

図2 肝がん合併肝硬変の成因 —頻度の経時的変化

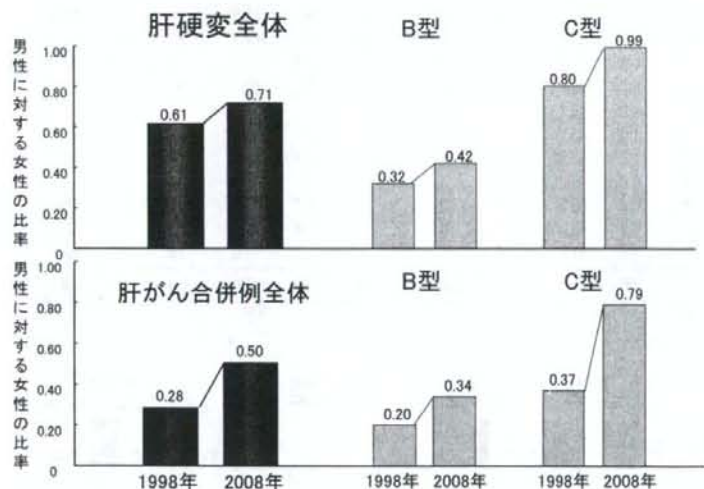


図3 肝硬変の性差 —女性比率の増加

し、B型では0.32から0.42へ、C型では0.80から0.99へと上昇を認めた。C型肝炎の発症のリスクは男女間で差が見られなくなっていた。

考 察

全国の肝硬変患者の成因と比べて、従来より、北海道ではB型の比率が多い傾向を認めてい

る。その理由のひとつに、北海道のHBs抗原陽性率が他の地域よりも高率であることが関連している可能性が考えられる。日本赤十字社の初回献血者（1995年から2000年まで）におけるHBs抗原陽性率を年代別にみると、16～19歳、20～29歳、30～39歳、40～49歳、50～59歳、60～75歳では、それぞれ0.23%、0.52%、0.84%。

1.19%, 1.50%, 1.27%であるが、北海道では、各年齢層で約3倍の陽性率を示している。肝硬変や肝癌などの好発年齢である50代以降では依然として3%台の陽性率である。さらに、当科へ紹介される肝癌患者には、他院での治療困難な高度進行肝癌症例が多く含まれている施設の特徴も一因と思われる。1997年から2008年3月までに当科に紹介された肝癌患者の肝硬変の原因は、B型が38%、C型が42%と、ほぼ同等の比率である。さらに、この10年間を前半と後半の5年ずつに分けて比較すると、B型/C型の頻度は、前半は31%/50%であったが、後半は41%/39%と逆転を示した。最近、高度に進行した状態で肝癌が発見され、集学的治療を求めて当科に紹介される例が増加しているが、医療機関で定期的にfollowされずに発癌する例には、B型関連患者が比較的多く含まれる可能性があり、このことも、当科の症例にB型が多いことの一因であると考えられた。

結 語

当科の肝硬変症例および肝癌合併症例の成因につき検討した。B型およびC型の関与は、肝硬変症例の80.3%、肝癌合併症例では88.1%であった。1998年調査時点との比較では、肝硬変および肝癌における女性の占める比率が上昇傾向を示した。とくに、C型肝硬変、肝癌において女性増加の傾向が著明であった。

■文献

- 1) 松嶋 喬, 他: 肝硬変の成因別実態, 「肝硬変の成因別実態」太田康幸, 原田 尚, 小林健一編, 日本医学館, 東京, 1992, p4-7.
- 2) 髭 修平, 他: 肝硬変の成因別実態, 「肝硬変の成因別実態」小林健一, 清澤研道, 岡上 武編, 中外医学社, 東京, 1999, p75-79.

II エイズ (acquired immunodeficiency syndrome ; AIDS)

1. AIDS とはどういう病気か

●原因ウイルスと病態

AIDS とは HIV 感染症である。

Human Immunodeficiency Virus (HIV : ヒト免疫不全ウイルス) 感染症で Acquired Immuno Deficiency Syndrome (後天性免疫不全症候群) の略。わが国の感染者数は年間千人を超え、感染爆発が懸念される。

HIV は、レトロウイルスであるため一度感染すると終生感染者となる。また免疫細胞、特に CD4 陽性細胞に親和性が強い。HIV 感染後は急性期症状、無症候性キャリアー、AIDS 関連症候群を経て、AIDS に至る。

8~9 割の感染者は感染後 10~15 年後に AIDS を発症する。ときに急激に AIDS を発症したり、長期間免疫不全の徴候を示さなかったりする感染者も存在する。発症した AIDS 患者は細胞性免疫不全の徴候を示し、日和見感染症がみられる。それらの合併症に対する予防・治療法は進歩した。しかし、中枢神経症状や悪性リンパ腫を伴うと予後はきわめて悪い。感染者体内のウイルスはさまざまに変異し、抗 HIV 免疫応答が有効に機能せず、感染は持続する。感染初期はマクロファージ好性のウイルス (R5) が主で、後に T 細胞好性 (X4) のウイルスが出現する。両者は異なった補受容体を使って感染する。

メモ HIV : レトロウイルスなのでウイルスの遺伝情報は RNA である。感染細胞に侵入した後に、逆転写酵素により RNA を DNA に変換する。レトロウイルスは腫瘍ウイルス、レンチウイルス、スプマウイルスなどがあるが、HIV はレンチウイルス。タイプ I とタイプ II が存在する。

タイプ I は全世界に拡がっていて、感染者数は 4,000 万人以上である。タイプ II はアフリカ西海岸に散見されるが、感染力、発病性ともに低い。感染者体内のウイルスは R5 と X4 に分類される。標的細胞のウイルス受容体は CD4 分子と補受容体の 2 種類である。R5 と X4 は使用する補受容体 (ケモカイン受容体) が異なっている。R5 は

表4 AIDS 指標症状

真菌感染症	原虫症	細菌感染症	ウイルス感染症	腫瘍	その他
カンジダ症 クリプトコッカス症 コクシジオイデス症 ヒストプラズマ症 ニューモシスチス肺炎	トキソプラズマ症 クリプトスポリジウム症 イソスポラ症	化膿性細菌感染症 サルモネラ菌血症 活動性結核 非定型抗酸菌症	サイトメガロウイルス感染症 単純ヘルペスウイルス感染症 進行性多巣性白質脳症	カポジ肉腫 原発性脳リンパ腫 非ホジキンリンパ腫 浸潤性子宮頸癌	反復性肺炎 リンパ性間質性肺炎 HIV 脳症 HIV 消耗性症候群

表5 成人の HIV 感染者の診断基準(1993年改訂版)

CD4 細胞数(μl)	臨床カテゴリー		
	A 無症候性・ 急性期 ^{a)}	B 症状あり	C AIDS 指標 症状あり ^{b)}
500 以上	A1	B1	C1
200~499	A2	B2	C2
200 未満 ^{c)}	A3	B3	C3

^{a)} A3, B3, C1~3 は拡大 AIDS 症例

^{b)} 進行性全身性リンパ節腫大を含む

^{c)} AIDS 指標症状は表 4

CCR5 を、X4 は CXCR4 を使用するが、すでに 10 種のケモカイン受容体が補受容体の機能を有することが知られている。

【メモ】 日和見感染症：免疫機能が正常の個体には病原性をもたない病原体が免疫不全（特に T 細胞の機能低下）を招来した際に、さまざまな感染症を生ずる。老人や乳幼児、抗癌薬治療後、原発性免疫不全症候群患者も罹患しやすい。具体的な疾患名は表 4 に示した。また免疫不全に伴いやすい、カポジ肉腫、悪性リンパ腫なども含め、日和見疾患とも呼ぶ。

2. どのように考えて診断をつけていくか

診断のキーポイント

1. 感染者は徐々に増加していて、一般開業医でもリスクファクターのない感染者に遭遇する
2. 代表的なリスクファクターは、男子同性愛、麻薬中毒、血液製剤投与・輸血、海外渡航
3. 発熱、下痢、リンパ節腫大があり、日和見感染や中枢神経症状を伴う
4. CD4 細胞減少、抗 HIV 抗体陽性

感染原因となる行為、たとえば、多数のパートナーとの性行為（わが国では男子同性愛行為での感染によるものが多い）、注射針共有や輸血、臓器移植、血液製剤投与などが患者の背景に存在する。しかし初診者では背景がはっきりしない例も多い。感染後 3~6 週に発熱、感冒様症状、皮膚発疹、リンパ節腫大、髄膜炎症状などの急性期症状を呈する。8 週までにほぼ全員に抗体が検出されるが、

特殊な例では 1 年近く抗体が陽性化しない例もある。抗体検査を施行する際には、患者の同意をとる必要がある。また抗体陽性者を発見した際は、無症候であろうとも、保健所長を通して知事に報告する義務がある。ウイルス分離やウイルス抗原の検出によっても感染者を同定できる。感染者のウイルスの量が病勢の把握の、CD4 細胞数が疾患のステージ決定の最も良い指標となる。症状と CD4 細胞数を組み合わせた診断基準を紹介する(表 5)。CD4 細胞数が 200/ μl 未満となったら症状のあるなしによらず AIDS と診断する。また CD4 細胞数によらず感染者が表 4 の疾患を併発したら AIDS と診断する。

3. 主な治療法と日常生活管理の実際

治療のキーポイント

1. 血漿中の HIV-RNA と CD4 細胞数を測定して病態を把握する
2. 臨床症状、HIV-RNA の増加、CD4 細胞数の減少のいずれかがあれば抗ウイルス薬を投与する
3. CD4 細胞数が減少していれば、日和見感染症の予防・治療を開始する

a. ウイルス量と予後

HIV 感染症においては、推定で 100 億個の粒子が毎日産生され、ウイルスの半減期は 6 時間ときわめて短い。CD4 細胞も短い半減期で回転しているともいわれ、無症候時期でもダイナミックなウイルスと免疫の動態が存在する。血漿 HIV-RNA 量は発症の危険性を予知するのにきわめてよいマーカーとなりうるが最近ではウイルス量に関係ない免疫活性化が重要という説もある。

【メモ】 血漿 HIV-RNA 量：定量性 PCR の導入により HIV の RNA の定量がきわめて容易になった。治療開始時期、効果判定にはきわめて有用で、化学療法において、検出感度以下までに低下する例もある。また、HIV の量が 500/ μl 以下だと 10 年後の AIDS 発症率はきわめて低いといわれていたが、HIV-RNA 量と CD4 数の減少に相関が

ないとするデータもある。

b. HAART とその問題点

HAART によりウイルス量の低下と CD4 細胞数の増加をはかる。

逆転写酵素阻害薬とプロテアーゼ阻害薬を組み合わせる highly active anti-retroviral therapy (HAART) により AIDS の進行を回避できる。治療開始時期、副作用など抱える問題は多々ある。ウイルスが体内から消失するわけではなく、リンパ節や末梢血 CD4 細胞中では治療中にもかかわらず、複製がみられ、感染者であることにはかわりはない。

㊦ プロテアーゼ阻害薬：プロテアーゼは HIV 自身が有する自己の蛋白の成熟を司る蛋白分解酵素である。アスパルティックプロテアーゼの 1 種。さまざまな阻害薬が感染者の治療に考案されまた使用されている。

c. 日和見感染症に対する予防・治療

カンジダ症は免疫機能が保たれている時期でも口腔内に生じやすいが、フルコナゾールなどの抗真菌薬により重症化を阻止できる。CD4 細胞数が 200/ μ l 未満ではさまざまな日和見疾患が生ずる。この時期の患者では、ニューモシスチス肺炎は致命率、発症率ともに高いので、ST 合剤による予防を開始し、サイトメガロウイルス感染は網膜に高頻度で発症するので、定期的な検査が必要である。また結核の合併は CD4 数に関係なく生ずる。感染が危惧される際は INH の予防投与を行うが、BCG 接種は禁忌である。日和見感染症を合併している場合は、免疫再構築症候群を避けるため、日和見感染症の治療を優先する。

㊦ 免疫再構築症候群：HAART により免疫機能が回復する過程で、治癒していたあるいは隠れていた日和見感染が増悪し、新たな日和見感染症が出現する場合があります。これを免疫再構築症候群 (IRIS) と呼んでいる。

d. 感染予防

感染者由来の体液で、感染源となりうるものは

表 6 体液に対する一般的な注意 (HIV 感染症)

注意の必要な体液	肉眼的な血液がみえなければ注意が不要な体液
血液	糞
精液	鼻汁
腺分泌液	痰
羊水	汗
脳脊髄液	涙
心嚢液	尿
腹水	嘔吐物
胸水	
滑膜液	
母乳	
唾液*	

*歯科に限る。歯科の扱う唾液はほとんど血液を含んでいる。

感染性のウイルスを一定量以上含むものである。これらの体液においては特に感染予防に注意しなければならない。注意を払う体液を表 6 に示す。血液を含む場合にはどのような体液でも感染予防に注意を払わなければならない。なぜならば血液は遊離ウイルス以外にきわめて感染力の強い、白血球を含むからである。細胞と細胞による感染はきわめて効率的なので、皮膚に傷や湿疹を有する場合には適宜防護して診療・看護にあたる必要がある。性病の存在は感染を助長する。無防備な性行為を避けると同時に、コンドームの使用が感染予防には効果的である。

e. 日常生活管理

免疫機能の維持が大事であるが、むやみな免疫賦活はウイルスの産生を高めるので、注意を要する。かぜ、ストレスを避けることが望ましい。CD4 細胞数が 500/ μ l 未満では日和見感染が生じやすくなり、十分な栄養の補給と適切な休養が望ましい。また全病期を通じてカウンセリングを必要とする。また無症候時期でも治療中でも体液にはウイルス感染細胞が存在するので、感染の拡大を防ぐ指導が必要である。

(服部俊夫)

11

HIV 感染症 (AIDS)

I 疾患の成り立ちと化学療法

アメリカの大都市に突如後天性免疫不全症候群 (AIDS) が出現したのは 1981 年である。その原因ウイルスがヒト免疫不全ウイルス (HIV) であることが明らかになったのは 1983~84 年である。さまざまな研究がなされ、啓蒙活動が進んでいるにもかかわらず、現在も世界中で毎日約 16,000 人の新しい HIV 感染者が発生している。その主たる感染ルートは性交渉と薬物中毒であろう。わが国における感染者数もわずかずつではあるが、増加傾向を示している。現在増加している感染ルートは主に性的接触である (表 11-1)。

本疾患は感染してから数年間はほとんど症状を呈さない無症候性キャリアの状態を呈するので、自分が感染していることを知らないで過ごす場合があり、感染者数の増加につながると思われる。また感染していることを知っている場合の行動に関しても注意を払っていかねばならない。一方で治療により病態の改善がみられるようになってきているので、本疾患に対する警戒心がなくなることに、最も注意を払わなければならない。また新しい感染症法案では、HIV 感染症は 4 類に属し、危険性はかなり低くランクされているが、同じ 4 類の中では、梅毒、マラリアと並んで、感染者をみつけた際には、保健所を通じて、都道府県知事に届けなければならない。一方で本疾患により日常生活がほとんどできなくなった場合は内部障害者として扱われることになった。

このように本疾患を巡る環境は、さまざまに変遷している。このリハビリテーションという概念も、治療成績の向上なしでは HIV 感染者には当てはまらなかったと思うが、疾病により侵された免疫機能にどの程度再生力があるのか素朴な疑問がわく。本稿においては疾患の本態を概説しながら、HIV 感染症のリハビリテーションの具体的な方向性を探してみたい。

1. HIV の性状

HIV はレトロウイルスに属する。レトロウイルスの最大の特徴は RNA ウィルスであるのにもかかわらず、逆転写酵素活性を有していることである。故に感染によりウィルスは宿主の DNA に取り込まれ、終生感染者として過ごすことになる。

表 11-1 HIV 感染者の届け出状況

	男性	女性	合計
異性間の性的接触	697(143)	734(510)	1,431(653)
同性間の性的接触	735(90)	0(0)	735(90)
静注薬物濫用	19(13)	1(1)	20(14)
母子感染	9(2)	11(6)	20(8)
その他	27(10)	24(6)	51(16)
不明	316(153)	414(392)	730(545)
凝固因子製剤	1,417	17(...)	1,434(...)
合計	3,220(411)	1,201(915)	4,421(1,26)

()内は外国人再掲載(1999年2月末現在)

表 11-2 ヒトレトロウイルス感染症

ウイルス名	種類	関連疾患
HIV-1	レンチウイルス	AIDS
HIV-2	レンチウイルス	AIDS
HTLV-1	オンコウイルス	ATL, HAM, その他
HTLV-2	オンコウイルス	不明

このようなウイルスが原因になっている疾患には、わが国には馴染みの深い成人T細胞白血病(ATL)があるが、その原因ウイルスはアメリカと日本でそれぞれ独立に HIV よりも先だって発見され、HTLV-1 と呼称されている。HTLV-1 感染はそれ以外に HTLV-1 associated myelopathy (HAM) やぶどう膜炎のような炎症性疾患をひきおこす。逆転写酵素の塩基配列の解析から HIV はレンチウイルスに、HTLV-1 はオンコウイルスに属している(表 11-2)。HIV のわが国の感染者数は表 1 のごとく、公式発表では 1 万人を超えないが、HTLV-1 感染者の推定数は 120 万人である。わが国の西南部に感染者数が集中しているが、その他の地域にも存在する。

2. HIV のライフサイクル

HIV は T 細胞あるいはマクロファージの受容体に結合して細胞内に侵入する。脱衣被により細胞質内に出現した RNA は逆転写酵素により DNA に変換する(図 11-1)。その DNA はインテグレースにより遺伝子に組み込まれ、プロウイルスとなる。プロウイルスは細胞の複製とともに、子孫の細胞にまで受け継がれる。何らかの契機で転写が行われウイルス蛋白が産生され、組立てが起こる。この組立ての際にプロテアーゼが作用する。

現在抗 HIV 剤の標的は、逆転写酵素とプロテアーゼであるが、他の標的も考慮されている。特に HIV の補受容体とそれに続く gp 41 の活性化が明らかになってきたので、それらのプロセスを阻害し、体内での拡散感染を阻止する方法も考えられている。

a. CD 4-gp 120-ケモカイン受容体結合による gp 41 の活性化

現在までよく知られている HIV 感染にかかわる、ウイルス・細胞膜蛋白を図 2 に示した。HIV の感染には細胞側受容体として、CD 4 分子とケモカイン受容体の存在が知られている。CD 4 への結合が gp 120 の立体構造変化を生じ、ケモカイン受容体への結合を可能にする。特にウイルス膜蛋白に存在する gp 120 と gp 41 はその一部が結晶化されて、その機能の全貌が明ら

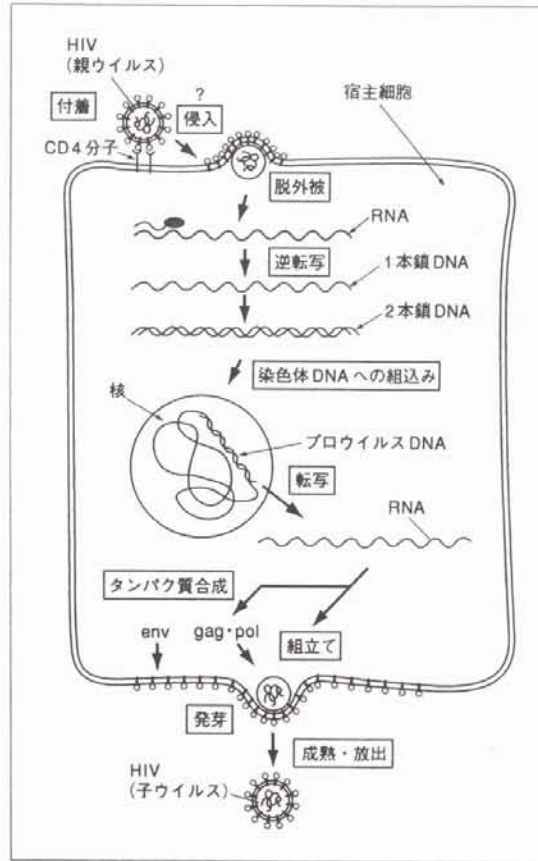


図 11-1 HIV のライフサイクル

かになりつつある。

gp 120 は非常に糖に富んだ蛋白であり単独での結晶化は困難であり、V1/V2 と V3 や糖鎖の結合ドメインをほとんど除去した後に、さらに可溶性 CD 4 蛋白と中和抗体を結合させ結晶化に成功したものである。この実験に用いられた中和抗体は 17b で CD 4 と結合した gp 120 に出現するケモカイン受容体に結合する部位をエピトープとしている。この結晶化により CD 4 と gp 120 の結合は主にファンデルワールス力によること、その結合には CD 4 の CDR 1 領域の連続した 25~64 番目のアミノ酸よりなる構造であるが、gp 120 側は不連続の 6 個の箇所より構成されることが明らかになった。sCD 4 結合による立体構造変化は、上述した 17b エピトープを出現させ gp 120 がケモカイン受容体に結合できるようになる。

ケモカイン受容体に結合した gp 120 はさらに立体構造変化を生じ、gp 41 の活性化が生ずる。

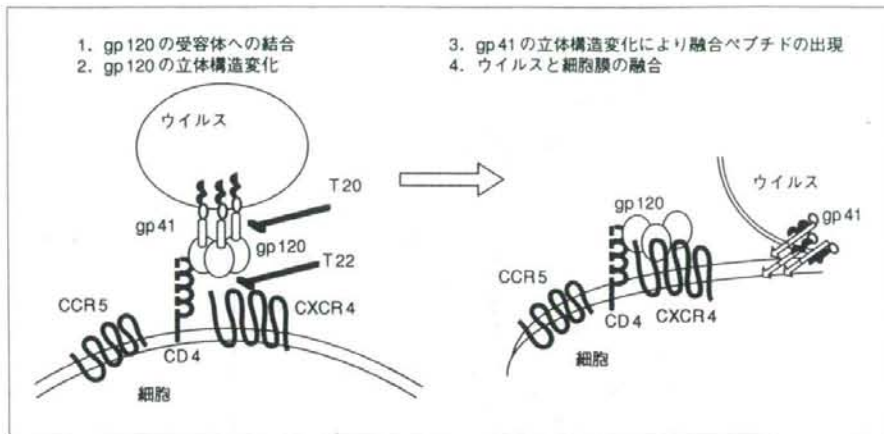


図 11-2 HIV 感染にかかわる分子と 2 つのインヒビター (T20, T22)

gp 41 の細胞外領域には元々 2 つのアルファヘリックス領域が存在している。gp 120 と sCD 4 への結合はこの 2 つの領域の立体構造変化をもたらし、逆向きのコイル-コイル結合による三量体が形成される。この 2 つの領域由来のペプチドは、以前より融合を強く阻止することが知られている。これらのペプチドは、dominant negative なペプチドとして gp 41 の活性化を抑制すると思われる。特に低濃度で融合を抑制する DP 178 は T 20 という名称で呼ばれ最近患者に投与され、HIV 抗原量を低下させることが明らかになった (図 11-2)。

b. ケモカイン受容体の種類

HIV にはマクロファージに主として感染するタイプと T 細胞に主として感染するタイプに大きく分かれるが、前者が CCR5 を、後者が CXCR4 を受容体として使用するので、略してそれぞれ、R5 および X4 とよぶ。また両者に指向性をもつものを X4R5 とよぶ。その他に補受容体として報告されているものは、CCR3, CCR2b, STRL(Bon20), GPR15(Bob), GPR1, V28, CCR8, US28, APJ の 11 種類である。これらの受容体にはさまざまな遺伝子変異が存在するが、CCR5 の N 端の完全欠損個体 ($\Delta 32$ ホモ) は、ハイリスクであるにもかかわらず、感染を免れているグループに高率に発見されることが明らかになった。初期感染には R5 タイプが関与するという以前からのデータと合致する所見である。これらの所見はケモカイン受容体を操作することにより、感染阻止を目指すことができることを示唆している。

c. ケモカイン受容体インヒビター

CCR5 や CXCR4 の機能を抑制して感染阻止を試みることは極めて自然である。CCR5 に結合する MIP-1 α , MIP-1 β , Rantes は炎症の研究から派生したものであるが故に抗炎症剤である。これらの抗炎症剤の一種であるジスタマイシンの誘導体が検索され、NSC651016 が合胞体形成を抑制することが報告されている。

CXCR4 を抑制する活性は AMD3100, ALX40-4C において報告され、わが国からは T22 が報告されている。T22 はもともとその抗 HIV 活性は注目され、特に R5 ウイルスにはほとんど効果がなく、X4 ウイルスには強い融合阻止活性が報告されていた。補受容体の発見により T22 が CXCR4 に結合することが明らかになってきた。これらの CXCR4 インヒビターはその殆どが陽性チャージである。元々 HIV の指向性を決定することのできる V3 loop も陽性荷電のアミノ酸に富み、陽性チャージが補受容体への結合を補完している。T22 の難点は 22 個のアミノ酸より構成されるペプチド性で、投与が困難であり、陽性チャージのアミノ酸に富んでいると毒性をもつことである。故により短くて毒性の低いペプチドが合成されている (図 2)。

d. ケモカイン受容体の機能と病態

さてここまでは HIV が侵入する際のケモカイン受容体の機能とその阻止について述べてきた。HIV 感染に伴ってこれらの受容体異常が病態に影響するかどうかは興味深い点である。X4 好性のウイルスは HIV 感染症がかなり進行した患者に出現してくるが、このウイルスの envelope 蛋白は CXCR4 へ結合することが想定される。CXCR4 は免疫系と中枢神経系の細胞によく発現していて、白血球や血液前駆細胞表面上にもよく観察される。

CXCR4 ノックアウトマウスは SDF-1 ノックアウトマウスと全く似通った心臓の欠陥を呈する。また神経系にも異常がみられる。これらの受容体は G-蛋白にカップルしていることが知られていて、これらの事実より神経細胞の G-蛋白結合ケモカイン受容体が HIV 感染症のエイズ痴呆症状の発現に関与しているかは興味のあるところである。

以上より、CXCR4 を介した SDF-1 の刺激伝達系を阻止する薬剤はその生物活性を阻止する可能性があり副作用に注意を払わなければならない。

3. ウイルスと病態

HIV は粘膜下の樹状細胞にまず感染し、所属リンパ節で増殖する。その後全身のリンパ節、脾臓、脳、消化管を含むリンパ節に拡散するが、その際に伝染性単核球症様の全身症状を呈し、急性期症状とよばれる。症状は発熱、筋肉痛、関節痛、皮疹、じん麻疹、腹痛、下痢、無症候性の髄膜炎などである。このような症状は感染後、3~6 週間で生じ、2~3 週間継続し、自然に軽快する。血清中に抗体が検出されるのは、感染してから 2~3 カ月後である。

感染後はほとんどの感染者が、無症候性キャリアとなる。この病期の長さは個体によって異なっていて、平均 8~10 年で AIDS を発症する (図 11-3)。指標となるマーカーのうち、全身の免疫能を反映できるのが末梢血 CD4 数である。正常人では 600~1000/ μ l であるが、経過とともに減少する。CD4 数が 500 を下回るとかなり免疫不全が進み、種々の日和見感染を含む合併症に注意しなければならない。さらに減少し、200 以下では合併症の有無によらず、AIDS と診断する (合併症の程度により、A3, B3, C3 とする) (表 11-3)。

さまざまな臨床経過をとる、HIV 感染者のエイズ発症の指標に関しては種々の検討がなされ

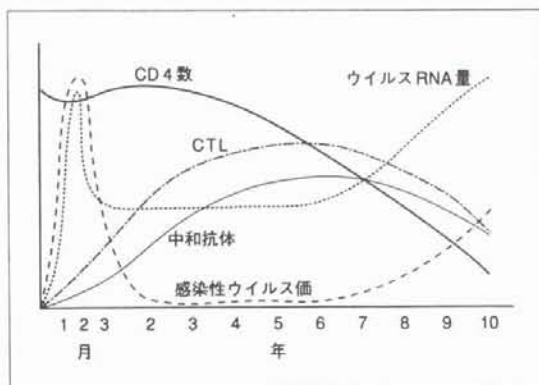


図 11-3 HIV 感染症のマーカーの推移

表 11-3 AIDS の臨床ステージ (1993 年 CDC 分類)

CD4 量		臨床カテゴリー		
絶対数	%	無症候性あるいは急性, PGL*	症候性	エイズ関連症候群**
>499	>29	A 1	B 1	C 1
200~499	14~28	A 2	B 2	C 2
<200	<14	A 3	B 3	C 3

*PGL: 持続性リンパ節腫脹.

**AIDS 患者においてみられる感染症. 詳細は MMWR,36: 1s-5s,1987

た、ウイルス側からは、マクロファージに感染するタイプとT細胞株に感染するタイプに大別され、後者の出現はエイズ発症に近いことを示唆していた。しかしそれまでのウイルスの増殖は、培養細胞を標的として単離するもので、客観性が低くなかなか一定のデータが得られなかった。近年、ウイルス量を正確に高感度に測定できる PCR 法が導入されて、感染者のウイルス量が当初思われていたよりも極めて高いことが明らかになった。また、そのウイルス量と AIDS を発症する期間に強い相関があることも明らかになった (図 11-4)。

4. HIV の治療

a. 治療の原則

感染者を放置すると必ず免疫不全がいずれはやってきて、AIDS を発症する事態は免れない。俗にいわゆる長期未発症者は極めて稀な例であり、HIV 感染者にとって薬物治療は必須である。

感染後に数週間してウイルスの増殖力と感染個体の免疫系が均衡を保つ時期がくる。この時のウイルス量をセットポイントという。上述したようにセットポイントの高い値に設定された人は、低い人よりも早く病気が進行するので、何よりも血漿中のウイルス量を減らす治療が望

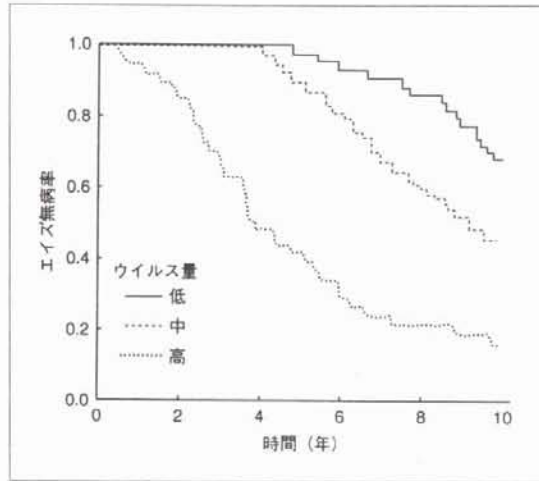


図 11-4 ウイルス量は AIDS 発症の期間と相関する

まれる。血漿中のウイルス量の測定は急性感染症の際の抗体がまだ出現しない、いわゆるウィンドーピリオドの際に診断的な価値をもつ。感染が確定している個体でも、3～4カ月に一度は測定して、ウイルス量に変化がないか否かをチェックする必要がある。

また治療の効果を最もよく反映するのはウイルス量である。ウイルス量の変化は対数(ログ)で表すが、有効に治療薬が効果を発揮しているとする、治療開始後2～8週目のウイルス量は、0.5～0.75 ログ減少している。通常はその後も減少を続け、3～4カ月の後に、ウイルス量は<500 コピーになるとされている。ウイルス量は種々の因子により影響を受けるので、感染や、非特異的症状が軽快してから1カ月以内あるいはワクチン接種後やはり1カ月経過してから測定すべきである。そのような状況下で測定されたウイルス量でも0.5 ログ以下の変化は有意とはいえない。

b. 治療開始時期

まず HIV に感染している患者で無症候性キャリアと非特異的な症候(体重減少、驚口瘡、2週間以上継続する発熱等)を呈している患者では後者に治療の適応がある。治療にあたっては、問診、血液検査、CD4 数、RNA 量以外に、VDRL、ツ反、トキソプラズマ IgG 抗体以外にも C 型肝炎ウイルス、胸部 X 線などの検査が必要である。

無症候性感染者の治療の開始にはより高度な判断が必要とされる。その理由は現在行われている治療が複雑だからである。そのメリット、デメリットを表 11-4 に示す。基本的には早期治療を開始することにより、ウイルス量が減少するために、耐性ウイルスの出現が遅れたり、健康人を治療するので、薬物毒性の可能性も減らせることなどがあげられる。治療を開始した際のデメリットは現在の治療法が複雑で未完成なことから、QOL の減少や将来ウイルス量が増加

表 11-4 無症候性キャリアに対する化学療法の特長とデメリット

メリット	デメリット
ウイルス量の減少	副作用などによるQOLの減少
正常免疫機能の維持	抵抗性ウイルスの早期出現
エイズ発症遅延、寿命延長	抵抗性ウイルスを感染させる可能性の増加
抵抗性ウイルスの出現減少	将来使用する抗ウイルス剤が限定される
薬物毒性の減少	長期抗レトロウイルス剤投与の副作用は不明
ウイルスを感染させる危険性の減少	現在の治療法が有効である期間は不明

表 11-5 慢性感染者の抗レトロウイルス治療

臨床症状	CD4 数, HIV RNA	治療の可否
症候性	どんな値でも	治療
無症候性	CD4 < 500/mm ³ あるいは HIV RNA > 10,000 (bDNA) あるいは > 20,000 (RT-PCR)	治療が推奨されるが予後に関する十分な説明と患者が治療を理解すること*
無症候性	CD4 > 500/mm ³ および HIV RNA < 10,000 (bDNA) あるいは < 20,000 (RT-PCR)	例外者を除きほとんどの医師は治療を推奨しない。

*CD4 数が 350-500/mm³ で HIVRNA が < 10,000 (bDNA) か < 20,000 (RT-PCR) を含む

表 11-6 薬剤の選択

推奨組み合わせ (A群とB群から1つずつ)	A群	B群
	indinavir nefinavir ritonavir saquinavir-SGC ritonavir + Saquinavir SGC or HGC	ZDV + ddI d4T + ddI ZDV + ddC ZDV + 3TC d4T + 3TC
禁忌組み合わせ	d4T + ZDV, ddC + ddI, ddC + d4T, ddC + 3TC	

したときに使用できる薬剤がないことなどがあげられる。

いずれにしろ、患者のカウンセリングを十分に行い治療の開始時期を決定すべきである。しかしながらウイルス量と CD4 数測定により AIDS 発症の可能性を予測できるようになって合理的な治療時期の決定がある程度可能になってきている。治療開始の指標は表 11-5 に示した。

c. 薬剤の選択

表 11-6 に掲げた A 群のプロテアーゼ・インヒビターと B 群の 2 種の NRTI (核酸アナログの逆転写酵素インヒビター) の組み合わせが最も効果があるといわれている。最近では NNRTI (非核酸アナログ) をプロテアーゼ・インヒビターの代わりに使う方法や、2 群のプロテアーゼ・インヒビター (ritonavir + saquinavir) だけでも有効であることが知られてきた。また薬剤が相

互に干渉することがあり、例えば d4T+ZDV は禁忌であるとされている。

一方これらの薬剤自身も副作用も枚挙にいとまがない。NRTI のほとんどが乳酸血症と脂肪肝を生じ生命に危険を生ずる。また ZDV には骨髄抑制による貧血や好中球減少、下痢、頭痛、不眠、倦怠感が、ddI には肺炎と末梢神経炎が、ddC と d4T ではやはり末梢神経炎を生ずる。プロテアーゼ・インヒビターでは一般に、体脂肪の分布が変わり、脂質代謝異常を伴ったり、血友病患者では出血のエピソードが増加するなどの副作用が見られる。

治療がうまくいかない大きな理由は二つで、一つは薬に効果がなかった場合で、二つ目は薬の副作用である。後者の場合は副作用を起こしている薬物を同定し、同じような効果がある薬に変えることは比較的容易である。前者の場合は3種の薬剤の全てを変えることが望まれる。

確かにウイルスの塩基配列や培養によるウイルスの特異的な薬剤に対する抵抗性を検討することは極めて有意義なことではあるが、それらの情報がウイルスの生体内での病原性にどの程度反映しているかの確証はまだ得られていない。現在治療の有効性を最もよく反映できるのは、血漿中のウイルス量と CD4 数であり、これらのマーカーでの有効性がなかった時に治療の変更を考える。変更する際には決して単剤だけの変更ではなく、全ての薬剤を変更すべきである。

以前 ZDV を投与されていた患者に抵抗性のウイルスが出現して ZDV 投与を中止した場合は、患者の体内では ZDV 感受性のウイルスが置き換わる。しかし ZDV を再投与すると、ZDV 抵抗性ウイルスが容易に再出現してくることが知られている。また indinavir と ritonavir、delavirdine と nevirapine は似通った薬剤であり、交叉耐性が存在するので、変更のさいは注意を要する。

(服部俊夫)

II 日常生活におけるケア

1. 日和見感染症の予防

1998年(平成10年)4月より、HIV感染者が身体障害者に認定されるようになった。他の多くの障害が身体的な障害であるのに対して、ヒト免疫不全ウイルスによる免疫機能障害は、それ自体は、基本的に身体の動きに制限を与えるものではない。したがって、そのリハビリテーションの目指すものは、他の内部障害とは異なってくるものと思われる。

例えば、HIV感染を知った患者が、より不安のない状態で長い期間生活できるようにサポートする、また、例えば、カリニ肺炎から回復した患者が、長い期間、再発を起こすことなく、暮らしていくことができるようにするといったことを目指すものになっていくものと考えられる。

HIV感染者の多くが、合併する日和見感染症によって命を落としている。アメリカでは、65~90万人が、日和見感染症により死亡している。日本では、厚生省の発表によると、累計約千人がAIDSにより死亡しているが、そのどれ程が、日和見感染症により死亡しているのかを

PPAR α activation is essential for HCV core protein–induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice

Naoki Tanaka,^{1,2} Kyoji Moriya,³ Kendo Kiyosawa,² Kazuhiko Koike,³ Frank J. Gonzalez,⁴ and Toshifumi Aoyama¹

¹Department of Metabolic Regulation, Institute on Aging and Adaptation, Shinshu University Graduate School of Medicine, Matsumoto, Nagano, Japan.

²Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Nagano, Japan.

³Department of Infectious Diseases, Internal Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

⁴Laboratory of Metabolism, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, Maryland, USA

Transgenic mice expressing HCV core protein develop hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma (HCC), but the mechanism underlying this process remains unclear. Because PPAR α is a central regulator of triglyceride homeostasis and mediates hepatocarcinogenesis in rodents, we determined whether PPAR α contributes to HCV core protein–induced diseases. We generated PPAR α -homozygous, -heterozygous, and -null mice with liver-specific transgenic expression of the core protein gene (*Ppara*^{+/+}:HCVcpTg, *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg, and *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice). Severe steatosis was unexpectedly observed only in *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice, which resulted from enhanced fatty acid uptake and decreased mitochondrial β -oxidation due to breakdown of mitochondrial outer membranes. Interestingly, HCC developed in approximately 35% of 24-month-old *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice, but tumors were not observed in the other genotypes. These phenomena were found to be closely associated with sustained PPAR α activation. In *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice, PPAR α activation and the related changes did not occur despite the presence of a functional *Ppara* allele. However, long-term treatment of these mice with clofibrate, a PPAR α activator, induced HCC with mitochondrial abnormalities and hepatic steatosis. Thus, our results indicate that persistent activation of PPAR α is essential for the pathogenesis of hepatic steatosis and HCC induced by HCV infection.

Introduction

HCV is one of the major causes of chronic hepatitis, whereas patients with persistent HCV infection have a high incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) (1, 2). Occurrence of HCC associated with chronic HCV infection has increased over the past 2 decades (3–5), and chronic HCV infection is recognized as a serious debilitating disease. However, the mechanism in which chronic HCV infection mediates hepatocarcinogenesis remains unclear.

HCV core protein was shown to have oncogenic potential (6). To examine how HCV core protein participates in HCV-related hepatocarcinogenesis, transgenic mouse lines were established in which HCV core protein is expressed constitutively in liver at cellular levels similar to those found in chronic HCV-infected patients (7). These mice exhibited hepatic steatosis (7) and insulin resistance (8) as early as 3 months of age; on further aging, these symptoms worsened and hepatic adenomas developed in approximately 30% of mice between 16 and 18 months of age (9). Finally, HCC was found within hepatic adenomas in a classic “nodule-in-nodule” pathology (9). Interestingly, no hepatic inflammation or fibrosis was found in these mice throughout

the course of HCC development (9), which suggested that the HCV core protein itself induces hepatic steatosis and HCC independently of hepatitis.

Several studies support the contention that hepatic steatosis promotes the development of HCC (10). Epidemiologic data have identified hepatic steatosis as a major accelerating factor of hepatocarcinogenesis in chronic HCV-infected patients (11). Moreover, increases in ROS production that can cause oxidative DNA damage, mitochondrial abnormalities, and accelerated hepatocyte proliferation were observed in the steatotic livers (12–14). Thus, an intriguing possibility has emerged that alteration of fatty acid metabolism in hepatocytes may be central to the pathogenesis of HCC induced by HCV core protein.

PPARs are ligand-activated nuclear receptors belonging to the steroid/thyroid hormone receptor superfamily; 3 isoforms designated as α , β/δ , and γ exist, all of which are involved in lipid homeostasis (15). PPAR α regulates constitutive transcription of genes encoding fatty acid–metabolizing enzymes (16) and is associated with the maintenance of fatty acid transport and metabolism, primarily in liver, kidney, and heart. Administration of PPAR α agonists, such as the widely prescribed fibrate drugs clofibrate, gemfibrozil, and fenofibrate, ameliorate hyperlipidemia in humans (17) and hepatic steatosis in mice (18).

On the other hand, long-term administration of PPAR α ligands to rodents causes accelerated hepatocyte proliferation, increased ROS generation, and development of HCC (19, 20). Disruption of the PPAR α gene was shown to prevent the development of HCC caused by long-term exposure to PPAR α activators (21). Interestingly, accumulation of fatty acids/triglycerides in hepatocytes

Nonstandard abbreviations used: ACC, acetyl-CoA carboxylase; AOX, acyl-CoA oxidase; CDK, cyclin-dependent kinase; CYP4A1, cytochrome P450 4A1; FAS, fatty acid synthase; FAT, fatty acid translocase; FATP, fatty acid transport protein; HCC, hepatocellular carcinoma; HCVcpTg, HCV core protein–expressing transgenic; L-FABP, liver fatty acid-binding protein; MCAD, medium-chain acyl-CoA dehydrogenase; MTP, microsomal transfer protein; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; RXRA, retinoid X receptor α .

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J. Clin. Invest.* 118:683–694 (2008). doi:10.1172/JCI33594.

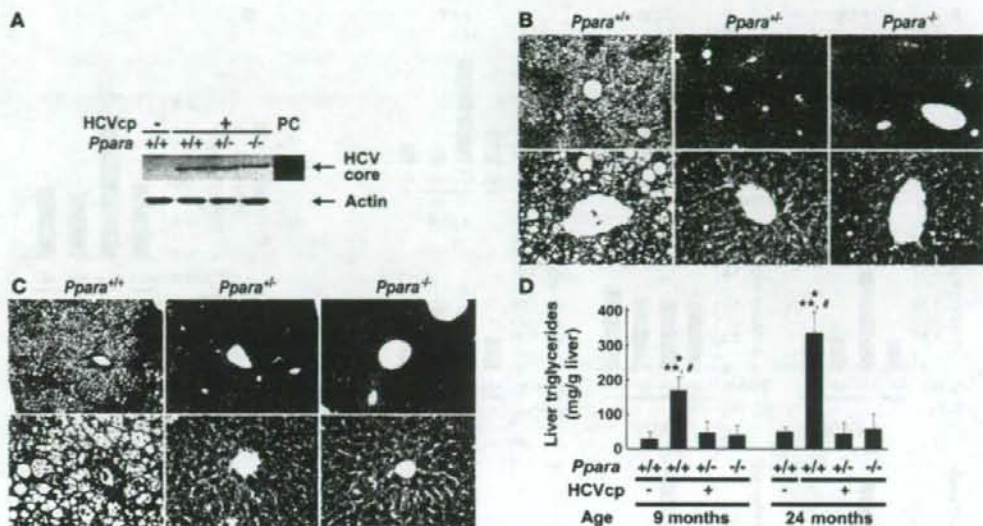


Figure 1

Phenotypic changes in transgenic mouse liver. (A) Immunoblot analysis of HCV core protein expression in livers of 9-month-old mice. Because no significant individual differences in the same mouse group were found in the preliminary experiments, 10 mg of liver prepared from each mouse ($n = 6$ /group) was mixed and homogenized. Whole-liver lysate (50 μ g protein) was loaded in each well. The band of actin was used as the loading control. Results are representative of 4 independent experiments. PC, lysate prepared from COS-1 cells overexpressing HCV core protein as a positive control. (B) Histological appearance of hematoxylin- and eosin-stained liver sections from 9-month-old HCVcpTg mice. Upper and lower rows show a lower ($\times 40$) and higher ($\times 400$) magnification, respectively. Microvesicular and macrovesicular steatosis was found only in $Ppara^{+/+}$:HCVcpTg mice. No inflammation or hepatocyte degeneration was evident in any of the genotypes. (C) Histological appearance of hematoxylin- and eosin-stained liver sections from 24-month-old HCVcpTg mice. Upper and lower rows show a lower ($\times 40$) and higher ($\times 400$) magnification, respectively. Hepatic steatosis was marked in $Ppara^{+/+}$:HCVcpTg mice, but not in other mice. Hepatic inflammation, fibrosis, and hepatocyte degeneration were not observed. In $Ppara^{+/+}$:HCVcpTg and $Ppara^{-/-}$:HCVcpTg mice, dysplastic hepatocytes and precancerous lesions were not detected throughout the entire liver. (D) Content of liver triglycerides. Results are expressed as the mean \pm SD ($n = 6$ /group) and compared between genotypes at the same age. * $P < 0.05$ compared with $Ppara^{+/+}$ nontransgenic mice; ** $P < 0.05$ compared with $Ppara^{+/+}$:HCVcpTg mice; * $P < 0.05$ compared with $Ppara^{-/-}$:HCVcpTg mice.

could lead to continuous PPAR α activation because of the presence of fatty acid metabolites that serve as natural PPAR α ligands. For example, mice lacking expression of the peroxisomal acyl-CoA oxidase (AOX) gene showed massive accumulation of very-long-chain fatty acids in hepatocytes, severe microvesicular steatosis, chronic PPAR α activation, and development of hepatic adenoma and HCC by 15 months of age (22). These results suggest a strong contribution of activated PPAR α to liver tumorigenesis.

On the basis of several lines of evidence, we hypothesized that PPAR α might contribute to hepatocarcinogenesis in HCV core protein-expressing transgenic (HCVcpTg) mice. To explore this possibility, PPAR α -homozygous ($Ppara^{+/+}$), PPAR α -heterozygous ($Ppara^{+/-}$), and PPAR α -null ($Ppara^{-/-}$) mice bearing the HCV core protein gene, designated $Ppara^{+/+}$:HCVcpTg, $Ppara^{+/-}$:HCVcpTg, and $Ppara^{-/-}$:HCVcpTg mice, were generated, and phenotypic changes were examined. Surprisingly, we found that severe hepatic steatosis and HCC induced by HCV core protein developed only in $Ppara^{+/+}$ mice, which were related to persistent PPAR α activation.

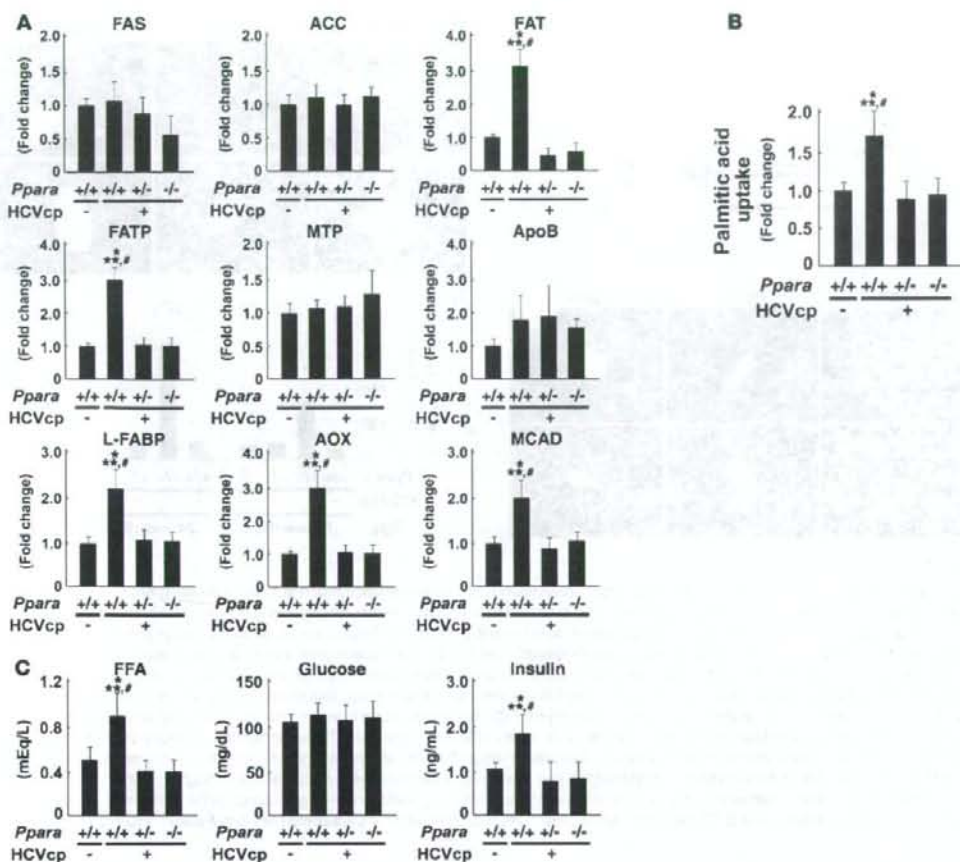
Results

Expression of HCV core protein in transgenic mice. $Ppara^{+/+}$:HCVcpTg and $Ppara^{+/-}$:HCVcpTg mice appeared healthy, and body weight in both genotypes was similar to that of $Ppara^{-/-}$:HCVcpTg and $Ppara^{-/-}$ mice

without the transgene. When hepatic expression of HCV core protein in 9-month-old transgenic mice was examined by immunoblot analysis, it was similar among $Ppara^{+/+}$:HCVcpTg, $Ppara^{+/-}$:HCVcpTg, and $Ppara^{-/-}$:HCVcpTg mice (Figure 1A) and was also similar to expression in HCVcpTg mice reported previously (7, 9). Age and sex had only a minor influence on the hepatic expression of HCV core protein.

Requirement of homozygous PPAR α for the development of hepatic steatosis in transgenic mice. Livers of 9-month-old male HCVcpTg mice with or without the $Ppara$ allele were examined. Those of $Ppara^{+/+}$:HCVcpTg mice were soft, slightly enlarged, and light in color and histologically showed macrovesicular and microvesicular steatosis with no apparent inflammation or hepatocyte necrosis (Figure 1B), in agreement with previous reports (7, 9). Biochemical analysis of liver extracts showed marked hepatic accumulation of triglycerides (Figure 1D). In contrast, livers of 9-month-old $Ppara^{+/-}$:HCVcpTg and $Ppara^{-/-}$:HCVcpTg mice showed neither histological abnormalities nor accumulation of triglycerides (Figure 1, B and D). Hepatic levels of free fatty acids in $Ppara^{+/+}$:HCVcpTg mice were approximately 3 times those in $Ppara^{+/-}$:HCVcpTg and $Ppara^{-/-}$:HCVcpTg mice or $Ppara^{+/+}$ mice not expressing the HCV core protein.

In 24-month-old $Ppara^{+/+}$:HCVcpTg mice, hepatic steatosis was found (Figure 1C), and the hepatic levels of triglycerides were further increased (Figure 1D). Apparent inflammation, hepatocyte

**Figure 2**

Analyses of factors associated with hepatic fatty acid and triglyceride metabolism. (A) Expression of genes associated with fatty acid and triglyceride metabolism in 9-month-old mouse livers. Total RNA was extracted from each mouse liver, and mRNA levels were determined by RT-PCR. mRNA levels were normalized by those of GAPDH and subsequently normalized by those in *Ppara*^{+/+} nontransgenic mice. Results are expressed as the mean \pm SD ($n = 6$ /group). * $P < 0.05$ compared with *Ppara*^{+/+} nontransgenic mice; ** $P < 0.05$ compared with *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice; # $P < 0.05$ compared with *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice. (B) Uptake of fatty acids in 9-month-old mouse livers. Liver slices obtained from 3 mice in each group were incubated in medium containing 0.8 mM [14 C]palmitic acid for 7 h. Fatty acid uptake ability was estimated by the sum of palmitic acid converted to CO₂ and ketone bodies with that incorporated into total cellular lipids after incubation. The experiment was repeated 3 times. Results were normalized by those of *Ppara*^{+/+} nontransgenic mice and expressed as the mean \pm SD. (C) Plasma concentrations of free fatty acids, glucose, and insulin. After an overnight fast, blood was obtained from each mouse and the above variables were determined. Results are expressed as the mean \pm SD ($n = 6$ /group).

degeneration and necrosis, and fibrosis were not detected. On the other hand, *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg and *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice showed no steatosis (Figure 1, C and D). These results indicate that hepatic steatosis develops in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice, but not in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg and *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice.

Hepatic fatty acid and triglyceride metabolism in transgenic mice. To investigate the mechanism responsible for the development of severe steatosis in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice, the expression of genes associated with fatty acid and triglyceride metabolism in the livers of 9-month-old mice was analyzed using the quantitative RT-PCR method. As shown in Figure 2A, the mRNA levels of genes related

to de novo lipogenesis (fatty acid synthase [FAS] and acetyl-CoA carboxylase [ACC]) and secretion of VLDL (microsomal transfer protein [MTP] and apoB) were constant in all groups. The mRNA levels of fatty acid translocase (FAT) and fatty acid transport protein (FATP), which are associated with the uptake of fatty acids into hepatocytes, were significantly increased only in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice, but the mRNA levels of hepatic triglyceride lipase, another contributor to fatty acid uptake, remained unchanged (data not shown). The mRNA levels of liver fatty acid binding protein (L-FABP) were also elevated only in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice. Surprisingly, the mRNA levels of AOX and medium-chain acyl-CoA

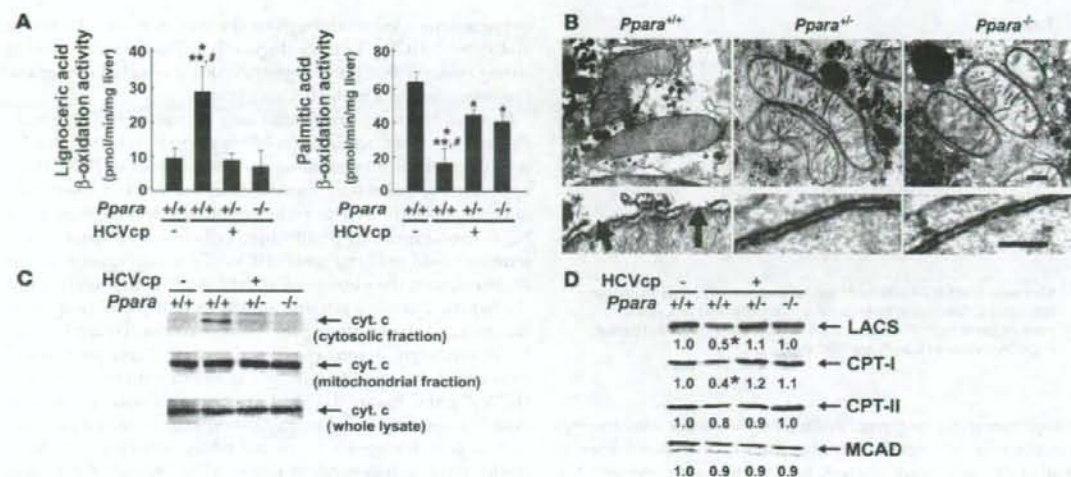


Figure 3

Analyses of mitochondrial abnormalities. (A) Lignoceric and palmitic acid β -oxidation activities in 9-month-old mice. Results are expressed as the mean \pm SD ($n = 6$ /group). * $P < 0.05$ compared with *Ppara*^{+/+} nontransgenic mice; ** $P < 0.05$ compared with *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg mice; * $P < 0.05$ compared with *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice. (B) Electron microscopic features of hepatic mitochondria of 9-month-old HCVcpTg mice. Upper and lower rows show a lower and higher magnification, respectively. In *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice, some mitochondria showing discontinuance of outer membranes (arrows) and amorphous inner structures were observed. In *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg and *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice, mitochondria appeared normal; the scale bars represent 200 nm (top) and 30 nm (bottom), respectively. (C) Immunoblot analysis of cytochrome *c* in 9-month-old mice. Whole-liver lysate, mitochondrial fraction, or cytosolic fraction (50 μ g protein) was loaded in each well. Results are representative of 4 independent experiments. (D) Immunoblot analysis of representative mitochondrial β -oxidation enzymes using a mitochondrial fraction prepared from 9-month-old mouse livers. The mitochondrial fraction (20 μ g protein) was loaded in each well. Results are representative of 4 independent experiments. The band intensity was quantified densitometrically and normalized by that in *Ppara*^{+/+} nontransgenic mouse. The mean value of the fold changes is shown under the representative band. LACS, long-chain acyl-CoA synthase; CPT, carnitine palmitoyl-CoA transferase.

dehydrogenase (MCAD), a rate-limiting enzymes in the peroxisomal and mitochondrial β -oxidation pathways, respectively, were significantly increased in *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice. When fatty acid uptake ability was measured in fresh liver slices, it was significantly enhanced only in *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice (Figure 2B). Additionally, plasma free fatty acid levels were higher in these mice than in mice in the other groups. Although there were no differences in fasting plasma glucose levels between the groups, hyperinsulinemia was observed only in *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice (Figure 2C), in agreement with the previous observation that significant insulin resistance developed in these mice (8). Similar results were obtained from 24-month-old mice (data not shown). These results combined show that the increased plasma fatty acid levels, which were likely due to enhanced peripheral fatty acid release caused by insulin resistance, and the increase in fatty acid uptake ability are consistent with steatogenesis in *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice.

Decreased mitochondrial β -oxidation in transgenic mice. Although the transcriptional activities of major β -oxidation enzymes were markedly increased, *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice had severe steatosis. To explore this discrepant result, peroxisomal and mitochondrial β -oxidation activities were measured using lignoceric and palmitic acids as substrates, respectively. The lignoceric acid-degrading capacity was increased only in *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice, where it corresponded to an increase in AOX expression. However, the capacity for palmitic acid degradation, which occurs particularly in mitochondria, was significantly lower in *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice than in *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg and *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg mice (Figure 3A).

Thus, decreased mitochondrial β -oxidation ability was considered to be another important mechanism for the development of steatosis induced by the core protein.

We further evaluated mitochondrial abnormalities. In electron microscopic examination, discontinuous outer membranes (Figure 3B, arrows) and lack of an internal structure were observed in some mitochondria of *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mouse livers, in agreement with the previous report (9). However, these abnormalities were not seen in *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg and *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice (Figure 3B). Immunoblot analysis showed that cytochrome *c*, which is usually localized in the mitochondrial intermembrane space, was present in the cytosolic fractions of *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice (Figure 3C). Moreover, immunoblot analysis using mitochondrial fractions showed that the expression levels of long-chain acyl-CoA synthase and carnitine palmitoyl-CoA transferase-I, which are enzymes indispensable to the initial step of mitochondrial β -oxidation and are localized mainly in mitochondrial outer membranes, were significantly decreased only in *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice (Figure 3D).

Overall, these results suggest that homozygous PPAR α is essential to the pathogenesis of hepatic steatosis induced by the HCV core protein, which results from a decrease in mitochondrial fatty acid degradation capacity caused by the breakdown of mitochondrial outer membranes and a disproportionate increase in the uptake of fatty acids. Interestingly, steatosis and the related changes did not occur in *Ppara*^{+/-} and *Ppara*^{-/-} mice expressing the HCV core protein, which suggested that these changes were not caused by the core protein itself.

Table 1
Incidence of HCC in 24-month-old mice

HCV core protein	<i>Ppara</i>	Mice (n)	Mice with HCC (n)	Incidence (%)
-	+/+	20	0	0
-	+/-	18	0	0
-	-/-	20	0	0
+	+/+	17	6	35.3 ^A
+	+/-	16	0	0
+	-/-	14	0	0

Mice were killed at 24 months of age for analysis. HCC was diagnosed according to histological findings. ^A*P* < 0.05 compared with *Ppara*^{+/+} nontransgenic mice, *P* < 0.05 compared with *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg mice, *P* < 0.05 compared with *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice.

Requirement of homozygous PPAR α for hepatic tumor development in transgenic mice. At 9 months of age, hepatic nodules were not observed at all in transgenic mice, whereas, at 24 months, approximately 35% of *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg mice had macroscopically evident hepatic nodules (Table 1). Microscopically, these nodules had the appearance of well-differentiated HCC with trabecular features, which was consistent with the previous report (9). Surprisingly, *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg and *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice of the same ages developed no evidence of hepatic tumors, despite the expression of HCV core protein at similar levels to those found in *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg mice (Table 1). Microscopic examination showed that there were no dysplastic cells

or precancerous lesions throughout the livers in *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg and *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice (Figure 1C). These results provide strong evidence that homozygous PPAR α is essential for hepatic tumorigenesis induced by HCV core protein.

Increased hepatocyte proliferation only in *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg mice. Because sustained acceleration of hepatocyte proliferation relative to apoptosis may promote the development of HCC, these opposing processes were quantified in the livers of 24-month-old mice. Both the liver-to-body weight ratio and the number of hepatocytes expressing proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were increased only in *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg mice (Figure 4, A and B). In contrast, the number of TUNEL-positive hepatocytes and the hepatic caspase 3 activity, indicators of hepatocyte apoptosis, remained similar among the 3 mouse strains (Figure 4, C and D). Interestingly, despite the presence of HCV core protein, the amounts of these proliferative and apoptotic markers in *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg and *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice were similar to those in *Ppara*^{+/+} nontransgenic mice. Expression levels of several proteins, such as protooncogenes (c-Fos and c-Myc), cell-cycle regulators (cyclin D1, cyclin-dependent kinase [CDK] 4, and PCNA), and phosphorylated ERK 1 and 2, all of which are associated with hepatocyte proliferation, were elevated in *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg mice but not in other genotypes (Figure 4, E and F).

Increased oxidative stress and DNA damage only in *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg mice. HCV core protein is associated with increased production of ROS (23). Enhanced ROS production induces nuclear DNA damage, which results in the initiation of hepatocarcinogenesis, and can also injure organelles, which can result in disorders in their

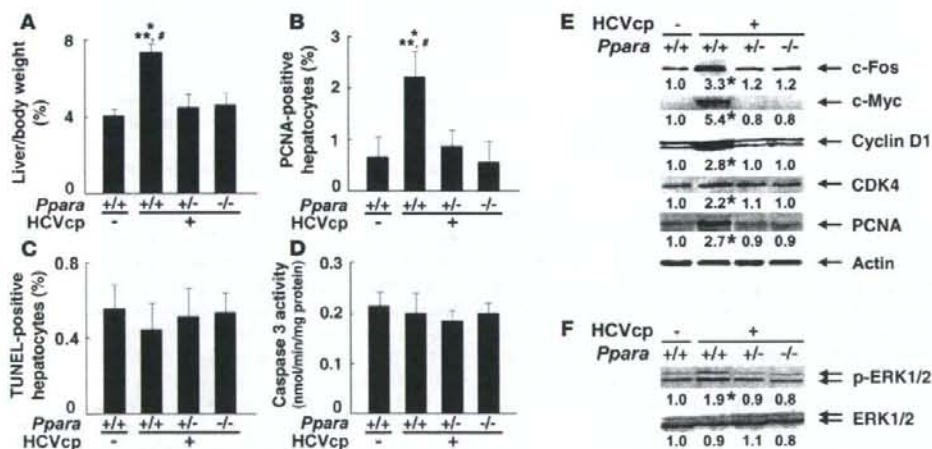
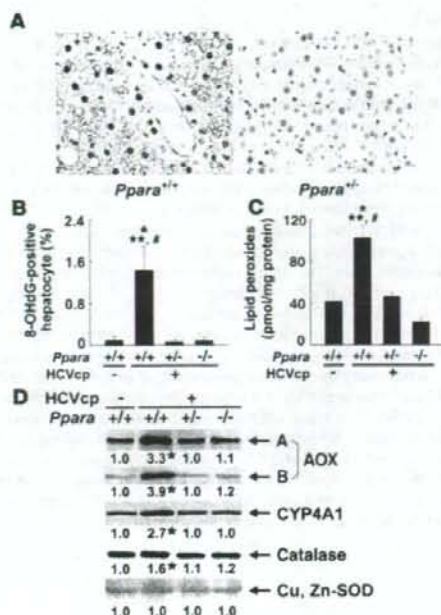


Figure 4

Increased hepatocyte proliferation in *Ppara*^{+/+}:HCVcpTg mice at 24 months of age. (A) Liver-to-body-weight ratio. Results are expressed as the mean \pm SD (*n* = 6/group). (B) Numbers of proliferating hepatocytes. Two thousand hepatocytes were examined in each mouse, and hepatocyte nuclei positive for anti-PCNA antibody were counted. Results are expressed as the mean \pm SD (*n* = 6/group). For A and B, comparisons are designated as follows: **P* < 0.05 compared with *Ppara*^{+/+} nontransgenic mice; ***P* < 0.05 compared with *Ppara*^{+/-}:HCVcpTg mice; #*P* < 0.05 compared with *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice. (C) Numbers of apoptotic hepatocytes. Liver sections were subjected to TUNEL staining, and TUNEL-positive hepatocyte nuclei were counted in 2,000 hepatocytes from each mouse. Results are expressed as the mean \pm SD (*n* = 6/group). (D) Caspase 3 activity. Results are expressed as the mean \pm SD (*n* = 6/group). (E) Immunoblot analysis of oncogene products and cell cycle regulators. The same sample used in Figure 1A (whole-liver lysate, 50 μ g protein) was loaded in each well. The band of actin was used as the loading control. Results are representative of 4 independent experiments. The band intensity was quantified densitometrically, normalized by that of actin, and subsequently normalized by that in *Ppara*^{+/+} nontransgenic mice. The mean value of the fold changes is expressed under each band. (F) Immunoblot analysis of phosphorylated ERK1/2 and total ERK1/2. The same samples in Figure 4E (50 μ g protein) were used.



function. The number of hepatocytes positive for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), an indicator of oxidative damage to nuclear DNA, was increased only in 24-month-old *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice (Figure 5, A and B). Lipid peroxides were slightly increased in the livers of 9-month-old *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice (data not shown) and were more abundant in the livers of 24-month-old *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice than in those of *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg and *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice or *Ppara*^{-/-} nontransgenic mice (Figure 5C). Expression of typical ROS-generating enzymes (AOX and cytochrome P450 4A1 [CYP4A1]) and ROS-eliminating enzymes (catalase and Cu, Zn-SOD) was examined. Immunoblot analysis showed marked increases in the expression of AOX and CYP4A1 and mild increases in that of catalase only in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice. No changes in Cu, Zn-SOD were found in the subgroups of transgenic mice (Figure 5D). These results suggest that enhanced oxidative stress causes damage in nuclear DNA and probably in mitochondria in the *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice.

Persistent and spontaneous PPAR α activation in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice. Liver tumorigenesis induced by long-term exposure to peroxisome proliferators and the related changes, such as sustained hepatocyte proliferation and increased oxidative stress, are associated with persistent PPAR α activation (19–21). To examine the activation of PPAR α , we quantified the level of PPAR α mRNA, which is induced by PPAR α activation (24, 25). PPAR α mRNA levels were higher in 9-month-old *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice than in *Ppara*^{-/-} nontransgenic mice (Figure 6A). These increases were more pronounced at 24 months of age. However, there were no differences in PPAR α mRNA levels between *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg and *Ppara*^{-/-} nontransgenic mice at either 9 or 24 months of age. The expression levels of typical PPAR α target genes (16, 25, 26) – such as FAT, FATP, L-FABP, AOX, and MCAD (Figure 2); c-Myc, cyclin D1, CDK4, and PCNA (Figure 4); and CYP4A1 (Figure 5)

Figure 5

Increased oxidative stress and DNA damage in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice at 24 months of age. (A) Immunohistochemical staining using antibody against 8-OHdG. In *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice, some steatotic hepatocytes were positive for 8-OHdG. Original magnification, $\times 400$. (B) Numbers of 8-OHdG-positive hepatocytes. Hepatocyte nuclei stained with anti-8-OHdG antibody were counted in 2,000 hepatocytes of each mouse. Results are expressed as the mean \pm SD ($n = 6$ /group). (C) Hepatic content of lipid peroxides. Results are expressed as the mean \pm SD ($n = 6$ /group). * $P < 0.05$ compared with *Ppara*^{-/-} nontransgenic mice; ** $P < 0.05$ compared with *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice; # $P < 0.05$ compared with *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice. (D) Immunoblot analysis of AOX, CYP4A1, catalase, and Cu, Zn-SOD. The whole-liver lysate used in the experiment in Figure 4E (20 μ g protein for AOX and CYP4A1 and 50 μ g for others) was loaded in each lane. The band of actin was used as the loading control. Results are representative of 4 independent experiments. A and B indicate full-length and truncated AOX, respectively. The band intensity was quantified densitometrically, normalized by that of actin, and subsequently normalized by that in *Ppara*^{-/-} nontransgenic mice. The mean value of the fold changes is expressed under each band. * $P < 0.05$ compared with *Ppara*^{-/-} nontransgenic mice.

– were simultaneously and synchronously increased in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice, but not in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg or *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice. These results confirm that persistent activation of PPAR α occurs only in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice. Various changes observed in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice, i.e., increased fatty acid uptake, mitochondrial abnormalities, steatosis, ROS overproduction, accelerated hepatocyte proliferation, and hepatocarcinogenesis, were considered to be closely linked with sustained PPAR α activation.

Nuclear PPAR α content. The results described above suggest that persistent PPAR α activation is critical to the steatogenesis and hepatocarcinogenesis induced by the HCV core protein. A question arises as to why *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice with an active *Ppara* allele do not exhibit the hallmarks of PPAR α activation and do not develop HCC. To address this issue, the nuclear PPAR α content was analyzed. Immunoblot analysis for PPAR α showed that the amount of nuclear PPAR α protein in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice was approximately 2- to 3-fold that of *Ppara*^{-/-} nontransgenic mice, which was disproportionate to the higher PPAR α mRNA levels (approximately 1.2- to 1.6-fold) (Figure 6, A and B). The level of nuclear PPAR α in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice was significantly lower than that in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice and was similar to that in *Ppara*^{-/-} nontransgenic mice (Figure 6B). Thus, the lower amount of nuclear PPAR α in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice than in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice might have heightened the threshold of expression required for long-term spontaneous PPAR α activation.

The degree of an increase in nuclear PPAR α levels was evidently higher than the degree of an increase in PPAR α mRNA levels in HCVcpTg mice (Figure 6, A and B). To investigate this disparity, the stability of nuclear PPAR α was evaluated by pulse-chase experiments using isolated hepatocytes obtained from these mice. The half-life of nuclear PPAR α was significantly longer ($P < 0.05$) in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice (11.5 \pm 2.3 h) than in *Ppara*^{-/-} nontransgenic mice (5.8 \pm 1.4 h) (Figure 6C). The half-life of nuclear PPAR α in *Ppara*^{-/-}:HCVcpTg mice tended to be prolonged compared with that in *Ppara*^{-/-} nontransgenic mice (Figure 6C). These results suggest that the stability of nuclear PPAR α was increased as a result of HCV core protein expression. Because it is known that the core protein interacts with retinoid X receptor α (RXR α) (27) and that