

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461012

研究課題名(和文) インスリン抵抗性を指標とした新しいインターフェロン治療効果予測因子の実用化

研究課題名(英文) Discovery of new insulin-resistance marker which determines the effect of IFN for chronic hepatitis C

研究代表者

大越 章吾 (Ohkoshi, Shogo)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号：70231199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：PEG-IFN+RIB治療を受けた遺伝子型1b、高ウイルス量のC型慢性肝炎例でインスリン抵抗性マーカーであるRBP4が著効に関係する有意なマーカーであるかを検討した。

RBP4を発現する肝がん培養細胞においてRBP4の発現を強制させまた遮断した結果、実際にRBP4がIFNによるHCVの抑制効果に対する抵抗因子として働くことが証明された。(Takahashi et al. Hepatogastroenterology. In press.)しかし、症例数を増やした検討では、RBP4は治療の有意な予測因子としては抽出されず、残念ながら汎用されるマーカーとしての有用性は実証できなかった。

研究成果の概要(英文)：We examined whether RBP4(Retinol binding protein 4) was a significant factor which determined the outcome of the CH C patients with genotype 1b who were treated with PEG-IFN plus ribavirin.

Because RBP4 was a marker of insulin resistance, we speculated that this might be the key molecule which determined the association between IFN therapy and insulin resistance. We performed in vitro experiments to examine whether RBP4 suppressed IFN signalling, resulting in the resistance of HCV replication against IFN. As a result, in RBP4-knockdown hepatoma cell, ISG genes were activated and HCV replication was enhanced when compared to RBP4 (+) cells. Thus we found that RBP4 interfered the action of IFN against HCV and result in IFN resistance.

However, RBP4 was not proved to be a significant factor for the prediction of clinical data from more number of patients. In conclusion, we could not verify the significance of RBP4 levels for the prediction of IFN therapy.

研究分野：消化器病学

キーワード：HCV RBP-4 Peg-IFN インスリン抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌(肝癌)はわが国における癌部位別死因第4位の悪性疾患であり、その約7割がHCV(C型肝炎ウイルス)を原因とする。研究開始当時はインターフェロン(IFN)がC型慢性肝炎の治療の主役であり、リバビリンとプロテアーゼ阻害薬を併用することによって遺伝子型1型、抗ウイルス量の難治性C型慢性肝炎患者でも7割程度の著効率が得られるようになった。

一方これらの抗ウイルス薬は多彩な副作用を有し、また高価であることより、治療前にその効果を予測することが極めて重要である。これによって無駄な治療を避け、効果の期待できる患者を洗い出し Cost Effectiveness を向上させることが可能になる。当時、Tanakaらは免疫に関与するIL28B 遺伝子のSNPの差異が治療効果を反映することを報告し(*Nat Genet* 41:1105-9, '09)、これによって個人の遺伝子の違いによって治療を選択するテーラーメイド医療が初めて可能になった。しかしながら遺伝子検査には常に倫理的問題が伴うと同時に費用の問題があり、簡便に測定できるIFN効果予測因子の開発が急務であった。

C型肝炎の持続感染は、個体に様々なレベルのインスリン抵抗性を誘発し病態に関与することが確立されている。

一方治療に観点を移すと、C型肝炎患者のインスリン抵抗性はインターフェロン+リバビリン治療に対する抵抗性と相関すると考えられている(*J Hepatol* 51:984-90, '09)。しかしながらその機序に関しては不明である。

インスリン抵抗性(IR)とC型肝炎の密接な関係、IFN治療抵抗性の関係から、申請者らは、IR因子中にIFN治療の効果予測に関連したものはないか?という着眼点を得た。

Retinol-binding protein 4 (RBP4)は血中のRetinol(Vitamin A)のキャリアー蛋白であり近年、インスリン抵抗性を示すAdipocytokineの1つとして注目されていた。そこで我々はこのRBP4がIFN治療の効果予測因子として利用できるのではないかという発想から本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究は、近年進歩の著しいC型肝炎の治療においてますます重要になってきた治療効果予測因子として、新たに、インスリン抵抗性因子の一つRBP4が臨床上有用であるかを検証し、実効性の高いテーラーメイド医療を確立することを目的とした。研究の臨床的意義は、この新しい治療効果予測マーカーが有用な対象患者を明らかにし、患者データに基づいた治療効果予測のアルゴリズムを作成することにある。これによって個々の患者に対して、より効果の高い

治療法を提供できることが可能となると考えた。

## 3. 研究の方法

(1)IFN+リバビリンを投与する Genotype 1b、高ウイルス量のC型慢性肝炎患者において、前向き研究によって種々のウイルス側及び宿主側の背景因子と著効率の関係について解析し、治療効果予測因子中におけるRBP4の重要性の位置づけを行う。

(2)肝がんの培養細胞株を用いた実験によってRBP4がIFNシグナルを抑制するメカニズムを、培養細胞への遺伝子導入、SiRNAを用いた遺伝子特異的ノックダウン実験とウエスタンブロット解析によって解析する。

(3)培養細胞を用いた実験を完了させRBP4のIFN抵抗性への有意な関与の理論的根拠を確立する。

(4)初年度に開始した臨床研究を終了させ、IFN治療効果予測におけるRBP4の意義づけを行う。特に、どのような背景を持つ患者に有用なのかについて患者背景を層別化することによって割り出していく。

## 4. 研究成果

(1)C型慢性肝炎症例に対するIFN/RBV併用療法の治療効果にインスリン抵抗性やRBP4がおよぼす影響について解析した。対象はIFN/RBV併用療法を行ったGenotype1型高ウイルス量C型慢性肝炎95症例であり、治療開始前の血清RBP4値を含めた臨床背景と、治療効果に関して解析を行った。

その結果、治療開始4週後にHCV-RNAが2log以上減少した群では2log未満減少群と比較して血清中RBP4値が低い傾向がみられた。(HCV-RNA 2log以上減少群13.1 $\mu$ g/ml: 2log未満減少群15.7 $\mu$ g/ml,  $P < 0.05$ )。しかし残念ながら、治療終了後24週で治療効果を判定するとSVR率に対するRBP4の関与は認められなかった。(SVR 12.8 $\mu$ g/ml: non-SVR 14.3 $\mu$ g/ml,  $P = 0.113 > 0.05$ )その他、RBP4は肝線維化や肝合成能と密接に関連していた。

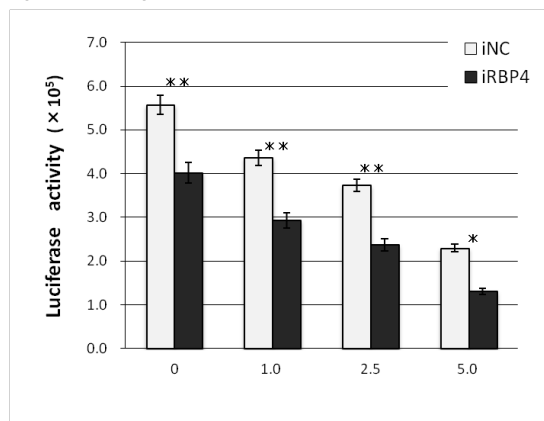
(2)培養細胞を用いてRBP4がIFNシグナルを抑制し、細胞内でのIFN抵抗性に関与するかどうかを検討した。

*in vitro*でのRBP4とIFNシグナルの関連を明らかにするため肝癌細胞株HepG2においてSiRNAを用いてRBP4をknockdownし、IFNシグナルの変化を代表的なIFN誘導蛋白であるInterferon Stimulating Genes15 (ISG15), 2'-5' oligoadenylate synthetase (2'-5' OAS), protein kinase R (PKR)の遺伝子発現量をリアルタイムPCR法で検討した結果、RBP4をknockdownした場合IFNシグナルの一部が増強されISG15, 2'-5' OASの発現

量が増加した。更に Reporter Plasmid を用いた promoter assay を行い RBP4 の knockdown による IFN 誘導蛋白発現量の変化は IFN-stimulated response element (ISRE) を介してもたらされることが明らかになった。

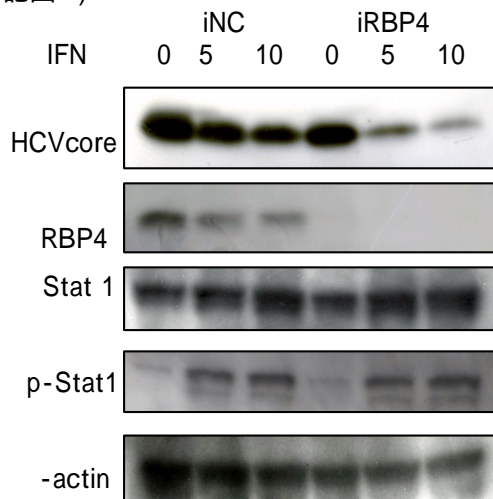
ルシフェラーゼ遺伝子を含む全長 HCV-RNA を複製する OR6 細胞を用いて RBP4 を同様に SiRNA で knockdown し、IFN が HCV-RNA 複製に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイにて検討した。

(下記図 1)



上記の如く、OR6 で RBP4 を knockdown した場合、コントロールに比して有意に HCV-RNA の複製が抑制された ( $P < 0.05$ )。また蛋白質レベルでも、HCV コア蛋白の複製が抑制されたことをウエスタンブロット法で確認した。

(下記図 2)



(結論)

(1) 本研究はペグインターフェロン + リバビリン治療を受けた遺伝子型 1b、高ウイルス量の難治性 C 型慢性肝炎にインスリン抵抗性因子 RBP4 が簡便な効果予測マーカーとして有用であるかを検証したものであったが、症例数を増やして検討した結果、著効 (SVR) 達成に関係する有意な因子としては抽出されず、残念ながら汎用されるマーカーとしての意義は乏しいと考えられた。

(2) In vitro の結果では RBP4 が特定の IFN シグナルを抑制することが分かった。次に実際に HCV 蛋白を発現する細胞を用いて解析を行った結果、RBP4 をノックダウンした時に、加えた IFN の濃度依存性に HCV 蛋白の減少効果が増強した。従って、実際に RBP4 が IFN による HCV の抑制効果に対する抵抗因子として働くことが証明された。興味深いことに IFN を添加しない場合においても RBP4 のノックダウンに伴い HCV 蛋白は低下したことより、RBP4 は HCV 増殖をサポートする因子であることが分かった。

このように、基礎的には RBP4 が HCV の増殖をサポートし、IFN の働きを抑制することが分かったが、その間 HCV 治療薬の全容は大きく変貌し、もはや IFN なしの経口 DAA の時代に突入してしまい、HCV 制御に関する IFN 絡みの研究の社会的価値は明らかに希薄化しており、今後 HCV と DAA、またさらに問題として残っていく HCV 治療後の HCC リスク評価に研究をシフトさせていく必要があると痛感させられた。

#### 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 7 件)

Takahashi H, Ohkoshi S, Yano M, Yamagiwa S, Ikeda M, Kato N, Matsuda Y, Aoyagi Y. Retinol binding protein 4, an insulin-resistance marker, induces interferon resistance in chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 2016 In Press. (査読有り)

Ohkoshi S, Hirono H, Watanabe K, Hasegawa K, Kamimura K, Yano M. Natural regression of fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol*. 2016 In Press. (査読有り)

Ohkoshi S, Hirono H, Watanabe K, Hasegawa K, Yano M. Contributions of transgenic mouse studies on the research of hepatitis B virus and hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis. *World J Hepatol*. 2015 Dec 8;7(28):2834-40. doi: 0.4254/wjh.v7.i28.2834 (査読有り)

Ohkoshi S, Yano M, Matsuda Y. Oncogenic role of p21 in hepatocarcinogenesis suggests a new treatment strategy. *World J Gastroenterol*. 2015 Nov 14;21(42):12150-6. doi: 10.3748/wjg.v21.i42.12150. (査読有り)

Ohkoshi S, Yano M, Matsuda Y. Oncogenic role of p21 in hepatocarcinogenesis suggests a new treatment strategy. *World J Gastroenterol*. 2015 Nov 14;21(42):12150-6. doi: 10.3748/wjg.v21.i42.12150. (査読有り)

Ohkoshi S, Hirono H, Yamagiwa S. Direct antiviral agent treatment of decompensated hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. World J Gastrointest Pharmacol Ther. 2015 Nov 6;6(4):114-9. doi: 10.4292/wjgpt.v6.i4.114.(査読有り)  
Matsuda Y, Sanpei A, Wakai T, Kubota M, Osawa M, Hirose Y, Sakata J, Kobayashi T, Fujimaki S, Takamura M, Yamagiwa S, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y. Hepatitis B virus X stimulates redox signaling through activation of ataxia telangiectasia mutated kinase. Int J Clin Exp Pathol. 2014 Apr 15;7(5):2032-43 (査読有り)  
Yano M, Ohkoshi S, Aoki YH, Takahashi H, Kurita S, Yamazaki K, Suzuki K, Yamagiwa S, Sanpei A, Fujimaki S, Wakai T, Kudo SE, Matsuda Y, Aoyagi Y. Hepatitis B virus X induces cell proliferation in the hepatocarcinogenesis via up-regulation of cytoplasmic p21 expression. Liver Int. 2013 Sep;33(8):1218-29. doi: 10.1111/liv.12176. (査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

高橋 弘道, 大越 章吾他, C型慢性肝炎とインスリン抵抗性因子RBP4 RBP4はインターフェロン治療抵抗性をもたらす(会議録)第48回日本肝臓学会総会口頭一般演題 於 金沢 2012  
Ohkoshi S, Takahashi H, et al. An insulin resistance-inducible factor, RBP4, is a negative predictor of outcome of peg-IFN+ribavirin therapy for patients with chronic hepatitis C (全米肝臓学会総会、2012 Nov 12、Boston)

〔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

大越 章吾 (OHKOSHI, Shogo)  
日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授  
研究者番号：70231199

(2) 研究分担者

松田 康伸 (MATSUDA, Yasunobu)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号：40334669

山際 訓 (YAMAGIWA, Satoshi)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号：10419327

(3) 連携研究者

矢野 雅彦 (YANO, Masahiko)  
昭和大学・歯学部・助教  
研究者番号：70529693