

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590992

研究課題名(和文) 血中HCV-RNA陰性化後のHCV感染持続を把握する非侵襲的方法の探索

研究課題名(英文) Invasive metabolic markers for evaluation of host factor on the pathological progress of hepatitis C patients

研究代表者

松崎 靖司 (Matsuzaki, Yasushi)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：50209532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性C型肝炎(HCV)ウイルス感染に対する治療効果や肝硬変に至る肝病態進展に関わる宿主側の代謝因子を評価するために、健常者、HCV患者、インターフェロン治療導入HCV(HCV+IFN)患者、肝硬変(LC)患者の血清にて、脂質代謝を中心に代謝関連物質をLC-MS/MS装置にて測定した。その結果、HCVでは脂肪酸酸化は不活性化、コリン代謝は活性化し、LCでは大きく反転する事が明らかとなった。しかし、IFN治療による変化が生じる代謝マーカーはなかった。本研究では、この宿主側の代謝変動が、HCVからLCへの病態進展へ深く関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Present study examined noninvasive metabolic markers in serum by LC-MS/MS system to evaluate host-factor related to the development from hepatitis C to liver cirrhosis. Sera were collected from healthy control, hepatitis C virus (HCV) infected patients, HCV patients with interferon therapy (HCV+IFN) and liver cirrhosis (LC) patients. In the results, the inactivated beta-oxidation and activated choline metabolism in the HCV patients would be largely inverted in the LC patients. In the examined metabolic markers, the influences of IFN therapy on the host-factor could not be detected. The metabolic fluctuations of the host side may suggest to be deeply involved in the progress from chronic hepatitis C to liver cirrhosis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：hepatitis C liver cirrhosis interferon metabolic marker host factor

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎(HCV)の感染は、慢性肝炎から肝硬変、肝癌へと進展する。この肝病変の進展を抑制するためには、HCVを排除する事が最も本質的な治療法である。そのHCVを排除する原因療法として、インターフェロン(IFN)が用いられており、リバビリン(RBV)と併用する事で、高い著効率が得られる様になった。しかし、著効の判定を受けた患者でも、後に再燃し、肝癌にまで進展するケースが少なからず見られる。このHCV陰性化判定のウイルス再増殖は、肝病態進展の抑制において重要な課題である。我々の先行研究において、HCV感染患者では、総コレステロール(Cho)、HDL-Cho、LDL-Cho、中性脂肪(TG)の全てにおいて、血清濃度が有意に減少している事が明らかとなっている。そのため、HCV感染により肝脂質代謝に異常が生じている可能性がある。そのため、肝病態進展に關与する要因として、宿主細胞の代謝環境の変化が挙げられる。したがって、血中代謝マーカーの変動を觀察する事で、HCVの活動状態や病態進展状態が評価できれば、慢性肝疾患の治療への貢献が大いに期待される。

ここ数年において、HCV感染の治療法は大きく進歩した。研究開始当初で主流であったIFN/RBV療法に加え、抗ウイルス薬であるプロテアーゼ阻害薬が開発された。その結果、IFN/RBV療法との3剤併用やプロテアーゼ阻害薬の経口投与のみ(IFNフリー療法)などの新しい治療法が発展し、非常に高い確立でのHCVの排除が可能となり、HCV肝炎は、治る時代になりつつある。また、新しい治療法では、HCVの再燃の確立も非常に低くなった。そのため、今研究では、肝硬変や肝癌への病態進展と宿主側の代謝環境の変化との関連性の評価についても、研究内容を広げて検討した。

2. 研究の目的

HCV治療効果や肝病態の進展に關わる宿主側の代謝因子を評価するために、高感度HPLC-MS/MS装置を用いて、非侵襲的血中代謝マーカーの変動を檢討する事を目的とした。

3. 研究の方法

血液サンプル収集として、東京医科大学茨城医療センターに、通院、入院された慢性C型肝炎患者(HCV; 55名)、IFN療法を受診された慢性C型肝炎患者(HCV+IFN; 55名)、肝硬変患者(LC; 32名)から血清を採取した。また、健康者コントロールとして、健康診断受診者(Control; 48名)より採取した血清を用いた。血清は、分析まで、-20°Cにて冷凍保存した。

保存血清を用いて、ケトン体(3-ヒドロキシ酪酸:3HB)、カルニチン(CT)、アセチルカルニチン(ACT)、3-ヒドロキシイソ酪酸(3HIB)、3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸(3HIB)、2-ヒドロキシ酪酸(2HB)、タウリン(TAU)、N-アセチルタウリン(NAT)、コリン(Choline)、トリメチルアミノオキシド(TMAO)の濃度を、LC-MS/MS分析装置にて定量した。

保存血清5μLを、安定同位体が標識された内部標準を含む95%アセトニトリル水と混合し、除タンパク処理を行った。除タンパク液を、80°Cにて蒸発乾固後、1%ギ酸水にて再溶解し、LC-MS/MS装置に導入した。目的物質の定量は、同時に測定した内部標準で補正した後、それぞれの標準物質にて作成した検量線を用いて行った。

4. 研究成果

図1は、HCV患者、HCV+IFN患者、LC患者ならびにControlにおける脂質、アミノ酸代謝マーカーの血清濃度の測定結果を示している。ミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化に必須のCTの血清濃度には、病態間で違いが見られなかった。一方、脂肪酸β酸化反応の代謝産物として血液中に放出されるACTの血清濃度において、Controlと比較し、HCV患者ならびに、HCV+IFN患者において、有意な減少が見られた。これとは対照的に、LC患者ではControlよりも有意に高い血清ACT濃度の上昇が觀察された。

ケトン体の1つである3HBの血清濃度は、HCV+IFN患者にて減少傾向が見られるものの、病態間での有意な違いは見られなかった。一方、エネルギー源として代謝される分岐鎖アミノ酸バリンの中間代謝物である3-HIBは、HCV患者とHCV+IFN患者ではControlと比較して違いは見られなかったが、LC患者において他病態と比較し、有意な上昇が見られた。

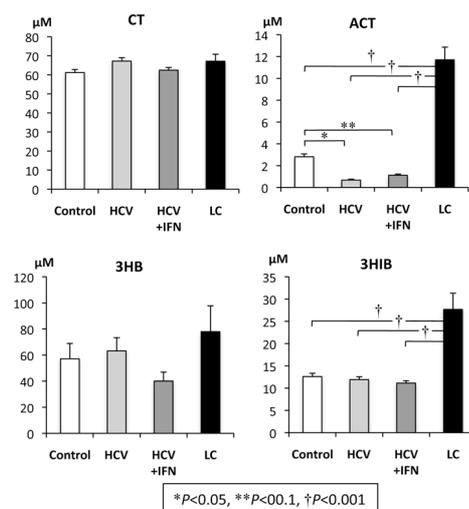


図1. 慢性C型肝炎患者、インターフェロン治療導入C型肝炎患者、肝硬変患者における脂質、アミノ酸代謝マーカーの血清濃度比較。CT: カルニチン、ACT: アセチルカルニチン、3HB: 3-ヒドロキシ酪酸、3HIB: 3-ヒドロキシイソ酪酸。

図2は、Control, HCV 患者, LC 患者における糖, 脂質, アミノ酸代謝関連有機酸の血中濃度の測定の結果を示している。アミノ酸メチオニン代謝系の産物で、糖代謝にも関与する血清 2HB 濃度は、Control よりも HCV 患者、さらに LC 患者にて、上昇傾向が見られたが、病態間での有意な差は認められなかった。同様に、分岐鎖アミノ酸ロイシンの代謝副産物である 3HMB の血清濃度にも、病態進展に伴う上昇傾向が見られたが、有意差は見られなかった。

胆汁酸に抱合してコレステロール排泄を促したり、酸化ストレスを軽減したりする作用が認められているタウリンの血清濃度にも、病態間の有意な差は認められなかった。しかし、タウリンが N-アセチル化された NAT では、Control と HCV 患者と比較し、LC 患者において、血清濃度の有意な上昇が認められた。

また、リン脂質の重要な構成成分であるコリンの血中濃度は、Control と比較し、HCV 患者において有意な上昇がみられた。反対に、LC 患者では、HCV 患者ならびに Control よりも、コリン濃度が有意に減少していた。コリンや CT の代謝産物である TMAO は、Control と比較し、HCV 患者ならびに LC 患者で上昇傾向がみられたが、病態内でのばらつきが多く、統計学的有意差はみられなかった。

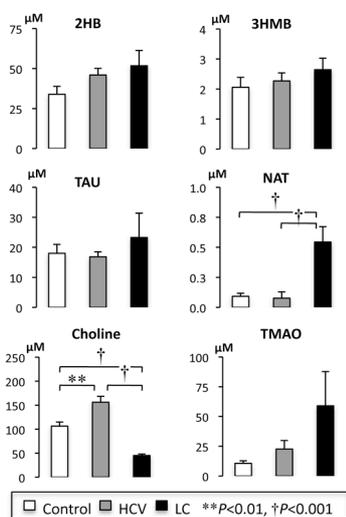


図2. 慢性 C 型肝炎患者と肝硬変患者における糖, 脂質, アミノ酸代謝関連有機酸の血清濃度比較。2HB; 2-ヒドロキシ酪酸, 3HMB; 3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸, TAU; タウリン, NAT; N-アセチルタウリン, Choline; コリン, TMAO トリメチルアミンオキシド。

これらの検討から、今回検討した代謝マーカーにおいて、HCV 患者への IFN 治療導入による変化は認められなかった。一方、慢性肝炎から肝硬変に至る病態進展に関与する可能性がある因子として、ACT と Choline が認められた。ACT は、Control と比較し、HCV 患者では有意に減少する一方、LC 患者

では一転して有意に上昇した。これは、脂肪酸  $\beta$  酸化能が慢性 C 型肝炎では低下するが、LC へ進展すると反対に活性化される事を示しており、慢性肝疾患の病態進展メカニズムを解明する大きな手がかりとなる可能性が示唆された。また、血中コリン濃度は、慢性 C 型肝炎では上昇し、LC になると有意に減少する事が示された。コリンは、細胞膜を構成するリン脂質の構成成分であるのに加え、肝臓でのメチオニン代謝系に必要な代謝物質の前駆体でもある。コリンとメチオニンが不足すると肝病態が引き起こされる事に加え、メチオニン代謝経路の S-アデノシルメチオニンやホモシステインは癌化、動脈硬化等の病態発生機序にも大きく関与する事から、慢性 C 型肝炎から肝癌への病態進展に関与する宿主側の重要な因子である可能性が示唆される。

## 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 3 件)

- ① Iwamoto J, Honda A, Miyamoto Y, Miyazaki T, Murakami M, Saito Y, Ikegami T, Miyamoto J, Matsuzaki Y. Serum carnitine as an independent biomarker of malnutrition in patients with impaired oral intake. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition.* 55(3):221-227, 2014. (査読有り)
- ② Ikegami T, Honda A, Miyazaki T, Kohjima M, Nakamuta M, Matsuzaki Y. Increased serum oxysterol concentrations in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 446(3):736-40, 2014. (査読有り)
- ③ Miyazaki T, Matsuzaki Y. Taurine and liver diseases: a focus on the heterogeneous protective properties of taurine. *Amino Acids.* 46:101-110, 2014. (査読有り)

[学会発表] (計 14 件)

- ① 宮崎照雄, 本多彰, 松崎靖司. 肝代謝代償能を評価する骨格筋分岐鎖アミノ酸異化バイオマーカー. 第 51 回日本肝臓学会総会(熊本市). 2015 年 5 月 21 日
- ② 宮崎照雄, 宮本和宜, 本多彰, 池上正, 岩本淳一, 松崎靖司. 肝硬変患者における低侵襲的骨格筋  $\beta$  酸化マーカーの有用性. 第 7 回三大学交流セミナー(阿見町). 2015 年 2 月 16 日
- ③ 池上正, 本多彰, 松崎靖司, 宮崎照雄, 国府島庸之, 中牟田誠. 血清ステロルマーカーからみた慢性 C 型肝炎患者の薬物代謝に関する検討. 第 36 回

胆汁酸研究会(千代田区). 2014年11月22日

- ④ Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, Matsuzaki Y. Determination of serum 3-hydroxyisobutyrate, a possible biomarker for the catabolism of branched-chain amino acids in skeletal muscles, in patients with liver cirrhosis. Falk Symposium 195. Challenges and Management of Liver Cirrhosis (Freiburg, Germany), Oct 10-11, 2014
- ⑤ 宮崎照雄. 肝硬変患者における低侵襲的骨格筋β酸化マーカーの有用性. 第173回東京医科大学医学会総会(新宿区). 2014年6月7日
- ⑥ 池上正, 本多彰, 宮崎照雄, 松崎靖司. 慢性肝疾患における血清酸化ステロール増加とその意義. 第14回日本抗加齢医学会総会(大阪市). 2014年6月7日
- ⑦ 宮崎照雄, 本多彰, 池上正, 松崎靖司. 骨格筋分岐鎖アミノ酸異化状態の低侵襲的評価. 第14回日本抗加齢医学会総会(大阪市). 2014年6月6日
- ⑧ 宮崎照雄, 本多彰, 池上正, 松崎靖司. 肝硬変患者における骨格筋BCAA異化マーカー血中3-ヒドロキシイソ酪酸濃度の評価. 第22回肝病態生理研究会(千代田区). 2014年5月31日
- ⑨ 宮崎照雄, 宮本和宜, 本多彰, 池上正, 岩本淳一, 松崎靖司. 肝硬変患者における低侵襲的骨格筋β酸化マーカーの有用性. 第172回東京医科大学医学会総会(新宿区). 2013年11月2日
- ⑩ 本多彰, 池上正, 岩本淳一, 宮崎照雄, 国府島庸之, 中牟田誠, 松崎靖司. 消化器疾患における末梢血胆汁酸分画測定. 第35回胆汁酸研究会(札幌市). 2013年10月19日
- ⑪ 宮崎照雄, 石倉恵介, 本多彰, 羅成圭, 宮川俊平, 大森肇, 松崎靖司. アセチルカルニチン測定による脂肪酸β酸化活性の評価. 第68回日本体力医学会大会(千代田区). 2013年9月23日
- ⑫ 宮崎照雄, 本多彰, 池上正, 岩本淳一, 宮本和宜, 松崎靖司. 肝硬変患者の骨格筋における脂肪酸β酸化活性の評価. 第49回日本肝臓学会総会(新宿区). 2013年6月6日
- ⑬ 宮崎照雄, 本多彰, 松崎靖司. 消化器疾患患者における血中3-ヒドロキシイソ酪酸濃度の比較. 第20回日本消化器関連学会週間(神戸市). 2012年10月10日
- ⑭ 宮崎照雄, 羅成圭, 本多彰, 石倉恵介, 宮川俊平, 大森肇, 松崎靖司. 骨格筋分岐鎖アミノ酸異化マーカーとしての血中3-ヒドロキシイソ酪酸測定の有用性. 第67回日本体力医学会大会(岐阜市). 2012年9月16日

[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]

ホームページ等なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松崎 靖司 (MATSUZAKI, Yasushi)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 50209532

### (2) 研究分担者

本多 彰 (HONDA, Akira)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10468639

池上 正 (IKEGAMI, Tadashi)  
東京医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40439740

宮崎 照雄 (MIYAZAKI, Teruo)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 60532687

### (3) 連携研究者

なし