

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790670

研究課題名（和文） リバビリンによるインターフェロンの抗 C 型肝炎ウイルス作用増強機序の解明

研究課題名（英文） Ribavirin regulates hepatitis C virus replication through the up-regulation of interferon-stimulated genes

研究代表者

徳本 良雄 (TOKUMOTO YOSHIO)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10533078

研究成果の概要（和文）：

C型肝炎ウイルス（HCV）の治療としてインターフェロン（IFN）とリバビリン（RBV）の併用療法が行われているが、RBV が有する抗 HCV 作用の機序は不明であった。肝細胞癌由来株である HepG2 及び Huh7 細胞に HCV 遺伝子型 1a 全長遺伝子を発現させ、IFN- α と RBV の添加を行った。リバビリンは内因性の IFN- β を誘導し、IFN- α の IFN 誘導子を介した抗 HCV 作用を相加的に増強することで抗 HCV 作用を増強した。IFN- β を誘導する新規の薬物を同定することで、新たな HCV 治療法を開発できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

The combination therapy of interferon (IFN) and ribavirin (RBV) is used to treat HCV infection, however, how RBV enhances the anti-HCV effects remains unknown. We therefore investigated whether RBV modifies IFN's anti-HCV action. We used plasmid-based HCV replication system, which express HCV genotype 1a full genome in HepG2 and Huh7 hepatoma cell lines. Ribavirin regulates HCV replication through the up-regulation of ISGs induced by enhancing autocrine IFN- β . The modulation of ISGs by RBV would help to establish a means of eliminating HCV.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

C 型慢性肝炎は C 型肝炎ウイルス（HCV）感染による慢性肝疾患である。肝硬変に進展すると肝細胞癌や静脈瘤を合併することがあり、早期に HCV を排除する必要がある。日本人の HCV 感染者はセロタイプ 1 型かつ高ウイルス量が約半数を占め、インターフェロン（IFN）単剤で約 10%、インターフェロン

とリバビリン（RBV）の併用療法でも約 50% とされ治療効果は十分と言えない。また、IFN と RBV の併用療法は副作用も多く、新規の抗ウイルス薬、RBV に替わる併用薬の開発が望まれる。

RBV は単剤での抗 HCV 効果は弱いですが、IFN と併用すると IFN の抗 HCV 効果を増強させる。これまでに報告された RBV の抗

HCV 作用は①HCV の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ阻害②イノシンーリン酸脱水素酵素阻害③T細胞を Th1 細胞優位に誘導する細胞性免疫の賦活④複製する HCV-RNA への遺伝子変異導入があげられる。しかし、これらの機序は RBV 単剤での作用機序であり、RBV が IFN との併用によって IFN の抗 HCV 作用を増強する機序としては十分説明できず、詳細は不明である。一方、IFN は IFN 誘導遺伝子群 (ISGs) を介して様々な生理活性を発揮する。特に IFN の抗ウイルス作用には protein kinase R (PKR)、Myxovirus resistance-A (MxA)、2'5'-Oligoadenylate synthetase (OAS) が重要とされる。RBV が IFN の抗 HCV 活性を増強することは明らかであり、IFN の抗 HCV 作用の要であるこれら ISGs の作用を修飾している可能性がある。

HCV に対する薬物の作用機序に関して解析が困難であった原因として、複製レベルの高い HCV 感染モデルがなかったことがあげられる。近年、HCV 粒子が形成可能な HCV 培養系が報告されたが、細胞内 IFN 誘導に障害がある Huh7 細胞とその亜型でのみしか十分な複製が得られず、HCV ジェノタイプ 2a を使用しているという限界点がある。申請者らは、これまでに複数の細胞株で HCV 遺伝子型 1a 全長の持続発現を可能とする HCV 複製モデルを作成した (Hiasa Y, Tokumoto Y, et al. *Hepatology* 72:867,2008)。この複製系では他の肝細胞株である HepG2 細胞をはじめとして様々な細胞で HCV 複製が可能である。難治性である HCV 遺伝子型 1a および、性質の異なる種々の細胞株を用いて、比較検討することで IFN と RBV の詳細な抗 HCV 作用機序を明らかにできる可能性がある。

2. 研究の目的

HCV genotype 1 の全長遺伝子を発現する複数の HCV 複製系を用いて、リバビリンのインターフェロンによる抗 HCV 作用を修飾する機序について解析した。RBV の作用機序に関連する標的分子の同定により、それに基づく治療法および他の IFN 併用候補薬を同定し、C 型肝炎患者の治療成績向上に寄与することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1)リバビリンによるインターフェロン誘導遺伝子への影響と抗 HCV 作用変化の解析

RBV による IFN- α の抗 HCV 作用増強機序を明らかにする目的で、IFN- α 及び RBV 添加時の宿主細胞因子、蛋白発現変化をみる。IFN- α の抗 HCV 作用に関連する ISGs として PKR、OAS、MxA に注目した。また、内因性の IFN である IFN- β についても解析した。

ヒト肝細胞癌由来細胞株である HepG2、Huh7 細胞を使用した。T7 プロモーター下流に HCV 遺伝子型 1a 全長遺伝子を挿入した HCV 発現プラスミド (pH77) と T7 ポリメラーゼを持つアデノウイルスベクター (Ad-T7pol) をこれら細胞株に導入した HCV 持続発現細胞を作成した。

この培養上清にインターフェロン (IFN) - α 100 IU/ml とリバビリン (RBV) 50 μ M を単独または混合添加し、5 日間まで経時的に RNA、細胞蛋白、培養上清の回収を行った。HCV-RNA は rTth 法による逆転写反応を用いた strand-specific リアルタイム RT-PCR でプラス鎖、マイナス鎖の定量を行った。同時にリアルタイム RT-PCR 法を用いて PKR、OAS、MxA、IFN- β mRNA の測定を行った。各 mRNA は GAPDH を内部コントロールとして標準化した。

細胞蛋白は PKR 関連蛋白 (PKR、リン酸化 PKR、eIF-2 α 、リン酸化 eIF-2 α) 及び actin のウェスタンブロッティングによる発現量の比較を行った。

(2)内因性 IFN- β 抑制時の RBV による IFN- α の抗 HCV 効果の修飾

IFN- α 及び RBV 添加による IFN- β への影響を明らかにする目的で IFN- β の抑制を行った。

①siRNA を用いた IFN- β 抑制による ISGs mRNA 誘導の変化

IFN- β 抑制の方法として siRNA を用いた。IFN- β に対する siRNA もしくはコントロール siRNA をリバーストランスフェクション法を用いて HepG2 細胞および Huh7 細胞に導入した。24 時間後に pH77 を導入したのちに Ad-T7pol を感染させて HCV 発現 IFN- β 抑制細胞を作成した。この培養上清に IFN、RBV を添加して経時的に RNA を回収し解析した。

②IFN- β 中和による ISGs mRNA 誘導の変化
IFN- β は細胞外に放出された後に I 型 IFN 受容体を介して ISGs を誘導することが予想される。そのため、上清中の IFN- β を中和した際の ISGs mRNA 誘導の変化について検討した。IFN- β に対する抗体もしくはアイソタイプコントロールを上清中に添加した。48 及び 72 時間培養を行ない、ISGs mRNA の変化について検討を行った。

4. 研究成果

(1)リバビリンによるインターフェロン誘導遺伝子への影響と抗 HCV 作用変化の解析

HepG2 細胞に IFN- α を添加したところ、投与後 1-5 日にかけて ISGs (PKR、MxA、OAS) mRNA がコントロールに比し有意に増加した ($p < 0.05$)。RBV の添加ではこれら mRNA の誘導はみられなかった。IFN- α と RBV を混合添加したところ、IFN- α で誘導された PKR、MxA mRNA が IFN- α 単独よりも有意に誘導された

(day2-5, $p < 0.05$)。Huh7 細胞でも IFN- α による ISGs mRNA の誘導があり、RBV による誘導は同様にみられなかった。しかし、IFN- α と RBV の混合添加では HepG2 細胞と異なり、RBV による IFN- α による ISGs mRNA 誘導の上乗せ効果は見られなかった。

IFN- β mRNA は IFN- α で誘導され RBV 単独では誘導されなかった。しかし、IFN- α と RBV を同時に添加したところ、IFN- α 単独よりも有意に IFN- β が誘導された ($p < 0.05$)。この相加効果は HepG2 細胞でみられたが、Huh7 細胞ではみられなかった。

細胞内蛋白の発現をウェスタンブロッティングにて検討した。HepG2 細胞では PKR、eIF-2 α 共に IFN- α 添加によりリン酸化がみられ、RBV と混合することで更にリン酸化が増強し相加的な PKR シグナルの活性化が明らかとなった。RBV 単独ではリン酸化がみられなかった。また、Huh7 細胞では IFN- α と RBV を混合添加してもリン酸化の亢進はなかった。

これらの結果から、HepG2 細胞では IFN- α に加えて RBV を添加することで、RBV が IFN- α の ISGs mRNA 誘導を相加的に増強していると考えられた。その機序として内因性 IFN- β が関係しており、Huh7 細胞では混合添加によっても十分な内因性 IFN- β の誘導がみられず、結果として相加的な ISGs 誘導効果が見られなかったと考えられた。

(2) 内因性 IFN- β 抑制時の RBV による IFN- α の抗 HCV 効果の修飾

内因性 IFN- β が RBV の IFN- α の抗 HCV 作用増強機序に関与していると考えられたことから、IFN- β の抑制下での変化を検討した。

HepG2 細胞に IFN- β の siRNA を用いて IFN- β 抑制細胞を作成した。IFN- β は約 90%抑制可能であり、IFN- α 、RBV 添加によっても抑制効果は減弱しないことを確認した。コントロールの siRNA を導入した細胞では、IFN- α と RBV の添加により、相加的な ISGs mRNA 誘導がみられたが、IFN- β 抑制細胞ではこの相加的な効果が減弱した。

更に、上清中の IFN- β を中和したところ、siRNA による IFN- β 抑制時と同様に RBV による ISGs 誘導効果は減弱した。

これらの結果から、RBV と IFN- α を同時に用いることで、内因性の IFN- β が誘導され、細胞外に放出された後に、I 型 IFN 受容体を介して IFN- α と相加的に ISG mRNA を誘導することで IFN- α の抗 HCV 作用を増強することが明らかとなった。

(3) 得られた成果の位置づけ

C 型肝炎ウイルスに対するウイルス排除可能な治療は IFN のみであり、RBV は IFN の抗ウイルス効果を増強可能な薬物である。臨床的に RBV は IFN の抗 HCV 作用を増強すること

から、IFN の抗 HCV 作用の要となる PKR、MxA、OAS などに影響を与える可能性が想定された。本研究では、難治性とされる 1 型の HCV を用いた複製系を用いた点、内因性 IFN- β の伝達系を含めた解析が可能な細胞株を用いた点で、これまでの既存の研究よりも臨床に即した結果を得ることができ、詳細に RBV の作用機序を検討可能であった。

(4) 今後の展望

RBV と IFN の併用療法による貧血などの副作用は投与量の減量や治療中止の原因となり、治療効果を低下させる原因となる。内因性 IFN- β をより効果的に誘導できる薬物をスクリーニングし、同定することで、RBV に替わる IFN の新規併用療法を開発できる可能性がある。

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 4 件)

①Michitaka K, Nishiguchi S, Tokumoto Y (他 3 名、4 番目)、Etiology of liver cirrhosis in Japan: a nationwide survey, Journal of Gastroenterology, 査読有、45 巻、2010、86-94

②Hamada M, Abe M, Tokumoto Y(他 6 名、3 番目)、Occupational liver injury due to N,N-dimethylformamide in the synthetics industry. Internal Medicine, 査読有、48 巻、2009、1647-1650

③Michitaka K, Hiraoka A, Tokumoto Y (他 17 名、15 番目)、Amino acid imbalance in patients with chronic liver diseases, Hepatology Research, 査読有、40 巻、2010、393-398

④Kisaka Y, Abe M, Tokumoto Y (他 7 名、3 番目)、Congenital hepatic fibrosis without any symptoms as diagnosed by laparoscopy, Digestive Endoscopy, 査読有、22 巻、2010、357-359

[学会発表] (計 3 件)

①徳本良雄、日浅陽一、恩地森一、C 型肝炎ウイルスと宿主細胞の interaction に及ぼすインターフェロン、リバビリンによるインターフェロン誘導遺伝子を介した抗ウイルス効果、第 45 回日本肝臓学会総会、2009 年 6 月 4 日、神戸市

②Tokumoto Y, Hiasa Y, Konishi I (他 6 名、1 番目)、Ribavirin enhances the interferon-stimulated genes through the upregulation of autocrine interferon-beta in the combination treatment of interferon-alpha and ribavirin, The 60th American association for the study of liver disease、2009 年 11 月 2 日、Boston, MA, USA

③Tokumoto Y, Hiasa Y, Konishi I (他 5 名、

1 番目)、Ribavirin directly enhances interleukin-8 and other interferon-stimulated genes when administered in combination with interferon-alpha. The 61th American association for the study of liver、disease、2010年10月31日、Boston, MA, USA
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳本 良雄 (TOKUMOTO YOSHIO)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10533078