

**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：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860522

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルス蛋白による宿主自然免疫からの回避機構の解明

研究課題名(英文) The Analysis of the immune evasion strategy by hepatitis C virus

## 研究代表者

新田 沙由梨 (NITTA, Sayuri)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・特任助教

研究者番号：20527056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)感染において、持続感染しやすい要因の一つとしてウイルス蛋白による自然免疫応答の阻害があげられる。本研究ではそのメカニズムの一つとして、HCVの非構造蛋白であるNS4Bがinterferon(IFN)応答に関わるSTINGという分子を標的として、抗ウイルス物質であるIFN およびIFN を抑制する機能を有する事を明らかにした。この成果は、更なる新規抗HCV薬の開発に有用な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Nearly 70% of HCV infected patients develop chronic hepatitis, which leads to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Some viral proteins of HCV have been reported to block the host antiviral immune response that could cause persistent infection and chronic hepatitis. In this study, we have shown that non-structural protein 4B of HCV, especially N-terminus of NS4B, inhibit both of the IFN and the IFN by targeting STING which is signal molecule of IFN pathway. These results are important to understand the HCV evasion system from host antiviral response and may contribute to develop novel anti-HCV drugs.

研究分野：ウイルス性肝炎

キーワード：C型肝炎 自然免疫応答

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における C 型肝炎ウイルス(HCV)感染者は 150-200 万人存在すると推定されているが、HCV 感染では約 7 割が慢性肝炎へと移行することから、その大半は感染が持続した慢性肝炎の状態と考えられる。C 型慢性肝炎は経過とともに高率に肝硬変への進展、及び肝細胞癌の発生を認め、肝疾患の主たる死因となっている。更に、難治例においては、既存の interferon(IFN)を基盤とした治療に加え、近年開発されたプロテアーゼ阻害薬との併用療法によっても、ウイルス陰性化率は 3 割程度(N Engl J Med, 2011)と治療効果は不十分である。従って、新規抗ウイルス療法の確立が強く求められ、そのためにも HCV 感染が高率に持続感染・慢性化するメカニズムの解明が必須である。

宿主は自然免疫応答により病原体を排除する機構を備えていることが知られている。HCV 感染時には、細胞内レセプターである RIG-I がウイルスを認識し、下流分子にシグナル伝達する事により IFN を産生しウイルス排除に導くことが知られている。しかし、このような機構が存在するにもかかわらず、HCV 感染では高率に持続感染し慢性化に至ることから、ウイルスによる自然免疫応答の阻害機構がその一因と考えられている。

一例として HCV 非構造蛋白である NS3/4A プロテアーゼが RIG-I のアダプター分子である Cardif を切断する事により IFN シグナル経路を遮断する事が報告されており、HCV が自然免疫機構を回避する重要なメカニズムの 1 つと考えられている。

これまで研究代表者らのグループは HCV による宿主自然免疫応答の回避メカニズムの解析に取り組んできた。その結果、HCV の NS4B 蛋白も RIG-I 依存性 IFN 誘導経路をブロックすること(Tasaka, et al. 2007)、そしてさらに、HCV-NS4B が IFN 産生経路のシグナル分子として新たに同定された STING を標的として、宿主の IFN 産生誘導を抑制する事を明らかとした (Nitta, et al. Hepatology 2012)

一方で、研究協力者らのグループは、III 型インターフェロン(IFN- $\lambda$ )をコードする IL28B 遺伝子の遺伝子多型(SNP)が、HCV 慢性感染に対する IFN 治療効果に大きく関わる重要な宿主因子であることを報告した(Tanaka & Sakamoto et al, Nat Genet, 2009)。また、申請者らは RIG-I Cardif など自然免疫に関わる遺伝子の発現が IL28B の SNP および IFN 治療効果に強く関連している事を報告した(Asahina & Nitta, et al. Hepatology, 2012)。IL28B SNP が C 型慢性肝炎における IFN 治療効果や HCV 急性感染における自然排除に強く関連する宿主因子であることが報告されて以降、HCV 感染時の自然免疫応答における IFN- $\lambda$  の動態に関する解析がなされており、IFN- $\lambda$  は IFN- $\alpha/\beta$  と比しより強く誘導されるとの報告がされている(Thomas et al. Gastroenterology 2012, Marukian et al.

Hepatology 2012)。また、IFN- $\lambda$  発現経路は IFN- $\alpha/\beta$  発現経路と一部共通の経路を共有している事が明らかとなっている。以上の背景からは HCV-NS4B が IFN- $\lambda$  だけでなく IFN- $\lambda$  誘導も抑制している可能性があると考えられる。

### 2. 研究の目的

HCV-NS4B による IFN- $\lambda$  発現誘導メカニズムに関する詳細な解析、IFN- $\lambda$  発現経路を含めた HCV 蛋白による宿主自然免疫応答の抑制効果とその分子機構の解析を行う。これらの研究によって、HCV による宿主の自然免疫応答からの回避に関する分子機構を解明し、得られた知見を基に、新規抗ウイルス薬開発、あるいは抗ウイルス薬の薬理作用解明のための学術基盤を形成することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1). HCV のウイルス蛋白による IFN- $\lambda$  誘導経路の抑制機構に関する解析: IFN- $\lambda$  発現経路に関わる分子として知られる STING が IFN- $\lambda$  誘導にも関わっているかどうかを検証するため、STING を強制発現し、real time PCR による IL28B の mRNA 測定および IL28B promoter を用いた promoter assay を行った。また、STING だけでなく RIG-I 依存性 IFN 発現経路のシグナル分子である RIG-I や Cardif と IL28B promoter を強制導入し、さらに HCV-NS4B や NS3/4A を共発現して promoter assay を行う事により、HCV 蛋白による IL28B promoter 活性の変化をみた。promoter assay では、IFN 治療効果に関わるとされる 2 つの異なる SNP を示す promoter を用いて比較を行った。

(2). NS4B の IFN 抑制作用に重要なアミノ酸配列の同定: 研究代表者らは以前に NS4B 蛋白の N 末端側(アミノ酸 1-84)のいずれかのドメインが IFN- $\lambda$  経路の抑制に必要なであることを示した(Nitta, et al. Hepatology 2012)。そこで、NS4B の IFN 抑制作用に重要なアミノ酸配列を同定するために、1-84 番目のアミノ酸を 4 アミノ酸ずつアラニン置換した変異体を網羅的に作成した。IFN- $\lambda$  あるいは IL28B promoter reporter plasmid および IFN 経路に関わるシグナル分子とともに、作成した変異 NS4B を共発現し promoter assay を行う事により、promoter 活性の変化をみた。また、変異 NS4B と STING との局在を免疫染色にて観察した。更に、promoter assay の結果から、NS4B の IFN 抑制作用に変化を及ぼすと思われる 4 アミノ酸を 1 アミノ酸ずつアラニン置換した変異 NS4B プラスミドを作成し、promoter assay にて同様の検討を行った。

- (3). NS4B の変異が治療効果に及ぼす影響についての臨床病態学的解析：C 型慢性肝炎患者で pegIFN/Ribavirin 併用療法を行い治療無効であった症例の血清からウイルスを抽出し、NS4B のアミノ酸配列をシーケンス解析にて同定した。同定したアミノ酸配列と(2)の検討から IFN 抑制作用に関わると考えられるアミノ酸配列との比較を行い、治療効果との関連を検討した。

#### 4. 研究成果

- (1). HCV のウイルス蛋白による IFN- $\gamma$  誘導経路の抑制機構に関する解析：IFN- $\gamma$  発現経路に関わる分子として知られる STING の発現により IL28B の mRNA の増加、および IL28B promoter 活性の上昇を認め、STING が IFN- $\gamma$  発現経路の活性化にも関わる分子であることを明らかにした。また、ウイルス刺激を模倣した poly I:C での刺激、および IFN- $\gamma$  誘導経路に関わるとされるシグナル分子の発現により IFN- $\gamma$  発現が活性化されることが検証された。さらに、ウイルス蛋白の発現プラスミドを共発現することにより、IL28B の promoter 活性が HCV の非構造蛋白である NS3/4A や NS4B によって抑制されることが示された (JDDW2013 第 16 回日本肝臓学会にて発表)。

IFN 治療効果に関連する SNP の異なった 2 種類の IL28B promoter を用いた検討では、NS4B による IL28B 抑制作用に大きな差を認めず、NS4B は SNP に関わらず IFN- $\gamma$  (IL28B) の誘導を抑制すると考えられた。本成果は、HCV 感染によって IFN- $\gamma$  と共に誘導される IFN- $\beta$  が、NS4B 蛋白によって IFN- $\gamma$  と同様に抑制される事を示しており、HCV の持続感染および肝炎の慢性化に関わる重要なメカニズムを明らかにしたと言える。

- (2). NS4B の IFN 抑制作用に重要なアミノ酸配列の同定：代表者らは以前に IFN- $\gamma$  活性の抑制に NS4B の N 末端側 (1-84 番のアミノ酸) を含む領域が重要であることを報告した。そこで IL28B promoter を用いて promoter assay を行ったところ、IFN- $\gamma$  での検討と同様に NS4B N 末端側 (1-84 アミノ酸) の欠失変異体によって、IL28B の promoter 活性が強く抑制されたことから、同領域が IFN 抑制作用に重要であると考えられた (図 1)。次に NS4B 1-84 番目のアミノ酸を 4 アミノ酸ずつアラニン置換した変異 NS4B を用いて、promoter assay を施行したところ、24-27 番目のアミノ酸を置換した変異 NS4B (NS4Bm24-27) が IFN- $\gamma$  promoter 活性の抑制に重要であることが示された。免疫染色では、野生型 NS4B と同様に NS4Bm24-27 と STING との共局在を認め

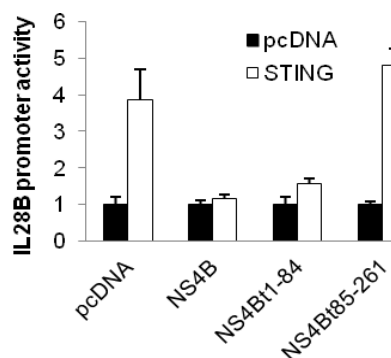
た。更に 24-27 番目のアミノ酸を 1 アミノ酸ずつアラニン置換した変異 NS4B を用いた検討では、いずれのアミノ酸変異体でも IFN 抑制作用の回復は不十分であり、複数のアミノ酸が IFN 抑制作用に必要なことが示唆された。また、IL28B promoter を用い IFN- $\gamma$  と同様の検討を行ったところ、同様に NS4Bm24-27 が IL28B promoter 活性抑制に重要である事が示された。(2014 年日本肝臓学会総会で発表)

本検討の結果および更なる解析を進めることにより、NS4B の IFN および IFN 誘導抑制作用に重要なドメインが同定できると考えられる。これは NS4B の同部位をターゲットとした薬剤など、新規抗 HCV 薬の創薬に結び付く重要な成果であると考えられる。

- (3). NS4B の変異が治療効果に及ぼす影響についての臨床病態学的解析：少数例の検討ではあるが、IFN 治療無効例の血清から得た HCV の一部において NS4B の N 末端側に存在するアミノ酸変異を認めるものもあり、同領域の変異が IFN 治療効果と関連を認める可能性が示唆された。

本成果は IFN 治療効果を規定するウイルス因子の一つとして、NS4B のアミノ酸変異が重要であり、これが NS4B の IFN 抑制作用と関連があることを検証するための重要な知見であると考えられる。

図 1



#### 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 1 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- $\gamma$  associated with non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C. J Gastroenterol

Hepatol, 2015 30:1075-1084,2015 査読有  
doi: 10.1111/jgh.12902.

〔学会発表〕(計4件)

(筆頭演者のみ記載)

1. 新田沙由梨、朝比奈靖浩、坂本直哉、後藤文男、谷口未樹、河合富貴子、大谷賢志、村川美也子、中川美奈、柿沼晴、渡辺守. HCV-NS4B の IFN- 抑制作用に関する解析. 第 50 回日本肝臓学会総会、2014 年 5 月 30 日、ホテルニューオータニ(東京、赤坂).
2. 新田沙由梨、坂本直哉、村川美也子、柿沼晴、中川美奈、朝比奈靖浩、渡辺守. HCV-NS4B は IFN- 発現誘導だけでなく IFN- 発現誘導も抑制する 2013 年第 17 回日本肝臓学会大会 2013 年 10 月 9 日、グランドプリンスホテル新高輪(東京、品川)
3. Sayuri Nitta, Yasuhiro Asahina, Naoya Sakamoto, Megumi Tasaka-Fujita, Akiko Kusano-Kitazume, Miyako Murakawa, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Mamoru Watanabe. HCV-NS4B protein blocks both type I and type III IFN production. 20nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2013 年 10 月 7 日 Melbourne( Australia )
4. 新田沙由梨、坂本直哉、村川美也、北詰晶子、藤田めぐみ、中川美奈、柿沼晴、朝比奈靖浩、渡辺守. HCV-NS4B による STING を標的とした自然免疫応答回避メカニズムの解析. 第 49 回日本肝臓学会総会、2013 年 6 月 7 日、京王プラザホテル(東京、新宿)

〔図書〕(計1件)

1. 新田沙由梨. メディカルトリビューン、Liver Forum in Kyoto 第 16 回学術集会記録集、2014 年、25-28

〔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

新田 沙由梨(NITTA, Sayuri)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・消化器病態学講座・特任助教  
研究者番号：20527056

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：