

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590960

研究課題名(和文) HCV培養系を用いたI型・III型インターフェロン不応性機構の解析

研究課題名(英文) Impaired host response and HCV disturbance of type I/III IFN signaling are closely associated with non-response to IFN-based anti-HCV treatment

研究代表者

大岡 真也(OOKA, Shinya)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・特任准教授

研究者番号：90361691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：HCVに対する新規DAA製剤導入後も宿主のインターフェロン不応性は難治の主因となる。本研究では、HCV-NS4BとRIG-I依存性IFN発現経路のシグナル分子であるSTINGとの蛋白相互作用の解析を行い、NS4B蛋白がSTINGに直接結合し、Cardif/STING間の結合を遮断することによってNS3/4Aとは独立かつ協調的にRIG-I依存性IFN活性化シグナルを抑制する事を明らかにした。またDAA治療における難治例では、I型・III型IFN応答系を抑制するSOCS3の上流分子であるIL6が高発現し、III型IFN(IL28B)のSNPが強く関連することを見出した。

研究成果の概要(英文)：HCV infection blocks cellular IFN-mediated antiviral signaling through cleavage of Cardif by HCV-NS3/4A serine protease. Like NS3/4A, we found NS4B protein strongly blocks IFN-production signaling mediated by RIG-I. IFN-promoter reporter assay showed that IFN-promoter activation induced by RIG-I or Cardif was significantly suppressed by both NS4B and NS3/4A, whereas STING-induced IFN-activation was suppressed by NS4B but not by NS3/4A, suggesting that NS4B had a distinct point of interaction. Immunoprecipitation and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays demonstrated that NS4B specifically bound STING. Therefore, NS4B suppresses RIG-I-mediated IFN-production signaling through a direct protein interaction with STING. Moreover, we reported over-expression of IL6, which is inhibitory molecule of type I/III IFN signaling, and IL28B (type III IFN) SNPs were closely associated with non-response to IFN-based anti-HCV therapy.

研究分野：消化器内科

キーワード：HCV インターフェロン NS4B IL28B

### 1. 研究開始当初の背景

HCVは国内に依然150万人の慢性感染者が存在し、多くの症例が肝硬変・肝癌に進展する。HCVに対する新規DAA製剤導入後もIL28B遺伝子多型に起因する約30%のinterferon (IFN)不応性の症例では耐性ウイルスの出現を伴う超難治群となる。従ってウイルス・宿主因子によるIFN不応性の分子機構の解明とそれに基づいたIFN抵抗性をキャンセルする新たな抗ウイルス療法の開発が急務である。

Type-IおよびType-III IFNは、細胞へのウイルス侵入をトリガーとして感染細胞から産生・分泌される。HCV感染急性期からウイルス排除の過程においても、肝細胞に発現する遺伝子群の80%がIFNおよびIFN誘導遺伝子(ISG)であり、IFNはHCVに対する抗ウイルス応答を司る中心分子である。我々はIFN誘導性に発現するISGの発現スクリーニングを行い、PKR、250AS、MxA等に加えGBP-1、IFI6-16、IFI-27など直接の抗ウイルス作用を担う多くのISGを同定した(Itsui, J Viral Hepat 2004; Itsui, Hepatology 2009)。従って、生体におけるIFN応答を抑制する生体の補助システム、さらにIFN産生シグナルを攪乱するウイルス蛋白の機能が、HCV持続感染、抗ウイルス治療抵抗性に密接に関わることは明らかであるが、未だその詳細は十分に解明されていない。

### 2. 研究の目的

HCVに対する新規DAA製剤導入後も宿主のインターフェロン不応性は難治の主因となる。本研究では、HCV感染とType-IおよびType-III IFN発現・応答系の相互作用を明らかにするため、独自に開発したHCV増殖・培養系を用いて以下の目的で研究を行った。

(1) HCV-NS3/4AおよびNS4B蛋白によるType-Iおよびtype-III IFN発現系の抑制機構を明らかとする。

(2) 変異HCV株培養系を用いてIFN不応性の分子機構、およびウイルス蛋白とIFN関連蛋白との相互作用を解析する。

以上の知見からC型肝炎難治例に対するIFN不応性をキャンセルする新たな抗ウイルス療法創出の知的基盤を築く。

### 3. 研究の方法

(1)ウイルスが細胞に侵入すると、増殖により精製される二重鎖RNAが認識されIFN- およびが産生・分泌され、それに応答したIFN誘導遺伝子(ISG)の発現を誘導する。更にRIG-Iの下流のアダプター分子であるCardifがHCV-NS3/4AによるIFNシグナル遮断の標的となる事が報告されている。我々は網羅的遺伝子発現解析より、既報のNS3/4以外にNS4BによるISRE活性化の抑制を認めた(Tasaka, J Gen Virol 2008)。そこで本研究においてはNS4BのIFNシグナル抑制標的部位の更なる詳細な解析のために、NS4Bと

候補分子の免疫沈降、NS4Bと候補分子との局在を確認する免疫染色、NS4Bと候補分子との蛍光を用いた相互作用解析による解析を進めた。

(2)HCVに対する新規DAA製剤導入後も宿主のインターフェロン不応性は難治の主因となる。本研究では、テラプレビル+ペグインターフェロン+リバビリン3剤併用療法施行例において解析を行い、I型・III型インターフェロン応答系のJAK-STATシグナルを抑制するSOCS3の上流分子であるIL6の血清レベルと治療効果との関連を解析した。

### 4. 研究成果

(1)本研究では、自然免疫系IFN発現経路のRIG-IおよびCardifによって誘導されたISRE活性がHCVのNS3/4A蛋白だけでなくNS4B蛋白によっても抑制されることを見出した。NS4B蛋白は、近年CardifとTBK1の間で働きIFN誘導に関わる分子として同定されたSTINGと直接結合し、細胞内で共局在していた。従って、HBV-NS4Bは宿主STINGとの相互作用により宿主IFNシグナルを攪乱することで、HCVの自然免疫機構からの逃避機構に関与していることが示唆された。本研究では、HCVが複数の自然免疫回避機構を有する事を示唆しており、HCVの持続感染のメカニズムの解明に寄与する重要な成果と考えられた。

(2)対象としたテラプレビル+ペグインターフェロン+リバビリン3剤併用療法施行例は94例(年齢27-79歳(59歳)で、男性56例/女性38例)であった。これらにおいて解析を行い、I型・III型IFN応答系のJAK-STATシグナルを抑制するSOCS3の上流分子であるIL6の血清レベルと治療効果との関連を解析した。その結果早期抗ウイルス効果不良例では、治療前および治療中の血清IL6値が高く、治療抵抗性に関連していることが示唆された。さらに、インターフェロン抵抗性HCVであるHCVコア変異株感染例では、テラプレビル+ペグインターフェロン+リバビリン3剤併用療法中のIL6が高値で推移しており、インターフェロン抵抗性HCVとIL6の高発現が関連している可能性が示唆された。

### 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20件)

1. Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kusano-Kitazume A, Watanabe T, Kawai-Kitahata F, Otani S, Taniguchi M, Goto F, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired induction of IL28B and expression of IFN 4 associated with non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C. J Gastroenterol Hepatol 2015 30:1075-1084. doi: 10.1111/jgh.12902. 査読有

2. Tamaki N, Kurosaki M, Matsuda S, Muraoka M, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Izumi N. Noninvasive prediction of hepatocellular carcinoma development using serum fibrosis marker in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 2014; 49: 1495-503. doi:10.1007/s00535-013-0914-y. 査読有
3. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Yoshimichi C, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terasita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuizka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions. *Hepatol Res* 2014 Sep 11. doi: 10.1111/hepr.12421. 査読有
4. Tamaki N, Kurosaki M, Matsuda S, Nakata T, Muraoka M, Suzuki Y, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Matsunaga K, Taki K, Asahina Y, Izumi N. Prospective comparison of real-time tissue elastography and serum fibrosis markers for the estimation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2014; 44: 720-727. doi: 10.1111/hepr.12179. 査読有
5. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. -fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2013; 58: 1253-1262. doi: 10.1002/hep.26442. 査読有
6. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. Genetic variation near interleukin 28B and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2013; 49:1152-1162. doi: 10.1007/s00535-013-0858-2. 査読有
7. Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection. *Hepatol Res* 2013; 43: 1-34. doi: 10.1111/hepr.12020. 査読有
8. Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Yamada G, Kawai T, Kajiwarra E, Okamura Y, Takeuchi T, Yokosuka O, Kariyama K, Toyoda J, Inao M, Tanaka E, Moriwaki H, Adachi H, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsushashi H, Oketani M, Kumada H. Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFN -2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multicenter cooperative study. *J Gastroenterol* 2013; 48: 382-390. doi: 10.1007/s00535-012-0641-9. 査読有
9. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M. Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 2013; 57: 46-58. doi: 10.1002/hep.26017. 査読有
10. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fijuki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M. Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells in mice. *Hepatology* 2013; 57: 2502-2513. doi: 10.1002/hep.26293. 査読有
11. Toyota J, Ozeki I, Karino Y, Asahina Y, Izumi N, Takahashi S, Kawakami Y, Chayama K, Kamiya N, Aoki K, Yamada I, Suzuki Y, Suzuki F, Kumada H. Virologic response and safety of 24-week telaprevir alone in Japanese patients infected with hepatitis C virus subtype 1b. *J Viral Hepat* 2013; 20: 167-173. doi: 10.1111/j.1365-2893.2012.01640.x. 査読有
12. Tamaki N, Kurosaki M, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Izumi N. Noninvasive estimation of fibrosis progression overtime using the FIB-4 index in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2013; 20: 72-76. doi: 10.1111/j.1365-2893.2012.01635.x. 査読有
13. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N. Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2013; 85: 449-458. doi: 10.1002/jmv.23497. 査読有
14. Sato A, Sata M, Ikeda K, Kumada T, Izumi

N, Asahina Y, Osaki Y, Chayama K, Kaneko S, Sakai A, Onji M, Hiasa Y, Omura T, Ozeki I, Yokosuka O, Shiina S, Itsubo M, Nishiguchi S, Hirano K, Ide T, Sakisaka S, Yamasaki T, Hidaka I, Tanaka M, Kim SR, Ichida T. Clinical characteristics of patients who developed hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication with interferon therapy: current status in Japan. Intern Med 2013; 52: 2701-2706. 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

1. Nakagawa M, Asahina Y, Taniguchi M, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka Y, Watanabe M. Impact of host and therapeutic factors and resistant associated variants on response to interferon based- direct acting antiviral treatment in difficult-to-treat chronic hepatitis C patients. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.

2. Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Taniguchi M, Watanabe T, Itsui Y, Kakinuma S, Watanabe M. Expression of IFN/4 in liver and PBMC is closely associated with higher basal expression of ISGs and impaired induction of IL28B by interferon treatment in chronic hepatitis C non-responder patients. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.

3. Watanabe T, Asahina Y, Nakagawa M, Kakinuma S, YItsui Y, Taniguchi T, Murakawa M, Nagata H, Miura M, Maekawa S, Enomoto E, Watanabe M. Emergence or selection of resistant associated variant immediately after initiation of the therapy is predictive for failure of direct acting antiviral therapy: ultra-deep sequencing analyses for serial time points. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.

4. Asahina Y, Murakawa M, NittaS, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired IL28B gene induction and expression of IFN 4 influenced by the polymorphisms near IL28B gene are closely associated with a non-response to interferon in chronic hepatitis C patients. The 49th annual meeting of the European association for the study of the liver

(EASL The International Liver Congress 2014), London, UK, April 8-14, 2014.

5. Asahina Y, Murakawa M, NittaS, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired IL28B gene induction and expression of IFN 4 are closely associated with a non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C patients. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.

6. Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Murayama A, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Substitution of amino acid 70/91 in the hepatitis C virus core region affects infectious virus production and cell surface expression of MHC class I. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.

7. Asahina Y, Nakagawa M, Taniguchi M, Kawai F, Fujiki J, Otani T, Yamanaka H, Murakawa M, Nitta S, Kitazume A, Watanabe T, Sakurai Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Serum interleukin-6 levels during treatment correlate with resistance to telaprevir-based triple therapy in chronic hepatitis C. The 48th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2013), Amsterdam, Netherlands, April 24-28, 2013.

〔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：  
出願年月日：  
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

大岡 真也 (OOKA, Shinya)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研  
究科・特任准教授  
研究者番号：90361691

(2)研究分担者

朝比奈 靖浩 (ASAHINA, Yasuhiro)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研  
究科・寄附講座教授  
研究者番号：00422692

渡辺 守 (WATANABE, Mamoru)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研  
究科・教授  
研究者番号：10175127

(3)連携研究者

坂本 直哉 (SAKAMOTO, Naoya)  
北海道大学・医学研究科・教授  
研究者番号：10334418