

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18590749

研究課題名 (和文) C 型肝炎ウイルスにおける感染 B 細胞内 IRES 依存性翻訳制御及び病原性発現機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis for mechanism of IRES dependent translation and pathogenesis of hepatitis C virus in B cells

研究代表者 伊藤敬義 (ITO TAKAYOSHI)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：50317517

研究成果の概要：HCV は肝細胞トロピズム以外にリンパ球系細胞など臓器トロピズムの異なる HCV が存在する。このことが肝外病変発症と関連する可能性がある。本研究では C 型肝炎患者の末梢血リンパ球から B 細胞を分離し、B 細胞中で複製する HCV をスクリーニングした。また、その B 細胞トロピズムを持つ HCV の全塩基配列を解析した。また、B 細胞トロピズムを持つ HCV の患者内での病原性について検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：内科、消化器内科、感染症、ウイルス、HCV

1. 研究開始当初の背景

HCV感染者におけるHCVの肝外臓器、特にリンパ球系細胞への感染及びその病原性発現についての報告が散見する中、リンパ球細胞内でのHCV増殖、翻訳制御機構、生体への影響は明らかになっていない。我々の臨床検体を用い

たpreliminaryな検討でも、HCV感染者25名中20名(80%)にB細胞への感染を認め、CD4(+)T細胞には8名(32%)、CD8(+)T細胞にも10名(40%)のHCV感染が確認された。そこで特に頻度の高いB細胞へのHCV感染により、患者内での病原性発現やB細胞機能への影響の有無を

検討する。HCV感染者ではクリオグロブリン血症や悪性リンパ腫などのリンパ増殖性疾患との関連が報告され、またHCVレセプターの一つとされているCD81はB細胞の活性化促進性コレセプターであるCD19、CD21と複合体を形成する。この事実は無症候であってもHCV感染によってB細胞活性化が生じ、免疫グロブリンのclonalityが生じている可能性があり、本研究で同時に検討する。また、このリンパ球系細胞へのHCV感染がIFN療法のSVRに影響するかについても解析する。最近HCV感染後の自然治癒患者やIFN療法後のSVR患者において、肝細胞やリンパ球中、またマクロファージ中にHCV RNAが残存する例が報告されている。このようなoccult HCVが細胞内でどのような分子機序で複製、蛋白発現を制御しているか、またウイルスの再活性化や悪性リンパ腫などの発生に関与するかなどについても解明されていない。HCVのB細胞感染が実際に成立しているか、またその複製制御機構、B細胞感染が惹起する病原性についての研究が急務である。

2. 研究の目的

B細胞内でHCVが複製しているかを明らかにし、肝細胞での複製制御機構との差異について感染HCVの塩基配列を比較検討する。更にIRESなどの配列に違いがあればB細胞内での翻訳制御機構に特異な制御機構があるかを検討する。更にB細胞感染があれば、HCV感染と悪性リンパ腫や混合型クリオグロブリン血症などのリンパ増殖性疾患(LPD)発症に関連があるかなどを検討する。

3. 研究の方法

(1) 患者B細胞中HCV RNA 定量

インフォームドコンセントを得たC型慢性肝炎患者75例の全血30mlから末梢血単核球(PBMC)を分離した。Affinity beadsを用いてCD4、CD8、CD19陽性細胞にそれぞれ分離し、CD19陽性細胞分画をB細胞分画とした。またC型慢性肝炎患者で瀉血療法を行っている患者から100-400mlの全血からPBMCを分離し、市販のB細胞アイソレーシ

ョンキットを用いてB細胞を分離した。得られたB細胞中、またCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞中のHCV RNA量をreal time RT-PCR法で定量した。同時にマイナス鎖HCV RNAも測定した。

(2) 患者B細胞中HCV RNA陽性の患者9例、陰性患者2例の血清から全長HCV RNAを4領域に分けてRT-PCRで増幅し、塩基配列を決定した。HCV RNA陽性B細胞のうち1例(HCV-MS株)ではマイナス鎖HCV RNAが検出され、同細胞でのHCV複製が確認されている。また全例がHCV 1型感染者である。

(3) 患者B細胞のclonality解析とリンパ球増殖疾患(LPD)マーカー測定

患者75例についてB細胞中免疫グロブリン重鎖遺伝子の超可変領域と、個々のB細胞で塩基長の異なることが報告されているCDR3を含む領域のmRNAをRT-PCRで増幅し、このPCR産物をP32で末端ラベルしたprimerとTaq polymeraseを用いて伸長反応した。伸長産物を電気泳動し、オートラジオグラフィーで泳動距離を解析した。同様に健常者28例についても解析した。LPDマーカーとしてクリオグロブリン血症(Cg)、リウマチ因子(RF)、C4、CH50を測定した。

(4) B細胞増殖因子(BAFF/BLyS)及びAPRILの血清中濃度の測定

HCV感染者95例[慢性肝炎(CH)46、肝臓のない肝硬変(LC without HCC)11、肝臓(HCC)25、非ホジキンリンパ腫(NHL)13例]の血清BAFF、APRILをELISA法で測定した。更にIFN治療後SVR患者12例の血清BAFF、APRILの推移を解析した。B型慢性肝炎36例、自己免疫性肝炎41例、原発性胆汁性肝硬変症72例、健常者19例についての血清APRILも同様に検討した。

4. 研究成果

(1) C型慢性肝炎患者におけるB細胞中HCV RNAとLPDマーカー異常との関連
C型慢性肝炎患者75例を検討し、CD19で分離

されたB細胞中HCV RNA陽性率は48例(64.0%)と他のリンパ球分画(CD4⁺, 11.5%; CD8⁺ T細胞, 13.5%)と比較して優位に高頻度であり、かつウイルス量も有意に高値だった。またB細胞中HCV RNA量が高値を示す患者16例からB細胞中マイナス鎖HCV RNAを解析すると4例でマイナス鎖HCV RNAが検出された。このことからB細胞トロピズムを持つHCVの存在が示された。

また、この75例でLPDマーカー及びB細胞clonalityなど何らかの異常を示す患者はC型肝炎患者の約70%と高頻度だった。これらの異常と関連する因子の探索として、単変量及び多変量解析を用い、B細胞中HCV RNA陽性が独立した寄与因子として抽出された。HCVのB細胞感染、あるいはHCVとB細胞とのassociationがLPD発症に関与することが示唆された。

(2) B細胞トロピズムを持つHCVの全長塩基配列の解析 B細胞中HCV陽性患者と陰性患者の血清中HCV RNA全塩基配列を比較してみると、両者に大きな差異は認めなかった。HCVレセプターの一つと考えられ、B細胞上に高発現しているCD81の結合領域はE2蛋白領域に2箇所存在する。同結合部位の配列はCD81 binding domain 1で4箇所、CD81 binding domain 2で1箇所、variationに富む領域が確認された。しかし、B細胞トロピズムを持つHCVに特徴的な配列は確認されなかった。ただB細胞中HCV RNA高値を示す患者のHCV株で5' UTRに変異を高頻度を示す株が存在し、今後翻訳高率などの検討を行う予定である。

(3) C型肝炎患者の血清BAFF、APRIL濃度

血清BAFFレベルはHCV感染者でコントロール群に比較して有意に高値を示した(HCV感染者群 $1,560.5 \pm 153.1$ vs 健常者群 891.4 ± 55.6 pg/ml, $P=0.0006$)。このBAFFレベルはB細胞中HCV RNA陽性とは相関しなかった。また他のLPDマーカー、B細胞clonalityと

も相関せず、独立した異常であることが示された。血清BAFFとの関連因子として血小板数の低値(15万/ μ l以下)が単変量解析で有意に相関した。またCH群よりLC群で高値を示し、肝病変の進展との関連が示唆された。他の慢性肝疾患での検討では同じウイルス性肝炎のB型肝炎では健常者群と差がなかったが、自己免疫性肝炎(AIH)や原発性胆汁性肝硬変症(PBC)では高値を示した(AIH: $1,084.8 \pm 77.6$, $P=0.04$, PBC: $1,970.3 \pm 202.6$ pg/ml, $P<0.0001$)。血清APRILはHCV感染者群と健常者群に有意差はなかった。血清BAFFとAPRILには単回帰解析で逆相関する傾向があり、BAFFレベルの上昇がAPRILレベルを低下させる傾向があった。病態別に見てもCH群、LC群、HCC群、NHL群で血清APRILに有意差はなかった。IFN治療後ウイルス学的持続陰性化(SVR)患者12例ではIFN投与直後より血清BAFFが高値になり治療終了後は前値より低下する傾向が見られた。血清APRILは対照的にIFN中、治療前と比べ有意に低下した。非HCV慢性肝疾患患者においても血清BAFFは健常者群に比べ有意に高値を示した。APRILはどの疾患群も健常者群と差がなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

1) Uchikoshi M, Ito T, Shimozuma Y, Inokuchi T, Morikawa K, Nozawa H, Shimazaki T and M.Imawari. Evaluation of Serum B Cell Activating Factor (BAFF/BlyS) as an Immunological Marker for Lymphoproliferative Disorders Associated with Chronic Hepatitis C. The Showa University Journal of Medical Sciences, 2009 in press. 査読有

2) Inokuchi M, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Morikawa K, Nozawa H,

Shimazaki T, Hiroishi K, Miyakawa Y and Imawari M. Infection of B Cells with Hepatitis C Virus for the Development of Lymphoproliferative Disorders in Patients with Chronic Hepatitis C. J Med Virol.81:619-627,2009 査読有

3) Doi H, Hiroishi K, Shimazaki T, Eguchi J, Baba T, Ito T, Matsumura T, Nozawa H, Morikawa K, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Imawari M. Magnitude of CD8+ T-cell responses against hepatitis C virus and severity of hepatitis do not necessarily determine outcomes in acute hepatitis C virus infection. Hepatology Research. 39:256-265, 2009 査読有

4) Hiroishi K, Ito T and Imawari M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. Journal of Gastroenterol Hepatol. 23 :1473-1482, 2008

5) Inokuchi T, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Nozawa H, Shimazaki T and Imawari M. Clonal Expansion of B cells is identified in Japanese Patients Infected with Hepatitis C virus. The Showa University Journal of Medical Sciences, 20:29-39. 2008 査読有

6) Sakaki M, Hiroishi K, Baba T, Ito T, Hirayama Y, Saito K, Tonoike T, Kushima M and Imawari M. Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune liver disease and chronic viral hepatitis. Hepatology Research 38: 354 361. 2008 査読有

〔学会発表〕(計 9件)

1) Uchikoshi M, Ito T, Shimozuma Y, Inokuchi T, Morikawa K, Nozawa H, Shimazaki T and M.Imawari. Evaluation of Serum B Cell Activating Factor (BAFF/BLyS) as an Immunological Marker for Lymphoproliferative Disorders Associated with Chronic Hepatitis C. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (San Francisco 2008.11).

2) Inokuchi M, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Nozawa H, Shimazaki T, Hiroishi K, Miyakawa Y and Imawari M. Infection of B Cells with Hepatitis C Virus for the Development of Lymphoproliferative Disorders in Patients with Chronic Hepatitis C. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (San Francisco 2008.11).

3) 打越学, 伊藤敬義, 井口桃子, 森川賢一, 下間祐, 井廻道夫. HCV関連リンパ増殖性疾患における血清B細胞増殖因子(BAFF/BLyS)、第44回日本肝臓学会総会(松山 2008.6)

4) 打越学, 伊藤敬義, 井口桃子, 森川賢一, 下間祐, 井廻道夫. HCV関連リンパ増殖性疾患における血清B細胞増殖因子(BAFF/BLyS)、第94回日本消化器病学会総会(福岡 2008.5)

5) 井口桃子, 伊藤敬義, 森川賢一, 打越学, 野沢妃佐子, 島崎とも江, 井廻道夫. C型慢性肝炎患者におけるB細胞HCV感染とリンパ増殖性疾患発症についての検討、第94回日本消化器病学会総会(福岡 2008.5)

6) 井口桃子、伊藤敬義、打越 学、野沢妃佐子、島崎とも江、井廻道夫. C型慢性肝炎患者におけるB細胞HCV感染とHCV関連リンパ増殖性疾患マーカーに対する抗ウイルス療法の効果、第43回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン(2007, 5.31-6.1) ワークショップ1「肝炎ウイルス研究の進歩」

7) 井口桃子、伊藤敬義、打越 学、森川賢一、野沢妃佐子、島崎とも江、井廻道夫. C型慢性肝炎患者におけるB細胞HCV感染と免疫グロブリン超可変領域遺伝子clonality発症の解析、第47回京都肝セルバイオロジー研究会、ホテルオークラ京都 (2007, 7.14)

8) 伊藤敬義、井口桃子、打越学、野沢妃佐子、島崎とも江、井廻道夫. C型慢性肝炎患者におけるリンパ球系細胞へのHCV感染及びその病態に及ぼす影響とIFN療法への反応性、第42回日本肝臓学会総会、シンポジウム1「難治性ウイルス肝炎に対する新しい治療の基礎的臨床的検討」(京都 2006.5)

9) 井口桃子、伊藤敬義、打越学、野沢妃佐子、島崎とも江、井廻道夫. C型肝炎ウイルス感染者におけるB細胞へのHCV感染とHCV関連clonalityの検討、第42回日本肝臓学会総会、(京都 2006.5)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 敬義 (ITO TAKAYOSHI)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号 50317517

(2)研究分担者

井廻 道夫

昭和大学・医学部・教授

研究者番号 70134228

(3)連携研究者

なし