

令和元年6月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15931

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来HBV感染培養系を用いた宿主IFN 応答とHBV逃避機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of IFN-lambda related innate immunity and the mechanism of immune escape of HBV using human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell lines.

研究代表者

村川 美也子 (MURAKAWA, Miyako)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20733851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から樹立した肝細胞培養系を用いた実験および、患者さんに同意を得て取得した肝生検・血液検体、臨床データの解析により、慢性ウイルス肝炎におけるインターフェロン・ラムダ(IFN λ)の機能について調べた。IFN λ 発現は遺伝子多型に規定され、かつIFN λ 発現により抗ウイルス作用や自然免疫関連分子の働きが異なること、また、抗ウイルス治療を行っている状態でもIFN λ 3の発現が高い患者では発癌リスクが高いことが示された。また、サブ解析によりウイルス複製が抑制された状態におけるB型肝炎からの発癌には糖尿病が関与する可能性も示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、新規抗HBV治療薬の開発に直結する成果は得られなかったが、IFN λ の機能には未だ不明点が多い中で、ウイルスが駆除された状況でもIFN λ 3が誘導され、かつその後の発癌とも関連するという新たな知見は、今後問題となり続ける抗ウイルス治療後発癌に対する治療戦略における新たなターゲットを見出した点で有意義である。また、IFN λ 3の抗HBV作用について臨床データを用いた再検証を行う中で、現在急増している糖尿病がHBV肝癌に関わることを示したことは、癌健診の啓蒙などの社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of IFN- λ on chronic viral hepatitis using both human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell lines and liver biopsy samples, blood samples, and clinical data obtained from the patients with viral hepatitis. The difference of anti-viral effect and expression of ISGs according to the expression levels of IFNL were shown in our study. Moreover, we found that the risk for HCC development were high in the patients under the antiviral treatment with higher expression levels of serum IFN- λ 3. Additionally, by the sub-analysis of HBV clinical data, we confirmed the relationship between diabetes mellitus and HCC development in the patients in whom HBV replication were suppressed well.

研究分野：ウイルス肝炎

キーワード：インターフェロンラムダ ウイルス性肝炎 発癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)の持続感染は肝硬変・肝癌の原因となるが、現行の抗ウイルス薬ではHBVの完全排除は困難であるため新規治療薬が求められている。HBV エントリー阻害薬、キャプシド集合阻害薬、RNA 阻害薬などのウイルスそのものを標的とした薬物の他、宿主免疫を標的とした治療として、HBV 特異的 T細胞・B細胞やNK細胞、樹状細胞等の宿主免疫の賦活化治療、PD-1 阻害薬、TLR7 agonist、STING agonist、また IFN 製剤等が有望視されていた。HBV は IFN 治療抵抗性であることが知られるが、一部の核酸アナログ投与時に誘導される内因性 IFN が HBs 抗原低下に関わるといった学会報告もあり、IFN と HBV の関連は非常に興味深いと考えられた。研究者らのグループはこれまでC型肝炎を中心にウイルスの自然免疫逃避機構や IFN シグナルに関わる研究を進めてきていた他、ヒト iPS 細胞由来肝細胞系譜を用いた HBV、HCV の感染培養系を独自に開発しており、さらにウイルス肝炎患者の臨床データベースおよび臨床検体の利用も可能な状態であった。

2. 研究の目的

慢性肝炎ウイルス感染における IFN の機能解析、特に B型肝炎における IFN の抗ウイルス作用および HBV の自然免疫逃避機構を解明することで新たな治療標的を見出すことを目的とした。また、ウイルス増殖制御のみに留まらず、肝線維化や肝癌への病態進展と IFN の関連についても探索し、今後抗ウイルス治療が発展した後も長期的に残される問題である肝硬変・肝癌の予防や治療に関わる学術基盤を形成することを目指した。

3. 研究の方法

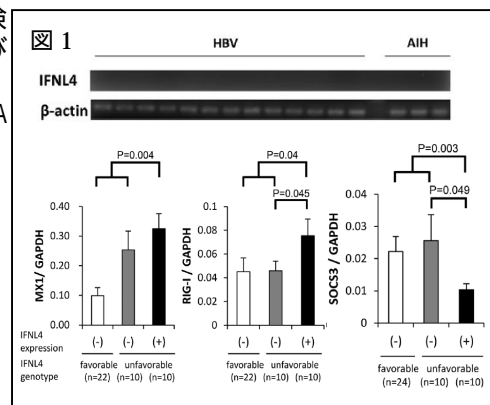
(1)HBV 感染刺激時の IFN 誘導シグナルと HBV による IFN シグナル阻害機構の解明： ヒト肝組織における IFN およびその下流シグナル分子の発現を解析し、ウイルス感染時の IFN 誘導および IFNL3/4 遺伝子多型による差異を評価する。次に、ヒト iPS-HPC 培養系を用いて HBV 感染刺激時の IFN 誘導シグナルおよび下流シグナル活性を評価することで、HBV 蛋白による IFN 誘導系または作用系におけるシグナル抑制機構、ウイルス蛋白の標的分子を探索する。IFN 逃避機構に関わる新規ウイルス/宿主分子が同定された場合はその分子の発現を調節する化合物のスクリーニングを行い、新たな抗 HBV 薬の開発基盤を形成する。

(2)肝炎ウイルス感染患者における生体内 IFN 3 発現と肝炎病態の関連の解明： 抗ウイルス治療下の慢性ウイルス肝炎患者の経時的血清検体を用いて IFN 3 蛋白レベルとウイルス動態の関連、IFNL3/4 遺伝子多型の影響、更には肝線維化や発癌との関連を明らかにする。臨床データベースを用いて抗 HBV 作用や発癌と IFN 3 との関連を解析し、その結果をもとに IFN シグナルを端緒として発癌抑制を目指した治療標的探索の学術的基盤の形成をめざす。

4. 研究成果

(1)HBV 感染刺激時の IFN 誘導シグナルと HBV による IFN シグナル阻害機構の解明：

HBV 感染培養系での解析に先立ち、まず肝炎患者検体を用いてヒト肝組織における IFN および IFN-stimulated gene(ISG)発現を評価した。B型肝炎、C型肝炎、非ウイルス性肝炎の患者肝生検検体から RNA を抽出、定量 PCR 解析を行ったところ、B型肝炎検体では IFNL3/4 遺伝子多型に関わらず IFN 4 発現は認めず、IFN 誘導シグナル阻害機構の存在が示唆される結果であった。一方でC型慢性肝炎患者検体では IFNL3/4 genotype が IFN 治療抵抗型の症例のみで IFN 4 発現が見られ、かつ IFN 4 発現を認める症例は抗ウイルス ISG 高値、抑制性 ISG 低値を示すことを見出され、その結果について論文発表した (Murakawa, et al. *JMV* 2017, 図1)。



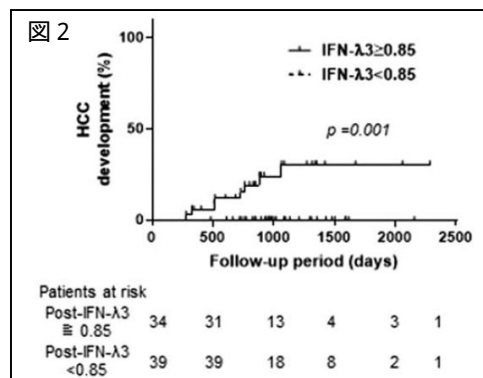
HBV 感染培養系を用いて HBV 感染と IFN 3・4 発現の関連の解析を行った。独自に樹立したヒト iPS-HPC-NTCP 培養系は従来の肝癌由来細胞株に比して自然免疫シグナルが保たれていることから、まず生体肝と同様の結果が得られるかどうかの検証を試みた。IFNL4 genotype が IFN 感受性型、IFN 抵抗型それぞれの iPS 細胞由来の iPS-HPC 培養系を樹立し、HBV、HCV 感染時 IFN 4 および ISG の発現解析を行ったが、genotype による差異よりも培養細胞株自体の viability による差が前面に出ていると思われる結果であり、比較が困難であった。

(2) 生体における IFN 3 蛋白発現とウイルス肝炎病態との関連の解明：

iPS-HPC を用いた解析が難航するなか、Murataらのグループより血清中 IFN- 3 蛋白発現量と核酸アナログの種類、さらに HBs 抗原低下との関連についての論文 (Murata, et al. *GUT* 2017) が発表されたことを契機に、研究者らは抗ウイルス治療下における IFN の機能に着目した。HBs 抗原低下などの抗ウイルス作用の他に、IFN 3 は発癌や線維化とも関連するとの既報があったため、ウイルス制御下でも IFN 3 が肝炎、線維化、発癌に寄与する可能性を考え解析を行うこととした。当科には多数の経時的血清検体が保管されていたが、B型肝炎症例は少数であったため、まず 200 例超の C型肝炎症例での評価を行った。すると、ウイルスによる IFN 誘導

が消失した治療後状態においても血清中 IFN 3 蛋白発現が確認され、しかも肝炎や治療後発癌との関連も認められ、ウイルス肝炎ではウイルス複製の制御下でも IFN 3 誘導機序が残存し、かつ発癌とも関連することが示唆された。結果は学会で発表 (Murakawa, ILC2019, EASL) するとともに論文発表した (Shinomiya-Inoue, Murakawa et al. *Hep Res* 2019, 図 2)。

HBV 増殖抑制および発癌と IFN 機能に関わる臨床因子の解析：(2)- の結果を受けて B 型肝炎患者臨床検体およびデータベースを用いた解析を行い、IFN の抗 HBV 作用および自然免疫動態との関連を調べた。HBs 抗原低下率は IFN 3 蛋白発現を誘導する ADF、TDF 投与例および IFN 治療例において有意に大きいことが示され、自然免疫を誘導する治療の有用性が示唆された。更に、平行して行った解析により核酸アナログ治療によるウイルス制御下では肝線維化の他に HBcrAg 高値と糖尿病が発癌に関連することが示された。(2)の結果でもウイルス制御下での持続炎症機序として糖尿病を始めとする代謝因子の寄与が疑われており、非ウイルス性 IFN 誘導の機序を解明し、それを抑制することが今後の課題と考えられた。AASLD Liver Meeting 2017、第 21 回日本肝臓学会大会、第 54 回日本肝臓学会総会パネルディスカッション、22 回日本肝臓学会大会パネルディスカッションにおいて結果発表を行った。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Inoue-Shinomiya E, Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Tsuchiya J, Sato A, Tsunoda T, Miyoshi M, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Murata K, Mizokami M, Watanabe M. Association of serum interferon- 3 levels with hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients treated with direct-acting antiviral agents. 査読有 *Hepatology Res.* 2019 May;49(5):500-511.
doi: 10.1111/hepr.13307.

Nitta S, Asahina Y, Kato T, Tsuchiya J, Inoue-Shinomiya E, Sato A, Tsunoda T, Miyoshi M, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Hikita H, Takehara T, Watanabe M. Impact of novel NS5A resistance-associated substitutions of hepatitis C virus detected in treatment-experienced patients. 査読有 *Sci Rep.* 2019 Apr 5;9(1):5722.
doi: 10.1038/s41598-019-42114-z.

Tsunoda T, Kakinuma S, Miyoshi M, Kamiya A, Kaneko S, Sato A, Tsuchiya J, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Sogo T, Komatsu H, Mukouchi R, Inui A, Fujisawa T, Nakauchi H, Asahina Y, Watanabe M. Loss of fibrocytin promotes interleukin-8-dependent proliferation and CTGF production of biliary epithelium. 査読有 *J Hepatology.* 2019 Mar 19. pii: S0168-8278(19)30146-1.
doi: 10.1016/j.jhep.2019.02.024.

Miyoshi M, Kakinuma S, Kamiya A, Tsunoda T, Tsuchiya J, Sato A, Kaneko S, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Nakauchi H, Asahina Y, Watanabe M. LIM homeobox 2 promotes interaction between human iPS-derived hepatic progenitors and iPS-derived hepatic stellate-like cells. 査読有 *Sci Rep.* 2019 Feb 14;9(1):2072.
doi: 10.1038/s41598-018-37430-9.

Azuma S, Asahina Y, Kakinuma S, Azuma K, Miyoshi M, Inoue E, Tsunoda T, Sato A, Kaneko S, Nagata H, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Tomita M, Nakagawa M, Watanabe M. Diabetic Retinopathy as a Risk Factor Associated with the Development of Hepatocellular Carcinoma in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. 査読有 *Dig Dis.* 2019;37(3):247-254.
doi: 10.1159/000493580.

Maekawa S, Sato M, Kuratomi N, Inoue T, Suzuki Y, Tatsumi A, Miura M, Matsuda S, Muraoka M, Nakakuki N, Amemiya F, Takano S, Fukasawa M, Nakayama Y, Yamaguchi T, Sato T, Sakamoto M, Murakawa M, Nakagawa M, Asahina Y, Enomoto N. Association between alanine aminotransferase elevation and UGT1A1*6 polymorphisms in daclatasvir and asunaprevir combination therapy for chronic hepatitis C. 査読有 *J Gastroenterology.* 2018 Jun;53(6):780-786.
doi: 10.1007/s00535-017-1405-3.

Nagata H, Nakagawa M, Asahina Y, Sato A, Asano Y, Tsunoda T, Miyoshi M, Kaneko S, Otani S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Nouchi T, Sakai H, Tomita M, Watanabe M; Ochanomizu Liver Conference Study Group. Effect of interferon-based and -free therapy on early occurrence and recurrence of

hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. 査読有 J Hepatol. 2017 Nov;67(5):933-939.

doi: 10.1016/j.jhep.2017.05.028.

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. ITPA gene variation and ribavirin-induced anemia in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated with sofosbuvir plus ribavirin. 査読有 Hepatol Res. 2017 Oct;47(11):1212-1218.

doi: 10.1111/hepr.12867.

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. 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. 査読有 J Med Virol. 2017 Jul;89(7):1241-1247.

doi: 10.1002/jmv.24763.

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. Bone morphogenetic protein-4 modulates proliferation and terminal differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. 査読有 Hepatol Res. 2017 Aug;47(9):941-952.

doi: 10.1111/hepr.12823.

〔学会発表〕(計5件) 筆頭演者の発表のみ記載

Miyako Murakawa, Emi Inoue-Shinomiya, Yasuhiro Asahina, Mina Nakagawa, Jun Tsuchiya, Ayako Sato, Masato Miyoshi, Tomoyuki, Tsunoda, Fukiko Kawai-Kitahata, Sayuri Nitta, Yasuhiro Itsui, Sei Kakinuma, Seishin Azuma, Mamoru Watanabe. The association of serum IFN-3 levels with liver fibrosis and hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients treated with direct-acting antiviral agents. The International Liver Congress 2019 (EASL) 2019年

村川美也子、朝比奈靖浩、渡辺守. B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療例・未治療例における発癌背景因子の解析. 第22回日本肝臓学会大会(JDDW2018) 2018年11月2日

村川美也子、朝比奈靖浩、渡辺守. B型慢性肝炎の長期経過におけるウイルス動態およびHBs抗原陰性化予測因子の検討. 第54回日本肝臓学会総会 2018年

Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Nagata H, Kaneko S, Asano Y, Miyoshi M, Tsunoda T, Inoue-Shinomiya E, Sato A, Itsui Y, Kakinuma S, Azuma S, Watanabe M. On-treatment higher levels of alpha-fetoprotein and M2BPGi are associated with development of hepatocellular carcinoma during nucleos(t)ide analog therapy in patients with HBV chronic infection. AASLD The Liver Meeting 2017. 2017年

村川美也子、朝比奈靖浩、中川美奈、東正新、柿沼晴、井津井康浩、新田沙由梨、北畑富貴子、金子俊、永田紘子、浅野侑、三好正人、角田知之、井上恵美、佐藤綾子、渡辺守 B型慢性肝疾患における核酸アナログ治療成績と肝発癌予測因子の検討. 第21回肝臓学会大会(JDDW2017) 2017年

〔図書〕(計1件)

村川美也子、中川美奈、朝比奈靖浩. B型・C型肝炎の抗ウイルス療法 最前線の治療エッセンス 医薬ジャーナル社 2017年 195ページ

〔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:

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：朝比奈靖浩
ローマ字氏名：(ASANIHA, Yasuhiro)

研究協力者氏名：柿沼晴
ローマ字氏名：(KAKINUMA, Sei)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。