

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 5 月 24 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590745

研究課題名（和文）C型肝炎ウイルスのB細胞感染・吸着が惹起する病原性発現機構の解析

研究課題名（英文）Pathogenesis of chronic hepatitis C through viral infection and/or binding with B cells in patients

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（和文）：C型慢性肝炎患者には多彩な肝外病変が合併するが、その多くはリンパ増殖性疾患(LPD)や自己免疫異常に代表される B 細胞異常に起因する。また、患者内では B 細胞中に HCV RNA が高ウイルス量かつ高頻度に検出され、B 細胞異常の発症機序の要因と推察されている。本研究ではC型慢性肝炎患者における B 細胞への HCV 感染・吸着と B 細胞異常活性化、更にインターフェロン治療抵抗性との関連及びその分子機構について解析した。

研究成果の概要（英文）：Hepatitis C virus (HCV) can induce variety of the extrahepatic manifestations, such as lymphoproliferative and autoimmune disorders in patients with chronic hepatitis C. These disorders are thought to be associated with the abnormal activation of B cells. HCV also infects and associates with B cells frequently in the patients, speculating that this interaction leads to abnormal activation of B cells. In this study, we analyzed the correlation between the B cell infection and/or association with HCV and abnormal activation of B cells. Furthermore, we investigated whether these abnormalities were associated with resistance to the interferon-based therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、消化器内科学

キーワード：C型肝炎ウイルス、B細胞異常

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎、肝硬変の原因ウイルスであり、我が国の肝癌患者で

は約80%がHCV感染者である。HCV感染者においてHCVの肝外臓器、特にリンパ球系細胞への感染は以前から報告され、悪性リンパ腫や

混合型クリオグロブリン血症などの罹患率が高いことも知られている。これらの事実よりHCV持続感染や病原性発現機序にHCVのリンパ球系細胞への感染が関与している可能性がある。事実、培養細胞系においてはB細胞株でのHCV持続感染系が確立され、そのモデルにおいてHCV感染が癌抑制遺伝子や免疫グロブリンの遺伝子変異を惹起すること、更にHCVに対する抗体産生能及び抗体とHCVとのaffinityを低下が報告された。更にB細胞表面へ吸着した状態のHCVは流血中のフリー粒子より安定かつ感染性が高いことが報告された。HCV感染者内でB細胞へのHCV感染、あるいはHCV粒子の細胞表面への吸着自体が惹起するB細胞内及び生体内全体への影響を明らかにすることは、HCV持続感染機構やこれまで分子メカニズムが明らかでない肝外病変発症機序の解明、また抗ウイルス療法抵抗性機序を解析する上で重要である。

2. 研究の目的

C型慢性肝炎患者には多彩な肝外病変が合併するが、その多くはリンパ増殖性疾患(LPD)や自己免疫異常に代表されるB細胞異常に起因する。これらのB細胞異常発症機序として、HCVがB細胞に感染・吸着し、異常活性化を惹起し、正常な抗原特異的抗体産生を抑制している可能性が考えられる。本研究ではC型慢性肝炎患者において、これまでB細胞へのHCV感染・吸着が患者にどのような影響を及ぼすかを研究することを目的とした。

まず、このB細胞異常が健常時の免疫圧力下で増殖抑制されている他のウイルスの再活性化を惹起し、間接的にB細胞異常を来す可能性について、B細胞中EBV再活性化の有無を検討することによって解析した。次にB細胞へのHCV感染・吸着が確認された患者とそ

うでない患者で、抗ウイルス療法治療効果に差があるかを検討した。更にHCV感染・吸着がB細胞サブセットに特異性があるかを解析し、B細胞分化のどの過程で影響を受けているかを解析した。一方でHCV感染はB細胞の異常活性化状態を惹起しているため、IFN療法中にも多彩な自己免疫異常を併発する可能性がある。本研究ではHCVキャリアにおいて、HCV感染に関連するB細胞異常の発症機序、またB細胞異常が惹起するIFN抵抗性、及び抗体産生能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。異常活性化を惹起されたB細胞の機能解析、また異常活性化に関連する血清マーカー、サイトカインについて検討した。

3. 研究の方法

1) HCVのB細胞感染とEBV再活性化との関連

C型慢性肝炎患者(52例)、B型慢性肝炎患者(17例)その他の肝疾患患者(19例)、非肝疾患患者(43例)について末梢血単核球中もしくはB細胞中のEBV再活性化マーカー(BZLF1、LMP1)のmRNA発現、並びに持続感染マーカーであるEBER遺伝子の発現の有無をRT-PCRで解析した。更に患者LPD関連マーカー異常とB細胞中HCVとの関連について解析した。

2) HCV感染・吸着B細胞を持つC型慢性肝炎患者のIFN治療抵抗性の解析

C型慢性肝炎でペグインターフェロン、リバビリン併用療法を行う100例の患者を対象にした。治療前にB細胞を分離し、B細胞中HCV RNA量を定量した。B細胞へのHCV感染・吸着の有無とIFN療法治療効果との関連を検討した。

3) 各B細胞サブセットの細胞中HCV RNA定量

33例のHCVキャリアから分離したPBMCをAutoMACS systemを用いてNaïve B細胞分画と非Naïve B細胞分画に分け、そ

れぞれから細胞中の HCV RNA 量を real time RT-PCR 法で定量した。同様に 77 例の患者について(3)Total B 細胞分画と(4)非 B 細胞分画に分け、HCV RNA 量を定量した。更に 5 例については B 細胞サブセット特異的表面マーカー抗体を固相化した Affinity Beads を用いて(A)形質細胞、(B)活性化 B 細胞、(C)メモリー B 細胞、(D)ナイーブ B 細胞及び休止期 B 細胞に 4 分画し、それぞれ HCV RNA 量を定量した。

4) Naïve B 細胞における単一クローン増殖 (Clonality) 解析及び遺伝子発現解析

3) で分離したナイーブ B と非ナイーブ B 細胞から Total RNA を分離し、IgH 遺伝子 CDR3 領域の RT-PCR 産物を用いた単一クローン増殖 (Clonality) 解析を IgM、IgG、IgA 各クラスに対して行った。Clonality の検出はキャピラリー電気泳動 (ABI-3100) 及び 4% アガロースゲルで検出した。更に B 細胞活性化関連遺伝子群 CD80、CD86、CD69、CD71、CXCR3 と AID、IFN 感受性遺伝子 (ISG) 群である OAS1、OAS2、MX1、ISGF3、IFITM の Naïve B 細胞での mRNA 発現量を real time RT-PCR 法で測定した。

4. 研究成果

1) HCV 感染者における EBV 再活性化 HCV 感染者 52 例の PBMC 中 12 例 (23%) から BZLF1 mRNA が検出された。非肝疾患群では 43 例中 3 例 (9%) で有意差を認めた ($p = 0.0179$)。B 細胞分画を用いた解析でも HCV 群で 42 例中 10 例 (23.8%) が BZLF1 陽性と PBMC での解析とはほぼ同様の結果で、リンパ球サブセット別の解析を BZLF1 陽性だった 10 例で行っても T 細胞など B 細胞以外の分画での再活性化は 1 例のみだった。IFN 療法後 SVR が得られた患者 3 例での検討で、治療中、治療後の HCV RNA

消失に伴い、持続感染状態を示す EBER は残存するものの、再活性化マーカー BZLF1 は速やかに消失することが示された。しかし、EBV 再活性化と LPD 関連マーカー異常との直接の関連はなかった。

2) HCV 感染・吸着 B 細胞を持つ C 型慢性肝炎患者の IFN 治療抵抗性

IFN 治療後無効 (NVR) に寄与する独立因子として HCV 遺伝子型 1 型、IL28B マイナーアレルとともに B 細胞中 HCV RNA 定性陽性が抽出された。HCV 1 型 70 例において、IL28B マイナーアレルかつ B 細胞中 HCV RNA 陽性の NVR に対する感度は 92.3%、特異度 98.25%、陽性的中率 (PPV) 92.3%、陰性的中率 (NPV) 98.2% であり、IL28B 単独より特異度、PPV が高かった。更に B 細胞中 HCV RNA 量と IL28B SNP やウイルス因子の関連について検討すると、B 細胞中 HCV RNA 量は IL28B SNP、コアアミノ酸 (70, 91 番) 変異とは関連しなかったが、ISDR 変異数 0-1 個で高ウイルス量だった。本来の宿主ではない B 細胞に持続感染する HCV は内因性自然免疫系に抵抗性を示すことが予想され、B 細胞中 HCV RNA 測定は HCV 遺伝子型、IL28B SNP と組み合わせることにより IFN 治療効果予測に有用であることが示された。

3) B 細胞異常と IFN 治療抵抗性の解析

多変量解析で IFN 療法後 non-SVR の関連因子として血清 C3 低値が血小板数低値、血清 HCV RNA 量高値、IL28B minor genotype とともに non-SVR に関連する因子として抽出された。Peg-IFN、リバビリン併用療法前、治療後 1 ヶ月、3 ヶ月、終了時、終了後 6 ヶ月時の血清 C3、C4 値の推移の検討から、SVR 群において C3 値が前値と比較し治療経過中に低下することが示された。治療開始 1 ヶ月後 C3 値 / 治療前 C3 値 [Response C3 ratio] と SVR 率

との関連を検討したところ、Response C3 ratio 1.1以上の症例ではSVR率が有意に低下することが示された。血清中の正常な補体レベルおよびIFN治療による補体の低下は正常なIFN関連抗ウイルス反応の維持に必要であると推察された。

4) ナイーブ B 細胞への HCV 感染・吸着と B 細胞単一クローン増殖発症との関連

HCV 感染者の B 細胞サブセットの解析からすべての B 細胞に HCV 感染・吸着が確認された。特定の対応抗原の決定していないナイーブ B 細胞の段階で多くの HCV 感染・吸着が確認され、非ナイーブ B 細胞を含む PBMC よりもナイーブ B 細胞への HCV 感染・吸着量が高値であることが示された。末梢血中において多数を占めるナイーブ B 細胞に HCV が主に感染・吸着していることが示された。

ナイーブ B 細胞を用いた B 細胞 Clonality 解析の結果から、ナイーブ B 細胞には単一クローン増殖が起こっていないことが確認された。非ナイーブ B 細胞での解析では HCV 感染者にのみ IgM 及び IgG クラスの Mono-clonality が確認された。この事実より HCV 感染に伴う B 細胞単一クローン増殖機序は HCV 感染に伴う B 細胞の抗アポトーシス、腫瘍化などに起因するものではなく、B 細胞の異常活性化に起因していることが示唆された。

5) ナイーブ B 細胞における遺伝子発現解析

遺伝子発現解析では CH-C 患者のナイーブ B 細胞において CD86、CXCR3 が高発現を示した。ISG 群の遺伝子発現解析では、CH-C 患者ナイーブ B 細胞では MX1 高発現が認められた。更に CD86 と CXCR3 がいずれも高値である患者を B 細胞異常活性化群とし、非異常活性化群と比較すると、MX1、IFITM、

IFGF3 が高値、また Clonality 検出頻度も高い傾向を示した。これらの事実より CH-C 患者のナイーブ B 細胞は HCV 感染・吸着が高頻度で、ナイーブ B 細胞の非特異的異常活性化を惹起していると推察された。また B 細胞異常活性化が ISG 発現や自然免疫系シグナル伝達の機能に関連する可能性が示唆された。

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 6 件)

1) Miyashita M, Ito T, et al. Genetic polymorphism in cyclooxygenase-2 promoter affects hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis* (in press)

2) Inokuchi M, Ito T, et al. Lymphotropic Hepatitis C Virus Has an Interferon-Resistant Phenotype. *Journal of Viral Hepatitis* 19 : 254-262, 2012.

3) Shimozuma Y, Ito T, et al. Reactivation of Epstein-Barr Virus in B Cells of Patients With Chronic Hepatitis C. *Journal of Medical Virology*, 82 : 2064-70, 2010.

4) Hiroishi K, Ito T et al. Strong CD8⁺ T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 45: 451-8, 2010.

5) 【新時代のウイルス性肝炎学-基礎・臨床研究の進歩-】 II C型肝炎 13. C型肝炎ウイルス感染関連の肝外病変とその対応。伊藤敬義、他日本臨床増刊号Page302-308(2011.05.20)

6) 【慢性ウイルス肝炎 治療の新たな展開】 Key words C型肝炎ウイルス感染とB

細胞異常。伊藤敬義 カレントセラピー 28
巻8号 Page68(2010.08)

[学会発表] (計 23 件)

- 1) Miyashita M, Ito T, et al. The detection of the hepatitis C virus in Naïve B cell leads to abnormal activation and the resistance to the interferon based therapy. The 10th JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science” (Tokyo 2012. 11. 21)
- 2) Miyashita M, Ito T, et al. Abnormal activation of naïve B cells in patients with chronic hepatitis C. 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (Boston 2012. 11. 11)
- 3) Uchikoshi M, Ito T, et al. Fluctuation pattern of serum complement levels during pegylated interferon and ribavirin therapy is closely associated with the outcome in patients with chronic hepatitis C. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (San Francisco 2011. 11. 8)
- 4) Miyashita M, Ito T, et al. The -1195 G>A cyclooxygenase-2 promoter polymorphism is associated with hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (San Francisco 2011. 11. 8)
- 5) Miyashita M, Ito T, et al. The -1195 G>A cyclooxygenase-2 promoter polymorphism is associated with hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the

Liver (Berlin 2011. 4. 2)

- 6) Ito T, Inokuchi M, et al. B cell-infected or -associated hepatitis C virus has interferon resistant phenotype. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (Boston 2010. 11. 1)
- 7) Inokuchi M, Ito T, et al. B cell-infected or -associated hepatitis C virus has interferon resistant phenotype. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses (Yokohama 2010. 9. 13)
- 8) Shimozuma Y, Ito T, et al. Reactivation of Epstein-barr virus in patients with chronic hepatitis C. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses (Yokohama 2010. 9. 13)
- 9) 伊藤敬義 C型慢性肝炎患者の免疫異常 第48回日本肝臓学会総会(金沢 2012. 6. 6) ランチョンセミナー
- 10) 宮下みゆき、伊藤敬義、他。C型慢性肝炎患者におけるナイーブB細胞の異常活性化 第48回日本肝臓学会総会(金沢 2012. 6. 7) 一般演題(ポスター)
- 11) 打越学、伊藤敬義、他。IL28 マイナー genotype のC型慢性肝炎患者における IFN 治療早期の補体反応性低下と IFN 治療法選択における血清 C3 動態測定の実用 第48回日本肝臓学会総会(金沢 2012. 6. 6) オープンワークショップ
- 12) 打越学、伊藤敬義、他。1型C型慢性肝炎患者における治療前・治療開始1ヶ月血清 C3 値比(Response C3 ratio)を用いた PEG-IFN、リバビリン併用療法早期効果予測 第53回日本消化器病学会大会(福岡 2011. 10. 21)
- 13) 下間祐、伊藤敬義、他。HCV 陽性肝細胞

癌患者における B 細胞中 Epstein-Barr ウィルス再活性化 第 53 回日本消化器病学会大会 (福岡 2011. 10. 21)

14) 宮下みゆき、伊藤敬義、他。Naïve B 細胞への HCV 感染・吸着と B 細胞単一クローン増殖発症との関連 第 53 回日本消化器病学会大会 (福岡 2011. 10. 19)

15) 伊藤敬義 治療前宿主 B 細胞への HCV 感染・吸着状態とペグ IFN/リバビリン併用療法の治療反応性との関連 第 5 回東京肝疾患研究会 (PERFECT) (東京 2011. 7. 2)

16) 宮下みゆき、伊藤敬義、他。C 型慢性肝炎活動性及び線維化への COX-2 プロモーター領域(-1195G>A) 遺伝子多型の関与 第 47 回日本肝臓学会総会 (東京、2011. 6. 4)

17) 井口桃子、伊藤敬義、他。IFN 治療効果予測における B 細胞中 HCV RNA 測定の有用性 第 47 回日本肝臓学会総会 (東京、2011. 6. 4)

18) 打越学、伊藤敬義、他。PEG-IFN、リバビリン療法中の治療前血清補体値および治療中補体値動態による治療効果予測 第 47 回日本肝臓学会総会 (東京、2011. 6. 4)

19) 伊藤敬義 HCV 感染と肝外病変 第 49 回臨床肝臓懇話会特別講演 (東京、2010. 9)

20) 下間祐、伊藤敬義、他。HCV 感染が惹起する B 細胞における EBV 再活性化. 第 45 回日本肝臓学会総会 (山形、2010. 5. 27)

21) 打越 学、伊藤敬義、他。C 型慢性肝炎患者における B 細胞異常関連マーカーと抗ウィルス療法反応性との関連 第 45 回日本肝臓学会総会 (山形、2010. 5. 27)

22) 伊藤敬義、他。HCV 感染と B 細胞異常. 第 94 回日本消化器病学会総会シンポジウム 8「C 型肝炎」：ウイルス感染の分子免疫機構. (新潟 2010. 4. 23)

23) 下間祐、伊藤敬義、他 HCV 感染者における Epstein-Barr ウィルス再活性化. 第 94 回日本消化器病学会総会 (新潟、2010. 4. 24)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 敬義 (ITO TAKAYOSHI)

研究者番号 : 50317517