

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19316

研究課題名(和文) 肝炎ウイルス感染時の宿主自然免疫応答機構とウイルスによるその阻害機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of the host innate immunity induced upon hepatitis virus infection and its inhibitory mechanism by virus protein

研究代表者

新田 沙由梨(Nitta, Sayuri)

東京医科歯科大学・医学部・プロジェクト助教

研究者番号：20527056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本検討では、臨床検体を用いた解析により、以前に明らかにしたC型肝炎ウイルスのNS4B蛋白によるinterferon (IFN)抑制作用がIFN治療効果と関連する可能性がある事を示した。一方、B型肝炎ウイルス(HBV)感染時の自然免疫応答にはRIG-I経路が関与していること、またIFN投与時に誘導されるInterferon Stimulated GenesはHBV存在下で抑制されることを示した。以上の成果は、HBV、HCVの持続感染成立機序やIFN治療抵抗性機序の解明に有用な知見と考えらえる。

研究成果の概要(英文)：In the hepatitis C virus (HCV) study, we demonstrated that the HCV-NS4B protein function to suppress interferon (IFN) activity may related to the effect of IFN therapy to chronic hepatitis C by the analysis using blood samples from patients infected with HCV. In the hepatitis B virus (HBV) study, we demonstrated that RIG-I dependent IFN signal pathway is one of the important innate immune signaling induced during HBV infection. Furthermore, we indicated that interferon stimulated genes induced by IFN is suppressed by HBV. These results above are important and contribute to understand and clarify the mechanisms of the sustained virus infection and the resistance to IFN therapy.

研究分野：ウイルス性肝炎

キーワード：ウイルス性肝炎 自然免疫 肝疾患治療 臨床病態解析 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

本邦における HBV・HCV 感染者は未だ 300 万人超存在すると推定されており、感染者の多くが肝硬変・肝癌へと至ることからその対策は急務である。抗 HCV 療法は、これまでのインターフェロン (IFN) を基軸とした治療に加え、ウイルス蛋白を直接標的とする direct acting antivirals (DAAs) が開発され治療効果が著しく向上した一方で、DAAs 使用による薬剤耐性ウイルスの出現の問題や、DAAs の発癌抑止効果は未知であることなど課題が残る。一方、HBV 感染ではウイルス DNA が肝細胞核内へと移行し cccDNA が宿主細胞に残存するため、既存の治療では完全なウイルス排除達成は極めて困難であり、これに関連して免疫調節薬・化学療法による HBV 再活性化の問題も注目されている。従ってこれらの課題を克服する新規治療の確立が強く求められており、そのためには HBV・HCV が宿主のウイルス排除機構を回避し持続感染するメカニズムの解明が必須である。

宿主は自然免疫応答として、病原体を認識し IFN などの抗炎症性物質を誘導する事により病原体を排除するという重要な生体防御機構を備えている。HCV 感染時には RIG-I を介した IFN- α 誘導経路が活性化されることが知られているが、研究代表者らはこれまで HCV による自然免疫応答の阻害機構に関する解析を続けてきた。その結果、HCV-NS4B 蛋白が RIG-I 経路のシグナル分子である STING を標的として IFN- α 誘導を抑制する事を示し、HCV の新たな自然免疫回避機構と NS4B 蛋白の新たな機能を明らかにした (Nitta et al. *Hepatology* 2013)。

III 型 IFN である IFN- λ は I 型 IFN と同様に自然免疫応答に重要であることが知られているが、近年 IFN- λ をコードする IL28B 遺伝子近傍の遺伝子多型 (SNP) が C 型慢性肝炎の IFN 治療効果を規定する重要な宿主因子であることが報告された (Tanaka & Sakamoto et al, *Nat Genet*, 2009)。一方、研究代表者らは、RIG-I など自然免疫系の遺伝子発現が IL28B の SNP および IFN 治療効果に強く関連している事を報告したが (Asahina & Nitta, et al. *Hepatology*, 2012)、これに関連して、HCV-NS4B 蛋白が IFN- λ だけでなく IFN- λ の誘導も抑制することを見出した (平成 25-26 年度若手研究 B)。

一方、HBV 感染時の pattern recognition receptor (PRR) を介した免疫応答に関しては未解明の点が多い。HBV は ISG の誘導能が弱いとの報告がある一方で、急性感染後早期に HBs 抗原陰性となる例を認めることや、幼少期での感染と成人期での感染とでは自然経過が異なることなどからは、HBV 感染時にも自然免疫応答が重要な意義を有すると予測される。既述の STING は病原体 DNA を介した自然免疫応答のシグナル分子、あるいは病原体の直接的な PRR として機能する事が示されており (Ishikawa et al. *Nature* 2007, Dara

L. B. *Nature* 2011 他)、HBV 感染に対する自然免疫応答に関わる有望な候補分子と考えられる。HBV の細胞内侵入・DNA の核内への移行を可能とするメカニズムや、IFN 治療により HBs 抗原の陰性化を得られない例を認めることには HBV による自然免疫応答の回避機構が関わっている可能性が考えられるが、近年 HBx 蛋白や HBV polymerase が自然免疫関連分子を標的として内因性 IFN 産生を抑制するとの報告が散見され (Kumar et. al *J Virol* 2011, Haifeng et. al *PLoS Pathog* 2010 他) これら既報からもその存在が示唆される。

2. 研究の目的

HCV および HBV と宿主自然免疫応答との相互関係について解析し、宿主の自然免疫応答によるウイルス排除機構と肝炎ウイルスとの関わりを解明する事によって、ウイルス持続感染のメカニズムの一端を明らかにし、新しいストラテジーの抗ウイルス療法開発の基盤とすることを目的とする。

すなわち、まず、HCV による自然免疫阻害機構に関わる NS4B の機能ドメインを解析し、解析結果を基に、HCV 感染患者血清などの臨床検体を用いて、*in vitro* で明らかにした HCV による自然免疫阻害機構が IFN 治療効果に与える影響を解析する。HBV 感染が可能な細胞株や可視化によりその動態が評価可能なウイルスを用いて HBV 感染時の自然免疫応答に関わるシグナル分子を探索し、更に、個々のウイルス蛋白発現プラスミドを用いることにより、HBV による自然免疫阻害機構を解析する。

3. 研究の方法

(1) IFN- λ および IL28B (IFN- λ 3) 誘導抑制に関わる NS4B の機能ドメイン解析：以前の検討より、HCV-NS4B 蛋白が IFN- λ のみならず IL28B (IFN- λ 3) の誘導を抑制する事、更に NS4B の N 末端側がこの抑制効果に重要であることを明らかにした。この結果を踏まえ NS4B の N 末端側をアラニンスキニングにより変異を挿入した変異 NS4B を用い、promoter assay を行うことにより IL28B 誘導抑制効果に関わる機能ドメインの解析を行った。解析には、研究代表者の所属する研究室で独自に作成した SNP の異なる二種類の IL28B promoter reporter を用いることにより、minor SNP, major SNP による差についても解析した。

(2) HCV-NS4B による自然免疫阻害機構が IFN 治療に与える影響に関する解析：本検討 (1) によって同定された NS4B の IFN 誘導抑制作用に重要なドメインと C 型慢性肝炎に対する IFN 治療効果との関連を明らかにするために、C 型慢性肝炎患者の血清中から HCV RNA を抽出し、cDNA を作成した後に、NS4B 領域のシーケンス解析を試みた。同定された配列をリファレンス配列と比較することに

よって、アミノ酸変異と IFN 治療効果との関連を検証した。

(3) HBV と pattern recognition receptors を介した自然免疫応答機構の関する解析：まず、自然免疫経路の活性化が HBV 増殖に与える影響を評価するために、1.2 倍長の HBV 発現プラスミドを主に RIG-I 経路に関わる自然免疫系分子と共に細胞に導入し、細胞上清中の HBs 抗原、HBe 抗原、および細胞内の HBV pgRNA を測定した。

一方、HBV による ISG 発現への影響を評価するために、以下の検討を行った。すなわち、ISRE promoter を 1.2 倍長 HBV プラスミドとともに HepG2 細胞に導入し、promoter assay を施行し、HBV 発現プラスミドを HepG2 細胞に強制発現させたときの、IFN 応答系に関わる分子の発現やリン酸化を western blotting によって評価し、更に HBV 発現プラスミドを HepG2 細胞に導入し種々の ISG の mRNA 発現を定量 PCR で測定した。以上の検討は、IFN 投与時、非投与時について解析し、HBV が IFN 投与時の ISG 変動に対して与える影響についても併せて評価を試みた。

4. 研究成果

(1) IFN- α および IL28B (IFN- λ 3) 誘導抑制に関わる NS4B の機能ドメイン解析: promoter assay による検討の結果、HCV-NS4B の N 末端側が IFN- α だけでなく IL28B の promoter 活性に対しても抑制作用を示したことから、同領域が IFN- α 抑制作用にも重要である事を見出した。一方、異なる SNP の IL28B promoter を用いた promoter assay では、NS4B による promoter 活性の抑制作用に差は認められなかった。更にアラニンスキャンによる検討から、NS4B 蛋白の 24-27 番目のアミノ酸をアラニン置換した変異 NS4B により IL28B promoter 活性の抑制作用の減弱を認めた。この領域を含む複数のアミノ酸がこの機能に関わる重要なドメインである事を示した。

(2) HCV-NS4B による自然免疫阻害機構が IFN 治療に与える影響に関する解析：今回の検討では、IL28B SNP が IFN 感受性である major SNP であるのにもかかわらず peg-IFN/RBV 療法が無効であった C 型慢性肝炎患者症例の血清を用いて解析を行った。シーケンス解析にて NS4B の塩基配列が同定された 3 例について、reference 配列と比較を行ったところ、いずれも NS4B の N 末端側である 1-84 アミノ酸領域に 1 つまたは複数のアミノ酸変異を認めた。今回は少数例の検討ということもありこの 3 例に共通のアミノ酸変異は見いだせなかった。しかしながら、この領域のアミノ酸変異が IFN 治療効果に関わる可能性が示唆され、更なる検証には症例数を増やして解析する必要があると考えられる。

(3) HBV と pattern recognition receptors を介した自然免疫応答機構の関する解析：HBV プラスミドを RIG-I 経路関連分子と共発現した検討では、RIG-I 経路のいずれの分子についても、HBV と共発現させることにより HBV のウイルス抗原 (HBs 抗原、HBe 抗原) および pgRNA の減少を認め、RIG-I 経路の活性化により HBV の増殖が抑制されるものと考えられた。

HBV による ISG 発現への影響の評価に関する検討では、以下のような結果を得た。HBV プラスミドの発現により ISRE promoter 活性は抑制された。IFN 添加により上昇した ISRE promoter 活性についても HBV 発現により概ね抑制された。HBV プラスミドは genotype A, B, C の 3 種類を使用したが、genotype C で ISRE 活性の抑制がやや弱かったものの、今回の検討では詳細な解析はしておらず、genotype による差については今後再検討が必要と考えられた。IFN 応答経路のうち STAT1, pSTAT1 については IFN 非投与下において HBV 強制発現時に蛋白発現の上昇を認めた。その他の分子については HBV 強制発現時においてその蛋白発現の変化は明らかでなかった。IFN 投与時においても同様に IFN 応答経路に関わる分子の発現の変化は明らかでなかった。IFN 非投与時には、HBV 強制発現によって、ISG15, CXCL10, PKR など様々な ISG の上昇を認めた。一方、IFN 投与時には、これらの ISG 発現は全体的に上昇したが、HBV の強制発現によって HBV 非発現時に比し ISG の上昇は抑制された。

以上の結果より、RIG-I 経路は HBV 増殖抑制に関わる重要な自然免疫経路であること、HBV 感染により特に IFN 投与時の ISG 誘導が抑制され、IFN 治療に抵抗性を示すことと関連がある事、が示唆された。これらの結果は、HBV による IFN 応答を抑制する機構がある事が示唆され、更なる検討を進めることによりこの機構を明らかにし、更に IFN 治療抵抗性の機序を解明するための知見となりうると思われる。

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 6 件)

1. ITPA gene variation and ribavirin-induced anemia in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated with sofosbuvir plus ribavirin. Murakawa M, Asahina Y, Nagata H, Nakagawa M, Kakinuma S, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Otani S, Kaneko S, Miyoshi M, Tsunoda T, Asano Y, Sato A, Itsui Y, Azuma S, Nouchi T, Furumoto Y, Asano T, Chuganji Y, Tohda S, Watanabe M. Hepatol Res. 2017 Jan 27. doi: 10.1111/hepr.12867. [Epub

- ahead of print] 21人6番目 査読有
2. Hepatic IFNL4 expression is associated with non-response to interferon-based therapy through the regulation of basal interferon-stimulated gene expression in chronic hepatitis C patients. Murakawa M, Asahina Y, Kawai-Kitahata F, Nakagawa M, Nitta S, Otani S, Nagata H, Kaneko S, Asano Y, Tsunoda T, Miyoshi M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka Y, Iijima S, Tsuchiya K, Izumi N, Tohda S, Watanabe M. *J Med Virol*. 2016 Dec 30. doi: 10.1002/jmv.24763 20人5番 査読有
 3. Serial measurement of Wisteria floribunda agglutinin positive Mac-2-binding protein is useful for predicting liver fibrosis and the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients treated with IFN-based and IFN-free therapy. Nagata H, Nakagawa M, Nishimura-Sakurai Y, Asano Y, Tsunoda T, Miyoshi M, Kaneko S, Goto F, Otani S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tojo N, Tohda S, Asahina Y, Watanabe M; Ochanomizu Liver Conference Study Group. *Hepatol Int*. 2016, Nov;10(6):956-964. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12072-016-9754-1>, 19人12番目 査読有
 4. Effects of Resistance-Associated NS5A Mutations in Hepatitis C Virus on Viral Production and Susceptibility to Antiviral Reagents. Nitta S, Asahina Y, Matsuda M, Yamada N, Sugiyama R, Masaki T, Suzuki R, Kato N, Watanabe M, Wakita T, Kato T. *Sci Rep*. 2016 Oct 5;6:34652. doi: 10.1038/srep34652. 査読有
 5. Bone morphogenetic protein-4 modulates proliferation and terminal differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. Goto F, Kakinuma S, Miyoshi M, Tsunoda T, Kaneko S, Sato A, Asano Y, Otani S, Azuma S, Nagata H, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Asahina Y, Watanabe M. *Hepatol Res*. 2016 Sep 27 doi: 10.1111/hepr.12823, 17人13番目 査読有
 6. Human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell lines as a new model for host interaction with hepatitis B virus. Kaneko S, Kakinuma S, Asahina Y, Kamiya A, Miyoshi M, Tsunoda T, Nitta S, Asano Y, Nagata H,

Otani S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Nakauchi H, Nishitsuji H, Ujino S, Shimotohno K, Iwamoto M, Watashi K, Wakita T, Watanabe M. *Sci Rep*. 2016 Jul 8;6:29358. doi: 10.1038/srep29358. 査読有

〔学会発表〕(計2件)
(筆頭演者のみ記載)

1. 新田沙由梨、加藤孝宣、朝比奈靖浩 C型慢性肝炎治療における薬剤耐性変異ウイルスに関する課題と対策 日本肝臓学会東部会 2016年12月9日 京王プラザホテル(東京、新宿)
2. 新田沙由梨、朝比奈靖浩、加藤孝宣 NS5A阻害剤耐性変異のHCVライフサイクルへの影響と薬剤感受性の解析. 第52回日本肝臓学会総会、2016年5月19日 ホテルニューオータニ幕張、東京ベイ幕張ホール(千葉、幕張)

3.
〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
新田 沙由梨(NITTA, Sayuri)
東京医科歯科大学・医学部・プロジェクト助教

研究者番号: 20527056

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()