

## 論 文 要 旨

**Difference in serum complement C4a levels between hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine aminotransferase levels or chronic hepatitis C**

HCV 感染 ALT 持続正常者と C 型慢性肝炎における

血清 C4a 濃度の相違

今給黎 和幸

**【序論および目的】**

C 型肝炎ウイルス (HCV) 持続感染者の多くは肝炎が持続し、肝硬変や肝臓に進展する。一方、正常 ALT レベルが持続し、肝炎は無いか軽度で、肝線維化もほとんど起こらず、肝硬変へ進展する可能性の低い HCV 持続感染者が約 2~3 割存在する。しかし、そのような HCV 感染者において、ALT 正常が持続する機序は十分明らかになっていない。ALT 正常が持続する機序や、病気の進展に寄与するタンパク・分子が同定できれば、C 型肝炎の進展予測や治療法の開発に利用できる可能性がある。

本研究では、ALT 正常が持続し、かつ血小板数が 15 万以上の HCV 持続感染者を Persistent Normal ALT (PNALT) と定義し、ALT 正常が持続する機序を明らかにするために PNALT 患者と ALT 値の高い C 型肝炎患者血清を用いてプロテオーム解析を行い、病態と関連する分子を探索した。

**【材料および方法】**

解析には HCV 持続感染者から得られた血清サンプルを用いた。病院受診者で 12 か月の間、少なくとも 3 回以上検査を行い、すべての検査で ALT 値 (IU/ml) が 30 以下、かつ血小板数 15 万以上を PNALT-1 と定義し、PNALT の基準を満たさない C 型肝炎患者を CHC-1 とした。また、年 1 回の HCV 高感染地区住民検診に少なくとも 3 回以上受診し、ALT が 30 以下、血小板数が 15 万以上の基準を満たす HCV 持続感染者を PNALT-2 と定義し、ALT が 31 以上を持続し、血小板数が 15 万未満を呈した検診受診者を CHC-2 とした。PNALT-1 は 19 名、CHC-1 は 20 名、PNALT-2 は 37 名、CHC-2 は 30 名で、健常者 12 例も合わせて比較検討した。

PNALT-1 と CHC-1 の血清を用い、クリンプロットおよび MALDI TOF/MS システムで比較解析し、発現に有意差のあるピーク蛋白を MS/MS イオンサーチ法で同定した。また PNALT-2 と CHC-2 の血清を用いて、ELISA 法で C4a 濃度を測定し、比較検討した。

**【結 果】**

1) PNALT-1 と CHC-1 の血清を用いてプロテオーム解析を行い、血清中に有意差のあるタンパク質ピークを 6 個検出した。

2) CH-1 よりも PNALT-1 で発現ピーク値が有意に高い 1738m/z のピーク蛋白を Complement component

4(補体 C4)断片と同定した。

3) C4 断片 (1738m/z) のピーク値は ELISA 法で測定した血清 C4a 濃度と相関した。

4) ELISA で測定した血清 C4a 濃度は健常者で最も低く、HCV 感染者、特に PNALT-2 で高値を示し、CHC-2 は PNALT よりも有意に低値であった。

5) PNALT - 2 における血清 C4a 濃度は AST や ALT と有意に相関し、HCV コア抗原量、血小板数、総コレステロール、肝線維化マーカーや肝癌腫瘍マーカーとは相関しなかった。

6) PNALT-2 と CHC-2 において、ALT が 30 以下であれば、血清 C4a 濃度は ALT と有意に相関したが、ALT が 30 を超えると、ALT は血清 C4a 濃度とは相関しなかった。

以上のことから、血清 C4a や血清プロテオミクスで同定した C4a 断片は HCV 感染により上昇し、その濃度は PNALT で最も高くなり、病態が進展すると低下すると考えられた。このような C4 の変化をきたす機序の解明は HCV 持続感染者の病態解明に役立つ可能性があり、プロテオミクスを用いた解析は、肝疾患の病態解明に役立つと考えられた。

#### 【結論及び考察】

- 1) 血清プロテオミクスを用いて、C4 由来の断片ペプチドおよび C4a が HCV 感染者、とくに PNALT で高値を示すことが示され、これらの分子は HCV 感染者の病態と関連すると考えられた。
- 2) C4 は肝で産生されることから、肝疾患の進行に伴い C4a も低下する可能性はあるが、C4a 濃度と PNALT との関連を明らかにした報告は今までになく、HCV 感染と C4 との関連についてはさらに検討が必要である。
- 3) 血清プロテオミクスを用いた検討から、PNALT は通常の慢性肝炎とは血清中に存在する分子のパターンが異なることが示され、血清プロテオミクスは肝疾患の病態を解明する一つのツールとなると考えられた。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 203 号	学位申請者	今給黎 和幸
審査委員	主査	橋口 照人	学位
	副査	馬場 昌範	副査
	副査	上野 真一	副査
			博士 (医学)
			高嶋 博
			堀内 正久

**Difference in serum complement C4a levels between hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine aminotransferase levels or chronic hepatitis C (HCV 感染 ALT 持続正常者と C 型慢性肝炎における血清 C4a 濃度の相違)**

C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染者は世界では 1 億人以上に達し、また、慢性肝炎の主な原因であり、最終的には末期の肝硬変および肝細胞癌に進展する。一方で HCV 感染者の中には ALT 値正常が持続し、肝炎の活動性が無いもしくは非常に軽度で病期の進行が緩徐な集団が存在するが、ALT 値正常が持続する機序は十分解析されていない。C 型肝炎の進展に寄与するタンパク質・分子が同定できれば、その進展予測や治療法の開発に応用できる可能性がある。本研究では、ALT 値正常が持続し、血小板数が 15 万以上の HCV 持続感染者を Persistent Normal ALT (PNALT) と定義し、ALT 値正常が持続する病態を明らかにするために PNALT および慢性肝炎 (CHC) 患者血清を用いて解析した。対象として HCV コア抗原陽性または HCV RNA 陽性の HCV 感染者で病院受診者 (1st グループ) と検診受診者 (2nd グループ) をそれぞれ PNALT と CHC に分けて比較した。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

- 1) 1st グループの PNALT と CHC 患者から得られた血清を用いて、クリンプロットおよび MALDI TOF/MS システムでプロテオーム解析し、血清中に有意差のあるペプチドのピークを 6 個検出した。
- 2) 1st グループでの解析で、CHC と PNALT で発現ピーク値が有意に高値であった m/z 1738 および m/z 1896 のピークはいずれも補体 4 (C4) 由来のタンパク質断片であると同定した。また、ELISA で測定した C4a 濃度はプロテオーム解析で検出した m/z 1738 のピーク値と相関した。
- 3) 2nd グループでの解析で、ELISA で測定した C4a 濃度は健常者で最も低く、HCV 感染者、特に PNALT で高値を示し、CHC は PNALT よりも有意に低値であった。
- 4) 2nd グループでの解析で、C4a 濃度は ALT 30 U/L 以下では ALT と有意に逆相関するものの、ALT 31 U/L 以上では ALT 値と C4a 濃度は関連しなかった。

本研究では、HCV 感染者のうち PNALT に着目し、プロテオーム解析を用いて PNALT の病態と関連するタンパク質として C4 断片を同定した。さらに、2nd グループの血清を用いて、同定した C4 断片と相関する C4a 濃度が HCV 感染により増加すること、HCV 感染者で病態が進展すると低下することを示し、その臨床的意義を明らかにした。

本研究は、HCV の持続感染や病態進展に関連する分子を同定した研究であり、新しい治療法や診断マーカーの創出への応用が期待される。また、プロテオミクスを用いた解析が肝疾患の病態解明に有用なツールとなる可能性も示唆している。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判断した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 203 号		学位申請者	今給黎 和幸
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学)
	副査	馬場 昌範	副査	高嶋 博
	副査	上野 真一	副査	堀内 正久

主査および副査の 5 名は、平成 24 年 8 月 27 日、学位申請者 今給黎和幸君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) HCV-RNA 量は PNALT と CHC の比較において差がみられるものなのか？

(回答) HCV-RNA 量は PNALT と CHC で差はないと言われている。我々は HCV RNA 量と相関する HCV コア抗原量で 2 群間比較したが、差はなかった。

質問 2) これまでに PNALT に着目した研究はなかったのか？

(回答) PNALT を対象としてインターフェロン治療を行った研究はあるが、PNALT に着目したプロテオーム解析の報告はない。

質問 3) 今回同定した C4 の断片とは C4c の一部ということなのか？

(回答) 同定した C4 断片は C4 の  $\alpha$  鎖の一部で C4c の一部でもある。C4 は活性化過程で、C4 前駆体から  $\alpha$  鎖や  $\beta$  鎖、さらに活性化されて C4a や C4c に切断されるが、今回の研究で同定した C4 断片が C4 前駆体に直接由来するのか、 $\alpha$  鎖もしくは C4c に分解されてから C4 断片が血中に出現したのかは不明である。

質問 4) HCV 感染だけで肝細胞内の様々な遺伝子発現に影響があるものなのか？

(回答) HCV 由来の蛋白は肝細胞内で宿主の様々な蛋白や遺伝子に影響することが知られており、HCV 感染により肝細胞内の遺伝子発現は変化すると考えられる。

質問 5) ALT の産生に HCV 感染が影響するものなのか？

(回答) ALT は肝逸脱酵素で、肝細胞が障害された際に血中に逸脱する。HCV 感染が直接 ALT の産生に影響するということは考えにくく、報告もない。

質問 6) 網羅的な解析を行うと論文に示した 6 つのペプチドだけでなく、もっと多くのペプチド・タンパク質が見つかるのではないのか？

(回答) プロテオーム解析では、サンプルの前処理により検出ピークは異なる。m/z 3000 以下のピークが同定しやすいことから、その範囲のピークのみに着目した。サンプルの前処理法を変えたり、解析する分子量の範囲を広げたりすると、別の蛋白ピークが検出される可能性がある。

質問 7) 慢性肝炎において血小板が低下する理由は門脈圧亢進症などによるものなのか？

(回答) 慢性肝疾患、とくに肝硬変では脾機能が亢進するため、血小板数は低下する。また、肝硬変では肝合成能が低下するため、血小板の産生に必要なトロンボポエチン産生が減少することも、血小板減少の一因である。

質問 8) MALDI-TOF/MS システムを用いた理由はなぜか？

(回答) 網羅的なタンパク質発現解析を行うことを目的としてプロテオミクス技術を利用することにした。さらに、測定機器を選別するにあたり、再現性と使いやすさから MALDI-TOF/MS システムを利用した。

質問 9) 測定しなかった残りの 4 つのタンパク質は重要でなかったのか。また今後解析する予定か？

(回答) 今回は 4 つのタンパク質の同定は出来なかったが、今後の解析を検討したい。

質問 10) PNALT は女性が多いようであるが、男女別に検討はしなかったのか？

(回答) ご指摘の通り PNALT は女性に多いことが知られており、性ホルモンが関連すると考えられている。今回の検討でも PNALT に女性が多かったが、男女別には検討しなかった。

質問 11) HBV にも PNALT の概念はあるのか？

(回答) ALT 値正常が持続する HBV 感染者も多く存在し、無症候性キャリアと言われることが多いが、HBV 感染者ではウイルス量が発癌と強く関連するため、HBV 感染者での ALT 値持続正常者は HCV 感染者の PNALT と同じようには扱われない。

質問 12) HBV は C4 の転写と関連するのか？

(回答) 慢性肝炎では血清補体 (CH50、C3、C4) が低下することが知られている。C4 が HBV の疾患活動性及び肝障害の指標となる可能性を示唆する報告はあるが、C4 転写と HBV との関連についての報告はない。

質問 13) PNALT と CHC で飲酒歴などの背景因子に差はないのか？

(回答) 飲酒は肝炎の進展に影響を与える因子と考えられるが、今回の研究では検討しなかった。

質問 14) 血清中の濃度としてどれくらいあればペプチドピークとして検出できるのか？

(回答) いままでの経験では、血清中に 100 ng/ml 程度存在すれば十分検出できる。サイトカインのように数 pg/ml 程度の濃度は検出できないと考えられるが、分子量にも依存するため、正確な数値ではない。

質問 15) 今回の検討ではアルブミン処理は行なったのか？

(回答) 今回の検討では、血清をクリンプロットビーズで処理し、ビーズに吸着したタンパク質のみを MALDI-TOF/MS で解析した。今回用いたビーズで処理する前にアルブミンは除去される。

質問 16) Table 2 で蛋白 m/z 1738 を同定した理由はなぜか？

(回答) 意図して選んだのではなく、同定できたものが 2 つのペプチドだけであった。ピーク強度が強く、分子量が小さいことが同定できた理由と考えられる。

質問 17) C4 濃度は加齢と関連しているのか？

(回答) 今回は検討していないが、肝細胞からの C4 産生は加齢とともに低下する可能性はある。

質問 18) m/z 1896 のペプチドも C4 断片ということであるが、論文にそのことを記載しなかった理由はなぜか？

(回答) 今回は発現量が比較的多かった蛋白 m/z 1738 について解析し、当初 m/z 1896 に関しては解析していなかったため論文には記載しなかった。

質問 19) 治療の観点から、この断片はバイオマーカーとして使えるものなのか？

(回答) HCV による慢性肝疾患では病態が進展すると C4 断片は低下してくることから、肝炎が改善すると C4 断片は増加する可能性がある。一方、HCV 感染があると C4 断片は健常者より高値であることから、抗ウイルス治療により HCV が排除されれば C4 断片は低下することが予想される。したがって、C4 断片濃度を用いて治療効果を判定するのは難しいと考えられるが、自然経過での病態進展を予測するバイオマーカーとしての臨床的意義はあると思われる。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。