

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870265

研究課題名(和文) C型慢性肝炎に対するIFN応答・不応答メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of non-response to antiviral treatment in chronic hepatitis C

研究代表者

白崎 尚芳 (SHIRASAKI, Takayoshi)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：50547180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性C型肝炎におけるインターフェロン(IFN)治療応答・不応答を規定する宿主因子の同定とその機能的役割の解明を目的とした研究を行った。肝線維化進行症例におけるIFN治療抵抗性の機序を解明し、分岐アミノ酸BCAAが肝線維化の抑制及びIFN治療抵抗性の改善に寄与することを解明した。更に、IL28Bの機能的役割の解明から、IL28Bにより特異的に誘導される分泌タンパク質LECT2を同定した。LECT2は肝細胞における自然免疫応答を正に制御するという新規機能的役割を解明した。

研究成果の概要(英文)：The response of chronic hepatitis C (CHC) to IFN treatment is hampered in patients with advanced liver fibrosis. TGF- β plays an important role in fibrosis development, but its role in IFN signaling is unclear. I investigated the role of TGF- β on IFN signaling in HCV replication. TGF- β impaired IFN signaling by activating Socs3-mediated IFN inhibitory signaling via Foxo3a promoter activation by c-Jun binding. BCAAs could be a new therapeutic candidate to augment IFN signaling in HCV replication in patients with advanced CHC. I also investigated the functional relevance of IL28B on the innate antiviral system and HCV replication. Gene expression profiling of primary hepatocytes treated with IFN α , IL28B, or both in combination revealed that LECT2, which enhances the innate immune response and suppresses HCV replication, was specifically induced by IL28B. LECT2 might participate in prolonged ISG induction by IL28B and in the unique innate antiviral immune system of IL28B.

研究分野：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス 慢性肝炎 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染症は放置すると肝硬変、肝臓に進行する重大な感染症である。近年、インターフェロン (IFN) に加え Direct Acting Antivirals (DAA) によりウイルス排除率を大幅に高めることが期待されている。しかしながら、耐性ウイルスの出現や副作用による治療困難症例、更に、ウイルス学的な著効が認められた場合においてもその後の発癌は重大な問題となる。そのため、HCV 感染による病態形成機序を解明し、新規治療法に繋がるための基礎研究が重要である。

(2) IFN 治療応答・不応答を規定する因子としてインターロイキン 28B (IL28B) の遺伝子多型 (メジャー型/マイナー型) が同定された。マイナー型を持つ HCV 患者群ではメジャー型患者群に比較して危険率 30 倍以上の確率で治療が無効になる。IL28B は IFN 同様、インターフェロン誘導遺伝子群 (Interferon Stimulated Genes: ISGs) を誘導し、抗ウイルス作用を持つことが報告されている。そこで申請者らは、IL28B の遺伝子多型と ISGs 発現の関連性を解析し、報告した。IL28B マイナー型では肝内 ISGs 発現が治療前でむしろ高値であり、肝と末梢血では ISGs の発現レベルが異なることを明らかにした。しかし、肝内 ISGs の発現が治療前で高値にも関わらずウイルスを排除できない機構、IFN 不応答を引き起こす機構については不明である。

2. 研究の目的

(1) IFN 治療応答・不応答を規定する宿主因子を同定し、その機能的役割を解明することを目的とした。

(2) IFN 治療応答・不応答を制御する機構に IL28B がどのような作用を持って関わるのか、IL28B の分子機構の解明から IFN 不応答の原因を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト初代肝細胞を用いた検討において IFN では変動しないが、IL28B により特異的に発現変動する遺伝子群を同定した。IL28B 特異的に発現変動する遺伝子群の中で IFN 応答・不応答と密接に関わる因子の同定は、これら遺伝子の過剰発現 (cDNA)、発現抑制系 (shRNA) をレンチウイルスベクターを用いてヒト肝細胞株 (Huh7, Huh7.5, HepG2 など) に導入し、IFN や IL28B による ISGs 発現、IFN 刺激応答配列 (ISRE) プロモーターアッセイを行い、IFN 応答性を評価した。また、肝細胞の自然免疫系による IFN 産生能、IFN 応答抑制系と関連性についての評価も行った。

(2) IL28B 特異的に発現変動する因子の IFN 応答、HCV 複製制御機構の解析を行った。具体的には、HCV クロンの permissive cell

line である Huh7 及び Huh7.5 細胞由来 IL28B 特異的発現変動遺伝子過剰発現及び発現抑制細胞を作成した。これら細胞株に、分泌型ガウシアルシフェラーゼ (Gaussia Luciferase:GLuc) 産生ゲノタイプ 1a 型 (H77-GLuc)、ゲノタイプ 1a2a 型キメラ (HJ3-5)、ゲノタイプ 2a 型 (JFH-1) など種々の HCV クローンを感染させた。GLuc アッセイ、リアルタイム PCR 法による HCV-RNA 量の定量、ウエスタンブロット法による HCV 蛋白発現測定、感染性粒子の力価測定を行い HCV 複製能を解析した。

(3) IL28B 特異的に発現変動する遺伝子のノックアウトマウス (KO)、トランスジェニックマウス (Tg) の作成、解析を試みた。KO マウス、Tg マウスの通常状態及び PolyIC、マウス IFN 投与後における免疫動態、肝内遺伝子発現解析を行った。同時に IFN 応答性についても評価した。

4. 研究成果

肝線維化を伴う慢性 C 型肝炎患者では、IFN に対する抗ウイルス効果が減弱することが知られている。しかしながら IFN が効かなくなる作用機序は不明であった。そこで申請者は線維化促進因子である TGF- β に着目し、TGF- β と肝細胞における IFN 応答の関連性について検討し、以下のことを明らかにした。

(1) IFN 治療抵抗性を示す IL28B マイナー型患者群及び線維化の進行した患者群において肝細胞における TGF- β や TGF- β レセプターの発現が有意に増加していた。更に、TGF- β シグナルの伝達因子である SMAD と IFN 応答抑制因子である FoxO3 及び SOCS3 の発現に正相関が認められた。

(2) 培養細胞を用いた検討から、TGF- β を処置した肝細胞では JNK-cJun シグナルを介して、FoxO3 の発現が有意に増強することを明らかにした。その結果、FoxO3 により発現が促された SOCS3 は IFN 応答を強く抑制した。更に、TGF- β は栄養センサー及び IFN 応答に関わる mTOR シグナルの活性を減弱させた。これら TGF- β による IFN 応答抑制は HCV の複製を有意に増強させた。

(3) TGF- β レセプターインヒビターを用いて TGF- β シグナルを遮断させることにより、IFN 応答性は改善し、更に DAA (ボセプレビル) による抗 HCV 効果も増強させた。興味深いことに、肝線維化に伴う肝低栄養状態の改善に用いられる分岐アミノ酸 (BCAA) は TGF- β シグナル及び JNK-cJun シグナルを減弱させた。その結果、TGF- β による FoxO3, SOCS3 の発現増強機構は解除され IFN 応答性が増強した。BCAA においても、DAA による抗 HCV 効果を有意に増強させた。

本研究において、TGF- β が肝線維化に伴う IFN 治療抵抗性を引き起こすメカニズムを解明することができた。BCAA は栄養不良状態における IFN 治療抵抗性の改善のみならず、TGF- β による治療抵抗性の改善においても有用である。

IFN 応答・不応答を規定する因子として IL28B の遺伝子多型が同定されたが、IL28B が IFN 応答を制御する機序は十分に解明されていない。そこで申請者は、HCV 感染培養細胞やモデルマウス、臨床サンプルを用いて IL28B の分子機構を解明することを目的とした研究を行い、以下のことを明らかにした。

(4) ヒト初代肝細胞に IFN α , IL28B, IFN γ +IL28B を処置し DNA マイクロアレイ法を用いて網羅的遺伝子発現解析、パスウェイ解析を行った。興味深いことに、IL28B でのみ発現が誘導される IL28B 特異的誘導遺伝子が 41 個存在した。更にパスウェイ解析から、IL28B は Wnt/ β -catenin, Notch, VEGF, Integrin シグナルを特異的に抑制していた。IL28B は抗ウイルスに働く IFN と共通の機能がある一方、IL28B 独自の機能的役割が存在することを明らかとした。

(5) IL28B 特異的誘導遺伝子の中で最も顕著に発現誘導された遺伝子が LECT2 であった。LECT2 は主に肝細胞から産生される分泌タンパク質である。LECT2 は好中球遊走能、細胞増殖・分化などの機能的役割を有することが報告されているが、抗ウイルス効果や IFN 応答に対する役割は不明であった。HCV 感染培養細胞を用いた検討から、LECT2 は抗ウイルス活性を示し、更に、興味深いことに LECT2 は ISGs を誘導するタンパク質であった。LECT2 ノックダウン細胞では IFN α や IL28B 処置による ISGs の誘導が抑制される一方、LECT2 過剰発現細胞では IFN α や IL28B による IFN 応答性や抗ウイルス効果が増強した。

(6) LECT2 の詳細な機能的役割の解明のため LECT2 トランスジェニック (LECT2 Tg) マウス及び LECT2 ノックアウト (LECT2 KO) マウスを作成した。これら Tg マウス、KO マウスに Poly(I:C) を処置し免疫応答を解析した。その結果、LECT2 Tg マウスは Poly(I:C) による肝細胞での自然免疫応答を増強させた一方、KO マウスにおいてはその応答性を減弱させた。更に、LECT2 KO マウスに IFN α を処置した結果、肝細胞における IFN 応答性が減弱した。LECT2 は肝細胞において自然免疫応答を増強させる機能を有する分泌タンパク質であることを明らかとした。

(7) 臨床サンプルを用いた検討より、慢性 C 型肝炎患者で肝細胞内の ISGs が高い症例では LECT2 の発現が高いことが明らかとなった。培養細胞やマウスにおける研究成果を裏付

ける結果である。

本研究は IL28B の機能的役割の解明を目的とした。IL28B 特異的誘導分泌タンパク質である LECT2 を同定した。HCV 感染培養細胞や LECT2 Tg マウス、KO マウスを用いた検討から、LECT2 は肝細胞の自然免疫応答を制御する因子であり、抗ウイルス活性を有することを解明した。自然免疫応答を抑制する宿主因子は多数存在するが、自然免疫応答を増強させる宿主因子の報告は少ない。本研究は HCV 感染症のみならず、他の感染症や免疫分野にも発展性が広がる可能性があり学術的に意義のある研究である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Okada H, Honda M, Campbell JS, Takegoshi K, Sakai Y, Yamashita T, Shirasaki T, Takabatake R, Nakamura M, Tanaka T, Kaneko S. Inhibition of microRNA-214 ameliorates hepatic fibrosis and tumor incidence in platelet-derived growth factor C transgenic mice. *Cancer Science*. 2015 Sep;106(9):1143-52. (査読有)
DOI:10.1111/cas.12730

Selitsky S, Gale J, Honda M, Yamane D, Masaki T, Fannin E, Guerra B, Shirasaki T, Shimakami T, Kaneko S, Lanford R, Lemon SM, Sethupathy P. Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. *Scientific Reports*. 2015 Jan8;5:7675 (査読有)
DOI:10.1038/srep07675

Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway. *Hepatology*. 2014 Nov;60(5):1519-30 (査読有)
DOI:10.1002/hep.27277

Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. The Acyclic Retinoid Peretinoin Inhibits Hepatitis C Virus Replication and Infectious Virus Release in Vitro.

Scientific Reports. 2014 Apr15;4:4688 (査読有)
DOI:10.1038/srep04688

Honda M, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. Hepatology. 2014 Mar;59(3):828-838 (査読有)
DOI:10.1002/hep.26788

Takayama H, Misu H, Iwama H, Chikamoto K, Saito Y, Murao K, Teraguchi A, Lan F, Kikuchi A, Saito R, Tajima N, Shirasaki T, Matsugo S, Miyamoto K, Kaneko S, Takamura T. Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P Gene via an AMP-activated Kinase (AMPK)/FoxO3a Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes. The Journal Of Biological Chemistry. 2014 Jan;289(1):335-345. (査読有)
DOI:10.1074/jbc.M113.479386

Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. Journal of Virology. 2013 May;87(9):5270-5286. (査読有)
DOI:10.1128/JVI.03022-12

〔学会発表〕(計7件)

Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Tetsuro Shimakami, Kazuhisa Murai, Hikari Okada, Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Stanley M. Lemon, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko
LECT2 specifically induced by IL28B enhances the innate immune response and HCV replication
66th AASLD The Liver Meeting
San Francisco, USA, November 15, 2015

Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Tetsuro Shimakami, Kazuhisa Murai, Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Stanley Lemon, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko
LECT2 specifically induced by IL28B enhances the innate immune response and HCV replication

22nd International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses
Strasbourg, France, October 10, 2015

Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Tetsuro Shimakami, Kazuhisa Murai, Takayuki Shiimoto, Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Stanley M. Lemon, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko
LECT2 specifically induced by IL28B regulates interferon response and HCV replication
65th AASLD The Liver Meeting
Boston, USA, November 11, 2014

Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Tetsuro Shimakami, Kazuhisa Murai, Takayuki Shiimoto, Hikari Okada, Riuta Takabatake, Yoshio Sakai, Taro Yamashita, Stanley M Lemon, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko
Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- signaling pathway
21st International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses
Banff, CANADA, September 8, 2014

Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Tetsuro Shimakami, Kazuhisa Murai, Takayuki Shiimoto, Hikari Okada, Riuta Takabatake, Stanley M Lemon, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko
Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C with advanced fibrosis via the TGF- signaling pathway
64th AASLD The Liver Meeting
Washington, DC, USA, November 4, 2013

Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Tetsuro Shimakami, Kazuhisa Murai, Takayuki Shiimoto, Hikari Okada, Riuta Takabatake, Stanley M Lemon, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko
Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C with advanced fibrosis via the TGF- signaling pathway
20th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses
Melbourne, Australia, October 9, 2013

6. 研究組織

(1)研究代表者

白崎 尚芳 (SHIRASAKI, Takayoshi)
金沢大学・保健学系・助教
研究者番号: 50547180