

## 論文の内容の要旨

論文題目 C型肝炎ウイルス感染に伴う脂質代謝異常・電子伝達系障害に対するフルバスタチンの作用

氏名 藤永 秀剛

### 【背景】

C型肝炎は本邦で170万～200万人の罹病者がおり、世界では1億3000万～1億7000万人（全人口の約2.2～3%）が感染していると推計されている。慢性肝炎が持続すると、無治療では10年以上の経過で肝硬変に進展する。肝硬変に至ると年率7～8%で肝細胞癌を発症する。肝がんによる死亡は年間3万人以上で、そのうちHCV関連ははまだ7割を占めている。

HCVはプラス一本鎖のRNAウイルスである。構造蛋白と非構造蛋白に大別され、前者にはコア蛋白、E1/E2エンベロープ蛋白があり、後者にはNS2蛋白、NS3-4A蛋白、NS4B蛋白、NS5A蛋白、NS5B蛋白などが含まれる。このうちトランスジェニックマウスを用いた検討では、コア蛋白発現マウスではヒト臨床と同様のインスリン抵抗性、脂肪肝、脂質代謝異常がみられるとともに、肝炎・肝線維化を伴わず肝発癌が得られた。

HCV感染と糖代謝異常の関連が知られている。日本人HCV感染者とB型肝炎ウイルス（HBV）感染者との比較でも、有意にHCV感染者で糖代謝異常が多いことが同様に示されている。HCVコア蛋白発現マウスでの検討で、肝脂肪化をきたす以前からインスリン抵抗性が存在することが示された。

C型肝炎は、慢性肝疾患の中でB型肝炎や自己免疫性肝炎に比べても、脂肪肝の合併が多い。C型慢性肝炎患者の肝組織は、リンパ濾胞形成や胆管障害、肝脂肪化が多く認められた。HCVコア蛋白発現マウスで、この肝脂肪化が再現され、著明な炎症を伴わないまま肝癌も発生することが示された。質的变化、すなわち不飽和脂肪酸のオレイン酸（C18:1）が有意に増加していることが、このマウスモデルでもヒトでも同様に明らかとなった。肝脂肪化の機序として、ひとつにはVLDL分泌低下があげられる。肝臓ではアセチルCoAから

HMG-CoA を経て、メバロン酸が合成され、コレステロールに至る。このコレステロールは主に VLDL として血中に放出される。HCV 感染者では血中コレステロールが低下しており、アポリポ蛋白も apoB (VLDL, LDL 修飾), apoCII (VLDL 修飾), apoCIII (VLDL 修飾) の減少が認められた。また VLDL 形成に必要な MTP (microsomal triglyceride transfer protein) 活性の低下も示された。脂肪化をきたす他の機序としては、脂肪酸の合成亢進と消費低下がある。HCV コア蛋白は SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein-1c), SCD-1 (stearoyl-CoA desaturase-1) の発現を増加させ、脂肪酸合成および不飽和化を促進する。これが前述のように不飽和脂肪酸であるオレイン酸の比率を高める。HCV コア蛋白はミトコンドリア電子伝達系を障害し、NADH/NAD<sup>+</sup>比を上昇させ、脂肪酸 β 酸化を抑制する。

以前から C 型慢性肝炎では酸化ストレスが病態に深く関与していることが報告されてきた。HCV コア蛋白発現マウスで炎症を伴わないまま過酸化物質増加と抗酸化系の活性化がみられており、酸化ストレスの亢進が示唆された。また、ミトコンドリア電子伝達系、複合体 I の障害が明らかとなった。

C 型肝炎の治療は、2011 年 11 月からペグインターフェロン、リバビリン、プロテアーゼ阻害剤テラプレビルとの 3 剤併用療法も可能となった。治療効果がめざましく向上した反面、急性腎不全や重症皮疹など様々な副作用もみられるようになり、より副作用の少ない治療法の工夫も求められている。HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチン系薬剤は臨床用量での単独使用ではウイルス減少効果はないものの、インターフェロン (IFN) との併用で治療成績を上昇させることが知られており、レプリコンを用いた *in vitro* の検討でも IFN の抗ウイルス効果を増強することが示されている。フルバスタチンを用いた臨床試験もおこなわれてきた。

スタチンは血中 LDL コレステロールを強力に低下させ、脂質異常症の治療薬、心血管イベント予防手段として有効性が確立されている。前述の IFN 治療の効果増強は、一般には HCV の複製の場である lipid droplet を縮小させること、ウイルスゲノム複製に関与する FBL2 (F-box/LRR-repeat protein 2) のグラニルグラニル化をスタチンが抑制することなどの機序が考えられている。スタチンの脂肪肝への影響については、評価が一定していない。生活習慣病の臨床において、スタチンは一般的に MTP 抑制により脂肪肝を増悪させると考えられている。心血管イベント抑制についての臨床試験で、スタチンは非アルコール性脂肪性肝疾患の患者の肝機能異常を有意に改善するという結果が示された。

#### 【目的】

HCV 感染に起因する脂質代謝異常・電子伝達系障害に対するフルバスタチンの作用機序について、コア蛋白発現マウスおよびレプリコン細胞で検討した。

#### 【方法】

マウス:我々の研究室で、HBV 由来の発現制御領域とポリ A 付加シグナルの間に HCV-1b 型の遺伝子 (約 0.6kb) を配置し、C57BL/6N マウスの受精卵に遺伝子挿入した。今回の検

討には、既に確立した系統のマウスを用いた。NTg のフルバスタチン非投与群 (NTg-N) 5 匹, 同投与群 (NTg-FLV) 8 匹, CoreTg の同非投与群 (CoreTg-N) 6 匹, 同投与群 (CoreTg-FLV) 6 匹で検討した。

培養細胞 : HCV の full genome replicon である RCYM1 細胞を用いた。対照群としては IFN $\alpha$  で HCV を排除した cure 細胞を用いた。

### 【結果】

マウスの体重, 肝重量, 体重あたりの肝重量は, いずれの群でも有意差は認めなかった。血中コレステロールは群間で有意差なく, 血中トリグリセライドは NTg, Tg ともにフルバスタチン投与群で有意に低下していた。HOMA-R は NTg-N に比べ CoreTg-N で有意に高値だった。

CoreTg では中心静脈周囲に脂肪蓄積を認め, フルバスタチン投与によりこの程度は軽減していた。肝トリグリセライド量は, CoreTg においてフルバスタチンで有意に減少していた。また不飽和脂肪酸についても, オレイン酸/ステアリン酸比およびパルミトレイン酸/パルミチン酸比は CoreTg-FLV は CoreTg-N に比べ有意に低下し改善していた。

フルバスタチン投与により, コレステロール合成の律速酵素である HMGCR の蛋白発現は抑制され, mRNA は発現上昇した。CoreTg では LDLR の蛋白発現が増強した。CoreTg ではフルバスタチンにより脂肪酸合成 (fatty acid synthase, FAS) が抑制され, トリグリセライド合成 (diacylglycerol acyltransferase 1, DGAT1) の発現も低下し, 肝内トリグリセライド量の減少と合致していた。また CoreTg では不飽和化 (SCD1) の蛋白発現・mRNA レベルともフルバスタチンにより抑制され, 不飽和脂肪酸の比率の低下と合致した。一方でリン脂質合成に関わる GPAM (glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial) は, CoreTg においてフルバスタチンにより発現が増強し, カルジオリピン合成 (cardiolipin synthase 1, CRLS1) も同様に発現増強した。

電子伝達系に関しては, 複合体 I では, NDUFS3 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3) は CoreTg においてフルバスタチンにより蛋白発現が増強した。複合体 II では, SDHA (succinate dehydrogenase complex, subunit A), SDHB の蛋白発現に変動はみられなかった。複合体 III では, UQCRCFS1 (ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1) の蛋白発現が, NTg および CoreTg ともにフルバスタチンにより増強し, CoreTg では mRNA レベルも同様に上昇した。複合体 IV では, COX4 (cytochrome c oxidase 4), COX5A, COX5B の蛋白発現が増強した。培養細胞を用いた検討でも, フルバスタチンによる電子伝達系の発現回復がみられた。

主要かつ重要なカルジオリピンである (C18:2)<sub>4</sub>-cardiolipin は, CoreTg と NTg では同等程度と考えられた。有意差は得られなかったが, フルバスタチン投与により CoreTg では (C18:2)<sub>4</sub>-cardiolipin 量が増加する可能性が示唆された。

ミトコンドリア形態については, NTg-N はミトコンドリア二重膜とクリステの構造が明瞭だった。NTg-FLV では形態が悪化した。CoreTg-N はミトコンドリア膜, クリステとも

きわめて不明瞭だった。CoreTg-FLV はミトコンドリア膜の連続性が保たれ、クリステも一部が整った構造であった。

#### 【考察】

フルバスタチン投与により、リン脂質のカルジオリピン合成系の発現が上昇した。カルジオリピンはミトコンドリアに特異的に存在し、ミトコンドリア内膜やクリステ構造の構成に必要なリン脂質である。カルジオリピンは電子伝達系の複合体 I, III, IV と結合し、これらの活性を維持しているとともに、超複合体 I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub> を安定化させてエネルギー産生を保っている。今回の検討ではカルジオリピン定量での有意差はみられなかったが、フルバスタチンにより CRLS1 (*de novo* 合成経路), PLA<sub>2</sub> (リモデリング経路) のいずれもが発現上昇していた。ミトコンドリア形態と電子伝達系障害の改善はカルジオリピン量および質 (組成) と関連する可能性がある。

これらの機序としては、CoreTg ではミトコンドリアの過剰なコレステロールが酸化ストレス増加、カルジオリピンの過酸化を経てミトコンドリア障害を来しているとの仮定の下、フルバスタチンがコレステロール合成抑制および抗酸化作用により上記を改善している可能性が考えられた。一方で NTg では高用量のフルバスタチンによりミトコンドリアのコレステロール欠乏から膜の脆弱性、電子伝達系の障害、酸化ストレス増加を生じている可能性も考えられた。いずれもさらなる検討が必要である。

#### 【結語】

HCV 感染に伴う脂質代謝異常・電子伝達系障害は、フルバスタチンにより改善が得られた。これらの知見は、いまだ難治例や治療困難例の多い C 型肝炎の治療法の進歩に寄与することにとどまらず、今後ますます重要となるであろう非アルコール性脂肪性肝炎に代表される代謝性肝疾患の病態解明や治療法の開発に大きく貢献することが期待される。