

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 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590747

研究課題名（和文） 低侵襲的解析法による慢性 C 型肝炎患者の脂質代謝異常に関する研究

研究課題名（英文） Non-invasive measurement of serum lipid metabolism biomarkers in patients with HCV infection

研究代表者

池上 正（IKEGAMI TADASHI）

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40439740

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルスはその活動維持のためコレステロール(Chol)を必要とし、脂質代謝異常を起こすとされる。慢性C型肝炎患者(CHC)にみられる低Chol血症の原因を、患者血清中の脂質代謝バイオマーカー解析によって説明しようと試みた。CHCではChol合成の低下が合成経路の途中のスクアレン以降の段階で起きていることが明らかになり、さらにChol酸化物である酸化ステロールの増加を伴うことが判明した。

研究成果の概要（英文）：

To identify key sites of HCV interference in the cholesterol metabolic pathways including absorption, biosynthesis, and catabolism, serum biomarkers of patients with HCV infection were determined. The results demonstrate that down-regulated post-squalene cholesterol biosynthesis and increased oxysterol production are characteristic features of patients with HCV infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：消化器内科学

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、コレステロール代謝、酸化ステロール

1. 研究開始当初の背景

慢性C型肝炎と脂質代謝異常の関係について多くの研究があるが、ほとんどのものはHCVレプリコンなどの増殖システムを用いた培養細胞系の実験か、あるいは動物実験であった。脂質の中で、コレステロールについては、HCVの増殖に重要である事がこれらの実験から示されているが、一方臨床データで

は、HCV感染患者では血清コレステロール値が健常者に比して低地である事が示されてきた。また、先行研究では、HCV感染患者の肝組織中のコレステロール合成酵素群のmRNA発現が亢進している事が示された。In vitroの実験系で得られた結果をどう臨床上どうfitさせていくのかという点で未解決な点があり、また、ヒトと、動物や癌細胞とではコレステロール代謝が全く異なっており、

ヒトサンプルを用いた検討が必要な状況であった。

2. 研究の目的

mRNA レベルでのコレステロール合成酵素の発現増加と、血清コレステロールの低下という一見乖離した所見を、コレステロール代謝の各ステップを低侵襲に診断できる血清ステロールの測定を通して解釈しようと試みる。

3. 研究の方法

まず、患者コホートを用いて、実際の血清脂質が健常人と比較してどう異なるかを明らかにするため、健康診断のデータをもとに、HCV 抗体陽性者と健常人の間での血清脂質（総コレステロール、LDL および HDL コレステロール、中性脂肪）を比較した。

次に、慢性 C 型肝炎患者血清ならびに健常人血清を収集し、コレステロール代謝のバイオマーカー（コレステロール合成マーカー；ラソステロール(Latho)、デスモステロール(Desmo)、メバロン酸(MVL)、7-デヒドロキシコレステロール(7DHC)、コレステロール吸収マーカー：カンペステロール(Campe)、シトステロール(Sito)、胆汁酸合成マーカー：7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one(C4)、胆汁酸吸収マーカー：FGF-19)を LC-MS/MS を用いて分析した。また、LXR のリガンドとなる酸化ステロール(27 水酸化コレステロール(27OH Chol)、25 水酸化コレステロール(25OH Chol)、24S 水酸化コレステロール(24SOH Chol)、4 beta 水酸化コレステロール(4bOH Chol)、7 α 水酸化コレステロール(7aOH Chol))をそれぞれ測定した。コレステロール代謝異常が問題となる肝疾患の比較として、①非アルコール性脂肪性肝炎②原発性胆汁性肝硬変患者の血清についても同様の解析を行い、病態による違いを論じた。

4. 研究成果

(1) 健康診断受診者のうちの HCV 抗体陽性者と非陽性者での血清脂質の違い

2002 年から 2007 年までの間、茨城県において行った節目健診受診者 146,857 名の参加者のうち、HCV 抗体陽性 and/or HCV-RNA 陽性者は男性で 1.37%、女性で 0.67%であった。血清の総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪は HCV 陽性者群で非陽性者群に対して、性別、年齢、栄養状態(BMI をもとに推定)を問わず有意に低値であった。多変量解析によると、HCV 陽性は血清脂質の低下に関連してもっとも強

い関連があった。とくに、ALT が正常範囲(ALT<31)にある HCV 陽性者においても低脂質血症は認められ、これは HCV 感染が直接的に脂質代謝に影響を及ぼしていることの間接的な証拠であると思われた。

(2) 慢性 C 型肝炎患者と健常人での血清バイオマーカーを用いた脂質代謝の比較

当院ならびに研究協力施設から収集した慢性 C 型肝炎患者(CHC)血清(n=55)、ならびに性・年齢をマッチさせた健常人(CTL)血清(n=113)を用いて、誘導体化を行い、LC-MS/MS による測定に供した。血清中のコレステロールは HCV 群では CTL に比して有意に低下しており、(1)に述べた健康診断のデータ、あるいは既報と一致していた。

①コレステロール合成経路の中間代謝物では、HMG-CoA 還元酵素の直接代謝産物であるメバロン酸は CTL 群と CHC 群で有意差がなく、また Squalene 以後の代謝物である Latho/Chol 比は CHC 群で有意に低下していた。また、Chol の直前段階の代謝物である 7DHC/Chol 比は CHC 群で有意に増加していた。②コレステロール吸収は両群で有意差を認めなかった。③胆汁酸合成(C4/Chol 比)には有意差がなかったが、胆汁酸吸収(FGF-19)は CHC 群で低下していた。④酸化ステロール(27-OH Chol, 25-OH Chol, 4 β -OH Chol/Chol, 7 α OH Chol 比)は CHC で有意に増加していた。⑤肝生検結果をもとに行ったサブ解析では、線維化の進行とこれらの Chol 代謝マーカーの変動には相関がみられなかった。⑥HCV ジェノタイプにより脂質代謝の変動には差があることが報告されているが、われわれのコホートでは 1 型と 2 型の間には脂質代謝マーカーの差は認めなかった。⑦PEG-IFN/RBV を投与開始後 3 ヶ月目の血清データでは、Chol はむしろ低下傾向にあり、IFN 治療の副作用による食事摂取量の低下による脂質代謝への影響を否定し得なかった。⑧コレステロール合成の低下の結果を直接証明するために、患者肝組織中のコレステロール量測定を試みた。肝細胞がんとして肝切除を受けた患者の肝組織(n=3)と、対照として HCV をもたず、他の目的で肝切除を受けた患者肝組織(n=3)について、組織中コレステロール濃度や、ステロールマーカー濃度を測定し、血清中の値と比較した。おおむね組織中のステロールマーカー濃度と血清中濃度は比例することが明らかになった。しかし、HCV 群肝組織中では有意なコレステロール濃度の低下はみられず、証明は困難であった。これは、肝組織が heterogenous な細胞集団から構成されること、あるいは細胞内のコレステロール濃度は非常に tight な範囲で調節されており、有意差を得られるような変化ではない可能性

が示唆された。

以上より、慢性C型肝炎患者における血清コレステロールの低下を説明するコレステロール代謝上の変化としては、スクアレン以降のコレステロール合成系の活性低下の可能性が示唆された。一方、本研究を通じて、酸化ステロールの増加が特徴的な変化であることが明らかになった。これは絶対値を用いた検討でも同様であり、酸化ステロール発生機序についての解明というあらたな問題が生じた。

(3) 他の慢性肝疾患における血清バイオマーカーの測定と慢性C型肝炎との比較

①非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 患者について、CHCと同様の検討を行った。多施設臨床研究で集積された15名の高コレステロール血症を伴うNAFLD患者血清と、性別、年齢をマッチさせた肥満や高脂血症、糖尿病を持たない健常者36名の血清について、CHCと同様の血清バイオマーカーについて解析をした。また、これらの症例は高コレステロール血症に対してスタチン製剤を投与されており、これを内服したときのバイオマーカーの変動を検討し、脂質代謝について考察した。高コレステロール血症を伴うNAFLD患者に特徴的なのは、コレステロール吸収マーカー (Campe/Chol比、Sito/Chol比)の著明な低下であり、コレステロール合成 (Latho/Chol)は増加していなかった。また、CHCと同様、酸化ステロールの増加が特徴的であった。酸化ステロールの和は、インスリン抵抗性を示すHOMA-IRとの間に相関があり、血清酸化ステロールがインスリン抵抗性のサロゲートマーカーになる可能性が示唆された。また、酸化ステロールの増加により、これをリガンドとするLXRが活性化し、ABCG5/8の発現上昇のため、コレステロール吸収が低下するという仮説を提唱した。

②原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 患者について、CHCと同様の検討を行った。酸化ステロールについて検討すると、PBCにおいてCTLより増加しているのは 4β -OH Chol/Cholのみであり、NASHやCHC患者における酸化ステロール増加のパターンとは異なっていた。

これらの結果から、慢性肝疾患における酸化ステロール上昇の意義と疾患による違いの背景因子について新たな研究テーマが生まれた。酸化ステロールはLXRのリガンドとしての性質の他に、その疎水性ゆえに強い細胞障害性をもつ。近年の報告は酸化ステロールの各種疾患との関連、細胞レベルでのシグナル伝達系への影響などについて明らかにしており、今後CHCやNASHにおける発癌メカ

ニズムとの関連という点で、今後の研究を発展させていく計画である。

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7件)

(1) Iwamoto J, Saito Y, Honda A, et al. Bile acid malabsorption deactivates pregnane X receptor in patients with Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 査読あり、19: p1278-1284, 2013 DOI: 10.1097/MIB.0b013e318281f423

(2) Honda A, Ikegami T, Nakamuta M, et al. Anticholestatic effects of bezafibrate in patients with primary biliary cirrhosis treated with ursodeoxycholic acid. *Hepatology*, 査読あり、57: p1931-1941, 2013 DOI: 10.1002/hep.26018

(3) Ikegami T, Hyogo H, Honda A, et al. Increased serum liver X receptor ligand oxysterols in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology*, 査読あり、47: p 1 2 5 7 - 1 2 6 6 , 2 0 1 2 DOI: 10.1007/s00535-012-0585-0

(4) Honda A, Miyazaki T, Ikegami T et al. Cholesterol 25-hydroxylation activity of CYP3A. *Journal of Lipid Research*. 査読あり、52: 1509-1516, 2011 DOI: 10.1194/jlr.M014084

(5) Hyogo H, Ikegami T, Tokushige K, et al. Efficacy of pitavastatin for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis with dyslipidemia: An open-label, pilot study. *Hepatology Research*. 査読あり、41: 1057-1065, 2011 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2011.00849.x.

(6) Miyazaki T, Honda A, Ikegami T et al. Hepatitis C virus infection causes hypolipidemia regardless of hepatic damage or nutritional status. *Hepatology Research* 査読あり、41: p530-541, 2011 DOI 10.1111/j.1872-034X.2011.00803.x

(7) Honda A, Miyazaki T, Ikegami T et al. Highly sensitive and specific analysis of sterol profiles in biological samples by HPLC-ESI-MS/MS. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 査読あり、121: p556-564, 2010 DOI:10.1016/j.jsbmb.2010.03.030

[学会発表] (計9件)

① 岩本淳一、本多 彰、松崎靖司、クローン病における低コレステロール血症の発生機序と栄養指標としての意義について 第5

4回 日本消化器病学会大会 2012年10月1日、神戸

② 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16回日本肝臓学会大会、2012年10月10日、神戸

③ 池上 正、本多 彰、松崎靖司、NAFLD患者血清における酸化ステロール上昇とその意義 第16回日本肝臓学会大会、2012年10月10日、神戸

④ Ikegami T, Honda A, Miyazaki T et al. Increased serum liver X receptor ligand and oxysterols in patients with non-alcoholic fatty liver disease. XXII International Bile Acid Meeting, 2012年9月14、15日、Vienna, Austria

⑤ 宮崎照雄、本多 彰、松崎靖司 胆汁酸合成誘導体(INT747)の脂肪肝治療への可能性. 第15回日本肝臓学会大会、2011年10月21日、福岡

⑥ 本多 彰、中牟田誠、松崎靖司 ベザフィブラートによる原発性胆汁性肝硬変の治療効果発現メカニズムの解明. 第47回日本肝臓学会総会、2011年6月3日、東京

⑦ 池上 正、本多 彰、兵庫秀幸 他. NAFLDに対するピタバスタチン投与によるコレステロール・脂肪酸代謝の変化ースタチン介入多施設試験からー. 第47回日本肝臓学会総会、2011年6月2日、東京

⑧ Ikegami T, Honda A, Hyogo H et al. Alteration of cholesterol and fatty acid metabolism in NAFLD patients treated with pitavastatin. Digestive Disease Week 2011、2011年5月10日、Chicago, USA

⑨ Ikegami T, Honda A et al. Cholesterol and fatty acid metabolism in NAFLD patients treated with Pitavastatin. The 9th JSH Single Topic Conference “NASH 2010” 2010年11月18日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

(3) 連携研究者

宮崎 照雄 (MIYAZAKI TERUO)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：60532687