

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790633

研究課題名（和文） HCV変異株培養系を用いたサイトカインシグナル抑制機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91.

研究代表者

中川 美奈（NAKAGAWA MINA）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30401342

研究成果の概要（和文）：

申請者らは、独自に開発した変異HCV 培養細胞レプリコンシステムを用いて、HCV 増殖制御に関連する宿主・ウイルス蛋白やIFNの抗ウイルス機構に抑制的に働く細胞内IFNシグナル関連蛋白とHCV蛋白の相互作用の解析を行い、これまでに以下の結果を得ている。1)臨床的に治療抵抗性であることが報告されているHCVコア70/91変異株を用いた培養細胞系の検討では、生体同様インターフェロン(IFN)低感受性であり、インターロイキン(IL)-6上昇、ウイルス粒子形成および分泌低下を認め、小胞体(ER)ストレス蛋白の発現誘導がみられた。2)JFH1細胞培養系を用いた検討でも、IFN低感受性株では IL-6、SOCS(suppressor of cytokine signaling) 3の発現亢進、IFN刺激因子 (ISG) 抑制がみられ、IL-6抗体処理によりIFN抵抗性が解除された。

培養細胞系を用いた以上の結果より、多機能サイトカインであるIL-6はERストレスと密接に関与し治療抵抗性への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Here we investigated mechanisms of difference in the response to alpha interferon (IFN) by using HCV cell culture with HCV core mutant R70Q, R70H, and L91M virus clones. The expression level of an interferon signal attenuator, SOCS3, was significantly higher for the R70Q, R70H, and L91M mutants than for the wild type. Interleukin 6 (IL-6), which upregulates SOCS3, was significantly higher for the R70Q, R70H, and L91M mutants than for the wild type, suggesting interferon resistance, possibly through IL-6-induced, SOCS3-mediated suppression of interferon signaling. Expression levels of endoplasmic reticulum (ER) stress proteins were significantly higher in cells transfected with a core mutant than in those transfected with the wild type. The HCV-2b/JFH1 chimeric virus, which was constructed in our laboratory, able to infect Huh7.5.1 cells and was significantly more sensitive to IFN than JFH1. The IFN resistance of JFH1 cells was negated by siRNA-knock down of SOCS3 expression and by pretreatment with anti-IL6 antibody. These data suggest that these differences of IFN sensitivity of HCV may be attributable to the sequences of HCV structural proteins and can be determined by SOCS3 and IL-6 expression levels, which might be induced by ER stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1600000	480000	2080000
2011年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3000000	900000	3900000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器内科学・肝臓学

キーワード：IFN 治療抵抗性、HCV コア変異株、インターロイキン(IL)-6、小胞体(ER)ストレス

1. 研究開始当初の背景

C 型慢性肝炎に対するインターフェロ(IFN)を基軸とした治療効果はまだまだ十分とはいえない。IFN 治療抵抗性に関わる分子の特定は、治療効果の事前予測に利用できる可能性があると同時に、難治症例に対する新規薬剤の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

このような状況の中で、臨床的に IFN 治療抵抗性である事が報告されている HCV コア蛋白変異株培養系を用いた解析を通じて IFN 治療抵抗性に関する因子の検討を行い、現行の治療では治癒が期待できない難治症例に対する新規薬剤の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HCV-JFH1 プラスミドに、臨床的に IFN 抵抗性が指摘されているコアアミノ酸 70 番変異および 91 番変異、さらに既報によりウイルス粒子の形成を認めなかった 77-80 番アミノ酸の変異株を negative control として作成した。

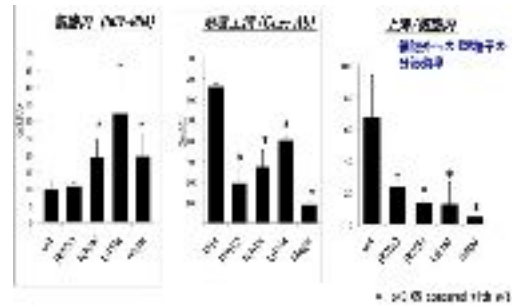
(2)合成した HCV-RNA を Huh7 細胞中に導入し、培養上清中のコア抗原および上清・細胞内の HCV-RNA、コア蛋白を測定した。

(3)HCV コア野生株と変異株の IFN 感受性を比較し、種々の IFN 誘導遺伝子(ISG)、SOCS、ER ストレス蛋白を検出、比較した。

なお当研究は東京医科歯科大学組み換え DNA 実験安全管理規定に準拠して行われる。また、ヒトの細胞および組織を用いた研究にあたっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」に準じて当該施設倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得た上で、人権及び利益の確保を行うよう配慮した。

4. 研究成果

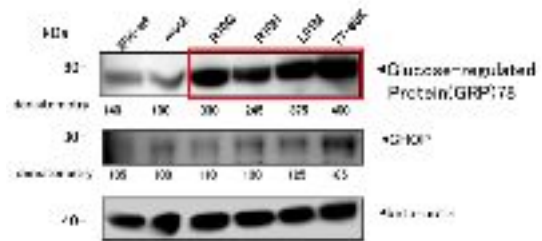
1) HCV コア蛋白変異株ではウイルス細胞内の RNA 合成は野生株と比較し同等もしくは亢進していたが、細胞外へのウイルス粒子の放出、分泌効率は低下しており、コア変異株ではウイルス複製以降の粒子形成や分泌の機能が障害されていることが示唆された。



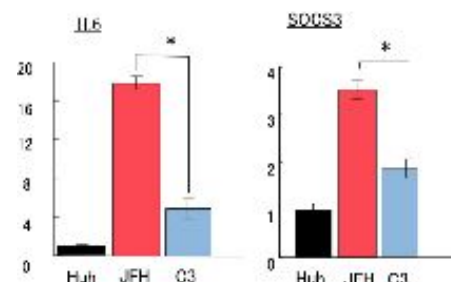
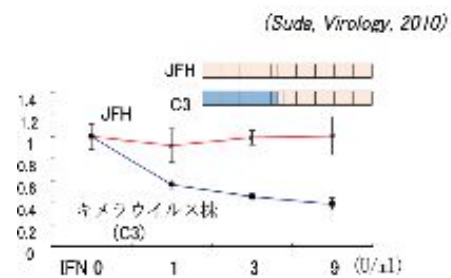
2)細胞内のウイルス蛋白の発現量をウェスタンブロットティングで評価したところ、コア変異株では野生株に比較してコア蛋白の発現増強を認めた。

3) HCV コア蛋白変異株では小胞体(ER)ストレス蛋白の発現誘導をみた。

4)IFN 治療抵抗株では IFN シグナル系の抑制因子である SOCS3 の発現亢進および ISG 発現低下をみた。



5)HCV レプリコンシステムの検討では IFN 治療抵抗株では SOCS3、IL-6 発現が亢進していた。臨床検体で治癒例と非治癒例を比較すると、非治癒治療抵抗例で IL-6 が持続高値であることが確認された。



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 22 件)

1. Kadokura M, Nakagawa M, et.al. Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy. **Hepatol Int.** 2011; 5: 789-99. (査読あり)
2. Kadokura M, Nakagawa M, et.al. Analysis of the complete open reading frame of genotype 2b hepatitis C virus in association with the response to peginterferon and ribavirin therapy. **PLoS One.** 2011; 6: e24514 (査読あり)
3. Kusano-Kitazume A, Nakagawa M, et.al. Identification of Novel N-(Morpholine-4-Carboxyloxy) Amidine Compounds as Potent Inhibitors against Hepatitis C Virus Replication. **Antimicrob Agents Chemother.** 2012; 56:1315-23 (査読あり)
4. Kurosaki M, Nakagawa M, et.al. Age and total ribavirin dose are independent predictors of relapse after interferon therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. **Antivir Ther.** 2012; 17: 35-43. (査読あり)
5. Funaoka Y, Nakagawa M, et.al. Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. **J Virol.** 2011; 85: 5986-94 (査読あり)
6. Watanabe T, Nakagawa M, et.al. Inhibitory effect of triterpenoid compound with or without interferon-alpha on Hepatitis C virus infection. **Antimicrob Agent Chemother** 2011; 55: 2537-45 (査読あり)
7. Nakagawa M, et.al. Serum interleukin-6 levels can predict resistance to treatment of chronic hepatitis C infection with pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin. **Antiviral Therapy** 2011; 16: 1081-1091 (査読あり)
8. Kurosaki M, Nakagawa M, et.al. Sequences in the interferon sensitivity-determining region and core region of hepatitis C virus impact pretreatment prediction of response to PEG-interferon plus ribavirin: data mining analysis. **J Med Virol.** 2011; 83: 445-52. (査読あり)
9. Onozuka I, Nakagawa M, et.al. Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice. **Biochem Biophys Res Commun** 2011; 406: 134-140 (査読あり)
10. Nakagawa M, et.al. Association of IL28B polymorphism with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy in patients with chronic genotype 2 hepatitis C. **J Medical Virol** 2011;83:871-878. (査読あり)
11. Yamamoto M, Nakagawa M, et.al. Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. **Hepatology Research** 2011;41:258-69. (査読あり)
12. Sakamoto N, Nakagawa M, et.al. ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon-a and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. **Hepatology Res** 2010; 40: 1063-1071 (査読あり)
13. Kurosaki M, Nakagawa M, et.al. Pretreatment Prediction of Response to Pegylated-Interferon Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C using Genetic Polymorphism in IL28B and Viral Factors. **J Hepatol** 2011 ;54:439-48 (査読あり)
14. Suda G, Nakagawa M, et.al. IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b

chimeric clones. **Virology**. 407: 80-90, 2010 (査読あり)

15. Mishima K, Nakagawa M, et.al. Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants. **Virology**. 405: 361-369, 2010 (査読あり)

16. Karakama Y, Nakagawa M, et.al. Inhibition of HCV replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 54: 3179-3186, 2010 (査読あり)

17. Nakagawa M, et.al. Mutations in the Interferon sensitivity determining region and virological response to combination therapy with pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b infection. **J Gastroentero** 2010; 45(6):656-65 (査読あり)

18. 中川美奈ほか; Cyclophilin inhibitors 特集/ ウイルス肝炎診療の変貌: 近づく疾患克服: 肝胆膵 62 巻 2 号 403-411, 2011

19. 植山真由美, 中川美奈ほか: ホルモン・サイトカインから見た肝発癌機構の性差 IL-6 と肝炎・肝発癌 肝・胆・膵 60 巻 5 号 849-856, 2010

20. 箆島裕子, 中川美奈ほか: C 型肝炎の日常診療 治療の適応、選択の実際 *medicina* 47 巻 3 号 437-441, 2010

21. 箆島裕子, 中川美奈ほか: HCV の複製・増殖機構と遺伝子型・遺伝子異変 *日本臨床*, 2010

22. 坂本直哉, 中川美奈ほか: 肝疾患における血液生化学検査, IL28B 肝・胆・膵 60 巻 4 号 657-660, 2010

[学会発表] (計 11 件)

1. C 型肝炎のインターフェロン治療効果と IL28B 遺伝子多型の解析、第 46 回日本肝臓学会総会一般演題、山形 (2010.5.28)

2. ウイルス遺伝子および宿主 IL28B 遺伝子情報を統合した C 型肝炎治療のオーダーメ

イド化、第 46 回日本肝臓学会総会シンポジウム(2010.5.27)

3. C 型肝炎のインターフェロン治療効果と IL28B 遺伝子多型の解析、第 14 回日本肝臓学会大会ポスター、横浜 (2010.10.13)

4. C 型肝炎患者におけるインターフェロン治療効果におけるインターロイキン-6 (IL-6) の関与、第 14 回日本肝臓学会大会パネルディスカッション、横浜 (2010.10.14)

5. ウイルスおよび宿主遺伝子情報に基づく C 型肝炎の治療戦略、第 38 回日本肝臓学会東部会パネルディスカッション、東京 (2010.12.3)

6. IL28B 遺伝子多型と治療抵抗性ウイルス変異からみた C 型肝炎の治療抵抗メカニズムの解析、第 38 回日本肝臓学会東部会シンポジウム、東京 (2010.12.2)

7. IL-28B SNPs and HCV genetic profiles are significant predictors of PEG-interferon plus ribavirin treatment outcomes, The 7th APASL Single Topic Conference “Hepatitis C”, Dec.17. 2010

8. 高齢化社会の C 型肝炎対策における宿主・ウイルス遺伝子情報に基づく個別化治療の重要性、第 47 回日本肝臓学会総会パネルディスカッション、東京 (2011.6.3)

9. C 型肝炎の PEG-IFN α -2b/Ribavirin 併用療法における ITPA 遺伝子の臨床的意義、第 47 回日本肝臓学会総会、東京 (2011.6.3)

10. Genotype2b/JFH1 キメラウイルス長期培養系を用いた IFN 抵抗性株の解析、第 47 回日本肝臓学会総会、東京 (2011.6.3)

11. C 型肝炎のインターフェロン治療抵抗性機序における IL-6 の関与、第 15 回日本肝臓学会大会シンポジウム、福岡 (2011.10.20)

[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〕

本学消化器内科ホームページにて研究成果を紹介

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 美奈 (NAKAGAWA MINA)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30401342

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし