

rs8099917 遺伝子多型と Core aa70 置換との関係について検討した。代謝・宿主要因を含む 17 個の因子を用いて Core aa70 置換に関連する因子を多変量解析で検討した。Core region はダイレクトシーケンス法でアミノ酸配列を決定した。

(倫理面の配慮)

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、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) 前治療無効例の SVR は 27%。SVR に寄与する要因は、単変量解析(Fisher's exact probability test)で Core aa70(Wild) ($P=0.015$), 前治療反応性(partial response; RNA 量が 2 log 以上低下した無効例) ($P=0.077$) が重要な要因であった。特に、前治療無効例で Core aa70 に前治療反応性を組み合わせて SVR 率を検討すると Core aa70(Wild) かつ前治療 partial response の症例では SVR が 80% であった。一方、Core aa70(Mutant) の症例では当院から SVR 例は確認されなかった。

3 剤併用療法中の LDL-C は Core aa70(Mutant) よりも Core aa70(Wild) の方が高値を推移していた。更に、最終の治療成績から LDL-C の推移を見ると Non SVR 例よりも SVR 例の方が高値を推移していた。(検討 2) 脂質要因では、肝細胞脂肪化の程

度が強くなると Core aa70(Mutant) の頻度が上昇することが単変量解析(Chi-squared test)で確認された($P=0.022$)。また、Core aa70(Mutant) では中性脂肪が高値($P=0.015$)、LDL-C が低値($P=0.006$)を示すことも単変量解析(Mann-Whitney U test)で確認された。

糖代謝要因では、糖尿病合併例を除外した検討において HOMA-IR 値が高くなると Core aa70(Mutant) の頻度が上昇する傾向が単変量解析(Chi-squared test)で確認された($P=0.072$)。また、Core aa70(Mutant) では空腹時血糖が高値を示す傾向があることも単変量解析(Mann-Whitney U test)で確認された($P=0.050$)。

宿主要因の *IL28B* rs8099917 と Core aa70 置換との関係を検討すると、TT かつ Wild を示す症例の頻度(72%)は TT かつ Mutant(28%) より高率で、non-TT かつ Mutant(59%) も non-TT かつ Wild(41%) より高率であった(Chi-squared test) ($P<0.001$)。

最終的に Core aa70(Mutant) と関連する要因を多変量解析(multiple logistic regression analysis)で検討すると、*IL28B* rs8099917(non-TT) (OR6.4, $P<0.001$) が独立要因として抽出された。また、*IL28B* 遺伝子多型を除外した代謝要因のみで Core aa70(Mutant) と関連する要因を検討すると、中性脂肪(≥ 100 mg/dl) (OR1.6, $P=0.001$), LDL-C(< 85 mg/dl) (OR1.4, $P=0.037$), 空腹時血糖(≥ 126 mg/dl) (OR1.8, $P=0.042$) という脂質/糖代謝要因が独立要因として抽出された。

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 蛋白による肝細胞脂肪化・インスリン抵抗性といった脂質/糖代謝への影響やそれらを介した肝発癌への影響が報告されてきた。当施設の検討は、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、脂質/糖代謝に寄与する要因としてウイルス要因の Core アミノ酸置換が抽出されたことは HCV の肝病態への直接的な関与を示唆する重要な成績であるといえる。

Core aa70 置換は難治な前治療無効例に対する PEG-IFN/RBV/TVR 併用療法の治療効果予測因子としても重要であることが示された。治療中の LDL-C は難治要因の Core aa70 (Mutant) で低値を推移し、Non SVR でも同様に低値を推移していた。この結果は、難治要因の Core aa70 置換が脂質要因を介して治療抵抗性に関与することを示す成績と言える。また、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効果改善が期待されることを示す成績であると言える。

Core aa70 置換が脂質/糖代謝要因以外に *IL28B* 遺伝子多型とも関連している可能性が示された。特に、Core aa70 置換と *IL28B* の分布を考えると、*IL28B* に影響されながら Core aa70 の Major clone が経時的に変化している可能性が考えられる。この様に、Core アミノ酸置換と *IL28B* 遺伝子多型との関連や、Core アミノ酸置換の脂質/糖代謝要因への影響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。

E. 結論

(検討 1) 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。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。

(検討 2) 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。

F. 健康危険情報

今回の研究内容については特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 the *IL28B* gene affect viral dynamics during telaprevir, peginterferon and ribavirin treatment. *Intervirology*. 2011 Feb 16. [Epub ahead of print]
- 2) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, 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/NS5A region and genetic variation near *IL28B* gene affect treatment efficacy to interferon plus ribavirin combination therapy.

Intervirology. 2011 Jul 5. [Epub ahead of print]

2011;204:84-93.

- 3) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in hepatitis C virus core region predict hepatocarcinogenesis following eradication of HCV RNA by antiviral therapy. *J Med Virol* 2011;83:1016-22.
- 4) Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy. *Gut* 2011;60:261-7.
- 5) Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Chayama K, Kamatani N, Nakamura Y, Miyakawa Y, Kumada H. Influence of ITPA polymorphisms on decreases of hemoglobin during treatment with pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir. *Hepatology* 2011;53:415-21.
- 6) Chayama K, Hayes CN, Abe H, Miki D, Ochi H, Karino Y, Toyota J, Nakamura Y, Kamatani N, Sezaki H, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H. IL28B but not ITPA polymorphism is predictive of response to pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir triple therapy in patients with genotype 1 hepatitis C. *J Infect Dis*

H. 知的所有権の出願・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。

研究分担報告書

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

研究分担者 古庄 憲浩 九州大学大学院 感染環境医学 准教授
研究協力者 林 純 九州大学大学院 感染環境医学 教授
村田 昌之 九州大学病院 総合診療科 臨床准教授
小川 栄一 九州大学病院 総合診療科 助教

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)持続感染例に対するペグインターフェロン(PEG-IFN)α・リバビリン(RBV)治療効果とインターロイキン28B (IL28B)遺伝子多型、インスリン抵抗性について検討した。対象は当施設でPEG-IFNα・RBV治療を受けたHCV持続感染421例で、HCV 1型が328例、2型が93例で、IL28B遺伝子多型のTT群は296例（70.3%）、TG/GG群は125例（29.7%）であった。治療前に空腹時の血糖およびインスリン値から、インスリン抵抗性を評価するHOMA-IRを測定し治療効果と検討した。HCV genotype 1型および2型の治療終了24週間後の持続的HCV血症消失(sustained virological response, 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、IL28B TT例のSVR、100例、45.2%は、IL28B TG/GG例のSVR、17例、15.9%と比べ有意に高率であった。HCV 2型において、IL28B TT例のSVR、59例、78.7%は、IL28B TG/GG例のSVR、9例、50.0%と比べ有意に高率であった。多変量解析でHCV 1型のSVRに関連する因子として、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。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。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)持続感染例に対する抗ウイルス療法であるペグインターフ

ェロン(PEG-IFN)α・リバビリン(RBV)治療の効果予測因子としてインターロイキン28B (IL28B)遺伝子多型が関わる。IL28B

遺伝子はヒトの第19染色体上にあり、インターフェロンλをコードする遺伝子の近傍にあるため、その遺伝子多型はインターフェロン感受性と関わる。一方、HCVの持続感染によりインスリン抵抗性が惹起され、糖尿病を発症することが、基礎研究でも疫学研究でも明らかになっている。さらに、インスリン抵抗性を有するHCV持続感染例は抗ウイルス療法であるインターフェロン治療の効果が低いことも判明している。今回、HCV持続感染例に対するPEG-IFNα•RBV治療効果とIL28B遺伝子多型、インスリン抵抗性について検討した。

B. 研究方法

2005年から2009年までに当施設でPEG-IFNα•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。HCV 1型は48週間治療のみを、2型は24週間治療のみを対象とした。対象中には、肝癌治療例、脾摘例、高度飲酒例、Child B-C例、HBs抗原陽性例、HIV感染例などは含まれていない。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。計算式は、 $HOMA-IR = \frac{\text{空腹時血糖} \times \text{空腹時インスリン}}{405}$ 、で算出し治療効果と検討した。

治療効果判定は、治療終了24週間後の血清HCV RNA (TaqMan PCR) にて治療効果判定をした。

対象患者の背景を表1-1, 1-2, 1-3に示す。
表1. HCV持続感染421例の患者背景

対象421例の背景 (1)

因子	全体 421例	HCV 1型 328例	HCV 2型 93例	P値*
年齢 (歳)	59 (54-66)	59 (54-65)	58 (50-67)	0.2065
男性 例数 (%)	188 (44.7)	147 (44.8)	41 (44.1)	0.9004
BMI (kg/m ²)	22.8 (20.7-24.2)	22.8 (20.6-24.2)	22.9 (20.9-24.3)	0.4679
25 ≤ BMI < 30 例数 (%)	64 (15.2)	50 (15.2)	14 (15.1)	0.4268
BMI ≥ 30 例数 (%)	8 (1.9)	5 (1.5)	3 (3.2)	
ALT (IU/L)	56 (35-94)	53 (35-92)	69 (37-100)	0.0186
γGTP (IU/L)	38 (24-67)	38 (24-67)	35 (26-65)	0.7697
空腹時血糖 (mg/dL)	93 (86-102)	95 (88-102)	88 (83-99)	0.0037
空腹時IRI (μU/mL)	9.6 (6.2-14.6)	10.2 (6.2-15.2)	7.7 (6.3-11.1)	0.0018
HOMA-IR	2.35 (1.38-3.69)	2.56 (1.41-3.88)	1.72 (1.36-2.88)	0.0005
HbA1c (%) (NGSP)	5.6 (5.3-6.0)	5.6 (5.3-6.0)	5.6 (5.3-5.9)	0.4907
糖尿病 例数 (%)	9 (2.1)	5 (1.5)	4 (4.3)	0.1320

対象421例の背景 (2)

因子	全体 421例	HCV 1型 328例	HCV 2型 93例	P値*
TC (mg/dL)	162 (144-183)	161 (143-183)	168 (145-187)	0.5649
LDL-C (mg/dL)	89 (71-108)	88 (70-108)	95 (73-109)	0.1291
Hb (g/L)	136 (127-146)	136 (127-145)	136 (128-149)	0.6957
血小板数 (10 ⁹ /L)	155 (117-197)	154 (117-196)	159 (117-202)	0.8234
AFP (ng/mL)	5.2 (2.9-10.0)	5.5 (3.2-10.6)	4.5 (2.4-7.4)	0.8940
IV型コラーゲン (ng/mL)	152 (120-217)	154 (122-221)	145 (114-199)	0.5975
HCV RNA (log IU/mL)	6.2 (5.8-6.6)	6.2 (5.9-6.6)	6.1 (5.4-6.5)	0.0003

対象421例の背景 (3)

因子	全体 421例	HCV 1型 328例	HCV 2型 93例	P値*
IL28B (rs8099917)				
TT 例数 (%)	296 (70.3)	221 (67.4)	75 (80.6)	0.0236
TG 例数 (%)	118 (28.0)	102 (31.1)	16 (17.2)	
GG 例数 (%)	7 (1.7)	5 (1.5)	2 (2.2)	
肝病理				
Stage, F0/F1/F2/F3/F4, 例数	25/91/57/24/37	18/63/47/20/28	7/28/10/4/9	0.3474
Grade, A0/A1/A2/A3, 例数	1/81/139/113	1/56/106/113	0/25/33/0	0.0224
未検査, 例数	187	152	35	

(倫理面の配慮)

本研究においては、当病院の倫理委員会、ヒトゲノム遺伝子解析研究委員会の承認を得た。すべての患者へ十分なインフォームド・コンセントを行い、文書にて承諾を得た。

C. 研究結果

1. 持続的 HCV 血症消失(sustained virological 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。

2. IL28B 遺伝子多型と SVR の関連：

HCV 1 型において、IL28B TT 例の SVR、100 例、45.2%は、IL28B TG/GG 例の SVR、17 例、15.9%と比べ有意に高率であった(P<0.05)。同様に、HCV 2 型において、IL28B TT 例の SVR、59 例、78.7%は、IL28B TG/GG 例の SVR、9 例、50.0%と比べ有意に高率であった(P<0.05)。

3. SVR に関連する因子の解析

HCV 1 型において、肥満例 (25≤BMI<30)およびγGTP高値例が治療無効であった(結果1)。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(結果2)。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(結果3)。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(結果4)。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(結果5)。

HCV 型別のウイルス効果と背景因子 結果 (1)

因子	HCV 1 型			HCV 2 型		
	SVR 117 例	Non-SVR 211 例	P 値	SVR 68 例	Non-SVR 25 例	P 値
年齢 (歳)	57 (53-65)	60 (55-65)	0.0213	58 (50-66)	59 (49-67)	0.5993
男性, 数 (%)	56 (47.9)	91 (43.1)	0.4091	29 (42.6)	12 (48.0)	0.6453
BMI (kg/m ²)	22.5 (20.5-24.3)	23.1 (20.8-24.5)	0.4197	22.4 (20.4-24.2)	23.8 (22.1-24.4)	0.6956
25 ≤ BMI < 30 数 (%)	11 (9.4)	39 (18.5)	0.0172	10 (15.7)	4 (16.0)	0.9313
BMI ≥ 30 数 (%)	4 (3.4)	1 (0.5)	>0.9999	2 (2.9)	1 (4.0)	>0.9999
ALT (IU/L)	54 (36-102)	53 (35-88)	0.4498	72 (36-106)	56 (34-87)	0.4595
γGTP (IU/L)	28 (21-46)	52 (29-79)	<0.0001	35 (25-65)	45 (27-73)	0.7594

HCV 型別のウイルス効果と背景因子 結果 (2)

因子	HCV 1 型			HCV 2 型		
	SVR 117 例	Non-SVR 211 例	P 値	SVR 68 例	Non-SVR 25 例	P 値
HCV RNA (logIU/mL)	6.2 (5.5-6.7)	6.4 (5.9-6.6)	0.0111	6.0 (5.1-6.5)	6.2 (6.0-6.6)	0.0076
IL28B (rs8099917)						
TT, 数 (%)	100 (85.5)	121 (57.3)		59 (86.8)	16 (64.0)	
TG, 数 (%)	17 (14.5)	85 (40.3)	<0.0001	9 (13.2)	7 (28.0)	0.0137
GG, 数 (%)	0	5 (2.4)		0	2 (8.0)	
ITPA (rs1127354)						
CC, 数 (%)	79 (67.5)	148 (70.1)		51 (75.0)	14 (56.0)	
CA, 数 (%)	33 (28.2)	55 (26.1)	0.8843	16 (23.5)	10 (40.0)	0.2104
AA, 数 (%)	5 (4.3)	8 (3.8)		1 (1.5)	1 (4.0)	

HCV 型別のウイルス効果と背景因子 結果 (3)

因子	HCV 1 型			HCV 2 型		
	SVR 117 例	Non-SVR 211 例	P 値	SVR 68 例	Non-SVR 25 例	P 値
血小板数 (10 ⁹ /L)	163 (124-204)	150 (115-189)	0.0213	159 (119-202)	152 (97-202)	0.2062
AFP (ng/mL)	4.3 (2.8-6.5)	6.9 (3.3-12.9)	0.0013	3.9 (2.4-7.5)	5.1 (3.0-6.5)	0.6263
IV 型コラーゲン (ng/mL)	140 (113-197)	162 (125-264)	0.0012	144 (115-177)	181 (102-230)	0.6673
肝病理組織						
F0/F1/F2/F3/F4, 数	6/25/17/3/6	9/38/30/17/22	0.0676	5/22/9/3/6	2/6/1/1/3	0.8676
A0/A1/A2/A3, 数	0/20/39/1	1/36/67/12	0.0960	0/18/27/0	0/7/6/0	0.3765
未検査, 数	57	95		45	12	
Hb (g/L)	135 (127-145)	137 (127-145)	0.9236	135 (126-147)	138 (134-154)	0.0514

HCV 型別のウイルス効果と背景因子 結果 (4)

因子	HCV 1 型			HCV 2 型		
	SVR 117 例	Non-SVR 211 例	P 値	SVR 68 例	Non-SVR 25 例	P 値
空腹時血糖 (mg/dL)	91 (88-100)	97 (87-104)	0.0220	88 (82-99)	94 (83-105)	0.2062
空腹時インスリン (μU/mL)	6.7 (4.7-8.6)	12.9 (8.8-17.0)	<0.0001	7.0 (5.9-9.1)	11.0 (9.0-13.1)	0.0071
HOMA-IR	1.67 (1.07-2.07)	3.15 (2.22-4.31)	<0.0001	1.58 (1.25-2.37)	2.77 (2.16-3.94)	0.0034
HbA1c (%) (NGSP)	5.7 (5.3-5.9)	5.6 (5.3-6.0)	0.7305	5.6 (5.3-6.0)	5.5 (5.2-5.9)	0.4431
総コレステロール (mmol/L)	4.63 (3.78-5.20)	4.32 (3.93-4.89)	0.0812	4.65 (3.96-5.12)	4.58 (3.93-4.89)	0.7175
LDL-C (mmol/L)	2.64 (1.91-2.97)	2.35 (1.91-2.92)	0.4861	2.48 (1.99-2.92)	2.74 (2.02-3.39)	0.5744
糖尿病, 数 (%)	2 (1.7)	3 (1.4)	0.8399	1 (1.5)	3 (1.4)	0.3146

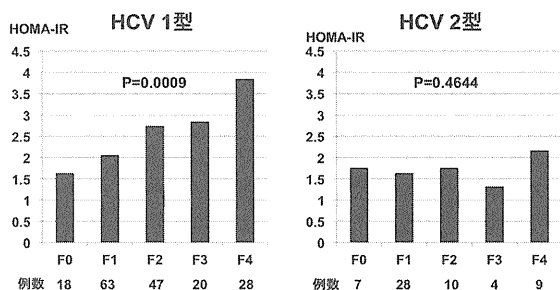
HCV型別のウイルス効果と治療因子 結果 (5)

因子	HCV 1型			HCV 2型		
	SVR 117例	Non-SVR 211例	P値	SVR 68例	Non-SVR 25例	P値
予定投与量 PEG-IFNa2b/RBV ≥80%≥80%, 数 (%)	21 (17.9)	9 (4.3)	< 0.0001	16 (23.5)	2 (8.0)	0.0003
治療中ウイルス効果 RVRcEVRcLVR, 数	29/58/30	3/44/70	< 0.0001	43/25/0	6/12/4	< 0.0001

3. インスリン抵抗性と肝線維化の関連：

HCV 1型は、病理学的に肝線維化が進行するに従ってHOMA-IRは有意に上昇したが、HCV 2型にその傾向は認められなかった(図1)。

図1. HCV型別・肝組織F分類別のHOMA-IR



4. SVR と関連する因子解析：

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。

結果のまとめ：

1. HCV 1型および2型ともにIL28B 遺伝子 TT 例は、TG/GG 例に比べ有意にSVR率が高率であった。

2. 肥満例、 γ GTP 高値例、高HCV RNA量例、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、空腹時インスリン高値例およびHOMA-IR 高値例、規定治療量が不十分例、早期ウイルス消失例などが治療効果の負の因子であったが、多変量解析にて、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。

HCV型別のウイルス効果因子 多変量解析

因子	治療前因子		治療前因子	
	OR (95% CI)	P値	OR (95% CI)	P値
IL28B (rs8099917) TT vs. TG/GG	5.97 (2.15-16.55)	0.0006	8.46 (2.46-29.05)	0.0007
HOMA-IR	0.65 (0.48-0.87)	0.0044	0.54 (0.37-0.79)	0.0014
予定投与量 PEG-IFNa2b/RBV ≥80%≥80%, 数 (%)	-	-	-	-

因子	治療前因子		治療前因子	
	OR (95% CI)	P値	OR (95% CI)	P値
IL28B (rs8099917) TT vs. TG/GG	7.66 (1.55-37.95)	0.0126	5.90 (1.01-34.36)	0.0485
予定投与量 PEG-IFNa2b/RBV ≥80%≥80%, 数 (%)	-	-	-	-

D. 考察

本研究は、HCV 持続感染例において、IL28B 遺伝子多型とインスリン抵抗性(HOMA-IR)の抗ウイルス療法に及ぼす影響についてHCV genotype別に検討した。抗ウイルス効果、SVRに対して、HCV 1型も2型感染例ともにIL28B 遺伝子 TT、つまり、感受性良好例は良好な抗ウイルス効果を認めた。一方、HCV 1型においてのみ、高HOMA-IR、つまり、インスリン抵抗性のある場合、IL28B 遺伝子多型とは独立して抗ウイルス効果は低下した。

HCV 1型は、HCV 2型に比べ、抗ウイルス効果が低い原因についてはいまだ明らかになっていない。一方、IL28B 遺伝子多型は、HCV 1型および2型ともに抗ウイルス効果に関与した。最近の知見として、Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3)

の細胞内高発現が、HCV 持続感染のインスリン抵抗性と抗ウイルス効果に関わることが示唆されている。肥満や HCV 感染自体が、SOCS3 の高発現を来し、そのため、細胞内のインターフェロニンシグナルの発現が低下と関与することが、治療効果が低下することにつながると報告されている。一方で、HCV 持続感染例が抗ウイルス療法で持続的に HCV 血症消失した場合、HCV 1 型ではインスリン抵抗性が改善するが、HCV 2 型では改善しないという報告もある。本研究で、HCV 1 型においてインスリン抵抗性は抗ウイルス効果に関わるが、HCV 2 型ではその現象を認められなかった点については、HCV genotype 差があることを示しており、今後 HCV genotype 特異性の研究が必要である。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Furusyo N**, Murata M, Ogawa E, Toyoda K, Ihara T, Ikezaki H, Hayashi T, Koga T, Kainuma M, Hayashi J. Ribavirin concentration in the later stages of 48-week pegylated interferon-alfa 2b plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C is useful for predicting virological response. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1127-1139.
- 2) Ikezaki H, **Furusyo N**, Ihara T, Hayashi T, Ogawa E, Toyoda K, Taniai H, Kainuma M, Murata M, Hayashi J. Abbott RealTime PCR Assay is useful for evaluating virological response to antiviral treatment for Chronic Hepatitis C. *J Infect Chemother* 2011; 17: 737-743.
- 3) **Furusyo N**, Walaa AH, Eiraku K, Toyoda K, Ogawa E, Ikezaki H, Ihara T, Hayashi T, Kainuma M, Murata M, Hayashi J. Eradication treatment of Helicobacter pylori infection for chronic hepatitis C patients. *Gut and Liver* 2011; 5: 447-453.
- 4) Ogawa E, **Furusyo N**, Murata M, Ohnishi H, Kazuhiro T, Tania H, Ihara T, Ikezaki H, Hayashi T, Kainuma M, Hayashi J. Longitudinal assessment of liver stiffness by transient elastography for chronic hepatitis B patients treated with nucleoside analog. *Hepatol Res* 2011; 41: 1178-1188.
- 5) Ogawa E, **Furusyo N**, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Dohmen K, Shimoda S, Hayashi

J. The Kyushu University Liver Disease Study Group. An evaluation of the adverse effect of premature discontinuation of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin treatment for chronic hepatitis C virus infection. J Gastroenterol Hepatol (in press)

2.学会発表

- 1) 古庄憲造, 林 純. 総合診療医が必要とするウイルス性肝炎の臨床について. 第2回日本病院総合診療医学会総会 教育講演、仙台市. 2011年2月
- 2) Furusyo N, Murata M, Ogawa E, Toyoda K, Hiramine S, Ikezaki H, Ihara T, Hayashi T, Okada K, Kainuma M, Kajiwara E, Hayashi J. Selective estrogen receptor modulator enhances the efficacy of pegylated interferon alpha plus ribavirin treatment for menopausal women with chronic hepatitis C. The 62nd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases (Late Breaking Abstract), San Francisco, USA, November, 2011.
- 3) 古庄憲造, 村田昌之, 小川栄一, 大西八郎, 古賀恒久, 池崎裕昭, 居原 毅, 林武生, 平峯 智, 竹嶋功人, 谷合啓明, 貝沼茂三郎, 澤山泰典, 林 純. 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における後期リバビリン血中濃度と抗ウイルス効果. 第85回日本感染症学会総会. 東京都. 2011年4月
- 4) 古庄憲造, 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 α ・リ

バビリン併用療法における後期リバビリン血中濃度と抗ウイルス効果. 第47回日本肝臓学会総会. 東京都. 2011年6月

- 5) 古庄憲造, 小川栄一, 村田昌之, 谷合啓明, 林 純. 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における後期リバビリン血中濃度と抗ウイルス効果. 第59回日本化学療法学会総会、札幌市. 2011年6月
- 6) 古庄憲造, 小川栄一, 野村秀幸, 林 純. 多施設共同研究における Hb 低値 C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン α 2b (PEG-IFN α 2b)・リバビリン(RBV)併用療法の効果. 第81回日本感染症学会西日本地方会. 北九州. 2011年10月

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

自己免疫疾患としての心血管疾患に関する研究

研究分担者 石坂 信和 大阪医科大学内科学講座内科学Ⅲ・教授

研究要旨：

C型慢性肝炎においては、代謝や免疫に異常を生じることについての報告がなされている。C型慢性肝炎の冠動脈疾患をむすぶ病態として、インスリン抵抗性の亢進などの代謝異常が介在している可能性があることをわれわれは報告した。一方、冠動脈疾患の発症・進展における免疫学的機序の関与については、基礎的な知見はあるものの、臨床面での知見は多くない。そこで、今回われわれは IgG4 関連の自己免疫と冠動脈病変の関連について検討した。組織学的に IgG4 陽性形質細胞の冠動脈周囲への著明な浸潤が証明された 2 例のうち 1 例では、ステロイド治療にもかかわらず冠動脈瘤は拡大傾向を示し、またもう 1 例では、冠動脈周囲に炎症性肥厚をともなっている部位に高度内腔狭窄が存在していた。冠動脈造影が施行された連続 286 例の血清 IgG4 値を測定したところ、血清 IgG4 値は、冠動脈狭窄の独立した危険因子であることが明らかになった。免疫学的異常が C 型慢性肝炎の冠動脈疾患をむすぶファクターであるかどうかについてはさらなる検討が必要である。

A.研究目的

慢性 C 型肝炎の症例では、動脈硬化性疾患が、血中の糖・脂質プロファイルなどから推定されるよりも高率に存在する可能性が指摘されている。われわれは、HCV 感染症例においては、糖・脂質プロファイルに表れにくいインスリン抵抗性が存在すること、糖代謝異常が肝疾患と心血管疾患を関連付けている可能性があることなどについて報告した。近年、HCV 感染により(自己)免疫における異常が生じる可能性が指摘されている。心血管疾患においても、基礎的なレ

ベルでは免疫・炎症機転が発症・進展に関与する可能性が示されているが、詳細はあきらかではない。そこで、今年度の研究では、IgG4 関連の(自己)免疫、という切り口から、免疫・炎症と冠動脈疾患を含む、心血管疾患と関連について検討した。

アプローチとしては、冠動脈病変と IgG4 関連疾患の関連が、血清学的・組織学的に証明されている症例について、症例ベースで詳細な検討を行う(検討 1)と、冠動脈造影が施行された症例において、血清中の IgG4 値と冠動脈狭窄の関連について解析する

(検討 2)という、2つのアプローチをとった。

B.研究方法

(検討 1)では、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。

(検討 2)では、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プレディクターであるかどうかについて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、三井記念病院と東京大学医学部、大阪医科大学の共同研究プロジェクトであるが、いずれの施設においても、倫理委員会の承諾を得ており、個人情報取り扱いにも細心の注意を払っている。

C.研究結果

(検討 1) 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、血管周囲には著名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。

(検討 2)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。

D.考察

IgG4 関連の自己免疫は、冠動脈病変との関連についての報告は多くない。今回の集中的に検討により、両病態間には interaction がある可能性が強く示唆された。検討 1 で証明された、特殊な症例以外でも、検討 2 で明らかにしたような、一般的な冠動脈狭窄症例においても、IgG4 の高値がバイオマーカーになっている可能性があることは注目に値する。C 型慢性肝炎における IgG4 関連自己免疫との関連は、散見するものの報告は多くない。今後、IgG4 関連疾患を含めた自己免疫学的機序が、C 型慢性肝炎と冠動脈疾患をむすぶ病態である可能性につ

いてさらに追及していく予定である。

E.結論

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れる。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

【論文発表】

- 1) 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 in press.
- 2) Terasaki F, Tsuji M, Kizawa H, Fujita S, Kanzaki Y, Kitaura Y, Ishizaka N. Sarcoidosis does not belong to or overlap the IgG4 related diseases based on the assessment of serum IgG4 levels in cardiac and noncardiac sarcoidosis. *Human Pathology*, 2011 in press.
- 3) Sakamoto A, Nagai R, Saito K, Imai Y, Takahashi M, Hosoya Y, Takeda N, Hirano K, Koike K, Enomoto Y, Kume H, Homma Y, Maeda D, Yamada H, Fukayama M, Hirata Y, Ishizaka N. Idiopathic retroperitoneal fibrosis, inflammatory aortic aneurysm, and inflammatory pericarditis - Retrospective analysis of 11 case histories. *Journal of Cardiology*, 2011 in press.
- 4) Tanigawa J, Daimon M, Murai M, Katsumata T, Tsuji M, Ishizaka N. IgG4-related coronary periarteritis in patients presenting with myocardial ischemia. *Human Pathology*, 2011 in press.
- 5) Kanzaki Y, Yamauchi Y, Okabe M, Terasaki F, Ishizaka N. Three-dimensional architecture of cardiomyocytes and connective tissues in hypertrophic cardiomyopathy--- a scanning electron microscopic observation. *Circulation*, 2011 in press.
- 6) Ishizaka N, Sakamoto A, Imai Y, Terasaki F, Nagai R. Multifocal fibrosclerosis and IgG4-related disease involving the cardiovascular system. *Journal of Cardiology*, 2011 in press.
- 7) Sakamoto A, Ishizaka N, Saito K, Imai Y, Morita H, Koike K, Kohro T, Nagai R. Serum levels of IgG4 and soluble interleukin-2 receptor in patients with coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta* 2012.;413(5-6):577-581.
- 8) Takahashi M, Shimizu T, Inajima T, Hosoya Y, Takeda N, Ishizaka N, Yamashita H, Hirata Y, Nagai R. A case of localized IgG4-related thoracic periarteritis and recurrent nerve palsy. *Am J Med Sci*. 2011;341(2):166-169.
- 9) Ishizaka N. Association between changes

in waist circumference versus those in body mass index, and changes in cardiometabolic risk factors. *Ningen Dock* 2011;25:1-5.

- 10) Ikutomi M, Matsumura T, Iwata H, Nishimura G, Ishizaka N, Hirata Y, Ono M, Nagai R. Giant tumorous lesions surrounding the right coronary artery associated with immunoglobulin-G4-related systemic disease. *Cardiology*. 2011;16;120(1):22-26.

【学会発表】

- 1) Sakamoto A, Ishizaka N, Saito K, Imai Y, Morita H, Nagai R. Serum immunoglobulin G4 levels is increased in patients with coronary artery disease but not in atherosclerotic aortic aneurysm. American Heart Association Scientific Sessions-2011, Orlando, FL, USA, 2011.
- 2) Sakamoto A, Ishizaka Y, Yamakado M, Koike K, Nagai R Ishizaka N. Does gain or loss in obesity parameters have significant association with the extent of progression of carotid intima-media thickening during one-year period? 第43回日本動脈硬化学会・学術集会、2011.
- 3) Sakamoto A, Ishizaka N, Saito K, Imai Y, Morita H, Nagai R. Association between serum IgG4 levels and abdominal aortic aneurysm in patients suspected to have coronary artery disease. 第75回日本循環器学会総会・学術集会、横浜、2011.
- 4) Sakamoto A, Ishizaka N, Saito K, Imai Y, Morita H, Nagai R. Relationship between

serum levels of IgG4 and soluble Interleukin-2 receptor and the history of bypass surgery and percutaneous coronary intervention. 第75回日本循環器学会総会・学術集会、横浜、2011.

- 5) 坂本愛子、石坂信和、齋藤 幹、今井 靖、永井良三. 胸・腹部大動脈症例における血清 IgG4、sIL-2R の検討. 第59回日本心臓病学会学術集会、神戸、2011.
- 6) 坂本愛子、石坂信和、齋藤 幹、今井 靖、永井良三. 320列冠動脈CT施行症例における石灰化スコアと血清sIL-2R、IgG4値との関連の検討
- 7) 第59回日本心臓病学会学術集会、神戸、2011.
- 8) 坂本愛子、石坂信和、齋藤 幹、今井 靖、永井良三. 心電図同期320列CT施行症例における上行大動脈掲載と血清sIL-2R、IgG4値の関連の検討. 第59回日本心臓病学会学術集会、神戸、2011.
- 9) 寺崎文生、木澤 隼、藤田修一、神崎裕美子、石坂信和. 心サルコイドーシス症例における血清IgG4値、組織IgG4陽性リンパ球に関する検討. 第59回日本心臓病学会学術集会、神戸、2011.
- 10) 谷川 淳、石坂信和、星賀正明、勝間田敬弘、花房俊昭. 急性大動脈症候群および非急性大動脈疾患における冠動脈疾患の合併. 第59回日本心臓病学会学術集会、神戸、2011.

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

脂質代謝に関する研究

研究分担者 森屋 恭爾 東京大学 教授

研究要旨：HCV 感染において脂質代謝変化がおきることを我々はマウスおよびヒトで示し肝発癌との関連を示してきた。また HCV 感染による肝臓脂質代謝変化は肝臓のみならず発現されていない筋肉において LDHa, PDK4 において mRNA レベルで発現低下が認められ HCV 代謝変化を軽減する分枝鎖アミノ酸（BCAA）投与によって回復することを確認した。

A. 研究目的

肝臓発癌において肝臓の脂肪化、および脂質組成変化、および酸化ストレスが病態の中心であることをC型肝炎マウスモデルで我々は示してきた。また近年問題になっているNASH（非アルコール性脂肪肝）における肝細胞発癌においても共通の病態が存在している報告が積み重ねられつつある。①今回HCV core蛋白による肝臓脂肪化の際に肝臓における解糖系亢進を認めているがHCV core蛋白が発現されていない

B. 研究方法

①HCV 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う。

（倫理面の配慮）

培養細胞系の実験であり特別な倫理面の拝領は必要としない

C. 研究結果

HCV core 蛋白による $\Delta 9$ 不飽和酵素活性上昇がマウスも出るのみでなく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投与によって抑制にされた。また分枝鎖アミノ酸による肝臓の脂肪化軽減を報告しているが、今回培養細胞においていくつかの物質を検討し有力な肝臓脂肪化抑制物質の同定がおこなわれた。

D. 考察

（LDHA）は嫌気性解糖の最終段階において、L-乳酸とNADのピルビン酸とNADHへの変換を触媒する。またPDK4（pyruvate dehydrogenase kinase4）もpyruvateからacetyl CoAの合成阻害を行い細胞内の代謝基質を糖質から脂質へ変化させる。PDK4遺伝子誘導は解糖系抑制を示しあり、HCVは自己の増殖に必要な脂質の場を $\Delta 9$ 不飽和酵素活性上昇によって獲得している

可能性がある。逆に PUFA によって活性抑制が認められ脂質合成も抑制される可能性がある。

E. 結論

培養細胞系においても $\Delta 9$ 不飽和酵素活性上昇が HCV core 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 core 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) LXR agonist increases apoE secretion from HepG2 spheroid, together with an increased production of VLDL and apoE-rich large HDL. Kurano M, Iso-O N, Hara M, Ishizaka N, Moriya K, Koike K, Tsukamoto K. *Lipids Health Dis*. 2011 Aug 5;10:134

2) Liquid chromatographic separation of proteins derivatized with a fluorogenic reagent at cysteinyl residues on a non-porous column for differential proteomics analysis. Koshiyama A, Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Yazawa I, Imai K. *J Chromatogr A*. 2011 Jun 3;1218(22):3447-52. Epub 2011 Apr 4.

3) Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. 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. *J Hepatol*. 2011 Mar;54(3):432-8. Dec;51(6):704-6.

2. 学会発表

なし

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

特記なし

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

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：肝臓特異的に発現している miR122 が HCV の翻訳および複製を増強することが知られている。そこで、HCV のレセプターを発現する種々の非肝臓系細胞株に miR122 を発現させて HCV の実験室株を感染させたところ、いくつかの細胞で HCV-RNA の複製が認められた。これらの非肝臓系細胞株では HCV が複製しているにもかかわらず、感染性粒子が産生されなかった。これらの非肝臓系細胞株では VLDL 関連蛋白質が発現していないことから、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。この細胞株では HCV の実験室株の感染により効率よく感染性粒子を産生した。以上の成績から、HCV の指向性は 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。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)の感染は、脂肪肝、肝硬変、肝細胞癌などの肝病変の発症だけでなく、リンパ腫やクリオグロブリン血症などの肝外病変にも関与することが知られている。しかし、HCV の肝臓に対する感染指向性や肝外病変の発症メカニズムは不明である。その理由として、HCV の感染培養系が肝癌細胞株である Huh7 細胞と HCV の実験室株である JFH1 ウイルスの組み合わせに限定されているからである。最近の研究により、肝臓特異的な micro RNA である miR122 が HCV-RNA の翻訳および複製を増強することが明らかになってきた。また、検討した細胞株の中では Huh7 細胞で最も miR122 の発現が高いことから、In vitro の感染増幅系成立に miR122 の発現が関与していることが予想された。今回、miR122 を発現させることによって HCVcc の感染増幅が可能になる非肝臓細胞株を樹立し、肝臓系細胞株との感染性の違いを検討することにより、感染指向性を規定する因子を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

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。

（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、個人情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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。

E. 結論

HCV 感染の肝臓指向性は miR122 と脂質代謝系遺伝子の発現によって規定されている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. *J. Virol.*, (in press).
- 2 Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, and Matsuura Y. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J. Virol.*, 2011; 85, 13185-13194.
- 3 Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, and Suzuki T. Role of the ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J Biol Chem.*, 2011; 286, 37264-37273.
- 4 Katoh H, Mori Y, Kambara H, Abe T, Fukuhara T, Morita E, Moriishi K, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through an interaction with viral proteins and RNA. *J. Virol.*, 2011; 85, 10976-10988.
- 5 Mori Y, and Matsuura Y. Structure of hepatitis E viral particle. *Virus Res.*, 2011; 61, 59-64.
- 6 Kambara H, Tani H, Mori Y, Abe T, Katoh H, Fukuhara T, Taguwa S, Moriishi K, and Matsuura Y. Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. *Virology*, 2011; 412, 211-219.
- 7 Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi M, and Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One*, 2011; 6, e15967.
- 8 Fukuhara T, Tani H, Shiokawa M, Goto Y, Abe T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, and Matsuura Y. Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus. *Microbes Infect.*, 2011; 13, 405-412.
- 9 Motomura T, Taketomi A, Fukuhara T, Mano Y, Takeishi K, Toshima T, Harada N, Uchiyama H, Yoshizumi T, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, and Maehara Y. The Impact of IL28B Genetic Variants on Recurrent Hepatitis C in Liver Transplantation : Significant Lessons from a Dual Graft Case. *Am. J. Transplant.*, 2011; 11, 1325-1329.
- 10 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, 432-438.
- 11 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., and 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.
 - 12 Yamamoto M, Ma J.S, Mueller C, Kamiyama N, Saiga H, Kubo E, Kimura T, Okamoto T, Okuyama M, Kayama H, Nagamune K, Takashima S, Matsuura Y, Soldati-Favre D, and Takeda K. ATF6 β is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18. *J. Exp. Med.*, 2011; 208, 1533-1546.
2. 学会発表
- 1 松浦善治: 基調講演: C型肝炎・肝癌制圧の分子基盤: 第47回日本肝臓学会総会、東京、6月2日-3日、2011.
 - 2 松浦善治: 特別講演: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関する宿主因子: 第48回日本ウイルス学会九州支部総会、門司、8月26日-27日、2011.
 - 3 松浦善治: 特別講演: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に関する宿主因子〜細胞内蛋白質分解システムの関与について〜: 第10回Hepatitis Expert Meeting、東京、8月27日、2011.
 - 4 Fukuhara T, Shiokawa M, Ninomiya A, Kambara H, Katoh H, Morita E, Wataru Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. : 第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日、2011.
 - 5 Ninomiya A, Abe T, and Matsuura Y. Induction of IFN by inoculation of recombinant baculovirus in mouse embryonic fibroblasts suppresses transgene expression. 同上
 - 6 Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki, Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. 同上
 - 7 Katoh H, Mori Y, Kambara H, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through the interaction with viral proteins and RNA. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日-16日、2011.
 - 8 Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ohara Y, Ono C, and Matsuura Y. miR122 participates in the determination of cell tropism of hepatitis C virus. 同上
 - 9 Tanaka T, Matsuura Y, and Kamitani W. Circumvention of the translational shut-off in cells infected with SARS coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA. 同上
 - 10 Tanaka T, Matsuura Y, and Kamitani W. Circumvention of the translational shut-off in cells infected with SARS coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA. The American Society for Virology, 30th Annual Meeting, University of Minnesota, Minnesota, July 16-20, 2011.
 - 11 Katoh H, Mori Y, Kambara H, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through the interaction with viral proteins and RNA. 同上
 - 12 Fukuhara T, Shiokawa M, Ninomiya A, Kambara H, Katoh H, Morita E, Wataru Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. 同上
 - 13 Abe T, Fukuhara T, Morita E, and Matsuura Y. Annexins negatively regulate HCV RNA replication. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, September, 8-12, 2011.
 - 14 Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Morita E, Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. 同上
 - 15 Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of HCV through an interaction with NS2. Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, and Aizaki H. 同上
 - 16 Kawakami K, Kasai H, Yamashita A, Kato I, Matsuura Y, Kusunoki M, and Moriishi K. Regulation of HCV replication by Hsp90 through FKBP8-dependent and -independent pathways. 同上
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

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

研究分担者 水落 利明 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長
研究協力者 楠 英樹 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

研究要旨： A20 は腫瘍壊死因子- α 刺激後急速に誘導されるタンパク質として同定された tumor necrosis factor- α induced protein 3 (TNFAIP3)の別名で、NF- κ B 経路の負の調節因子である。A20 は免疫応答の制御に重要な役割を担っており、さまざまな外的刺激に応じて起こる NF- κ B の過剰な活性化を制御することが知られている。最近、成熟 B 細胞腫瘍において、A20 遺伝子が体細胞変異ないし遺伝子欠失によって高度に不活化されていることが報告され、A20 の機能欠損によって引き起こされる NF- κ B シグナル伝達の制御異常が、一部の成熟 B 細胞リンパ腫の病因に関与していることが示唆されている。我々はこれまでの研究により C 型肝炎ウイルス (HCV) が肝細胞のみならず B 細胞にも感染することを明らかにした。一方、疫学データからは HCV 感染と B 細胞リンパ腫発症との関連が示唆されている。本研究では慢性 C 型肝炎 (CHC) 患者 B 細胞における A20 分子の発現動態を解析し、B 細胞リンパ腫発症機序について考察した。

A. 研究目的

HCV感染とB細胞リンパ腫発症については疫学的観点からその相関が強く示唆されているが、リンパ腫発症機序についての研究および考察は未だ十分に為されていない。本研究ではNF- κ Bシグナル伝達の制御異常がB細胞の癌化を誘導する可能性に注目し、NF- κ B経路の負の調節因子であるA20に焦点をあて、CHC患者末梢血B細胞におけるA20分子および、NF- κ B経路関連蛋白分子

の発現を解析することにより、HCV感染によるB細胞リンパ腫発症機序について考察することを目的とした。

B. 研究方法

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- κ B 経路関連蛋白分子の発現解析を行った。

(倫理面の配慮)

本研究に用いた CHC 患者血液についてはその譲渡側、受領側の双方にて、倫理委員会からの承諾を得て実験に使用した。

C. 研究結果

CHC 患者末梢 B 細胞 (CHC-B) で NF- κ 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 κ 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 (図 1A)。この結果から、CHC-B では、NF- κ 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- α 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 (図 1B)。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。現在、p65 と p50 の核移行に関して調べている。また一方で、IKB- α 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 (図 1B)、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- κ 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 (図 2)。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(図3)。A20はNF- κ 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- κ 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。

D. 考察

CHC-B においては A20 が恒常的に発現亢進しているが、この A20 の機能消失が B リンホーマ発症を誘導するのではないかと考えている。HCV-Tg マウスで得られた結果 (B リンホーマを発症した HCV-Tg マウスでは A20 の発現が極度に低下している) はこの仮説を支持するものであり、今後の HCV 感染 B リンホーマ発症患者検体の解析が待たれる。

HCV 感染 B 細胞からの B リンホーマ発