

201125010A

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業

# 肝炎ウイルスと代謝・免疫系の 相互作用に関する包括的研究

(H21-肝炎-一般-010)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 **小池和彦**

東京大学医学部消化器内科学 教授

平成24(2012)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルスと代謝・免疫系の相互作用に関する包括的研究  
(H21- 肝炎 - 一般 -010)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小池 和彦  
東京大学医学部消化器内科 教授

平成 24 (2012) 年 3 月

## まえがき

日本においては、180 万人以上の人が C 型肝炎ウイルス (HCV)、また 120 万人以上の人が B 型肝炎ウイルス (HBV) に感染しており、慢性肝炎から肝硬変、肝癌の恐怖と戦っている。しかしながら、HCV 感染症、HBV 感染症には肝臓以外の臓器あるいは全身性の病態が存在する。C 型肝炎には脂質代謝異常や糖代謝異常・インスリン抵抗性が合併しやすく、慢性肝炎の進行に影響を与えることも示されてきている。これは HCV 感染が代謝性変化を誘発することともに、代謝性変化によって C 型肝炎の病態に影響を受けるという相互作用によるものと考えられる。脂質代謝異常やインスリン抵抗性が C 型慢性肝炎の進行そのもの、あるいはリバビリン併用 Peg・インターフェロン療法を中心とした抗ウイルス治療に与える影響も次第に明らかとなってきた。また、C 型肝炎における脂質代謝異常や糖尿病が、脳血管疾患、心血管疾患等の動脈硬化性疾患の合併を増加させるのか否かについても明らかにしなくてはならない。一方、B リンパ球を初めとする免疫系と HCV、HBV の相互作用も重要な役割を演じている。本研究においては、肝炎ウイルスと代謝・免疫系の相互作用について、臨床的研究と基礎的研究の両面から病態・原因の究明を目指している。更に、これら代謝性変化の肝病変と患者の予後に対する影響を明らかにし、臨床的な健康障害の状況を明らかにして国民の健康増進に寄与することを目的として検討を行ってきた。

今年度の研究の結果、鉄代謝、肝脂肪化、インスリン抵抗性が C 型肝炎の進展に与える影響、肥満度と HCV 感染症病態の関係、HCV 感染による糖代謝の変化、脂質代謝と HCV 増殖の相互作用について次第に明らかにされてきた。C 型肝炎においては、インスリン抵抗性や肝脂肪化などの代謝異常が起こりやすく、慢性肝炎進行の決定因子ともなっている。したがって、C 型肝炎患者は肥満をさけるべきであるが、C 型肝炎患者にとっての肥満の定義が通常の日本人と同様に BMI 値 25 でよいのか否かも明らかではない。この点を明らかにするため多施設共同研究を行なった。また、HCV 感染と B 細胞リンパ腫の発生、成因における HCV の役割についても新しい知見が得られた。本年度の検討によって、C 型肝炎、B 型肝炎における代謝・免疫系との相互作用について解明が進展した。

最後に、本研究に貢献いただいていた研究分担者ならびに研究協力者の方々、また外からこの研究を支えて下さった多くの方々に、心から篤く御礼申し上げる

平成 24 年 3 月

研究代表者 小池 和彦  
東京大学医学部消化器内科

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

「肝炎ウイルスと代謝・免疫系の相互作用に関する包括的研究」班

平成23年度 班の構成

小池 和彦	東京大学医学部 消化器内科 教授
岡上 武	大阪府済生会吹田病院 院長
熊田 博光	虎の門病院 分院 院長
古庄 憲浩	九州大学大学院医学研究院 感染環境医学分野 准教授
石坂 信和	大阪医科大学 循環器内科 教授
森屋 恭爾	東京大学医学部 感染制御学 教授
松浦 善治	大阪大学微生物病研究所 分子ウイルス分野 教授
水落 利明	国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長
小原 恭子	熊本大学熊本大学大学院生命科学研究部 感染症阻止学 特任教授
勝二 郁夫	神戸大学大学院医学系研究科 微生物学分野 准教授
相崎 英樹	国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官
中本 安成	福井大学医学部 消化器内科 教授
斎藤 泉	東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設 教授
四柳 宏	東京大学医学部 感染症内科 准教授

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 肝炎ウイルスと代謝・免疫系の相互作用に関する包括的研究  
小池 和彦..... 1

### II. 分担研究報告

1. C型肝炎の肝病態における鉄蓄積パターンの意義に関する研究  
岡上 武..... 25
2. HCV core アミノ酸置換が代謝・病態・治療に及ぼす影響  
熊田 博光 ..... 35
3. C型肝炎ウイルス持続感染例に対する抗ウイルス療法における  
IL28B 遺伝子多型とインスリン抵抗性の抗ウイルス効果への影響  
に関する研究  
古庄 憲浩..... 39
4. 自己免疫疾患としての心血管疾患に関する研究  
石坂 信和..... 45
5. 脂質代謝に関する研究  
森屋 恭爾..... 49
6. miR122 と脂質代謝系遺伝子の発現が HCV の肝臓特異性を規定する  
松浦 善治..... 51
7. 慢性 C 型肝炎患者末梢血 B 細胞における TNFAIP3 (A20) の発現解析  
水落 利明..... 55
8. HCV の B リンパ腫発症要因の解明に関する研究  
小原 恭子..... 61
9. 肝培養細胞を用いた HCV による糖代謝異常の分子機構の研究  
勝二 郁夫..... 67
10. HCV 増殖と脂質の相互作用に関する研究  
相崎 英樹..... 73

11.B 型肝炎ウイルスと免疫の相互作用	
中本 安成.....	77
12. 肝炎ウイルスに対する遺伝子治療用ベクターの開発に関する研究	
斎藤 泉.....	81
13.C 型肝炎における肝脂肪化に影響を及ぼす因子に関する多施設後ろ向き調査 (班共同研究)	
四柳 宏.....	85
III. 研究成果に関連した刊行物 (総説抜粋) .....	89

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

## 総括研究報告書

# 肝炎ウイルスと代謝・免疫系の 相互作用に関する包括的研究

研究代表者 小池 和彦 東京大学消化器内科 教授

## 研究要旨

我が国においては、180 万人以上の人が C 型肝炎ウイルス (HCV)、また 120 万人以上の人が B 型肝炎ウイルス (HBV) に感染しており、慢性肝炎から肝硬変、肝癌へと到る連鎖に苦しんでいる。しかしながら、HCV 感染症、HBV 感染症には肝臓以外の臓器あるいは全身性の病態が存在しうる。C 型肝炎には脂質代謝異常や糖代謝異常・インスリン抵抗性が合併しやすく、慢性肝炎の進行に影響を与えることも示唆されてきている。本研究においては、肝炎ウイルスと代謝・免疫系の相互作用について、臨床的研究と基礎的研究の両面から病態・原因の究明を目指している。更に、これら代謝性変化の肝病変と患者の予後に対する影響を明らかにし、臨床的な健康障害の状況を明らかにして国民の健康増進に寄与することを目的とする。今年度の研究の結果、鉄代謝、肝脂肪化、インスリン抵抗性が C 型肝炎の進展に与える影響、肥満度と HCV 感染症病態の関係、HCV 感染による糖代謝の変化、脂質代謝と HCV 増殖の相互作用について次第に明らかにされてきた。C 型肝炎においては、インスリン抵抗性や肝脂肪化などの代謝異常が起りやすく、慢性肝炎進行の決定因子ともなっている。したがって、C 型肝炎患者は肥満をさけるべきであるが、C 型肝炎患者にとっての肥満の定義は不明である。通常の日本人と同様に BMI25 でよいのか否かも明らかではない。この点を明らかにするため多施設共同研究を行なった。また、HCV 感染と B 細胞リンパ腫の発生、成因における HCV の役割についても新しい知見が得られた。本年度の検討によって、C 型肝炎、B 型肝炎における代謝・免疫系との相互作用について解明が進展した。

分担研究者 (所属施設名・職名)

岡上 武 (大阪府済生会吹田病院・院長)

熊田博光 (虎ノ門病院分院・院長)

古庄憲浩 (九州大学大学院医学研究院感染環境医学分野・准教授)

石坂信和 (大阪医科大学循環器内科・教授)

森屋恭爾 (東京大学医学部感染制御学・教授)

松浦善治 (大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野・教授)

水落利明 (国立感染症研究所血液・安全性研究部・室長)

小原恭子 (熊本大学医学薬学感染症阻止学・特任教授)

勝二郁夫 (神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野・准教授)

相崎英樹 (国立感染症研究所ウイルス第二部・主任研究官)

中本安成 (福井大学医学部附属病院消化器内科・教授)

斎藤 泉 (東京大学医科学研究所遺伝子解析施設・教授)

四柳 宏 (東京大学医学部感染症内科・准教授)

### A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) や B 型肝炎ウイルス (HBV) は肝臓に病気を起こすウイルス



である。我が国でも、なお約 200 万人の人が HCV に、約 140 万人が HBV に感染しており、慢性肝炎、肝硬変、肝癌へと到る連鎖に苦しめられている。しかし、HCV 感染症、HBV 感染症は単に肝臓だけの感染症ではない。これまでの我々の検討によって、HCV 感染症とシェーグレン症候群や扁平帯癬との間に強い関連性の存在することが明らかになった。また、C 型肝炎や B 型肝炎において脂質代謝異常や糖代謝異常・インスリン抵抗性が合併しやすく、慢性肝炎の進行に影響を与えることも示してきているが、分子レベルでの解明も含めて、まだ充分解明されたとはいえない。更に、C 型肝炎に対する抗ウイルス治療の効果との関連性についても、ウイルスと代謝因子の相互作用を中心として解明されるべきことは多い。また、ウイルス肝炎に合併する代謝性異常が、動脈硬化や脳血管・心血管障害に及ぼす影響や、そのメカニズムも不明である。B 細胞リンパ腫と HCV の関わりも示唆されているが、日本における実態の詳細と機序は不明である。また、HBV 感染者では、免疫系と HBV との相互作用がその病態に強く反映されているが、病態には不明な点が多い。

そこで、本研究においては、これまでの疫学的な検討によって明らかになってきたウイルス肝炎における代謝および免疫系の障害について、治療効果への影響を含めて、より臨床に密接した観点から明らかにし、次いで、基礎的研究によってその原因・機序を分子レベルで究明する。研究代表者を含む 13 名の研究者によって、臨床、基礎両面からなお包括的な研究を行い、C 型肝炎に加えて B 型肝炎においても詳細な検討を

遂行する。初年度は、臨床面からはまず詳細な臨床的な解析を、基礎面からはモデルシステムの構築を行ない、次年度以降の分子医学的解析を含めた詳細な検討へと発展させる。ウイルス肝炎患者におけるこれらの異常の合併が、いかなる健康障害に到るかを明らかにすることが期待される。肝炎ウイルスと代謝・免疫系との相互作用に関する解析データを基に、新規治療法の開発を図り、国民の健康増進に寄与することを目的とする。

## B. 方法

- 1) 139 名の C 型肝炎症例について肝生検を施行し、新犬山分類に準じて線維化 (stage) と炎症 (grade) を評価した。肝脂肪化 (steatosis)、鉄蓄積をスコア化した。88 名の肝生検組織を用いて hepcidin、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の発現レベルを定量した。
- 2) Core アミノ酸置換が PEG-IFN/RBV/TVR 併用療法の治療成績に及ぼす影響を検討した。HCV-1b で Core アミノ酸置換を評価された 2, 220 例から Core アミノ酸置換と関連する代謝・宿主要因を検討した。
- 3) 2005 年から 2009 年までに PEG-IFN $\alpha$ ・RBV 治療を受けた HCV 持続感染例で、治療前にインスリン抵抗性検査を施行した 560 例中、遺伝子検査に文書同意した 421 例で、平均年齢は 59.0 歳 (54-66 歳) で、男性 188 例 (44.7%)、HCV genotype 1 型が 328 例、HCV genotype 2 型が 93 例であった。IL28B 遺伝子多型は、Real time PCR 法にて rs8099917 を同定した。IL28B (rs8099917) 遺伝子多型の TT 群 (インタ

- ーフェロン感受性良好)は 296 例(70.3%)、TG/GG 群(インターフェロン感受性不良)は 125 例(29.7%)であった。治療前に全例入院の上、夜間 12 時間以上の絶食後の早朝に糖負荷試験を行い、空腹時の血糖およびインスリン値から、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。
- 4) IgG4 関連の自己免疫と冠動脈疾患の関連について、症例ベースで血清学的、および免疫組織学的観点から詳細な検討を行った。冠動脈造影が施行され、血清検査に承諾をいただいた連続 286 症例において、血清中の IgG4 値と冠動脈狭窄の関連について検討した。冠動脈疾患の有無別で血清 IgG4 値を検討し、また、多変量ロジスティック解析により、血清 IgG4 値が他の動脈硬化の危険因子と独立した冠疾患の予測因子であるかどうかについて検討した。
  - 5) HCV core 蛋白発現培養細胞系において不飽和酵素の活性、および脂質組成を個々に検討し HCV core 蛋白による活性変化を受けている酵素の確認とその酵素活性を抑制する物質のスクリーニングを行った。
  - 6) HCV のレセプターを発現する 10 種類の非肝臓系細胞株にレンチウイルスベクターにて miR122 を強制発現した。HCVcc の感染性は HCV-RNA の定量およびウイルス蛋白質の発現を検討した。miR122 と HCV-RNA の結合部位の遺伝子特異性の検討には、変異を導入した mt-miR122 と mt-HCVcc を用いた。HCVcc の感染性の違いとして、上清中の感染価を肝臓系と非肝臓系細胞株の間で比較した。
  - 細胞株の検索には cDNA array データベースを用いた。
  - 7) 瀉血療法の際に採取された CHC 患者末梢血液、また対照としては健常人末梢血液より Ficoll を用いて PBMC を分離し、さらに抗体結合磁気ビーズを用いて CD19 陽性細胞 (B 細胞) を分離した。得られた細胞から蛋白質を抽出し、Western Blotting 法により A20 分子および NF- $\kappa$ B 経路関連蛋白分子の発現解析を行った。
  - 8) RzCD19Cre マウスの樹立：全長の HCV ゲノム RNA (1 b 型) をリボザイム (Rz) で正確切り出す事ができ、また Cre/loxP 制御下で任意の時期や臓器で発現可能なマウス (Rz) をまず樹立した。その後 B 細胞のマーカーである CD19 のゲノム遺伝子座に Cre 酵素がノックインしたマウス (CD19Cre マウス; NAR 1997) と交配して B 細胞特異的に HCV 遺伝子を発現できる RzCD19Cre マウスを樹立した。
  - 9) HCV J6/JFH-1 感染細胞と非感染細胞において回収の 12 時間前にライソゾーム阻害剤 (pepstatin A あるいはそれぞれ単独投与) またはプロテアソーム阻害剤 (clasto-lactacystin) を投与し、内在性 HNF-1 $\alpha$  蛋白質量をウエスタンブロット法で比較した。Huh7.5 細胞に NS5A 発現プラスミドをトランスフェクションし、内在性 HNF-1 $\alpha$  蛋白質の量をウエスタンブロット法で比較した。
  - 10) HCV 感染細胞と非感染細胞で約 900 の代謝産物について、キュ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メタ

ボローム解析した。さらに、比較のため HCV 構造蛋白質の影響のないサブゲノムレプリコン細胞のメタボローム解析も行った。感染細胞およびレプリコン細胞でエネルギー代謝に大きな変化が認められたので、エネルギー産生に重要な役割を果たしているミトコンドリアについて解析するとともに、ATP 消費量、ATP 局在の解析を行った。

- 11) HBV特異的細胞障害性Tリンパ球と宿主因子、ウイルス因子の相互作用に関する検討を行なった。
- 12) 新規遺伝子治療用 AdV は、従来の「切り出し発現法」とは異なり、ウイルスゲノムの左端側に $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)のプロモーターから部位特異的組換え酵素 Cre を発現するスイッチユニットとその下流に目的遺伝子の cDNA のみと loxP、ウイルスゲノムの右端側に loxP と EF1  $\alpha$  プロモーターを持つ(「ミニアデノ」と命名)。Cre と loxP を同一分子上に持つコスミドは作製が不可能であるため、分担者の開発した Cre に対する dominant negative を持つコスミドカセットにより作製し、Cre に対する shRNA を高度に発現している 293 細胞を用いて作製した。ベクターは十分に力価の高いものが得られたため、AFP を発現している HuH-7 細胞による発現効率を「ミニアデノ」と「切り出し発現」で比較した。また HeLa 細胞を用いて特異性の検討を行った。
- 13) H23 年度班共同研究：C 型肝炎においては、インスリン抵抗性や肝脂肪化などの

代謝異常が起こりやすく、慢性肝炎進行の決定因子ともなっている。したがって、C 型肝炎患者は肥満をさけるべきであるが、C 型肝炎患者にとっての肥満の定義は不明である。通常日本人と同様に BMI25 でよいのか否かも明らかではない。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。5 施設(虎の門病院、済生会吹田病院、九州大学関連施設、福井大学、東京大学)でリバビリン併用ペグ・インターフェロン治療前に肝生検を施行した患者の肝脂肪化を決定する因子に関して後ろ向き調査を行った。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、などの十数項目を用いた。

- 14) 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、個人情報厳格に管理、保存する。

## C. 結果

- 1) C 型肝炎では肝組織中に蓄積した過剰な鉄が肝障害を増悪させる。鉄は肝細胞(HC)や網内皮系細胞(REC)に蓄積するが、肝障害の進展にそれぞれ個別の役割を担っていると考えられる。本研究では 139 名の C 型肝炎患者を対象に鉄蓄積パ

ターンの意義を検討した。HC と REC の鉄蓄積はそれぞれ 74 名と 52 名に認められた。蓄積パターンは HC 単独が 30 名、REC 単独が 8 名、混合型が 44 名、鉄陰性が 57 名であった。REC 蓄積は線維化、炎症、脂肪化と密接に相関しており、REC 蓄積症例は肝障害度や組織学的進展が鉄陰性症例や HC 蓄積症例に比較して高度であった。血清フェリチン値は HC 蓄積や REC 蓄積の予測に有用であったが、REC 蓄積のカットオフ値が高値であった。多変量解析では REC 蓄積は線維化進展と独立して相関していた。88 名の症例で肝組織中の TNF- $\alpha$  発現を定量した結果、混合型蓄積群における発現が最も高値であった。一方、hepcidin の発現は HC 蓄積群と混合型蓄積群で亢進していたが、2 群間で差はなかった。IL-6 の発現レベルはグループ間で有意差がなかった。以上の結果より、C 型肝炎では最初に HC へ鉄が蓄積し、組織学的進展に伴って REC へ鉄が蓄積していくと推測された。

2) HCV-1b core アミノ酸置換が治療・代謝・病態に及ぼす影響を検討した。前治療無効例に対する Peginterferon/Ribavirin/Telaprevir 併用 24 週間治療の SVR 予測に Core aa70 置換が有用であった。治療中の LDL-C の推移は Core aa70 置換と関係しており、脂質代謝を標的とした薬剤の追加で更なる効果改善が期待されることが示された。更に、Core アミノ酸置換は糖/脂質代謝要因・*IL28B* 遺伝子多型とも関係し、特に Core aa70 は *IL28B* に影響されながら経時的に Major clone が変化している可能性が示唆された。Core

aa70 と *IL28B* 遺伝子多型・脂質/糖代謝要因の関係を解析することが将来の新規抗 HCV 療法の開発と肝病態進行メカニズムの解明につながると思われる。

3) 持続的 HCV 血症消失 (sustained virologic response, SVR) 率 : HCV genotype 1 型および 2 型の治療終了 24 週間後の SVR 率は、各々 117 例、35.7% および 68 例、73.1% であった。HCV 1 型において、肥満例 ( $25 \leq \text{BMI} < 30$ ) および  $\gamma$  GTP 高値例が治療無効であった。HCV 1 型および 2 型ともに、IL28B TG/GG および高 HCV RNA 量例が治療無効であった。HCV 1 型において、血小板低値例、AFP 高値例および血清 IV 型コラーゲン高値例が治療無効であった。HCV 1 型および 2 型ともに、空腹時インスリン高値例および HOMA-IR 高値例が治療無効であった。HCV 1 型および 2 型ともに、規定治療量が不十分例および非早期ウイルス消失例が治療無効であった。多変量解析で、HCV 1 型の SVR に寄与する因子として、IL28B TT、低 HOMA-R が有意な因子で、IL28B と独立してインスリン抵抗性が治療効果に影響を及ぼした。同様に、多変量解析で HCV 2 型の SVR に寄与する因子として IL28B TT のみが有意な因子であった。

4) 血清学的・組織学的に確実に IgG4 関連の冠動脈病変と判断された症例は、検討期間中に 2 例存在した。1 例目は、68 歳男性。不安定狭心症で来院した。血清 IgG4 値は 564 mg/dL と上昇し、冠動脈狭窄部周囲に線維性肥厚を伴う多枝病変であったことから、バイパス術を施行。冠動脈

周囲の組織の生検により、リンパ濾胞の形成と IgG4 陽性の形質細胞の浸潤が認められた。2 例目は、75 歳の男性。狭心症で来院。冠動脈には 3 枝ともびまん性の拡張病変と狭窄を認めた。右冠動脈の末梢は瘤化しており、血管周囲には著大な線維性肥厚を認めた。血清 IgG4 値は 2510 mg/dL と上昇。当初、冠動脈狭窄部に対して、ステント留置で対応したが、冠動脈瘤の瘤径増大するため、バイパス術を施行。冠動脈周囲組織からは、おびただしい IgG4 陽性の形質細胞の浸潤が認められた。

冠動脈造影が施行され、血清検査に承諾をいただいた連続 286 症例において、血清中の IgG4 値と冠動脈狭窄の関連について検討した。冠動脈狭窄症例では、有意に血清 IgG4 値は高く、年齢・性別・eGFR・hsCRP・高血圧・糖尿病・高脂血症・sIL-2R で調整したロジスティック回帰分析では、血清 IgG4 値の下位 25%(IgG4 <17.8) をレファレンスとして、上位 25%(IgG4 57.7-) は、オッズ比 3.75 で有意に冠動脈狭窄症例が多かった。

- 5) HCVcore 蛋白による  $\Delta 9$  不飽和酵素活性上昇が培養細胞系脂質組成検討でも示された。またこの  $\Delta 9$  不飽和酵素 (Stearoyl CoA desaturase) 活性は PUFA など複数の物質投与によって抑制にされることを確認し有力な肝発癌抑制物質の同定が可能となった。また分枝鎖アミノ酸による肝臓の脂肪化および SCD-1 発現抑制を報告しているが、長期マウス投与による発癌抑制効果を検討した。
- 6) 検討した 10 種類の細胞株のうち、5 種類の

細胞株で感染後、HCV-RNA の複製を認めた。特に子宮由来の Hec1B 細胞、腎臓由来の 293T 細胞で高い複製効率が確認された。Hec1B 細胞に対し、mt-miR122 を発現させ、mt-HCVcc を感染させることによって、miR122 の発現による HCV-RNA の複製亢進には miR122 の高い遺伝子特異性が必要であった。また、非肝臓系細胞株では高効率に HCV-RNA が複製するにも関わらず、上清中に感染性粒子が産生されなかった。cDNA array および定量 PCR によって、非肝臓系細胞株には HCV の粒子産生に必須とされている apolipoprotein などの VLDL 関連蛋白質の発現が認められなかった。そこで、非肝臓系細胞株のうち、VLDL 関連蛋白質を発現する細胞株を cDNA array データベースで検索したところ、胃癌由来の FU97 細胞が同定された。この細胞では HCV-RNA の複製のみならず、感染性のウイルス粒子が高効率に産生された。以上から、HCV の感染指向性は miR122 と脂質代謝系遺伝子の発現によって規定されていることが示唆された。

- 7) CHC 患者末梢 B 細胞 (CHC-B) で NF- $\kappa$ B 活性化シグナルに関わる分子の発現レベルについて検討した。その結果、RIP1 (Receptor-interacting protein 1), IKK (I $\kappa$ B kinase) complex はいずれも CHC-B で発現が亢進していることが明らかになった。この結果から、CHC-B では、NF- $\kappa$ B が恒常的に活性化されている状態にあると考えられた。次に、IKB $\alpha$  と p65 の発現レベルを調べたところ、健常者と CHC 患者との間での差はほとんど見られなかった。さらに、p50 に関しては CHC-B ではその発現量は減少していた。また一方

で、IKK- の発現量が健常者と CHC 患者の間でほとんど差がなかったことから、p65 と p50 は細胞質に留まっている可能性が高いと思われた。そこで、この理由として、NF- B 活性化シグナルを抑制する分子である A20 および、同様の機能を持つ事が知られている CYLD (Cylindromatosis) に関して CHC-B での発現レベルを調べた。その結果、A20 と CYLD は共に、CHC-B で恒常的に発現亢進していることが明らかになった。おそらく、CHC-B では、恒常的に発現亢進した A20 や CYLD が、同様に発現亢進している RIP1 や IKK complex の活性を抑えていると考えられる。現在、慈恵医大第3病院との共同研究を申請しており、HCV 感染 B リンホーマ発症患者の検体を入手し A20 および CYLD の発現解析を進めたいと考えている。それにより、B リンホーマ発症と A20/CYLD の発現動態との関連が明らかになることが期待される。

一方、HCV の full genome を B 細胞特異的に導入したマウス (HCV-Tg) が熊本大学 (現鹿児島大学) の小原先生の研究室において作製され、約 25% のマウスで B リンホーマが発症することが示されている。そこで小原先生との共同研究により、HCV-Tg マウス B 細胞における A20 の発現動態を調べた。その結果、B リンホーマを発症した HCV-Tg マウスでは、未発症マウスと比較して A20 の発現が極度に低下していることが明らかになった。A20 は NF- B 経路を阻害する役割を担っていることから、その機能低下が無秩序な NF- B 経路の促進、つまり癌化へと誘導

することを考えると、本結果は非常に興味深い。

- 8) HCV の full genome を B 細胞特異的に導入したマウス (HCV-Tg) のマイクロアレイによる網羅的な解析は次の組み合わせで行った。各群は 2 匹ずつから RNA を抽出して個体差を軽減するように試みた。① ♂700 日令以上 ; RzCD19Cre B 細胞 vs B リンパ腫 ② ♂一年未満 : B 細胞 Rz (HCV-) vs RzCD19Cre (HCV+) ③ ♀ RzCD19Cre B cell vs B リンパ腫 ④ ♀一年未満 : B 細胞 Rz (HCV-) vs RzCD19Cre (HCV+) の 4 群である。変動した宿主遺伝子群は、①上昇;4067 種, 下降 3480 種 ② 上昇;1680 種, 下降 1337 種 ③ 上昇;4331 種, 下降 4218 種 ④ 上昇 ; 1418 種, 下降 1961 種の遺伝子の動きが認められた。現在詳細なネットワークを用いて行っている所である。
- 9) HCV 感染細胞において HNF-1  $\alpha$  蛋白質の量が著明に減少するが、Pepstatin A で回復することからライソソーム系プロテアーゼ、特に酸性プロテアーゼによる分解の関与が示唆された。HCV NS5A 蛋白質の単独発現でも HNF-1  $\alpha$  蛋白質の分解が促進され、同様に Pepstatin A で分解が抑制されたことから、HCV NS5A がライソソームプロテアーゼによる HNF-1  $\alpha$  分解を誘導することが明らかとなった。
- 10) 細胞の脂質代謝は糖質・蛋白質・核酸・エネルギー代謝と互いに影響を及ぼしあっていることが知られており、脂質の代謝だけでなく全体の代謝変化をとらえることが重要と考えられる。そこで、HCV 感染に伴う細胞内代謝の変化を理解する

ため、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メタボローム解析を行い、約 900 の代謝産物の定量を行った。HCV 感染細胞とサブゲノムレプリコン細胞のメタボローム解析の比較で、HCV 感染、特に複製でエネルギー産生が低下することが見出された。これはミトコンドリア障害によるものと HCV ゲノム複製によるものの可能性が示された。

11) ヒト不死化肝細胞 (*in vitro*) において、HBV タンパク HBx と転写因子 c-Myc の共発現が転写因子 STAT3 の活性化を誘導して、がん化に促進的に作用することが観察された。HBV トランスジェニックマウスモデル (*in vivo*) において、慢性肝炎の進展に伴う酸化ストレス経路 (NFkB) ; p65/RelA の活性化は STAT3 と連動していた。また、進展した慢性肝炎、肝がん組織で NFkB 経路 ; RelB 経路, p100/52 の活性化を認めた。これより、HBV への免疫反応によって誘導される酸化ストレス経路や転写因子の相互作用が、形質転換、がん化に促進的に作用することが示唆された。

12) 班員への AdV の供給は、要望に応じて行った。本年度は 1 件の通常ベクターの要望、VA 欠失ベクターとして 12 件の要望があり、精製ベクターロットとして供給した。「ミニアデノ」は、肝細胞癌特異的に治療用遺伝子を発現するベクターであり、播種状の癌を手術などで摘出後に肝臓に投与し「目に見えない癌」をサーチしながら治療するベクターである。先に開発した「切り出し発現型ベクター」は未だ予備的な解析ではあるが、治療効果

を示す傾向が認められた。「切り出し発現」では治療用遺伝子がウイルスゲノムから切り出された環状分子として存在しているが、詳細な解析から環状分子は細胞内で不安定であることが明らかになり、細胞内で 6 ヶ月安定に存在するウイルスゲノム上に治療用遺伝子を残しながら肝細胞癌特異性を付加するベクター開発の必要性が生じた。そこで、ベクターゲノムの左端側に AFP プロモーターから Cre を発現するスイッチユニット、その下流に GFP あるいはヘルペスウイルス TK 遺伝子と loxP を、右端に loxP と分担研究者が「低炎症型ベクター」として報告した EF1 $\alpha$  プロモーターを挿入した「ミニアデノ」ベクターを作製した。この「ミニアデノ」ベクターは AFP 発現 HuH-7 細胞に導入された時のみ AFP プロモーターから Cre が発現し、loxP 間のアデノウイルスゲノムの大半を環状に切り出す。最終的に治療用遺伝子は安定なウイルスゲノム上で機能する。AFP 発現 HuH-7 細胞と AFP 非発現 HeLa 細胞に「切り出し発現」と「ミニアデノ」ベクターを導入しマーカー遺伝子である GFP の発現を比較した結果、3 日目では「切り出し発現」が高いが 6 日目ではほぼ追いついていた。より長期間の観察では「ミニアデノ」が安定に治療用遺伝子を発現すると考えられる。また HeLa 細胞における特異性の検討では両者に違いは認められなかった。

13) リバビリリン併用ペグ・インターフェロン治療前に肝生検を施行した C 型慢性肝炎患者の肝脂肪化を決定する因子に関して後ろ向き調査を行った。498 症例を解析

したところ、BMI、ALT 値、TG 値、HOMA-IR、HCC 合併などが単変量解析にて有意な因子として抽出された。多変量解析においては、BMI と血清 TG 値のみが肝脂肪化の存在の決定因子であった。肝組織の線維化ステージが 0-2 の症例のみを対象にしたところ、脂肪化と肝発癌の間に相関があることが認められた。BMI を低く保っておくことは肝脂肪化、さらには肝発癌を抑制することが示唆された。ROC curve 分析を行なったところ、BMI 23.7 が 5% 以上の肝細胞に脂肪滴を認めるか否かを最も正しく識別することが判明した。

#### D. 考察

網内皮系細胞の鉄蓄積が C 型肝炎の病態進展と密接に関連することが明らかとなった。C 型肝炎の病態初期には肝細胞のみに鉄が蓄積するが、線維化や炎症が高度になるにしたがって網内皮系細胞へ蓄積していく鉄代謝異常の進展経路が推測された。網内皮系細胞の鉄蓄積には hepcidin の働きが重要である。すなわち、細胞膜上に存在する ferroportin が hepcidin によって分解されると鉄が放出出来なくなるためである。実際に鉄が網内皮系細胞に蓄積している群では hepcidin の発現が亢進していたが、肝細胞単独蓄積群と比較して有意差がなかった。このことは、hepcidin 以外にも網内皮系細胞の鉄蓄積に関与する因子が存在する可能性を示唆している。

前治療無効例に対する PEG-IFN/RBV/TVR 併用 24 週治療の SVR 予測に、Core アミノ酸置換・前治療反応性の組み合わせが有用であることが明らかとなった。前治療無効

例の治療成績は脂質代謝を標的とした薬剤の追加で更なる改善が期待される。Core アミノ酸置換は糖/脂質代謝要因・*IL28B* と関連する。Core アミノ酸置換は *IL28B* と関連しながら経時的に Major clone が変化する可能性が示唆された。

HCV コア蛋白変異と肝癌患者の予後、インスリン抵抗性に関する証拠が見いだされてきており、HCV と代謝の相互作用について明らかになってきた。また、C 型肝炎と肥満の関係について新しい知見が得られつつある。また、また、アミノ酸代謝と C 型肝炎の肝病態について新たな知見が得られ、治療法の開発が期待される。糖代謝、脂質代謝と HCV 感染、HCV 複製との関係が明らかになってきており、治療法開発につながることが期待される。

HCV 持続感染例に対する抗ウイルス療法において、*IL28B* TT は HCV genotype に共通した治療有効因子であるものの、インスリン抵抗性は HCV genotype 1 型に対して独立した負の効果因子である。したがって、HCV 持続感染例に対する抗ウイルス療法の推奨は、*IL28B* の TT 群やインスリン抵抗性が低い症例が挙げられるが、TG/GG 群では治療効果を上げるために治療前にインスリン抵抗性への対応が必要である。

C 型慢性肝炎症例において、早期動脈硬化病変や冠動脈狭窄症の頻度が高い可能性が報告されている。両疾患をむすびつける可能性のある病態として、C 型慢性肝炎における代謝異常（インスリン抵抗性亢進など）を報告したが、今回の結果から、IgG4 関連の自己免疫を含む免疫学的異常についてもさらなる検討する必要があると考えら



えられる。

培養細胞系においても  $\Delta 9$  不飽和酵素活性上昇が HCV コア蛋白によってもたらされることから新たな治療薬スクリーニングが可能となることまた多価不飽和脂肪酸投与によって HCV コア蛋白による  $\Delta 9$  不飽和酵素活性上昇が抑制され新たな治療のターゲットとなる可能性がある。またこの検討のなかで新たな肝臓脂肪化抑制物質の候補が得られた。分枝鎖アミノ酸長期投与により肝腫瘍サイズ縮小が認められ時間的遅延がもたらされていることが示された。

ウイルス感染の指向性はレセプターで規定されていることが多いが、HCV 感染の臓器特異性はレセプターではなく、miR122 と脂質代謝系遺伝子の発現により規定されていることが明らかになった。今回、HCVcc の感染が可能になった様々な非肝臓系細胞株は肝外病変の発症メカニズムの解明に用いることのできる有用なツールになりうる。

HCV 感染患者の B 細胞 (CHC-B) においては、癌化抑制分子として知られている A20 と CYLD の発現が顕著に亢進していることを明らかにした。一方、HCV の full genome を B 細胞特異的に導入したマウスの B 細胞においては A20 の発現が顕著に減少していることを明らかにした。これらの結果から、CHC-B では、恒常的に発現亢進した A20 や CYLD が、RIP1 や IKK complex の活性を抑えているが、それらの発現/機能が低下あるいは消失することにより NF- $\kappa$ B 経路を阻害する機能を損なうため、無秩序な NF- $\kappa$ B 経路の亢進により癌化を誘導するのではないかと考えている。

昨年度までの結果から、マウスの血中

sIL-2R レベルと B リンパ腫発生の相関が示唆されていた。今年度は B リンパ腫発症に関連するシグナル伝達経路を解明するため、HCV 存在下で B 細胞と B リンパ腫で異なる発現を示す宿主因子を抽出し、修飾経路の解明を試みた。詳細なネットワーク解析を現在コンピューター解析で行っている過程であり、未だ最終的な結論は得られていない。しかしながら、これまでのところ B リンパ腫になるとみ、♀に関わらず発現が大きく変動する因子があり、HCV 病原性との関与が示唆される。B リンパ腫発症との関連については、今後の解析による解明が待たれる。さらに、共同研究者の水落らは、本マウスの B リンパ腫における A20 の低下を見いだしている。

HCV 感染に伴う宿主代謝の変化を調べるため、糖新生、解糖系のなどの律速酵素のプロモーターアッセイ、mRNA の TaqMan による定量、WB による定量なども行ったものの、時間経過に伴い大きく変動し、再現性が低かった。一方、メタボローム解析の結果は再現性が高く、安定的な結果が得られたことから、細胞内代謝の変化を解析するにはメタボローム解析が有効だということが確認された。

HBV への免疫反応によって誘導される酸化ストレス経路、NF $\kappa$ B や転写因子 STAT3 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唆された。

当初目的としていた C 型肝炎ウイルス研究に寄与するベクターの作製及び精製ロットでの供給、肝細胞癌に対する治療用ベクターの新規開発及び播種モデルマウスシステムの確立において一定の進展をみた。

C型肝炎の脂肪化は BMI と血清中性脂肪レベルに大きく反映されている。適正な減

量を行うことがC型肝炎の長期予後を改善させる可能性がある。

#### E. 自己評価

- 1) 達成度について：当初設定した目標について、ほぼ各項目について、3年目の目標通りに研究が遂行されたと考える。
- 2) 研究成果の学術・国際・社会的意義について：C型肝炎を全身疾患として捉えるという概念のもつ社会的な意義は大きいと考えられる。
- 3) 今後の展望について：HCV感染症と代謝系の相互作用について、臨床データ、基礎実験を通じて成果が期待される。

#### F. 結論

HCV感染症は肝臓、代謝、循環器等を含む全身疾患である。この様な認識をもって感染者の管理・治療に当ることにより、患者の予後、QOLを大幅に改善することが期待される。

#### G. 健康危険情報

なし

#### H. 研究発表

論文発表のみ

- 1) Yoshimi A, Yamamoto G, Goto T, Koike K, Kurokawa M. Hepatocellular carcinoma in cirrhotic liver with graft-versus-host disease. *Ann Hematol* 2012 Feb 9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22314841.
- 2) Inoue H, Yamazaki S, Shimizu M, Uozaki H, Goto T, Ohnishi S, Koike K. Liver injury induced by the Japanese herbal drug

kamishoyosan. *Gastroenterol Hepatol* (NY) 2011;7(10):692-695. PubMed PMID: 22298964.

- 3) Goto E, Masuzaki R, Tateishi R, Kondo Y, Imamura J, Goto T, Ikeda H, Akahane M, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Value of post-vascular phase (Kupffer imaging) by contrast-enhanced ultrasonography using Sonazoid in the detection of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2011 Dec 27. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22200940.
- 4) Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Sato T, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Yoshida H, Omata M, Koike K. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors. *Am J Gastroenterol* 2011 Dec 13. doi: 10.1038/ajg.2011.425. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22158026.
- 5) Ohki T, Tateishi R, Akahane M, Shiina S, Yamashiki N, Mikami S, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Inoo S, Ohtomo K, Omata M, Yoshida H, Koike K. Characteristics of hepatocellular carcinoma nodules newly detected by computed tomography during arteriography and arterial portography: preliminary report of a randomized controlled trial. *Hepatol Int* 2011 Aug 31. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22020826.
- 6) Enooku K, Tateishi R, Kanai F, Kondo Y, Masuzaki R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Evaluation of molecular

- targeted cancer drug by changes in tumor marker doubling times. *J Gastroenterol*. 2011 Sep 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21935635.
- 7) Takata A, Otsuka M, Kogiso T, Kojima K, Yoshikawa T, Tateishi R, Kato N, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Direct differentiation of hepatic cells from human induced pluripotent stem cells using a limited number of cytokines. *Hepatol Int* 2011 Feb 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21484132.
- 8) 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, Koike K. 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.
- 9) Goto T, Yoshida H, Tateishi R, Enooku K, Goto E, Sato T, Ohki T, Masuzaki R, Imamura J, Shiina S, Koike K, Omata M. Influence of serum HBV DNA load on recurrence of hepatocellular carcinoma after treatment with percutaneous radiofrequency ablation. *Hepatol Int* 2011 Sep;5(3):767-773.
- 10) Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, Matsuura Y. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J Virol* 2011;85:13185-13194.
- 11) Kudo Y, Tanaka Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Mohri D, Isomura Y, Seto M, Nakagawa H, Asaoka Y, Tada M, Ohta M, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue T, Maeda S, Shiina S, Yoshida H, Nakajima O, Kanai F, Omata M, Koike K. Altered composition of fatty acids exacerbates hepatotumorigenesis during activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Hepatol* 2011;55(6):1400-1408.
- 12) Ishizaka N, Hongo M, Sakamoto A, Saito K, Furuta K, Koike K. Liver lipid content is reduced in rat given 7-day administration of angiotensin II. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011;12(4):462-468.
- 13) Bertot LC, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, Koike K. Mortality and complication rates of percutaneous ablative techniques for the treatment of liver tumors: a systematic review. *Eur Radiol* 2011;21(12):2584-2596.
- 14) Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Yoshida H, Aoki T, Hasegawa K, Akahane M, Ohtomo K, Fukayama M, Koike K, Kokudo N. Diagnostic accuracy of  $\alpha$ -fetoprotein and des- $\gamma$ -carboxy prothrombin in screening for hepatocellular carcinoma in liver transplant candidates. *Hepatol Res* 2011;41(12):1199-1207.
- 15) Fujinaga H, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K, Koike K. Hepatocarcinogenesis in hepatitis C: HCV shrewdly exacerbates oxidative stress by modulating both production and scavenging of reactive oxygen species. *Oncology* 2011;81 Suppl 1:11-7.

- 16) Ikeda H, Tateishi R, Enooku K, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Kume Y, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ono T, Koike K, Yatomi Y. Prediction of hepatocellular carcinoma development by plasma ADAMTS13 in chronic hepatitis B and C. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(10):2204-2211. (2010IF 4.1)
- 17) Watanabe S, Enomoto N, Koike K, Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M; PERFECT Study Group. Cancer preventive effect of pegylated interferon  $\alpha$ -2b plus ribavirin in a real-life clinical setting in Japan: PERFECT interim analysis. *Hepatol Res* 2011;41(10):955-964.
- 18) Otsuka M, Takata A, Yoshikawa T, Kojima K, Kishikawa T, Shibata C, Takekawa M, Yoshida H, Omata M, Koike K. Receptor for Activated Protein Kinase C: Requirement for Efficient MicroRNA Function and Reduced Expression in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2011;6(9):e24359. Epub 2011 Sep 15. PubMed PMID: 21935400.
- 19) Uchino K, Tateishi R, Shiina S, Kanda M, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Omata M, Yoshida H, Koike K. Hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis: Clinical features and prognostic factors. *Cancer* 2011;117(19):4475-4483.
- 20) Takata A, Otsuka M, Kojima K, Yoshikawa T, Kishikawa T, Yoshida H, Koike K. MicroRNA-22 and microRNA-140 suppress NF- $\kappa$ B activity by regulating the expression of NF- $\kappa$ B coactivators. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;411(4):826-831.
- 21) Wakita T, Suzuki T, Evans MJ, Shimotohno K, Chayama K, Matsuura Y, Hijikata M, Moriishi K, Seya T, Enomoto N, Koike K, Kato N, Kanto T, Hotta H. Will There Be an HCV Meeting in 2020? Summary of the 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. *Gastroenterology* 2011 Jul;141(1):e1-5.
- 22) Nakagawa H, Hirata Y, Takeda K, Hayakawa Y, Sato T, Kinoshita H, Sakamoto K, Nakata W, Hikiba Y, Omata M, Yoshida H, Koike K, Ichijo H, Maeda S. Apoptosis signal-regulating kinase 1 inhibits hepatocarcinogenesis by controlling the tumor-suppressing function of stress-activated MAPK. *Hepatology* 2011;54(1):185-195.
- 23) Kojima K, Takata A, Vadnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, Kondo Y, Kang YJ, Kishikawa T, Kato N, Xie Z, Zhang WJ, Yoshida H, Omata M, Nepveu A, Koike K. MicroRNA122 is a key regulator of  $\alpha$ -fetoprotein expression and biologically aggressive behavior of hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 2011 Jun 7;2:338. doi: 10.1038/ncomms1345. PubMed PMID: 21654638. (on-line journal)
- 24) Tsukada K, Sugawara Y, Kaneko J, Tamura S, Tachikawa N, Morisawa Y, Okugawa S, Kikuchi Y, Oka S, Kimura S, Yatomi Y, Makuuchi M, Kokudo N, Koike