

丈頭、田邊雄一、遠城寺宗近、東晃一、下田慎治、下野淳哉、酒井浩徳、林純。C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン α 2b・リバビリン併用療法における長期投与のウイルス学的効果の検討。日本消化器関連学会週間 Japan Digestive Disease Week 2008、東京、2008

32) 古庄憲浩、貝沼茂三郎、小川栄一、豊田一弘、谷合啓明、大田黒 滋、村田昌之、澤山泰典、野村秀幸、林純。高齢者C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン α ・リバビリン併用療法の臨床成績。第78回日本感染症学会西日本地方会、広島、2008。

33) Hiroshi Kukihara, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human vesicle-associated membrane protein-associated protein subtype C inhibits HCV replication. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, October 5-9, 2008.

34) Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: HCV infection induces IP-10 production through the TLR signaling pathway. 同上。

35) Hideki Tani, Takayuki Izumi, Hiroto Kanbara, Yuuki Kaname, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Ceramide plays a crucial role on the entry of Japanese encephalitis virus. 同上。

36) Yoshinori Tanaka, Yoshio Mori, Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of an indicator cell line that detects the replication of HCV in sera from hepatitis C patients. 同上。

37) Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura:

Proteasome activator PA28g is required for efficient growth of hepatitis C virus. 同上。

38) 松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製および病原性発現におけるRipの役割: 第31回日本神経科学大会ワークショップ、2008、東京。

39) Xiaoyu Wen、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: IRF7 dominant active 変異体によるHCV感染細胞におけるI型IFNの発現増強効果: 第14回日本遺伝子治療学会、2008、札幌。

40) 山下哲生、宮崎直幸、森嘉生、森石恆司、李天成、宮村達男、武田直和、吉村政人、月原富武、松浦善治: 分解能3.5ÅのE型肝炎ウイルス様粒子のX線結晶構造解析: 第56回日本ウイルス学会総会、2008、岡山。

41) 田銀修平、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製におけるhB-ind1のコシヤペロン活性、同上。

42) 森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルス感染におけるプロテアソーム活性化蛋白質PA28 γ の役割、同上。

43) 森 嘉生、山下哲生、嶋 亮一、森石恆司、李 天成、武田直和、松浦善治: E型肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製、同上。

44) 谷 英樹、泉 貴之、寒原裕登、要 祐喜、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: 日本脳炎ウイルスの細胞侵入におけるセラミドの関与、同上。

45) 久木原 博、森石恆司、松浦善治: ヒトVAP-CはC型肝炎ウイルスの複製を抑制する、同上。

46) 阿部隆之、温 小玉、田中佳典、寒原裕登、谷 英樹、森石恆司、松浦善治: C型肝炎

炎ウイルス感染細胞特異的な IFN の誘導によるウイルス排除システムの構築、同上。

47) 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: C型肝炎ウイルス感染による TLR 経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上。

48) 田中佳典、森 嘉生、谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、巽 正志、松浦善治: 患者血清中に存在する C 型肝炎ウイルスの感染・複製を検出可能な指示細胞の樹立、同上。

49) 松浦善治: C 型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に関与する宿主因子: 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、シンポジウム、2008、神戸。

50) Yotsuyanagi H, Yamada N, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Itoh F, Iino S, Koike K. Hepatitis B virus splicing variants emerge and dominate in the immune clearance phase of chronic hepatitis B. #677, 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Milan, 2008.

51) Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K: Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. #1071, 59TH Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Disease, San Francisco, 2008.

52) HCV 慢性感染患者における B 細胞リンパ腫発症機序の解明: 末梢血 B 細胞での HCV 感染・増殖および AID (Activation-induced

cytidine deaminase) の発現上昇: 伊藤昌彦、村上恭子、鈴木哲朗、山口一成、水落利明 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008。

53) Peripheral B cells are reservoirs for HCV infection/replication: 水落利明 第 38 回日本免疫学会学術集会、京都、2008。

54) T. Nishimura, M. Sato, Y. Kasama, M. Shuda, S. Nakagawa, M. Saito, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. "Significance of virus." 第 8 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 淡路島 2008

55) 佐藤正明、齊藤誠、田中康介、岩永寿真子、岡田誠治、甲斐知恵子、小原恭子 「ヒトリンパ球移入 NOD/SCID マウス (huPBL NOD/SCID) を用いた組換麻疹ウイルス評価系の構築」 第 61 回 日本細菌学会九州支部会 第 45 回日本ウイルス学会九州支部会合同大会 熊本 2008

56) 西村知裕、笠間由里、齊藤誠、小原道法、小原恭子 「DHCR24 を介した HCV の p53 活性抑制」 第 61 回 日本細菌学会九州支部会 第 45 回日本ウイルス学会九州支部会合同大会 熊本 2008

57) 齊藤誠、小原恭子 「C 型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御機構の解析」 第 61 回 日本細菌学会九州支部会 第 45 回日本ウイルス学会九州支部会合同大会 熊本 2008

58) 佐藤正明、笠間由里、小原道法、小原恭子 「抗 DHCR24 単クローン抗体の C 型肝炎ウイルス複製抑制作用を担う宿主因子」 第 56 回 日本ウイルス学会学術集会 岡山 2008

59) 齊藤 誠、小原恭子 「C 型肝炎ウイル

- スによる腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御機構の解析」 第 56 回 日本ウイルス学会学術集会 岡山 2008
- 60) 徳永 優子, 齊藤 誠, 小原 道法, 小原 恭子 「C 型肝炎ウイルスが誘導する宿主因子 DHCR24 の相互作用分子の探索」 第 56 回 日本ウイルス学会学術集会 岡山
- 3 β -dehydroxysterol-D24-reductase (DHCR24) in life cycle of Hepatitis C
- 61) T. Nishimura, Y. Kasama, M. Shuda, M. Arai, M. Saito, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. "Hepatitis C virus abrogates p53 activity through 24-dehydrocholesterol reductase." 第 67 回日本癌学会学術総会 名古屋 2008.
- 62) 高野貴士, 林 昌弘, 榎原琢也, 平田雄一, 小原恭子, 小原道法 「DHCR24 による HCV 複製能制御の検討」 Characterization of HCV replication regulatory by DHCR24 第 67 回日本癌学会学術総会 名古屋 2008
- 63) T. Nishimura, Y. Kasama, M. Shuda, M. Arai, M. Saito, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. "Hepatitis C virus suppresses p53 activity through 24-dehydrocholesterol reductase." BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会年会・合同大会) 神戸 2008
- 64) 齊藤 誠, 小原恭子 「C 型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御機構の解析」 Molecular mechanism of DHCR24 over-expression induced by hepatitis C virus BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会年会・合同大会) 神戸 2008
- 65) K. Tsukiyama-Kohara. Molecular Basis of Hepatocarcinogenesis elevated by Hepatitis C virus. The Asia and Africa International Network Symposium of JSPS Asia and Africa Science Platform Program and the Fourth Liver Care Center Symposium (invited) Khon Kaen, Thai-land, 2008.
- 66) T. Nishimura, M. Satoh, Y. Kasama, M. Shuda, S. Nakagawa, M. Saito, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Significance of 3 β -dehydroxysterol-D24-reductase (DHCR24) in life cycle of Hepatitis C virus. 21th International Congress of Antiviral Research, Montreal, 2008.
- 67) T. Nishimura, Y. Kasama, T. Takano, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus abrogates p53 activity by over-expression of 3-beta-hydroxysterol delta-24-reductase (Oral presentation). IUMS (XIVth International Congress of Virology), Turkey, 2008.
- 68) M. Satoh, M. Saito, T. Takano, Y. Kasama, Y. Hirata, T. Nishimura, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Significance of DHCR24 in life cycle of Hepatitis C virus. "15th International Meeting on Hepatitis C & Related viruses" Texas, 2008.
- 69) T. Takano, Y. Hirata, K. Tsukiyama-Kohara, M. Sudoh, and M. Kohara. Regulation of HCV replication by DHCR24. "15th International Meeting on Hepatitis C & Related viruses" Texas, 2008.
- 70) Shoji, I., Osaki, M., Fukuda, K., Murakami, K., Hotta, H., Suzuki, T., Wakita, T., and

- Miyamura T. Molecular mechanism of E6Ap-mediated regulation of hepatitis C virus production. *Keystone Symposia, Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis*, Victoria, Canada, 2008.
- 71) Murakami, K., Abe, K., Shoji, I., Takamiya, S., Kimura, T., Aizaki, H., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Wakita, T. Identification of hnRNPH1 as a binding partner of hepatitis C virus core protein and the IRES IIIId region of viral RNA. *International Union of Microbiology 2008, Istanbul, Turkey, 2008.*
- 72) Hara, H., Aizaki, H., Matsuda, M., Murakami, K., Shoji, I., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T. Involvement of creatinine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses.*, San Antonio, USA, 2008.
- 73) Hamamoto, I., Murakami, K., Suzuki, T., Tanaka-Taya, K., Okabe, N., Wakita, T., and Shoji, I. ERGIC-53 regulates the HCV RNA replication through interaction with the viral NS3 protein. *15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses.*, San Antonio, USA, 2008.
- 74) El-Shamy, A.M., Apichartpiyakul, C., Kim, S.R., Adachi, T., Shoji, I., and Hotta, H. Polymorphism of HCV-1b core protein and interferon/ribavirin resistance -determining region (IRRDR) of NS5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/rivavirin combination therapy. *15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses.*, San Antonio, USA, 2008.
- 75) Abe, K., Murakami, K., Takamiya, S., Suzuki, T., Miyamura, T., Koike, K., Wakita, T., and Shoji, I. Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding partners for HCV core protein. *15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses.*, San Antonio, USA, 2008.
- 76) Deng, L., Adachi, T., Kitayama, K., Bungyoku, Y., Kitazawa, S., Ishido, S., Shoji, I., and Hotta, H. HCV infection induces Bax-triggered, mitochondria-mediated, caspase-3-dependent apoptosis. *15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses.*, San Antonio, USA, 2008.
- 77) Hotta, H., Kitayama, K., Yabuki, R., Deng, L., Nagano-Fujii, M., and Shoji, I. HCV induces nucleolar enlargement of the host cell that is associated with anti-apoptotic status and cell cycle progression during the chronic persistent phase of infection. *15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses.*, San Antonio, USA, 2008.
- 78) Shoji, I., Osaki, M., Murakami, K., Suzuki, T., Miyamura, T., Wakita, T., and Hotta, H. Ubiquitylation signal of hepatitis C virus core protein. *15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses.*, San Antonio, USA, 2008.
- 79) 原弘道、相崎英樹、松田麻未、村上恭子、勝二郁夫、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、creatine kinase BはC型肝炎ウイルスNS4Aとの相互作用によりウイルスゲノム複製複合体へ運ばれエネルギー供給に働く、第56回日本ウイルス学会学術集

会、岡山、2008.

80) 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆字、勝二郁夫、HCV コア蛋白に結合する新規宿主因子 hnRNPH1/H2 の HCV 生活環における役割、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.

81) Lin Deng、足達哲也、北山喜久美、分玉泰彰、北澤荘平、石戸聡、勝二郁夫、堀田博、C 型肝炎ウイルス感染によるアポトーシスの分子機序の解析、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.

82) 堀田博、北山喜久美、矢吹玲子、Lin Deng、長野基子、勝二郁夫、C 型肝炎ウイルスの持続感染は宿主細胞の核小体肥大、アポトーシス感受性低下及び細胞周期進行を誘導する、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.

83) 浜本いつき、村上恭子、鈴木哲朗、多屋馨子、岡部信彦、脇田隆字、勝二郁夫、C 型肝炎ウイルス複製を制御する宿主因子 ERGIC-53 の機能、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.

84) エルシャーミーアメード、足達哲也、犬伏祥子、勝二郁夫、堀田博、ペグインターフェロン/リビリン併用療法における HCV core および NS5A の多様性による SVR 予測因子と Non-SVR 予測因子の検討、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.

85) 内海孝子、ルシダマリア、長野基子、笹山美紀子、勝二郁夫、堀田博、インドネシア・パプア州の B 型肝炎ウイルス (HBV) の分子系統樹解析と新規 subgenotype の同定、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.

86) 勝二郁夫、大崎一直、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字、堀田博、C 型肝炎ウイルスコア蛋白のユビキチン化シグナル、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008.

87) 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆字、勝二郁夫、HCV コア蛋白に結合する新規宿主因子 hnRNPH1/H2 の HCV 生活環における役割、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008.

88) 大坪維範 森重聡 奥英二郎 高田由香 関律子 今村理恵 橋口道俊 大崎浩一 薬師寺和昭 金地泰典 吉本幸治 岡村孝 川口巧 佐田通夫. HCV 陽性者における末梢血 B リンパ球の clonality 解析. 第 70 回日本血液学会総会、京都、2008.

I. 知的所有権の出願・取得状況

特許取得

「ウイルスの複製に関与する宿主因子」特願：2008-66158、発明者：小原恭子、小原道法、佐藤正明、西村知裕、出願日：平成20年3月14日、出願人：国立大学法人 熊本大学、(財)東京都医学研究機構、(財)化学及血清療法研究所

J. その他

なし

肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究
分担研究報告書

C型肝炎の脂質代謝異常についての解析

研究分担者 岡上 武 大阪府済生会吹田病院 院長
研究協力者 光吉 博則 京都府立医科大学大学院 消化器内科学助教
安居幸一郎 京都府立医科大学大学院 消化器内科学講師

研究要旨：C型肝炎では肝の脂肪化が病態促進の重要因子として注目されている。脂肪化には宿主因子とHCVタンパクが関与すると考えられている。297名のC型肝炎患者について検討した結果、57.6%で肝の脂肪化を認めた。多変量解析では年齢、性別（男性）、BMIなどが重要な因子であった。肥満、糖尿病、飲酒歴を除外した100名の解析では、肝線維化が脂肪化の重要な因子であった。肝生検組織を用いた脂質代謝遺伝子の発現解析では、肝の脂肪化を認める群でMTP、PPAR α の発現が有意に低下していた。以上の成績から、本邦におけるC型肝炎の肝脂肪化には、宿主因子と肝障害の進展が関与していると考えられた。一方、肝細胞における中性脂肪の分泌や脂肪酸酸化の低下も脂肪化の原因の一つと考えられるが、HCVとの関連についてはさらなる解析が必要である。

A. 研究目的

C型肝炎では肝の脂肪変性が高頻度におき、肝病態進展や抗ウイルス療法に対する抵抗因子との関連が注目されている^{1,2)}。これまでの報告では、肝脂肪化に宿主側の要因とウイルス側の要因に起因すると考えられている。具体的には、肥満によるインスリン抵抗性や³⁾、HCVによる中性脂肪の分泌阻害⁴⁾などが報告されている。しかし、今のところ詳細なメカニズムは不明である。そこで、C型肝炎の脂肪化に関連する因子を解析し、肝生検組織を用いて脂質代謝に関する主要な遺伝子の発現を定量した。

B. 研究方法

(1) 対象

京都府立医科大学消化器内科において、2004年4月から2006年6月の間に肝生検

を行った全てのC型肝炎患者を対象にした。年齢が18歳未満、HBs抗原陽性、自己免疫性肝疾患、多飲歴、先天性肝疾患、HIV陽性、肝の脂肪化をきたす薬剤を服用中、肝生検までの6ヶ月以内に抗ウイルス療法を受けた症例は除外した。BMIが25kg/m²以上の場合を肥満症例とし、空腹時血糖値が126mg/dl以上またはインスリン、経口血糖降下剤を投与されている症例を糖尿病症例とした。全例で飲酒量について複数回の問診を行い、20g/日以上を飲酒歴ありとした。

(2) 肝生検

肝生検はすべて京都府立医科大学消化器内科で行った。肝生検組織は新犬山分類に従って評価し、小葉内の脂肪変性を軽度（33%未満）、中等度（33%以上 66%未満）、高度（66%以上）と定義した。組織の一部は液体窒素で迅速に凍結させ、遺伝子発現解

析まで -80°C で保存した。

(3) 遺伝子発現解析

凍結保存した肝生検組織から市販のキット (Quiagen) を用いて RNA を抽出した。cDNA を作成して real time-PCR 法 (LightCycler) で遺伝子発現を定量した。内部標準には β actin を用いた。表 1 に標的遺伝子のリストを示す。

(4) 倫理面への配慮

臨床試験の目的・方法、検査の副作用、患者に関する個人情報守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した (新 GCP に遵守)。本研究計画は京都府立医科大学倫理委員会の承認の承認を受けた。

C. 研究結果

(1) 対象

解析対象は 297 名となった (表 2)。症例全体では肥満が 25.6% (76 名)、飲酒歴が 22.6% (67 名) 含まれていた。HCV 遺伝子型は 97% (288 名) が 1 または 2 型の症例であり、3 型は 0.7% (2 名) であった。肝生検組織では 57.6% (171 名) に脂肪化が認められ、ほとんどの症例が軽度の脂肪変性であった。

(2) 全症例における肝脂肪化因子の解析

297 名の症例を肝の脂肪化の有無で 2 群に分け、肝の脂肪化に関連する因子を単変量 (Mann-Whitney test) で解析した。2 群間で有意差があった因子は、年齢、性別 (男性)、BMI、AST、ALT、 γ -GTP、空腹時血糖値、中性脂肪、肝組織の炎症 (activity) と線維化 (fibrosis) であった (表 3)。飲酒歴のある症例と糖尿病症例の比率は有意差

を認めなかった。次に、年齢、性別、BMI、空腹時血糖値、中性脂肪、activity や fibrosis の進行度について多変量解析を行った。その結果、肝の脂肪化と独立して相関したものは、BMI、中性脂肪、activity、fibrosis であった (表 4)。このうち、odds 比が高いものは、activity (2.18) と fibrosis (2.53) であった (表 4)。

(3) 肥満、糖尿病、飲酒歴を除く症例についての肝脂肪化因子の解析

脂肪肝を来たす因子 (肥満、糖尿病、飲酒歴) を除いた 100 名について同様の解析を行った。このうち、45% (45 名) の症例に肝の脂肪化を認めた。単変量解析では、AST、ALT、 γ -GTP、activity、fibrosis で有意差を認めた (表 5)。次に、これらの症例の肝生検組織を用いて、脂質代謝遺伝子の発現を解析した (図 1)。脂肪化のある群とない群に分けて、それぞれ発現量を比較した結果、PPARA (PPAR α)、NR1H3 (LXR)、ACADS (ミトコンドリア β 酸化酵素)、EHHADH (ホモキソム β 酸化酵素)、SLC27A5 (FATP5)、MTP、ACACA (脂肪酸合成酵素) で有意差を認めた (図 1)。いずれの遺伝子発現レベルも肝の脂肪化を認める群で有意に低下していた (図 1)。つぎに、表 5 で有意差があった因子にこれら 7 つの遺伝子発現レベルを加えて多変量解析を行った。その結果、肝の脂肪化と独立して相関した因子は fibrosis のみであった (表 6)。

D. 考察

C 型肝炎における肝の脂肪化には、宿主側因子とウイルス側因子が関与する。一般的には、本邦における主な HCV 遺伝子型である 1、2 型では宿主側因子の影響が強く、3 型ではウイルスによる直接効果と考えら

れている。本研究において、全体の症例で肝の脂肪化と独立して相関する宿主の因子は、年齢、性別（男性）、BMIであった。この成績は、これまでの報告とほぼ同じである¹⁾。宿主の影響（肥満、糖尿病、飲酒歴）を除いた100名の解析では、肝の線維化が最も重要な因子であった。

これまで、HCVによる肝脂肪化のメカニズムとして、MTPの抑制やSREBP1cの活性化が報告されている^{5,6)}。本研究で行った脂質代謝関連遺伝子の発現解析では、肝の脂肪化を認める群において、MTPの発現低下やPPAR α と脂肪酸酸化酵素（ACADS、EHHADH）の発現低下を認めた。これらの成績はDharancyらの報告と一致する⁷⁾。一方、SREBP1cの発現レベルは脂肪化のある群とない群の間に差を認めなかった。Kimらは*in vitro*でHCVコアタンパクがSREBP1cの発現を増加させることを報告しているが⁶⁾、本研究の成績と彼らの報告が異なる原因は不明である。我々はヒト肝生検組織を用いて解析しており、実験条件の差が原因である可能性も考えられる。McPhersonらは我々と同様に、肝生検組織を用いて遺伝子発現を解析し、HCV患者と正常肝ではSREBP1cの発現レベルに差がないことを報告している⁸⁾。いずれにしても、HCVによる脂質代謝異常のメカニズム解明には、*in vitro*と*in vivo*の結果が一致する必要がある。MTPやSREBP1c以外に、肝の脂肪化を認める群でLXR、FATP5、ACACAの発現が有意に低値であった。これらの遺伝子には肝脂肪化の促進効果があるため、一見矛盾するように思われる。これまでのところ、これらの遺伝子とHCVとの関係は報告されていないが、negative feedbackによって遺伝子発現が低下した可能性もある。

以上の結果をまとめると、本邦におけるC型肝炎では、肝の脂肪化に重要な宿主因子は肥満と性別（男性）が最も重要と考えられた。一方、脂肪酸酸化や中性脂肪分泌の低下が肝の脂肪化に関連していたことから、今後、HCVによるこれらの遺伝子発現に対する影響についても検討が必要である。

（参考文献）

1. Hourigan L et al. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology* 29; 1215-9, 1999
2. Poynard T et al. Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin. *Hepatology* 38; 481-92, 2003
3. Negro F. Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 12; 6756-65, 2006
4. Mirandola S et al. Liver microsomal triglyceride transfer protein is involved in hepatitis C liver steatosis. *Gastroenterology* 130; 1661-9, 2006
5. Abid Ket al. An *in vitro* model of hepatitis C virus genotype 3a-associated triglyceride accumulation. *J Hepatol* 42; 744-51, 2005
6. Kim KH et al. HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 355; 883-8, 2007
7. Dharancy S et al. Impaired expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha during hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 128; 334-42, 2005
8. McPherson S et al. Investigation of the role of SREBP-1c in the pathogenesis of HCV-related steatosis. *J Hepatol* 49; 1046-54

E. 結論

1. C型肝炎では肥満などの宿主因子以外に、肝の線維化進展が肝脂肪化と密接に関連していた。
2. C型肝炎では脂肪酸酸化の低下や中性脂肪の分泌障害が肝脂肪化に関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mitsuyoshi H, Itoh Y, Sumida Y, Minami M, Yasui K, Nakashima T, Okanoue T. Evidence of oxidative stress as a cofactor in the development of insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res*. 2008;38:348-53.
- 2) Zen K, Yasui K, Nakajima T, Zen Y, Zen K, Gen Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Mitsufuji S, Tanaka S, Itoh Y, Nakanuma Y, Taniwaki M, Arii S, Okanoue T, Yoshikawa T. ERK5 is a target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulating mitotic entry. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48:109-20.
- 3) Gen Y, Yasui K, Zen K, Nakajima T, Tsuji K, Endo M, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Tanaka S, Taniwaki M, Arii S, Okanoue T, Yoshikawa T. A novel amplification target, ARHGAP5, promotes cell spreading and migration by negatively regulating RhoA in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2009 ; 275 : 27-34.
- 4) Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*, in press.

2. 学会発表

- 1) 光吉博則 伊藤義人 岡上 武. シンポジウム ; NAFLD の病態・予後・治療. 第 94 回 日本消化器病学会総会、福岡、2008.

G. 知的所有権の取得状況

今回の研究内容については特になし。

図1 脂質代謝遺伝子発現の比較 (n=100)

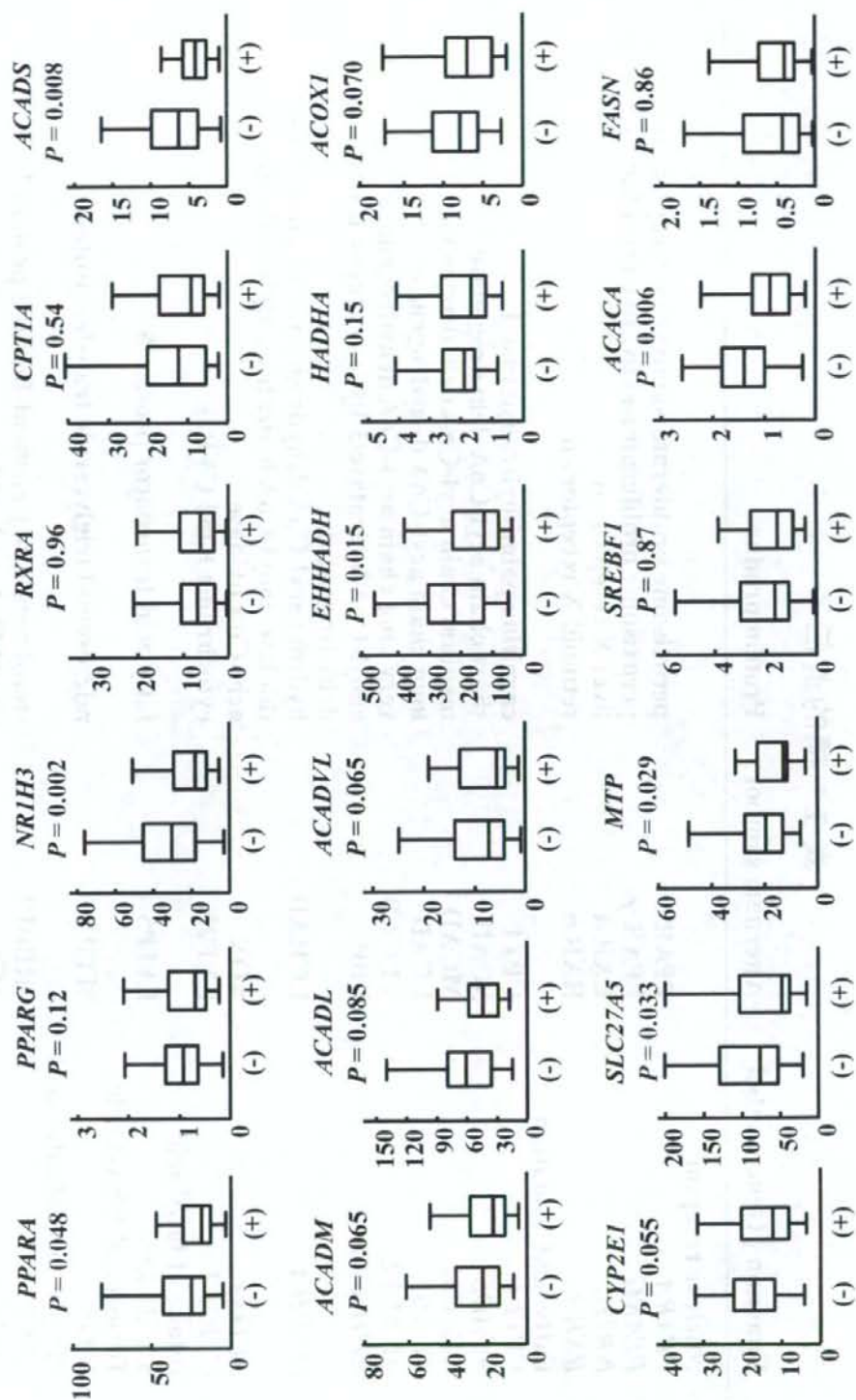


表 1 標的遺伝子

Function / Gene symbol	Alternate symbol	Protein product
Nuclear receptor		
<i>PPARA</i>	PPAR α	peroxisome proliferator-activative receptor α
<i>PPARG</i>	PPAR γ	peroxisome proliferator-activative receptor γ
<i>NRIH3</i>	LXR α	liver X receptor α
<i>RXRA</i>	RXR α	retinoid X receptor α
Fatty acid oxidation		
<i>CPT1A</i>	CPT1	carnitine palmitoyltransferase 1
<i>ACADS</i>	SCAD	short chain acyl-CoA dehydrogenase
<i>ACADM</i>	MCAD	medium chain acyl-CoA dehydrogenase
<i>ACADL</i>	LCAD	long chain acyl-CoA dehydrogenase
<i>ACADVL</i>	VLCAD	very long chain acyl-CoA dehydrogenase
<i>EHHADH</i>	LBP	enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
<i>HADHA</i>	LCHAD	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase, alpha subunit
<i>ACOX1</i>	AOX	acyl-CoA oxidase
<i>CYP2E1</i>	CYP2E	cytochrome P450 CYP2E
Intake of fatty acid		
<i>SLC27A5</i>	FATP5	fatty acid transporter protein 5
Transfer of triglyceride		
<i>MTP</i>	MTP	microsomal triglyceride transfer protein
Biosynthesis of fatty acid		
<i>SREBF1</i>	SREBP1	sterol regulatory element-binding protein 1
<i>ACACA</i>	ACC	acetyl CoA carboxylase
<i>FASN</i>	FAS	fatty acid synthase

表 2 対象 (n=297)

Total no.	297
Age*	58 (20-78)
Male gender (%)	131 (44.9%)
BMI*	22.7 (15.6-35.1)
Obesity (%)	76 (25.6%)
Alcohol intake (%)	67 (22.6%)
Diabetes (%)	9 (3.0%)
HCV genotype (%)	
1	212 (71.4%)
2	76 (25.6%)
3	2 (0.7%)
unknown	7 (2.3%)
HCV RNA level (KIU/ml)*	1100 (1-9400)
Platelet count ($\times 10^4/\mu\text{L}$)*	17.6 (5.3-37.4)
AST (IU/L)*	47 (14-413)
ALT (IU/L)*	59 (9-537)
γ -GTP (IU/L)*	39 (10-490)
Fasting glucose (mg/dL)*	96 (68-223)
Total cholesterol (mg/dL)*	173 (19-318)
Triglyceride (mg/dL)*	91 (26-930)
*Median (range)	

表 3 肝脂肪化の有無による比較

Factors.	No steatosis (n = 126)	Steatosis (n = 171)	P
Age*	56 (20-78)	59 (27-75)	0.019
Male gender (%)	56 (20-78)	87 (50.9%)	0.007
BMI*	21.8 (16.5-30.7)	23.9 (15.6-35.1)	<0.0001
Alcohol intake (%)	29 (23.0%)	38 (22.2%)	0.89
Diabetes (%)	4 (3.2%)	5 (2.9%)	1.00
HCV genotype (%)			
1	91 (72.2%)	121 (70.8%)	
2	31 (24.6%)	45 (26.3%)	
3	1 (0.8%)	1 (0.9%)	
unknown	3 (2.4%)	4 (2.4%)	0.78
HCV RNA level (KIU/ml)*	1257 (1-7030)	1063 (5-9400)	0.14
Platelet count ($\times 10^4/\mu\text{L}$)*	18.4 (5.9-32.7)	17.4 (5.3-37.4)	0.19
AST (IU/L)*	36 (15-413)	58 (14-339)	<0.0001
ALT (IU/L)*	40 (9-537)	73 (12-509)	<0.0001
γ -GTP (IU/L)*	25 (10-298)	56 (12-490)	<0.0001
Fasting glucose (mg/dL)*	95 (68-207)	97 (77-223)	0.002
Total cholesterol (mg/dL)*	179 (109-285)	171 (104-318)	0.13
Triglyceride (mg/dL)*	83 (26-214)	96 (32-930)	<0.0001
Histological activity (%)			
0	2 (1.6%)	1 (0.6%)	
1	72 (57.1%)	55 (32.2%)	
2	42 (33.3%)	78 (45.6%)	
3	10 (7.9%)	37 (21.6%)	<0.0001
Fibrosis (%)			
0	3 (2.4%)	1 (0.6%)	
1	62 (49.2%)	38 (22.2%)	
2	47 (37.3%)	73 (42.7%)	
3	11 (8.7%)	51 (29.8%)	
4	3 (2.4%)	8 (4.7%)	0.001

*Median (range)

表 4 脂肪化に関する因子 (多変量解析)

Factors	Odds ratio	95% confidence interval	P
Age	1.02	1.00-1.05	0.11
Male gender	0.78	0.42-1.46	0.44
BMI	1.20	1.07-1.33	0.001
Fasting glucose	1.00	0.98-1.02	0.90
Triglyceride	1.01	1.01-1.02	0.001
Activity grade A2 or A3	2.18	1.15-4.13	0.02
Fibrosis stage F3 or F4	2.53	1.15-5.59	0.02

表 5 肝脂肪化の有無による比較 (肥満・糖尿病・糖尿病・飲酒歴を除く)

Factors.	No steatosis (n = 55)	Steatosis (n = 45)	P
Age*	56 (30-77)	60 (27-73)	0.69
Male gender (%)	13 (23.6%)	14 (31.1%)	0.50
BMI*	21.4 (17.0-24.8)	22.2 (17.8-24.9)	0.10
HCV genotype (%)			
1	39 (70.9%)	30 (66.7%)	
2	16 (29.1%)	15 (33.3%)	
3	0 (0%)	0 (0%)	
unknown	0 (0%)	0 (0%)	0.65
HCV RNA level (KIU/ml)*	1800 (1-7030)	1110 (5-5190)	0.33
Platelet count ($\times 10^4/\mu\text{L}$)*	19.5 (8-33)	17.5 (6-31)	0.27
AST (IU/L)*	31 (15-138)	50 (14-138)	0.001
ALT (IU/L)*	34 (12-217)	62 (12-290)	0.003
γ -GTP (IU/L)*	23 (10-134)	38 (12-151)	0.006
Fasting glucose (mg/dL)*	96 (75-116)	96 (78-121)	0.38
Total cholesterol (mg/dL)*	178 (117-281)	177 (119-300)	0.64
Triglyceride (mg/dL)*	81 (26-209)	88 (40-178)	0.24
Histological activity (%)			
0	1 (1.8%)	1 (2.2%)	
1	31 (56.4%)	16 (35.6%)	
2	19 (34.5%)	20 (44.4%)	
3	4 (7.3%)	8 (17.8%)	0.033
Fibrosis (%)			
0	1 (1.8%)	1 (2.2%)	
1	30 (54.5%)	12 (26.7%)	
2	19 (34.5%)	18 (40.0%)	
3	5 (9.1%)	13 (28.9%)	
4	0 (0%)	1 (2.2%)	0.002

*Median (range)

表 6 脂肪化に関する因子 (多変量解析)

Factors	Odds ratio	95% confidence interval	P
Activity grade A2 or A3	0.96 4.05	0.33-2.79 1.05-15.6	0.93 0.04
Fibrosis stage F3 or F4	1.53 1.52	0.37-6.36 0.44-5.18	0.56 0.51
PPARA*	0.79	0.16-3.83	0.77
NRIH3*	0.67	0.19-2.36	0.53
ACADS*	2.15	0.83-5.59	0.12
EHHADH*	1.55	0.46-5.22	0.48
SLC27A5*	2.29	0.78-6.68	0.13
MTP*			
ACACA*			

肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究
分担研究報告書

インスリン抵抗性から見たC型肝炎治療効果

研究分担者 **熊田 博光** 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 分院長
研究協力者 **芥田 憲夫** 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院肝臓センター

研究要旨：HCV のインスリン抵抗性(IR)への影響と、IR の抗ウイルス効果への影響を検討した。糖尿病・肝硬変を除外した HCV-1b 慢性肝炎の 52%が IR(HOMA-IR \geq 2.5)を示した。1b-Core aa70/91 置換(Gln70(His70) and/or Met91)を有する症例は HOMA-IR 高値を示し、Core aa70/91 置換は高度 IR(HOMA-IR \geq 3.5)に寄与する独立要因であった。特に、治療で HCV が排除された症例では肝組織進行度とは独立して糖尿病発症の risk が減少していた。更に、糖尿病・肝硬変を除外した HCV-1b で Peginterferon/Ribavirin 併用 48 週の治療成績における IR の影響は確認されなかった。また、48 週・72 週併用療法の matched case-control study において Core aa70/91 置換(Arg70 and/or Leu91)が Sustained virological response に寄与する独立要因であることが確認された。今後は HCV の IR への直接的な影響と、IR の抗ウイルス効果への影響を正確に検討するためにも、症例を絞り込んだ検討が必要である。

A. 研究目的

当院では HCV-1b core aa70/91 置換[aa70 の arginine(Arg70)から glutamine(Gln70)もしくは histidine(His70)への置換と、aa91 の leucine(Leu91)から methionine(Met91)への置換]が Peginterferon/Ribavirin(PEG-IFN/RBV)併用療法難治要因であると同時に肝発癌にも関与することを報告してきた。今回は HCV のインスリン抵抗性(IR)への影響と、IR の抗ウイルス効果への影響を検討した。

B. 研究方法

(検討 1)HCV-1b 慢性肝炎における HOMA-IR の分布と、Core aa70/91 置換から見た HOMA-IR の分布を検討。HOMA-IR に影響を与える肝硬変・糖尿病の症例を除外した 1b・高ウイルス量(1b-high) 123 例の

慢性肝炎を対象に HOMA-IR の分布と多変量解析で HOMA-IR 上昇に寄与する要因を検討。

(検討 2)C型肝炎における IFN 治療後の糖尿病発症率を検討。IFN 関連療法を施行された 2842 例(IFN 単独療法 2417 例・RBV 併用療法 425 例)を対象に多変量解析(Cox proportional hazard model)で糖尿病発症に寄与する要因を検討。

(検討 3)IR から見た PEG-IFN/RBV 併用療法の成績を検討。PEG-IFN/RBV 48 週併用を完遂した HCV-1b で肝硬変・糖尿病を除外した 72 例における HOMA-IR から見た治療成績を検討。更に、PEG-IFN/RBV 併用を導入された 1b-high 559 例において、年齢・性別・ウイルス陰性化期間を一致させた 48 週群 130 例・72 週群 65 例との matched case-control study を施行。治療前 28 要因を

用いて多変量解析 (Logistic regression analysis) を行い Sustained virological response(SVR)に寄与する独立要因を多方面から検討。

検討項目としては糖・脂質代謝の各種代謝要因や、Core aa70/91置換・NS5A-ISDR変異数のウイルス要因も含めて検討。Core region と NS5A-ISDR はダイレクトシーケンシング法でアミノ酸配列を決定。HOMA-IR の ≥ 2.5 を IR 群、 ≥ 3.5 を高度 IR 群と定義。治療効果判定は治療終了後 24 週経過時点で HCV RNA 陰性が持続している症例を SVR、治療中に HCV RNA が陰性化しない症例を Non virological response (NVR)と定義した。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した(新 GCP に遵守)。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

C. 研究結果

(検討 1)HOMA-IR の分布は ≤ 1.4 (16%)/ $1.5-2.4$ (33%)/ $2.5-3.4$ (24%)/ ≥ 3.5 (28%)の頻度であり、52%が IR 群、28%が高度 IR 群であった。Core aa70/91 置換から見た HOMA-IR の分布は、Arg70 and Leu91 の症例で median 2.3, Gln70(His70) and/or Met91 の症例で median 2.9 であり、Gln70(His70) and/or Met91 の置換を有する症例では Arg70 and Leu91 の症例よりも HOMA-IR が

高値であった(Mann-Whitney U test; $p=0.022$)。HOMA-IR の分布から Gln70(His70) and/or Met91 の置換頻度を見ると、 ≤ 1.4 (60%)/ $1.5-2.4$ (58%)/ $2.5-3.4$ (62%)/ $3.5-3.9$ (83%)/ ≥ 4.0 (82%)であり、HOMA-IR 3.5 を境に Gln70(His70) and/or Met91 の置換頻度が上昇していた。高度 IR に寄与する要因は、肝細胞脂肪化($\geq 5\%$)($p=0.021$)、Core aa70/91 置換(Gln70(His70) and/or Met91)($p=0.021$)、年齢(≥ 55 歳)($p=0.037$)の 3 因子であった。

(検討 2)糖尿病発症に寄与する要因は、肝線維化進行度(肝硬変)($p<0.001$)、IFN 治療効果 (non-SVR)($p<0.001$)、Glucose level(prediabetes)($p<0.001$)、年齢 (≥ 50 歳)($p<0.001$)の 4 因子であった。

(検討 3)HOMA-IR から見た PEG-IFN/RBV 併用 48 週の成績は、IR 群は SVR 50%・NVR 29%、non-IR 群は SVR 53%・NVR 21%。高度 IR 群は SVR 55%・NVR 30%、non-高度 IR 群は SVR 50%・NVR 23%。今回の対象では HOMA-IR は治療成績に影響していなかった。PEG-IFN/RBV 併用 48 週・72 週の matched case-control study における SVR 率は 48 週群 32%、72 週群 62%。SVR に寄与する要因は、Core aa70/91 置換 (Arg70 and/or Leu91)($p=0.015$)、治療期間(72 週)($p=0.014$)の 2 因子であった。

D. 考察

トランスジェニック・マウスによる動物実験では HCV core 蛋白による IR への直接作用が報告されてきた。今回の検討 1・2 は、このような基礎的な検討を臨床面から支持する成績であるといえる。特に、検討 2 では肝線維化進行度と独立して HCV 排除

の要因が得られたことは重要な成績である。

HOMA-IRがPEG-IFN/RBV併用治療成績に影響することが他施設より報告されているが、従来の検討はHCV-1b以外のgenotypeも含めた検討やIRに影響する要因を含む検討であった。今回の検討3は糖尿病・肝硬変を除外したHCV-1bの48週治療に限定した検討であることから既報と異なる成績を示したと思われる。

今回の検討はIRに影響を与える肝硬変・糖尿病の症例を除外したHCV-1b症例に絞り込んだことが特徴的である。今後はHCVのIRへの直接的な影響と、IRの抗ウイルス効果への影響をより正確に検討するためにも、症例を絞り込んだ検討が必要である。

E. 結論

(検討1)HCV-1bの慢性肝炎の約半数がIRを示した。1b-core aa70/91はIRに関与する可能性が示唆された。(検討2)HCVの排除は肝組織進行度とは独立してDM発症のriskを減少させる。(検討3)糖尿病・肝硬変を除外したHCV-1bに限るとIRはPEG-IFN/RBV併用の治療成績に影響していなかった。72週併用療法のSVR予測にも1b-core aa70/91は有用である。

F. 研究発表

1. 学会発表

1) 芥田憲夫他：HCV core aa 70/91置換の抗ウイルス療法・肝病態における臨床的意義 第12回日本肝臓学会大会 東京 2008.10

2. 論文発表

- 1) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Substitution of amino acid 70 in the hepatitis C virus core region of genotype 1b is an important predictor of elevated alpha-fetoprotein in patients without hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2008;80:1354-1362.
- 2) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Efficacy of low-dose intermittent interferon-alpha monotherapy in patients infected with hepatitis C virus genotype 1b who were predicted or failed to respond to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy. *J Med Virol* 2008;80:1363-1369.
- 3) Arase Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Hirakawa M, Ikeda K, Kumada H. Sustained virological response reduces incidence of onset of type 2 diabetes in chronic hepatitis C. *Hepatology* (in press). Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. A matched case-controlled study of 48 and 72 weeks of peginterferon plus ribavirin combination therapy in patients infected with HCV genotype 1b in Japan: Amino acid substitutions in HCV core region as predictor of sustained virological response. *J Med Virol*

2009;81:452-458.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし。