

(Roche)、HBV CTL epitope (SIGMA、A2 拘束性 core18-10, A24 拘束性 core117-9, A24 拘束性 pol756-9) である。

(倫理面への配慮) 血液採取に関しては、当該組織(東京大学医科学研究所倫理審査委員会)における倫理審査を受け、既に承認を得ている。承認された内容に従って、患者およびその家族に対して倫理的、人権的な配慮を最大限に講ずる。特にヘルシンキ宣言(2000年10月エジンバラ改訂版)の趣旨に則って、十分な説明のもとでインフォームド・コンセントを得るものとする。以下の(1)~(6)を文書にして説明し、同意書へ本人またはその家族の署名を得られた場合にのみ患者試料を採取する。患者情報と取り扱いについては、個人情報保護法にのっとり厳重に保管・管理する。(1)提供された試料から細胞分離を行い、その機能を調べたり、遺伝子を抽出してその特徴を調べたりする。(2)これらの目的のために、場合によっては細胞の一部を試験管の中で増殖させることがある。(3)試料は必要に応じて、冷凍保存することがある。(4)厳重な管理を行い、プライバシーを保護する。(5)本研究に参加しないことにより、何らの不利益を被らない。(6)同意書に署名をした後も、いつでも撤回可能である。研究成果は、希望があれば説明をする。

C. 研究結果

1. HIV/HBV重感染者の臨床経過調査

HAARTを施行したHBs抗原陽性のHIV感染者12名は、全て男性であった(表1)。HBVの感染経路は1例が母子感染で、それ以外では性感染が疑われた。HAART開始後15~108ヶ月

間の観察期間中に、肝機能異常の出現(GPTの正常上限の2倍以上)または肝機能異常の明らかな増悪が認められた症例は7例であった。これらの症例の経過を詳細に観察すると、HBV DNA量が低下した時期に見られる肝機能異常はHBVの関与のない薬剤性肝障害の可能性が高いと考えられたが、HBV DNA量が高い場合は、免疫再構築症候群・肝炎の自然増悪・薬剤の副作用のいずれとも判断しがたかった。

2. HBV特異的Tリンパ球の解析

表2に示すように、3名のHIV感染者(2名はHBs抗原陽性、1名はHBs抗体陽性、3名とも肝機能異常なし)、および4名のHIV非感染者(2名はHBVワクチン追加接種者、1名はHBs抗原陽性の慢性肝炎、1名は急性B型肝炎)について、末梢血単核球を用いてHBV抗原刺激によるサイトカイン産生を指標にしたHBV特異的Tリンパ球の同定を試みた。

その結果、非HIV感染者の急性B型肝炎患者(症例TK)において、HBs抗原、HBpreS1抗原、HBcore抗原に対して、CD4陽性Tリンパ球およびCD8陽性Tリンパ球の明瞭なTNF α 産生が認められ、HBV特異的細胞性免疫の存在が示された(図1, 2)。それ以外の患者では、非HIV感染者2名において弱いサイトカイン産生が認められたが、HIV感染者においては明確な反応は認められなかった(表2)。

D. 考察

HBVに対する特異的細胞性免疫に関する過去の解析では、*in vitro*で抹消血リンパ球をHBV抗原存在下で培養し細胞障害活性や³H-thymidineの取り込みで同定する方法や、

ELISPOTアッセイ、テトラマー解析が行われている。それらを総括すると、一般に慢性感染期にはHBV特異的細胞性免疫が検出されず、急性感染の初期に検出されやすいことが報告されている（表3）。今回のわれわれの細胞内サイトカインを指標にフローサイトメーターで検出する方法でも、同様の傾向が観察された。この方法は手技的に容易であり、また、他のリンパ球表面抗原に対する抗体を組み合わせることで細かなリンパ球分画の抗原特異的免疫応答を解析することができる点で、従来の方法よりも優れている。今後、この系を用いて抗HIV療法後に見られる肝障害時のHBV特異的免疫応答を解析し、その機序について知見を得ていく必要がある。

E. 結論

抗HIV療法を行った12例のHIV/HBV重感染者のうち、7例で肝機能障害の出現または増悪がみられたが、その機序を肝酵素やHBV DNA量の推移から断定することは困難と思われた。細胞質内IFN- γ 、IL2、TNF- α 産生を指標にしたHBV抗原特異的Tリンパ球の同定は、急性B型肝炎症例（HIV陰性例）において可能であった。HAART開始後の肝障害の際にHBV抗原特異的Tリンパ球が検出されるか、またそれが肝障害の機序の鑑別に役立つかについては、症例数を増やして検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ide F, Nakamura T, Tomizawa M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Hosoya N,

Iwamoto A. Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: A phase 1 trial. *J. Med. Virol.* 2006;78:711-718.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. そのほか

該当なし

表1 HAARTを施行したHBs抗原陽性者12例

患者	HBV感染経路	HAART開始前			HAART開始後		
		診断	AST/ALT	HBV-DNA	観察期間 (M)	HBV-DNA (原則12M)	ALTの最高値 (時期)
HS	性行為	CH	不明	不明	108	不明	異常なし
TM	母子	CH	23 / 33	不明	98	<3.7 LGE/ml (71M)	643 (27M)
SF	不明	不明	21 / 16	3,300 M/ml	96	不明	236 (95M)
YY	性行為	CH	30 / 27	8.3 LGE/ml	84	< 3.7 LGE/ml	566 (67M)
MA	性行為	不明	15 / 9	> 8.8 LGE/ml	77	< 3.7 LGE/ml	221 (51M)
KO	不明	不明	不明	不明	64	不明	85 (57M)
KT	性行為	CH	53 / 121	7.5 LGE/ml	56	5.0 LGE/ml	112 (10M)
MH	性行為	CH	122 / 232	8.7 LGE/ml	54	不明	異常なし
MM	不明	CH	23 / 30	> 8.8 LGE/ml	22	5.5 LGE/ml	91 (19M)
HI	性行為	CH	388 / 593	38,348 CPM	21	< 2.6 LGE/ml (8M)	異常なし
TS	性行為	CH	26 / 21	6.9 LGE/ml	20	< 3.7 LGE/ml	異常なし
HA	性行為	キャリア	35 / 34	8.6 LGE/ml	15	4.2 LGE/ml	異常なし

表2 HBV特異 Tリンパ球検査

患者氏名	HIV	HAART・CD4数・VL	HBVの経	抗原刺激	CD4陽性T細胞			CD8陽性T細胞			
					IFN-γ	IL-2	TNFα	IFN-γ	IL-2	TNFα	
MT	+	TDF+3TC+FPV/r CD4: 1,247/microL VL < 50c/ml	母感染 →キミア HBs抗原陽性 HBV-DNA: 3.7未満 肝機能正常	HBsAg							
				HB preS1							
				HBeAg							
				HB core							
HM	+	TDF+ddI+FPV/r CD4: 426/microL VL < 50c/ml	急性B型肝炎既往 HBs抗原陽性 HBV-DNA: 3.7未満 肝機能正常	HBsAg				0.25%	0.25%		
				HB preS1							
				HBeAg							
				HB core							
AM	+	TDF+3TC+d4T+LPV/r CD4: 515/microL VL < 50c/ml	急性B型肝炎既往 HBs抗体陽性 肝機能正常	HBsAg							
				HB preS1							
				HBeAg							
				HB core							
LK	HIV陰性	HIV陰性	基礎疾患なし HBVワクチン 追加接種 90日目 抗陽性	HBsAg							
				HB preS1							1.01%
				HBeAg			0.20%				
				HB core					0.21%	0.23%	
KT	HIV陰性	HIV陰性	基礎疾患なし HBVワクチン 追加接種 60日後 抗体陰性 (前職)	HBsAg							
				HB preS1							
				HBeAg							
				HB core							
HR	HIV陰性	HIV陰性	慢性B型肝炎 HBs抗原陽性 HBV-DNA: 3.7未満 3TC+Adefovir内服	HBsAg					0.22%		
				HB preS1							0.25%
				HBeAg						0.58%	
				HB core							
TK	HIV陰性	HIV陰性	急性B型肝炎 HBs抗原陽性 HBV-DNA 3.0 (PCR) 3TC内服	HBsAg			0.29%	0.37%			
				HB preS1			0.84%			0.32%	
				HBeAg							
				HB core			0.85%			0.24%	

表 3 HBV特異的T細胞の解析：これまでの報告

	アッセイ法	結論
1	ELISPOT	急性感染期にのみ末梢血中にHBV特異的CTLが検出できる
2	HLA-A2 tetramer	急性感染期にのみ末梢血中にHBV特異的CTLが検出できる
3	培養→CTL assay	慢性肝炎患者では、末梢血中にHBV特異的CTLは検出できないか、できたとしても弱い
4	培養→CTL assay	慢性肝炎患者では、末梢血中にHBV特異的CTLは検出できないか、できたとしても弱い
5	培養→CTL assay	血清学的に治癒した急性肝炎後の患者でも、特異的CTL1年以上陽性
6	HLA-A2 tetramer	慢性肝炎患者に対するラミブジン治療後に、HBV特異的CTL反応は容易に検出できた
7	培養→ ³ H-thymidine	HBeAg→eAbへのセロコンバージョン直前にHBV特異的T細胞反応が検出できた

1. Jung, M. Virology 1999
2. Maini, M. Gastroenterology 1999
3. Bertoletti, A. J Exp Med. 1994
4. Nayersina, R. J Immunol. 1993
5. Rehmann, B. et al. J Exp Med. 1995
6. Boni, C. Hepatology 2001
7. Tsai, S. J. Clin. Invest. 1992

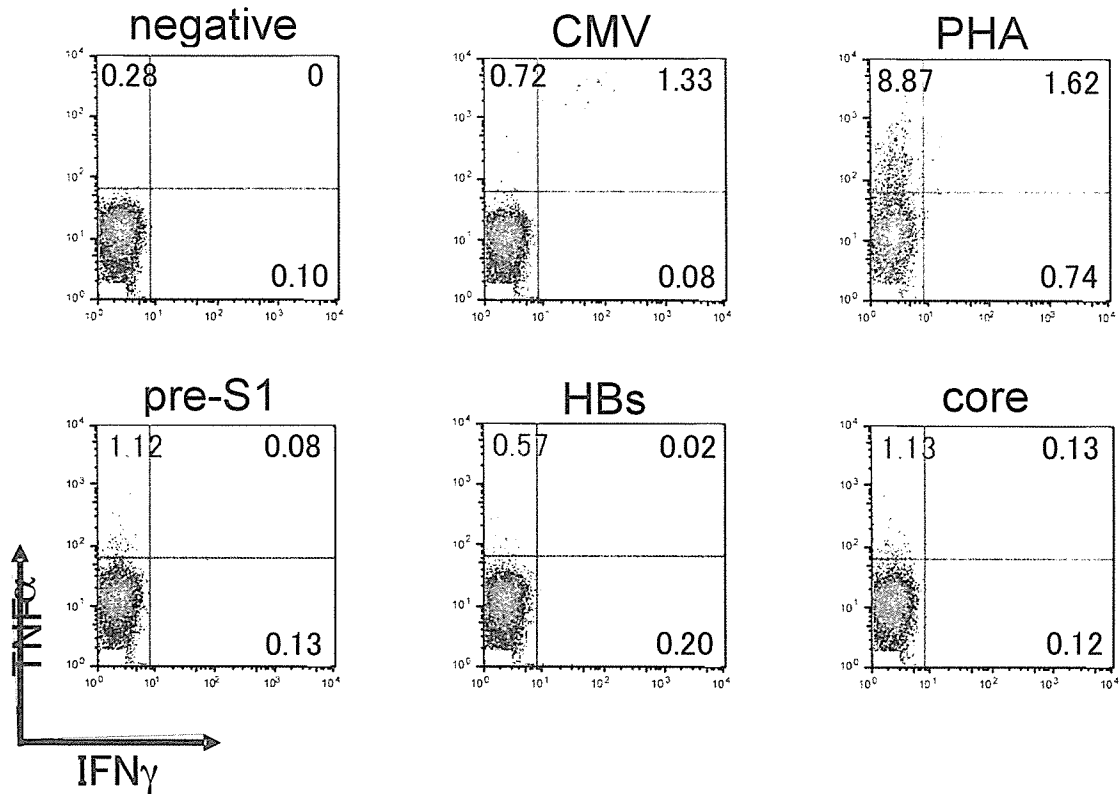


図1-1. CD4陽性Tリンパ球のHBV抗原刺激(患者TK)

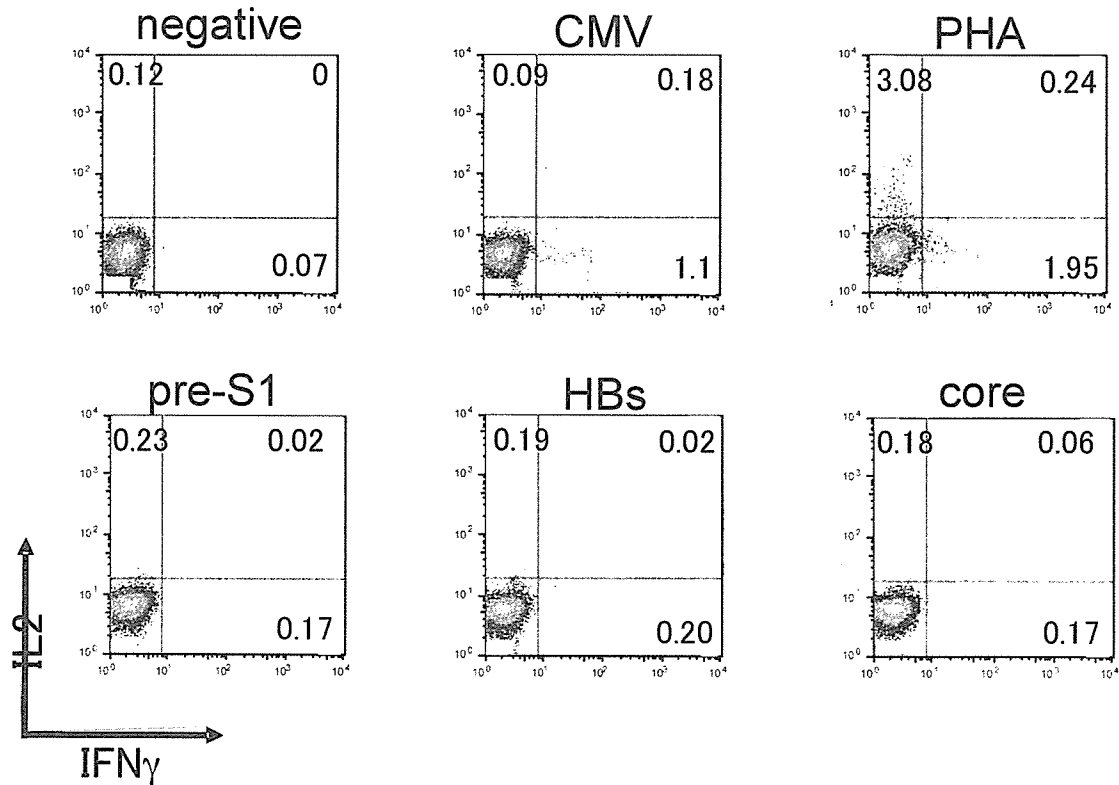


図1-2. CD4陽性Tリンパ球のHBV抗原刺激(患者TK)

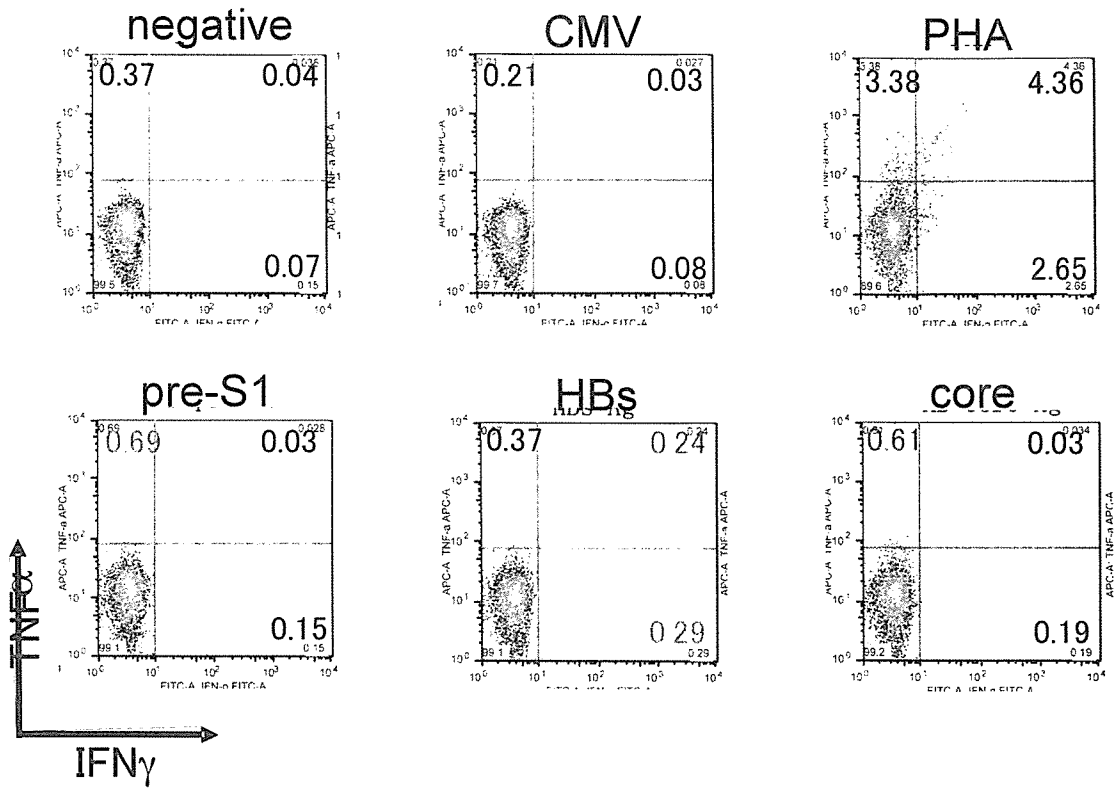


図2-1. CD8陽性Tリンパ球のHBV抗原刺激(患者TK)

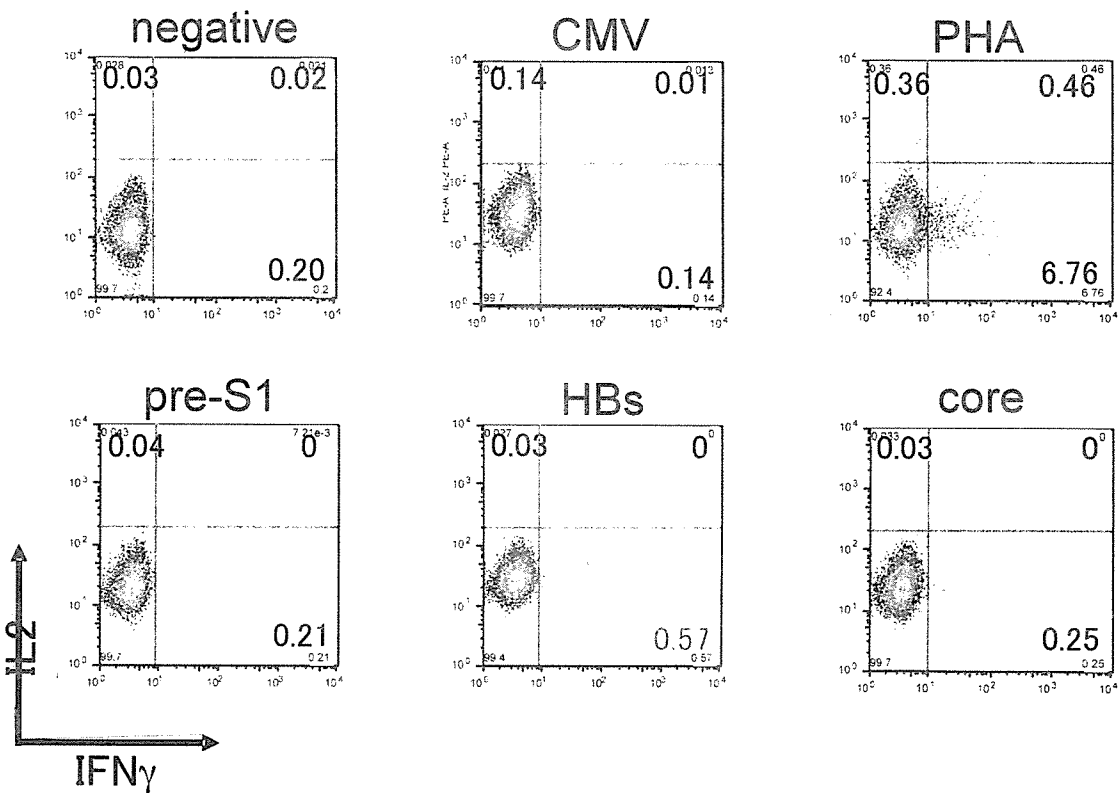


図2-2. CD8陽性Tリンパ球のHBV抗原刺激(患者TK)

HIV感染症に合併する各種疾病に関する研究

分担研究報告書

SDA-1キメラウイルスの作成と非CD4細胞株への感染実験

分担研究者	服部 俊夫	東北大学大学院医学系研究科
研究協力者	鈴木 康弘	東北大学大学院医学系研究科
	芦野 有悟	東北大学大学院医学系研究科
	宇佐 美修	東北大学大学院医学系研究科
	肖 鵬	東北大学大学院医学系研究科
	白澤 基紀	エイズ予防財団

研究要旨:重症のニューモシステイス肺炎を伴ったAIDS患者からHIV-1を分離した。SDA-1はCD4のほか様々な補受容体を用いて感染する。今年度は、SDA-1のエンベロープがCD4陰性の細胞やヒト肝臓由来細胞株への感染を引き起こすかどうかを検証するために、キメラウイルスを作成し評価を行った。キメラウイルスとしてNL43にSDA-1 *env*を組み合わせたNL43_SDA-1を作成した。これらのキメラウイルスは、ヒト肝臓細胞由来の細胞株に感染した。

A. 研究目的

AIDS患者の中には、ウイルス性の肝炎によらない肝臓障害を示す例がある。われわれは重篤な肝炎を伴ったAIDS患者からHIVを分離し、この株がCD4非依存に感染することを示した。そこで、HIVが肝臓細胞に感染するという仮説を立てた。

今年度は、AIDS患者由来のHIVの外膜糖蛋白質を持つキメラウイルスを作成し、その感染様式を検討することを目的とした。

B. 研究方法

細胞株と細胞の培養 CD4陽性細胞として、293T細胞とヒトグリオーマ細胞U87細胞を用いた。これらの細胞は、CD4のほかCXCR4あるいはCCR5を発現している。これらの細胞株をDMEM(Invitrogen)、300 μ g/mlのG-418 (Promega) と1 μ g/mlの

ピュロマイシン(Sigma)、10%ウシ胎児血清を含む培地で培養した。

CD4陰性細胞としてヒト骨肉腫(HOS)細胞¹とNP2細胞²を用いた。これらの細胞は、CXCR4かCCR5のいずれかを発現している。HOS細胞はDMEM、10%、ウシ胎児血清、1 μ g/mlピュロマイシン培地で、NP2細胞はDMEM、10%ウシ胎児血清、0.5 μ g/mlピュロマイシン培地で培養した。

CD4陰性のヒト肝臓癌由来細胞Huh7とHepG2³はDMEMと10%ウシ胎児血清で培養した。

¹ Dr. Landau から NIH AIDS Research and Reference Reagent Program により提供を受けた。

² 群馬大学星野浩郎博士から提供を受けた。

³ これらは、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから提供を受けた。

キメラウイルス作成 キメラウイルスは pNL43 に SDA-1、ADA、89.6 の外膜糖蛋白遺伝子を組み込んで作成した(Fig.1)。

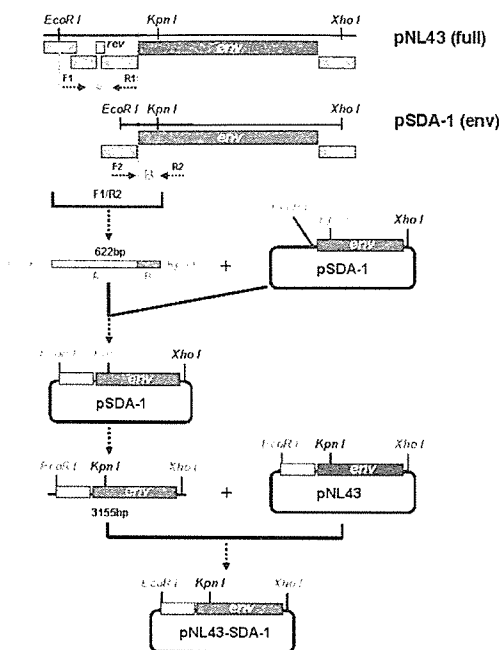


Fig1. NL43_SDA-1 キメラウイルスの作成手順

図中の PCR 産物 A は EcoRI サイトを含み、pNL43 のプライマー

(F1) 5'-GGCTCCATAACTTAGGACAAC-3' (nt 5671-5691)
(R1) 5'-CACTCTCATTGCCACTGTCTTCTG-3' (nt 6229-6206)

で増幅した。PCR 産物 B は KpnI サイトを含み pSDA-1 のプライマー

(F2) 5'-ACA GTGGCAATGAGAGTGAAGGAG-3'
(R2) 5'-TACTTCTTGTGGGTTGGGGTC-3'

で増幅した。622bp 断片は、EcoRI と KpnI 両方を含み、EcoRI のプライマー (F1) と KpnI のアンチプライマー (R2) で増幅し、その後 pSDA-1 プラスミドにこれらを挿入した。新たに pSDA-1 から得られる EcoRI-XhoI 断片 (3159bp) は pNL43 の対応する領域に移植され SDA-1 のエンベロープ配列を持つウイルスが合成された。同様にして、ADA と 89.6 のキメラウイルスも合成した。

ウイルスストックの生成 ウイルスストックの生成は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、293T 細胞へのトランスフェクションによって行った。48 時間後に上清を濾過し-80°C 保管した。ウイルス濃度は p24 抗原酵素免疫測定法により測定した (RETRO-TEK, ZeptoMetrix Corp.)。

外膜糖蛋白の発現 293T 細胞へのトランスフェクションは Western Blot で評価した。トランスフェクションの 48 時間後、293T 細胞を蛋白抽出試薬 (Pierce) で溶解し懸濁液を 7.5 ~ 15% SDS-PAGE で分離した後に、ブロッティングし、HIV-1 gp120 ウサギ抗血清を用い化学発光法により測定した (Amersham Biosciences)。

感染実験 感染前日、細胞を 96-well plates に 6×10^3 cells/well 播種した。翌日培地を除去し、10 ng の p24 量に相当するウイルスをそれぞれのウェルに加えた。37°C で 1 時間静置し細胞洗浄を 3 回行い、遊離しているウイルスを除去した。感染実験はそれぞれのウイルスについて少なくとも 2 回実施した。ウイルスの複製は、3 日後に p24 ELISA kit によって p24 抗原濃度を測定することで確認した。

C. 結果

NL43 ベースのキメラウイルス作成 われわれは NL43_SDA-1, NL43_ADA と NL43_89.6 の 3 種類のキメラウイルスを作成した。これらのキメラウイルスは X4 型ウイルスである pNL43 をもとに作られた。NL43_env (-) プラスミドはネガティブ・コントロールとして用いた。すべてのウイルスストックは 293T 細胞を用いたトランスフェクションによった。

キメラウイルスに組み込んだ SDA-1, ADA と 89.6 の外膜糖蛋白が機能しているかどうかを判定するために Western Blot を行った。Fig. 2 に示すようにキメラウイルス粒子の gp120 糖蛋白はトランスフェ

クシオンを行ったすべての 293T 細胞で検出された。

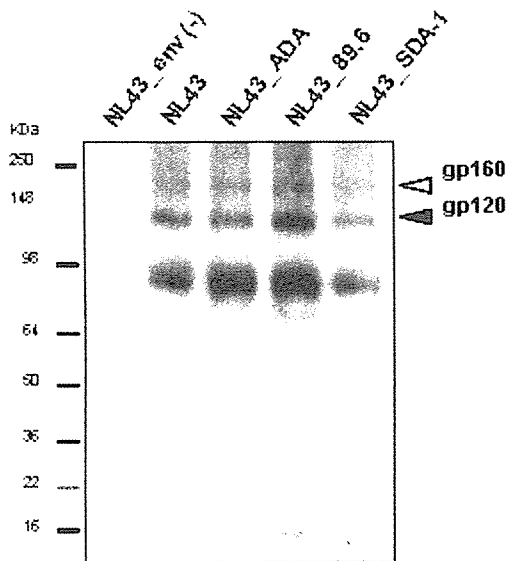


Fig2. Western Blot による外膜糖蛋白発現の評価

すなわち、NL43 をもとに作成したこれらのキメラウイルスは外膜糖蛋白を発現する機能がある。

CD4⁺/CD4⁻ 細胞株への感染実験

キメラウイルスの特徴を明らかにするために、U87.CD4.CXCR4 と U87.CD4.CCR5 細胞への感染性を検討した。Fig. 3A に示すように NL43_ADA は CCR5 のみを利用し、NL43_89.6 と NL43_SDA-1 は CXCR4 と CCR5 の両方を補受容体として利用することが示された。この結果は既知の ADA, 89.6 や SDA-1 ウイルスの特徴と一致する。

これらのキメラウイルスの CD4 非依存感染を明らかにするために、ヒト由来の CD4 陰性細胞への感染性を検討した。NL43_SDA-1 は HOS.CXCR4 細胞と HOS.CCR5 細胞の両方に感染した(Fig. 3B)。同様に NP-2.CXCR4 細胞と

NP-2.CCR5 細胞にも感染した(Fig. 3C)。特に NL43_SDA-1 はヒト肝臓癌由来細胞である Huh-7 と HepG2 に感染し、Huh7 への感染効率は HepG2 への約 3 倍であった(Fig. 3D)。

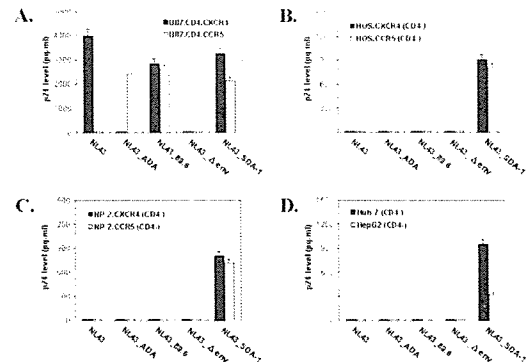


Fig. 3 NL43_SDA キメラウイルスの感染性

D. 考察

今年度は、HIV の肝臓細胞への感染を検討するためにキメラウイルスの作成を行い、NL43_SDA-1, NL43_ADA, NL43_89.6 という 3 種を得た。これらのキメラウイルスは X4 型の pNL43 をもとに作成し、膜蛋白質を発現している。NL43_SDA-1 は *in vitro* でヒトの CD4 陰性細胞に感染することが確認された。

HIV 感染が肝臓機能の障害をもたらすという報告は少なくない。もちろん、HARRT の影響など複数の要因が関与しているが、HIV 感染末期に生じる肝臓障害が重症化することは、本報告の結果と併せて検討する価値がある。臨床的にも、AST/ALT 比が ≥ 1 である重篤な肝臓障害が SDA-1 に感染した AIDS 患者の末期にみられた。この患者は、抗生物質投与後から肝機能が悪化し、薬剤の変更後は悪化が止まるも、HAART 開始約一週間で再度悪化という経過をたどった。これらの結果を

考えあわせると HIV が患者の体内で肝臓細胞に感染し、それによって肝臓障害が引き起こされた、と結論するには証拠に乏しい。

来年度以降は、今回作成したキメラウイルスをはじめとした CD4 非依存的な感染を示すウイルス株の感染様式を詳細に検討する。臨床的なアプローチとして、HIV の病態と肝臓機能との相関を調査することも重要であると考ええる。

E. 結論

NL43_SDA-1 キメラウイルスを作成し、ヒト肝臓由来細胞株への感染性を検討した。キメラウイルスはこれらの細胞に感染した。

F. 研究発表

論文発表

1. Zhang J, Hattori T. Small RNA molecules as therapeutic genes for viral infectious diseases. *J Pharmacol Toxicol* In press.
2. 服部俊夫, 巽浩一郎, 岩垣博己, 佐久間光江. ウイルス感染とバイオデフェンス. *Mebio* 別冊 2007; 24: 16-21.
3. 服部俊夫, 芦野有悟, 宇佐美修, 古田里佳. HIV の感染と増殖のメカニズム. *診断と治療* 2006; 94: 2208-2212.
4. Usami O, Xiao P, Ling H, Hattori T. Competitive Study of Monoclonal Antibodies Against the HIV-1 Gp41 Core Structure. *Microbiol Immunol* 2006; 50: 131-134.

5. Li D, Gu H-X, Zhang S-Y, Zhong Z-H, Zhuang M, Hattori T. YMDD mutations and genotypes of HBV in Northern China. *J J Infect Dis* 2006; 59: 42-45.

学会発表

1. Xiao P, Ling H, Usami O, Furuta R-A, Shimizu N, Hoshino H, Zhuang M, Hattori T. Characterization of a CD4-independent primary HIV-1 isolate from *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia patient. 10th Anniversary Annual International Meeting of the Institute of Human Virology, Baltimore, U.S.A. 2006.
2. Usami O, Xiao P, Nakasone T, Hattori T. Anti-gp41 immunity of pneumocystis (pc) patients. *ATS*, Diego, 2006.
3. 芦野有悟, 西巻雄司, 服部俊夫. 当院における肺日和見感染を合併した後天性免疫不全症候群 (AIDS) 発症患者の臨床像の検討. 第 46 回日本呼吸器学会, 東京. 2006.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
髭 修平	ペグ化インターフェロン	戸田剛太郎、 沖田極、門田 守人	肝臓病の最新治療	先端医療技術研究所	東京都	2006	34-39
茶山一彰			名医のわかりやすい肝臓の病気 B型・C型肝炎から肝がんまで	同文書院	東京都	2006	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Koike K</u>	Hepatitis C virus infection can present with metabolic disease by inducing insulin resistance	Intervirolgy	49	51-57	2006
<u>Koike K</u> , Miyoshi H	Oxidative stress and hepatitis C viral infection	Hepatol Res	34	65-76	2006
Nukui Y, Tajima S, Kotaki A, Ito M, Takasaki T, <u>Koike K</u> , Kurane I	Novel dengue virus type 1 from travelers to Yap State, Micronesia	Emerg Infect Dis	12(2)	343-346	2006
<u>Koike K</u>	Oxidative stress and apoptosis in hepatitis C: the core issue	J Gastroenterology	41	292-294	2006
Okuse C, Yotsuyanagi H, Nagase Y, Kobayashi Y, Yasuda Y, <u>Koike K</u> , Iino S, Suzuki M, Itoh F	Risk Factors for Retinopathy Associated with Interferon Alpha-2b and Ribavirin Combination Therapy in Patients with Chronic Hepatitis C	World J Gastroenterol	12	3759-3759	2006
Matsuoka-Aizawa S, Gatanaga H, Sato H, <u>Koike K</u> , Kimura K, Oka S	Gag substitutions responsible for nelfinavir-dependent enhancement of precursor cleavage and human immunodeficiency virus type-1 replication	Antiviral Res	70	51-59	2006

Saito R, Sato K, Kumita W, Inami N, Nishiyama H, Okamura N, Moriya K, <u>Koike K</u>	Role of type II topoisomerase mutations and AcrAB efflux pump in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of <i>Proteus mirabilis</i>	J Antimicrob Chemoth	58	673-677	2006
Okugawa S, Yanagimoto S, Tsukada K, Kitazawa T, <u>Koike K</u> , Kimura S, Nagase H, Hirai K, Ota Y	Bacterial fragelin inhibits T cell receptor-mediated activation of T cells by inducing suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1)	Cell Microbiol	8	1571-1580	2006
Kitazawa T, Ota Y, Kada N, Morisawa Y, Yoshida A, <u>Koike K</u> , Kimura S	Successful vancomycin desensitization with a combination of rapid and slow infusion methods	Intern Med	45	317-321	2006
<u>Koike K</u>	Antiviral treatment of hepatitis C: present status and future prospects	J Infect Chemother	12	227-232	2006
Takahashi H, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Koibuchi T, Suzuki M, Kato T, Nakamura T, Iwamoto A, Nishioka K, Iino S, <u>Koike K</u> , Itoh F	Molecular epidemiology of hepatitis A virus in metropolitan areas in Japan	J Gastroenterol	41	981-986	2006
Shin N, Sugawara Y, Tsukada K, Tamura S, Akamatsu N, Okugawa S, <u>Koike K</u> , Kikuchi K, Makuuchi M	Successful treatment of disseminated <i>Nocardia farcinica</i> infection in a living donor liver transplantation recipient.	Transpl Infect Dis	8	222-225	2006
<u>Koike K</u> , Tsukada K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Kikuchi Y, Oka S, Kimura S	Prevalence of Coinfection with Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus in Japan	Hepatol Res	37	2-5	2007
Bi X, Gatanaga H, <u>Koike K</u> , Kimura S, Oka S	Reversal periods and patterns from drug resistant to wild-type HIV-1 after cessation of anti-HIV therapy	AIDS Res Hum Retro	23	43-50	2007

Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, <u>Koike K</u> , Matsuura Y	Hepatitis C Virus Core Protein Induces Insulin Resistance through a PA28 γ -Dependent Pathway	J Virol 2007	81	1727-1735	2007
Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, <u>Koike K</u> , Matsuura Y	Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis	Proc Natl Acad Sci USA	104	1661-1666	2007
<u>Koike K</u>	Pathogenesis of HCV-associated HCC: dual-pass carcinogenesis through the activation of oxidative stress and intracellular signaling	Hepatol Res	In press		2007
<u>Koike K</u>	Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways	J Gastroenterol Hepatol	In press		2007
Yotsuyanagi H, <u>Koike K</u>	Mechanisms underlying drug resistance in antiviral treatment for infections with hepatitis B and C viruses	J Gastroenterol	In press		2007
Saito R, Sato K, Kumita W, Inami N, Nishiyama H, Okamura N, Moriya K, <u>Koike K</u>	Detection of plasmid-mediated quinolone resistance associated with qnrA in Escherichia coli clinical isolate producing CTX-M-9 beta-lactamase in Japan	Int J Antimicrob Agents	In press		2007
Suzuki Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Nagase Y, Takahashi H, Moriya K, Suzuki M, <u>Koike K</u> , Iino S, Itoh F	Fatal liver failure caused by reactivation of lamivudine-resistant hepatitis B virus: A case report	World J Gastroenterol	In press		2007
<u>Yamamoto K</u> , <u>Honda T</u> , <u>Matsushita T</u> , <u>Kojima T</u> , <u>Takamatsu J</u>	Anti-HCV agent, ribavirin, elevates the activity of clotting factor VII in patients with hemophilia: a possible mechanism of decreased events of bleeding in patients with hemophilia	Journal of Thrombosis and Haemostasis	4(2)	469-470	2006

	by ribavirin				
Gatanaga H, Tachikawa N, <u>Kikuchi Y</u> , Teruya K, Genka Y, Honda M, Tanuma J, Yazaki H, Ueda A, Kimura S, Oka S	Urinary beta2-microglobulin as a possible sensitive marker for renal injury caused by tenofovir disoproxil fumarate	AIDS Res Hum Retroviruses.	22	744-748	2006
Masaki N, Imamura M, <u>Kikuchi Y</u> , Oka S	Usefulness of elastometry in evaluating the extents of liver fibrosis in hemophiliacs coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus.	Hepatol Res.	35	135-139	2006
<u>Sugawara Y</u> , Makuuchi M.	Living donor liver transplantation to patients with hepatitis C virus cirrhosis.	World J Gastroenterol	12(28)	4461-4465	2006
<u>Sugawara Y</u> , Kaneko J, Makuuchi M.	Cyclosporin a for treatment of hepatitis C virus after liver transplantation.	Transplantation.	82(4)	579-580	2006
Okuse C, <u>Yotsuyanagi H</u> , Nagase Y, Kobayashi Y, Yasuda Y, Koike K, Iino S, Suzuki M, Itoh F.	Risk Factors for Retinopathy Associated with Interferon Alpha-2b and Ribavirin Combination Therapy in Patients with Chronic Hepatitis C.	World J Gastroenterol	12	3756-3759	2006
Takahashi H, <u>Yotsuyanagi H</u> , Yasuda K, Koibuchi T, Suzuki M, Kato T, Nakamura T, Iwamoto A, Nishioka K, Iino S, Koike K, Itoh F.	Molecular epidemiology of hepatitis A virus in metropolitan areas in Japan.	J Gastroenterol	41	981-986	2006
Koike K, Tsukada K, <u>Yotsuyanagi H</u> , Moriya K, Kikuchi Y, Oka S, Kimura S.	Prevalence of Coinfection with Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus in Japan.	Hepatol Res	37	2-5	2007

<u>Yotsuyanagi H</u> , Koike K.	Mechanisms underlying drug resistance in antiviral treatment for infections with hepatitis B and C viruses.	J Gastroenterol	In press		2007
Suzuki Y, <u>Yotsuyanagi H</u> , Okuse C, Nagase Y, Takahashi H, Moriya K, Suzuki M, Koike K, Iino S, Itoh F.	Fatal liver failure caused by reactivation of lamivudine-resistant hepatitis B virus: A case report.	World J Gastroenterol	In press		2007
Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, Kang JH, <u>Hige S</u> , Kuramitsu T, Suzuki K, Tanaka E, Okada S, Tokita H, Asahina Y, Inoue K, Kakumu S, Okanoue T, Murawaki Y, Hino K, Onji M, Yatsushashi H, Sakugawa H, Miyakawa Y, Ueda R, Mizokami M.	Influence of Genotypes and Precore Mutations on Fulminant or Chronic Outcome of Acute Hepatitis B Virus Infection.	Hepatology	44	326-334	2006
<u>Masaki N</u> , Imamura M, Kikuchi Y, Oka S	Usefulness of elastometry in evaluating the extents of liver fibrosis in hemophiliacs coinfectd with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus	Hepatol Res	35	135-139	2006
Okuyama N, Ide Y, Nakano M, Nakagawa T, Yamanaka K, Moriwaki K, Murata K, Ohigashi H, Yokoyama S, Eguchi H, Ishikawa O, Ito T, <u>Kato M</u> , Kasahara A, Kawano S, Gu J, Taniguchi N, Miyoshi E	Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer : A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation	Int.J.Cancer	118	2803-2808	2006

Hiramatsu N, Oze T, Tsuda N, Kurashige N, Koga K, Toyama T, Yasumaru M, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, <u>Kato M</u> , Yoshihara H, Katayama K, Hijioka T, Hagiwara H, Kubota S, Oshita M, Haruna Y, Mita E, Suzuki K, Ishibashi K, Hayashi N	Should aged patients with chronic hepatitis C be treated with interferon and ribavirin combination therapy?	Hepatol Res	35	185-189	2006
Oze T, Hiramatsu N, Kurashige N, Tsuda N, Yakushijin T, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, <u>Kato M</u> , Yoshihara H, Katayama K, Kubota S, Hijioka T, Ishibashi K, Oshita M, Hagiwara H, Haruna Y, Mita E, Tamura S, Hayashi N	Early decline of hemoglobin correlates with progression of ribavirin-induced hemolytic anemia during interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C	J Gastroenterol	41	862-872	2006
Yuki N, Hijikata Y, <u>Kato M</u> , Kawahara K, Wakasa K	Squamous cell carcinoma as a rare entity of primary liver tumor with grave prognosis	Hepatol Res	36	322-327	2006
Ide F, <u>Nakamura T</u> , Tomizawa M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Hosoya N, Iwamoto A.	Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: A phase 1 trial.	J. Med. Virol.	78	711-718	2006
Usami, O., Xiao, P., Hong Ling, H. and <u>Hattori, T</u>	Competitive Study of Monoclonal Antibodies Against the HIV-1 Gp41 Core Structure	Microbiology and Immunology	50	131-134	2006
Di Li, Hong-Xi Gu, Shu-Yun Zhang, Zhao-Hua Zhong ¹ , Min Zhuang, <u>Toshio Hattori</u>	YMDD mutations and genotypes of HBV in Northern China	J J Infectious Diseases	59	42-45	2006
Zhang J and <u>Hattori T</u>	Small RNA molecules as therapeutic genes for viral infectious diseases.	Journal of Pharmacology and Toxicology			In press

山田典栄, <u>四柳宏</u>	ウイルス感染症 UPDATE 肝炎ウイルス わが国における B 型急性肝炎の現状	医学のあゆみ	218	895-898	2006
伊与田賢也、泉 裕子、 <u>加藤道夫</u>	Peg-IFN+リバビリン併用療法における超早期治療効果予測	消化器科	43	471-477	2006
三田英治、 <u>加藤道夫</u>	薬剤師の慢性肝炎患者さんへの対応 B 型肝炎ウイルスに感染していることが判明したのに、様子をみると言われました、薬を使って早く治したいのですが・・・	薬局	57	3258-3262	2006
熊田博光、豊田成司、後藤賢一郎、井廻道夫、藤原研司、横須賀收、佐藤信紘、安田清美、泉 並木、市田隆文、本多政夫、小島紘一、吉岡健太郎、富田栄一、熊田 卓、 <u>加藤道夫</u> 、吉原治正、下村宏之、山田剛太郎、向坂彰太郎、谷川久一	Genotype1 かつ低ウイルス量、あるいは genotype2 の C 型慢性肝炎に対する PEG-インターフェロン α -2b とリバビリン 24 週併用療法の有効性 -インターフェロン α -2b とリバビリン 24 週間併用療法との比較-	肝胆膵	52	645-663	2006
<u>服部俊夫</u> 、巽浩一郎、岩垣博己、佐久間光江	ウイルス感染とバイオデフェンス	Me b i o 別冊	24	16-21	2007
<u>服部俊夫</u> 、芦野有悟、宇佐美修、古田里佳	H I V の感染と増殖のメカニズム	診断と治療	94	2208-2212	2006

Hepatitis C Virus Infection Can Present with Metabolic Disease by Inducing Insulin Resistance

Kazuhiko Koike

Department of Infectious Diseases, Internal Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

Key Words

Diabetes · Hepatitis C virus · Insulin resistance · Insulin receptor substrate · Transgenic mouse

Abstract

Although hepatitis C virus (HCV) targets the liver, it has become increasingly evident that HCV can induce diseases of many organs. Recently, much attention is drawn to metabolic disorders in HCV infection. First, hepatic steatosis and derangement in lipid metabolism have been found characteristic of HCV infection, and later on, a correlation was noted between HCV infection and diabetes as well as insulin resistance. We have demonstrated that HCV by itself can induce insulin resistance through disturbing the insulin signaling pathway by HCV proteins. The fact that HCV infection induces insulin resistance by the virus itself may influence the progression of chronic liver disease and open up novel therapeutic approaches. In conclusion, towards the future, HCV infection needs to be viewed not only as a liver disease but also as a metabolic disease.

Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infects approximately 1.8 million people in Japan alone and as many as 200 million over the world and induces liver disease ranging from

chronic hepatitis through cirrhosis to hepatocellular carcinoma (HCC) [1, 2]. It has been noticed soon after the discovery that the infection with HCV does not exclusively involve the liver. In fact, type II cryoglobulinemia [3] and membranoproliferative glomerulonephritis [4] frequently occur in patients infected with HCV. Furthermore, strong associations of HCV infection with Sjogren's syndrome [5] and lichen planus [6] have been noted, which is verified in the animal model [7]. In addition, the relation between HCV infection and B cell lymphoma has attracted attention especially in Europe [8].

Recently, there have been increasing lines of evidence to indicate metabolic disturbances in HCV infection which, in turn, would influence the pathogenesis of chronic hepatitis C. The discovery of HCV in 1989 [9] enabled a comparison between chronic hepatitis C and other chronic liver diseases. As shown in the results, it has been repeatedly reported that steatosis is significantly associated with chronic hepatitis C [10, 11]. Steatosis in HCV infection is reproduced in animal models [12–14] to reinforce a pathologic role of HCV. Furthermore, patients infected with HCV have abnormalities in serum lipids, such as hypocholesterolemia and abnormal levels of apolipoproteins in serum [15, 16]; they are rectified in sustained virological responders to interferon (IFN) [16]. Thus, the association between HCV infection and a derangement in lipid metabolism has become increasingly strong, both in patients and experimental systems in animals. Finally, patients with chronic hepatitis C accompanied by severe steatosis develop hepatic fibrosis with an

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2006 S. Karger AG, Basel
0300–5526/06/0492–0051\$23.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/int

Kazuhiko Koike, MD
Department of Infectious Diseases, Internal Medicine
Graduate School of Medicine, University of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655 (Japan)
Fax +81 3 5800 8799, E-Mail kkoike-ty@umin.ac.jp

increased velocity [17]. All in all, we could say that abnormal lipid metabolism in HCV infection is deeply involved in the pathogenesis of hepatitis C.

HCV Infection and Diabetes

Diabetes is suggested as another metabolic disease in association with HCV infection. In 1994, Allison et al. [18] reported an epidemiological link between diabetes and HCV infection. However, doubts were cast on the association in view of a decreased glucose tolerance in advanced chronic hepatitis as well as an increased opportunity for HCV infection in diabetics who frequently receive determination of blood sugar. Several reports from the same group and others followed along this line. The trend to accept the solid association between diabetes and HCV infection seems to have been triggered in the United States by the population study by Metha et al. [19].

However, the association between diabetes and HCV infection is blemished by factors responsible for decreased glucose tolerance, such as advanced cirrhosis, obesity and ageing common in patients with hepatitis C; they make it difficult to prove this association. Hence, there is a need to evaluate the association by basic studies in experimental systems.

HCV Infection Induces Insulin Resistance

We set out to demonstrate the association between HCV infection and diabetes using the animal model. Mice transgenic for the HCV core gene were employed to this end [12, 13]. These mice are engineered to have the HCV core gene of genotype 1b in the absence of other viral genes. They express HCV core protein of the expected size in the liver, in levels comparable with those of patients with chronic hepatitis C (fig. 1). Half of them develop HCC later during their lives [13]. These transgenic mice were fed with their normal littermates, and the glucose metabolism was compared between them [20].

Although mice transgenic for the core gene did not develop overt diabetes, they had markedly elevated serum levels of insulin. Plasma glucose levels were somewhat higher in transgenic mice than in their normal littermates, both in the fast and after ample feeding, with no significant differences between them. In remarkable contrast, serum insulin levels were significantly higher in transgenic than in normal mice in both conditions (fig. 2). Since such a combination of normal glucose levels and

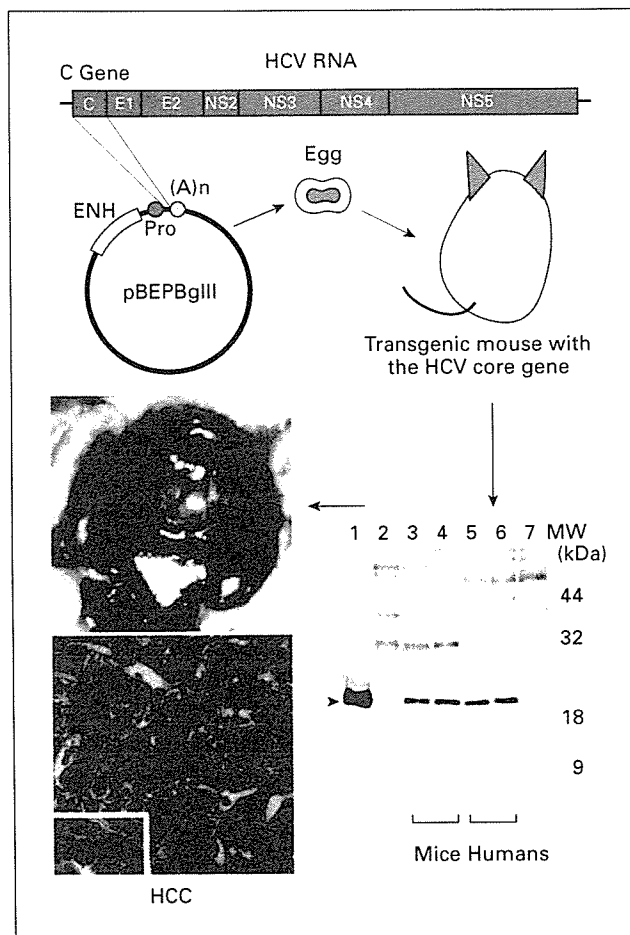


Fig. 1. Expression of HCV core gene in transgenic mouse. It carries the core gene of HCV genotype 1b alone and expresses the core protein of expected size in the liver, at levels similar to those in human patients. Mice eventually develop HCC later in their lives.

hyperinsulinemia points to insulin resistance, glucose and insulin tolerance tests were conducted.

Mice transgenic for the HCV core gene exhibited glucose levels a little higher than those in normal littermates, without any significant differences between them. In insulin tolerance tests, glucose levels were significantly higher in transgenic than in normal mice, both 40 and 60 min after they were injected with insulin intraperitoneally (fig. 3). These results indicate suppression of the activity of insulin to decrease blood glucose levels for inducing insulin resistance in core-transgenic mice. Since only the HCV core gene had been incorporated into these transgenic mice, HCV core protein was able to induce insulin resistance *in vivo*.

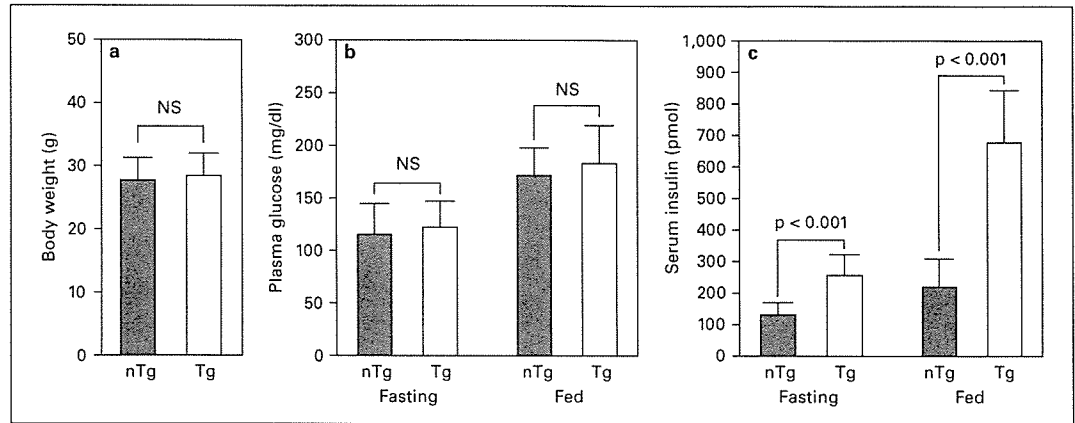


Fig. 2. Altered homeostasis of glucose in mice transgenic for the HCV core gene. Body weight of 2-month-old mice (a), plasma glucose levels in fasting or fed mice (b) and serum insulin levels in fasting or fed mice (c) are shown. Values represent means \pm SE. NS = Not significant statistically; nTg = nontransgenic mice; Tg = transgenic mice.

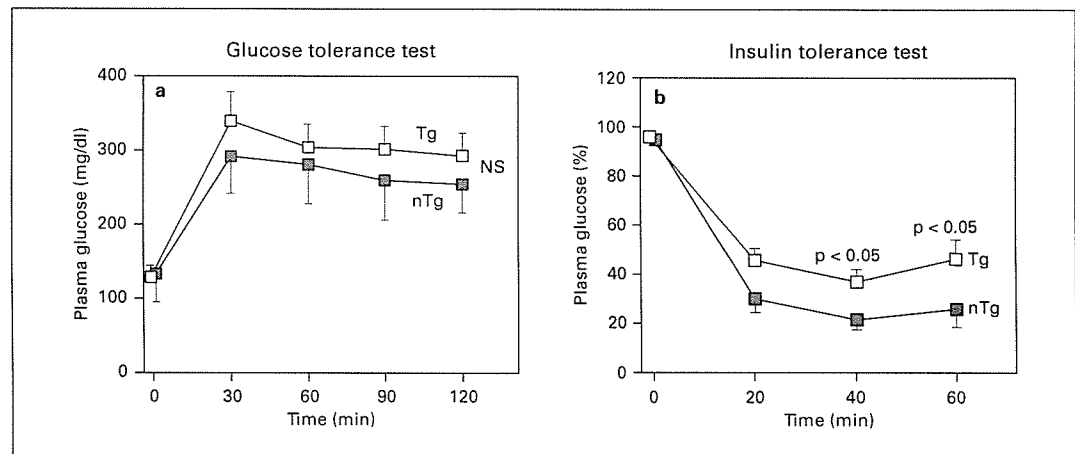


Fig. 3. Insulin resistance in transgenic mice. Glucose tolerance in mice after overnight fasting (a). *D*-Glucose (1 g/kg body weight) was given intraperitoneally to conscious mice, and plasma glucose levels were determined at time points indicated. b Insulin tolerance in mice fasted overnight. Human insulin (1 U/kg body weight) was injected intraperitoneally, and glucose concentrations were determined sequentially. Values were normalized to the baseline glucose concentration at the time of insulin administration. NS = Not significant statistically; nTg = nontransgenic mice; Tg = transgenic mice.

By what mechanism does insulin resistance arise in this animal model? The insulin resistance is considered to involve two factors, namely central and peripheral insulin resistances (table 1) [21]. The hyperinsulinemic-euglycemic clamp method was employed to differentiate between them. In this method, hepatic glucose production (HGP) is calculated on the basis of amounts of glu-

cose required to keep plasma glucose levels within a certain range at serum insulin levels higher than physiological ones. In normal control mice, HPG was suppressed by 60% by the administration of insulin, in contrast to core-transgenic mice in which there was no appreciable suppression of HGP by insulin (fig. 4). These results indicate a hepatic (central) origin of the insulin resistance