

総 説**C型肝炎ウイルスの持続感染機序と
肝発癌機構についての一考察**

日野啓輔

山口大学医学部保健学科基礎検査学講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : C型肝炎ウイルス, 遺伝子変異, 酸化ストレス, 鉄過剰, 肝細胞癌**和文抄録**

著者は山口大学医学部第一内科入局以来, 主にウイルス性肝炎の病態と治療に関する研究を行ってきた。本総説ではC型肝炎ウイルス (HCV) の持続感染機序と肝発癌機構についてわれわれのデータを紹介しながら考察を行った。HCVが末梢血単核球細胞内に感染することにより宿主の免疫応答から回避する可能性や, 外被タンパク内に存在する超可変領域の変異を繰り返すことによる中和抗体からの逃避が持続感染機序の一要因と考えられた。こうしたHCV持続感染は究極的には高率な肝細胞癌の発生へと繋がるが, 肝発癌にはHCVがもたらす酸化ストレスが関与していると考えられる。しかし, HCVのみの酸化ストレスでは肝発癌には不十分であり, 酸化ストレスを増強する2nd hitが重要と考えられる。臨床的には加齢, アルコールなど酸化ストレス増強因子はいくつか上げられるが, われわれはC型肝炎病態の特徴の一つである肝内鉄過剰に注目しC型慢性肝炎の鉄過剰状態に類似したHCVトランスジェニックマウスを作成し, 肝発癌機構の解析を行った。その結果, HCV感染における鉄過剰状態はミトコンドリア障害を引き起こし, 酸化ストレスを増強することで肝発癌を促進することが明らかとなった。今後はこの発癌モデルを利用して, C型肝炎からの肝発癌を抑制しうる効果的な治療を開発したいと考えている。

平成17年7月11日受理

はじめに

著者は山口大学医学部卒業後, 直ちに第一内科 (現, 先端分子応用医科学講座消化器病態内科学) に入局し2年間の臨床研修を行った後, 肝臓班に所属した。肝臓班では主としてB型肝炎, C型肝炎を中心としたウイルス肝炎の病態と治療に関する研究を行ってきた。本総説では紙面の都合上, B型肝炎に関する研究については割愛させていただき, C型肝炎ウイルス (HCV) の持続感染機序に関する研究と, 現在進行中のC型肝炎における酸化ストレスからみた肝発癌機構に関する研究を紹介させていただくことにする。

I 末梢血単核球細胞内におけるHCV感染

HCVはB型肝炎ウイルス同様, 肝細胞親和性を持つ肝炎ウイルスであるが, 末梢血単核球細胞内 (PBMC) にも感染しうるウイルスである。HCVがクローニングされて以来, HCVがPBMC内で増殖しうるか否かについては論議的であったが, 著者らはHCVの外被タンパク内に存在する超可変領域に注目して, HCVのPBMC内での感染を明らかにした^{1, 2)}。まず, C型肝炎患者の血清及びPBMCよりHCV RNAを増幅し, Single-strand conformational polymorphism (SSCP) 法を用いて各々の超可変領域のquasispecies (遺伝子相同性) を比較したところ, 18%の患者では血清とPBMCでのquasispeciesが異なり, かつ経時的にも変化した。

これによりPBMCから増幅されたHCV RNAは単にPBMCに付着したHCVに由来するものではないことが明らかにされた¹⁾。そこで、PBMC内のHCVの quasispeciesが肝臓内のそれと本当に異なるのか否かを明らかにするために、C型肝炎患者の血清、PBMC、肝組織よりHCV RNAを増幅し、超可変領域をクローニングした後塩基配列を決定し、各々の quasispeciesを比較検討した。その結果、23%の患者においては、血清、PBMC、肝臓での major cloneが互いに異なり、さらにアミノ酸の変異率からみた quasispeciesの程度はPBMCが最も低いことが明らかとなった²⁾。

以上の成績から、PBMC内でのHCV感染が明らかとなっただけでなく、超可変領域が宿主の免疫応答により多彩に変異しうることを考慮すると、PBMC内のHCVの quasispeciesの程度が最も低かったことは、PBMC内のHCVが宿主の免疫応答から回避し、HCVの持続感染において重要な役割を果たすと考えられた。

II 超可変領域の変異による液性免疫からの回避

超可変領域はHCVの外被タンパク内に存在することから中和抗体のエピトープが存在するという報告が多く見られる。一方、HCV粒子の一部は循環血液中においてこの中和抗体と免疫複合体を形成して存在することが明らかにされている³⁾。そこでHCV免疫複合体を形成する中和抗体が真に超可変領域に対して特異的であるか否かを明らかにするために、C型肝炎患者の血液中のHCV免疫複合体と複合体を形成しない非複合体粒子についてHCV超可変領域の quasispeciesを比較した。その結果、両粒子には全く異なる quasispeciesが形成される症例が存在し、HCV免疫複合体を形成する中和抗体は超可変領域に対して特異的と考えられた⁴⁾。そこでHCVの持続感染機序の一つとして液性免疫からの回避機構を明らかにするために、HCV免疫複合体粒子と非複合体粒子についてHCV超可変領域の quasispeciesを経時的に観察した。その結果、免疫複合体には存在しない新たなクローンが肝炎の経過とともに産生され、中和抗体からの逃避現象が確認された⁵⁾。

このようにHCVの外被タンパク内に存在する超

可変領域はめまぐるしくアミノ酸変異を引き起こすことにより液性免疫から回避することが明らかとなったが、次にこの変異が全く任意に引き起こされているのか、拘束性をもった変異なのかについて検討した。C型肝炎患者から経時的に得られた865クローンの超可変領域を含む塩基配列のうち、異なる169の塩基配列について検討した。超可変領域を構成する27アミノ酸各々の変異率、親水性、疎水性プロフィールについて検討するとともに、Robsonの方法により超可変領域の二次構造を予測した。その結果、超可変領域内のいくつかのアミノ酸は殆ど変異せず、アミノ酸変異が起きる部位の中でも親水性、疎水性プロフィールがほぼ一定に保たれる部位があることが示された⁶⁾。さらに、例え超可変領域の異なる塩基配列により quasispeciesが形成されても、超可変領域内の一定の領域の二次構造は保たれていることが明らかとなった。

以上から、持続感染に移行したHCVは宿主からの免疫機構を回避する一手段として、PBMCに感染したり、中和抗体のエピトープが存在する超可変領域の変異を引き起こしていると考えられた。

III C型肝炎における酸化ストレスと肝発癌

これまで述べてきたようにHCVは持続感染を引き起こすことにより、結果として高率に肝癌を引き起こす。C型肝炎はB型肝炎同様、肝炎ウイルスにより引き起こされる疾患でありながらその肝発癌率は大きく異なり、C型はB型の約7倍（肝がん白書）で、肝細胞癌症例の約8割を占めている。しかしながら、C型肝炎からの肝発癌機序は未だ不明の点が多い。ウイルス性肝炎の肝細胞傷害機序は主として宿主の免疫応答によると考えられているが、C型肝炎はB型肝炎に比べて無症候性キャリアーの割合が低いことが知られている。これは言い換えればC型肝炎においてはウイルスによる直接的肝細胞傷害の存在を示唆するものであり、最近の研究からこの直接的肝細胞傷害機序のひとつとして酸化ストレスの関与が注目されている⁷⁻⁹⁾。したがってC型肝炎ウイルス（HCV）が惹起する酸化ストレスが高率な肝発癌に関与しているのではないかという仮説が成り立ち、事実この方面での新たな知見が集積されつつある。本総説ではわれわれの知見も含め

て酸化ストレスからみたC型肝炎の肝発癌機構について考察する。

① HCVコアタンパクによる酸化ストレスの誘導

HCVコアタンパクの発現が調節可能な培養細胞系 (Huh-7とHeLa) を用いた検討からは、HCVコアタンパクが直接的に活性酸素を産生させることが明らかにされている¹⁰⁾。 *In vivo*においてもHCVコアタンパクを発現する16ヶ月齢以上のトランスジェニックマウス (TgM) の肝臓では、炎症が存在しないにもかかわらず有意に脂質過酸化物質二次性生物の量が高いことが明らかにされている¹¹⁾。一方、C型慢性肝炎患者の肝組織像の特徴のひとつとして肝細胞の脂肪化が知られているが、脂肪化のある肝臓では、脂肪化がない肝臓に比べて有意に脂質過酸化物質二次性生物量 (この場合は4-hydroxy-2-hexenal) が多く、C型肝炎における肝脂肪化も酸化ストレスと密接に関連していることを明らかにした¹²⁾。

ではこうしたHCVコアタンパクによる酸化ストレスの誘導機序はどのように考えられるのであろうか。細胞内における活性酸素の最大産生部位がミトコンドリアであることはよく知られている。HCVコアタンパクはミトコンドリア電子伝達系の複合体Iの酵素活性を障害することにより電子の伝達を遅延させ、その結果として活性酸素を産生すると考えられている¹³⁾。HCVコアタンパクがどのようにして複合体Iに作用するのことは今後の研究課題であるが、最近HCVコアタンパクのC端側にミトコンドリア移行シグナルが存在し、コアタンパクが実際にミトコンドリア外膜に結合しうることが報告されている¹⁴⁾。

② 酸化ストレス下でのHCVコアタンパクによるアポトーシス抑制効果

一方、細胞内においてHCVコアタンパクにより誘導される酸化ストレスのマグニチュードはそれほど大きいものではないが、このようにわずかな酸化ストレスによっても酸化的DNA障害の指標の一つである8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) が有意に蓄積されることが明らかとなった¹⁵⁾。しかし、細胞内における活性酸素の産生はミトコンドリア障害を増幅し、結果として細胞がアポトーシスに陥りやすくなることもよく知られた事実である。そこで

HCVコアタンパクによる酸化的DNA障害の存在下で、HCVコアタンパクがアポトーシスに与える影響について検討した。その結果、アポトーシス調節分子であるBcl 2ファミリーのうちアポトーシス抑制分子であるBcl-xLの発現が亢進し、アポトーシス促進分子であるBaxの発現が低下していることが明らかとなった。すなわちHCVコアタンパク発現細胞において活性酸素を産生し、酸化的DNA障害を惹起する一方で、アポトーシスに抵抗性であることは、HCV感染における肝発癌過程を考えるうえで興味深い知見であると考えられた。しかし、HCVコアタンパクが細胞のアポトーシスに与える影響は、用いる細胞やアポトーシス誘導因子の違いにより亢進と抑制の両面からの報告があり、更なる検討を要すると考えられる。

③ HCV肝発癌における鉄過剰の意義

以上から、HCVによる酸化ストレスの発現が肝発癌において重要な役割を果たすと推測されるが、HCV自体が誘導する酸化ストレスのマグニチュードはそれほど大きいものではない。臨床的にもHCV持続感染者が均一に発癌するわけではなく、高齢者、アルコール多飲者、線維化進展者など肝発癌の高危険群が存在する。加齢やアルコールは酸化ストレス誘導因子であり、逆に酸化ストレスにより肝線維化が進行することも知られている。すなわちHCV自体の酸化ストレス誘導に加えて、2nd hitとしての酸化ストレスの増強が肝発癌には重要と考えられる。一方、C型慢性肝炎患者では肝内の鉄過剰状態が明らかにされている¹⁶⁾。何故、鉄過剰状態が引き起こされるかについては未だ明らかではないが、鉄は強力な活性酸素を産生させる。そこで、われわれは酸化ストレスの増強因子として鉄に注目し、HCV感染での肝発癌における鉄の役割を明らかにしたいと考えている。

④ 鉄過剰HCVトランスジェニックマウスによる肝発癌の検討

HCV全遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウス (HCV TgM) に鉄過剰食を与えることにより、C型慢性肝炎に類似した肝内鉄濃度のHCV TgMを作成した。このTgMと同系のC57BL/6マウス (BL6) をコントロールとし、8週例のTgMと

BL6にそれぞれ鉄過剰食 (Fe群: 鉄含有225mg/g) または通常食 (control群: 鉄含有45mg/g) を投与する4群を設定した。4群間での平均食餌摂取量や経時的な体重増加には差を認めなかったが, TgM Fe群の肝内鉄含有量は最も多く, 6~10ヶ月の鉄過剰食投与により約200 μ g/g liver weightに達し, C型慢性肝炎患者のそれに近似した。さらに, 鉄染色により肝内の鉄の局在を検討したところ, 大半は肝細胞内に鉄の沈着を認め, Kupffer細胞には殆ど認めなかった。6ヶ月目のTgM control群や12ヶ月目のBL6 Fe群でも軽度のsteatosisを認めたが, TgM Fe群は6ヶ月目以降Zone IIIのmicrovesicular steatosisも混じた著明なsteatosisを認めた。このTgMは肝内に炎症を起こすことなく, 脂肪沈着を引き起こすことが明らかにされているが¹⁷⁾, 鉄負荷によりsteatosisが増強したと考えられる。また酸化ストレスの指標としての肝内脂質過酸化物質 (4-HNE 及び4-HHE) 陽性面積と肝内8-OHdG量はTgM Fe群が他の3群にくらべ有意に高かった。ミトコンドリアの超微形態はTgM Fe群において大小不同, クリスタの消失, 巨大ミトコンドリア等を示し, 明らかな形態学的異常を認めた。さらに¹⁸⁾Cでラベルしたパルミチン酸を投与し脂肪酸代謝能を比較検討したが, TgM Fe群が他の3群に比べて有意に低下しており, ミトコンドリア機能障害も認めた。最も興味深いことに, 飼育開始9ヶ月目まではいずれの群においても肝腫瘍を認めなかったが, 12ヶ月目ではTgM Fe群においてのみ肝細胞癌を含む肝腫瘍を11匹中5匹 (45%) に認めた。このHCV TgMはもとも13ヶ月齢以上の雄において肝発癌を認めることが報告されているが¹⁹⁾, 今回の検討からHCV感染における鉄過剰状態はミトコンドリア障害を引き起こし, 酸化ストレスを増強することで肝発癌を促進することが明らかとなった。

おわりに

著者のC型肝炎に関する研究対象はその持続感染機序の解析から始まり, 現在はHCV持続感染が究極的にもたらす肝発癌機構の解明へと変遷してきた。

C型慢性肝炎の治療はペグインターフェロン・リバビリン併用療法の導入により, 難治型症例に対し

ても約50%のウイルス排除が可能になった。しかし, 未だ半数の患者はウイルス排除ができないまま, 肝発癌抑制のために闘病生活を余儀なくされている。ようやくC型肝炎患者に類似した肝発癌モデルを作成することができたので, 今後は肝発癌抑制のための新たな治療を構築していきたいと考えている。

最後に, 著者が肝臓班に所属して以来, ご指導いただいた沖田 極 前教授, 肝炎研究を共に行ってきた肝炎グループの大学院生, 指導医の先生方, トランスジェニックマウスをご供与いただいたLemon教授, Weinman教授 (テキサス大学ガルベストーン校), 電子顕微鏡のご指導をいただいた権藤俊一先生 (山口大学医学部附属病院病理部) に深謝致します。

文 献

- 1) Fujii K, Hino K, Okazaki M, Okuda M, Kondoh S, Okita K. Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus between human serum and peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **225**: 771-6.
- 2) Okuda M, Hino K, Korenaga M, Yamaguchi Y, Katoh Y, Okita K. Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in human serum, peripheral blood mononuclear cells, and liver. *Hepatology* 1999; **29**: 217-22.
- 3) Hijikata M, Shimizu YK, Kato H, Iwamoto A, Shih JW, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H. Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol* 1993; **67**: 1953-8.
- 4) Korenaga M, Hino K, Okazaki M, Okuda M, Okita K. Differences in hypervariable region 1 quasispecies between immune complexed and non-immune complexed hepatitis C virus particles. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **240**: 677-82.
- 5) Korenaga M, Hino K, Katoh Y, Yamaguchi Y, Okuda M, Yoshioka K, Okita K. A possible role of hypervariable region 1 quasispecies in

- escape of hepatitis C virus particles from neutralization. *J Viral Hepat* 2001 ; **8** : 331-40.
- 6) Hino K, Korenaga M, Orito E, Katoh Y, Yamaguchi Y, Ren F, Kitase A, Satoh Y, Fujiwara D, Okita K. Constrained genomic and conformational variability of the hypervariable region 1 of hepatitis C virus in chronically infected patients. *J Viral Hepat* 2002 ; **9** : 194-201.
- 7) Barbaro G, Di Lorenzo G, Asti A, Ribersani M, Belloni G, Grisorio B, Filice G, Barbarini G. Hepatocellular mitochondrial alterations in patients with chronic hepatitis C: ultrastructural and biochemical findings. *Am J Gastroenterol* 1999 ; **94** : 2198-2205.
- 8) Kageyama F, Kobayashi Y, Kawasaki T, Toyokuni S, Uchida K, Nakamura H. Successful interferon therapy reverses enhanced hepatic accumulation and lipid peroxidation in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2000 ; **95** : 1041-1050.
- 9) Paradis V, Mathurin P, Kollinger M, Mbert-Bismut F, Charlotte F, Piton A, Opolon P, Holstege A, Poynard T, Bedossa, P. In situ detection of lipid peroxidation in chronic hepatitis C: correlation with pathological features. *J Clin Pathol* 1997 ; **50** : 401-6.
- 10) Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM, Weinman SA. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 2002 ; **122** : 366-75.
- 11) Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Todoroki T, Kimura S, Koike K. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2001 ; **61** : 4365-70.
- 12) Kitase A, Hino K, Furutani T, Okuda M, Gondo T, Hidaka I, Hara Y, Yamaguchi Y, Okita K. In situ detection of oxidized n-3 polyunsaturated fatty acids in chronic hepatitis C: correlation with hepatic steatosis. *J Gastroenterol* (in press).
- 13) Korenaga M, Wang T, Showalter L, Chan T, Sun J, Weinman SA. Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases ROS production. (in submitted).
- 14) Schwer B, Ren S, Pietschmann T, Kartenbeck J, Kaehlcke K, Bartenschlager R, Yen TS, Ott M. Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *J Virol* 2004 ; **78** : 7958-68.
- 15) Hara Y, Hino K, Furutani T, Okuda M, Hidaka I, Yamaguchi Y, Korenaga K, Li K, Weinman SA, Lemon SM, Okita K. Hepatitis C virus core protein inhibits deoxycholic acid-mediated apoptosis despite generating mitochondrial reactive oxygen species. (in submitted).
- 16) Farinati F, Cardin R, De Maria N, Della Libera G, Marafin C, Lecis E, Burra P, Floreani A, Cecchetto A, Naccarato R. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol* 1995 ; **22** : 449-56.
- 17) Lerat H, Honda M, Beard MR, Loesch K, Sun J, Yang Y, Okuda M, Gosert R, Xiao SY, Weinman SA, Lemon SM. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2002 ; **122** : 352-65.

Persistent Infection of Hepatitis C Virus and Hepatocarcinogenesis

Keisuke HINO

*Department of Basic Laboratory Sciences, Faculty of Health Science,
Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

SUMMARY

I herein discuss the two subjects on hepatitis C virus (HCV) infection by showing some data obtained from our research. First, I discuss the mechanisms by which HCV evades host immune surveillance. Differences in HCV quasispecies between liver and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) suggest infection of PBMCs by HCV and that HCV in PBMCs may be differently exposed to host immunity from that in liver. As another mechanism for persistent infection of HCV, major HCV clones escape from neutralization by neutralizing antibodies by generating considerably divergent minor "decoy" clones which may be preferentially neutralized. Second, I discuss the mechanisms by which hepatocellular carcinoma (HCC) develops in persistent HCV infection, especially focusing on the oxidative stress induced by HCV. We established iron overloaded HCV transgenic mice which have almost the same iron content in the liver as that in patients with chronic hepatitis C and develop HCC in twelve months. By analyzing these animals, it has been shown that the development of HCC is closely related to the synergistic oxidative stress induced by HCV core protein and iron overload.