

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07973

研究課題名(和文) インターフェロンによるB型肝炎ウイルス増殖抑制メカニズムに関する検討

研究課題名(英文) Analyses of antiviral mechanisms by interferon treatment on hepatitis B virus replication

研究代表者

柘植 雅貴 (TSUGE, MASATAKA)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・助教

研究者番号：50448263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌細胞株にペグインターフェロン(PEG-IFN)を添加し、細胞内のIFN誘導遺伝子(ISGs)誘導能を比較した結果、34%のISGsにおいてPEG-IFN 2aに比してPEG-IFN 添加時に、より強い発現誘導を認めた。さらに、これらのISGsの一部はHBV発現により誘導率が有意に制御された。そこで、これらの遺伝子のうち、遺伝子Aに着目し、さらに研究を進めた。その結果、遺伝子AはHBV感染に伴い発現亢進し、HBV増殖抑制により発現が減弱することが明らかとなった。さらに、その発現制御にHBx蛋白が関与し、同遺伝子の発現が亢進すると生体内の免疫応答を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、同定した遺伝子は、B型肝炎ウイルス感染に伴い活性化する生体内の免疫応答やインターフェロンにより活性化された免疫応答を回避し、B型肝炎ウイルスの持続感染に関与しているものと考えられる。現在、同遺伝子の発現制御を行い、インターフェロンによる抗ウイルス効果を制御できる化合物を探索中であり、化合物を同定できれば、B型肝炎ウイルス持続感染者に対する抗ウイルス療法の新たなオプションとなりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I compared the induction of interferon stimulated genes (ISGs) between by PEG-IFN 2a and PEG-IFN using hepatoma cell line. When I treated hepatoma cells with PEG-IFNs, I found that 34% of ISGs were more strongly induced by PEG-IFN treatment rather than by PEG-IFN 2a treatment. Additionally, I also found that the induction rates of several ISGs were enhanced or reduced by HBV expression. To identify the molecular target for the improvement of antiviral effects by interferon treatment, I focused on gene A and further analyses were performed. I found that gene A is upregulated by HBV infection using human hepatocyte chimeric mouse model and also found that the expression of gene A could be regulated by HBx protein using in vitro HBV expression model. Furthermore, I clarified that host immune response might be suppressed by gene A upregulation.

研究分野：消化器病学

キーワード：B型肝炎 インターフェロン 抗ウイルス効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

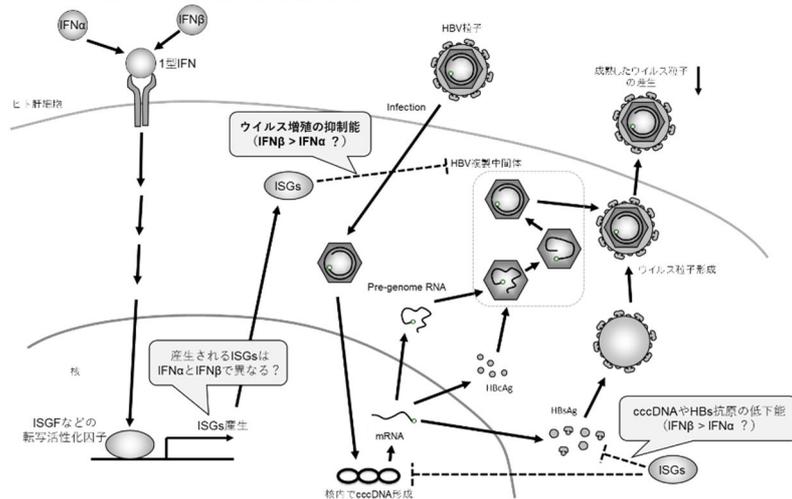
1. 研究開始当初の背景

B 型慢性肝疾患に対する抗ウイルス薬として、核酸アナログ製剤、IFN 製剤が広く使用されている。IFN によるウイルス増殖抑制効果は、核酸アナログ治療ほど強力とは言えないものの、一部の症例で HBs 抗原が急速に低下し、消失することが明らかとなっており、HBV 感染肝細胞の核内に形成された HBV cccDNA (HBV 増殖の際の鋳型となる) を減少させることも報告されている。このような背景から、IFN 製剤は、B 型慢性肝疾患治療の長期目標である HBs 抗原消失を達成するためのキードラッグと考えられる。

近年、新規 IFN としてペグ化インターフェロン β (PEG-IFN β : TRK-560) が開発され、この PEG-IFN β が、臨床で使用されているペグインターフェロン α 2a 製剤 (PEG-IFN α 2a) と比較し、HBV に対する抗ウイルス効果が強いことを報告した (Tsuge M, et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017.)。同研究において、ヒト肝癌細胞株に IFN を添加し、細胞内の IFN 誘導遺伝子 (ISGs) の誘導を検討したところ、IFN α と IFN β はいずれも I 型 IFN であるにもかかわらず、一部の ISGs において、PEG-IFN α 2a と PEG-IFN β による誘導に差異を認め、これらの遺伝子誘導の差が抗ウイルス効果の違いに強く影響していると考え、本研究を立案した (図 1)。

本研究で、IFN によって異なる反応性を示した ISGs と抗ウイルス効果の関連性が明らかとなれば、IFN 治療効果の向上だけでなく、肝細胞からの HBV 完全排除への手掛かりとなる可能性があるものと考えられる。

図1. 本研究の学術的背景と研究仮説

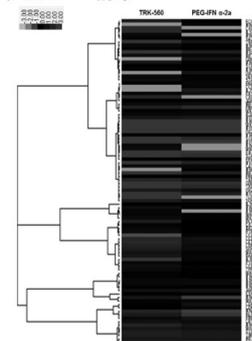


2. 研究の目的

IFN α と IFN β は、IFN を投与した際には、同じシグナル伝達系を活性化し、抗ウイルス効果を発揮するものと考えられてきた。我々の研究成果においても、多くの ISGs は、いずれの IFN 添加時にもほぼ同様の誘導を受けていたが、一部に反応性が異なる ISGs が存在することが明らかとなった (図 2)。

そこで、本研究では、IFN α と IFN β で異なる反応を示す ISGs を同定し、これらの遺伝子発現制御による IFN の HBV に対する抗ウイルス効果の変化を明らかにし、同定した遺伝子発現制御による抗ウイルス効果の向上を目指すことを目的とした。

図2. PEG-IFN α 2a、TRK-560による細胞内ISGs誘導



3. 研究の方法

まず、図 2 で示した解析において抽出された約 50 の遺伝子について、IFN α および IFN β により誘導の差異を確認する。IFN の反応性は IFN の濃度や添加時間によっても異なることが予測されたため、*in vitro* において IFN 濃度や添加時間による細胞内の標的遺伝子発現の変化を real time PCR にて解析し、cDNA マイクロアレイのデータの再現性を含め確認した。さらに、ヒト肝細胞キメラマウスへ IFN を投与し、*in vivo* での肝細胞内の遺伝子発現変化を real time PCR にて

検討し、IFN α および IFN β 投与にて反応性に相違が生じる標的遺伝子を絞った。

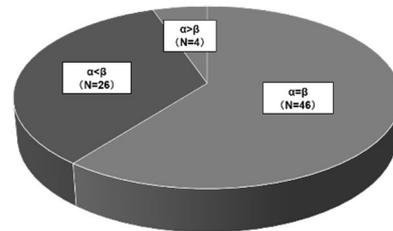
抽出された遺伝子については、HBV 増殖に及ぼす影響を、*in vitro* および *in vivo* にて検討した。*In vitro* では、同定された遺伝子を発現するプラスミドを HBV 持続発現細胞株にトランスフェクションし、培養上清中の HBV DNA 量の変化や細胞内の HBV 複製中間体量の変化を解析し、抽出した遺伝子の HBV への抗ウイルス効果に關与しているか確認し、HBV に対する抗ウイルス効果と関連のある遺伝子を絞り込んだ。さらに、抗ウイルス効果が IFN 存在下で大きく変化する可能性も考えられたことから、ISG 発現プラスミドをトランスフェクションした HBP25 細胞に IFN を添加し、抗ウイルス効果の変化を確認した。*in vitro* にて抗ウイルス効果への關与が確認された遺伝子については、*in vivo* においても抗ウイルス効果を確認した。

4. 研究成果

HepG2 細胞に PEG-IFN α 2a 100ng/ml もしくは PEG-IFN β 1ng/ml を添加し、24 時間後の細胞内のインターフェロン誘導遺伝子 (ISGs) 発現量を real time PCR にて定量し、PEG-IFN 非添加細胞での発現量と比較した。その結果、両 PEG-IFN 添加に伴う ISGs 誘導は、約 61% の ISGs でほぼ同程度の誘導であったのに対し、34% の遺伝子では PEG-IFN α 2a に比して PEG-IFN β 添加において、より強く誘導能の変化が生じることが明らかとなった (図 3)。

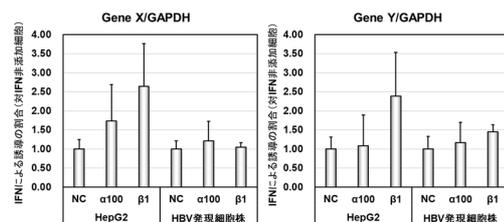
図3. PEG-IFN α 2a、PEG-IFN β 添加による細胞内ISGs誘導の比較

$\alpha>\beta$: PEG-IFN α による誘導がPEG-IFN β による誘導よりも30%以上高かった遺伝子
 $\alpha<\beta$: PEG-IFN α による誘導がPEG-IFN β による誘導よりも30%以上低かった遺伝子



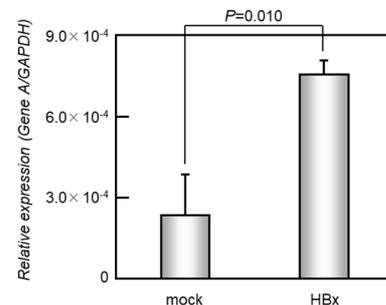
一方、HepG2 細胞由来の HBV 持続発現細胞を用いて同様の検討を行ったところ、一部の ISGs では HepG2 細胞使用時と同等の発現誘導変化が認められたものの、HBV 発現に伴いその誘導能が明らかに正または負の方向に制御される ISGs が多数存在することが明らかとなった (図 4)。このことから、HBV 発現に伴う ISGs 誘導能の変化が HBV の IFN 治療抵抗性に關与している可能性が考えられた。

図4. HBV発現により、多くのISGs誘導能は低下する



そこで、HBV 感染に伴い IFN による誘導が変化した遺伝子のうち、HBV 感染に伴い有意な発現変化を認めた遺伝子 A に着目し、さらに研究を進めた。その結果、遺伝子 A は HBV 感染に伴い有意に発現亢進し、核酸アナログ投与などによる HBV 増殖抑制により発現が減弱することが明らかとなり、その発現制御には HBx 蛋白が關与していることも明らかとなった (図 5)。さらに、同遺伝子の発現が亢進すると生体内の免疫応答を抑制することが明らかとなった。

図5. HBx発現に伴うGene Aの細胞内発現亢進



これらの結果から、本遺伝子は、HBV 感染に伴い活性化する生体内の免疫応答やインターフェロンにより活性化された免疫応答を回避し、HBV 感染維持に關与しているものと考えられた。

現在、同遺伝子の発現制御を行い、インターフェロンによる抗ウイルス効果を制御できる化合物を探索中であり、化合物を同定できれば、HBV に対する抗ウイルス療法の新たなオプションとなりうると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Makokha Grace Naswa, Abe-Chayama Hiromi, Chowdhury Sajeda, Hayes C. Nelson, Tsuge Masataka, Yoshima Tadahiko, Ishida Yuji, Zhang Yizhou, Uchida Takuro, Tateno Chise, Akiyama Rie, Chayama Kazuaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Regulation of the Hepatitis B virus replication and gene expression by the multi-functional protein TARDBP	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-44934-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsushima K, Tsuge M, Hiraga N, Uchida T, Murakami E, Makokha GN, Kurihara M, Nomura M, Hiyama Y, Fujino H, Ono A, Nakahara T, Yamauchi M, Abe-Chayama H, Kawaoka T, Miki D, Imamura M, Aikata H, Hayes CN, Chayama K.	4. 巻 54
2. 論文標題 Comparison of intracellular responses between HBV genotype A and C infection in human hepatocyte chimeric mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 650-659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-019-01558-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 柘植雅貴、茶山一彰	4. 巻 6
2. 論文標題 ヒト肝細胞キメラマウスを用いたB型肝炎研究の最前線	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 消化器・肝臓内科	6. 最初と最後の頁 271-278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nomura M, Tsuge M, Uchida To, Hiraga N, Kurihara M, Tsushima K, Fujino H, Nakahara T, Murakami E, Abe-Chayama H, Kawaoka T, Miki D, Hiramatsu A, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Zhang Y, Makokha GN, Hayes CN, Tanaka S, Chayama K	4. 巻 25
2. 論文標題 CTL-associated and NK cell-associated immune responses induce different HBV DNA reduction patterns in chronic hepatitis B patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Viral Hepatitis	6. 最初と最後の頁 1555 ~ 1564
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jvh.12970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tatsukawa Yumiko, Tsuge Masataka, Kawakami Yoshiiku, Murakami Eisuke, Kurihara Mio, Nomura Motonobu, Tsushima Ken, Uchida Takuro, Nakahara Takashi, Miki Daiki, Kawaoka Tomokazu, Abe-Chayama Hiromi, Imamura Michio, Aikata Hiroshi, Ochi Hidenori, Hayes C Nelson, Kawakami Hiroiku, Chayama Kazuaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Reduction of hepatitis B surface antigen in sequential versus add-on pegylated interferon to nucleoside/nucleotide analogue therapy in HBe-antigen-negative chronic hepatitis B patients: a pilot study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antiviral Therapy	6. 最初と最後の頁 639 ~ 646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3851/IMP3240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuge M, Hiraga N, Zhang Y, Yamashita M, Sato O, Oka N, Shiraishi K, Izaki Y, Makokha GN, Uchida T, Kurihara M, Nomura M, Tsushima K, Nakahara T, Murakami E, Abe-Chayama H, Kawaoka T, Miki D, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Hayes CN, Fujita T, Chayama K	4. 巻 525
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum-mediated induction of interleukin-8 occurs by hepatitis B virus infection and contributes to suppression of interferon responsiveness in human hepatocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 48 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2018.08.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuge Masataka, Uchida Takuro, Walsh Kevin, Ishida Yuji, Tateno Chise, Kumar Upendra, Glenn Jeffrey, Koh Christopher, Heller Theo, Uprichard Susan, Dahari Harel, Chayama Kazuaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Early Multiphasic HBV Infection Initiation Kinetics Is Not Clone-Specific and Is Not Affected by Hepatitis D Virus (HDV) Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 263 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v11030263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Masataka Tsuge, Motonobu Nomura, Takuro Uchida, Hiromi Abe-Chayama, Daiki Miki, Michio Imamura, Hiroshi Aikata, Grace Naswa Makokha, C. Nelson Hayes, Kazuaki Chayama
2. 発表標題 CTL-associated and NK cell-associated immune responses induce different HBV DNA reduction patterns in chronic HBV infection.
3. 学会等名 7th Japan-Taiwan-Korea HBV Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柘植雅貴、辰川裕美子、茶山一彰
2. 発表標題 2. 核酸アナログ・ペグインターフェロン併用療法におけるHBs低下に寄与する因子の検討
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柘植雅貴
2. 発表標題 症例から学ぶ B型肝炎の診断・治療の最前線
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hatsue Fujino, Miko Namba, Atsushi Ono, Takashi Nakahara, Eisuke Murakami, Masami Yamauchi, Tomokazu Kawaoka, Daiki Miki, Masataka Tsuge, Hiromi Abe-Chayama, C. Hayes Nelson, Michio Imamura, Hiroshi Aikata, Kazuaki Chayama
2. 発表標題 Investigation of infectivity of serum-derived HBV from patients and human hepatocyte chimeric mouse to HepG2/NTCP cells.
3. 学会等名 International HBV meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masataka Tsuge, Ken Tsushima, Nobuhiko Hiraga, Takuro Uchida, Michio Imamura, C. Hayes Nelson, Harel Dahari, Susan L. Uprichard, Kazuaki Chayama
2. 発表標題 Analysis of the association between HBV infection and long-term trends in intrahepatic gene expression.
3. 学会等名 International HBV meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Hatsue Fujino, Kei Morio, Atsushi Ono, Takashi Nakahara, Eisuke Murakami, Masami Yamauchi, Tomokazu Kawaoka, Daiki Miki, Masataka Tsuge, Hiromi Abe-Chayama, C. Hayes Nelson, Michio Imamura, Hiroshi Aikata, Kazuaki Chayama
2. 発表標題	Serum atutotaxin levels is useful to evaluate fibrosis during entecavir therapy and to predict the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B.
3. 学会等名	International HBV meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	藤野初江、柘植雅貴、寺岡雄吏、盛生慶、大野敦司、中原隆志、村上英介、河岡友和、三木大樹、平松憲、今村道雄、相方浩、茶山一彰
2. 発表標題	核酸アナログ・ペグインターフェロン併用療法におけるHBs低下に寄与する因子の検討
3. 学会等名	第43回日本肝臓学会西部会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Ken Tsushima, Masataka Tsuge, Takuro Uchida, Michio Imamura, Mitsutaka Osawa, Hiromi Abe-Chayama, Grace Naswa Makokha, Hiroshi Aikata, Kazuaki Chayama
2. 発表標題	The influence of histone methyltransferase SUV39h1 on hepatitis B virus related hepatocarcinogenesis
3. 学会等名	AASLD (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	柘植雅貴
2. 発表標題	B型肝炎治療の現状と新規治療薬開発の動向
3. 学会等名	広島肝炎ウイルスセミナー (招待講演)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 柘植雅貴
2. 発表標題 脂質代謝と肝炎ウイルス増殖との関連
3. 学会等名 Up To Date Seminar for Researchers (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柘植雅貴、辰川裕美子、茶山一彰
2. 発表標題 核酸アナログ治療後のペグインターフェロン治療におけるHBs低下に寄与する因子の検討
3. 学会等名 JDDW2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柘植 雅貴、内田宅郎、茶山一彰
2. 発表標題 新規ペグ化インターフェロン によるB型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス効果の検討
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柘植 雅貴、今村 道雄、茶山一彰
2. 発表標題 B型肝炎ウイルス (HBV) 関連肝疾患に対する肝移植とHBV再感染の解析
3. 学会等名 第104回日本消化器学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------