

機関番号：18001
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590475
 研究課題名 (和文) C型肝炎ウイルス複製に対する脂肪沈着、およびアディポサイトカインの作用
 研究課題名 (英文) The effects of hepatocyte steatosis and adipocytokines on HCV replication
 研究代表者
 山城 剛 (YAMASHIRO TSUYOSHI)
 琉球大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：80468074

研究成果の概要 (和文) : C 型肝炎ウイルス (HCV) は慢性肝炎を発症、肝硬変、肝細胞癌の原因となるウイルスであり、治療薬として抗ウイルスサイトカインであるインターフェロン (IFN) が用いられている。肥満を伴う患者では治療効果が有意に低下するということが報告されているがその機序は不明である。本研究では HCV の増殖モデルであるレプリコン細胞を用いて、細胞内の脂肪沈着、及び脂肪組織より分泌されるアディポサイトカイン (adiponectin, resistin, PAI-1) による HCV 増殖に対する影響、さらに HCV に対する IFN の効果へのアディポサイトカインの影響について評価をおこなったが、HCV 増殖に対して脂肪沈着、アディポサイトカイン、いずれも有意な影響を認めなかった。

研究成果の概要 (英文) : Hepatitis C virus (HCV) is a health-care problem causing a spectrum of liver disease ranging from chronic hepatitis to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Anti-HCV treatments are based on a major antiviral cytokine, interferon (IFN). Obesity is reported to be an independent negative predictor of response to hepatitis C treatment. In the present study, we examined the influence of hepatocyte steatosis induced by free fatty acid on HCV replication and the action of adipocytokine (adiponectin, resistin, PAI-1) alone, or in combination with IFN, on HCV replication using the replicon system. Our results showed that hepatocyte steatosis and adipocytokines had no effect on HCV replication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス、アディポサイトカイン、インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (HCV) は血液を介して感染し、慢性肝炎を発症、肝硬変、肝細胞癌の原因となるウイルスである。本邦において約 100～150 万人の感染者が存在すると考えられており、肝炎患者の治療として、インターフェロン (IFN) を中心とした治療が行われて

いる。IFN 治療に対する効果は HCV ゲノタイプと血中ウイルス量により決定されるが、本邦で蔓延している HCV の約 70% が効果の低いゲノタイプ 1b であり、高ウイルス量の場合、リバビリン併用療法でも駆除率は 40% 程度である。近年食事の欧米化に伴い、肥満者の増加を認めている本邦では非アルコール性脂

脂肪性肝疾患 (NAFLD) と定義された脂肪肝を基礎とした肝障害が急増している。肥満者における肝組織への脂肪の沈着が HCV 肝炎患者の IFN 治療効果を有意に下げることが報告 (T Polynard, Hepatology, 2003. Soresi, Liver International, 2006.) されているが、その機序に関しては不明である。今後肥満者の増加に伴った HCV 肝炎患者の IFN 治療無効例が臨床的に問題となってくることが予想される。

2. 研究の目的

これまで我々は HCV レプリコンシステムを用いて細胞内における HCV 複製機序についての基礎的研究報告を国内外の学会、また雑誌において発表してきた。また、沖縄県の肥満者の増加に伴う、脂肪性肝疾患などの疫学、臨床的報告も行ってきたが、肥満者においては脂肪組織の脂肪細胞より数種のサイトカイン (アディポサイトカイン) の分泌が増加、各臓器の細胞へ作用し、結果として耐糖能の異常などメタボリック症候群の原因となっている。本研究の目的は、肝細胞の脂肪沈着、及びアディポサイトカインの HCV 複製への影響また IFN の作用への影響について基礎的に調べ、その結果を臨床へ応用することにある。

3. 研究の方法

HCV の感染モデルとしてこれまでチンパンジーなどの大型動物のみで、その複製メカニズムに関しては不明な点が多かったが、近年、HCV レプリコンシステムの開発により人肝細胞由来の培養細胞内でモデルウイルスを増殖させることが可能となった。本研究では同システムを用い、細胞内への脂肪の沈着による HCV 複製への影響、アディポサイトカインの HCV 複製への影響、IFN 作用への影響について検討を行った。

HCV レプリコンシステム： HCV 遺伝子が持続的に複製をする細胞系。HCV 全長遺伝子から構造蛋白領域を欠失させ、代わりに Neomycin 耐性遺伝子を挿入してある subgenomic RNA である。この subgenomic RNA を肝癌由来の細胞株である Huh-7 細胞に遺伝子導入し、G418 存在下で培養することにより選択的にレプリコン RNA が自律複製している細胞株 (レプリコン細胞) を得ることができる。今回の実験で使用したのは HCV レプリコンの中でもさらに、ホタル luciferase と Neomycin 耐性遺伝子の融合遺伝子を発現するレプリ

コン細胞であり、細胞質を溶解処理、ルシフェリン反応で生じた蛍光度を測定することで簡単に HCV-RNA 量を定量的に評価することが可能 (T Yoko, J Infect Dis. 2004) である (図 1)。

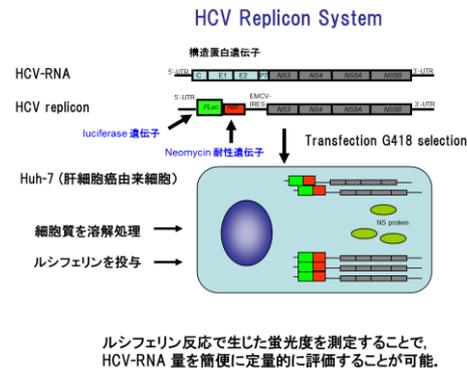


図 1

(1) 細胞内脂肪沈着の影響

人肝細胞由来の培養細胞へ遊離脂肪酸 (Oleic acid, stearic acid) を用いて脂肪を沈着させる技術 (H Malhi, The Journal of Biological Chemistry, 2006) を使用し、レプリコン細胞へ脂肪を沈着させ、HCV レプリコン複製に対する影響についてルシフェラーゼアッセイを行った。

条件は前述の論文を参考に細胞障害を認めない濃度 (0~200 μ M)、沈着開始 4 時間後の細胞をサンプルとして用いた。

(2) アディポサイトカインの作用

HCV レプリコン細胞へアディポサイトカインを投与し、48 時間後の細胞をサンプルとして用い、ルシフェラーゼアッセイを行うことにより評価を行った。投与濃度はこれまで報告されている人血中濃度を参考に決定した。また HCV への IFN (1U/mL) の作用に対するアディポサイトカインによる影響について評価を行った。IFN, サイトカイン投与 48 時間後の細胞をサンプルとして用いた。

アディポサイトカイン： adiponectin (健常者 2-5 μ g/ml)、resistin (健常者 6-10ng/ml)、PAI-1 (健常者 30-40 μ g/ml)

4. 研究成果

(1) 細胞内脂肪沈着の HCV 増殖への影響

① Oleic acid の HCV レプリコン増殖への作用。HCV 増殖への有意な作用は認めなかった (図 2)。

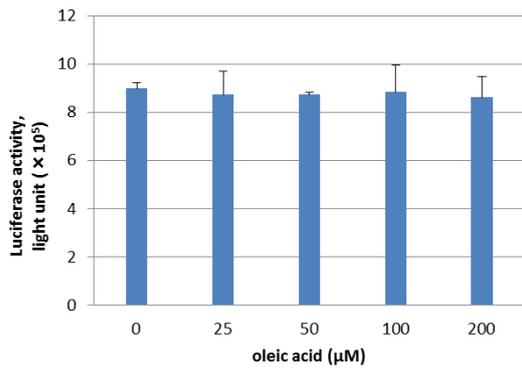


図 2

②stearic acidのHCVレプリコン増殖への作用。HCV増殖への有意な作用は認めなかった(図3)。

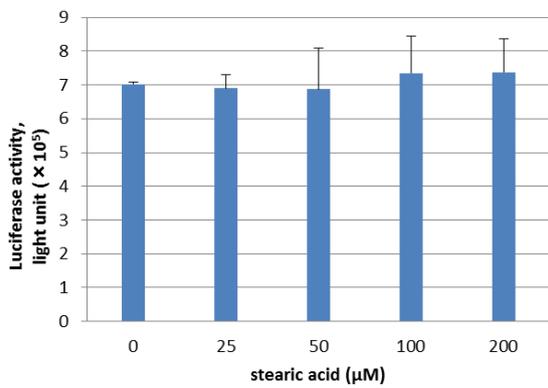


図 3

(2)アディポサイトカインの作用

①adiponectinのHCVレプリコン増殖への作用、及びHCVへのIFNの作用に対する影響。adiponectinによるHCV増殖への有意な作用(図4)、adiponectin(10μg/ml)のIFNに対する有意な影響は認めなかった(図5)。

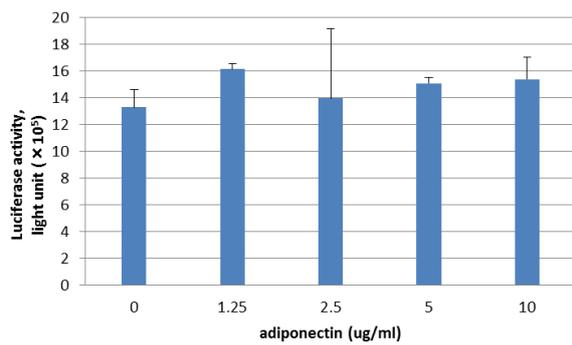


図 4

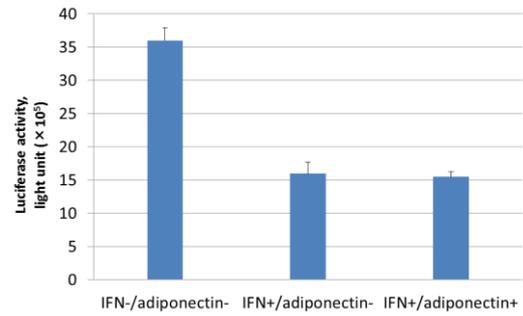


図 5

②resistinのHCVレプリコン増殖への作用。resistinによるHCV増殖への有意な作用(図6)、resistin(20ng/ml)のIFNに対する有意な影響は認めなかった(図7)

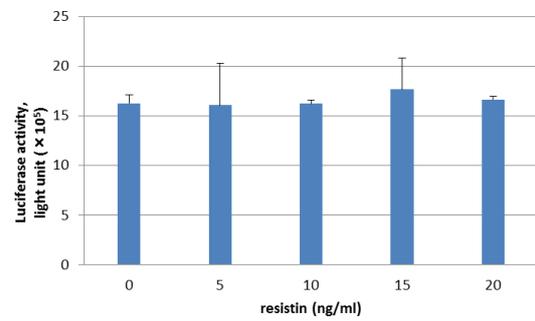


図 6

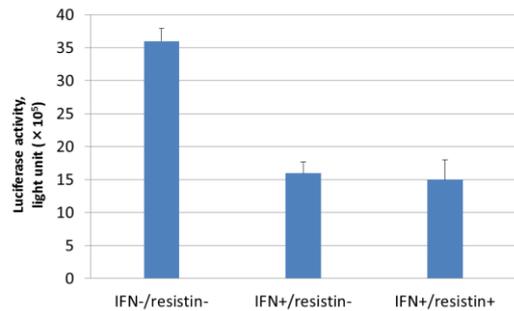


図 7

③PAI-1のHCVレプリコン増殖への作用。PAI-1によるHCV増殖への有意な作用(図8)、PAI-1(60ng/ml)のIFNに対する有意な影響は認めなかった(図9)。

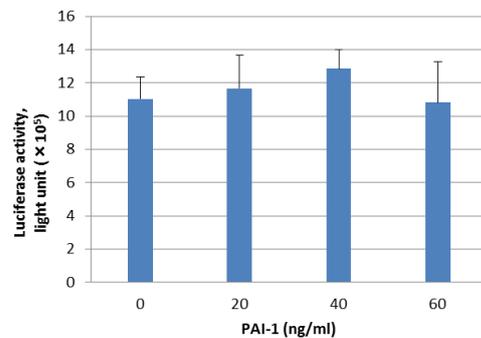


図 8

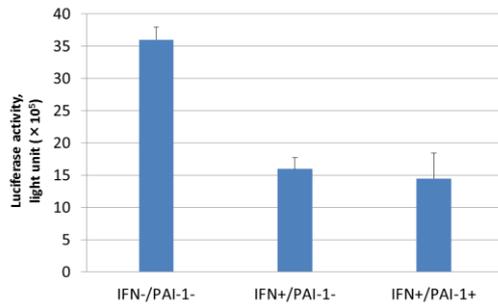


図 9

考察

臨床的に報告されている肥満とC型慢性肝炎の治療効果の関係について、病態機序解明を目的に細胞内でのHCV増殖モデルを用いて評価を行った。肥満が肝細胞へ与える影響として肝細胞内の脂肪沈着と脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインが肝細胞へ与える作用を想定し、実験を行った。いずれも肝細胞内におけるHCV増殖へは影響を与えないという結果が得られた。

本研究方法の問題点として①脂肪酸を利用した肝細胞への脂肪沈着自体肝細胞のアポトーシスを誘導することよりその影響を防ぐため、実験条件を4時間という比較的短い時間にしたが、慢性的な脂肪沈着が生じている可能性が高い実際の病態と異なる可能性がある点、②Huh-7細胞にアディポサイトカインのレセプターの有無、シグナル伝達系の障害の有無について証明していない点が挙げられた。

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1件)

①Toma S, Yamashiro T, Arakaki S, Shiroma J, Maeshiro T, Hibiya K, Sakamoto N, Tateyama M, Kinjyo F, Fujita J. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by nelfinavir and synergistic effect with interferon-alpha. Journal of Viral Hepatitis 2009;16:506-512. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山城 剛 (YAMASHIRO TSUYOSHI)
琉球大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80468074