところである。

E. 結論

HCV 感染症とインスリン抵抗性との直接的な関連性が示された。C 型肝炎の病態開明に極めて重要な発見といえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T. Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology* 38:820-828, 2003.

2) Moriishi K, Okabayashi T, Nakai K, Moriya K, Koike K, Murata K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki R, Miyamura T, Matsuura Y. PA28 γ -dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. *J Virol* 77:10237-10249, 2003.

3) Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004 in press.

2. 学会発表

1) Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, Yoshiharu Matsuura: PA28 γ -Dependent Nuclear Retention and Degradation of HCV Core Protein, p41, 10th

International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses, Kyoto, 2003

- 2) Kyoji Moriya, Ai Tajima, Takeya Tsutsumi, Kousei Ito, Toshiharu Horie, Kazuhiko Koike: Hepatitis C Virus Core Protein Insults Mitochondrial Function Through Reducing the ETS Complex 1 Activity, p73, 10th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses, Kyoto, 2003
- 3) Hideyuki Miyoshi, Hajime Fujie, Kyoji Moriya, Yoshizumi Shintani, Takeya Tsutsumi, Seiko Shinzawa, Kazuhiko Koike: Hepatitis C Virus Core Protein Selectively Exerts an Inhibitory Effect on Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-1 Gene Expression, p190, 10th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses, Kyoto, 2003
- 4) 小池和彦 シンポジウム HIV・HCV重複感染症の治療 第17回日本エイズ学会 2003年 神戸
- 5) 三好秀征、藤江 肇、森屋恭爾、新谷良澄、堤武也、小池和彦、木村 哲. HCV コア蛋白のSOC-1 遺伝子発現への関与についての検討. 39回日本肝臓学会総会 2003年 福岡
- 6) 藤江 肇、森屋恭爾、新谷良澄、三好秀征、堤武也、小池和彦. C型肝炎ウイルスコア遺伝子によるインスリン抵抗性の検討. 第7回日本肝臓学会大会 2003年 大阪
- 7) 小池和彦. HCVによる肝発がん機構. 62回日本癌学会総会 2003年 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

C型慢性肝炎への IFN/Rib 併用療法時の HCV dynamics の有用性

分担研究者 岡上 武 京都府立医科大学消化器病態制御学 教授

研究要旨：IFN/Rib 併用療法を行った C 型慢性肝炎患者 65 例を対象とし、治療開始 24 時間後の HCV RNA 量や 24 時間までの HCV RNA の減少度が治療効果予測判定に有用か否かを検討した。Group 1 の患者では、治療開始 24 時間後の HCV RNA 量が 5 KIU/ml 未満の症例では著効予測率（PPV）が 66.7%、無効予測率（NPV）が 86.0%、200 KIU/ml 未満の症例では NPV が 100%であり、24 時間までの HCV RNA の減少度が 1.2 log 以上の症例では PPV が 36.8%、NPV が 90.0%であった。Group 2 の患者では、治療開始 24 時間後の HCV RNA 量が 50 KIU/ml 未満の症例は PPV が 100%、NPV が 75.0%、24 時間までの HCV RNA の減少度が 1.0 log 以上の症例では PPV が 100%、NPV が 50.0%であった。Group 1 の症例のうち、NS5A 領域の変異株と野生株との間で 24 時間までの HCV RNA の減少度に差はなかった。IFN/Rib 併用療法において治療開始 24 時間後の HCV RNA 量は、特に Group 1 では無効、Group 2 では著効例の予測において有用であると考えられた。

A. 研究目的

日本では平成 13 年年末より IFN/Rib 併用療法が始まっており、genotype が 1b でウイルス量が 100 KIU/ml を超える、いわゆる、難治性の C 型慢性肝炎(CH-C)症例の約 20%において著効が得られることが報告されている。

IFN/Rib 併用療法の早期効果予測においては、治療開始 1 か月後、3 か月後までに末梢血中の HCV RNA が消失するか否かが重要視されており、現在、

臨床の場で広く応用されている。一方、医療経済的な面から、また、無用な副作用を避けるためには、できる限り早期に治療効果予測をたてることが有用であると考えられる。

本年度の研究目的は、IFN/Rib 併用療法を行った CH-C 患者で、治療開始 24 時間後の HCV RNA 量や 24 時間までの HCV RNA の減少度が治療効果予測判定に有用か否かを検討することである。

B. 研究方法

IFN/Rib 併用療法を行った C 型慢性

肝炎患者 65 例で HCV dynamics の検討を行った。すなわち、IFN/Rib 併用治療開始前、6、12、48 時間、4、7、14 日、1、3 か月後に採血し、リアルタイム PCR 法で HCV RNA を定量した。

さらに、genotype が 1b の 26 例において、治療開始直前の末梢血より血清を採取し Enomoto らの方法に従って HCV-J を wild type とした場合の NS5A の C 末端領域に存在する ISDR (2209 ~ 2248) のアミノ酸変異数を測定した。

(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

治療開始から 24 時間までの第 1 相と 24 時間以降 3 か月までの第 2 相における HCV RNA の半減期を HCV 遺伝子グループ別に検討した。結果、グルー

プ 1 における dynamics の第 1 相および第 2 相の半減期は、SVR 群では non-SVR 群と比べて有意に短縮していた。グループ 2 においても結果は同様で、HCV RNA の半減期は SVR 群では non-SVR 群と比べて有意に短縮していた。

次に、治療開始 1 か月の HCV RNA 定性陰性 [HCV 1M(-)] と dynamics 第 2 相の半減期が治療効果予測に役立つか否かについて HCV 遺伝子のグループ別に検討した。[HCV 1M(-)] の著効予測率 (PPV) は 62.5%、無効予測率 (NPV) は 90.2% であった。dynamics 第 2 相の半減期は、4 日をカットオフ値とすると、PPV が 40.0%、NPV が 90.6% であった (表 1)。

開始 24 時間後の HCV RNA 量は、5 KIU/ml をカットオフ値に設定すると PPV が 66.7%、NPV が 86.0% であった (表 2)。しかし、カットオフ値を 200 KIU/ml に設定すると PPV が 30.3%、NPV が 100% であった (表 3)。開始前のウイルス量に対する 24 時間めの減少度は、1.2 log をカットオフ値とすると、PPV が 36.8%、NPV が 90.0% であり、第 1 相の半減期はカットオフ値を 7 時間未満と設定すると、PPV が 32.0%、NPV が 91.7% であった。(表 2)

グループ2では、[HCV 1M(-)]群の PPV が 100%、NPV が 50%であり、第2相の半減期が10日未満の群では PPV が 90.9%、NPV が 66.7%であった(表4)。治療開始24時間後の HCV RNA 量を 50KIU/ml をカットオフ値に設定すると、PPV が 100%、NPV が 75%であった。ウイルスの減少度を 1.0 log をカットオフ値にすると、PPV が 100%、NPV が 50%であり、半減期をカットオフ値7時間に設定すると、PPV が 100%、NPV が 60%であった(表5)。

グループ1の症例のうち、NS5A領域の変異株と野生株との間で治療開始24時間後までの HCV RNA の減少度に差は認めなかった。

D. 考案

グループ1の症例では、治療開始24時間後の HCV RNA 量からは、[HCV 1M(-)]に近い PPV と NPV が得られた。しかし、治療開始24時間後の効果予測パラメーターは全て PPV が 30~60%台と低く、かつ、NPV が 90%前後と高かった。これより、24時間後の血清 HCV RNA 量の測定は、特に、グループ1の症例において無効の予測に有用であると思われた。さらに、治療開始24時間後の HCV RNA 量を 200 KIU/ml をカットオフ値に設定することによ

り、NPV を 100%とすることが可能であった。

グループ2の症例における治療開始24時間後の効果予測パラメーターでは、[HCV 1M(-)]や第2相の半減期とほぼ同等の PPV、NPV が得られた。また、PPV が 100%であることより、特に著効の予測に有用であると思われた。

医療経済的な面から、また、無用な副作用を避ける意味でも治療効果の早期予測は重要な課題である。今回の検討結果は、IFN/Rib 併用療法の適応において重要な所見を与えるものと考えられた。

E. 結論

- 1) IFN/Rib 併用療法において Group 1 の症例では、治療開始24時間後の HCV RNA 量が 200 KIU/ml 以上の場合、NPV は 100%であった。
- 2) 同治療において Group 2 の症例では、治療開始24時間後の HCV RNA 量が 50KIU/ml 未満の場合、PPV が 100%であった。
- 3) IFN/Rib 併用療法を行った患者では、治療開始24時間の HCV RNA 量は [HCV 1M(-)] とほぼ同等の治療効果予測が期待でき、特に、Group 1 では無効、Group 2 では著効の判定に有用であると考えられた。

F. 研究発表

1 論文発表

1) Murakami Y, Minami M, Daimon Y, et al. Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol* 72(2): 203-214, 2004

2) Yamaguchi K, Itoh K, Ohnishi N, et al. Engineered long terminal repeats of retroviral vectors enhance transgene expression in hepatocytes in vitro and in vivo. *Mol Ther* 8(5): 796-803, 2003

3) Kirishima T, Okanoue T, Daimon Y, et al. Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *J Hepatol* 37(2): 259-265, 2002

4) Ohnishi N, Itoh K, Itoh Y, et al. High expression of transgenes mediated by hybrid retroviral vectors in hepatocytes: comparison of promoters from murine retroviruses in vitro and in vivo. *Gene Ther* 9(4):303-306, 2002

2 学会発表

1) 伊藤義人、牧山明子、岡上 武、他。難治性 C 型慢性肝炎に対するリバビリン併用 IFN 治療—HCV dynamics と Th1/Th2 バランスによる病態解析—。第 89 回日本消化器病学会総会、さいたま、2003.4.26

2) 牧山明子、伊藤義人、笠原彰紀、他。IFN 治療で著効を呈した C 型慢性肝炎からの肝

癌症例の検討。第 39 回日本肝臓学会総会
久留米、2003.5.23

3) 牧山明子、伊藤義人、国本晃司、他。C 型慢性肝炎の IFN+リバビリン併用治療開始早期(24 時間)の血清 HCV RNA 量および減少率からみた治療効果予測。第 7 回日本肝臓病学会大会、大阪、2003.10.16

4) Makiyama A, Itoh Y, Nakajima T, et al. First phase HCV kinetics in interferon and ribavirin combination therapy is an useful predictor of treatment response in chronic hepatitis C patients. 54th annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2003.10.28

G. 知的所有権の取得状況

なし

**表1 IFN/Rib併用療法における
HCV RNA dynamicsを用いたSVR予測 (Group 1)**

血清HCV RNA1か月定性

HCV RNA陰性

PPV 62.5% (5/8) 感度 50.0% (5/10)
 NPV 90.2% (37/41) 特異度 94.9% (36/39)

2nd phase(24H-3M)の半減期

Cut off 値 4日未満

PPV 40.0% (4/10) 感度 57.1% (4/7)
 NPV 90.6% (29/32) 特異度 82.9% (29/35)

表2 IFN/Rib併用療法における
開始24時間後のHCV RNA量を用いたSVR予測
(Group 1)

	PPV	NPV	感度	特異度
<u>HCV RNA量</u> Cut off値 5 KIU/ml未満	66.7% (4/6)	86.0% (37/43)	40.0% (4/10)	94.9% (37/39)
<u>HCV RNA減少度</u> Cut off 値 1.2 log以上	36.8% (7/19)	90.0% (27/30)	70.0% (7/10)	69.2% (27/39)
<u>1st phase半減期</u> Cut off 値 7 時間未満	32.0% (8/25)	91.7% (22/24)	80.0% (8/10)	56.4% (22/39)

表3 IFN/Rib併用療法における
開始24時間後のHCV RNA量を用いたSVR予測
(Group 1)

	PPV	NPV	感度	特異度
<u>HCV RNA量</u> Cut off値 200 KIU/ml未満	30.3% (10/33)	100% (16/16)	100% (10/10)	41.0% (16/39)

**表4 IFN/Rib併用療法における
HCV RNA dynamicsを用いたSVR予測 (Group 2)**

血清HCV RNA1か月定性

HCV RNA陰性

PPV 100% (10/10) 感度 76.9% (10/13)
NPV 50.0% (3/3) 特異度 100% (3/3)

2nd phase(24H-3M)の半減期

Cut off 値 10日未満

PPV 90.9% (10/11) 感度 90.9% (10/11)
NPV 66.7% (2/3) 特異度 66.7% (2/3)