

200400667A

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

B型及びC型肝炎ウイルスの新たな感染予防法の確立のための  
感染病態解明に関する研究

平成16年度 研究報告書

主任研究者 河田 純男

平成17年（2005）4月

## 目次

---

I. 総括研究報告	1
班長報告 (河田純男)	2
II. 分担研究報告	9
1. 岩手県におけるB型肝炎ウイルス (HBV) キャリア住 民のHBV遺伝子型とその臨床的特徴 (鈴木一幸)	10
2. C型肝炎ウイルスによるインスリン抵抗性発現の分子 機序 (佐田通夫)	14
3. HBV DNA と HBV コア関連抗原量測定による HBe 抗原セロコンバージョンの解析 (田中榮司)	24
4. HBVキャリアーのステージ分類とその経時的推移 (加藤道夫)	27
5. HBs抗原消失後のHBV関連ウイルスマーカーの変化 (荒瀬康司)	33
6. 全自動分析装置の改良 (大矢博昭)	35
7. 山形県A村におけるHCV抗体陽性者の死因に関する 検討 (新澤陽英)	40
6. 超高感度免疫測定法 (radical immunoassay) を用い た新規のHBs抗原測定の開発 (富樫 整)	42
7. C型肝炎ウイルスに対する感染防御遺伝子の検討 (斎藤貴史)	46
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	51
IV. 研究成果の刊行物・別刷	55

---

## I. 総括研究報告

B型及びC型肝炎ウイルスの新たな感染予防法の確立のための  
感染病態解明に関する研究

主任研究者 河田 純男 山形大学消化器病態制御内科学教授

---

研究要旨：B型及びC型肝炎ウイルスの感染病態を解明するために、本研究班ではとくに感染成立にかかわるウイルス要因と遺伝素因に着目した。

- (1) B型肝炎では低ウイルス量の感染病態を検討するために、新規蛋白定量法であるラジカルイムノアッセイ法を応用した HBs 抗原の超微量自動化測定法を開発した。本法により HBV DNA 量が10コピー/mlの低ウイルス量状態であっても HBs を高感度に検出可能になっている。今後の課題として本測定法の特異性の確立、実用化に向けた測定の迅速化および低ウイルス感染状態の臨床的意義を明らかにすることが挙げられる。
- (2) C型肝炎ではウイルス感染感受性遺伝子を明らかにし、感染防御さらには治療法開発へ資することを目指している。具体的には HCV 抗体陽性者を RNA 陽性（持続感染者）と RNA 陰性（既感染者）に分け、生体防御にかかわる遺伝子の SNP について検索した。その結果、候補として10遺伝子が挙げられた（SULT2B1, AP1B1, IFNAR2, IFI27, IFI41, PRL, CD4, TGFBI, LTBP2, TNFRSF1A）。

---

<分担研究者（班員）>

鈴木 一幸 岩手医科大学第一内科 教授  
佐田 通夫 久留米大学医学部第二内科 教授  
田中 栄司 信州大学医学部内科学第二 助教授

加藤 道夫 国立大阪医療センター消化器科 医長  
荒瀬 康司 虎の門病院消化器内科 医長  
大矢 博昭 山形県産業振興機構生物ラジカル研究所 副所長  
新澤 陽英 公立置賜南陽病院 院長  
富樫 整 山形大学医学部消化器病態制御内科学 助教授  
斉藤 貴史 山形大学医学部消化器病態制御内科学 講師  
<研究協力者(班友)>  
林 純 九州大学大学院医学研究院感染環境医学 教授

#### A. 研究目的

B型及びC型肝炎は慢性化し、長年月を経て肝硬変に進展し、さらには肝細胞がんの発症に至る。しかも本邦における肝炎ウイルスキャリアーは数百万人を数え、肝疾患死亡者は増加の一途を辿っている。さらには新規の感染者は増加傾向にある。しかし、B型及びC型肝炎ウイルスの感染病態、とくに感染成立にかかわるウイルス要因と遺伝素因については必ずしも明らかではない。

1. ウイルスの感染病態を解明するために、まず感染成立にかかわるウイルス要因と遺伝素因について検討する(富樫班員、斉藤班員)。

(1) B型肝炎においては低ウイルス量の血液を媒介とした感染成立(性交渉や輸血におけるウィンド期間など)とその病態を解明する(富樫班員)。

(2) さらに、B型肝炎ウイルスキャリアーにおける低ウイルス病態(たとえば潜在性B型肝炎など)について検索する(富樫班員)。

(3) C型肝炎においてはウイルス感染感受性遺伝子を明らかにし、感染防御さらには治療法開発へ資する(斉藤班員)。

2. HBcr抗原測定法の開発と感染病態の解明を行う(田中班員)。

3. ウイルス動態と感染病態との関連を検討する。

(1) HBV genotype別の病態を検討する(鈴木班員)。

(2) 慢性肝炎のステージ分類とその継時的推移を検討する(加藤班員)。

(3) HBs抗原消失後のHBV関連ウイルスマーカーの推移を検討する(荒瀬班員)。

- (4) B型慢性肝炎に対するラミブジン長期投与によるウイルス動態を検討する(林班友)。
4. C型肝炎における新しい感染病態、インスリン抵抗性のメカニズムを解明する(佐田班員)。
5. 山形県A村におけるHCV抗体陽性者における死因を検討する(新澤班員)。

## B. 研究方法

### 1. 感染成立にかかわるウイルス要因および遺伝素因

- (1) B型肝炎の感染成立におけるウイルス要因を検索するために超高感度全自動化HBs抗原分析装置の開発を行う(大矢班員)。
- (2) 生体サンプルを使用して本装置の精度を検証する(富樫班員)。
- (3) 上記全自動分析装置を使用して低ウイルス病態の解析を行う。対象としては、通常の測定法(EIA)によりHBs抗原が陰性であると確認された健常ボランティア、C型肝炎ウイルス関連慢性肝疾患患者およびエジプト人C型肝炎患者におけるHBs抗原陽性率を検討する(富樫班員)。
- (4) C型肝炎ウイルス感染感受性候補遺伝子を検索する。山形県某町のC型肝炎ウイルス感染者が集積している地区において13年前より肝検診を行っているが、これらの地域住民に呼びかけ自発的な参加によりSNP解析を施行する(斉藤班員)。

本研究は国の倫理指針に準拠して行った。とくにSNP解析は山形大学倫理委員会の承認を受けており、かつ被験者の自発的な参加により、書面による同意を得て施行し、サンプルは直ちに匿名化を行い、個人情報保護に万全を期した。

## C. 研究成果

### 1. 感染成立にかかわるウイルス要因および遺伝素因

- (1) 超高感度自動化HBs抗原分析装置を開発した(大矢班員)。
- (2) 生体サンプルを用いて、HBV DNA 10コピー/ml以下の低ウイルス量においてHBs抗原を検出可能であることを示した(富樫班員)。

- (3) 通常の HBs 抗原測定法 (EIA) で陰性とされた健常人ボランティア、C 型肝炎ウイルス関連慢性肝疾患患者およびエジプト人 C 型慢性肝炎患者において少数例であるが、HBs 抗原を検出しえた。そのうちの一部症例では HBV DNA は核酸増幅法によっても検出されなかった (富樫班員)。
- (4) HCV 抗体陽性者 238 名が本研究に自発的な参加を表明し、書面により DNA サンプルの採取と SNP 解析によるデータの使用に同意した。RNA 陽性者が 189 名 (ウイルス持続感染者) であり、陰性者が 49 名 (既感染者) であった。1784 遺伝子の 4784 SNP を解析し、候補遺伝子として 10 遺伝子 (SULT2B1, AP1b1, IFNAR2, IFI27, IFI41, PRL, CD4, TGFB1, LTBP2, TNFRSF1A) を抽出できた (斉藤班員)。
2. HBcr 抗原量の解析により、HBe 抗原のセロコンバージョンには HBV 増殖低下を伴うものと pre-C や CP 変異の出現に伴うものと 2 つあることが明らかとなった (田中班員)。
3. ウイルス動態と感染病態の関連を検討することにより、
- (1) 岩手県における HBV キャリアー住民の遺伝子型の頻度を明らかにし、これら遺伝子型の違いが肝病態および予後に密接に関連することを示した (鈴木班員)。
- (2) 考案したステージ分類は HBV キャリアーの病期の把握と治療法の選択に有用であることが示された (加藤班員)。
- (3) HBs 抗原消失後の 5 ないし 10 年経過しても一部の症例では血清 HBV DNA は高感度な nested PCR 法にて陽性であった (荒瀬班員)。
4. C 型肝炎におけるインスリン抵抗性の一つの機序として、HCV により誘導される SOCS3 による IRS-1 および IRS-2 のユビキチンプロテアソームシステムを介する分解により、インスリンシグナル伝達の減弱が起これると考えられた (佐田班員)。
5. HCV 抗体陽性者における死因調査の結果、男性における全死因の SMR は 124.5、女性は 153.5 であった。男性における肝癌の SMR は 2810、女性では 902 であった。各疾患中では肝癌が男女ともに最も高かったが、女性

では心疾患が 218.6 と次いで高かった(新澤班員)。

#### D. 考察

1. B 型肝炎では低ウイルス量の感染病態を解明するために、超高感度全自動化 HBs 抗原分析装置を開発した。本装置を使用して、HBV DNA 10 コピー/ml 以下の低ウイルス量の血液においても HBs 抗原を検出できる可能性が示された。今後の課題として、1) アッセイの特異性を確立すること、2) より大量のサンプルをより迅速に分析すること(現状では、60 サンプルを60分 で分析可能)が挙げられる。

2. EIA で HBs 抗原を検出できない低ウイルス量の検体でも検出可能であった。しかも高感度の核酸増幅法でも HBV DNA を検出できない血液サンプルにおいて HBs 抗原が検出可能であった。今後、低ウイルス量の血液を媒介とした感染成立(性交渉による感染や輸血におけるウインド期間など)とその病態解明に対する本法の有用性を検討するべきである。さらに、本法が、キャリアーにおける低ウイルス量状態と肝障害発症との関連(たとえば潜在性 B 型肝炎など)を検索する際の手段として使用できるかを検証することが課題の一つである。このために、各分担研究者および研究協力者との協力体制を作り上げていく必要がある。

3. C 型肝炎ウイルスに対する感染感受性遺伝子候補を 10 遺伝子抽出し、特許を出願した。今後は、1) 各候補遺伝子について機能解析を行うこと、2) ゲノムワイドに SNP 検索を進めて、HCV ウイルスレセプター遺伝子など感染責任遺伝子を検索することが課題となる。それにより、感染防御および治療法の開発への道が拓かれることが期待される。

#### E. 結論

B 型および C 型肝炎ウイルスの感染病態を解明するために、3 年計画初年度は、とくに感染成立にかかわるウイルス要因と遺伝素因について検討し、以下の結果を得た。

- 1) 超高感度全自動化 HBs 抗原分析装置を開発した。
- 2) 本装置を使用して、HBV DNA 10 コピー/ml 以下の低ウイル



- ス量の血液においても HBs 抗原が検出できる可能性を示した。
- 3) C 型肝炎ウイルス感受性候補 10 遺伝子を SNP 解析から抽出し、特許を出願した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Saito T, Togashi H, Kawata S, et al. Genetic variations in human associated differences in the course of hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 30: 335-41.
2. Saito T, Togashi H, Kawata S, et al. Transmission of hepatitis C virus quasispecies between human adults. *Hepatology* 2004; 30: 57-62
3. Okumoto K, Saito T, Togashi H, Kawata S, et al. Possible contribution of circulating transforming growth factor- $\beta$ 1 to immunity and prognosis in unresectable hepatocellular carcinoma. *Liver International* 2004; 24: 21-8
4. Imanaka K, Tamura S, Kawata S, et al. Enhanced expression of suppressor of cytokine signaling-1 in the liver of chronic hepatitis C: possible involvement in resistance to interferon therapy. *J Viral Hepat* 2005; 12: 130-8
5. Sato S, Suzuki K, Tanikawa Y, et al. Clinical epidemiology of fulminant hepatitis in Japan before the substantial introduction of liver transplantation: an analysis of 1309 cases in a 15-year national survey. *Hepatology* 2004; 30: 155-161
6. Arase Y, Ikeda K, Kumada H, et al. Long-term outcome following HBsAg seroclearance in patients with chronic hepatitis B. *A J M* 200; 11 (in press)
7. Kobayashi M, Arase Y, Kumada H, et al. Infection with hepatitis B virus genotype A in Tokyo, Japan during 1976 through 2001. *J Gastroenterol* 2004; 39: 844-50
8. Kato M, Yuki N, Hayashi N, et al. Changes in virus loads and precore mutations in chronic hepatitis B patients treated with 4 weeks of daily interferon alfa-2a therapy. *Hepatology* 2004; 28: 73-8
9. Kawaguchi T, Yoshida T, Sata M, et al. Hepatitis C virus down-regulates

insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. Am J Pathol 2004; 165: 1499-1508

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願

「C型肝炎ウイルス感染者の経過に関する遺伝子およびその利用」

特許出願番号：特願 2004-13667

識別番号：No. 504026465

## II. 分担研究報告

岩手県における B 型肝炎ウイルス(HBV)キャリア住民の  
HBV 遺伝子型とその臨床的特徴

分担研究者 鈴木一幸 岩手医科大学第一内科 教授

研究要旨：HBV 遺伝子型の違いのより急性および慢性 B 型肝炎疾患の病態や予後が異なることが明らかにされつつあるが、医療機関を受診していない HBV キャリアの実態、予後は不明な点も多い。そこで、岩手県において検診により発見された HBV キャリア住民の遺伝子型の頻度を明らかにし、HBe 抗原の陽性率、経過観察中の肝機能の推移、肝癌進展例の特徴などを検討した。岩手県における HBV キャリア住民の遺伝子型は遺伝子型 A 1.9%、遺伝子型 B 44.9%、遺伝子型 C 52.2%であり、年齢層でその頻度に違いが認められた。また、遺伝子型の違いは Hbe 抗原の陽性率、血清 ALT 値の変動に関連していた。肝癌進展例では遺伝子型 B 30%、遺伝子型 C 70%であり、発癌年齢は遺伝子型 B で有意に高齢であった。また、経過中の血清 ALT 値の変動も遺伝子型 B で少ない傾向が認められた。結果として、岩手県における HBV キャリア住民の遺伝子型の頻度を明らかにし、これら遺伝子型の違いが肝病態および予後に密接に関連する可能性を示した。

共同研究者

阿部弘一 岩手医科大学第一内科  
講師  
熊谷一郎 岩手医科大学第一内科  
専門医員  
葛西幸穂 岩手医科大学大学院生  
小山富子 岩手県予防医学協会

の国内地域分布には特徴がみられ、東北地区は沖縄地方について遺伝子型 B が多い地域とされている。最近、遺伝子型の違いのより急性および慢性 B 型肝炎疾患の病態や予後が異なることが明らかにされつつあり注目されているが、これらの研究対象となった HBV キャリアの多くは医療機関を受診者（入院および外来通院患者）であり、医療機関を受診していない HBV キャリアの実態は不明な点も多

A. 研究目的

HBV 遺伝子型には A~H の 8 種類が報告されており、これら遺伝子型

い。そこで、検診より発見された HBV キャリア住民の遺伝子型の頻度を明らかにし、HBe 抗原の陽性率、経過観察中の肝機能の推移などを検討した。

## B. 研究方法

1977 年より 2004 年に岩手県予防医学協会で検診を受けた一般住民のうち HBs 抗原陽性を指摘された HBV キャリア(6711 名)の中から層別抽出法により 661 名(男性 343 名、女性 318 名)の HBV キャリアを選択した。また、これら対象とは別に、岩手県癌登録事業に登録され B 型肝炎にて死亡が確認された 60 例の中から初回検査時の血清が保存されている 30 例を検討に加えた。HBV の遺伝子型を ELISA 法にて測定し、遺伝子型毎の HBe 抗原陽性率、血清 ALT 値(初回、経過中の平均値)などを比較検討した。

なお、本研究は岩手医科大学倫理委員会、岩手県予防医学協会および岩手県医師会の委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

### 1) 遺伝子型の頻度

遺伝子型 A は 19 名(1.9%)、遺伝子型 B は 297 名(44.9%)、遺伝子型 C は 345 名(52.2%)であった。2003 年

の年齢に換算すると、遺伝子型 A は 20~30 歳代のみで認められ、遺伝子型 B は年齢と共に増加し、70 歳以上の高齢者で多かった。遺伝子型 C は 40~60 歳代で多く認められた。

### 2) 各遺伝子型における HBe 抗原陽性率

遺伝子型 A では 0%、遺伝子型 B では 3.7%、遺伝子型 C では 33.3% が HBe 抗原陽性を示し、遺伝子型 C では A、B に比し有意に高率であった。遺伝子型 B における HBe 抗原陽性者は 20~30 歳で多くみられたが、遺伝子型 C では各年齢層でみられ、特に 20 歳代では高率であった。また、HBe 抗原陽性者 116 名において HBe 抗原から HBe 抗体への seroconversion の有無(観察期間:1~15 年)を検討すると、全体では 30 例に seroconversion を認めたが、遺伝子型 B では 54.5%、遺伝子型 C では 20.9%であった。

### 3) 血清 ALT 値の差異

初回受診時の血清 ALT 値は遺伝子型 C で遺伝子型 A、B に比し有意の高値であった。また、経過観察中の血清 ALT 値も遺伝子型 C で最も高く、遺伝子型 B に比し有意であった。

### 4) 肝癌例の検討

30 例のうち遺伝子型 B は 9 例、遺伝子型 C は 21 例であったが、発癌年齢は遺伝子型 B で有意に高齢であ

った。また、遺伝子型 B の肝癌例は全例初回検診時の HBe 抗原は陰性であった。経過中の血清 ALT 値の変動も遺伝子型 B で少ない傾向が認められた。

#### D. 考察

岩手県における HBV キャリア住民の遺伝子型は、以前より遺伝子型 B が多いとされていたが、今回の検討により予想以上に高い結果が得られた。また、各遺伝子型の頻度は年代別に違い認められた。若年層で遺伝子型 A が増加している理由については、他地域での検討を含めて今後更なる調査が必要であろう。さらに、HBV 遺伝子型の違いにより HBe 抗原の陽性率、HBe 抗体への seroconversion 率、血清 ALT 値の変動、発癌頻度に差を認めたことから、今後、HBV キャリアに対する健康管理を行う場合には、HBV 遺伝子型を考慮すべきであると考えられる。

#### E. 結論

岩手県における HBV キャリア住民の遺伝子型の頻度を明らかにし、これら遺伝子型の違いが肝病態および予後に密接に関連する可能性を示した。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 学会発表

1)阿部弘一、鈴木一幸、他：C型慢性肝炎に対する IFN $\alpha$ -2b+Ribavirin 併用療法の投与量別治療効果の検討. 第 40 回日本肝臓学会総会、2004.6.3 (千葉)

2)熊谷一郎、鈴木一幸、他：HBs 抗原が消失した慢性 HBV 感染における pre-S 領域の経時的解析：無性候性キャリア住民と慢性肝炎の比較検討. 第 40 回日本肝臓学会総会、2004.6.3 (千葉)

熊谷一郎、阿部弘一、鈴木一幸：岩手県における E 型急性肝炎の実態：その感染経路と重症化に關与する因子の考察. 第 8 回日本肝臓学会大会、2004.10.21 (福岡)

3)阿部弘一、小山富子、鈴木一幸：C型肝炎ウイルス検診により発見された HCV キャリアの実態と肝癌の頻度－検診後の追跡調査による検討－. 第 8 回日本肝臓学会大会、2004.10.21 (福岡)

4)宮坂昭生、阿部弘一、鈴木一幸：B型非代償性肝硬変に対するラミブジンの治療効果と限界. 第 8 回日本肝臓学会大会、2004.10.21 (福岡)

5)熊谷一郎、阿部弘一、鈴木一幸：C型慢性肝炎例に対する各種抗ウイルス療法の評価. 第 35 回日本肝臓学会東部会、2004.12.10 (東京)

- 6)熊谷一郎、鈴木一幸、他：B型重症肝炎に対するラミブジン療法の意義. 第90回日本消化器病学会総会、2004.4.21 (仙台)
- 7)宮坂昭生、鈴木一幸、他：HCV 検診における血清ヒアルロン酸測定の意義. 第90回日本消化器病学会総会、2004.4.21 (仙台)
- 8)熊谷一郎、阿部弘一、鈴木一幸：岩手県におけるE型急性肝炎の実態：その感染経路と重症化に關与する因子の考察. 第46回日本消化病学会大会、2004.10.22 (福岡)
- 9)阿部弘一、小山富子、鈴木一幸：C型肝炎ウイルス検診より発見されたHCVキャリアの実態と肝癌の頻度－検診後の追跡調査による検討－. 第46回日本消化病学会大会、2004.10.22 (福岡)
- 10)宮坂昭生、阿部弘一、鈴木一幸：B型非代償性肝硬変に対するラミブジンの治療効果と限界. 第46回日本消化病学会大会、2004.10.22 (福岡)
- 2) 阿部弘一、熊谷一郎、葛西幸穂、宮坂昭生、遠藤龍人、滝川康裕、鈴木一幸:HBVキャリアからの重症化・劇症化例をいかに対処するか. 臨床医 2004; 30:1607-1611.
- 3) 阿部弘一、熊谷一郎、遠藤龍人、滝川康裕、鈴木一幸：B型肝炎重症化例の治療. 内科 2004; 3:471-476.
- 4) 鈴木一幸、阿部弘一、熊谷一郎：HBV無症候性キャリアの自然経過、予後、死因. ウイルス性肝炎(下)、日本臨床、2004; 増刊号8:227-232.
- 5) Sato S, Suzuki K, Takikawa Y, Endo R, Omata M: Clinical epidemiology of fulminant hepatitis in Japan before the substantial introduction of liver transplantation: an analysis of 1309 cases in a 15-year national survey. Hepatol Res 2004; 30:155-161.

#### H. 論文発表

- 1) Kato H, Sugauchi F, Ozasa A, Kao T, Tanaka Y, Sakuragawa H, Sata M, Hino K, Onji M, Okanoue T, Tanaka E, Kawara S, Suzuki K, Hige S, Ohno T, Orito E, Ueda R, Mizokami M: Hepatitis B genotype G in an extremely rare genotype in Japan. Hepatol Res 2004; 30:199-203.

B型・C型肝炎ウイルス感染病態に関する研究

分担研究者； 佐田通夫 久留米大学医学部第2内科学講座 教授  
研究協力者； 長尾由実子 久留米大学先端癌治療研究センター肝癌部門 講師  
研究協力者； 川口 巧 久留米大学医学部第2内科学講座 助手  
研究協力者； 吉田隆文 久留米大学医学部第2内科学講座 助手

**研究テーマ**； C型肝炎ウイルスによるインスリン抵抗性発現の分子機序

研究要旨：C型肝炎硬変患者において高率に認められるインスリン抵抗性を特徴とした耐糖能異常は、肝硬変症患者の予後因子の一つである。このようにC型肝炎硬変患者における耐糖能異常の合併は注目すべき病態であるにも関わらず、耐糖能異常発症の分子機序は不明である。今回我々は、C型肝炎ウイルスによるインスリン抵抗性発現の分子生物学的機序解明を目的に研究を行った。HepG2細胞へのC型肝炎ウイルスコア蛋白遺伝子導入により、HepG2細胞はインスリン抵抗性を示した。同細胞のインスリン受容体発現量に変化は認められなかったが、インスリンシグナル伝達分子である insulin receptor substrate (IRS) 1 および IRS2 は発現量の低下を認めた。また、C型肝炎ウイルスコア蛋白遺伝子導入を行った HepG2 細胞において Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) の発現の増強を認めた。C型肝炎ウイルスコア蛋白遺伝子導入による IRS1 および IRS2 は発現量の低下はプロテアソーム阻害剤にて抑制された。これまでに我々は疫学的検討よりC型慢性肝炎患者のインスリン抵抗性は他の慢性肝胆道系疾患に比べ有意に上昇していることを報告してきたが、その一機序として HCV コア蛋白誘導 SOCS3 によるユビキチン・プロテアソームシステムを介した、IRS1 および IRS2 の発現低下を明らかにした。

A. 研究目的

C型肝炎硬変患者において高率に認められるインスリン抵抗性を特徴とした耐糖能異常は、肝硬変症患者の予後因子の一つである。このようにC型肝炎硬変患者における耐糖能異常の合併は注目すべき病態であるにも関わらず、耐糖能異常発症の分子機序は不明である。

本研究の目的はC型肝炎ウイルスによるインスリン抵抗性発現の分子生物学的機序を検討することである。

B. 対象と研究方法

C型慢性肝炎患者肝組織、C型肝炎ウイルスコア抗原トランスジェニックマウス肝組織、C型肝炎ウイルスコア抗原遺伝子導入 HepG2 細胞においてインスリンシグナル伝達関連蛋



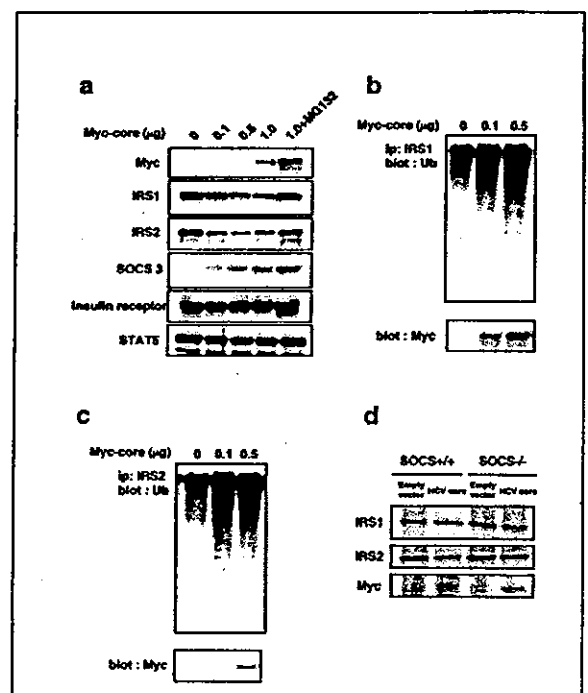
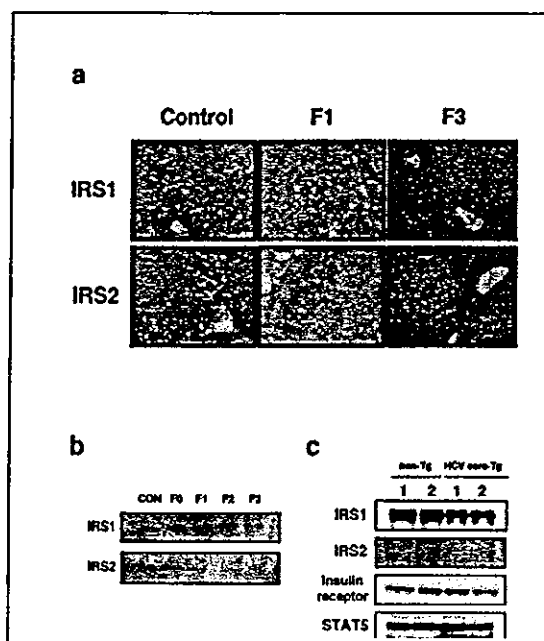
白の発現をウエスタンブロッティングまたは免疫染色にて評価した。

### C. 研究結果

細胞内インスリンシグナル伝達の中心的分子である IRS1 および IRS2 は正常肝組織において門脈域の肝細胞に強く発現していた。慢性C型肝炎患者肝組織では IRS1 および IRS2 の発現低下を免疫組織化学的検討にて認めた。また、肝線維化が進行した組織における IRS1 および IRS2 の発現は肝線維化が進行していない組織にくらべて著明に低下していた (図 1 a)。免疫組織化学的検討で認められた IRS1 および IRS2 の発現低下は同様にウエスタンブロッティングにおいても認められた (図 1 b)。さらに HCV コア抗原トランスジェニックマウス肝組織においても、IRS1 および IRS2 発現の低下は認められた。HCV コア抗原トランスジェニックマウス肝組織においてインスリン受容体の発現量には変化が認められなかった (図 1 c)。

HCV コア遺伝子を導入した HepG2 細胞を用い、インスリンシグナル伝達分子の変化を検討した。HCV コア遺伝子導入量と dose-dependent に IRS1 および IRS2 の発現量は低下した。一方、SOCS3 は HCV コア遺伝子を導入によりその発現が誘導された。プロテアソーム阻害剤である MG132 を培養上清に添加することにより、HCV コア遺伝子導入によって誘導された IRS1 および IRS2 の発現量低下はそれぞれ発現量の改善を認めた (図 2 a)。HCV コア遺伝子導入によりユビキチン化された IRS1 および IRS2 が増加していた (図 2 b c)。SOCS3 をノックアウトした mouse embryonic fibroblast (MEF) 細胞に HCV コア遺伝子を導入し、IRS1 および IRS2 の発現量を検討した。HepG2 細胞と同様に、wild-type MEF 細胞では HCV コア遺伝子を導入により IRS1 および IRS2 の発現低下を認めた。一方、SOCS3 をノックアウトした MEF 細胞に HCV コア遺伝子導入を行っても、IRS1 および IRS2 の発現に変化は

図 1



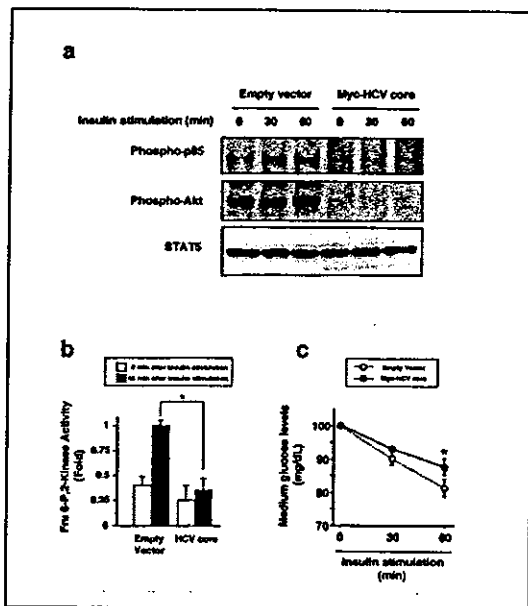
認められなかった (図 2 d)。

図 2

HCV コア抗原を恒常的に発現する HLF 細胞を作成し、HCV コア抗原のインスリン抵抗性発現への関与を分子生物学的に検討した。Wild-type HLF 細胞はインスリン刺激により、細胞内インスリンシグナル伝達分子である p85 および Akt がリン酸化を受ける。一方、HCV コア抗原を恒常的に発現する HLF 細胞ではインスリン刺激を加えても、p85 および Akt のリン酸化は認められない (図 3 a)。同様に、インスリンによる 6-phosphofructo-2-kinase

(Fru-6-P, 2-Kinase) の活性化は wild-type HLF 細胞では認められるが、HCV コア抗原を恒常的に発現する HLF 細胞ではインスリンによる Fru-6-P, 2-Kinase の活性化は認められなかった (図 3 b)。また、HCV コア抗原を恒常的に発現する HLF 細胞では、インスリン刺激によるグルコースの細胞内取り込みは障害されていた (図 3 c)。

図 3



#### D. 考察並びに結論

C型慢性肝炎患者のインスリン抵抗性発現においてC型肝炎ウイルスが関与していることを明らかにした。その一機序としてHCVによって誘導されるSOCS3によるIRS-1およびIRS-2のユビキチン・プロテアソームシステムを介する分解の結果、肝細胞内でインスリンシグナル伝達の減弱が起こるものと考えられた。

#### E. 健康危険情報

特になし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1). 長尾由実子, 千葉逸朗, 佐田通夫  
歯学部並びに歯科衛生士学校の学生を対象に実施した B 型及び C 型肝炎に対する意識調査 感染症学雑誌 78:554-565, 2004.
- 2). Sata M. Lamivudine therapy of hepatitis B in Japan. Therapy for viral hepatitis and prevention of hepatocellular carcinoma. p. 32-37, 2004.
- 3). Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, Nagao Y, Ide T, Taniguchi E, Kumemura H, Harada S, Maeyama M, Baba S, Koga H, Kumashiro R, Ueno T, Ogata H, Yoshimura A, and Sata M. Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. Am J Pathol 165: 1499-1508, 2004.
- 4). Ito K, Tanaka Y, Orito E, Hirashima N,

- Ide T, Hino T, Kumashiro R, Kato A, Nukaya H, Sakakibara K, Mukaide M, Ito H, Sata M, Ueda R, Mizokami M. Predicting relapse after cessation of lamivudine monotherapy for chronic hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis* 38: 490-495, 2004.
- 5). Yoshida H, Tateishi R, Arakawa Y, Sata M, Fujiyama S, Nishiguchi S, Ishibashi H, Yamada G, Yokosuka O, Shiratori Y, Omata M. Benefit of interferon therapy in hepatocellular carcinoma prevention for individual patients with chronic hepatitis C. *Gut* 53: 425-430, 2004.
- 6). Nagao Y, Tanaka K, Kobayashi K, Kumashiro R, Sata M. Analysis of approach to therapy for chronic liver disease in an HCV hyperendemic area of Japan. *Hepatol Res* 28: 30-35, 2004.
- 7). Kato H, Sugauchi F, Ozasa A, Kato T, Tanaka Y, Sakugawa H, Sata M, Hino K, Onji M, Okanoue T, Tanaka E, Kawata S, Suzuki K, Hige S, Ohno T, Orito E, Ueda R, Mizokami M. Hepatitis B virus genotype G is an extremely rare genotype in Japan. *Hepatol Res* 30: 199-203, 2004.
- 8). Nagao Y, Tanaka K, Kobayashi K, Kumashiro R, Sata M. A cohort study of chronic liver disease in an HCV hyperendemic area of Japan: a prospective analysis for 12 years. *Int J Mol Med* 13: 257-265, 2004.
- 9). Yano M, Hayashi H, Yoshida K, Kohgo Y, Saito H, Niitsu Y, Kato J, Iino S, Yotsuyanagi H, Kobayashi Y, Kawamura K, Kakumu S, Kaito M, Ikoma J, Wakusawa S, Okanoue T, Sumida Y, Kimura F, Kajiwara E, Sata M, Ogata K. A significant reduction in serum alanine aminotransferase levels after 3-month iron reduction therapy for chronic hepatitis C: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial in Japan. *J Gastroenterol* 39: 570-574, 2004.
- 10). Tanaka Y, Yeo AE, Orito E, Ito K, Hirashima N, Ide T, Sata M, Mizokami M. Prognostic indicators of breakthrough hepatitis during lamivudine monotherapy for chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol* 39: 769-775, 2004.
- 11). Kuwahara R, Kumashiro R, Murashima S, Ogata K, Tanaka K, Hisamochi A, Hino T, Ide T, Tanaka E, Koga Y, and Sata M. Genetic heterogeneity of the precore and the core promoter region of genotype C hepatitis B virus during lamivudine therapy. *J Med Virol* 72: 26-34, 2004.
- 12). Takao Y, Yamada A, Yutani S, Sata M, and Itoh K. Antibody reactive to a hepatitis C virus (HCV)-derived peptide capable of inducing HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes is detectable in a majority of

- HCV-infected individuals without HLA-A2 restriction. *Microbiol Immunol* 48: 507-517, 2004.
- 13). Yoshida T, Ogata H, Kamio M, Joo A, Shiraishi H, Tokunaga Y, Sata M, Nagai H, and Yoshimura A. SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis. *J Exp Med* 199: 1701-1707, 2004.
  - 14). Kuwahara R, Kumashiro R, Inoue H, Tanabe R, Tanaka E, Hino T, Ide T, Koga Y, Sata M. Adefovir Dipivoxil as a treatment for hepatic failure caused by lamivudine-resistant HBV strains. *Dig Dis Sci* 49: 300-303, 2004.
  - 15). Nagao Y, Sata M. Hepatitis C virus and lichen planus. *J Gastroenterol Hepatol* 19: 1101-1113, 2004.
  - 16). Nagao Y, Kawaguchi T, Ide T, Kumashiro R, Sata M. Exacerbation of oral erosive lichen planus by combination of interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Int J Mol Med* 15: 237-241, 2005.
2. 学会発表
- 1). 桑木光太郎、矢野洋一、福森一太、安東栄治、住江修治、加藤収、山本裕士、佐田通夫. HCV 関連肝細胞癌における HBc 抗体の臨床的意義. 第 90 回日本消化器病学会総会 (仙台).
  - 2). 田中一雄、日野照子、井出達也、古賀郁利子、久持顕子、緒方啓、桑原礼一郎、古賀裕之、神代龍吉、佐田通夫. C 型慢性肝炎に対する IFN  $\alpha$  2b + ribavirin 併用療法の効果 — とくに Biochemical responder の検討を中心に —. 第 90 回日本消化器病学会総会 (仙台).
  - 3). 桑原礼一郎、有永照子、福泉公仁隆、森田恭代、村島史朗、緒方啓、田中一雄、久持顕子、古賀郁利子、井出達也、神代龍吉、佐田通夫. Lamivudine 耐性株による Breakthrough hepatitis に対する Adefovir dipivoxil の効果. 第 40 回日本肝臓学会総会 (浦安).
  - 4). 持田智、山下竜也、金子周一、井出達也、佐田通夫、石川哲也、各務伸一、澤田康史、藤原研司. 難治性 C 型慢性肝炎に対する二重膜血液濾過を併用したインターフェロン (IFN) 治療の有用性. 第 40 回日本肝臓学会総会 (浦安).
  - 5). 川口巧、原田大、吉田隆文、久本隆生、谷口英太郎、久米村寛大、花田慎一郎、馬場真二、前山倫子、古賀浩徳、神代龍吉、上野隆登、佐田通夫. インスリン抵抗性発現における C 型肝炎ウイルスコア蛋白の細胞生物学的意義. 第 40 回日本肝臓学会総会 (浦安).
  - 6). 井出達也、神代龍吉、古賀郁利子、有永照子、久持顕子、田中一雄、古賀裕之、桑原礼一郎、緒方啓、関律子、佐田通夫. IFN・リバビリン併用療法時の貧血に対するエイコサペンタエン酸の効果. 第 40 回日本肝臓学会総会 (浦安).
  - 7). 関律子、岡村孝、井出達也、佐田通夫、丸山徹、藤野武彦、上坂伸宏. C 型慢性肝疾患患者における赤血球変形能の定