

# 論文内容要旨

論文題目

## Toll-like receptor 2 およびその関連遺伝子群の 遺伝子多型と C 型慢性肝炎の病態との関連

責任講座： 耳鼻咽喉科学 講座  
氏 名： 石井 健一

### 【内容要旨】

【背景】 C 型肝炎ウイルス (HCV) は高率に持続感染し、慢性肝炎やさらに肝線維化が進行すると肝硬変や肝細胞癌に至る。C 型慢性肝炎の進展は患者間で大きく異なっており、その進展には環境因子、ウイルス因子のみならず宿主因子が関与していると考えられる。宿主側の因子として、獲得免疫系の炎症反応の個体差と、肝疾患との関連については以前より研究されてきたが、自然免疫系に関する報告は少ない。近年、自然免疫に対する研究は急速に進んでおり、特に Toll-like receptor (TLR) に関しては様々な病原体を認識し、細胞内のシグナル伝達に影響を及ぼし、炎症反応に関与するものとして多くの報告がなされている。その中で TLR3 と HCV との関連、TLR2 と HCV コア蛋白との関連など HCV に関しても徐々に明らかになってきた。本研究では、TLR2 を介する自然免疫反応と C 型慢性肝炎の進展との関連を解明するため、TLR2 シグナル伝達経路に存在する遺伝子群の遺伝子多型と、C 型慢性肝炎患者の病態について検討し、さらに関連が示唆された遺伝子多型に対して機能解析を行った。

【方法】 2003 年 6 月から 2006 年 5 月の間に、山形大学付属病院第 2 内科を受診した HCV 抗体陽性患者 179 名 (肝癌 63 名、非肝癌 116 名) を対象とし、内訳は男性 94 名 (年齢 26 ~86 歳、中央値 61 歳)、女性 85 名 (年齢 25 歳~85 歳、中央値 66 歳)。飲酒・喫煙歴などの生活習慣、および手術歴・輸血歴などの既往歴は医師の問診にて聴取した。血液データについては肝生検等の精査を施行した確定診断時から 1 ヶ月以内のものを採用した。遺伝子多型は、TLR2 シグナル伝達経路に関わる遺伝子群の多型の中で Pubmed 上の文献報告、dbSNP、HapMap Database に基づいて、5'UTR(untranslated region)、exon、3'UTR に存在する insertion、deletion、regulatorySNP、codingSNP から 4 遺伝子 7 箇所の多型を選択し、PCR 法、直接 sequencing 法、Melting Curve Analysis にて調査した。また TLR2 5'UTR deletion の遺伝子発現への影響を検討するため、この deletion 部位を有するプラスミドを作製し、ヒト肝細胞癌 Huh7.5 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行った。

【結果】 血小板数との関連では、血小板  $<10^5/\mu\text{l}$  群における TLR2 5'UTR del アレルの割合が有意に高く ( $p=0.03$ )、遺伝子型 del23 型 (wild/del+del/del) の割合が有意に高かった ( $p=0.04$ )。del23 型の年齢調整後オッズ比も 2.32 (95% C.I. 1.17-4.60) と有意差を認めた。他の多型との関連は認めなかった。ALT 値との関連では、ALT  $>40$  IU/l 群における del アレルの割合は有意に高く ( $p=0.01$ )、del23 型の割合も有意に高かったが ( $p=0.04$ )、del23 型の年齢調整後オッズ比は 1.69 (95% CI 0.83-3.43) と有意差を認めなかった。他の多型との関連は認めなかった。またルシフェラーゼアッセイの結果、wild 型に比べ del 型のルシフェラーゼ活性が低い値となった (wild 型 : del 型 = 2.63 : 1.96)。

【結論】 C 型慢性肝炎患者において TLR2 5'UTR deletion は血小板数と関連があることが明らかとなった。また、この deletion は遺伝子発現に影響があることが示され、TLR2 を介する自然免疫反応が C 型慢性肝炎の病態に影響していると考えられた。

平成 19 年 / 月

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 石井 健一

論文題目： Toll-like receptor-2 およびその関連遺伝子群の遺伝子多型と  
C型慢性肝炎の病態との関連

審査委員：主審査委員

河 田 純 男



副審査委員

吉 田 匡



副審査委員

木 村 理



審査終了日：平成 19 年 / 月 / 日

### 【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

C型肝炎ウイルス(HCV)の持続感染者は慢性肝炎から肝硬変、さらに肝細胞癌へと進展する。その予後を規定する因子として、ウイルス要因と宿主要因があるが、近年、宿主要因、とくに遺伝素因が注目されている。一方、ウイルス感染と自然免疫の関連が注目されているが、HCVはtoll-like receptor-2(TLR2)に結合して炎症およびインターフェロン産生を誘導することが知られている。しかし、C型肝炎の病態とTLR2遺伝子多型の関連を検討した報告はない。

本研究は、C型肝炎の病態進展とTLR2およびその関連遺伝子群の遺伝子多型との関連に着目し検討を行い、さらに機能解析を実施した。その結果、肝線維化の進展と関連して減少することを確かめた血小板とTLR2遺伝子多型の関連が示された。すなわち、血小板10万/ $\mu$ l未満群では10万/ $\mu$ l以上群に比較してTLR2 5'URT deletion(del)アレルおよび遺伝子型 del23型(wild/del + del/del)の割合が有意に高かった( $P=0.03$ および $P=0.04$ )。また、del23型の年齢調整後オッズ比は有意差を認めた。

炎症の指標であるALT値との関連では、ALTが40を超える群ではdelアレルおよび遺伝子型 del23型の割合は有意に高かった( $P=0.01$ および $P=0.01$ )。しかし、年齢調整後のdel型のオッズ比は有意差を認めなかった。また、ルシフェラーゼ活性はdel型で低かった。以上より、del型は血小板、すなわち肝線維化の進展と関連があることが示唆された。

本研究は、C型肝炎の病態進展と自然免疫に重要な役割を担うTLR2遺伝子多型との関連を初めて明らかにしており、ウイルス肝炎の病態形成に関する研究に資するものである。研究の進め方および手法も堅実である。よって、本審査委員会は、慎重に審査した結果、学位論文としてその価値があると結論付けた。