

201125010B

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21-23年度 総合研究報告書

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 21 ～ 23 年度 総合研究報告書

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 万人以上の方が C 型肝炎ウイルス (HCV)、また 120 万人以上の方が 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。

3 年間の研究の結果、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。肝脂肪化のリバビリン併用 Peg・インターフェロン療法に対する抵抗性との関連性は我が国でも示されつつあるが、我が国におけるやインスリン抵抗性と治療効果との関連性については多施設研究では否定的な結果が得られた。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。本研究班での検討によって、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。本報告書では、3 年間の研究の成果を記させていただいた。多くの疑問点が解明されたと考えている。まだ、いくつかの積み残された疑問点が存在するが、それは今後また検討されていくことを期待する。

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ます。

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21～23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
林 純	九州大学大学院医学研究院 感染環境医学分野 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型肝炎における脂質・鉄代謝異常と肝病態の相互作用に関する研究
岡上 武..... 43
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 61
3. C型肝炎ウイルス (HCV) 感染の動脈硬化症、心筋障害、抗ウイルス
効果とインスリン抵抗性に関する研究
古庄 憲浩..... 69
4. 代謝・免疫系の相互作用は肝炎と心血管疾患を結ぶ因子か
石坂 信和..... 75
5. 脂質代謝に関する研究
森屋 恭爾..... 83
6. 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の検索
松浦 善治..... 87
7. 慢性C型肝炎におけるB細胞リンパ腫発生機序の解析
水落 利明..... 95
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..... 107
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..... 117
10. HCV増殖と脂質の相互作用に関する研究
相崎 英樹..... 129

11.B 型肝炎ウイルスと免疫の相互作用	
中本 安成.....	135
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.....	139
13.C 型肝炎におけるインスリン抵抗性・肝脂肪化と臨床経過に関する研究 (班共同研究)	
四柳 宏.....	143
III. 研究成果に関連した刊行物 (総説抜粋)	151

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た。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研究を進めた。3 年間の研究の結果、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 複製の相互作用、オートファジーや miRNA と HCV 複製の関係等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は不明である。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、肝脂肪化のリバビリン併用 Peg・インターフェロン療法に対する抵抗性との関連性は我が国でも示されつつあるが、我が国におけるインスリン抵抗性と治療効果との関連性については多施設共同研究では否定的な結果が得られた。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。3 年間の検討によって、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当初予定された事項に関して解明が進展した。

研究分担者 (所属施設名・職名)

岡上 武 (大阪府済生会吹田病院・院長)	森屋恭爾 (東京大学医学部感染制御学・教授)
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)	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)
林 純 (九州大学大学院医学研究院 感染環境医学分野・教授)	水落利明 (国立感染症研究所血液・安全性研究部・室長)
石坂信和 (大阪医科大学循環器内科・教授)	小原恭子 (熊本大学医学薬学感染症阻止

学・特任教授、現鹿児島大学 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 180 万人の人が HCV に、約 120 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 14 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) 大阪府済生会吹田病院と京都府立医科大学消化器内科で肝生検を行ったC型肝炎患者を対象として、脂質、鉄代謝関連遺伝子の発現、鉄代謝を検討した。
- 2) C型慢性肝炎患者における 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虎の門病院におい

て検討した。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) 九州大学附属病院における 165 例の無症候性血清脂質異常症患者で、脂質降下剤のプロブコール (500mg/日、82 例) またはプラバスタチン (10mg/日、83 例) の内服治療の 2 群に無作為割付けし 2 年間の観察を行った。観察終了時の頸動脈超音波の頸動脈内膜中膜複合体厚 (IMT) の改善を主要エンドポイントとした。心疾患を指摘されることがない HCV 感染患者 90 例 (男性 43 例、女性 47 例、平均年齢 58.4 ± 5.4 才) を、性、年齢をマッチさせた対照 180 例と比較し解析を行った。PEG-IFN α ・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 (治療後持続的 HCV 血症消失、SVR) と検討した。
- 4) C 型慢性肝炎症例のインスリン抵抗性について、2004 年 1 月から 2009 年 12 月に、三井記念病院人間ドックを 2 年連続で受診した 3852 名 (男性 2541 名、女性 1311 名) を対象に検討した。また、HCV コア蛋白 (抗原) 陽性の症例を C 型慢性肝炎群と判断した。HCV コア蛋白陽性の慢性 C 型肝炎症例は 33 症例、陰性症例は、3819 症例であった。体格指数 (BMI) などの体格指数とインスリン抵抗指数 (HOMA-IR) 間

の関連、および、これらのパラメータの年次変化の間の関連について検討し、各パラメータの年次変化率は (「2 回目受診時の値」 - 「初回受診時の値」) / 「初回受診時の値」 $\times 100$ (%) で求め、以下の表記とした。

BMI の変化率 : %dBMI

HOMA-IR の変化率 : %dHOMA

IgG4 関連の自己免疫と冠動脈疾患の関連についての検討は、症例ベースの検討に加えて、冠動脈造影が施行され、血中バイオマーカーの測定に承諾が得られた症例を対象にして、血清 IgG4 値の測定を行うことで検討を行った。

- 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) コア蛋白の N 末端側にユビキチン蛋白質の C 末端を付加した融合蛋白質を bait として、ユビキチン蛋白質の N 末端を付加したヒト肝臓の cDNA ライブラリーを酵母膜ツーハイブリッド法でスクリーニングした。HCV レプリコン細胞や JFH1 ウイルスの感染細胞におけるオートファジーを検討するため、オートファゴソームのマーカである LC3 の性状と局在を、ウェスタンブロット法と共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。また、ライソソーム阻害剤を用いた Autophagy flux assay や Tandem fluorescent tagged LC3 (tfLC3) assay により、LC3 の蓄積機序を検討した。ATG4B のプロテアーゼの活性欠損変異体と ATG16L を用いてオートファジ

一の誘導を阻害した。空胞化した細胞内コンパートメントの性状を各種オルガネラマーカーやデキストランの取り込みを指標にして検討した。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- κ 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) ヒト肝がん細胞 (Huh7.5細胞) と同細胞由来の HCV サブゲノム RNA レプリコン複製細胞 (SGR)、HCV

フルゲノム RNA レプリコン複製細胞 (FGR) 及び HCV J6/JFH-1 感染細胞を用いて、2-deoxy-D-[1, 2- 3 H]glucose の取り込みを測定した。また、細胞表面での GLUT2 の発現をフローサイトメーターで解析した。ルシフェラーゼをレポーターとし、GLUT2 プロモーター領域の 8 種類の欠失変異体 (全長、 Δ C/EBP、 Δ CRE、 Δ AP-1、 Δ HNF-1 α 、 Δ CAAT、 Δ TATA、転写開始) プラスミドを作製した。その欠失変異体プラスミドを各細胞にトランスフェクションし、GLUT2 プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した。GLUT2 発現に関連する転写因子 HNF-1 α について mRNA 発現量を Real-time quantitative PCR (qRT-PCR)、タンパク発現量をウエスタンブロット法により測定した。また、上記細胞を IFN 処理した後に、HNF-1 α の mRNA 発現量、タンパク発現量を測定し比較検討した。GLUT2 プロモーターの抑制にいずれの 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。Huh7.5 細胞に HCV 蛋白質発現プラスミドの core、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B を各 1 μ g ずつと、GLUT2 発現プラスミド 0.5 μ g をコ・トランスフェクションし、それぞれの GLUT2 プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した。

- 10) 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 (40 μ M E-64d+20 μ M 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 (10 μ M clasto-lactacystin) を投与し、内在性 HNF-1 α 蛋白質量をウエスタンブロット法で比較した。
- 11) Huh7.5 細胞に HCV NS5A 蛋白質発現プラ

スミドまたはNS5B蛋白質発現プラスミドを各0.5, 1.25, 2.5, 5 μ gずつトランスフェクションし、内在性HNF-1 α 蛋白質量をウエスタンブロット法で比較した。

12) 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 α 蛋白質の量をウエスタンブロット法で比較した。その際、ライソゾーム阻害剤 (40 μ M E-64d+20 μ M 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 (10 μ M clasto-lactacystin) を投与し、HNF-1 α の蛋白質量を比較した。HCV NS5AとHNF-1 α の相互作用を免疫沈降法で解析した。

13) 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。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。上記の結果、感染細胞およびサブゲノム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。

14) 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。

15) 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 α -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 α 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。

16) (班共同研究1) 虎の門病院、済生会吹田病院、九州大学医学部附属病院 (関連施設を含む)、金沢大学医学部附属病院、東京大学医学部附属病院において PEG-IFN/RBV 療法を行われた Genotype (Serogroup) 1 685 例、Genotype (Serogroup) 2 109 例の計 794 例を後ろ向きに解析した。肝硬変及び明らかな糖尿病 (空腹時血糖 126mg / d L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。

- 17) (班共同研究 2) 虎の門病院、済生会吹田病院、九州大学医学部附属病院 (関連施設を含む)、福井大学医学部附属病院、東京大学医学部附属病院において肝生検が行われた C 型慢性肝炎 947 例を対象とした。得られた結果から 5%以上の肝細胞に脂肪化を認めるための条件を抽出し、単変量解析を行った。また、単変量解析で抽出された因子を用いて多変量解析を行った。線維化の進展により脂肪化が軽減し、脂肪化と肝病態との関連の解析が難しくなることを考慮し、線維化ステージが 0 から 2 までの症例のみを対象にした解析も行った。また、5%以上の肝細胞脂肪化と最もよく相関する BMI を ROC 解析を用いて求めた。
- 18) 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、個人情報情報を厳格に管理、保存する。

C. 結果

- 1) C 型肝炎における脂質・鉄代謝異常と肝病態の相互作用を宿主と HCV ウイルス因子に分けて検討した。初年度の研究では脂質代謝を中心に検討した。非肥満症例では肝組織中の脂肪を燃焼させる peroxisome proliferator-activated receptor α と細胞外へ輸送する microsomal triglyceride transfer protein の発現低下が肝脂肪化に重要であったが、肥満症例では脂肪を合成する sterol regulatory element-binding protein1c の発現亢進が重要と考えられた。次年度は鉄代謝制御因子である hepcidin を中心に検討を行った。血清フェリチンで補正した肝組織中の hepcidin 発現レベルは宿主因子 (肥満) に関係なく C 型肝炎患者で低下していた。非肥満の C 型肝炎症例では対照の B 型肝炎患者に比較して肝組織中の hemojuvelin や transferrin receptor 2 の発現が低下していたが、肥満の C 型肝炎症例では transferrin receptor 2 と bone morphogenetic protein 6 の発現が有意に低下していた。これらの遺伝子発現は hepcidin 合成に重要なことが知られている。最終年度は肝病態進展における鉄蓄積パターン (肝細胞と網内皮系細胞) と肝病態進展について検討した。肝細胞の蓄積は grade と弱い相関を認めしたが、網内皮系細胞の蓄積は stage、grade、steatosis と密接に相関していた。網内皮系細胞の蓄積症例は肝障害度や組織学的進展が鉄陰性症例や肝細胞の鉄蓄積症例に比較して高度であり、網内皮系細胞の蓄積は線維化進展と独立して相関して

いた。血清フェリチンから予測した網内皮系細胞蓄積のカットオフ値は肝細胞蓄積のカットオフ値に比較して高値であった。肝組織中の TNF- α 発現は混合型蓄積症例で最も高値であった。肝組織中の hepcidin 発現レベルは肝細胞蓄積群と混合型蓄積群で亢進していたが、2 群間で差は認められず、hepcidin を誘導する IL-6 の発現レベルに差はなかった。

2) Peginterferon/Ribavirin 併用療法難治要因の 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。新規治療の Telaprevir 併用療法の効果予測因子として有用であるばかりでなく、肝発癌を含む肝病態進行にも影響することが確認された。更に、Core アミノ酸置換は糖/脂質代謝(代謝要因)や *IL28B* 遺伝子多型(宿主要因)とも関係し、特に Core アミノ酸置換は *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も示唆された。Core アミノ酸置換と宿主・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) 1. HCV 感染および非感染においても脂質降下剤による血清脂質値は有意に低下した。2. 脂質降下剤による最大 IMT の改善率において、HCV 非感染例は-10.9%と有意に改善したが、HCV 感染例は-0.3%で改善を認めなかった。3. 治療薬群間において血清脂質値および最大 IMT 値の改善に差を認めなかった。4. 多変量解析にて、HCV 感染と肺炎クラミドフィラ感染が最大 IMT 値に關与する独立した負の因子で

あった。5. HCV 感染群は、対照群と比べ、糖尿病、脂質異常症の罹患率が低く、NT-proBNP 値が有意に高値であった。6. 心疾患の存在が疑われる NT-proBNP \geq 125pg/ml を認めたのは、HCV 感染群では 20%であり、対照群 0.6%に比べ有意に高率であった。7. 多変量解析にて、NT-proBNP \geq 125pg/ml に關与する因子として、HCV 持続感染と BMI 値が抽出された。8. 多変量解析にて、HCV 感染例における proBNP \geq 125pg/ml に關与する因子として、収縮期血圧値、中性脂肪値、血清 HCV RNA 量が抽出された。9. 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。10. 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。

4) C 型慢性肝炎と動脈硬化性疾患をむすぶメカニズムについて、代謝および免疫学的な異常の両面からのアプローチを試みた。C 型慢性肝炎においては、インスリン抵抗性が亢進している一方で、そのことが血糖や血清脂質のパラメータに反映されにくいことより、「隠れインスリン抵抗性」状態を呈していると考えられる。一方、健診受診者のデータの経年的変化を検討した研究から、体重の増減がインスリン抵抗性の増減に反映される程度は、

C 型慢性肝炎症例と非肝炎症例で差を認めないことが明らかになった。冠動脈疾患における免疫学的異常についての知識は、臨床の場において限定的である。そこで、IgG4 関連疾患の観点から、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 例では、ステロイド治療にもかかわらず拡大傾向を示す冠動脈瘤や、冠動脈周囲の偽性瘤に高度内腔狭窄が併存していた。冠動脈造影が施行された連続 286 例の検討では、血清 IgG4 値は、冠動脈狭窄の独立した危険因子であった。代謝異常に加えて、免疫学的な異常が 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、さらなる検討が必要である。

- 5) HBV, HCV, NASH いずれにも共通する肝発癌の病態として代謝変化、特に脂質代謝変化を検討し、HCV core 蛋白発現系で SCD-1 発現抑制によって肝臓の脂肪化、不飽和化抑制を認める物質としてピルビン酸、多価不飽和脂肪酸、FK506, スタチン、分枝鎖アミノ酸を同定するとともに。HCV core 蛋白と鉄が長期共存在により抗酸化作用を持つヘムオキシゲナーゼ 1 の誘導が抑制されることから瀉血による治療効果の基礎的データを得た。
- 6) 1. 酵母膜ツーハイブリッド法を用いて、HCV コア蛋白と相互作用する宿主因子を 11 種同定した。そのうちの 3 種がミトコンドリア蛋白（外膜に局在する Tom20、電子伝達系複合体 I のサブユニット NDUFS2、FADH2 や NADH2 を運ぶフラビン蛋白のサブユニット ETFB）であった。2. コア蛋白発現細胞からミトコンドリアを分画し、そのシトクロム C オキシ

ダーゼ活性を測定したところ、対照細胞に比べて有意な低下が見られたことから、コア蛋白の発現によるミトコンドリア外膜への何らかの障害が示唆された。3. コア蛋白と NDUFS2 を発現した細胞または NDUFS2 のみを発現した細胞からミトコンドリアを分画して NDUFS2 の取り込みを比較すると、コア蛋白存在下では NDUFS2 のミトコンドリアへ取り込み量の低下が見られた。これらの成績からコア蛋白の発現によりミトコンドリア蛋白の輸送障害が示唆された。4. ミトコンドリアへの蛋白輸送に関わる因子とコア蛋白の相互作用は免疫沈降法では確認できなかったことから、他の輸送経路の存在が示唆された。5. レプリコン細胞や JFH1 ウイルスの感染細胞ではオートファジー誘導のマーカーである、LC3 の C 末端のグリシンにホスファチジルエタノールアミンが共有結合した LC3-II が検出され、細胞質内に LC3 の蓄積が点状に観察された。また、レプリコン細胞におけるオートファジーの誘導は遺伝子型で程度が異なった。蓄積した LC3 はライソソームマーカーである LAMP1 や、オートファジーにより特異的に分解される p62 と共局在した。6. Autophagy flux assay と tfLC3 assay により、蓄積した LC3 の一部はオートファジーの成熟過程で阻害されていることが確認された。7. Atg4B のドミナントネガティブ体の導入によりオートファジーを抑制しても、HCV 増殖には影響しないが、細胞内に顕著な空胞が形成され、細胞死が誘導された。形成された空胞内には Lamp-1 やカテプシンが存在し、デキストランが取り込まれることから、ライソソーム/後期エンドソームが肥大化したものであると考えられた。空胞にはウイルスの蛋白や RNA は検出されなかった。8. 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。9.

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。10. 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。

7) 慢性 C 型肝炎 (CHC) 患者末梢血中の CD5 陰性 B 細胞がアポトーシスにより破壊されることで自己抗原を放出し、アポトーシス抵抗性の CD5 陽性 B 細胞が相対的に増加して自己抗原に対する自己抗体を産生することにより、自己免疫疾患発症へとつながる可能性を示した。CHC 患者の末梢血 B 細胞 (CHC-B) に HCV が感染していること、および遺伝子改変に関与する AID (activation-induced cytidine deaminase) や種々の癌化関連遺伝子の発現亢進が見られることを明らかにした。一方で、なぜ HCV が B 細胞に持続感染するのかという疑問が生じた。CHC-B では、自然免疫系に関与するセンサー/アダプター分子の発現が亢進していたが、IFN 遺伝子の転写に関わる IRF-3 の 2 量体形成および核移行は惹起されていなかった。この原因として、CHC-B では IRF-3 のリン酸化が抑制され、従って IFN 産生が抑制されていることにより HCV が持続感

染できる可能性を示した。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。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。そこで本研究では CHC-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。

8) C 型肝炎ウイルス (HCV) が引き起こす肝外病変の 1 つである B リンパ腫の発症には不明な点が多く残されていた。研究分担者らは、モデルマウスを樹立して解析を行った。このうち、HCV 構造蛋白質を持続発現する IRF-1 欠損マウス (CN2-IRF-1^{-/-}) はリンパ性増殖を発症した。HCV 遺伝子発現後、CN2 マウスの体内では IL-2, IL-10, IL-12 が発現上昇するのに対し CN2-IRF-1^{-/-} マウスでは IL-2, IL-10 の上昇は見られたが IL-12 の発現上昇は見られなかった。これらマウスの脾臓細胞を用いた試験管内での解析から、リンパ球の増殖形質獲得に重要なのは HCV のコア蛋白質並びに IL-2, IL-10 である事が明らかとなった。また、CN2-IRF-1^{-/-} マウスではリンパ性増殖から B リンパ腫に移行しない事から、この段階では IRF-1 並びに IL-12 が関与する可能性が示唆された。さらに、HCV 全長

遺伝子を B 細胞で発現するマウス (RzCD19Cre) も樹立し、HCV 遺伝子の B 細胞に対する直接作用を解析した。その結果、600 日以上立つと 25% のマウスで B リンパ腫を発症する事が明らかとなった。この B リンパ腫発症と関連する液性因子として可溶性の IL-2 レセプター α (sIL-2R α) を同定した。sIL-2R α の産生は B リンパ腫組織であると考えられた。B リンパ腫の発症に関与する宿主因子をマイクロアレイ解析で網羅的に検索したところ、♂、♀とも HCV により B 細胞で 1000 種以上の遺伝子の発現変動があり、腫瘍では 4000 種以上の遺伝子の発現変動が見られた。

9) C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染に 2 型糖尿病が有意に高率に合併することが臨床で知られている。HCV 感染に 2 型糖尿病が合併すると肝線維化、IFN 治療抵抗性、発がんなど病態に悪影響を及ぼすため、HCV 感染による糖代謝異常の分子機序を明らかにし、治療法開発のための分子基盤を構築することを目的とした。HCV レプリコン細胞および HCV J6/JFH1 感染系を用い、HCV 感染が肝細胞でのグルコーストランスポーター GLUT2 発現抑制、それに伴う糖の取り込み低下を引き起こすことを明らかにした。それは HCV により転写因子 Hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α) の発現が転写および翻訳後において抑制されることが原因であることを見出した。HCV 感染細胞において HNF-1 α 蛋白質の量が著明に減少するが、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され

た。HCV 蛋白質の中でも NS5A が HNF-1 α との相互作用を介して分解を誘導することを明らかにした。

10) 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、解析を行った。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超低比重リポ蛋白 (VLDL) の割合の増加という、HCV 増殖に好都合な環境が作り出されているものと考えられた。メタボローム解析の結果、感染細胞のエネルギー代謝および蛋白核酸合成は低下し、糖代謝は解糖系の亢進が認められた。これは、ミトコンドリア障害によるエネルギー産生の低下とウイルスゲノム複製によるエネルギー消費の亢進によるものと考えられ、感染細胞は解糖系を亢進させてエネルギー産生を行っている可能性が示唆された。このように、HCV 感染に伴う細胞内代謝の変化を解析することは C 型肝炎患者の病態の理解につながると期待できる。

11) 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。ヒト不死化肝細胞 (*in vitro*) において、HBV タンパク HBx はがん抑制遺伝子 (p53 および pRb) 経路を制御することにより細胞老化を克服し、また c-Myc と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した。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 (NFκB) ; p65/RelA の活性化は STAT3 と連動していた。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がん抑制遺伝子、酸化ストレス経路、転写因子との相互作用が、がん化に促進的に作用することが示された。

- 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 EF1α 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が、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) (班共同研究 1) C 型肝炎における代謝の適正なコントロール指標に関して多施設共同研究を行った。共同研究 1 は 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関する検討である。SVR に関与する因子として Genotype (Serogroup) 1 では HCV コア領域 70 番のアミノ酸配列が、Genotype (Serogroup) 2 では年齢が抽出されたが、インスリン抵抗性など代謝因子は抽出されなかった。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。
- 14) (班共同研究 2) 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 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。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

肥満の C 型肝炎症例では肝組織中の SREBP-1c の発現亢進が肝脂肪化に重要である。しかし、HCV 感染自体が PPAR α の発現を低下させて脂肪化を促進させる可能性がある。C 型肝炎では hepcidin 合成能の低下で鉄過剰を来すと考えられる。Hepcidin 合成低下には非肥満の症例では HFE2 や TFR2 の発現低下が関与し、肥満の症例では TFR2 や BMP6 の発現低下が関与していると推測された。C 型肝炎ではまず肝細胞に鉄が蓄積し、肝障害の進展とともに網内皮細胞へ鉄が蓄積していくと考えられる。網内皮系細胞の鉄蓄積は炎症性サイトカインの産生を増加させて肝病態を悪化させていると考えられる。

HCV-1b core アミノ酸置換は PEG-IFN/RBV/TVR 併用療法の治療効果予測因子として有用であるだけでなく、肝発癌を含む肝病態進行にも影響する。更に、Core アミノ酸置換は糖/脂質代謝(代謝要因)や *IL28B*(宿主要因)とも関係し、特に Core アミノ酸置換は *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も示唆された。Core アミノ酸置換と宿主・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。

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を期待される。

HCV 持続感染は、頸動脈アテローム性動脈硬化症に対する脂質降下剤治療の効果を妨げる。HCV 持続感染は、心筋障害を示すヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体 N 端フラグメントが高値であり、心不全との関連がある。HCV 持続感染例に対する抗ウイルス療法において、インターロイキン 28B 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。

C 型慢性肝炎症例と、冠動脈疾患を含めた動脈硬化病変をむすびつける可能性のある病態として、代謝異常、自己免疫の両面から検討を行った。BMI とインスリン抵抗性の関連や、体重の増減がインスリン抵抗性の増減に反映される程度は、C 型慢性肝炎症例でも、非肝炎症例と差を認めなかった。C 型慢性肝炎症例では、インスリン抵抗性の亢進は、血糖や血清の中性脂肪や HDL コレステロール値に反映されにくいものの、非肝炎症例同様に肥満対策が重要であることを示唆していると考えられた。

後半の検討では、IgG4 関連の冠動脈周囲炎を呈する存在すること、IgG 4 関連の免疫・炎症機転が冠動脈瘤や冠動脈狭窄の病態形成に関与する可能性について、明らかにすることができた。IgG4 関連を含めた免疫学的異常が C 型慢性肝炎症例と動脈硬化病変の間に介在する可能性については、更なる検討が必要である。

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。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。またこの検討の中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。

コア蛋白質を発現している細胞では、ミトコンドリアのシトクロム C オキシダーゼ活性の低下が観察されたことから、コア蛋白質の発現によるミトコンドリア外膜への何らかの障害が示唆された。コア蛋白質のミトコンドリアへの輸送機構とミトコンドリア機能の障害機序の解明により、慢性 C 型肝炎から肝細胞癌への進展を阻止できる新規治療法の開発が期待される。

オートファジーは HCV の増殖には直接関与しないことが示された。オートファジー関連遺伝子を欠損させたマウスでは肝障害が観察されることから、HCV の複製による不完全なオートファジーの誘導が病態発症に関与する可能性が考えられる。HCV 感染細胞でオートファジーの誘導を阻害すると、

細胞の空胞化に伴う細胞死が観察されることから、HCV は感染細胞にオートファジーを誘導することによって細胞死を回避し、持続感染を成立させている可能性が示唆された。

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。

本研究において、CHC 末梢血中の CD5 陽性 B 細胞と CD5 陰性 B 細胞とでは、両者の間にアポトーシス感受性（抵抗性）に大きな差があることが示された。この原因として、CHC においては CD5 陽性 B 細胞のアポトーシスを抑制するサイトカインレベルの上昇が考えられた。このような CHC における CD5 陽性 B 細胞数の相対的な増加が、自己免疫疾患の発症誘導に、さらには B-NHL 発症にも関与している可能性があり興味深い。B 細胞においては、HCV 感染により IFN 産生に代表される自然免疫能が抑制されているために、HCV が持続感染できることが示唆された。このような B 細胞における HCV の持続感染は、HCV がその増殖の場を肝細胞以外に保持するだけでなく、B 細胞リンホーマの発症にも関与している可能性があるだろう。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 B 細胞においては A20 の