

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型慢性肝炎におけるインスリン抵抗性
—食餌負荷試験によるB型慢性肝炎との比較—

研究分担者 林 純 九州大学病院 総合診療科(感染環境医学) 教授
研究協力者 迎 はる 九州大学病院 総合診療科
古庄 憲浩 九州大学病院 総合診療科

研究要旨 HCV 感染例に対し、食餌負荷試験を行いインスリン抵抗性に関与する因子について HBV 感染例と比較検討した。対象は、慢性活動性肝炎 262 例（HCV 224 例、HBV 38 例）および非 HBV 非 HCV（対照）群 109 例：HBs 抗原陰性かつ HCV 抗体陰性を検討した。糖尿病もしくは脂質異常症で薬物治療中、血清 Cr>1.0 mg/dL、HBV・HCV 重複感染は除外した。方法は、夜間 12 時間の絶食後、食餌負荷試験（クッキーテスト 592 kcal）を行い、負荷前、負荷後 1 時間および 2 時間における、血糖、血清インスリン、中性脂肪を測定した。また、空腹時に HDL-C、LDL-C、ALT、 γ GTP、血小板数、HCV-RNA 量、HBV-DNA 量、HBe 抗原量を測定した。年齢調整後に比較すると、HCV 群は HBV 群、対照群と比べ、空腹時インスリン（HCV 群： 9.1 ± 0.3 、HBV 群： 7.2 ± 0.8 、対照群： 6.3 ± 0.4 、HCV vs. HBV： $p=0.02$ 、HCV vs. 対照： $p<.0001$ ）、HOMA-IR（HCV 群： 2.1 ± 0.1 、HBV 群： 1.7 ± 0.2 、対照群： 1.5 ± 0.1 、HCV vs. HBV： $p=0.03$ 、HCV vs. 対照： $p<.0001$ ）が有意に高値であった。また、HCV 群は対照群に比べ、インスリン面積（HCV 群： 96.6 ± 3.1 、HBV 群： 85.0 ± 7.6 、対照群： 68.9 ± 4.5 、HCV vs. HBV： $p=0.16$ 、HCV vs. 対照： $p<.0001$ ）が、有意に高値であった。HCV 群では、インスリン抵抗性の有無に関わらず、HBV 群と比べ、LDL-C が有意に低値であった。インスリン分泌に関わる因子として、HCV 群においては高 BMI、高 ALT、負荷後 2 時間の高 TG が抽出されたが、HBV 群では LDL-C が抽出された。HCV 感染例では、HBV 感染例と比べ、有意に高いインスリン抵抗性を認め、脂質代謝が異なることが示唆された。

A. 目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)持続感染はインスリン抵抗性を合併しやすく、同抵抗性により抗ウイルス療法の効果や肝組織線維化の進行にも影響を与える。また、同感染と脂質代謝異常の関与も示唆されている。

今回、HCV 感染例に食餌負荷試験を行い、

インスリン抵抗性および脂質代謝異常について HBV 感染例、非 HBV 非 HCV 例と比較検討した。

B. 方法

対象は、2004 年 4 月から 2008 年 5 月までの間に、抗ウイルス療法導入前の評価で

入院した慢性活動性肝炎の 262 例 (HCV RNA 持続陽性 (HCV) 群 : 224 例、HBs 抗原持続陽性 (HBV) 群 : 38 例) について検討した。糖尿病もしくは脂質異常症で薬物治療中の者、血清 Cr>1.0 mg/dL の者、HBV・HCV 重複感染の者は除外した。平均年齢は、HCV 群 56.6 ± 11.9 才、HBV 群 49.3 ± 13.9 才であり、HCV 群が有意に高齢であった ($p=0.0007$)。男女比、BMI、総ビリルビン、ALT、 γ GTP、血小板数、空腹時中性脂肪 (TG) に有意差は認めなかった。血清アルブミンは、HCV 群 4.1 ± 0.4 mg/dL、HBV 群 4.3 ± 0.3 mg/dL と HCV 群で有意に低値であった ($p=0.02$)。また、HDL-C は、HCV 群 50.5 ± 14.2 mg/dL、HBV 群 56.1 ± 14.9 mg/dL、LDL-C は、HCV 群 98.2 ± 25.0 mg/dL、HBV 群 117.2 ± 32.9 mg/dL と HCV 群で有意に低値であった ($p=0.04$ 、 $p<0.0001$)。HBs 抗原陰性かつ HCV 抗体陰性で、同期間中に、外来や入院で耐糖能障害を疑われ検査を行った、非 HBV 非 HCV (対照) 群 107 例を検討した。対照群の平均年齢は、 54.9 ± 12.7 才で HCV 群と年齢、男女比、BMI において有意差を認めなかった。HCV 群は、対照群に比べ、空腹時血糖 (94.5 mg/dL、 97.9 mg/dL : $p=0.007$)、空腹時 TG (101.7 mg/dL、 118.9 mg/dL : $p=0.001$)、HDL-C (50.5 mg/dL、 56.9 mg/dL : $p=0.0004$)、LDL-C (98.2 mg/dL、 135.2 mg/dL : $p<0.0001$) が有意に低値であった。(表 1)

方法は、夜間 12 時間の絶食後、検査用クッキー (592kcal、糖質 75.0g、脂質

28.5g、蛋白質 8.0g ネオクッキー™ SRL 社 東京)を用いた食餌負荷試験を行った。

検査用クッキーは、お茶または水を飲用下に、10-15 分以内で摂取し、50%量摂取の時点を負荷スタートとした。負荷前および負荷後 60、120 分後に採血し、血糖、血清インスリン、中性脂肪を測定した。また、空腹時に HDL-C、LDL-C、ALT、 γ GTP、血小板数、HCV-RNA 量、HCV genotype、HBV-DNA 量、HBe 抗原量を測定した。

インスリン抵抗性は、HOMA-IR (homeostasis model assessment-insulin resistance)、インスリン面積で検討した。計算式は、 $HOMA-IR = \text{空腹時血糖} \times \text{空腹時インスリン} / 405$ 、インスリン面積 (AUC-IRI : area under the insulin curve) = (負荷前インスリン + 負荷後 1 時間インスリン $\times 2$ + 負荷後 2 時間インスリン) $\div 2$ を用いた。

糖尿病の診断には、WHO の診断基準 (2006 年) を用いた。空腹時高血糖例 (HCV 群 2 例、対象群 1 例) は、耐糖能障害として解析を行った。

本研究の遂行に当たっては患者のプライバシーを厳守し、患者に不利益が生じないよう細心の注意を払った。各患者にインフォームドコンセントを行い、書面での同意を得た。

統計学的有意差を $p<0.05$ とした。

表1 対象患者の特徴

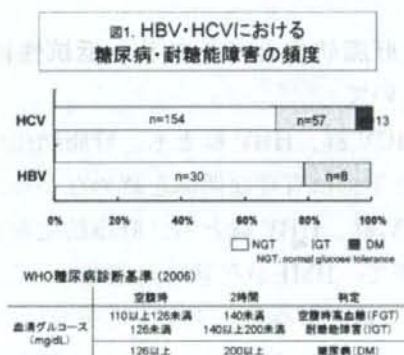
	HCV (224例)	HBV (38例)	P値	対照 (113例)
年齢 (才)	46.4±11.9	48.3±13.9	0.0007	54.9±13.1
女性 例数 男性 例数	130/94	19/19	0.38	53/54
Body mass index (kg/m ²)	23.5±3.1	23.3±2.8	0.71	23.8±3.8
アルブミン (g/dL)	4.1±0.4	4.3±0.3	0.02	
総ビリルビン (mg/dL)	0.8±0.3	0.8±0.3	0.79	
ALT (U/L)	57.7±44.9	51.6±65.9	0.47	
γ-GTP (U/L)	47.3±39.7	39.9±30.4	0.27	
血小板数 (万/μL)	16.5±5.5	17.6±5.9	0.26	
LDL-C (mg/dL)	99.2±25.0	117.2±32.9	<0.001	135.2±31.6
HDL-C (mg/dL)	50.5±14.2	66.1±14.9	0.04	56.9±17.5
空腹時TG (mg/dL)	101.7±43.2	96.2±33.5	0.49	118.9±53.4
HbA1c (%)	5.2±0.5	5.1±0.4	0.58	5.3±0.4
HbA1c異常性 例数 (%)		11 (28.9)		
HBV DNA量 (log copies/mL)		4.6±2.1		
HCV genotype 例数 (1型/2型)	164/56			
HCV RNA量 (IU/mL)	1801±1589			

平均±標準偏差

C. 結果

1. 糖尿病・耐糖能障害について

HCV群では、耐糖能障害57例(25%)、糖尿病13例(6%)、HBV群では、耐糖能障害8例(21%)、糖尿病0例と両群に20%を超える耐糖能異常を認めた。また、HCV群では、8例が新たに糖尿病と診断された。(図1)



2. 負荷後のインスリン (IRI)、血糖の変化について

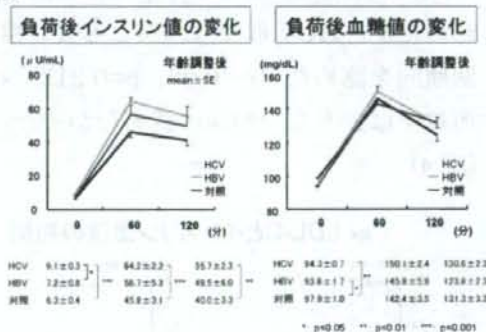
年齢調整を行い比較すると、空腹時IRIは、HCV群では9.1±0.3 μU/mLと上昇しており、HBV群7.2±0.8 μ

U/mL、対照群6.3±0.4 μU/mLと比べ有意に高値であった(p=0.02, p<0.001)。負荷後1時間および2時間では、HCV群とHBV群間に統計学的有意差は認められなかったが、HCV群でインスリン値が高い傾向が認められた。対照群との比較では、HCV群は負荷後1時間、2時間ともに、有意にインスリン分泌が亢進していた(p<0.001)。

負荷後血糖値は、空腹時で対照群が98.0±1.0 mg/dLとHCV群94.2±0.7 mg/dLやHBV群93.8±1.7 mg/dLと比べ有意に高値であったが(p=0.003, p=0.04)、負荷後1時間および2時間の血糖値では、有意差は認めなかった。(図2)

HCV群は、HBV群と空腹時血糖値に有意差がなくても空腹時インスリン分泌が有意に亢進していた。対象群との比較では、HCV群は、負荷前、負荷後ともにインスリン分泌が有意に亢進していた。

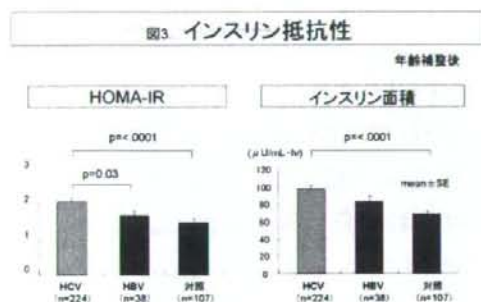
図2



3. HOMA-IR、インスリン面積について

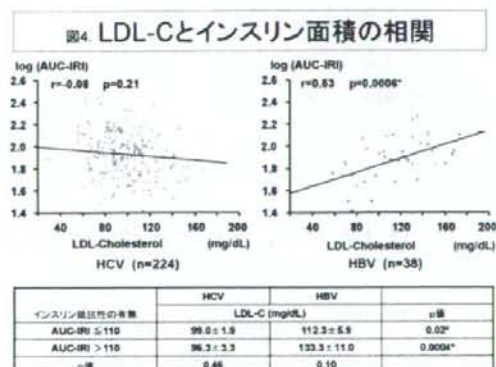
年齢調整後の検討で、HOMA-IR(HCV群:2.1±0.1、HBV群:1.7±0.2、対照

群 : 1.5 ± 0.1 、HCV vs. HBV : $p=0.03$ 、HCV vs. 対照 : $p<.0001$) およびインスリン面積 (HCV 群 : 96.6 ± 3.1 、HBV 群 : 85.0 ± 7.6 、対照群 : 68.9 ± 4.5 、HCV vs. HBV : $p=0.16$ 、HCV vs. 対照 : $p<.0001$) は、HCV 群で有意に高く、HCV 群の高いインスリン抵抗性が認められた。(図 3)



4. LDL-C とインスリン面積の相関について

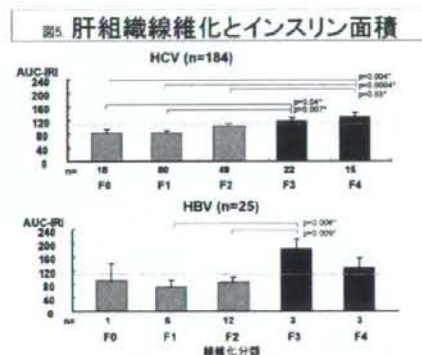
HBV 群では LDL-C とインスリン面積が強い正の相関 ($r=0.53$ 、 $p=0.0006$) を認めたが、HCV 群では、むしろ負の相関傾向を認めた ($r=-0.08$ 、 $p=0.21$)。対照群では、有意な傾向は認めなかった。(図 4)



5. 肝組織線維化とインスリン面積について

HCV 群 184 例、HBV 群 25 例に肝組織検査を行った。両群とも、線維化の軽い F0-2 症例に比べ、線維化の進行した F3-4 症例で有意にインスリン面積が高値であった。

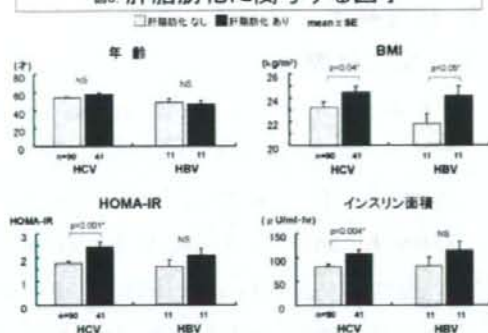
(図 5)



6. 肝脂肪化とインスリン抵抗性について

HCV 群、HBV 群とも、肝脂肪化の有無と年齢に有意な関係を認めなかった。HCV 群、HBV 群とも、肝脂肪化を呈する例で、BMI が有意に高値であった。HCV 群で肝脂肪化を呈する例では、有意に HOMA-IR、インスリン面積が高値であった。HBV 群では、統計学的有意差は認められなかったが、肝脂肪化を呈する例で、インスリン抵抗性が高い傾向が認められた。(図 6)

図6 肝脂肪化に関与する因子



7. インスリン分泌に関わる因子についての多変量解析

インスリン分泌に関わる因子として、年齢、BMI、空腹時TG、負荷後2時間TG、HDL-C、LDL-C、血清アルブミン、総ビリルビン、ALT、γGTP、血小板数について多変量解析を行った。HCV群では、高BMI、高ALT、負荷後2時間の高TGが抽出されたが、HBV群では、LDL-Cが抽出された。

(表2)

表2 インスリン面積に関与する因子 (多変量解析)

	HCV			HBV		
	パラメーター 決定値	標準誤差	P値	パラメーター 決定値	標準誤差	P値
年齢 (年)	0.0010	0.0013	0.47	0.0059	0.0031	0.068
Body mass index (kg/m ²)	0.0175	0.0047	0.0003*	0.0049	0.0012	0.69
log ALT	0.1883	0.0667	0.0052*	0.0735	0.1111	0.52
log γGTP	0.0426	0.0564	0.47	0.2034	0.1458	0.17
LDL-C (mg/dL)	-0.00003	0.0006	0.95	0.0020	0.0095	0.039*
log TG2時間値	0.2976	0.1336	0.027*	0.3561	0.3354	0.30

アルブミン、総ビリルビン、血小板数、HDL-C、Log TG空腹時で調整

D. 考察

C型慢性肝炎のインスリン抵抗性に関

わる因子を調べるために、検査用クッキーを用いた食餌負荷試験を行った。

食餌負荷試験は、炭水化物以外に、脂質や蛋白質を含むため、糖液を用いた75gOGTT検査と比べ、食事の栄養バランスに近く、より生理的な状態で検査が行える。そのため、反応性低血糖やそれに伴う悪心などの副作用の発現が少ない特徴がある。また、動脈硬化や急性心筋梗塞のリスクファクターでもある食後高中性脂肪血症についても評価が可能である。

空腹時血糖だけでは、約30%の耐糖能障害や糖尿病を見逃すといわれており、一般臨床においても糖負荷試験は重要である。さらに、HCV感染例では、インスリン抵抗性を有する例では、有意にPEG-IFNα2b・RBV療法の効果が低くなるため、HCV感染例では、積極的に糖負荷試験、できればより安全な食餌負荷試験を行うことが重要である。

HCV群では、65歳以上で、インスリン値が有意に高く、また、HCV、HBV、対照群のいずれの群においても、年齢は血糖値と正の相関を認めたため、年齢調整後に、インスリン値および血糖値の負荷後変化を解析した。その結果、血糖値に有意な差がなくても、HCV群は、対照群と比べて、負荷前、負荷後ともインスリン値が有意に高値であった。また、インスリン抵抗性の指標である

HOMA-IR、インスリン面積ともHCV群で有意に高値であった。すなわち、有意に高いインスリン抵抗性を認めた。

C型慢性肝炎において、PEG-IFNα

2b・RBV 療法導入前に、インスリン抵抗性について評価を行い、インスリン抵抗性を認める場合には、食餌や運動療法により介入を行うことが、より高い SVR 率を得るために有用な可能性があり、今後検討が必要と思われる。

LDL-C とインスリン面積の相関については、HBV 群で有意な正の相関を示す一方、HCV 群では逆に負の相関傾向を示した。対照群では、いずれの傾向も示さないことから、それぞれのウイルスによる特徴の可能性が示唆された。HCV は、増殖にコレステロールを必要としており、血中で LDL-C が低いにも関わらず、肝脂肪化を呈する例が多いことについて、さらなる解明が期待される。

多変量解析の結果、HCV 群、HBV 群とも、インスリン面積と年齢や血清アルブミン、血小板数といった宿主側の因子や肝合成能、肝線維化をあらわす因子に関連を認めなかった。HCV 群では、高 BMI がインスリン面積高値と関連していたが、それ以外では、HCV 群で ALT や負荷後 2 時間 TG、HBV 群で LDL-C と肝の炎症や脂質代謝と関連した因子がインスリン抵抗性の独立因子として抽出された。

E. 結論

C 型慢性肝炎では、空腹時および負荷後のインスリン分泌が亢進しており、非 HBV 非 HCV 群と比較してインスリン抵抗性が有意に高い。C 型慢性肝炎と B 型慢性肝炎では脂質代謝が異なる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furusyo N. Kajiwara E. Takahashi K. Nomura H. Tanabe Y. Masumoto A. Maruyama T. Nakamuta M. Enjoji M. Azuma K. Shimono J. Sakai H. Shimoda S. Hayashi J. An association between the treatment length and cumulative dose of pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin and their effectiveness as a combination treatment for Japanese chronic hepatitis C patients: A project of the Kyushu University Liver Disease Study Group. J Gastroenterol Hepatol 2008;23:1094 - 1104

[総説]

- 1) 林純、古庄憲浩、村田昌之. 院内で問題となる微生物と感染症—ウイルス感染症— 薬剤師のための感染制御標準テキスト 2008;43 - 50
- 2) 林純、古庄憲浩、村田昌之、貝沼茂三郎、梶原英二. インターフェロン無効の C 型慢性肝炎に対する治療 学療法領域 2008;24(2):80 - 85
- 3) 林純、古庄憲浩、澤山泰典、村田昌之. 消化器病と動脈硬化症の病因としての感染症 福岡医学雑誌 2008;99(4):67 - 73
- 4) 林純、古庄憲浩、梶原英二、中牟田誠、野村秀幸、高橋和弘、丸山俊博、増本陽秀、田邊雄一、遠城寺宗近. C 型慢性肝炎に対するインターフェロン

療法 臨牀と研究 2008;85(7):56 - 62

- 5) 林 純、古庄憲浩. ウイルス感染症の現況と対策 HCV 臨牀と研究 2008;85(5):695 - 700
- 6) 林純、古庄憲浩、小川栄一. FibroScan の臨床的有用性について 臨牀と研究 2008;85(10):148 - 152
- 7) 林純. 性感染症としての肝炎 Medical ASAHI 2008;37(11):78 - 80

2. 学会発表

- 1) 古庄憲浩、村田昌之、大田黒 滋、貝沼茂三郎、小川栄一、草椰はる、永楽訓三、海野麻美、澤山泰典、林純. 慢性肝炎に対するペグインターフェロン (PEG-IFN)・リバビリン (RBV) 併用療法における初期ウイルス減衰について. 第 82 回日本感染症学会総会、松江、2008
- 2) 古庄憲浩、村田昌之、大田黒 滋、貝沼茂三郎、小川栄一、草椰はる、武岡宏明、豊田一弘、前田晋至、大西八郎、澤山泰典、野村秀幸、林純. C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン alpha-2b・リバビリン併用療法と耐糖能異常. 第 82 回日本感染症学会総会、松江、2008
- 3) 古庄憲浩、小川栄一、豊田一弘、武岡宏明、前田晋至、大西八郎、村田昌之、貝沼茂三郎、澤山泰典、林純. C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療における経時的インスリン抵抗性の推移. 第 82 回日本感染症学会総会、松江、2008
- 4) 古庄憲浩、小川栄一、林純. C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法における経時的非侵襲的肝線維化評価. 第 44 回日本肝臓学会総会 ワークショップ、松山、2008
- 5) 古庄憲浩、梶原英二、高橋和弘、野村秀幸、田邊雄一、増本陽秀、丸山俊博、中牟田 誠、遠城寺宗近、東 晃一、下野淳哉、酒井浩徳、下田慎治、林純. 65 歳以上の Genotype1 型高ウイルス量 C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン alpha-2b・リバビリン併用療法の臨床成績. 第 44 回日本肝臓学会総会、松山、2008
- 6) 吉本剛志、中牟田 誠、古庄憲浩、梶原英二、高橋和弘、野村秀幸、田邊雄一、増本陽秀、丸山俊博、遠城寺宗近、東 晃一、下野淳哉、酒井浩徳、下田慎治、林純. ALT 値 30 IU/mL 未満の Genotype1 型高ウイルス量 C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン alpha-2b・リバビリン併用療法の臨床成績. 第 44 回日本肝臓学会総会、松山、2008
- 7) 酒井健司、下田慎治、古庄憲浩、梶原英二、高橋和弘、野村秀幸、田邊雄一、増本陽秀、丸山俊博、中牟田 誠、遠城寺宗近、東 晃一、下野淳哉、酒井浩徳、林純. Genotype1 型高ウイルス量 C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン alpha-2b・リバビリン併用療法の規定総投与量による臨床成績.

- 第 44 回日本肝臓学会総会、松山、2008
- 8) 古庄憲浩、村田昌之、小川栄一、林純、C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン a2b・リバビリン併用療法と耐糖能異常。第 91 回日本消化器病学会九州支部例会 パネルディスカッション 2、福岡、2008
- 9) 多田靖哉、古庄憲浩、梶原英二、中牟田誠、野村秀幸、高橋和弘、丸山俊博、佐藤丈顕、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 a2b・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
- 10) 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 a・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

G. 知的所有権の取得状況

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

アンジオテンシン II による非脂肪組織における脂質含量の変化

研究分担者 石坂 信和 東京大学医学部附属病院 講師

研究要旨

われわれは、検診受診者のデータを解析し、慢性 C 型肝炎がインスリン抵抗性を増大する可能性があることに加え、早期動脈硬化病変や慢性腎臓病のリスクも増大していることを報告してきた。レニン・アンジオテンシン系 (RAS) の活性亢進状態は、インスリン抵抗性増大や心血管・腎の障害進展に働くことが知られていたが、近年、慢性肝炎や、NAFLD の肝障害の進展にも RAS の関与を示唆する知見が報告されている。そこで、われわれは、アンジオテンシン II による非脂肪細胞へのリポトキシシティ誘導について検討した。昇圧用量のアンジオテンシン II を SD ラットへ 7 日間持続投与したところ、腎尿細管、心筋などへの中性脂質を中心とした集積が誘導された。また、これらの臓器において、SREBP-1、脂肪酸合成酵素など脂質合成関連の遺伝子の発現が亢進しており、アンジオテンシン II が局所での脂質代謝調節に関与している可能性があると考えられた。また、心・腎においては、脂質集積部に一致したスーパーオキシドの過剰産生を認めた。一方、肝臓においては、アンジオテンシン II 投与は AT1 受容体依存性に脂質含量を低下していた。この現象は、脂質合成関連の遺伝子の発現低下や β 酸化関連遺伝子の発現亢進を伴わず、リポリシスの亢進や全身の代謝亢進による肝外性の要素に起因している可能性が示唆された。アンジオテンシン II の過剰状態では、カロリー制限状態と類似した非脂肪組織における脂質の再分布が生じていることが明らかになった。

A. 研究目的

われわれは、検診受診者のデータを解析し、慢性 C 型肝炎がインスリン抵抗性を増大し、早期動脈硬化病変や慢性腎臓病 (CKD: 糸球体ろ過率の低下、ミクロ/マクロアルブミン尿) のリスクを増大することを報告してきた。

レニン・アンジオテンシン系 (RAS) の活性化は、さまざまな疾患において、病態の増悪因子として働くことや CKD の促進に働く

ことが知られている。一方、慢性 C 型肝炎や非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) などの病態において、RAS の抑制が、肝機能障害の進展抑制にはたらくことが、近年報告されている。これらのことから、われわれは、慢性 C 型肝炎における臓器障害の発症に RAS の活性化が深く関与しているのではないかという着想を得た。

われわれは、以前、ラットへのアンジオテンシン II の持続投与が、心・腎において、

中性脂質の集積と同部位における酸化ストレスの亢進を惹起することを報告した。

以上の知見を踏まえて、今回われわれは、アンジオテンシン II の投与がラットの肝臓における脂質含量や、脂質代謝関連遺伝子の発現調節にどのような影響を与えるかについて検討した。

B. 研究方法

(1) アンジオテンシン II の投与

ラットの皮下に浸透圧ミニポンプを埋め込み、アンジオテンシン II を 0.7 mg/kg/日の用量で 7 日間持続投与した。

(2) 肝臓の脂質含量の検討

非固定凍結切片をオイルレッド O 染色し、脂質集積の局在を検討した。また、肝臓の脂質を抽出し、中性脂肪、総コレステロール、遊離コレステロールについて E テスト WAKO を用いて測定した。

(3) 脂質代謝関連遺伝子の発現の検討

Roche LightCycler を用いた定量 PCR による mRNA 定量、Western ブロット法による蛋白定量を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では動物モデルを用いた検討である。東京大学医学部動物実験施設により認可されたプロトコールにより動物に対し、愛護的な配慮を行い実験を遂行した。

C. 研究結果

(1) 血圧および血中脂質濃度

アンジオテンシン II 投与は、中性脂肪、遊離脂肪酸の血中濃度を上昇した。この上昇は、AT1 受容体拮抗薬のロサルタンにより抑制されたが、単純な血管拡張薬である

ハイドララジンでは抑制されなかった。また、アンジオテンシン II は、AT1 受容体特異的に体重減少を惹起した(表 1)。

	コントロール (n=6)	アンジオテンシン II (n=8)	アンジオテンシン II +ハイドララジン (n=5)	アンジオテンシン II +ロサルタン (n=5)	アンジオテンシン II +ロサルタン (n=4)
体重 [g]	323±12	255±51	231±101	316±4	300±17
収縮期血圧 [mmHg]	131±3	192±41	126±3	126±2	189±31
総コレステロール [mg/dL]	44.2±2.2	44.2±4.4	48.0±12.6	39.3±8.0	42.2±4.3
中性脂肪 [mg/dL]	20.4±1.5	28.0±3.6*	27.0±3.3†	21.3±2.7	15.5±3.4
遊離脂肪酸 [mEq/L]	34.7±4.4	52.5±24.1	75.3±58.1	41.9±5.5	38.6±6.3

表 1. 各群の血中脂質濃度、体重、血圧

(2) 脂質(オイルレッド O)染色

Overnight の絶食後、非固定凍結切片に対して、オイルレッド O 染色を施行した。コントロールラットの肝臓においては、オイルレッド O 陽性の脂質の集積が、少ないながら認められた。一方、アンジオテンシン II 投与ラットの肝臓においては、オイルレッド O 陽性の脂肪 droplet をほとんど認めなかった(図 1)。アンジオテンシン II による脂質 droplet の減少は、ハイドララジンでは抑制されず、ロサルタンで抑制された。アンジオテンシン II の投与は、心臓、腎臓においては、これらのパターンとは逆に、ロサルタンでのみ抑制される脂質集積を誘導した(data not shown)。

(3) 肝臓組織の脂質含量測定

アンジオテンシン II 投与ラットの肝臓では、組織中の中性脂肪含量が低下していた。これもハイドララジンでは抑制されず、ロサルタンで抑制された(図 1)。ノルエピネフリン投与による高血圧ラットでは、肝臓の中性脂肪含量は $11.7 \pm 2.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ (n=7) であり、コントロールラットの肝臓脂質量との間に有意な差を認めなかった。

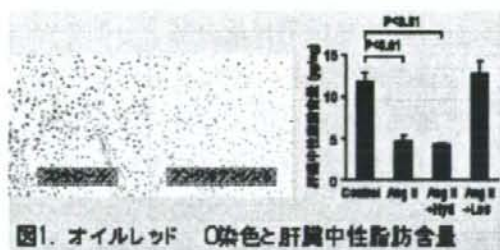


図1. オイルレッド O染色と肝臓中性脂肪含量

(4) 肝臓における脂質関連遺伝子の発現検討 (図2)

RT-PCRによる検討では、アンジオテンシン II は脂質合成に関与する遺伝子 (SREBP-1、脂肪酸合成酵素 [fatty acid synthase, FAS]、HMG-CoA還元酵素) の発現に有意な変化を与えなかった。また、 β 酸化に関与する遺伝子では、acyl-CoA oxidase [ACO]、uncoupling protein [UCP]2 の発現を有意に変化させず、また、carnitine palmitoyltransferase [CPT]1、PPAR- α の発現を低下させていた。

(5) アンジオテンシン II は AMP-activated protein kinase の蛋白発現、活性をいずれも抑制しており、この現象は、ロサルタンで完全に抑制されたが、ヒドララジンでの抑制は部分的であった。

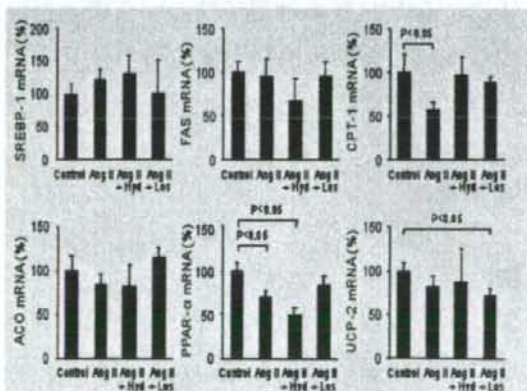


図2. RT-PCRによる脂質代謝関連遺伝子の発現調節の検討

D. 考察

RAS の抑制が、慢性 C 型肝炎や NAFLD の肝機能障害の進展に抑制的に働くこと、AT 1 受容体拮抗薬が、NAFLD の肝機能障害の進展や、肝臓の steatosis そのものを改善する可能性ことなどが近年の研究であきらかにされてきた (Yamamoto E. Hypertension. 2008 Sep;52(3):573-80)。これらの知見は、RAS の活性化が、慢性 C 型肝炎や NAFLD の病態形成、臓器障害の発生に関与している可能性を示唆している。今回の検討では、われわれは、アンジオテンシン II 投与が肝臓の脂質含量に対してどのような影響を与えるかという点について焦点を絞り検討を進めてきた。

アンジオテンシン II は、肝臓におけるオイルレッド O 陽性の脂質滴を減少し、また、中性脂肪などの脂質含量を減少していた。一方で、アンジオテンシン II は、肝脂質減少を説明するような遺伝子発現の変化 (脂質合成系の減少や、 β 酸化関連遺伝子の発現亢進) は誘導していなかった。これらのことは、アンジオテンシン II 投与による肝臓脂質含量の低下は、肝臓の脂質関連遺伝子の発現調節による直接的なものではない可能性を示唆している。

われわれの以前、アンジオテンシン II 投与が、腎臓、心臓への脂質集積を誘導することを発見した (Saito K, Ishizaka N. Hypertension 2005; Ishizaka N. Lab Invest, 2006; (Hongo M, Ishizaka N. Eur J Pharmacol, 2009)。今回アンジオテンシン II の投与がむしろ肝臓の脂質含量を減少する、という結果が本研究から得られたことは、むしろ想定外であった。これらの

ことは、RAS の活性化が、すべての組織に同等に脂質集積する方向に働くのではないことを示している。他方、AT1 受容体の抑制が、脂肪肝抑制に働くという報告もあるが、それらの報告では、糖尿病などで、「内因性の」RAS 活性が亢進していることが、肝臓脂肪の増加に関与していることを主張している。今回の検討では、過剰量の「外因性の」アンジオテンシン II を投与していることには注意すべきである。すなわち、今回の検討では、アンジオテンシン II 投与により体重減少をともなう血圧・脈拍数の上昇が生じているが、報告されている脂肪肝モデルに AT1 受容体を用いた検討では、逆の反応、すなわち、体重増加や、血圧低下などの出現は認められていない。すなわち、アンジオテンシン II-AT1 受容体系の活性化は、内因性のレベルにとどまるときには、肝臓の脂質を増加する方向で、また、本検討で用いたような過剰状態においては、肝臓の脂質を減少する方向で働く可能性がある、とすると理解できる。ただし、過剰量といっても、アンジオテンシン II 投与は、血清のアンジオテンシン II を約3倍にしか上昇してない (Ishizaka N. J Biol Chem. 1997 Dec 19;272(51):32482-8)。

過剰量の外因性のアンジオテンシン II が肝臓の脂質含量を減少した原因が、直接の遺伝子発現調節でないとする、その原因は何であろうか。この点については、いくつかの可能性があると考えている。第一には、アンジオテンシン II が代謝の亢進や交感神経系の活性化につながり、体重減少が生じ、それに引き続き肝臓脂肪量を減少した可能性がある。第二には、アンジオテ

ンシン II 投与が摂食量を減少したことによる体重の減少から、やはり肝脂肪を減少した可能性がある。第三には、アンジオテンシン II がリポライシスを惹起した可能性、などである。類似の現象は、カロリー制限モデルなどでも報告されていることから、アンジオテンシン II による体重の減少そのものが脂質の re-distribution の背景にある可能性がある。

以上から、アンジオテンシン II-AT1 受容体経路の肝臓脂肪に与える影響には、その刺激量に応じた二面性がある可能性があることが示唆された。Wei らは、レニン遺伝子を導入したラットにおいて、脂肪肝が認められること、この現象が AT1 受容体拮抗薬で抑制されることを報告している (Wei. Journal of Hepatology 49 (2008) 417-428)。このことは、外因性の RAS 活性化でも、脂肪肝促進 (Wei ら) にも肝脂肪現象 (今回の検討) にも働く可能性を示唆している。アンジオテンシン II の作用の二面性のカットオフポイントは単に、血清濃度に依存した問題ではなく、個々の病態に依存した問題であるのかもしれない。この点は、AT1 受容体による NAFLD の進展予防という概念を捉える上でも更なる検討を要するポイントであると考えられる。

E. 結論

アンジオテンシン II の投与は、ラット肝臓において、中性脂肪含量を低下した。アンジオテンシン II 投与が心、腎においては逆に脂質含量を増加していたことから、アンジオテンシン II が、(非脂肪細胞における) 脂質分布を re-distribution させてい

ると考えられた。

アンジオテンシン II は、肝臓における脂質合成関連遺伝子の発現は低下せず、また、 β 酸化関連遺伝子の発現も亢進しない。以上から、アンジオテンシン II による肝臓脂質含量の低下は、摂食量の低下やリポリシスなどによるセカンダリーな現象であることが示唆された。また、このような re-distribution は、カロリー制限時などでも認められるパターンと類似することから、過剰量のアンジオテンシン II が、体重減少を誘導し、その結果、肝臓の脂質含量も減少させた可能性が考えられた。

なお、本検討の結果から、ACE 阻害薬や AT1 受容体拮抗薬が、内因性の RAS を抑制した場合、肝臓の脂質量を増加する可能性がある、という結論には、直接つながらない、という点に関しては注意が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Daiju Fukuda, Masataka Sata, Nobukazu Ishizaka, Ryozo Nagai. Critical role of bone marrow angiotensin II type 1 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(1):90-96.
- 2) Nobukazu Ishizaka, Yuko Ishizaka, Ei-Ichi Toda, Kazuhiko Koike, Minoru Yamakado, Ryozo Nagai. Are serum carcinoembryonic antigen levels associated with carotid atherosclerosis in Japanese men? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(1):160-165.
- 3) Yasutomi Higashikuni, Nobukazu Ishizaka, Yuko Ishizaka, Ei-ichi Toda, Ryozo Nagai, Minoru Yamakado. Relationship between blood pressure and chronic kidney disease in the Japanese population: The lower the better even in individuals without hypertension? *Hypertension Res* 2008; 31(2):213-219.
- 4) Nobukazu Ishizaka, Yuko Ishizaka, Ei-Ichi Toda, Hiroji Shimomura, Kazuhiko Koike, George Seki, Ryozo Nagai, Minoru Yamakado. Association between cigarette smoking with chronic kidney disease in Japanese men. *Hypertension Res* 2008; 31(3): 485-492.
- 5) Nobukazu Ishizaka, Yuko Ishizaka, George Seki, Ryozo Nagai, Minoru Yamakado, Kazuhiko Koike. Association between hepatitis B/C viral infection, chronic kidney disease and insulin resistance in individuals undergoing general health screening. *Hepatology Research* 2008; 38(8):775-783.
- 6) Yuko Ishizaka, Nobukazu Ishizaka, Mizuki Tani, Akiko Toda, Ei-ichi Toda, Kazuhiko Koike, Minoru Yamakado. Relationship between albuminuria, low eGFR, and carotid atherosclerosis in Japanese women. *Kidney Blood Press Res* 2008; 31(3):164-170.
- 7) Gen Matsuzaki, Nobukazu Ishizaka, Kyoko Furuta, Makiko Hongo, Kan Saito,

- Ryota Sakurai, Kazuhiko Koike, and Ryozo Nagai. Comparison of vasculoprotective effects of benidipine and losartan in a rat model of metabolic syndrome. *Eur J Pharmacol* 2008; 587(1-3):237-242.
- 8) Nobukazu Ishizaka, Yuko Ishizaka, Minoru Yamakado, Eiichi Toda, Kazuhiko Koike, Ryozo Nagai. Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose tolerance test. *Atherosclerosis* 2008 in press.
- 9) George Seki, Hideomi Yamada, Yuehong Lia, Shoko Horita, Nobukazu Ishizaka, Kazuhiko Koike, Toshiro Fujita. Roles of MEK/ERK pathway in vascular and renal tubular actions of angiotensin II. *Vascular Disease Prevention* 2008 in press.
- 10) Makiko Hongo, Nobukazu Ishizaka, Kyoko Furuta, Naoya Yahagi, Kan Saito, Ryota Sakurai, Gen Matsuzaki, Ryozo Nagai. Administration of angiotensin II, but not catecholamines, induces accumulation of lipids in the rat heart. *Eur J Pharmacol* 2009; 604(1-3):87-92.
- 11) Yuko Ishizaka, Nobukazu Ishizaka, Mizuki Tani, Akiko Toda, Ei-Ichi Toda, Kazuo Koike, Ryozo Nagai, Minoru Yamakado. Association between changes in obesity parameters and incidence of chronic kidney disease in Japanese individuals. *Kidney Blood Press Res* 2009 in press.
2. 学会発表
- 1) Nobukazu Ishizaka. Angiotensin II induces cardiac lipid accumulation and regulates expression of lipid metabolism-related genes. 22nd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Berlin, Germany, 2008.
- 2) 石坂信和. アンジオテンシンIIによる臓器への鉄集積および鉄輸送関連蛋白の調節. 日本薬学会第128年会、横浜、2008.
- 3) Nobukazu Ishizaka, Yuko Ishizaka, Ei-ichi Toda, Ryozo Nagai, Minoru Yamakado. Cardiac lipid accumulation in the rat model of angiotensin II-infusion. 第72回日本循環器学会総会・学術集会、福岡、2008.
- 4) Nobukazu Ishizaka, Yuko Ishizaka, Ei-ichi Toda, Ryozo Nagai, Minoru Yamakado. Is metabolic syndrome a risk factor for carotid atherosclerosis in individuals with normal fasting glucose. 第72回日本循環器学会総会・学術集会、福岡、2008.
- 5) Yuko Ishizaka, Nobukazu Ishizaka, Ei-ichi Toda, Ryozo Nagai, Minoru Yamakado. Does risk factor properties of serum uric acid for carotid atherosclerosis differ according to the status of chronic kidney disease? 第72回日本循環器学会総会・学術集会、福岡、2008.
- 6) 石坂裕子、山門実、石坂信和、永井良

- 三. Albuminuria and decreased eGFR are associated positively and negatively, respectively, with carotid atherosclerosis in Japanese women. 第72回日本循環器学会総会・学術集会、福岡、2008.
- 7) 石坂信和、石坂裕子、山門 実、永井良三. 高血圧・糖代謝障害が存在しない、または軽度な場合のメタボリックシンドロームと頸動脈硬化病変. 第56回日本心臓病学会学術集会、東京、2008.
- 8) 石坂裕子、谷 瑞希、戸田晶子、石坂信和、山門 実. BMI、腹囲の変化が慢性腎臓病の出現・解消にあたる影響についての検討. 第56回日本心臓病学会学術集会、東京、2008.
- 9) 本郷真紀子、石坂信和、齋藤幹、松崎弦、永井良三. アンジオテンシンII投与ラットの心臓におけるリポトキシティ. 第56回日本心臓病学会学術集会、東京、2008.
- 10) Nobukazu Ishizaka, Yuko Ishizaka, Ryozo Nagai, Minoru Yamakado. Are annual changes in BMI or waist circumference associated with annual changes in blood pressure in Japanese individuals? 第31回日本高血圧学会、札幌、2008.
- 11) 本郷真紀子、石坂信和、齋藤幹、古田恭子、松崎弦、桜井良太、永井良三. PPARアゴニスト投与がアンジオテンシンII投与ラット腎への脂質集積に与える影響の検討. 第31回日本高血圧学会、札幌、2008.
- 12) 松崎弦、石坂信和、齋藤幹、本郷真紀子、桜井良太、永井良三. 糖尿病動物モデルの血管障害におけるカルシウム拮抗薬とアンジオテンシンII受容体拮抗薬の効果の比較. 第31回日本高血圧学会、札幌、2008.
- 13) 本郷真紀子、石坂信和、齋藤幹、古田恭子、松崎弦、桜井良太、永井良三. アンジオテンシンII投与ラットの心臓における脂質集積とその生理的意義. 第31回日本高血圧学会、札幌、2008.
- 14) 石坂信和、本郷真紀子、齋藤幹、松崎弦、桜井良太、永井良三. 2型糖尿病ラットにおけるカルシウム拮抗薬とアンジオテンシンII受容体拮抗薬の血管内皮保護作用の比較. 第49回日本脈管学会総会、東京、2008.
- 15) 本郷真紀子、石坂信和、齋藤幹、松崎弦、桜井良太、永井良三. アンジオテンシンIIによる血管障害への鉄キレーター治療の可能性についての検討. 第49回日本脈管学会総会、東京、2008.
- 16) 本郷真紀子、石坂信和、齋藤幹、古田恭子、松崎弦、桜井良太、永井良三. アンジオテンシンIIによる腎・心への脂質集積. 第9回アンジオテンシン研究会、東京、2008. (本研究の一部を報告した)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
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

HCVコア蛋白質の成熟機構とその生物学的意義

研究分担者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)のコア蛋白質は、宿主のシグナルペプチダーゼによって前駆体蛋白質から切り出され、そのシグナル配列がシグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)によって切断されて成熟する。しかしながら、ヒト細胞内での正確な切断部位や、粒子形成におけるSPPによる切断の役割は明らかにされていない。そこで、コア蛋白質の細胞内局在とウイルス増殖におけるSPPによる切断の生物学的意義を解析した。成熟コア蛋白質は界面活性剤耐性膜画分(DRM)にも検出されたが、SPPに耐性を示す変異コア蛋白質はDRMには存在しなかった。また、同様の変異を導入したHCVのJFH1株では、ウイルスの放出量が顕著に減少したことから、SPPによるコア蛋白質のプロセッシングは、HCVの粒子形成に重要な役割を演じていることが示された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)に感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には2百万人ものHCV感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。近年、特定のクローン(JFH-1株)を用いたHCVの増殖系が確立されたものの、未だHCVの感染機構の詳細は明らかにされていない。HCVのコア蛋白質を発現するトランスジェニックマウスは、インスリン抵抗性や脂肪肝を経て肝細胞癌を発症する。コア蛋白質はウイルス粒子の構成因子であるが、一部は核やミトコンドリアへ移行する。これまでに我々は、HCVの病原性発現におけるコア蛋白質の核移行の重要性を明らかにしてきた。本研究では、HCVコア蛋白質の成熟機構と病原性発現の関連を解析する。

B. 研究方法

293T細胞で発現させたFLAGタグをN末端に付加した全長コア蛋白質(1-191アミノ酸残基)を、抗FLAG抗体で免疫沈降した。

SDS-PAGEで分離したコア蛋白質をAsp-Nプロテアーゼによってゲル内消化し、ペプチド断片をMALDI-TOF MS/MSで分析した。コア蛋白質発現細胞を1% TritonX-100存在あるいは非存在下で破碎した後、超遠心による分画を行い、コア蛋白質のDRM局在を解析した。このとき、SPPによる切断の影響を、SPP阻害剤(L685458)の添加、SPP切断耐性変異体、あるいは、SPPドミナントネガティブ体の発現により解析した。さらに、SPP阻害剤添加時のJFH-1株の増殖性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報等を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

成熟型コア蛋白質のC末端はPhe177であり、さらに、Ile176とPhe177に変異を導入したコア蛋白質がSPP切断に耐性であることから、ヒト由来細胞でのSPPによるコア蛋白質の切断部位はPhe177/Leu178であることが支持された。成熟型コア蛋白質はDRMにも検出されたが、SPPに耐性を示す変異コア蛋白質はDRMには検出されなかった。また、SPP阻害剤処理やSPPドミナントネガティブ体の発現により、コア蛋白質の切断が阻害されDRMへの局在も消失した。さらにJFH-1株感染細胞をSPP阻害剤で処理すると、細胞内ウイルスのRNA量に比べて、培養上清へ放出されるウイルスRNA量の顕著な減少が認められた。

D. 考察

SPPによるHCVコア蛋白質のプロセッシングは、コア蛋白質のDRMへの局在に重要な役割を演じており、ウイルス粒子の集合にも関与している可能性が示唆された。HCVのプロテアーゼやポリメラーゼを標的とした抗ウイルス剤が開発され、臨床試験が進行中であるが、ウイルスの酵素を標的とした薬剤に対しては耐性株の出現が大きな問題となっている。従って、宿主因子との相互作用を標的とした抗HCV剤の開発が今後の重要な課題である。SPPも慢性C型肝炎の有望な創薬ターゲットの一つであると考えられる。

E. 結論

- 1 HCV コア蛋白質の SPP によるプロセッシングの生物学的意義を解析した。
- 2 成熟コア蛋白質は DRM にも検出されたが、SPP に耐性を示す変異コア蛋白質は DRM には存在しなかった。
- 3 同様の変異を導入した HCV の JFH1 株では、ウイルスの放出量が顕著に減少した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 2008;82:8349-8361.
- 2) Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J. Virol.* 2008;82:7964-7976.
- 3) Aizaki H., Morikawa K., Fukasawa M., Hara H., Inoue Y., Tani H., Saito K., Hanada K., Matsuura Y., Lai M.M.C., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 2008;82:5715-5724.
- 4) Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol.* 2008;82:3480-3489.
- 5) Tagawa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.*

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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。
- 3) 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。
- 4) 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。
- 5) Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Proteasome activator PA28g is required for efficient growth of hepatitis C virus. 同上。
- 6) 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。
- 7) 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。
- 8) 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 3.5 Å 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。
- 9) 田鍬修平、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 のコシャペロン活性、同上。
- 10) 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 PA28γ の役割、同上。
- 11) 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。
- 12) 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。
- 13) 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。
- 14) 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。
- 15) 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。
- 16) 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。
- 17) 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。

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

C型肝炎と鉄代謝に関する研究

研究分担者 森屋 恭爾 東京大学医学部附属病院感染制御部 講師

研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）感染患者は、約180万人に上ると言われており、今や本邦においては社会問題となり国を挙げて肝炎の撲滅、感染者対策を行っている。慢性C型肝炎患者においては肝病変だけでなく、インスリン抵抗性、脂質代謝異常も認められることが報告されている。またこのトランスジェニックマウスにおいては、肝臓内の酸化ストレスの増加（Moriya et al. *Cancer Res* 2001）が生じていることもわかっている。今回肝炎にみられる血清鉄増加状況をマウス腹腔内鉄投与により惹起したところ、鉄存在時に誘導される抗酸化系酵素である、ヘムオキシゲナーゼ1（HO-1）がHCV core蛋白存在下では発現阻害され酸化ストレス増加が認められることを確認した。すなわちHCVは酸化ストレス産生を増加させるだけでなく、抗酸化系を阻害し、酸化ストレスをより悪化させることが明らかになった。この誘導阻害を薬剤により解除することによりはインターフェロン治療困難な高齢者において有用な肝硬変進展、発癌阻止をもたらす可能性が高い。

A. 研究目的

C型肝炎においては高率に肝硬変に移行し、肝細胞癌の発生を見る。インターフェロン、リバビリン併用によってウイルス排除が見られるようになったが、高齢、副作用によって抗ウイルス療法の恩恵を受けられない患者も多い。多くの日本の高齢肝炎患者において肝硬変、肝発癌の遅延をもたらす病態の解明と薬剤の開発は急務である。

ウイルス蛋白によって肝臓の脂肪化に代表される脂質代謝異常（Moriya et al. *J Gen Virol* 1997）、インスリン抵抗性（Shintani et al. *Gastroenterology* 2004）、酸化ストレ

ス増加が直接惹起され（Moriya et al. *Cancer Res* 2001）最終的に肝発癌を見ること（Moriya et al. *Nat Med* 1998）を我々はHCV core遺伝子発現トランスジェニックマウスにおいて示してきた。

HCV core遺伝子発現トランスジェニックマウスにおいては抗酸化系が亢進されることを既に示してきた（Moriya et al. *Cancer Res* 2001）。酸化ストレスはヘムタンパク質からヘムを遊離させ、活性酸素生成を促進して細胞傷害を悪化させるが、抗酸化系としてヘム分解の律速酵素：Heme Oxygenase-1（HO-1）が細胞内に誘導され細胞保護機能を有する。鉄含有量