

ずしも夫婦間感染によるものとは考えられなかった。

福岡県 H 村の HCV 感染者のうち輸血歴が認められたのは 11.9%のみであった。当地区における HCV の感染経路を解明するため、1950-60 年代の住民の医療圏、すなわち掛かり付けであった医療機関について、聴き取り調査を行った。その結果、ある医療機関に通院していた住民に HCV 抗体陽性率が高いことが判明し、さらに、そこでは使用した注射器および針が十分に滅菌されずに、繰り返し使用されていたことが判明した。台湾でも non-disposable の注射針が C 型急性肝炎の感染経路であったことが報告されている。本邦で disposable の注射器および針などが使用され始めたのは 1963 年頃であり、地方まで普及したのは最近である。

以上のことから、本邦における HCV の感染経路は母児間感染および夫婦間感染よりも、輸血を含む医療行為が主であったと考えられた。

2. 最近の HCV の感染状況

福岡県 H 村において、1993 年の調査で HCV 抗体が陰性であった 1,351 例について、追跡調査を 2003 年まで行った。新たな HCV 抗体陽性例が 70 歳および 74 歳女性に認められ、いずれも HCV RNA も陽性であった。このうち 1 例は医療機関で下部消化管内視鏡検査(生検を含む)を受けていた。C 型慢性肝炎患者の大腸ポリープ摘出術に用いた内視鏡で検査を受けた 1 組の夫婦が、HCV に感染し急性肝炎を発症した事例が米国で報告されている。著者らの症例も、他に感染機会などが無いことから、同様な感染経路が考えられた。いずれにしても、赤十字血液センターでのスクリーニング体制の改善、disposable 器材の普及などから、新たな HCV 感染は著明に減少していると思われる。しかし、欧米では薬物乱用者での注射器の廻し打ちによる感染が多く報告されているが、わが国でもこのような感染経路による感染が散見されている。

血液透析患者では HCV 感染例が高頻度にみられることは既に述べたが、その原因としては、

HCV 抗体陽性率が透析期間に比例して高率になっていたこと⁵⁾、HCV 感染者の透析後の透析液には HCV RNA が存在していること⁶⁾などから、透析という行為の周辺に感染機会が多く存在していることが考えられた。また、透析に必要なヘパリン生食を作製する際に、HCV 感染者の血液が誤って混入した事例もあり⁷⁾、血液透析施設では、リスクマネジメントも考慮した院内感染対策が必要と考えられた。

3. 肝炎発症機序

1) HCV 感染例における肝機能異常

福岡県 H 村での HCV 感染 306 例について、年 1 回行われる肝機能検査の 10 年間の成績をまとめて検討すると、39.5%が肝機能持続正常群、41.5%が間欠異常群、19.0%が持続異常群であった。また、持続正常群には女性が多く、持続異常群には男性が多かった⁸⁾。

2) 肝炎発症とウイルス側因子

HCV RNA 量は C 型慢性肝炎患者では重症になるほど多くなるとの報告もあり、HCV RNA (ウイルス)量と肝障害の機序との関連が疑われていたが、その後の研究によりウイルス量と肝障害の程度との関連は認められないことが判明した⁹⁾。また、ウイルス量は 2-3 年では変化しないことも証明された⁹⁾。

著者らは、HCV のコア領域では変異が少ないこと、細胞障害性 T リンパ球 (CTL) が認識する領域であることに注目し、福岡県 H 村における肝機能持続正常群 10 例と持続異常群 10 例について、クローニング・シーケンスを行った。前者ではアミノ酸レベルでは変異がみられず、後者では変異が多くみられた⁹⁾。また、観察中、肝機能が正常から異常になった例では、今までなかったコア領域の変異が出現するようになった⁹⁾。すなわち、HCV 感染による肝障害と、HCV のコア領域でみたウイルスの多様性との関連性が示唆された。

3) 肝炎発症と宿主側因子

①免疫：近年、HCV 感染による肝炎の発症機序として、CTL を含む細胞性免疫の関与が注目

されている。著者らも、C型慢性肝炎患者の末梢血単核球ではIL-1 β およびTNF- α の産性能が亢進していること¹⁰⁾、T細胞の活性化を示すとされる可溶性IL-2レセプターが血清中で高値を示していることを報告してきた¹¹⁾。さらに、彼らの末梢血のリンパ球は、HCV陰性の患者に比較して、CD4⁺細胞ではIFN- γ ⁺細胞が有意に増加しており、CTLの前駆細胞とされるCD28⁺CD8⁺IFN- γ ⁺細胞が増加していることも判明し¹²⁾、HCV感染例における肝炎にCTLが深く関わっていることが考えられた。

②生活習慣：福岡県H村におけるHCV慢性感染者で肝機能異常に影響を及ぼす生活習慣因子として、喫煙本数、喫煙歴、Brinkmann index、飲酒量、飲酒歴、飲酒指数、重労働を、その他に年齢、性別、輸血歴、HCV genotype、ウイルス量を変数として検討した。HCV慢性感染例では、重労働2時間以上(OR: 20.60)、男性(OR: 5.98)、飲酒歴(OR: 1.04)が肝機能に影響を及ぼす因子として抽出されたが、HCV非感染者では飲酒指数(OR: 1.06)のみが抽出された。HCV慢性感染者では、飲酒のみでなく、重労働も肝機能を増悪させる危険因子の一つと考えられた¹³⁾。

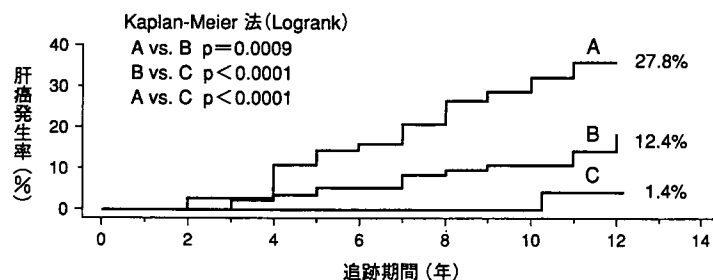
4. 肝癌発症機序

福岡県H村でのHCV持続感染411例において、12年間、肝癌発症について経過観察した。

肝癌発症例数は、64例(15.6%)であった。肝機能持続正常群144例では、5年目までに0例、12年目までに74歳と80歳の男性2例(1.4%)であったが、肝機能間欠異常群137例では、5年目に7例(5.1%)、12年目までに17例(12.4%)で、肝機能持続異常群144例では、5年目までに23例(17.7%)で、12年目までに36例(27.8%)であった(図1)。肝機能異常群に有意に多くの肝癌発症が見られたことから、C型慢性肝炎における肝癌発症には、持続する炎症が重要な役割を果たしていると考えられた⁹⁾。

欧米での研究では、C型の肝硬変患者のgenotypeは1a型および1b型が多いとされている。しかし、本邦での成績はgenotypeと肝障害の程度には関連がないとの報告が多く、1b型からも2a型からも同程度の割合で肝癌の発症がみられている。

福岡県を含む九州では、成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-1)の高浸淫地区である。HTLV-1は白血病を起こすだけでなく、免疫異常を起こすため種々の疾患に関連していることが明らかとなっている(脊髄症、ぶどう膜炎、関節症、皮膚筋炎)。HCVに関しては、HCV感染者にHTLV-1が重複感染すると、HCV単独感染に比較して肝癌の発症頻度が高く、また若年で発症する傾向がみられることが、著者らの調査で判明した。



A: 肝機能持続異常群	3/130	5/126	2/121	8/117	5/109	2/102	3/98	5/91	3/80	0/76	36例
B: 肝機能間欠異常群	1/137	2/134	1/132	0/131	3/127	1/135	3/132	3/128	3/80	0/121	17例
C: 肝機能持続正常群	0/144	0/143	0/140	0/139	0/139	0/135	0/134	1/132	0/123	1/121	2例

図1 HCV感染者(411例)の累積肝癌発症率

5. IFN 療法

1) IFN 単独療法

わが国では、1992年にC型慢性肝炎に対してIFNの投与が保険適応となった。IFNには α と β があるが、当初IFN α は24週、 β は6-8週投与の単独療法であった。IFN投与終了後、ウイルスが持続的に陰性化かつ肝機能検査の正常化がみられる(著効)のは約25%であった。多変量回帰分析による著効に関連する因子を検討した結果、高ウイルス量、genotype 1b型、40歳以上の女性がIFN療法に対する負の因子であった^{14,15)}。その他に、肝硬変も重要な負の因子とされているが、肝硬変でもウイルス量が低い場合、IFNが有効な例もみられる¹⁶⁾。

2) IFN+リバビリン併用療法

近年、新たなIFNの開発および新たなIFN療法が試みられているが、2001年12月より、難治性C型慢性肝炎(genotype 1bかつ高ウイルス量)をターゲットとして、IFN α 2b+リバビリン併用療法が行われるようになった。著者らは九州大学関連病院肝疾患研究会(36施設)として、その効果を検討した。いわゆる難治例での著効率は347例中22.5%で、IFN単独療法の成績よりかなり高率であった¹⁷⁾。

2004年末より、週1回のPegIFN α 2bとリバビリン併用投与が48週間行われ、その効果が期待されている。米国での研究によれば、いわゆる

難治例に対しても、その著効率は約50%と報告されている。

3) IFNの肝癌発症抑制効果

著者らは、IFN投与患者の経過観察を行い、肝癌の発症について前向きに調査した。観察期間平均5.7年での肝癌発症率は、IFN α 投与群では260例中17例、6.5%、 β 投与群では91例中4例、4.4%で、福岡県H村の年齢を補正した肝機能持続異常群における5年の肝癌発症率17.7%に比較し低い値であった(図2)。特に、ウイルスが持続的に陰性化した著効例や、肝機能が正常化した例に肝癌発症が少ない傾向であった。IFN β 投与群では、IFN無効例でも肝癌発症例が少ない傾向がみられた¹⁸⁾。肝癌細胞株Huh7およびHepG2を用いた*in vitro*の著者らの実験では、IFN β で処理した株の方が、 α で処理した株より発育が抑制されており¹⁹⁾、IFN β はC型慢性肝炎に対する効果に拘わらず、抗腫瘍効果がみられているのかもしれない。

6. HCV感染と生活習慣病

1) 動脈硬化症

HCV感染者(男性218例、女性269例)では非感染者(男性1,852例、女性3,855例)に比較して、総コレステロール値、LDL-コレステロール値、中性脂肪のいずれも低い傾向がみられた(図3)。実際、頸動脈エコーにて頸動脈の内膜中膜肥厚(IMT値)を測定すると、HCV感染者と非感

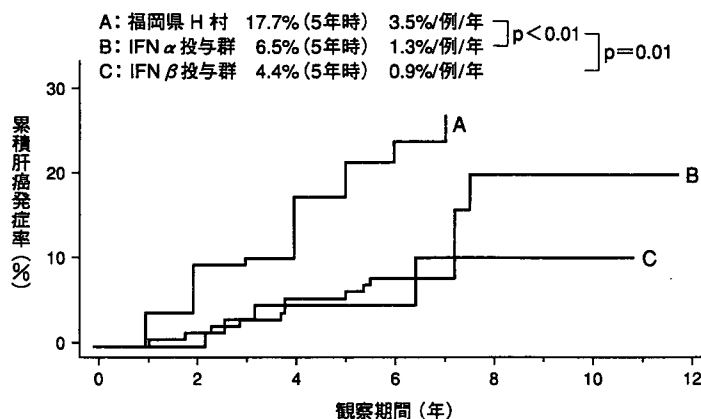


図2 インターフェロンによる肝癌発症抑制効果

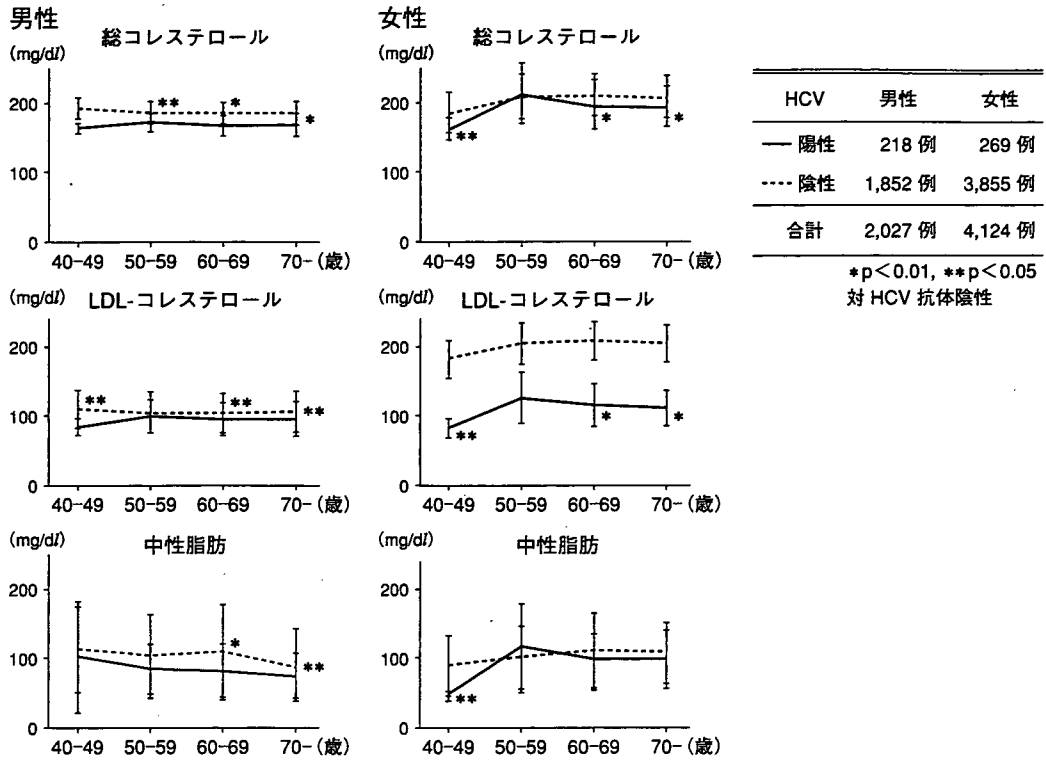


図3 血清脂質に対する HCV 感染の影響

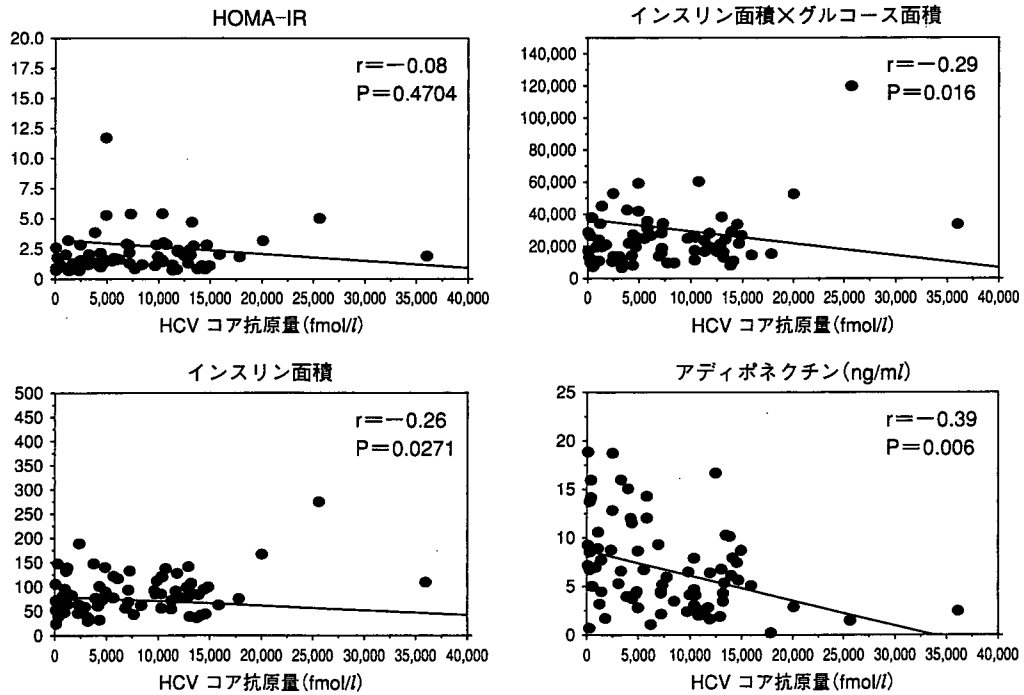


図4 HCV コア抗原量とインスリン抵抗性の指標

染者において差はみられなかった。しかし、プロブコールやプラバスタチンなどの抗高脂血症剤は、血清脂質を改善するだけでなく動脈硬化も改善させるが²⁰⁾、HCV感染者では動脈硬化の改善がみられなかった。HCV感染は肺炎クラミジア感染²¹⁾と同様に、動脈硬化の進展に寄与している可能性が考えられた。

2) HCV感染とインスリン抵抗性

HCVトランスジェニック・マウスに高脂肪食を食べさせると糖尿病を発症したが、コントロール・マウスでは発症しないことと、その原因としてインスリン抵抗性が関係していることが報告されている。著者らは、C型慢性肝炎患者81例に対してクッキー(糖質75g, 脂肪28.5g, 蛋白質7g, 計585Kcal)²²⁾を経口投与し、HOMA-IRだけでなく、インスリン面積、インスリン面積×グルコース面積を指標としてインスリン抵抗性を検討した。いずれの指標でもC型慢性肝炎患者では、コントロールに比較して高値であった。また、HCVコア蛋白量は種々のインスリン抵抗性の指標と有意な関連がみられるだけでなく、高分子量アディポネクチンとは逆相関がみられ(図4)、HCV感染とインスリン抵抗性との関連が強く示唆された。また、コントロールに比較して、血清脂質は低く、その増加率も低値であった。今後、さらにIFNの効果との関連を検討したい。

おわりに

わが国におけるHCV感染例の感染経路は、輸血を含む、医療行為によるものが主流と考えられたが、現在、新たな感染は激減している。肝炎の発症機序については、未だ不明な点が多いが、CTLを中心とした細胞性免疫とウイルスの変異との関与が考えられる。感染者に対するIFN療法は肝機能の改善だけでなく、ウイルスの排除、さらには肝癌発症の防止効果もみられ、有用と考えられる。さらに、著効率の高いとされるPegIFN α 2b+リバビリン併用療法も開始され、特に難治例に対しての効果に期待が持たれている。

また最近、HCV感染者では、インスリン抵抗

性の増加を介して、糖尿病を合併することが指摘されている。わが国の大部分のC型慢性肝炎患者は高齢化を迎えており、肝癌発症だけでなく、生活習慣病の合併についても注意を払わなければならない。

文 献

- 1) Hayashi J, Hirata M, Nakashima K, *et al.*: Hepatitis C virus is a more likely case of chronic liver disease in Japanese population than hepatitis B virus. *Fukuoka Acta Med* 1991; 82: 648-654.
- 2) Nakashima K, Kashiwagi S, Hayashi J, *et al.*: Sexual transmission of hepatitis C virus among female prostitutes and patients with sexually transmitted diseases in Fukuoka, Kyushu, Japan. *Am J Epidemiol* 1992; 136: 1132-1137.
- 3) Hayashi J, Kishihara Y, Yamaji K, *et al.*: Transmission of hepatitis C virus by health care workers in a rural area of Japan. *Am J Gastroenterol* 1995; 89: 794-799.
- 4) Nakashima K, Ikematsu H, Hayashi J, *et al.*: Intrafamilial transmission of hepatitis C virus among the population of an endemic area of Japan. *JAMA* 1995; 274: 1459-1461.
- 5) Hayashi J, Nakashima K, Kajiyama W, *et al.*: Prevalence of antibody to hepatitis C virus in hemodialysis patients. *Am J Epidemiol* 1991; 134: 651-657.
- 6) Furusyo N, Hayashi J, Kakuda K, *et al.*: Acute hepatitis C among Japanese hemodialysis patients: A prospective 9-year study. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1592-1600.
- 7) Furusyo N, Kubo N, Nakashima H, *et al.*: Confirmation of nosocomial hepatitis C virus infection in a hemodialysis unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 584-590.
- 8) Hayashi J, Kishihara Y, Yamaji K, *et al.*: Hepatitis C viral quasispecies and liver damage in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1997; 25: 697-701.
- 9) Hayashi J, Furusyo N, Ariyama I, *et al.*: A relationship between the evolution of hepatitis C virus variants, liver damage, and hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C viremia. *J Infect Dis* 2000; 181: 1523-1527.
- 10) Kishihara Y, Hayashi J, Yoshimura E, *et al.*: IL- β and TNF- α produced by peripheral blood mononuclear cells before and during interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 315-321.

- 11) Hayashi J, Kishihara Y, Yamaji K, *et al.*: Serum levels of soluble interleukin-2 receptors and effects of Interferon- α for patients with chronic hepatitis C virus. *Dig Dis Sci* 1995; **40**: 1837-1841.
- 12) Murata M, Nabeshima S, Maeda N, *et al.*: Increased frequency of IFN-gamma-producing peripheral CD8⁺ Tcells with memory-phenotype in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2002; **67**: 162-170.
- 13) Kubo N, Furusyo N, Nakashima H, *et al.*: Strenuous physical labor Is Important as a cause of elevated alanine aminotransferase levels In Japanese patients with chronic hepatitis C viremia. *Eur J Epidemiol* 2005; **20**: 251-261.
- 14) Hayashi J, Ohmiya M, Kishihara Y, *et al.*: A statistical analysis of predictive factors of response to human lymphoblastoid interferon in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1994; **89**: 2151-2156.
- 15) Hayashi J, Kishihara Y, Ueno K, *et al.*: Age-related response to interferon alfa treatment in women vs men with chronic hepatitis C virus infection. *Arch Intern Med* 1998; **158**: 177-181.
- 16) Furusyo N, Hayashi J, Ueno K, *et al.*: Human lymphoblastoid interferon treatment for patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *Clin Ther* 1997; **19**: 1352-1367.
- 17) 林 純: ぜひ知っておきたいウイルス肝炎から肝癌まで. 大同学館出版部, 福岡, 2005. p.13.
- 18) Kashiwagi K, Furusyo N, Kubo N, *et al.*: A prospective comparison of the effect of interferon-alpha and interferon-beta treatment in patients with chronic hepatitis C on the incidence of hepatocellular carcinoma development. *J Infect Chemother* 2003; **9**: 333-340.
- 19) Murata M, Nabeshima S, Kikuchi K, *et al.*: A comparison of the antitumor effects of interferon- α and β on human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cytokine* 2006; **33**: 121-128.
- 20) Sawayama Y, Shimizu C, Maeda N, *et al.*: Effects of probucol and pravastatin on common carotid atherosclerosis in patients with asymptomatic hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2002; **39**: 610-6016.
- 21) Sawayama Y, Tatsukawa M, Okada K, *et al.*: Association of *Chlamydia pneumoniae* antibody with the cholesterol-lowering effect of statins. *Atherosclerosis* 2003; **171**: 281-285.
- 22) Okada K, Maeda N, Kikuchi K, *et al.*: Pravastatin improves insulin resistance in dyslipidemic patients. *J Atheroscler Thromb* 2005; **12**: 322-329.

特集/性感染症—今、なにが問題か

性感染症—診断・治療

肝 炎

林 純 古 庄 憲 浩
 澤 山 泰 典 村 田 昌 之

はじめに

肝炎ウイルスとして、現在A, B, C, D, EおよびG型が認められている。A型肝炎ウイルスを(Hepatitis A Virus: HAV), B型肝炎ウイルスを(Hepatitis B Virus: HBV), 以下同様にHCV, HDV, HEV, HGVと記す。さらに、まだ完全に肝炎ウイルスの仲間として認知されていない感があるが、輸血後肝炎の日本人男性患者から分離されたTTウイルス(Torque Teno Virus: TTV)がある。表1にそれぞれの肝炎ウイルスの生物学的性状を比較した。HBVおよびTTVはDNAウイルスであるが、その他はRNAウイルスで、主としてHAVおよびHEVは経口感染で、HBVおよびHCVは血液および体液を介した感染である。TTVは血液を介した感染が主と考えられているが、経口感染の存在も疑われている。HDVはHBV持続感染例にしか感染しえないこと、HEVは本邦ではまれであり、HAV感染に準じると考えられること、また、HGVおよびTTVは肝炎との関連が定かでないことから、本稿では省略する。

I. A型肝炎ウイルス(HAV)

1. 特 徴

HAVの主な感染経路は、fecal-oralである。すなわち、感染者の糞便中に排泄されたHAVが、なんらかの媒介体(感染源)を通して未感染者の口に入り感染が成立する。わが国においては衛生環境の改善により、かつてのようなHAV感染の大流行はなくなったが、散発性急性肝炎のなかでA型肝炎の占める割合は30%前後あり、けっして過去の疾患ではない。従来はカキなどの二枚貝の生食による季節的な発生が主であったが、男性同性愛者間では性行為の一種(anal-oral sex)により感染が起こることから、性感染症にも分類されている。

A型急性肝炎の臨床的特徴は、B型、C型に比較して38℃以上の発熱をきたす率が高い。食欲不振、悪心、嘔吐などの消化器症状、全身倦怠感、黄疸も高頻度にみられるが、慢性化することはない。

2. 診 断 法

A型肝炎は、血清中にIgM型HA抗体を検出

表 1 肝 炎 ウ イ ル ス の 種 類

ウイルス	核 酸				感染経路	慢性化	
	種類	鎖性	サイズ				
A型肝炎ウイルス(HAV)	RNA	一本鎖	線状	+	7.5kb	経口	なし
B型肝炎ウイルス(HBV)	DNA	二本鎖	環状(不完全)	+	3.2kb	非経口	あり
C型肝炎ウイルス(HCV)	RNA	一本鎖	線状		9.5kb	非経口	あり
D型肝炎ウイルス(HDV)	RNA	一本鎖	環状		1.7kb	非経口(HBVに重複感染)	あり
E型肝炎ウイルス(HEV)	RNA	一本鎖	線状	+	8.5kb	主に経口	なし
G型肝炎ウイルス(HGV)	RNA	一本鎖	線状	+	9.4kb	経口	あり
TTウイルス(TTV)	DNA	一本鎖	環状		3.9kb	経口/非経口	あり

九州大学病院総合診療部
 九州大学大学院医学研究院感染環境分野

することで診断される。IgM型HA抗体は、一般にA型肝炎の発症早期より血中に出現し、3～6ヵ月間みられる。IgG型HA抗体はHAV感染がごく最近なものでも、かなり過去のものでも陽性となる。IgG型HA抗体のみで、A型肝炎の診断をする場合は、時期をおいて再検査し、抗体価の上昇を確認する必要がある。

3. 治療法

通常は特別な治療を必要とせずに3ヵ月以内に治癒するが、劇症肝炎や胆汁うっ滞をきたし、ステロイドの投与を必要とするような肝炎重症化例も散見される。A型肝炎の重症化の要因は従来、患者の高齢化、他の肝疾患の合併など宿主の因子によるものと考えられてきたが、ウイルス側の因子との関連も報告されるようになった。HAVの5'側非翻訳領域にHAVの増殖能に影響をあたえるsiteがあり¹⁾、その変異により感染ウイルス量が高値となり、重症化を引起すのではないかと考えられている²⁾。

4. 予 防

近年、HA抗体陽性率は30歳以下では著明に減少しており³⁾、HAVに易感染性の者が増加していると考えられる。HAV感染予防に対しては、HAワクチンの接種が有効と考えられる。ワクチンによるHA抗体獲得率は、3回の接種により5年後でもほぼ100%の抗体獲得率であった⁴⁾。

II. B型肝炎ウイルス (HBV)

1. 特 徴

HBVの感染経路としては、血液を介しての感染で輸血、医療行為などが主であるが、ヒトとヒトとの密接な接触でも感染する。HBV感染様式には持続感染と一過性感染がある。免疫機能の未熟な3歳以下の乳幼児がHBVに感染すると高率に持続感染(キャリア)に移行することが知られている。その感染経路としては、家族内感染が重要で、出産時の産道感染を含む母子間感染、父子間および同胞間の感染が認められ⁵⁾、さらには保育園内感染⁶⁾も報告されている。一過性感染には不顕性感染と急性肝炎があり、前者が約80%で、後者が20%である。不顕性感染では無症状でHBs抗体が検出されて治癒する。B型急性肝炎では、一定の潜伏期の後に、黄疸、発熱、消化器症状、倦怠感などで発症し、血液生化学的には、AST、ALT、LDHが著明に上昇し、総ビリルビンも上昇することが多い。

性行為による感染は、対象が成人であることから一般には一過性感染で、現在のB型急性肝炎の大部分は性行為によるとされている。特筆すべき点は、genotype Aによる急性肝炎の頻度が増加してきていることである。genotypeの分布には地域差があり、わが国のHBVキャリアはgenotype BとCが大半を占め⁷⁾、genotype Aは本来きわめてまれで、B型急性肝炎もgenotype BとCがほとんどであった。しかし、近年、性習慣の変化や多様化から、欧米やフィリピンに多いとされるgenotype Aによる急性肝炎が急速に都市部から広がりを見せ⁸⁾、最近ではB型急性肝炎の約50%を占めている。genotype Aによる急性肝炎の特徴は家族歴がなく、男性が90%以上を占め、感染経路は性行為が疑われることが多く、homosexualが約50%を占めるとされている⁹⁾。genotype BやCに比べ慢性化しやすいのが特徴であり、欧米の報告では慢性化率は約10%と報告されている。

著者らはヒト免疫不全ウイルス(HIV)およびHBVの重複感染のあるセックスパートナーとのdeep kissのみで感染したgenotype AのB型急性肝炎の男性同性愛者を経験したが、HIVは感染していなかった¹⁰⁾。このことからHBVはHIVに比較して、血液中だけでなく唾液中のウイルス量が多いため、感染しやすいと考えられた。

著者らの行った特殊浴場女性従業員についての調査では(表2)、HBc抗体は、28.2%と女性献血者に比べて有意に高率であった。25.1%にトレポネーマ・パリドム(TP)抗体が認められたため、このTP抗体の有無とHBc抗体について検討した。表3に示すように、TP抗体陽性89例中、41.6%がHBc抗体陽性であり、TP抗体陰性例の13.2%に比べて有意に高率であった。このような成績から、性行為の頻度が高い特殊浴場女性従業員ではHBVに高率に感染し、とくに梅毒に罹患し粘膜に損傷がある場合にはその危険性が高いことが示唆された¹¹⁾。

2. 診 断

B型急性肝炎の場合のHBV関連マーカーの経時的推移では、潜伏期から、HBs抗原、HBe抗原、DNAポリメラーゼ活性、HBVDNAが陽性となり、IgM型HBc抗体も陽性となる。発症後は早期にHBe抗原、DNAポリメラーゼ活性およびHBV DNAの陰性化、HBe抗体の陽性化がみられ、徐々にHBs抗原価も低下する。以後は、

表 2 特殊浴場女性従業員における HBc 抗体, HCV 抗体および TP 抗体の陽性率

対 象	例数	HBc 抗体 陽性 (%)	HCV 抗体 陽性 (%)	TP 抗体 陽性 (%)
特殊浴場女性従業員	354	100(28.2) ^a	33(9.3) ^a	89(25.1) ^a
女性献血者	424	104(21.7)	5(1.2)	1(0.2)

a: p<0.001

臨床症状の改善とともに、HBs 抗原は陰性化し、肝機能検査が正常域となって B 型急性肝炎は治癒する。なお、HBV 関連マーカーのその後の推移は、HBs 抗体は発症 4～6 ヶ月後に検出される例が多く、IgM 型 HBc 抗体価は徐々に低下するが、長期間、低力価で検出されることが多い¹²⁾。

3. 治 療

HBV が成人に感染した場合、慢性化することはなく特別な治療をしなくても、self limited で血中より HBs 抗原および HBVDNA が 3 ヶ月以内にほぼ消失するが、肝臓の組織内には HBVDNA が残存していることが知られている。すなわち、血液中の HBs 抗原、HBVDNA が陰性であっても、HBs 抗体、HBc 抗体が陽性の患者に抗癌剤や強力な免疫抑制剤を投与した場合 HBV が増殖し、B 型慢性肝炎の再燃がみられる事があるため注意を要する¹³⁾。また、臨床上問題となるのは、1～2%にみられる劇症化例である¹⁴⁾¹⁵⁾。急性肝炎の劇症化のメカニズムは、患者が HBe 抗原を産生しない HBV の変異株に感染することによって起こることが明らかになっている。近年、劇症肝炎の治療としては生体肝移植が積極的に行われている。

B 型慢性肝炎に対する治療としては、本邦では 1986 年より天然型インターフェロン (IFN) β が、1988 年より天然型 IFN α および組換え型 IFN α の投与が行われるようになった。一般には 4 週間の連日投与であるが、HBV の replication の抑制を示す HBe 抗原から HBe 抗体への seroconversion は投与例のうち 20～30%しかみられなかった。このため他の抗ウイルス剤との併用や、IFN の長期投与が試みられている。

抗 HIV 薬として使用されていた核酸誘導体であるラミブジン (3TC) が、HBV に対しても有効であることが判明し、2000 年より保険適応となった。B 型慢性肝炎患者に対する効果としては、投与 1 ヶ月で患者の 85%以上が血液中の HBV が測定感度以下になり肝機能検査も正常化するが、

表 3 特殊浴場女性従業員における TP 抗体別の HBc 抗体, HCV 抗体陽性率

TP 抗体	例数	HBc 抗体 陽性 (%)	HCV 抗体 陽性 (%)
陽性	89	37(41.6) ^a	21(23.6) ^a
陰性	265	35(13.2)	12(4.5)

a: p<0.001

この薬剤に対する耐性ウイルスの出現もあることから、2 年以上の投与では有効率は 50%と低下する¹⁶⁾。このようなラミブジン耐性ウイルスが出現した場合、アデフォビルを追加投与することにより耐性ウイルスを抑制することが可能である。さらに、2006 年 10 月よりエンテカビルも保険適応となった。

B 型急性肝炎に対しても重症化の危険性がある場合など、上述の核酸誘導体の投与がなされている。

4. 予 防

感染防止対策として、HBV キャリアに日常の自己管理と他人への感染予防を指導する必要がある。1. 血液による汚染の可能性のあるカミソリ¹⁴⁾、歯ブラシ、タオルなどは専用とし、共用しないように、2. 外傷などの出血はなるべく自分で手当てをして他人に血液が付着しないように配慮する、3. 血液、体液で汚染されたものは包んで廃棄する、4. 輸血のための献血は行わない、などを指導する。入浴、プール、理髪、食器などについては特別な配慮は必要としない。

性行為による HBV 感染は、セックスパートナーの一方が HBs 抗原キャリアである場合に起こる¹⁰⁾¹⁵⁾。HBV キャリアと結婚する場合、その相手が HBV に未感染 (HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗体のいずれもが陰性) であれば、HB ワクチンの接種が勧められる。

HB ワクチンの接種方法は、初回、1 ヶ月後、6 ヶ月後の計 3 回の接種で、皮下あるいは、筋肉内接種である。3 回接種後の HBs 抗体獲得率は

表 4 A 地区における HCV 抗体の性・年齢別頻度

年齢	男性		女性		合計	
	例数	陽性(%)	例数	陽性(%)	例数	陽性(%)
～9	66	0	58	0	124	0
10～19	96	0	72	0	168	0
20～29	37	1(2.7)	28	1(3.6)	65	2(3.1)
30～39	90	11(12.2) ^a	127	5(3.9)	217	16(7.3)
40～49	106	23(21.7) ^a	134	14(10.4)	240	37(15.4)
50～59	147	52(35.4) ^b	231	47(20.3)	378	99(26.2)
60～69	235	85(36.2) ^a	312	83(25.4)	547	168(30.7)
70～	118	33(28.0)	189	48(25.4)	307	81(26.4)
合計	895	205(22.9) ^b	1,151	198(17.2)	2,046	403(19.7)

a: p<0.05, b: p<0.01

80～95%である。感染防止に対する有効性については、母児間感染だけでなく、保育園内¹⁷⁾や心身障害患者施設内¹⁸⁾での水平感染に対しても認められている。さらに性行為による感染予防として、Szmunessら¹⁹⁾は男性同性愛者間でのHBV感染を防止できると報告している。

HBワクチンに関する問題点として、1.母児間感染の防止目的以外では、比較的高価な自費で行うこと、2.無反応例の存在、3.獲得抗体化の低下および消失である。その対策としては、通常量の1/3～1/4の量の皮内接種で行うと、経費節減となり、その抗体反応も、通常の皮下および筋肉内接種と差がない¹⁸⁾。

Ⅲ. C型肝炎ウイルス (HCV)

1. 特 徴

C型急性肝炎の症状、経過は他のウイルス肝炎とはほぼ同様であるが、一般にはA型急性肝炎、B型急性肝炎に比べ軽度で、劇症化はまれである。しかし、A型肝炎と異なり、HCV感染にはHBV感染と同様に持続感染と一過性感染がある。さらに、HBV感染と異なる点としては、免疫能の発達した成人でも、HCVに感染すると高率に持続感染(キャリア)に移行することが知られている。すなわち、急性肝炎の60～80%は慢性肝炎へ移行するとされている。本邦での慢性肝炎に占めるHCV感染は63.0%で、病型別では慢性肝炎の53.0%、肝硬変の70.0%、肝癌の79.3%である²⁰⁾。

HCVの感染マーカーであるHCV抗体は、頻回の輸血や血液製剤を受ける透析患者および血友病患者では、それぞれ30.4%、90.7%と著明に高率であった²¹⁾。透析患者でのHCV抗体陽性率は

輸血の回数に比例して高くなり、また、輸血歴のない患者でも22.1%と高く、透析期間と比例して高くなった²²⁾。以上の結果から、輸血だけでなく、頻回の医療行為を受けることもHCV感染の重要な感染経路ではないかと考えられた。

HCVの家族内感染については、多くの研究がなされている。母児間の感染率は5.6%とされ、その際HCV RNA量の高い母親から感染するとされている。また、夫婦感染については、Chayamaら²³⁾はHCVの分子生物学的検討を加え、夫婦間感染率は少なくとも4.5%は存在することを報告している。

以上のことを踏まえて、本邦におけるHCVの主な感染経路を知るために、HCV抗体陽性率が高いA地区(19.7%)(表4)²⁴⁾およびB地区(14.1%²⁵⁾において疫学的検討を行った。A地区ではHCVRNA陽性の母親の子供のHCV抗体陽性率は17.8%と高率であったが、彼らの平均年齢は43.8±3.3歳であり、住民の40歳代の15.4%と比較して差はみられなかった。さらに、両地区とも、19歳以下の住民にはHCV抗体陽性例は1例も存在しておらず、母児間感染は主流とは考えられなかった。

夫婦間感染についてみると、A地区ではHCV RNA陽性の女性の夫のHCV抗体陽性率は34.8%で、HCV RNA陽性の男性の妻のHCV抗体陽性率は22.2%であった。その平均年齢は、それぞれ62.7±1.6歳、61.4%±1.1歳であり、住民の60歳代の男性の36.2%および女性の26.6%と比較して差はみられなかった²⁴⁾。HCVのgenotype 1b型と2b型が混在しているB地区で、夫婦ともHCV RNA陽性の11組についてgenotypeを検討

表 5 夫婦ともに HCV RNA 陽性であった11組の genotype (B 地区)

症例	夫				妻			
	年齢	genotype	輸血歴	手術歴	年齢	genotype	輸血歴	手術歴
1	46	1b	-	+	43	1b	-	-
2	69	1b	-	+	61	1b	-	-
3	57	1b	+	+	56	1b	-	-
4	59	1b	-	+	64	1b	-	-
5	69	1b	-	+	67	1b	-	-
6	58	1b	-	-	59	2b	-	+
7	60	2b	-	+	67	1b	-	-
8	63	2b	-	-	69	1b	-	-
9	70	2b	+	+	66	1b	-	+
10	66	2b	-	+	62	1b	+	+
11	59	2b	-	+	51	2b	-	+

した。このうち6組は同じ genotype であったが、5組は異なっており(表5)、また、たとえ genotype が同一でも、必ずしも夫婦間感染によるものとは考えられなかった²⁵⁾。

A 地区の HCV 感染者のうち輸血歴が認められたのは11.9%のみであった。当地区における1970年頃の掛かり付け医療機関について、聴き取り調査を行った。その結果、ある医療機関に通院していた住民に HCV 抗体陽性率が高いことが判明し、さらに、そこでは使用した注射器および針が十分に滅菌されずに、再度使用されていたことが判明した²⁴⁾。台湾でもノン・ディスポーザブルの注射針がC型急性肝炎の感染経路であったことを報告している。本邦でのディスポーザブル注射器および針などが使用され始めたのは1963年頃であり、地方まで普及したのは最近である。以上のことから、本邦における HCV の感染経路は母児間感染および夫婦間感染よりも、輸血を含む医療行為が主であると考えられた。

しかし、夫婦間感染は少ないとはいえ、性感染症としての HCV 感染は重要である。著者らが行った調査では、女性の性感染症患者における HCV 抗体陽性率は6.1%で、女性献血者の1.6%に比較して有意に高率であった。また、男性の性感染症患者では2.9%と、男性献血者の1.7%に比べて有意に高率であった。性感染症のうちで梅毒患者での HCV 抗体陽性率が、男性で4.1%、女性で5.3%といずれも高率であった²⁵⁾。

また、特殊浴場女性従業員における HCV 抗体陽性率は、9.3%と女性献血者の1.2%に比べて有意に高率であった(表2)。また、TP 抗体との関連をみると(表3)、TP 抗体陽性例89例中、

23.6%が HCV 抗体陽性であり、TP 抗体陰性例の4.5%に比べて有意に高率であった。この成績は、前述の HBV と同様に梅毒の罹患との関連を証明するものであり、梅毒により粘膜に傷があれば、感染が成立するものと考えられる。この成績は、通常の夫婦間の検討とは矛盾する結果であるが、特殊浴場女性従業員の場合は性行為の回数が多く性感染症に罹患する機会も多い。したがって、通常の夫婦間よりはるかに HCV 感染の機会が多いと考えられる¹¹⁾。

2. 診 断

肝機能検査に異常があり、第2世代 HCV 抗体が陽性であれば、C型肝炎と診断されるが、実際の臨床の場では、現在 HCV に感染しているかどうかを検討するため、ウイルスの存在を示す HCV RNA を測定する必要がある。

C型肝炎の診断上の問題では、HCV RNA 陽性で、HCV 感染が考えられるのに抗体が検出されない場合と、逆に、HCV RNA が陰性で、HCV 感染がないのに抗体が検出される場合がある。前者としては、未だ HCV 抗体が産生されていない感染初期のC型急性肝炎や抗体産生の乏しい免疫不全合併例²⁷⁾が挙げられる。後者としては、C型急性肝炎の治癒例やC型慢性肝炎の IFN 治療後の治癒例、あるいは母親からの移行抗体が存在している場合もあるが、最も多いのは過去になんらかの機会に HCV に感染し、自然にウイルスが排除されてしまった状態である。

その他の HCV 関連マーカーとしては、HCV RNA 定量および HCV コア蛋白量はウイルス量を表し、IFN 療法の効果²⁸⁾²⁹⁾および感染力との関連性があり、HCV RNA genotype は IFN 療法の

効果²⁸⁾²⁹⁾との関連性だけでなく、感染経路の検討に有用であるが、本邦のHCVキャリアでの genotype は主として1b型が80%を占めており、次いで2a型、2b型である²⁸⁾³⁰⁾。

3. 治 療

C型急性肝炎は高率に慢性化するため、1～3ヵ月の観察で、血中よりHCVRNAが消失していない場合、積極的にIFN療法を行うことが望ましいと思われる。急性肝炎に対するIFN療法の効果は80%と慢性肝炎の30%に比較して高率で、完全に慢性肝炎となつてからIFNを投与するより有効であると考えられる。その際、感染初期であれば4週間の短期投与でも効果があることが証明されている³¹⁾。C型急性肝炎に対するIFN療法は医療現場での針刺し事故などによる感染の場合、労働災害として保険適応であるが、他の感染経路による場合は保険適応ではない。

慢性肝炎には1992年から一般にIFN療法が行われるようになったが、IFNは肝機能の改善だけでなく、ウイルスの排除²⁸⁾²⁹⁾、さらには肝臓癌発症の防止効果が疫学的³²⁾にも、実験的³³⁾にも認められている。IFN単独療法では、ウイルスが持続的に陰性化する著効率は約30%である。著者らは311例のC型慢性肝炎あるいは肝硬変に天然型IFN α を投与し、HCVRNAが持続的に陰性化する予測因子について多変量回帰分析を用いて検討した²⁸⁾²⁹⁾。その結果、高HCVRNA量および genotype 1b型の著効率は5%しかないことが判明した。現在、このような例は難治性C型慢性肝炎と呼ばれている。これらの症例へのIFN療法が重要となり、現在、週1回投与のpegIFN α -2bとリバビリ併用療法が行われている。著者らが九州大学関連肝疾患研究会として行っている成績では、このような難治性C型慢性肝炎での著効率は約40%と以前のIFN単独療法に比較し著明に増加した。しかし、著者らが以前より指摘していたが、女性および高齢者の著効率が低いことが課題に残されている²⁹⁾³⁴⁾。

4. 予 防

B型肝炎の予防の項で述べたように、HCVキャリアへ日常の自己管理と他人への感染予防についてはB型肝炎の場合と同様のこと(B型肝炎の項を参照)を指導する必要がある。

性行為によるHCV感染は、セックスパートナーの一方がHCVキャリアである場合に起こる。ワクチンも開発されておらず、コンドームの使用

以外、予防方法はないが、幸いに夫婦間感染率も少なく、特別な措置は必要ないと思われる。しかし、特殊浴場女性従業員でのHCV感染率が高いことから、夫婦間以外での性行為による感染の危険は高く、米国のCDCが指導しているように、セックスパートナーを減少させることも、一つの予防対策と考えられる。

お わ り に

肝炎ウイルスを性感染症の観点から述べた。性感染症としてHAV、HBVおよびHCVが重要と考えられる。その他HGV、TTVについては未だ明確でなく、HEVについては現在まったく不明で、今後の検討が待たれる。

文 献

- 1) Brown, E. A., Day, S. P., Jansen, R. W. et al.: The 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro. *J Virol*, 65: 5828-5838.
- 2) 藤原慶一, 横須賀収: 医歯薬出版, 医学の歩み (別冊), 消化器疾患 Vor 3, state of arts II 肝・胆・膵, A型肝炎. p508-5113, 2006.
- 3) Furusyo, N., Hayashi, J., Sawayama, Y. et al.: The elimination of hepatitis B virus infection; Changing seroepidemiology of hepatitis A and B virus infection in Okinawa, Japaover a 26 year period. *Am J Trop Med Hyg*, 59: 693-698, 1998.
- 4) 遠藤修, 田中克明; 岩田渥一郎ほか: 不活化A型肝炎ワクチン接種後の抗体価の長期観察. *臨床とウイルス*, 25: 43-47, 1997.
- 5) Kashiwagi, S., Hayashi, J., Ikematsu, W. et al.: Transmission of hepatitis B virus among siblings. *Am J Epidemiol*, 120: 617-625, 1984.
- 6) Hayashi, J., Kashiwagi, S., Nomura, H. et al.: Hepatitis B virus transmission in nursery schools. *Am J Epidemiol*, 125: 492-498, 1987.
- 7) Furusyo, N., Nakashima, H., Kashiwagi, K. et al.: Clinical outcomes of hepatitis B virus (HBV) genotypes B and C in Japanese patients with chronic HBV infection. *Am J Trop Med Hyg*, 67: 151-157, 2002.
- 8) Yotsuyanagi, H., Okuse, C., Yasuda, K. et al.: Distinct geographic distributions of hepatitis B virus genotypes in patients with acute infection in Japan. *J Med Virol*, 77: 39-46, 2005.
- 9) 朝比奈靖浩: 医歯薬出版, 医学の歩み (別冊), 消化器疾患 Vor 3, state of arts II 肝・胆・膵, B型肝炎の現況・病態・診断・治療. p512-516, 2006.
- 10) Kubo, N., Furusyo, N., Sawayama, Y. et al.: A Case in which only hepatitis B virus (HBV) was thought to have been contracted, by kissing, from a same-sex partner co-Infected with HBV and human Immunodeficiency virus-1. *J Infect Chemother*, 9: 260-264, 2003.
- 11) 澤山泰典, 林 純, 岸原康浩ほか: Commercial sex workers (CSW) およびSTD患者におけるHCVおよびHBV感染と梅毒疾患. *日性感染症会誌*, 8: 116-121, 1997.
- 12) 林 純, 古庄憲浩: 肝炎ウイルスマーカー. *臨床と研究*, 83: 188-192, 2006.
- 13) 林 純, 古庄憲浩, 中牟田誠ほか: ウイルス肝炎-HBs

- 抗原消失の機序とその問題点. 日本臨牀, 62: 106-111, 2004.
- 14) 林 純, 柏木征三郎, 野村秀幸ほか: カミソリの共用により感染したB型劇症肝炎の1例. 感染症誌, 59: 315-320, 1985.
 - 15) 平野勝也, 森孝宏, 奥村雄三ほか: 婚約者が感染源と考えられたB型劇症肝炎の救命例. 感染症誌, 62: 388-392, 1987.
 - 16) Furusyo, N., Takeoka, H.; Toyoda, K. et al.: Long-term lamivudine treatment for chronic hepatitis B in Japanese patients: A project of Kyushu University Liver Disease Study. *World J Gastroenterol*, 12: 561-567, 2006.
 - 17) Hayashi, J., Kashiwagi, S., Nomura, H. et al.: The control of hepatitis B virus infection with vaccine in Japanese nursery schools. *Am J Epidemiol*, 126: 474-479, 1987.
 - 18) Hayashi, J., Nakashima, K., Noguchi, A. et al.: Cost effectiveness of intradermal vs. subcutaneous hepatitis B vaccination for the mentally handicapped. *J Infect*, 23: 39-45, 1991.
 - 19) Szumunness, W., Stevens, C. E., Harley, E. J. et al.: Hepatitis B vaccine: Demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States. *N Engl J Med*, 303: 833-841, 1980.
 - 20) Hayashi, J., Hirata, M., Nakashima, K. et al.: Hepatitis C virus is a more likely cause of chronic liver disease in the Japanese population than hepatitis B virus. *Fukuoka Acta Med*, 82: 648-654, 1991.
 - 21) Hayashi, J., Nakashima, K., Yoshimura, E. et al.: Prevalence and role of hepatitis C viraemia in haemodialysis in Japan. *J Infect*, 28: 271-281, 1994.
 - 22) Hayashi, J., Nakashima, K., Kajiyama, W. et al.: Prevalence of antibody to hepatitis C virus in hemodialysis patients. *Am J Epidemiol*, 134: 651-657, 1991.
 - 23) Chayama, K., Kobayashi, M., Tsubota, A. et al.: Molecular analysis of intraspousal transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol*, 22: 431-439, 1995.
 - 24) Hayashi, J., Kishihara, Y., Yamaji, K. et al.: Transmission of hepatitis C virus by health care workers in a rural area of Japan. *Am J Gastroenterol*, 89: 2151-2156, 1994.
 - 25) Nakashima, K., Ikematsu, H., Hayashi, J. et al.: Intrafamilial transmission of hepatitis C virus among the population of an endemic area of Japan. *JAMA*, 274: 1459-1461, 1995.
 - 26) Nakashima, K., Kashiwagi, S., Hayashi, J. et al.: Sexual transmission of hepatitis C virus among female prostitutes and patients with sexually transmitted diseases in Fukuoka, Kyushu, Japan. *Am J Epidemiol*, 136: 1132-1137, 1992.
 - 27) Furusyo, N., Hayashi, J., Kakuda, K. et al.: Acute hepatitis C among Japanese hemodialysis patients: a prospective 9-year study. *Am J Gastroenterol*, 96: 1592-1600, 2001.
 - 28) Hayashi, J., Ohmiya, M., Kishihara, Y. et al.: A statistical analysis of predictive factors of response to human lymphoblastoid interferon in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*, 89: 2151-2156, 1994.
 - 29) Hayashi, J., Kishihara, Y., Ueno, K. et al.: Age-related response to interferon alfa treatment in women vs men with chronic hepatitis C virus infection. *Arch Intern Med*, 158: 177-181, 1998.
 - 30) Hayashi, J., Kishihara, Y., Yoshimura, E. et al.: Relationship of genotype to level of hepatitis C viraemia determined by competitive polymerase chain reaction. *J Infect*, 30: 235-239, 1995.
 - 31) Nomura, H., Sou, S., Tanimoto, H. et al.: Short-term interferon-alfa therapy for acute hepatitis C: A randomized controlled trial. *Hepatology*, 39: 1213-1219, 2004.
 - 32) Kashiwagi, K., Furusyo, N., Kubo, N. et al.: A retrospective comparison of the effect of interferon-alfa and interferon-beta treatment in patients with chronic hepatitis C on the incidence of hepatocellular carcinoma development. *J Infect Chemother*, 9: 333-340, 2003.
 - 33) Murata, M., Nabeshima, S., Kikuchi, K. et al.: A comparison of the antitumor effects of interferon- α and β on human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cytokine*, 33: 121-128, 2006.
 - 34) 林 純, 古庄憲浩, 柏木征三郎: 肝疾患と性差医療. 臨床と研究, 82: 1291-1296, 2005.

Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis

Kohji Moriishi*, Rika Mochizuki*, Kyoji Moriya[†], Hironobu Miyamoto*, Yoshio Mori*, Takayuki Abe*, Shigeo Murata[‡], Keiji Tanaka[‡], Tatsuo Miyamura[§], Tetsuro Suzuki[§], Kazuhiko Koike[†], and Yoshiharu Matsuura*^{¶1}

*Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan; [†]Department of Internal Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan; [‡]Department of Molecular Oncology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo 113-8613, Japan; and [§]Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

Edited by Peter Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, and approved December 1, 2006 (received for review August 23, 2006)

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic liver disease that frequently leads to steatosis, cirrhosis, and eventually hepatocellular carcinoma (HCC). HCV core protein is not only a component of viral particles but also a multifunctional protein because liver steatosis and HCC are developed in HCV core gene-transgenic (CoreTg) mice. Proteasome activator PA28 γ /REG γ regulates host and viral proteins such as nuclear hormone receptors and HCV core protein. Here we show that a knockout of the PA28 γ gene induces the accumulation of HCV core protein in the nucleus of hepatocytes of CoreTg mice and disrupts development of both hepatic steatosis and HCC. Furthermore, the genes related to fatty acid biosynthesis and *srebp-1c* promoter activity were up-regulated by HCV core protein in the cell line and the mouse liver in a PA28 γ -dependent manner. Heterodimer composed of liver X receptor α (LXR α) and retinoid X receptor α (RXR α) is known to up-regulate *srebp-1c* promoter activity. Our data also show that HCV core protein enhances the binding of LXR α /RXR α to LXR-response element in the presence but not the absence of PA28 γ . These findings suggest that PA28 γ plays a crucial role in the development of liver pathology induced by HCV infection.

fatty acid | proteasome | sterol regulatory element-binding protein (SREBP) | RXR α | LXR α

Hepatitis C virus (HCV) belongs to the Flaviviridae family, and it possesses a positive, single-stranded RNA genome that encodes a single polyprotein composed of \approx 3,000 aa. The HCV polyprotein is processed by host and viral proteases, resulting in 10 viral proteins. Viral structural proteins, including the capsid (core) protein and two envelope proteins, are located in the N-terminal one-third of the polyprotein, followed by nonstructural proteins.

HCV infects >170 million individuals worldwide, and then it causes liver disease, including hepatic steatosis, cirrhosis, and eventually hepatocellular carcinoma (HCC) (1). The prevalence of fatty infiltration in the livers of chronic hepatitis C patients has been reported to average \approx 50% (2, 3), which is higher than the percentage in patients infected with hepatitis B virus and other liver diseases. However, the precise functions of HCV proteins in the development of fatty liver remain unknown because of the lack of a system sufficient to investigate the pathogenesis of HCV. HCV core protein expression has been shown to induce lipid droplets in cell lines and hepatic steatosis and HCC in transgenic mice (4–6). These reports suggest that HCV core protein plays an important role in the development of various types of liver failure, including steatosis and HCC.

Recent reports suggest that lipid biosynthesis affects HCV replication (7–9). Involvement of a geranylgeranylated host protein, FBL2, in HCV replication through the interaction with NS5A suggests that the cholesterol biosynthesis pathway is also important for HCV replication (9). Increases in saturated and monounsaturated fatty acids enhance HCV RNA replication, whereas increases in polyunsaturated fatty acids suppress it (7). Lipid homeostasis is regulated by a family of steroid regulatory element-binding proteins (SREBPs), which activate the expression of >30 genes involved in

the synthesis and uptake of cholesterol, fatty acids, triglycerides, and phospholipids. Biosynthesis of cholesterol is regulated by SREBP-2, whereas that of fatty acids, triglycerides, and phospholipids is regulated by SREBP-1c (10–14). In chimpanzees, host genes involved in SREBP signaling are induced during the early stages of HCV infection (8). SREBP-1c regulates the transcription of acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, and stearoyl-CoA desaturase, leading to the production of saturated and monounsaturated fatty acids and triglycerides (15). SREBP-1c is transcriptionally regulated by liver X receptor (LXR) α and retinoid X receptor (RXR) α , which belong to a family of nuclear hormone receptors (15, 16). Accumulation of cellular fatty acids by HCV core protein is expected to be modulated by the SREBP-1c pathway because RXR α is activated by HCV core protein (17). However, it remains unknown whether HCV core protein regulates the *srebp-1c* promoter.

We previously reported (18) that HCV core protein specifically binds to the proteasome activator PA28 γ /REG γ in the nucleus and is degraded through a PA28 γ -dependent pathway. PA28 γ is well conserved from invertebrates to vertebrates, and amino acid sequences of human and murine PA28 γ s are identical (19). The homologous proteins, PA28 α and PA28 β , form a heteroheptamer in the cytoplasm, and they activate chymotrypsin-like peptidase activity of the 20S proteasome, whereas PA28 γ forms a homoheptamer in the nucleus, and it enhances trypsin-like peptidase activity of 20S proteasome (20). Recently, Li and colleagues (21) reported that PA28 γ binds to steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) and enhances the degradation of SRC-3 in a ubiquitin- and ATP-independent manner. However, the precise physiological functions of PA28 γ are largely unknown *in vivo*. In this work, we examine whether PA28 γ is required for liver pathology induced by HCV core protein *in vivo*.

Results

PA28 γ -Knockout HCV Core Gene Transgenic Mice. To determine the role of PA28 γ in HCV core-induced steatosis and the development of HCC *in vivo*, we prepared PA28 γ -knockout core gene transgenic mice. The PA28 γ -deficient, PA28 γ ^{-/-} mice were born without

Author contributions: K. Moriishi, K.T., T.M., T.S., K.K., and Y. Matsuura designed research; K. Moriishi, R.M., K. Moriya, H.M., Y. Mori, and T.A. performed research; S.M. contributed new reagents/analytic tools; Y. Matsuura analyzed data; and K. Moriishi, K.K., and Y. Matsuura wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS direct submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

Abbreviations: CoreTg, HCV core gene-transgenic; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; LXR, liver X receptor; LXRE, liver X receptor-response element; MEF, mouse embryonic fibroblast; ROS, reactive oxygen species; RXR, retinoid X receptor; SRC-3, steroid receptor coactivator-3; SREBP, steroid regulatory element-binding protein.

[¶]To whom correspondence should be addressed. E-mail: matsuura@biken.osaka-u.ac.jp.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0607312104/DC1

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

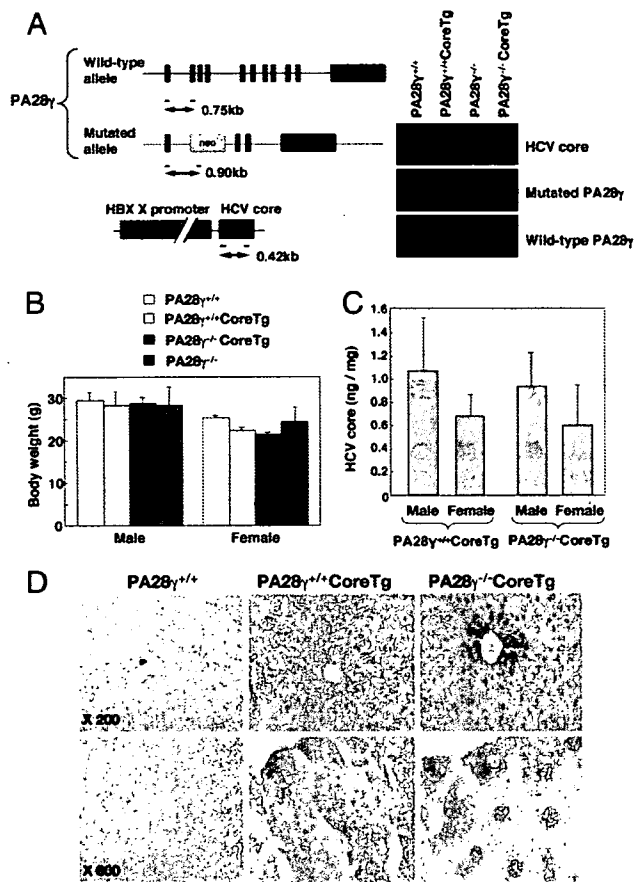


Fig. 1. Preparation and characterization of PA28 γ -knockout HCV core-transgenic mice. (A) The structures of the wild-type and mutated PA28 γ genes and the transgene encoding the HCV core protein under the control of the HBV X promoter were investigated. Positions corresponding to the screening primers and sizes of PCR products are shown. PCR products of the HCV core gene as well as wild-type and mutated PA28 γ alleles were amplified from the genomic DNAs of PA28 $\gamma^{+/+}$, PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg, PA28 $\gamma^{-/-}$, and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice. (B) Body weights of PA28 $\gamma^{+/+}$, PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg, PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg, and PA28 $\gamma^{-/-}$ mice at the age of 6 months. (C) HCV core protein levels in the livers of PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice were determined by ELISA (mean \pm SD, $n = 10$). (D) Localization of HCV core protein in the liver. Liver sections of PA28 $\gamma^{+/+}$, PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg, and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice at the age of 2 months were stained with anti-HCV core antibody.

appreciable abnormalities in all tissues examined, with the exception of a slight retardation of growth (22). HCV core-transgenic (PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg) mice were bred with PA28 $\gamma^{-/-}$ mice to create PA28 $\gamma^{+/-}$ CoreTg mice. The PA28 $\gamma^{+/-}$ CoreTg offspring were bred with each other, and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice were selected by PCR using primers specific to the target sequences (Fig. 1A). No significant differences in body weight were observed among the 6-month-old mice, although PA28 $\gamma^{-/-}$ mice exhibited a slight retardation of growth (Fig. 1B). A similar level of PA28 γ expression was detected in PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg and PA28 $\gamma^{+/+}$ mice (see Fig. 5B). The expression levels and molecular size of HCV core protein were similar in the livers of PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice (Fig. 1C; see also Fig. 5B).

PA28 γ Is Required for Degradation of HCV Core Protein in the Nucleus and Induction of Liver Steatosis. HCV core protein has been detected at various sites, such as the endoplasmic reticulum, mitochondria, lipid droplets, and nucleus of cultured cell lines, as well as in hepatocytes of PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice and hepatitis C patients

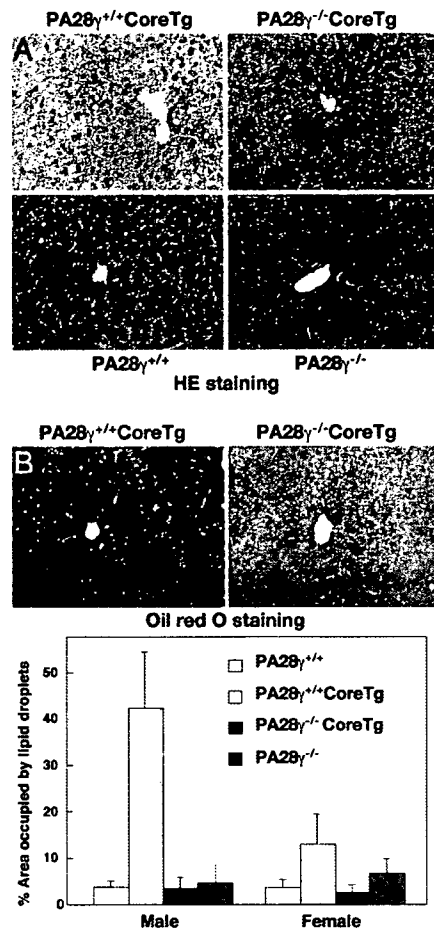


Fig. 2. Accumulation of lipid droplets by expression of HCV core protein. (A) Liver sections of the mice at the age of 6 months were stained with hematoxylin/eosin (HE). (B) (Upper) Liver sections of PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice at the age of 6 months were stained with oil red O. (Lower) The area occupied by lipid droplets of PA28 $\gamma^{+/+}$ (white), PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg (gray), PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg (black), and PA28 $\gamma^{-/-}$ (dark gray) mice was calculated by Image-Pro software (MediaCybernetics, Silver Spring, MD) (mean \pm SD, $n = 10$).

(6, 23, 24). Although HCV core protein is predominantly detected in the cytoplasm of the liver cells of PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice, as reported in ref. 6, in the present study a clear accumulation of HCV core protein was observed in the liver cell nuclei of PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice (Fig. 1D). These findings clearly indicate that at least some fraction of the HCV core protein is translocated into the nucleus and is degraded through a PA28 γ -dependent pathway. Mild vacuolation was observed in the cytoplasm of the liver cells of 4-month-old PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice, and it became more severe at 6 months, as reported in ref. 25. Hematoxylin/eosin-stained liver sections of 6-month-old PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice exhibited severe vacuolating lesions (Fig. 2A), which were clearly stained with oil red O (Fig. 2B Upper), whereas no such lesions were detected in the livers of PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg, PA28 $\gamma^{+/+}$, or PA28 $\gamma^{-/-}$ mice at the same age. The areas occupied by the lipid droplets in the PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mouse livers were ≈ 10 and 2–4 times larger than those of male and female of PA28 $\gamma^{+/+}$, PA28 $\gamma^{-/-}$, and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice, respectively (Fig. 2B Lower). These results suggest that PA28 γ is required for the induction of liver steatosis by HCV core protein in mice.

PA28 γ Is Required for the Up-Regulation of SREBP-1c Transcription by HCV Core Protein in the Mouse Liver. To clarify the effects of a knockout of the PA28 γ gene in PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice on lipid

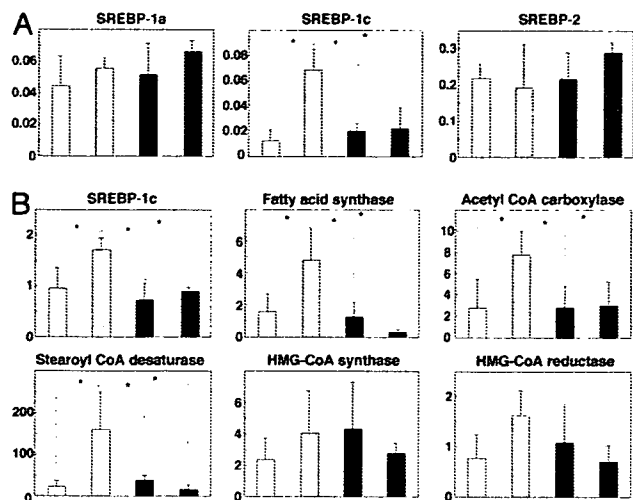


Fig. 3. Transcription of genes regulating lipid biosynthesis in the mouse liver. (A) Total RNA was prepared from the livers of 2-month-old mice; and the transcription of genes encoding SREBP-1a, SREBP-1c, and SREBP-2 was determined by real-time PCR. (B) The transcription of genes encoding SREBP-1c, fatty acid synthase, acetyl-CoA carboxylase, stearoyl-CoA desaturase, HMG-CoA synthase, and HMG-CoA reductase of 6-month-old mice was measured by real-time PCR. The transcription of the genes was normalized with that of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, and the values are expressed as relative activity ($n = 5$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). The transcription of each gene in PA28 $\gamma^{+/+}$, PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg, PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg, and PA28 $\gamma^{-/-}$ mice is indicated by white, gray, black, and dark gray bars, respectively.

metabolism, genes related to the lipid biosyntheses were examined by real-time quantitative PCR. Transcription of SREBP-1c was higher in the livers of PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice than in those of PA28 $\gamma^{+/+}$, PA28 $\gamma^{-/-}$, and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice at 2 months of age, but no such increases in SREBP-2 and SREBP-1a were observed (Fig. 3A). Although transcription of SREBP-1c and its regulating enzymes, such as acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, and stearoyl-CoA desaturase, was also enhanced in the livers of 6-month-old PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice compared with the levels in the livers of PA28 $\gamma^{+/+}$, PA28 $\gamma^{-/-}$, and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice, no statistically significant differences were observed with respect to the transcription levels of cholesterol biosynthesis-related genes that are regulated by SREBP-2 (e.g., HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase) (Fig. 3B). These results suggest the

following: (i) the up-regulation of SREBP-1c transcription in the livers of mice requires both HCV core protein and PA28 γ ; and (ii) the nuclear accumulation of HCV core protein alone, which occurs because of the lack of degradation along a PA28 γ -dependent proteasome pathway, does not activate the *srebp-1c* promoter.

HCV Core Protein Indirectly Potentiates *srebp-1c* Promoter Activity in an LXR α /RXR α -Dependent Manner. LXR α , which is primarily expressed in the liver, forms a complex with RXR α and synergistically potentiates *srebp-1c* promoter activity (16). Activation of RXR α by HCV core protein suggests that cellular fatty acid synthesis is modulated by the SREBP-1c pathway, although HCV core protein was not included in the transcription factor complex in the electrophoresis mobility shift assay (EMSA) (17). To analyze the effect of HCV core protein and PA28 γ on the activation of the *srebp-1c* promoter, we first examined the effect of HCV core protein on the binding of the LXR α /RXR α complex to the LXR-response element (LXRE) located upstream of the SREBP-1c gene (Fig. 4A). Although a weak shift of the labeled LXRE probe was observed by incubation with nuclear extracts prepared from 293T cells expressing FLAG-tagged LXR α and HA-tagged RXR α , a clear shift was obtained by the treatment of cells with 9-*cis*-retinoic acid and 22(*R*)-hydroxycholesterol, ligands for LXR α and RXR α , respectively. In contrast, coexpression of HCV core protein with LXR α and RXR α potentiated the shift of the probe irrespective of the treatment with the ligands. Addition of 500 times the amount of nonlabeled LXRE probe (competitor) diminished the shift of the labeled probe induced by the ligands and/or HCV core protein. Furthermore, coinubation of the nuclear fraction with antibody to FLAG or HA tag but not with antibody to either HCV core or PA28 γ caused a supershift of the labeled probe. These results indicate that HCV core protein does not participate in the LXR α /RXR α -LXRE complex but indirectly enhances the binding of LXR α /RXR α to the LXRE.

The activity of the *srebp-1c* promoter was enhanced by the expression of HCV core protein in 293T cells, and it was further enhanced by coexpression of LXR α /RXR α (Fig. 4B). Enhancement of the *srebp-1c* promoter by coexpression of HCV core protein and LXR α /RXR α was further potentiated by treatment with the ligands for LXR α and RXR α . The cells treated with 9-*cis*-retinoic acid exhibited more potent enhancement of the *srebp-1c* promoter than those treated with 22(*R*)-hydroxycholesterol. HCV core protein exhibited more potent enhancement of the *srebp-1c* promoter in cells treated with both ligands than in those treated with either ligand alone. These results suggest that HCV core protein poten-

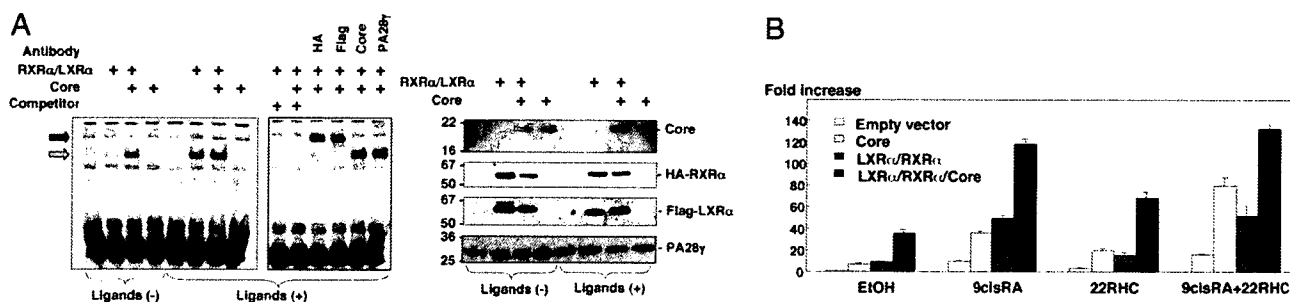


Fig. 4. Activation of the *srebp-1c* promoter by HCV core protein. (A) FLAG-LXR α and HA-RXR α were expressed in 293T cells together with or without HCV core protein. Ligands for LXR α and RXR α dissolved in ethanol [Ligands (+)] or ethanol alone [Ligands (-)] were added to the culture supernatant at 24 h posttransfection. Cells were harvested at 48 h posttransfection, and nuclear extracts were mixed with the reaction buffer for EMSA in the presence or absence of antibody (100 ng) against HA, FLAG, HCV core or PA28 γ , or nonlabeled LXRE probe (Competitor). (Left) The resulting mixtures were subjected to PAGE and blotted with horseradish peroxidase/streptavidin. The mobility shift of the LXRE probe and its supershift are indicated by a gray and black arrow, respectively. (Right) Expression of HCV core, HA-RXR α , FLAG-LXR α , and PA28 γ in cells was detected by immunoblotting. (B) Effects of ligands for RXR α , 9-*cis*-retinoic acid (9cisRA), and for LXR α , 22(*R*)-hydroxycholesterol (22RHC), on the activation of the *srebp-1c* promoter in 293T cells expressing RXR α , LXR α , and/or HCV core protein. Ligands were added into the medium at 24 h posttransfection at a concentration of 5 μ M, and the cells were harvested after 24 h of incubation.

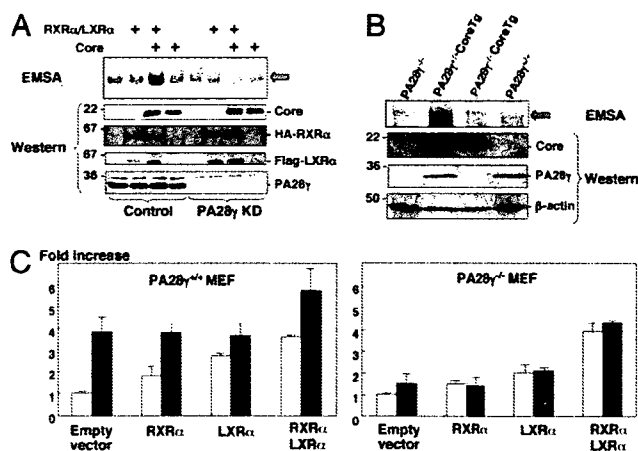


Fig. 5. PA28 γ is required for HCV core-dependent activation of the *srebp-1c* promoter. (A) Effect of PA28 γ knockdown on the LXR α /RXR α -DNA complex. FLAG-LXR α and HA-RXR α were expressed in FLC4 (control) or PA28 γ knockdown (PA28 γ KD) cells together with or without HCV core protein. Cells were harvested at 48 h posttransfection, and nuclear extracts were mixed with the reaction buffer for EMSA. (Upper) The resulting mixtures were subjected to PAGE and blotted with horseradish peroxidase-streptavidin. The mobility shift of the LXRE probe is indicated by an arrow. (Lower) Expression of HCV core, HA-RXR α , FLAG-LXR α , and PA28 γ in cells was detected by immunoblotting. (B) Effect of PA28 γ knockout on the LXR α /RXR α -DNA complex in the mouse liver. (Upper) Nuclear extracts were prepared from the livers of 2-month-old PA28 $\gamma^{-/-}$, PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg, PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg, and PA28 $\gamma^{+/+}$ mice and subjected to EMSA. The mobility shift of the LXRE probe is indicated by an arrow. (Lower) The expression of HCV core, PA28 γ , and β -actin in the livers of the mice was detected by immunoblotting. (C) Effect of HCV core protein on *srebp-1* promoter activity in PA28 γ -knockout fibroblasts. A plasmid encoding firefly luciferase under the control of the *srebp-1c* promoter was transfected into MEFs prepared from PA28 $\gamma^{+/+}$ (Left) or PA28 $\gamma^{-/-}$ (Right) mice together with a plasmid encoding a *Renilla* luciferase. An empty plasmid or plasmids encoding mouse RXR α or LXR α were also cotransfected into the cells together with (gray bars) or without (white bars) a plasmid encoding HCV core protein. Luciferase activity under the control of the *srebp-1c* promoter was determined, and it is expressed as the fold increase in relative luciferase activity after standardization with the activity of *Renilla* luciferase.

tiates *srebp-1c* promoter activity in an LXR α /RXR α -dependent manner.

HCV Core Protein Activates the *srebp-1c* Promoter in an LXR α /RXR α - and PA28 γ -Dependent Manner. To examine whether PA28 γ is required for HCV core-induced enhancement of *srebp-1c* promoter activity in human liver cells, a PA28 γ -knockdown human hepatoma cell line (FLC4 KD) was prepared. Enhancement of binding of the LXRE probe to LXR α /RXR α by coexpression of HCV core protein and LXR α /RXR α in FLC4 cells was diminished by knockdown of the PA28 γ gene (Fig. 5A). Furthermore, formation of the LXR α /RXR α -LXRE complex was enhanced in the livers of PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice but not in those of PA28 $\gamma^{-/-}$, PA28 $\gamma^{+/+}$, or PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice (Fig. 5B). The expression of the HCV core protein in the mouse embryonic fibroblasts (MEFs) of PA28 $\gamma^{+/+}$ mice induced the activation of the mouse *srebp-1c* promoter through the endogenous expression of LXR α and RXR α (Fig. 5C Left). Further enhancement of the activation of the *srebp-1c* promoter by HCV core protein in PA28 $\gamma^{+/+}$ MEFs was achieved by the exogenous expression of both LXR α and RXR α . However, no enhancing effect of HCV core protein on *srebp-1c* promoter activity was observed in PA28 $\gamma^{-/-}$ MEFs (Fig. 5C Right). These results support the notion that HCV core protein enhances the activity of the *srebp-1c* promoter in an LXR α /RXR α - and PA28 γ -dependent manner.

Table 1. HCC in mice at 16–18 months of age

Mouse and sex	Total no. of mice	No. of mice developing HCC	Incidence, %
PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg			
Male	17	5	29.4
Female	28	3	10.7
PA28 $\gamma^{+/-}$			
Male	16	0	0
Female	4	0	0
PA28 $\gamma^{-/-}$			
Male	23	0	0
Female	13	0	0
PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg			
Male	15	0	0
Female	21	0	0

PA28 γ Plays a Crucial Role in the Development of HCC in PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg Mice. The incidence of hepatic tumors in male PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice older than 16 months was significantly higher than that in age-matched female PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice (6). We reconfirmed here that the incidence of HCC in male and female PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice at 16–18 months of age was 29.4% (5 of 17 mice) and 10.7% (3 of 28 mice), respectively. To our surprise, however, no HCC developed in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice (males, 15; females, 21), although, as expected, no HCC was observed in PA28 $\gamma^{+/-}$ (males, 16; females, 4) and PA28 $\gamma^{-/-}$ mice (males, 23; females, 13) (Table 1). These results clearly indicate that PA28 γ plays an indispensable role in the development of HCC induced by HCV core protein.

Discussion

HCV core protein is detected in the cytoplasm and partially in the nucleus and mitochondria of culture cells and hepatocytes of transgenic mice and hepatitis C patients (6, 23, 24, 26). Degradation of HCV core protein was enhanced by deletion of the C-terminal transmembrane region through a ubiquitin/proteasome-dependent pathway (27). We previously reported (18) that PA28 γ binds directly to HCV core protein and then enhances degradation of HCV core protein in the nucleus through a proteasome-dependent pathway because HCV core protein was accumulated in nucleus of human cell line by treatment with proteasome inhibitor MG132. In this work, accumulation of HCV core protein was observed in nucleus of hepatocytes of PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice (Fig. 1D). This result directly demonstrates that HCV core protein migrates into the nucleus and is degraded through a PA28 γ -dependent pathway. However, HCV core protein accumulated in the nucleus because knockout of PA28 γ gene abrogated the ability to cause liver pathology, suggesting that interaction of HCV core protein with PA28 γ in the nucleus is prerequisite for the liver pathology induced by HCV core protein. We have previously shown (18) that HCV core protein is degraded through a PA28 γ -dependent pathway, and Minami *et al.* (28) reported that PA28 γ has a cochaperone activity with Hsp90. Therefore, degradation products of HCV core protein by means of PA28 γ -dependent processing or correct folding of HCV core protein through cochaperone activity of PA28 γ might be involved in the development of liver pathology. We do not know the reason why knockout of the PA28 γ gene does not affect the total amount of HCV core protein in the liver of the transgenic mice. PA28 γ -dependent degradation of HCV core protein may be independent of ubiquitination, as shown in SRC-3 (21), whereas knockdown of PA28 γ in a human hepatoma cell line enhanced the ubiquitination of HCV core protein [supporting information (SI) Fig. 6], suggesting that lack of PA28 γ suppresses a ubiquitin-independent degradation but enhances a ubiquitin-dependent degradation of HCV core protein. Therefore, the total amount of HCV

core protein in the liver of the mice may be unaffected by the knockout of the PA28 γ gene.

Our results suggest that the interaction of HCV core protein with PA28 γ leads to the activation of the *srebp-1c* promoter along an LXR α /RXR α -dependent pathway and the development of liver steatosis and HCC. HCV core protein was not included in the LXR α /RXR α -LXRE complex (Fig. 3A), suggesting that HCV core protein indirectly activates the *srebp-1c* promoter. Cytoplasmic HCV core protein was shown to interact with Sp110b, which is a transcriptional corepressor of RAR α -dependent transcription, and this interaction leads to the sequestering of Sp110b in the cytoplasm, resulting in the activation of RAR α -dependent transcription (29). The sequestration of an unidentified corepressor of the LXR α /RXR α heterodimer in the cytoplasm by HCV core protein may also contribute to the activation of the *srebp-1c* promoter. Although the precise physiological function of PA28 γ -proteasome activity in the nucleus is not known, PA28 γ has previously been shown (21) to regulate nuclear hormone receptors by means of the degradation of its coactivator SRC-3 and to participate in the fully Hsp90-dependent protein refolding (28). It appears reasonable to speculate that degradation or refolding of HCV core protein in a PA28 γ -dependent pathway might be involved in the modulation of transcriptional regulators of various promoters, including the *srebp-1c* promoter. Saturated or monounsaturated fatty acids have been shown to enhance HCV RNA replication in Huh7 cells containing the full-length HCV replicon (7). The up-regulation of fatty acid biosynthesis by HCV core protein may also contribute to the efficient replication of HCV and to the progression of HCV pathogenesis.

Expression of HCV core protein was reported to enhance production of reactive oxygen species (ROS) (30), which leads to carbonylation of intracellular proteins (31). Enhancement of ROS production may trigger double-stranded DNA breaks and result in the development of HCC (30, 32, 33). HCV core protein could enhance the protein carbonylation in the liver of the transgenic mice in the presence but not in the absence of PA28 γ (SI Fig. 7), suggesting that PA28 γ is required for ROS production induced by HCV core protein. Development of HCC was observed in PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice but not in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice (Table 1). Enhancement of ROS production by HCV core protein in the presence of PA28 γ might be involved in the development of HCC in PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice.

It is well known that resistant viruses readily emerge during the treatment with antiviral drugs targeting the viral protease or replicase, especially in the case of infection with RNA viruses. Therefore, antivirals targeting the host factors that are indispensable for the propagation of viruses might be an ideal target for the development of antiviral agents because of a lower rate of mutation than that of viral genome, if they have no side effects to patients. Importantly, the amino acid sequence of PA28 γ of mice is identical to that of human, and mouse PA28 γ is dispensable because PA28 γ knockout mice exhibit no abnormal phenotype except for mild growth retardation. Therefore, PA28 γ might be a promising target for an antiviral treatment of chronic hepatitis C with negligible side effects.

In summary, we observed that a knockout of the PA28 γ gene from PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice induced the accumulation of HCV core protein in the nucleus and disrupted the development of both steatosis and HCC. Activation of the *srebp-1c* promoter was up-regulated by HCV core protein both *in vitro* and *in vivo* through a PA28 γ -dependent pathway, suggesting that PA28 γ plays a crucial role in the development of liver pathology induced by HCV infection.

Materials and Methods

Histology and immunohistochemistry, real-time PCR, and detection of proteins modified by ROS are discussed in *SI Materials and Methods*.

Plasmids and Reagents. Human PA28 γ cDNA was isolated from a human fetal brain library (18). The gene encoding HCV core protein was amplified from HCV strain J1 (genotype 1b) (34) and cloned into pCAG-GS (35). Mouse cDNAs of RXR α and LXR α were amplified by PCR from the total cDNAs of the mouse liver. The RXR α and LXR α genes were introduced into pEF-FLAGspGBK (36) and pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), respectively. The targeting fragment for human PA28 γ knockdown (GGATCCGGTGGATCAGGAAGTGAAGTTCAAGAGACCTTCACTTCTGATCCACCTTTTTTGGAAAAGCTT) was introduced into the BamHI and HindIII sites of pSilencer 4.1 U6 hygro vector (Ambion, Austin, TX). Mouse anti-FLAG (M2) and mouse anti- β -actin antibodies were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Rabbit polyclonal antibody against synthetic peptides corresponding to amino acids 70–85 of PA28 γ was obtained from AFFINITI (Exeter, U.K.). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit IgGs were purchased from ICN Pharmaceuticals (Aurora, OH). Rabbit anti-HCV core protein was prepared by immunization with recombinant HCV core protein (amino acids 1–71), as described in ref. 24. Mouse monoclonal antibody to HCV core protein was kindly provided by S. Yagi (37). The plasmid for expression of HA-tagged ubiquitin was described in ref. 27.

Preparation of PA28 γ -Knockout HCV CoreTg Mice. The generation of C57BL/6 mice carrying the gene encoding HCV core protein genotype 1b line C49 and that of PA28 $\gamma^{-/-}$ mice have been reported previously (22, 25). Both strains were crossed with each other to create PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice. PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice were identified by PCR targeted at the PA28 γ or HCV core gene (22, 25). Using 1 μ g of genomic DNA obtained from the mouse tail, the PA28 γ gene was amplified by PCR with the following primers: sense, PA28-3 (AGGTGGATCAGGAAGTGAAGCTCAA); and antisense, PA28 γ -5cr (CACCTCACTTGTGATCCGCTCTCT-GAAAGAATCAACC). The targeted sequence for the PA28 γ -knockout mouse was detected by PCR using the PA28-3 primer and the PAKO-4 primer (TGCACTTCATTCAGGGCACCGGACAG). The transgene encoding HCV core protein was detected by PCR as described in ref. 25. The expression of PA28 γ and HCV core protein in the livers of 6-month-old mice was confirmed by Western blotting with mouse monoclonal antibody to HCV core protein, clone 11-10, and rabbit antibody to PA28 γ . Mice were cared for according to the institutional guidelines. The mice were given ordinary feed, CRF-1 (Charles River Laboratories, Yokohama, Japan), and they were maintained under specific pathogen-free conditions.

All animal experiments conformed to the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, and they were approved by the Institutional Committee of Laboratory Animal Experimentation (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University).

Preparation of Mouse Embryonic Fibroblasts. MEFs were prepared as described in ref. 22. MEFs were cultured at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) supplemented with 10% FBS, penicillin, streptomycin, sodium pyruvate, and nonessential amino acids.

Transfection and Immunoblotting. Plasmid vectors were transfected into the MEFs and 293T cells by liposome-mediated transfection by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The amount of HCV core protein in the liver tissues was determined by an ELISA as described in ref. 37. The cell lysates were subjected to SDS/PAGE (12.5% gel), and they were then transferred onto PVDF membranes. Proteins on the membranes were treated with specific antibody and Super Signal Femto (Pierce, Rockford, IL). The results were then visualized by using a LAS3000 imaging system (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan). The method of immunoprecipitation test is described in ref. 18.

Reporter Assay for *srebp-1c* Promoter Activity. The genomic DNA fragment encoding the *srebp-1c* promoter region (located from residues -410 to +24) was amplified from a mouse genome. The fragment was introduced into the KpnI and HindIII sites of pGL3-Basic (Promega, Madison, WI), and it was designated as pGL3-*srebp-1c*Pro. The plasmids encoding RXR α and LXR α were transfected into MEFs together with pGL3-*srebp-1c*Pro and a control plasmid encoding *Renilla* luciferase (Promega). The total DNA for transfection was normalized by the addition of empty plasmids. Cells were harvested at 24 h posttransfection. The ligand of RXR α , 9-*cis*-retinoic acid (Sigma), and that of LXR α , 22(*R*)-hydroxylcholesterol (Sigma) were added at a final concentration of 5 μ M each to the culture medium of 293T cells transfected with pGL3-*srebp-1c*Pro together with expression plasmids encoding RXR α , LXR α , and HCV core protein at 24 h posttransfection. Cells were harvested 24 h after treatment. Luciferase activity was measured by using the dual-luciferase reporter assay system (Promega). Firefly luciferase activity was standardized with that of *Renilla* luciferase, and the results are expressed as the fold increase in relative luciferase units.

Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA). EMSA was carried out by using a LightShift Chemiluminescent EMSA kit (Pierce) according to the manufacturer's protocol. Nuclear extract of the cell lines and liver tissue was prepared with an NE-PER nuclear

and cytoplasmic extraction reagent kit (Pierce). Briefly, double-stranded oligonucleotides for EMSA were prepared by annealing both strands of each LXRE of the *srebp-1c* promoter (5'-GGACGCCCGCTAGTAACCCCGGC-3') (16). Both strands were labeled at the 5' ends with biotin. The annealed probe was incubated for 20 min on ice with nuclear extract (3 μ g of protein) in a reaction buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.05 μ g/ μ l poly(dI-dC), 2.5% glycerol, 0.05% Nonidet P-40, and 0.1 nM labeled probe, with or without 1 mM nonlabeled probe. The resulting mixture was subjected to PAGE (5% gel) at 120 V for 30 min in 0.5 \times TBE. The DNA-protein complex was transferred to a Hybond N+ membrane (Amersham, Piscataway, NJ), incubated with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin, and visualized by using an LAS3000 imaging system.

Statistical Analysis. The results are expressed as the mean \pm SD. The significance of differences in the means was determined by Student's *t* test.

We thank H. Murase for secretarial work and D. C. S. Huang for providing the plasmids. This work was supported in part by grants-in-aid from the Ministry of Health, Labor, and Welfare; the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology; the 21st Century Center of Excellence Program; and the Foundation for Biomedical Research and Innovation.

- Wasley A, Alter MJ (2000) *Semin Liver Dis* 20:1-16.
- Bach N, Thung SN, Schaffner F (1992) *Hepatology* 15:572-577.
- Lefkowitz JH, Schiff ER, Davis GL, Perrillo RP, Lindsay K, Bodenheimer HC, Jr., Balart LA, Ortego TJ, Payne J, Dienstag JL, et al. (1993) *Gastroenterology* 104:595-603.
- Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Z, Chapman MJ, Miyamura T, Brechot C (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1200-1205.
- Hope RG, McLauchlan J (2000) *J Gen Virol* 81:1913-1925.
- Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K (1998) *Nat Med* 4:1065-1067.
- Kapadia SB, Chisari FV (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2561-2566.
- Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, Wieland S, Bukh J, Purcell RH, Schultz PG, Chisari FV (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15669-15674.
- Wang C, Gale M, Jr, Keller BC, Huang H, Brown MS, Goldstein JL, Ye J (2005) *Mol Cell* 18:425-434.
- Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H (1998) *J Clin Invest* 101:2331-2339.
- Pai JT, Guryev O, Brown MS, Goldstein JL (1998) *J Biol Chem* 273:26138-26148.
- Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL (1996) *J Clin Invest* 98:1575-1584.
- Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL (1997) *J Clin Invest* 99:846-854.
- Shimano H, Shimomura I, Hammer RE, Herz J, Goldstein JL, Brown MS, Horton JD (1997) *J Clin Invest* 100:2115-2124.
- Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobbaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ (2000) *Genes Dev* 14:2819-2830.
- Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Hasty AH, Matsuura T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, et al. (2001) *Mol Cell Biol* 21:2991-3000.
- Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T, Suzuki R, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T (2002) *Hepatology* 35:937-946.
- Moriishi K, Okabayashi T, Nakai K, Moriya K, Koike K, Murata S, Chiba T, Tanaka K, Suzuki R, Suzuki T, et al. (2003) *J Virol* 77:10237-10249.
- Masson P, Andersson O, Petersen UM, Young P (2001) *J Biol Chem* 276:1383-1390.
- Li J, Rechsteiner M (2001) *Biochimie* 83:373-383.
- Li X, Lonard D, Jung SY, Malovannaya A, Feng Q, Qin J, Tsai SY, Tsai M, O'Malley BW (2006) *Cell* 124:381-392.
- Murata S, Kawahara H, Tohma S, Yamamoto K, Kasahara M, Nabeshima Y, Tanaka K, Chiba T (1999) *J Biol Chem* 274:38211-38215.
- Falcon V, Acosta-Rivero N, Chinea G, Gavilondo J, de la Rosa MC, Menendez I, Duenas-Carrera S, Vina A, Garcia W, Gra B, et al. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 305:1085-1090.
- Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, Moriishi K, Iwasaki T, Mizumoto K, Matsuura Y, et al. (2005) *J Virol* 79:1271-1281.
- Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Koike K (1997) *J Gen Virol* 78:1527-1531.
- Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M (1998) *J Virol* 72:6048-6055.
- Suzuki R, Tamura K, Li J, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T (2001) *Virology* 280:301-309.
- Minami Y, Kawasaki H, Minami M, Tanahashi N, Tanaka K, Yahara I (2000) *J Biol Chem* 275:9055-9061.
- Watashi K, Hijikata M, Tagawa A, Doi T, Marusawa H, Shimotohno K (2003) *Mol Cell Biol* 23:7498-7509.
- Machida K, Cheng KT, Lai CK, Jeng KS, Sung VM, Lai MM (2006) *J Virol* 80:7199-7207.
- Nystrom T (2005) *EMBO J* 24:1311-1317.
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr (1999) *Cell* 98:295-303.
- Carballo M, Conde M, El Bekay R, Martin-Nieto J, Camacho MJ, Montescirini J, Conde J, Bedoya FJ, Sobrino F (1999) *J Biol Chem* 274:17580-17586.
- Aizaki H, Aoki Y, Harada T, Ishii K, Suzuki T, Nagamori S, Toda G, Matsuura Y, Miyamura T (1998) *Hepatology* 27:621-627.
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J (1991) *Gene* 108:193-199.
- Huang DC, Cory S, Strasser A (1997) *Oncogene* 14:405-414.
- Aoyagi K, Ohue C, Iida K, Kimura T, Tanaka E, Kiyosawa K, Yagi S (1999) *J Clin Microbiol* 37:1802-1808.

Institution: OSAKA UNIVERSITY [Sign In as Member / Individual](#)

Moriishi *et al.* 10.1073/pnas.0607312104.

This Article

▶ [Abstract](#)

Services

▶ [Alert me to new issues of the journal](#)

▶ [Request Copyright Permission](#)

Supporting Information

Files in this Data Supplement:

[SI Figure 6](#)

[SI Figure 7](#)

[SI Methods and Materials](#)

MG132	+	+	+	+
Core		+		+
HA-Ub	+	+	+	+

