

でHNF-1 α mRNAの特異的な低下が示唆された。

3) GLUT2プロモーター抑制にいずれのHCV蛋白質が関与しているか明らかにするために、GLUT2プロモーター活性測定を行った。HCV蛋白質core、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5Bをそれぞれ共発現させたときのGLUT2プロモーター活性を測定したところ、NS5Aの発現ではGLUT2プロモーター活性が著しく抑制された。一方、core、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5Bではcontrolと比べてプロモーター活性が変化なし、あるいは上昇した。

4) NS5AとHNF-1 α の相互作用を解析するために、免疫沈降法にて解析した。抗HNF-1 α 抗体で免疫沈降後に抗NS5A抗体でWestern blottingを行うと、NS5Aに一致するシグナルが得られ、HNF-1 α とNS5Aが会合することが示された。

D. 考察

今回の研究から、Huh7.5細胞にHCVを感染させると、HNF-1 α mRNA発現量とHNF-1 α 蛋白質量の低下がみられた。このことからHCV感染によってHNF-1 α の発現が低下することがGLUT2の発現低下をもたらしている可能性が示された。しかしmRNAの低下に比べ、蛋白質量低下の程度の方が強かったため、蛋白分解系について調べたところ、ライソソーム系による分解が関与しており、特にアスパラギン酸プロテアーゼの関与が示唆された。

NS5A共発現下にGLUT2の活性化の低下がみられたこと、NS5AとHNF-1 α に相互作用がみられたことなどから、HCV蛋白質の中でNS5AがHNF-1 α を介して、GLUT2の発現抑制に関与していることが示唆された。

HNF-1 α は薬物トランスポーターを含む多くの肝臓特異的遺伝子の転写を正に制御し、homodimerあるいはHNF-1 β とheterodimerを形成して転写調節をする因子で、膵 β 細胞においてGLUT2の転写を制御して、グルコースの取り込みを調節している。興味深いことに、HNF-1 α の遺伝子変異が常染色体優性遺伝による糖尿病のMaturity-onset diabetes of the young (MODY3)の原因であることが明らかにされており、HNF-1 α の遺伝子変異と膵 β 細胞でのGLUT2転写抑制、それに伴うインスリン分泌不全が病気の本態と考えられている。本研究ではHCV感染が膵細胞のHNF-1 α の転写抑制に関与していること、またはHNF-1 α 蛋白質の分解を促進することでGLUT2転写抑制を引き起こす可能性が示された。NS5AとHNF-1 α の相互作用とライソソーム分解系の関係についてはまだ明らかでないので、次年度に解明していく必要がある。

E. 結論

HCV J6/JFH1 感染細胞においてHNF-1 α の蛋白発現の減少によってGLUT2転写抑制が引き起こされると考えられた。この際ライソソーム分解系の関与が示唆された。また、HCV NS5A蛋白質がGLUT2プロモーター活性を抑制することが示された。今後、HCV NS5A蛋白質とHNF-1 α の相互作用とライソソーム依存性分解誘導の機序を明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) El-Shamy, A., Ide, Y-H., Kim, SR., Sasase, N., Imoto, S., Deng, L., Shoji, I.

- and Hotta, H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin therapy. *Intervirology*, in press.
- 2) Inoue, Y., Aizaki, H., Hara, H., Matsuda, M., Ando, T., Shimoji, T., Murakami, K., Masaki, T., Shoji, I., Homma, S., Matsuura, Y., Miyamura, T., Lai, MMC, Wakita, T., and Suzuki, T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology*, 2010, 410, 38-47.
 - 3) Hayashida K, Shoji, I., Deng, L., Ide, Y-H., and Hotta, H. 17 β -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology*, 2010, 54, 684-90.
 - 4) Nasu, J., Murakami, K., Miyagawa, S., Yamashita, R., Ichimura, T., Wakita, T., Hotta, H., Miyamura, T., Suzuki, T., Satoh, T., and Shoji, I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010, 111, 676-85.
 - 5) Kim SR., Imoto S., Kudo M., Nakajima T., Ando K., Mita K., Fukuda K., Hong HS., Lee YH., Nakashima K., Shoji I., Nagano-Fujii M., Hotta H., and Hayashi Y. Autoimmune thrombocytopenic purpura during pegylated Interferon α treatment for chronic hepatitis C. *Internal Medicine*, 2010, 49, 1119-1122.
 - 6) Moriishi K., Shoji, I., Mori, Y., Suzuki, R., Suzuki, T., Kataoka, C., and Matsuura, Y. Involvement of PA28 γ in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology*, 2010, 52 411-420.
 - 7) Sanjo M., Saito, T., Ishii, R., Nishise, Y., Haga, H., Okumoto, K., Ito, J., Watanabe, H., Saito, K., Togashi, H., Fukuda, K., Imai, Y., El-Shamy, A., Deng, L., Shoji, I., Hak, H., and Kawata, S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Journal of Medical Virology*, 82, 1364-70, 2010.
 - 8) Sasayama, M., Deng, L., Kim, SR., Ide Y-H., Shoji, I., and Hotta, H. Analysis of neutralizing antibodies against hepatitis C virus in patients who were treated with peglated-Interferon plus ribavirin. *Kobe Journal of Medical Sciences*, 56, E60-E66, 2010.
 - 9) Kim, SR., Imoto, S., Kudo, M., Mita, K., Taniguchi, M., Kim, KI., Sasase, N., Shoji, I., Nagano, M., El-Shamy, A., Hotta, H., Nagai, T., Nagata, Y., and Hayashi, Y. Double filtration plasmapheresis plus interferon treatment for non-sustained virological response to previous combination therapy: Early viral dynamics. *Intervirology*, 53, 44-48, 2010.
 - 10) Sasase, N., Kim, SR., Kudo, M., Kim, KI., Taniguchi, M., Imoto, S., Mita, K., Hayashi, Y., Shoji, I., El-Shamy, A., and Hotta, H. Outcome and early viral

dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 53, 49-54, 2010.

2. 学会発表

- 1) Shoji I, Kaneda S, Deng L, Ide Y-H, Hotta H. Molecular mechanism of HCV-induced suppression of glucose transporter (GLUT) 2 expression. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses. Sep 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
- 2) El-Shamy A, Kim SR, Ide Y, Deng L, Shoji I, Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, 2010. Yokohama.
- 3) Deng L, Ide Y-H, Shoji I, Hotta H. HCV-induced generation of reactive oxygen species leads to Bax-mediated apoptosis through activation of the c-Jun NH₂-terminal kinase signaling pathway. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses. Sep 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
- 4) Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Ide Y-H, Deng L, Hotta H. Identification of an amino acid residue that determines sensitivity to virus neutralization by nonspecific inhibitors and specific neutralizing antibodies in human sera. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses. Sep 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
- 5) Hotta H, El-Shamy A, Kim SR, Imoto S, Aoki C, Ide Y, Shoji I. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 2010, Vienna.
- 6) Shoji I, Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Ide Y-H, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. 第33回日本分子生物学会、Dec 7-10. 2010 神戸.
- 7) 岡田典子、勝二郁夫、甘翔、Lin Deng、姜大鵬、井出良浩、堀田博. C型肝炎ウイルス NS5A に結合するユビキチンリガーゼの同定. 第33回日本分子生物学会、Dec 7-10. 2010. 神戸.
- 8) Deng Lin, 兼田崇作、井出良浩、勝二郁夫、堀田博. C型肝炎ウイルス感染は転写因子 FoxO1 を介した糖新生を誘導する. 第63回日本細菌学会関西支部総会、Nov 20、2010. 大阪.
- 9) 勝二郁夫、Lin Deng、堀田博. HCVによる糖代謝障害の分子機序 日本ウイルス学会学術集会 シンポジウム Nov 7-9, 2010. 徳島
- 10) 堀田博、井出良浩、勝二郁夫. C型肝炎ウイルス感染は糖新生系を亢進し、糖尿病発症に関与する. 第46回日本

肝臓学会総会, May 27-28, 2010. 山形.

- 11) 堀田博, El-Shamy Ahmed, 金守良, 井本勉, 金啓二, 谷口美幸, 井出良浩, 勝二郁夫. 慢性 C 型肝炎に対する PEG-IFN/RBV 治療効果に及ぼすウイルス側因子のさらなる検討 HCV-2a 及び HCV-2b の NS5A 多様性は治療効果と相関する. 第 46 回日本肝臓学会総会, May 27-28, 2010. 山形.
- 12) 金守良, 井本勉, 堀田博, 三田敬二, 前川陽子, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 井出良弘. 1b 型高ウイルス C 型肝炎の PEG-IFN+リバビリン併用療法(併用療法)無効例に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)+IFN-β4 週間連続投与の試み. 第 46 回日本肝臓学会総会, May 27-28, 2010. 山形.
- 13) El-Shamy Ahmed, 金守良, 井出良浩, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. HCV genotype 2a および 2b の NS5A 多様性はペグインターフェロン/リバビリン併用療法の治療効果と相関する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010. 徳島.
- 14) 瀬尾靖, 三木章, 矢野嘉彦, 勝二郁夫, 堀田博, 東健. C 型肝炎に対する PEG-IFNα-2a/RBV 併用療法の早期治療効果に関与する因子の検討. 第 14 回日本肝臓学会大会, Oct 13-14, 2010. 横浜.
- 15) 井本勉, 金守良, 堀田博, 三田敬二, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 井出良浩, 前川陽子. C 型肝炎 1b

型高ウイルス量併用療法無効患者に対する二重濾過血漿交換療法

(DFPP)+IFNβ2 ~ 4 週連続投与後 PEG-IFNα-2a+RBV 併用療法の早期ウイルスダイナミクスによる EVR 予測. 第 14 回日本肝臓学会大会, Oct 13-14, 2010. 横浜.

- 16) 進藤道子, El-Shamy Ahmed, 森川輝久, 原野雄一, 中島知明, 勝二郁夫, 奥野忠雄, 堀田博. C 型肝炎から肝癌発生まで経時的観察が可能であった症例におけるウイルス遺伝子多様性の解析. 第 14 回日本肝臓学会大会, Oct 13-14, 2010. 横浜.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究分担報告書

C型肝炎ウイルス増殖と脂質の相互作用の検討

研究分担者 相崎 英樹 国立感染症研究所 室長

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)感染による肝脂肪化の原因のひとつとして、超低比重リポ蛋白(VLDL)分泌低下が報告されている。一方、VLDLはHCVの感染性に必須と報告されており、これらの矛盾点を解明するためHCV感染に伴う肝細胞の脂肪化の分子メカニズムについて、生体での脂質輸送の中心を担っているリポ蛋白に注目し解析した。HCV感染後、培養上清中のVLDLが増加し、低比重リポ蛋白(LDL)が低下することを見出し、その原因としてHCV感染細胞でのVLDL分解酵素であるHepatic lipaseの発現低下を見出した。さらに、HCV感染に伴う細胞内代謝の変化を理解するため、代謝物質の網羅的解析(メタボロミクス)を行った。HCV感染により、TCA回路、プリン・ピリミジン合成系など蛋白核酸合成等は低下し、ATP、GTP、phosphocreatine等のエネルギー供与体は減少し、一方解糖系は著明に亢進していた。蛋白核酸合成の低下はウイルス感染に伴う「シャットオフ」現象の可能性があり、ウイルス増殖にエネルギーが消費され、解糖系を亢進させてエネルギー産生を行うというウイルス感染の急性期状態を示している可能性が考えられた。今後、代謝酵素群のmRNA、蛋白レベルの変化、関与するHCV因子の同定、メカニズムの解明等を目指す。

A. 研究目的

近年、HCV感染が単なる肝炎だけでなくインスリン抵抗性や脂肪肝などの代謝異常も引き起こしていることが明らかになってきており、HCV感染による肝脂肪化の原因のひとつとして、VLDL分泌低下が報告されている(Perlemuter et al., FASEB J 2002)。一方、VLDLはHCVの感染性に必須と報告されており(Huang et al., Proc Natl Acad Sci USA 2007)、これらの矛盾点を解明するためHCV感染に伴う肝細胞の脂肪化

の分子メカニズムについて解析した。HCV感染増殖が宿主細胞の脂質代謝に与える影響を調べるために、生体での脂質輸送の中心を担っているリポ蛋白に注目し解析を行った。

さらに、HCV感染に伴う細胞内代謝の変化を理解するため、遺伝子の網羅的解析(ゲノミクス)やタンパク質の網羅的解析(プロテオミクス)に比べて、ホメロスターシスの影響を受けにくく、表現型に最も近い表現型での変化が観察しやすい代

謝物質の網羅的解析（メタボロミクス）を行った。

B. 研究方法

（１）HCV 感染が宿主細胞のリポ蛋白代謝に与える影響

Huh7 細胞に JFH1 由来 HCV を感染させ、経時的に培養上清、細胞を回収し、含まれるウイルスコアタンパク量および脂質の量を測定した。培養上清をゲル濾過 HPLC 分画し、各分画に含まれる脂質の解析を行った。

（２）HCV 感染が宿主細胞の代謝に与える影響のメタボロミクス解析

HCV 感染細胞と非感染細胞で約 900 の代謝産物について、キャピラリー電気泳動法と質量分析法で定量的に測定し、HCV 感染に伴う細胞の代謝変化について解析した。

（倫理面の配慮）

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は国立感染症研究所内のバイオリスク管理委員会、組換えDNA実験委員会等の承認を受けて行った。

C. 研究結果

（１）HCV 感染が宿主細胞のリポ蛋白代謝に与える影響

Huh7 細胞に HCV を感染させると、細胞内総コレステロール TC、中性脂肪 TG、リン脂質 PL 等の増加を認め、一方培養上清中の TC、TG、PL は時間経過とともに減少した。培養上清をゲル濾過 HPLC 分画し、培養上清中のリポ蛋白の割合について解析

したところ、感染後時間経過とともに VLDL が増加し、LDL が低下することを見出し、その原因として感染細胞における VLDL 分解酵素である Hepatic lipase の減少を見出した。

（２）HCV 感染が宿主細胞の代謝に与える影響のメタボロミクス解析

HCV 感染では解糖系は著名に亢進していたものの、その他の TCA 回路、プリン、ピリミジン合成系など低下傾向であった。HCV 感染は宿主のエネルギー産生、脂質産生は上げるものの、蛋白、核酸合成等は抑制する傾向が見られた。

D. 考察

HCV は感染に伴い、肝細胞内での脂質の蓄積と培養上清中の VLDL の割合の増加という、HCV 増殖に好都合な環境を作り出しているものと考えられる。メタボロミクス解析の結果、ウイルス感染に伴う「シャットオフ」現象と考えられる蛋白核酸合成の低下が認められた。我々はレプリコン細胞で細胞質の ATP が減少し、複製複合体に ATP が集まって、複製にエネルギーを消費していることを見出しているが、メタボロミクス解析の結果、ウイルス増殖にエネルギーが消費され、解糖系を亢進させてエネルギー産生を行うというウイルス感染の急性期状態を示している可能性が示された。

E. 結論

メタボロミクス解析の結果、感染細胞のエネルギー代謝、糖代謝、蛋白核酸合成等に大きな変化が認められた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.

Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology*. 2011;410:38-47.

2) Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res*. 2010;85:520-524.

3) Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol*. 2010;84:5824-5835.

4) 鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博、C型肝炎ウイルスの複製と粒子形成、日本ウイルス学会、雑誌ウイルス、東京、2011、60、87-92.

2. 学会発表

1) 相崎英樹、HCV 粒子形成に関与する脂

肪滴周辺膜蛋白の機能解析、第46回日本肝臓学会総会、山形、2010.

2) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Suzuki T, Real-time visualization of the ATP level in HCV replicating cells, 17th

International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, 2010.

3) Saito K, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M, Inhibition of cellular squalene synthase impairs hepatitis C virus proliferation in cultured cells, 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, 2010.

4) 相崎英樹、HCV 粒子形成と脂質の役割、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.

5) 渡辺則幸、村山麻子、Saeed Mohsan、伊達朋子、加藤孝宣、相崎英樹、脇田隆字、HCV エンベロープタンパク質に付加されるN型糖鎖の機能解析、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.

6) 安東友美、今村博臣、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルス複製複合体におけるATP制御の可視化と機能解析、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.

7) 山本真民、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルス粒子感染における粒子表面のコレステロールの役割、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、

2010.

- 8) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Suzuki T, Real-time visualization of the ATP level in HCV replicating cells, 第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
- 9) 鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆宇、鈴木哲朗、分割ユビキチン法を利用した HCVNS2 と結合する宿主因子の探索およびウイルス粒子形成への関与、第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
- 10) 斎藤恭子、鈴木哲朗、相崎英樹、花田賢太郎、脇田隆宇、西島正弘、深澤征義、Squalane synthase 阻害剤のC型肝炎ウイルス増殖阻害機構の解析、第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究分担報告書

B型肝炎ウイルスと免疫の相互作用

研究分担者 中本 安成 福井大学医学部第二内科 教授

研究要旨： 肝炎ウイルスに対する免疫反応は、慢性肝炎の発症から進展、がん化に至る一連のプロセスの引き金となっている。本研究では、B型肝炎ウイルス（HBV）に特異的なCTLが引き起こす慢性炎症の病態について *in vitro*、*in vivo* 実験系を併用して検討した。酸化ストレスに関わる細胞内シグナルについて、NFκB 経路の構成分子および cytochrome P450 (CYP) の発現が慢性肝炎早期から亢進し、Stat3 のリン酸化が亢進していた。ヒト不死化初代肝細胞のがん化過程で、HBx と H-RAS^{V12} または c-Myc の共発現、SV40-LT+ST 抗原と H-RAS^{V12} の共発現が促進的に作用する可能性が示され、Raf/MEK/ERK 経路や転写因子 Stat3 の関与が示唆された。これより、肝臓の慢性炎症の場における HBV 遺伝子産物と宿主の転写活性に関わる因子との相互作用が形質転換、がん化に促進的に作用することが示された。

A. 研究目的

肝炎ウイルスと免疫系を中心とする宿主因子の相互作用において、ウイルス特異的なCTLは、慢性肝炎の発症から進展、がん化に至る過程に深く関わっているが詳細な病態機序は不明である。本研究では、HBV特異的なCTLが誘導する慢性炎症の病態を、独創的な *in vitro*、*in vivo* 実験系を用いて検討した。

B. 研究方法

HBV特異的なCTLによって慢性肝炎から肝がんを発症するトランスジェニックマウスモデル（*in vivo* 系）を用いて、経時的に遺伝子発現プロファイルを観察することによって、酸化ストレスに関連する細

胞内シグナルの変化に注目して肝細胞の動態と併せて検討した。さらに、マウスモデル系で活性化が示唆された分子病態とウイルス遺伝子産物（HBx など）との相互作用に関して、ヒト由来不死化初代細胞

（*in vitro* 系）における形質転換能とその分子機構を解析した。

（倫理面の配慮）

動物実験については、動物愛護と動物福祉の観点から適切な配慮を行うため、各法令に基づき当該研究を実施した。また、本学の倫理委員会あるいは実験動物委員会の審査と承認を得て行った。

C. 研究結果

1) in vivo系において、肝臓での慢性炎症の経過において、肝細胞への酸化ストレスの蓄積とともに増殖反応 (PCNA陽性率) が亢進していた。

2) 酸化ストレスに関連する細胞内シグナルの検討において、慢性肝炎の早期から NFkB/RelA 経路が活性化していた。

3) in vitro系 ; hTERT 導入不死化肝細胞 (TTNT16 細胞) において、HBx と c-myc の共発現細胞では細胞増殖速度が増加する傾向が認められた。

4) 軟寒天培地でのコロニー形成能の評価では、HBx 蛋白と c-myc 蛋白の共発現細胞において 10,000 細胞あたり 442.8 ± 51.6 個のコロニーが認められた。

5) ノードマウスを用いた腫瘍形成能の評価において、HBx と c-myc 蛋白の共発現細胞は HBx と活性型 RAS 蛋白の共発現細胞と同様に腫瘍形成能を示した。

6) ELISA 法を用いた pathway 解析において、HBx と活性型 RAS 蛋白を共発現した TTNT16 細胞では pAkt1 や pMEK1 の活性化がみられた。一方、HBx と c-myc 蛋白を共発現した TTNT16 細胞では pStat3 の活性化がみられた。

D. 考察

HBV 特異的CTLが誘導する慢性炎症の病態について、in vivo系においてNFkB経路の構成分子およびcytochrome P450 (CYP)の発現が慢性肝炎早期から亢進し、Stat3のリン酸化が亢進していた。in vitro系において、HBxとc-Mycの共発現ががん化に促進的に作用する可能性が示され、

Raf/MEK/ERK経路や転写因子Stat3の関与が示唆された。

本研究において、宿主側因子として広く知られているc-Myc、Stat3に注目した相互作用の解析結果が得られた。これらの結果は、HBVとウイルスに対する免疫反応の相互作用において、宿主の転写活性に関わる因子が形質転換、がん化に促進的に作用することを示唆している。しかし、慢性肝炎in vivoモデルにおいて活性化が示唆される多くの宿主側因子との相対的な発がん活性の比較がなされなかった。今後、炎症性発がん活性が予測されるこれらの宿主側因子を含めた解析が期待された。

E. 結論

肝臓の慢性炎症の場合におけるHBV遺伝子産物と宿主の転写因子との相互作用が形質転換、がん化に促進的に作用することが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Nakagawa H, Mizukoshi E, Naito M, Mukaida N and Kaneko S: Antitumor effect after radio-frequency ablation of murine hepatoma is augmented by an active variant of cc chemokine ligand 3/macrophage inflammatory protein-1alpha. *Cancer Res.* 2010; 70: 6556-6565.

2) Kakinoki K, Nakamoto Y, Kagaya T,

Tsuchiyama T, Sakai Y, Nakahama T, Fujita Y, Mukaida N and Kaneko S: Prevention of intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma by combination of suicide gene therapy and monocyte chemoattractant protein-1 delivery in mice. *J. Gene Med.* 2010; 12: 1002-1013.

3) Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y and Kaneko S: Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res.* 2010; 70: 4687-4697.

4) Wu Y, Wang YY, Nakamoto Y, Li YY, Baba T, Kaneko S, Fujii C and Mukaida N: Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in the liver. *Oncogene* 2010; 29: 2228-2237.

5) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S. Prolonged recurrence-free survival following ok432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 163: 165-177.

2. 学会発表

1) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: #1725; NFkB activation precedes dynamics of oxidative stress-related procarcinogenic

signalings in a mouse model of chronic hepatitis B.; 第 61 回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): Hepatology 52 (4, Suppl.) 935A; 一般; poster: Nov. 1, 2010

2) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Dendritic Cell Transfer during Locoregional Treatments Induces Prolonged Recurrence-Free Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma.; International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa “Cancer and Host Response” (Satellite Symposium of 14th International Congress of Immunology - Kanazawa, Japan): Abstract p33-34; session; oral: Aug. 29, 2010

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究分担報告書

C型肝炎におけるインスリン抵抗性とペグ・インターフェロン/リバビリン併用治療 (PR治療) の効果との関連性についての多施設後ろ向き調査

研究分担者 四柳 宏 東京大学大学院医学系研究科・生体防御感染症学 准教授

研究要旨：C型肝炎におけるインスリン抵抗性とペグ・インターフェロン/リバビリン併用の治療効果との関係について解析した。Genotype (Serogroup) 1 の 685 例中、292 例 (42.6%) が Sustained Virological Response (SVR) になった。SVR に寄与する因子を解析したところ、単変量解析では空腹時血糖、インスリン、コレステロールなどが挙げられたが、多変量解析の結果、HCV コア領域 70 番のアミノ酸配列のみが残り、インスリン抵抗性に関する因子は残らなかった。また、Genotype (Serogroup) 2 の 109 例中、88 例 (83.8%) が SVR となった。SVR に寄与する因子を解析したところ、最終的には年齢のみが残り、インスリン抵抗性に関する因子は残らなかった。本邦においては、C型慢性肝炎の治療効果にインスリン抵抗性の及ぼす影響は小さいものと考えられた。

A. 研究目的

欧米においてはインスリン抵抗性はC型肝炎に対するIFN治療効果を低下させるとの報告がいくつかある。しかし、欧米に比してBMIの低い日本人において同様な影響があるかどうか不明である。

今回この点を明らかにすべく、他施設共同研究（後ろ向き調査）を行った。

B. 研究方法

5施設（虎の門病院、済生会吹田病院、九州大学関連施設、金沢大学、東京大学）でリバビリン併用ペグ・インターフェロン治療を完遂した患者の後ろ向き調査を行った。なお、肝硬変及び明らかな糖尿病（空腹時血糖126mg/dL以上もしくは随

時血糖200mg/dL以上が少なくとも2回あること。）の合併例は除外した。

治療効果決定因子の候補としては、年齢、性、BMI、総コレステロール、LDLコレステロール、空腹時血糖、インスリン、HOMA-IR、コア領域70番のアミノ酸配列、ISDRのアミノ酸変異数の10項目を用いた。

C. 研究結果

(1) 解析症例

解析の対象は、各施設から報告のあった1027例である。欠損データのある症例は除外したため、最終的にはGenotype (Serogroup) 1の68

5例及びGenotype (Serogroup) 2の109例の合計794例となった。

Genotype (Serogroup) 1の685例中292例(42.6%)、Genotype (Serogroup) 2の109例中88例(83.8%)がSVRとなった。

(2) Genotype (Serogroup) 1の症例における治療効果規定因子は、単変量解析では総コレステロール、LDLコレステロール、空腹時血糖、インスリン、HOMA-IR、コア領域70番のアミノ酸配列の6項目が抽出されたが(表1)、多変量解析ではコア領域70番のアミノ酸配列のみが残った(表2)。

(3) Genotype (Serogroup) 2の症例における治療効果規定因子は、単変量解析では年齢、インスリン、HOMA-IR、の3項目が抽出されたが(表3)、多変量解析では年齢のみが残った(表4)。

D. 考察

C型慢性肝炎はインスリン抵抗性を随伴する。インスリン抵抗性は肝細胞の脂肪化、酸化ストレスの亢進を伴う。また、インスリン抵抗性は肝線維化の速度を早めることも知られている。

インターフェロン療法の治療効果にインスリン抵抗性が影響を及ぼすという報告はこれまで欧米から出されてきた。しかしながら、BMIも違い、人種も違う日本人でも同じかどうかは検証が必要であった。

今回の検討では、Genotype

(Serogroup) 1の症例、Genotype (Serogroup) 2の症例とも、BMIは治療効果に影響を及ぼさなかった。

Genotype (Serogroup) 1の症例では治療効果規定因子として総コレステロール、LDLコレステロール、空腹時血糖、インスリン、HOMA-IR、コア領域70番のアミノ酸配列の6項目が抽出され、うち5つは代謝関連因子であった。それにもかかわらず、多変量解析で残ったのはコア領域70番目のアミノ酸配列のみであった。コア領域70番のアミノ酸配列はインスリン抵抗性や肝細胞の脂肪化と関連があるとする報告に合致する知見である。議論の余地はあるものの、Genotype (Serogroup) 1の症例に関してはインスリン抵抗性とペグインターフェロン・リバビリン併用療法の効果との間に直接の関係はないと考えられる。

Genotype (Serogroup) 2の症例では単変量解析では年齢、インスリン、HOMA-IR、の3項目が抽出されたが、多変量解析では年齢のみが残った。症例数も少なく、オッズ比も高くないことから、さらに症例を増やして検討する必要があると思われる。

E. 結論

1. Genotype 1ではインターフェロン・リバビリン併用療法の治療効果を決める最大の因子はコア領域70番のアミノ酸配列であった。

2. BMIを含めたメタボリック因子はS

VRとnon-SVRとの間で大きな相違は見られなかった。

3. Genotype 2では治療開始時の年齢が低い方がSVRになりやすい傾向があった。

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Moriya K, Miyoshi H, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie H, Goto K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells. J Med Virol. 2010;82:776-92.

2) Koike K, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K. Lipid metabolism and liver disease in hepatitis C viral infection. Oncology. 2010 Jul;78 Suppl 1:24-30.

3) Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: Polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. J Hepatol. 2011;54:432-8.

2. 学会発表

特になし

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

表 1 Genotype 1 SVR予測因子 (単変量)

項目	SVR (n=292)	Non-SVR (n=393)	p値
年齢	53.0±11.6	58.9±10.6	0.07
性 (男:女)	149:143	194:199	0.67
BMI	22.9±3.6	23.3±3.2	0.02
総コレステロール	180.0±33.8	169.0±28.1	0.0008
LDLコレステロール	103.0±28.9	94.2±28.1	0.0005
空腹時血糖	93.0±11.6	97.1±14.4	0.0001
インスリン	9.9±11.3	12.8±10.2	0.02
HOMA-IR	2.1±1.5	2.3±1.5	0.052
コアアミノ酸70番 (Wild:Mutant)	93 : 22	194 : 199	<0.0001
ISDR (平均置換数)	0.66±1.15	0.61±1.05	0.37

表 2 Genotype 1 SVR予測因子 (多変量)

項目	オッズ比	p値
BMI	0.98	0.70
総コレステロール	0.99	0.32
LDLコレステロール	0.99	0.59
空腹時血糖	1.00	0.95
インスリン	1.00	0.82
コアアミノ酸70番 (Wild:Mutant)	5.36	<0.0001

表3 Genotype 2 SVR予測因子 (単変量)

項目	SVR (n=88)	Non-SVR (n=21)	p値
年齢	50.6±13.3	57.1±12.1	0.02
BMI	23.1±3.1	23.8±0.7	0.17
総コレステロール	177.2±30.5	165.1±29.8	0.052
LDLコレステロール	55.8±45.2	46.7±43.2	0.24
空腹時血糖	94.1±13.7	93.8±9.5	0.46
インスリン	11.0±11.2	17.4±18.0	0.02
HOMA-IR	3.1±3.1	5.8±7.2	0.048

表4 Genotype 2 SVR予測因子 (多変量)

項目	オッズ比	p値
年齢	3.91	0.048
インスリン	1.01	0.82

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, <u>Koike K.</u>	Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein	J Hepatol			2010 Sep 22. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21093950.
Arano T, Nakagawa H, Tateishi R, Ikeda H, Uchino K, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Omata M, Yoshida H, <u>Koike K.</u>	Serum level of adiponectin and the risk of liver cancer development in chronic hepatitis C patients.	Int J Cancer			2010 Dec 17. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21170963.
Masuzaki R, Shiina S, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sugioka Y, Kondo Y, Goto T, Ikeda H, Omata M, <u>Koike K.</u>	Utility of contrast enhanced ultrasonography with sonazoid in radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma.	J Gastroenterol Hepatol			2010 Nov 3. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21054516.
Watanabe S, Enomoto N, <u>Koike K.</u> , Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M.	Prolonged treatment with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin improves sustained virological response in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan.	Hepatol Res	40	135-44	2010

Tejima K, Masuzaki R, Ikeda H, Yoshida H, Tateishi R, Sugioka Y, Kume Y, Okano T, Iwai T, Gotoh H, Katoh S, Suzuki A, Koike Y, Yatomi Y, Omata M, <u>Koike K</u> .	Thrombocytopenia is more severe in patients with advanced chronic hepatitis C than B with the same grade of liver stiffness and splenomegaly.	J Gastroenterol	45	876-84.	2010
Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inoue Y, Nishikawa T, Ikeda H, Seyama Y, Kokudo N, Shibahara J, Fukayama M, <u>Koike K</u> , Shirataki H, Fujiwara K.	Expression of alpha-taxilin in hepatocellular carcinoma correlates with growth activity and malignant potential of the tumor.	Int J Oncol	37	1417-23.	2010
Moriya K, Miyoshi H, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie H, Goto K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, <u>Koike K</u> .	Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells.	J Med Virol	82	776-92	2010
<u>Koike K</u> , Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K.	Lipid metabolism and liver disease in hepatitis C viral infection.	Oncology	78 Suppl 1	24-30	2010
<u>Koike K</u> , Moriya K, Matsuura Y.	Animal models for hepatitis C and related liver disease.	Hepatol Res	40	69-82	2010
Kanamori H, Yuhashi K, Ohnishi S, <u>Koike K</u> , Kodama T.	RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus binds to its coding region RNA stem-loop structure, 5BSL3.2, and its negative strand.	J Gen Virol	91	1207-12.	2010
Ikeda H, Ohkawa R, Watanabe N, Nakamura K, Kume Y, Nakagawa H,	Plasma concentration of bioactive lipid mediator sphingosine 1-phosphate	Clin Chim Acta	411	765-70	2010

Yoshida H, Okubo S, Yokota H, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, <u>Koike K</u> , Yatomi Y.	is reduced in patients with chronic hepatitis C.				
Okuse C, Yotsuyanagi H, Yamada N, Okamoto M, Ikeda H, Kobayashi M, Fukuda Y, Takahashi H, Nagase Y, Suzuki Y, Matsunaga K, Ishii T, Matsumoto N, <u>Koike K</u> , Suzuki M, and Itoh F	Effect of nucleoside analogue-interferon sequential therapy on patients with acute exacerbation of chronic hepatitis B.	Hepatol Res	40	461-469	2010
Molina-Jiménez F, Benedicto I, Murata M, Martín-Villalchez S, Seki T, Pintor-Toro J, Tortolero M, Moreno-Otero R, Okazaki K, <u>Koike K</u> , Barbero J, Matsuzaki K, Majano P and López-Cabrera M	Expression of pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG1)/securin in hepatitis B virus-associated liver diseases: Evidence for a hepatitis B virus X protein-mediated inhibition of PTTG1 ubiquitination and degradation	Hepatology	51	777-787	2010
Tsuji K, Yasui K, Gen Y, Endo M, Dohi O, Zen K, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Taniwaki M, Tanaka S, Arii S, <u>Okanoue T</u> , Yoshikawa T.	PEG10 is probable target for the amplification at 7q21 detected in hepatocellular carcinoma.	Cancer Genetics Cytogenetics	198	118–125	2010
Kumada H, <u>Okanoue T</u> , Onji M, Moriwaki H, Izumi N, Tanaka E, Chayama K, Sakaida S, Takehara T, Oketani M, Suzuki F, Toyota J,	Guidelines for the treatment of chronic hepatitis and cirrhosis due to hepatitis C virus infection for the fiscal year 2008 in Japan.	Hepatol Res	40	8-13	2010

Nomura H, Yoshioka K, Seki M, Yotsuyanagi H, Ueno Y and The Study Group for the Standardization of Treatment of Viral Hepatitis including Cirrhosis, Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.					
Fujii H, Itoh Y, Ohnishi N, Sakamoto M, Ohkawara T, Sawa Y, Nishida K, Nishimura T, Yamaguchi K, Yasui K, Minami M, Okanoue T, Ohkawara Y, Yoshikawa T.	Relapse of hepatitis C in a pegylated-interferon- α -2b plus ribavirin-treated sustained virological responder	Hepatol Res	40	654-660	2010
Yasui K, Harano Y, Mitsuyoshi H, Tsuji K, Endo M, Nakajima T, Minami M, Itoh Y, Zen Y, Nakanuma Y, Yoshikawa T, Okanoue T.	Steatosis and hepatic expression of genes regulating lipid metabolism in Japanese patients infected with hepatitis C virus.	J Gastroenterol	45	95-104	2010
Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y, Kumada H.	Amino acid substitution in HCV core region and genetic variation near IL28B gene affect viral dynamics during telaprevir, peginterferon and ribavirin.	Intervirology			in press
Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T,	Influence of ITPA polymorphism on decreases of hemoglobin	Hepatology			in press