

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 22 年度～平成 24 年度

課題番号：22590750

研究課題名（和文） C 型慢性肝炎の鉄過剰が誘導するミトコンドリア障害とウイルス排除機構の解析

研究課題名（英文） Association of between HCV induced mitochondria dysfunction and viral response by interferon in hepatic iron overloaded

研究代表者 是永匡紹 (MASAAKI KORENAGA) 独立行政法人国立国際医療研究センター

研究者番号：70420536

研究成果の概要（和文）：HCV の全長遺伝子を発現する transgenic mouse(TgM)では、酸化ストレス亢進を誘導し、hepcidin 発現低下により肝内鉄過剰を形成し、更なる鉄負荷によって肝発癌が促進する。一方、in vitro では、HCV と鉄負荷が誘導する酸化ストレスにより HCV 活性が抑制されることも明らかにした。酸化ストレスの関与と治療効果を明らかにするため PegIFN/RBV 投与前、2,4,12 週目に尿中 8OHdG を測定し、EVR 例(15 例)と LVR 例(10 例)とで比較検討を行うと EVR 例では、LVR 例に比べて IFN 投与開始 2 週目に有意な 8OHdG 上昇が確認された。鉄負荷長期モデルでは逆に、抗酸化剤投与によりミトコンドリア機能が改善し IFN β 産生が亢進することも明らかになり、IFN 治療中に抗酸化作用がある UDCA など投与を控えるべきであるが、HCV 蛋白が肝内鉄過剰を誘導し、酸化ストレスを亢進させることで HCV 増殖を control している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that HCC developed through the oxidative stress in iron-overloaded transgenic mice expressing the hepatitis C virus (HCV) polyprotein (HCV TgM) (Gastroenterology;130: 2006) Oxidative stress is one of the pathophysiologic mechanisms involved in HCV-associated liver injury and hepatocarcinogenesis. The aim of this study was to clarify whether iron-induced oxidative stress affects HCV replication in full genomic HCV replicon cells. Methods: Various concentration of Fe(II)SO₄, Fe(III)(NO₃)₃, FeCl₂, FeCl₃, Holo-transferrin apo-transferrin or IFN α was added to the genome length HCV-RNA replicon (OR6) cells. Using reporter assay system, HCV replication was assessed. We also measured cellular reactive oxygen sepsis (ROS) production by DCF assay and the expression levels of HCV core protein by western blot. Result : Ferrous and ferric ions significantly inhibited HCV replication and the levels of core protein at the concentration of iron less than 1 μ M. However, only ferrous ions increased ROS production, suggesting that ferric ions may have inhibited HCV replication through its cytotoxicity Additional IFN treatment showed additive inhibition of HCV replication. Conclusion: Although iron- induced oxidative stress accelerates hepatocarcinogenesis, it may work as an anti-HCV factor in patients with chronic hepatitis C. These data suggested that we should avoid touse antioxidant agents during IFN therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,800,000 円	540,000 円	2,340,000 円
平成 23 年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
平成 24 年度	700,000 円	210,000 円	910,000 円
年度			
年度			
総計	3,500,000 円	1,050,000 円	4,550,000 円

研究分野：基盤研究一般（C）

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は本邦の悪性新生物による死因の第4位を占める疾患であり、その8割はHCV感染に起因する。Peg-IFN/RBV併用療法の登場により持続ウイルス排除(SVR)率は飛躍的に向上したが、本邦に多いgenotype Ib・高ウイルス量症例ではSVRは50%にすぎない。難治の指標として注目されたコア蛋白70番目の変異(Intervirolgy 2005;48:372-380)もPeg-IFN/RBVの延長投与にて有意差が消失しており、ウイルス側以外からIFN抵抗性に関わる因子・機序、特に、高齢・女性の治療低下の原因を明らかにすることが急務である。最近、宿主因子として、IA28BがIFN治療抵抗性因子として報告され(Nat Genet. 41 1105-9. 2009)「ウイルスが減少しない」原因となるも、投与後に再燃する理由は未だ明らかにされていない。

一方、C型慢性肝炎では鉄が過剰に蓄積し、その結果生じたフリーラジカルにより組織傷害や核DNA障害を惹起し肝細胞癌の増悪因子となり、除鉄(瀉血や鉄制限食)療法により肝細胞癌発生が抑制されている(J. Gastroenterol 2007 42 830-836)。最近、この除鉄療法がIFN治療効果を高めることが報告され(Dig Dis Sci 2008; 53: 815-22)、肝臓における鉄過剰状態がIFN抵抗性の因子のひとつである可能性が示唆された。

また、欧米ではSOCS3(Suppressors of cytokine signaling3)発現亢進を介して肥満、耐糖能異常を有する症例も治療抵抗性とされる(Am. J. Pathol. 2004;165; 1499-1608, Gut; 2006;55:529-535)が、本邦では肝臓内の鉄・脂質・糖といった代謝異常がどの様にIFN治療に影響を及ぼすかは、未だに結論が出ていない。

2. 研究の目的

代謝異常と治療抵抗性を解明するために、HCV自然排除にIFNシグナルが重要であること(Nature2005;437: 1167-1172)やその経路に存在する細部内ウイルスセンサーRIG-1とアダプター分子IPS-1の比が高い程Peg-IFN/RBVの治療効果が低下するという報告(Gastroenterology 2008; 134: 1396-1405)に着目した。IPS-1はミトコンドリア外膜に存在し、RIG-1と結合することでIFNシグナルを伝達するが、すでにHCVコア蛋白がミトコンドリア外膜に存在し、ミトコンドリア機能障害を来すとことを確認しており(JBiolChem. 2005, 280:37481-8)、また鉄負荷HCV TgMではミトコンドリア障害が増強することも確認しておりIPS-1に直接的または間接的に影響を与え、抗ウイルス効果に抑制的に働く可能性が示唆される。本研究では、

C型慢性肝炎におけるミトコンドリア障害と鉄過剰状態がHCV排除のための自然免疫(=IFNシグナル)に影響を与えるか否かに解明することを目的とする。

3. 研究の方法

I HCV replicon 増殖細胞を用いて、HCV自然排除機構(インターフェロン誘導機構)を、細胞膜の外側で感染を検知するTLR3(Toll-Like Receptor 3)による検知システムと感染肝細胞内での検知に關与するRIG-1による検知システムを解析する

II. 肝発癌を来たす鉄負荷なしコントロールマウス、鉄負荷なしHCV TgM、鉄負荷HCV TgMの3群を設定し、1、3、6ヶ月齢にてマウス肝を摘出し、鉄負荷によるミトコンドリア機能障害(酸化ストレス亢進)やIPS-1発現の解析を行い、その障害機構を解明する。

4. 研究成果

結果① 第一鉄投与により酸化ストレスは亢進し、HCV増殖は抑制される

Fe(II)SO₄、Fe₃(III)(NO₃)₃ 3 負荷 48 時間後、HCV 増殖は抑制され(図1)、その現象はFeCl₂、FeCl₃、を用いても同様であった(図2)。第二鉄(3価鉄)でHCV増殖が低下した理由は不明であるが、第一鉄(2価鉄)を投与した時に酸化ストレスの亢進が確認された。2価鉄は、Fenton 反応を誘導し、強力なラジカルを産生するが観察範囲内では細胞増殖抑制作用は認めなかった(図3)また、鉄負荷 24、72 時間後も濃度依存性に HCV 増殖抑制を認め、IFN 併用することで、相加的に HCV 増殖抑制は促進された(図4)。

図1 Fe(II)SO₄/Fe(II)(NO₃)₃はHCV増殖を低下させる

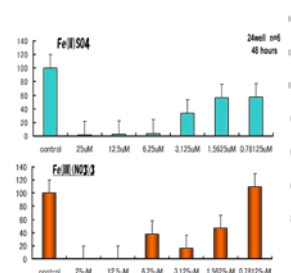


図2 FeCl₂/FeCl₃はHCV増殖を低下させる

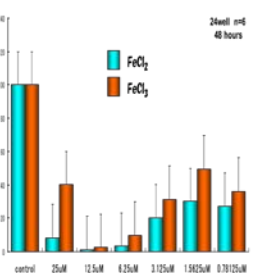


図3 Fe(II)SO₄/FeCl₂負荷時に酸化ストレス亢進が確認されるが、細胞増殖抑制効果は認められない

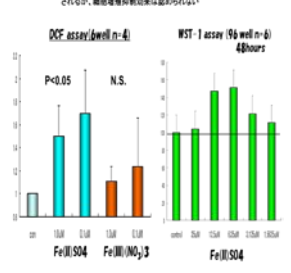
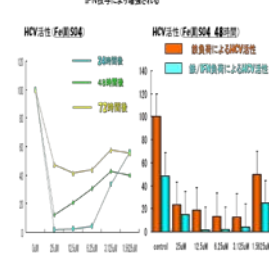
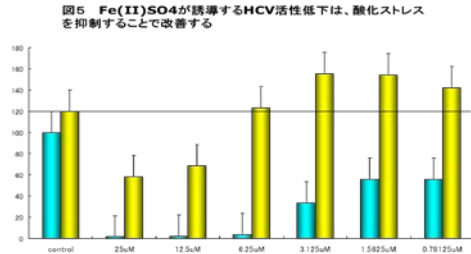


図4 Fe(II)SO₄負荷時にHCV増殖抑制効果はIFN併用により増強される



結果② 酸化ストレスを抑制することで、HCV 増殖は亢進する

2価鉄負荷が及ぼす酸化ストレスが、HCV 増殖を抑制することが明らかになった為、CoQ(10uM)を2価鉄と併用投与すると HCV 増殖抑制効果はcancelされ、鉄負荷を行っていない replicon 細胞では HCV 増殖の増強が確認された(図5)。



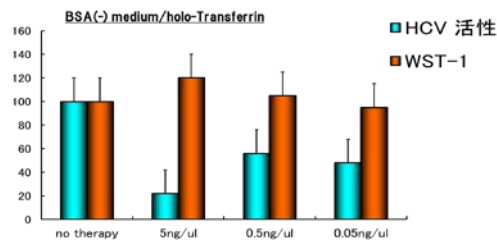
結果③ tranferin 鉄と無血清培地を用いても HCV 増殖は抑制される

また、これまでの投与した鉄剤が肝細胞に取り込まれ、肝内鉄過剰を形成し酸化ストレスを亢進しているか否かは不明である為、holo-transferin 鉄(0.05-5 ng/ul)を血清は除いた培養中に投与し、同様に replicon 細胞の HCV 増殖を測定したところ、前述の検討同様に HCV 活性が抑制された(図6)

結果④ 酸化ストレスの一過性亢進はウイルス排除に必要である

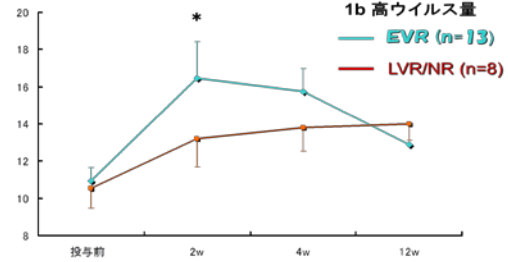
これまでの結果で、酸化ストレス亢進によって HCV 増殖が抑制され、抗酸化剤投与により HCV 増殖が亢進するという事が判明したが、これは臨床面でどの様な意義をもつのであるか?そこで、PegIFN/RBV 投与中ウイルス排除が早期に行われた early viral responder (EVR) 症例とそれ以外の late viral responder (LVR)、non-viral responder (NVR)

図6 血清をfreeにしても、HCV活性は鉄負荷によって抑制される



症例において、投与中の酸化ストレスマーカー(尿中 8OHdG)を経時的(2, 4, 12 週)に測定すると、EVR 例では一過性に尿中 8OHdG が上昇し、その後低下するのに対し、LVR/NVR 例では経過中に変化を認めなかった(図7)。この事は、ウイルス排除にはやはり酸化ストレスが必要であり、ウイルス排除治療中には抗酸化作用を有する薬剤の併用は避けるべきと推測された。

図7 EVR症例において、投与中の尿中8OHdGが上昇している ~PegIFN/RBV投与中の尿中8OHdGの推移~



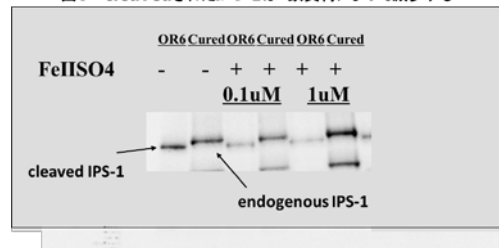
結果⑤ 長期間の酸化ストレス亢進や鉄過剰は IFN 治療に影響する

これまでは in vitro の研究であったが、長期間、酸化ストレス亢進状態では IFNβ 産生能が低下しており、抗酸化剤投与によりその産生が回復することが明らかになり、治療中に酸化ストレス亢進は抗ウイルスに悪影響を及ぼすも、治療前に十分な抑制が必要であることが確認された。

結果⑥ 宿主は鉄過剰が誘導する酸化ストレスによって、ウイルス増殖を調節する可能性がある

最後に2価鉄負荷に伴う MAVS とミトコンドリア障害について確認した。replicon 細胞の IPS-1 は、HCV によりミトコンドリアから cleavage されていた。鉄負荷による HCV 増殖抑制効果により、その発現は減少していたが、HCV が増殖していない cured 細胞の様ミトコンドリア外膜の発現(endogenous)は確認されなかった(図8)。また、ミトコンドリア複合体 I 発現も鉄負荷により抑制されており、宿主側はミトコンドリアから酸化ストレス亢進させ、HCV 増殖を control する可能性が考えられた。また、鉄負荷による HCV 増殖抑制は MAVS 非依存性であることが推察された。この酸化ストレスの亢進により HCV のウイルス量が増殖することは避けられるものの、ミトコンドリア障害は継続し、酸化ストレスは亢進し肝発癌促進へと繋がるのではないかと考えた。

図8 cleavedされたIPS-1は鉄負荷によって減少する



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 9 件)

1. Nishida N, Korenaga M, Mizokami M他 33 名 24 番目 Genome-wide association study confirming association of HLA-DP

with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean PLoS One. 7(6): e39175 2012;

2. Sawai H, Korenaga M, Mizokami M他 32 名 21 番目 No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. BMC Med Genet. 19;13:47 2012

3. Ito K, Korenaga M, Mizokami M他 17 名 9 番目 LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. Hepatology 56:1448-56. 2012

4. Korenaga M, Hidaka I, Hino K, 他 7 名 1 番目 A glycyrrhizin-containing preparation reduces hepatic steatosis induced by hepatitis C virus protein and iron in mice. Liver Int.:31(4):552-60. 2011

5. Nishina S, Korenaga M, Hino K, 他 6 名 2 番目 Hepatitis C virus protein and iron overload induce hepatic steatosis through the unfolded protein response in mice Liver Int.:30(5):683-92 2010

6. 是永匡紹, 是永圭子, 日野啓輔, 溝上雅史. 症例 13 メトホルミンと瀉血が有効だった症例. 症例に学ぶNASH/NAFLDの診断と治療—臨床で役立つ症例 32. 岡上武, 米田正人, 江口有一郎, 角田圭雄, 中島淳編集, 診断と治療社, 東京, 2012.

7. 是永匡紹, 溝上雅史. 5.C型肝炎の肝発癌と発癌抑制(インターフェロン少量/ウルソ/SNMC/BCAAなど). 肝炎ウイルス—B型・C型 インフォームドコンセントのための図説シリーズ. 熊田博光編集, 医薬ジャーナル社, 大阪, p100-105, 2012.

8. 是永匡紹, 溝上雅史. 肝硬変に対する治療. 最新 C型肝炎 治療薬の使い方. 芥田憲夫, 斉藤聡, 角田圭雄編集, 診断と治療社, 東京, p46-54, 2012.

9. 是永匡紹, 日野啓輔, 溝上雅史. HCV感染における鉄過剰異常, 酸化ストレスと分岐鎖アミノ酸. 肝がん・肝硬変に対する栄養療法の新時代. 市田隆文, 平野 克治監・編集, アークメディア 東京, p16-19. 2012

[学会発表] (計 4 件)

1. Korenaga M, Korenaga K, Nishina S, Yoshioka N, Tomiyama Y, Hara Y, Sugiyama M, Nishida N, Murata K, Masaki N, Mizokami M, Hino K. Anti-interferon- α neutralizing antibodies interact with viral responses to interferon in patients with hepatitis C virus infection bearing interferon sensitive IL28B single nucleotide polymorphisms. The 63rd

annual meeting of the American association for the study of liver diseases (AASLD). Boston, U.S., Nov, 2012.

2. Korenaga M, Nishina S, Korenaga K, Tomiyama Y, Hara Y, Sakai Y, Shimonaka Y, Mizokami M, Hino K. Supplementation with branched-chain amino acids improves HCV-induced iron metabolic disorder via upregulation of antioxidant potential by restoring mitochondrial complex I function in iron overloaded transgenic mice expressing HCV polyprotein The 63rd annual meeting of the American association for the study of liver diseases (AASLD). Boston, U.S., Nov, 2012.

3. Korenaga M, Korenaga K, Nishina S, Tomiyama Y, Hino K :Dietary supplementation with branched-chain amino acids reduces hepatic iron accumulation induced by hepatitis C virus proteins and iron overload in mice. The 62nd annual meeting of the American association for the study of liver diseases (AASLD). San Francisco, U.S. Nov, 2011.

4. Korenaga M, Korenaga K, Nishina S, Tomiyama Y, Hino K Oral branched-chain amino acid supplementation reduces oxidative stress and interacts with iron metabolism in patients with hepatitis C virus-related advanced liver fibrosis—a pilot study-. The 62nd annual meeting of the American association for the study of liver diseases (AASLD). San Francisco, U.S. Sep, 2011. The 63rd annual meeting of the American association for the study of liver diseases (AASLD). Boston, U.S., Sep, 2012.

5. 是永匡紹, 仁科惣治, 是永圭子, 日野啓輔 IFN 少量長期投与はHCV 関連肝発癌における鉄代謝異常を改善する ワークショップ 10 肝細胞癌の発症と再発予防を目指した慢性肝炎の治療 第 48 回日本肝臓総会 2012 年 6 月 (金沢)

6. 是永匡紹 是永圭子 日野啓輔 テーラーメイド医療時代における抗IFN α 抗体測定の意義 第 39 回日本肝臓学会西部会 シンポジウム 1 テーラーメイド医療時代のC型肝炎治療戦略 2011 年 12 月 (岡山)

7. 是永匡紹 是永圭子 日野啓輔 C型慢性肝疾患の鉄代謝異常に対するBCAA顆粒投与の有効性 2011 年 10 月 (福岡) 第 15 回日本肝臓学会大会 第 53 回日本消化器病学会大会 シンポジウム 14 代謝性・遺伝性肝疾患研究の進歩

8. 是永匡紹, 仁科惣治, 田中志保, 是永圭子, 日野啓輔 BCAA顆粒はHCVtGmにおける肝内鉄過剰と酸化ストレスを抑制する 第 47 回 日本肝臓学会総会 ワークショップ 1

「代謝・酸化ストレスの場としての肝臓」

2011年6月（東京）

9. 是永匡紹, 田中志保, 佐々木雄亮, 下中靖, 日野啓輔 鉄負荷 HCVtgM における hepcidin25 発現とサイトカインの網羅的解析 第97回日本消化器病学会総会 2011年5月（東京）

10. 是永匡紹, 池田正徳, 日野啓輔 肝内鉄過剰とミトコンドリア障害が誘導する酸化ストレスはC型肝炎ウイルス(HCV)増殖を抑制する 第14回日本肝臓学会大会 第52回日本消化器病学会大会 パネルディスカッション7 代謝異常（金属代謝を含む）からみたC型肝炎の病態解析 2010年10月（横浜）

3.

〔図書〕（計3件）

1. 是永匡紹, 仁科惣治, 富山恭行, 田中志保, 是永圭子, 溝上雅史, 日野啓輔 C型慢性肝疾患の鉄代謝異常に対するBCAA顆粒投与の有効性, 酸化ストレスと肝疾患<第8巻>. 坪内博仁編集, 株式会社嵯峨野 p95-102. 2012

2. 是永匡紹, 是永圭子, 鈴木淑子, 寺本房子, 仁科惣治, 日野啓輔 肥満・脂肪肝の栄養管理を向上させる工夫— 一体組成計・間接熱量計・フリーラジカル測定器を用いた試み— 酸化ストレスと肝疾患<第8巻>. 坪内博仁編集, 株式会社嵯峨野 p181-189. 2012

3. 是永匡紹, 池田正徳, 加藤宣之, 日野啓輔 過剰鉄とミトコンドリア障害が誘導する酸化ストレスはC型肝炎ウイルス増殖を抑制する

酸化ストレスと肝疾患 第7巻. 2011:41-46.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

是永 匡紹 (MASAAKI KORENAGA)

研究者番号：70420536

(2) 研究分担者

日野 啓輔 (KEISUKE HINO)

研究者番号：80228741

是永 圭子 (KEIKO KORENAGA)

研究者番号：60420535

(3) 連携研究者

()

研究者番号：