

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460987

研究課題名(和文) C型肝炎治療抵抗性を示すウイルス因子と宿主因子の解析

研究課題名(英文) Analysis for viral factors and host factors influencing hepatitis C therapeutic effect.

研究代表者

井津井 康浩 (Itsui, Yasuhiro)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20401341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)の治療効果因子としてインターフェロン(IFN)により誘導されるIFN誘導遺伝子(ISG)からコードされる宿主蛋白に注目し解析を行った。研究者は(1)新たなHCVレプリコン増殖細胞(Huh7/Rep-Feo)を樹立することに成功し、次に(2)ISG:GBP-1, IFI-6-16, IFI-27がHCV増殖を制御することを確認した。ISG発現蛋白とHCV蛋白との相互作用について解析を行い、(3)GBP-1蛋白とNS5B蛋白が相互作用を示した。さらに解析を進めGBP-1のGTPaseドメインとNS5B fingerドメインが相互作用をすることを確認することを確認した。

研究成果の概要(英文)：We have focused on interferon stimulated genes (ISGs), which were involved in efficacy of interferon (IFN)-based therapy for chronic hepatitis C, and investigated regulatory effects of ISG on viral replication in hepatitis C virus (HCV). (1) We have produced newly established cell lines, HCV subgenomic replicon (Huh7/Rep-Feo), which were in-vitro models simulating cellular autonomous replication of HCV genomic RNA. (2) We showed that GBP-1, IFI-6-16, and IFI-27 had directly inhibited subgenomic replication and virus production of HCV. (3) Investigation of molecular interaction of the ISGs with HCV proteins showed that GBP-1 bound HCV-NS5B directly. A protein truncation assay showed that the guanine binding domain of GBP-1 and the finger domain of NS5B were involved in the interaction.

研究分野：肝臓病学

キーワード：インターフェロン誘導遺伝子 C型肝炎ウイルス GBP-1 NS5B

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)感染者は国内に約150万人の慢性感染者が存在し、多くが肝硬変・肝細胞癌に進展する。肝細胞癌は我が国の癌死因疾患として男女ともに多い。そのため慢性肝炎の段階で治療を行い、肝硬変へ進行させず発癌リスクを減少させる重要性があり、インターフェロン(IFN)を主軸とした治療が行われてきたが、いまだ十分な治療効果とはいえない。IFN治療への抵抗性因子として、宿主由来因子とウイルス由来因子が多いに関わっていることが指摘されていた。宿主のどの因子とウイルスのどの因子が関わっているかを研究者たちは解明し、そこで得られた知見を基に新規抗ウイルス治療を可能にする学術的基盤を形成したいと研究を開始した。

2. 研究の目的

HCVの治療効果因子としてIFNにより誘導されるIFN誘導遺伝子(ISG)からコードされる宿主蛋白やHCV遺伝子変異に注目し、(1)HCV感染・増殖細胞系の作成、(2)HCV増殖細胞系へのISG蛋白の抗ウイルス機構の解析、(3)ISG蛋白とウイルス蛋白の直接相互作用の解析を行った。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した。

3. 研究の方法

(1)新たなHCVレプリコン増殖細胞の作成
ネオマイシン耐性遺伝子とルシフェラーゼリポーター遺伝子の融合遺伝子を発現するキメラリポーターHCVレプリコン(Rep-Feo)RNAをHuh7細胞に導入し、G418選択によりFeoレプリコン恒常発現細胞株を樹立する(Huh7/Rep-Feo)。Huh7/Rep-Feoを用いウイルス複製増殖レベルをレポーターアッセイにより高精度・高効率に検出する。レプリコンRNA・ウイルス蛋白発現はnorthern・western blottingより確認する。また、HCV genotypeとして、genotype 1b, 2aがこれまで報告されており、研究者らはgenotype 1b由来のキメラリポーターHCVレプリコン増殖細胞は作成しているため、新たにgenotype 2a由来のキメラリポーターHCVレプリコン増殖細胞を作成する。

(2)ISG発現プラスミドベクターの構築及びレポーターアッセイ
Human Liver cDNA library発現プラスミドを用いて、PCR法により遺伝子を増幅し、ISG発現プラスミドベクターを構築する。解析するISG(予定): IP10, IL8, MxA, PKR, GBP-1, IFI-56K, 25OAS, IFP35, IRF-9, IFI-6-16, ISG15, IFI-27, PLSCR1, TRAIL, LMP7-E, 9-27, RIG-G, IRF-1。構築したISG発現プラスミドベクターを、培養細胞(Huh7, 293T)へ遺伝子導入し、回収した蛋白質を用いて、western

blottingで蛋白発現の有無を確認する。

(3)ISG発現によるHCVレプリコン増殖細胞への影響の解析

今回新たに作成したgenotype 2a由来のキメラリポーターHCVレプリコン増殖細胞にISG発現プラスミドベクターを強制発現させる。レプリコン細胞内蛋白を回収して、レポーターアッセイを行い、HCV増殖制御を定量的に解析する。

(4)ISG発現によるHCV感染培養系への影響の解析
Genotype 2a JFH1株由来HCV感染培養細胞にISG発現プラスミドベクターを遺伝子導入し、細胞内HCV-RNAにはリアルタイムPCRを行い、細胞内蛋白にはHCVコア蛋白によるwestern blotを行いHCV増殖抑制効果を解析する。

(5)ISG発現を抑制するsiRNAの作成とHCV感染培養系への影響

ISG mRNAを標的とするsiRNA(shRNA発現プラスミド)を作成する。作成したsiRNAをISG発現プラスミドベクターとともにHuh7細胞へ遺伝子導入し、western blottingにより、蛋白発現抑制について確認する。作成したsiRNAをGenotype 2a JFH1株由来HCV感染培養細胞に導入して、培養上清中のHCVコア抗原を測定する。

(6)ISG蛋白とHCV非構造蛋白との相互作用の解析
(免疫沈降法, Two hybrid法)

HCV非構造蛋白を発現するプラスミドベクターを作成する。作成するHCV非構造蛋白: NS3, NS4B, NS5A, NS5B。研究者らが同定したGBP-1, IFI-6-16及びIFI-27を発現するプラスミドベクターとHCV非構造蛋白発現プラスミドベクターを293T細胞へ遺伝子導入し、蛋白質を回収する。回収した蛋白質を用いて、免疫沈降法にて解析する。さらに免疫沈降法に加え、酵母two-hybrid systemを利用したmammalian two-hybrid systemを用いる。HCV非構造蛋白をDNA結合ドメインと融合させた蛋白発現プラスミドベクターと、ISG発現蛋白を転写活性ドメインと融合させた蛋白発現プラスミドベクターを構築する。両者とルシフェラーゼ発現ベクターを、Huh7細胞へ導入する。ISGとHCV非構造蛋白が相互作用を示せば、ルシフェラーゼがレポーターとして発現するので、レポーターアッセイを行い解析する。

(7)GBP-1蛋白エピトープとNS5B蛋白エピトープの解析

HCV非構造蛋白NS5Bと相互作用を示すISGのGBP-1が同定できたのでGBP1のtruncate plasmidとNS5Bのtruncate plasmidを作成する。GBP-1 truncate発現プラスミドベクターとHCV-NS5B truncate発現プラスミドベクターとをHuh7細胞へcotransfectionし、蛋白を回収して、mammalian two-hybrid systemで認する。

4. 研究成果

(1) 新たな HCV レプリコン増殖細胞 (Huh7/Rep-Feo) を樹立することに成功した。HCV ジェノタイプ 1b と 2a のそれぞれについて、Huh7/Rep-Feo 細胞 (Huh7/Rep-Feo1b, Huh7/Rep-Feo2a) を樹立することができた。

(2) ISG 発現プラスミドベクターの構築として、予定していた ISG : IP10, IL8, MxA, PKR, GBP-1, IFI-56K, 25OAS, IFP35, IRF-9, IFI-6-16, ISG15, IFI-27, PLSCR1, TRAIL, LMP7-E, 9-27, RIG-G, IRF-1 の 18 遺伝子についての発現プラスミドベクターを構築することができた。

(3) ISG 発現による HCV レプリコン増殖細胞への影響の解析: 構築された 18 種類の ISG のそれぞれの発現ベクターを Huh7/Rep-Feo へ強制発現し、HCV 増殖への影響を解析したところ IRF-1, GBP-1, IFI-6-16, IFI-27 が HCV 増殖を有意に抑制することが判明した (1b-Feo: GBP-1; $63.7 \pm 7.49\%$, IFI-6-16; $62.6 \pm 19.2\%$, IFI-27; $71.6 \pm 1.22\%$, IRF-1; $95.1 \pm 0.19\%$ / 2a-Feo: GBP-1; $61.9 \pm 12.3\%$, IFI-6-16; $42.9 \pm 7.0\%$, IFI-27; $42.9 \pm 13.2\%$, IRF-1; $95.8 \pm 1.0\%$)。

(4) HCV 感染培養系に対する ISG 強制発現の影響: Genotype 2a JFH1 株由来 HCV 感染培養細胞 ISG 発現プラスミドベクター (GBP-1, IFI-6-16, IFI-27, IRF-1) を遺伝子導入し、HCV コア蛋白質と細胞内 HCV-RNA を解析した。HCV コア蛋白質では、GBP-1 ($24.3 \pm 2.90\%$), IFI-6-16 ($33.9 \pm 0.40\%$), IFI-27 ($38.5 \pm 3.63\%$), IRF-1 ($69.2 \pm 1.89\%$) のいずれも有意に HCV コア蛋白質産生を抑制した。また細胞内 HCV-RNA についても、GBP-1, IFI-6-16, IFI-27, IRF-1 の強制発現により、HCV-RNA が有意に抑制された GBP-1 ($38.2 \pm 1.39\%$), IFI-6-16 ($54.6 \pm 2.93\%$), IFI-27 ($50.7 \pm 2.81\%$), IRF-1 ($6.61 \pm 0.341\%$)。

(5) GBP-1, IFI-6-16, IFI-27 に対する siRNA を Genotype 2a JFH1 株由来 HCV 感染培養細胞へ導入したところ、細胞内 HCV-RNA が GBP-1 ($161.1 \pm 1.95\%$), IFI-6-16 ($155.7 \pm 18.6\%$) で有意に上昇した。HCV コア蛋白質による western blotting でも GBP-1, IFI-6-16 で発現が上昇していた。

(6) ISG 蛋白と HCV 非構造蛋白との相互作用の解析: GBP-1, IFI-6-16, IFI-27 の発現プラスミドベクターと HCV 非構造蛋白発現ベクター (NS3, NS4B, NS5A, NS5B) を共発現させて、回収した蛋白について免疫沈降法で相互作用を解析したところ、GBP-1 と NS5B が相互作用をすることが確認された。次に、mammalian two-hybrid system でも GBP-1 と HCV-NS5B が相互作用を示すか解析したところ、両者が相互作用することが確認できた。

(7) GBP-1 蛋白エピトープと NS5B 蛋白エピトープの解析: GBP-1 と NS5B が相互作用を示すことが明らかとなったため、GBP-1 の蛋白エピトープ (GBP-1t.1-317, GBP-1t.318-593) と NS5B の蛋白エピトープ (NS5Bt.1-70, NS5Bt.71-591, NS5Bt.371-591) を発現するプラスミドベクターを作成した。

mammalian two-hybrid system を用いて、
① GBP-1 発現プラスミドと NS5Bt.1-70, NS5Bt.71-591, NS5Bt.371-591 のそれぞれとの相互作用を解析したところ、GBP-1 と NS5Bt.1-70 が結合することが判明した。

② NS5B 発現プラスミドと GBP-1t.1-317, GBP-1t.318-593 のそれぞれとの相互作用を解析したところ、NS5B と GBP-1t.1-317 で相互作用を示すことが判明した。

GBP-1t.1-317 は、GTPase ドメインにあたり、HCV-NS5Bt.1-70 は NS5B finger ドメインにあたる。GBP-1 の GTPase ドメインは、GBP-1 の機能的ドメインに当たるので、これが HCV に対する抗ウイルス作用を示すものと示唆された。一方、HCV-NS5B は GTPase ドメインと結合して、GTPase 作用を失活させて、HCV 増殖を持続することも示唆された。

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 7 件)

① Murakawa M, Asahina Y, Itsui Y, Watanabe M (他 16 名, 2 番目, 12 番目, 20 番目)

Hepatic IFNL4 expression is associated with non-response to interferon-based therapy through the regulation of basal interferon-stimulated gene expression in chronic hepatitis C patients. *J Med Virol.* 2017 Jul;89(7):1241-1247. doi: 10.1002/jmv.24763 査読有

② Murakawa M, Asahina Y, Itsui Y, Watanabe M (他 17 名, 2 番目, 14 番目, 21 番目)

ITPA gene variation and ribavirin-induced anemia in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated with sofosbuvir plus ribavirin. *Hepatol Res.* 2017 Jan 27. doi: 10.1111/hepr.12867 査読有

③ Nagata H, Itsui Y, Asahina Y, Watanabe M (他 16 名, 13 番目, 18 番目, 19 番目)

Serial measurement of Wisteria floribunda agglutinin positive Mac-2-binding protein is useful for predicting liver fibrosis and the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients treated with IFN-based and IFN-free

therapy.
Hepatol Int. 2016 Nov;10(6):956-964
DOI: 10.1007/s12072-016-9754-1 査読有
④Kaneko S, Asahina Y, Itsui Y, Watanabe M (他 19名, 3番目, 13番目, 23番目)
Human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell lines as a new model for host interaction with hepatitis B virus.
Sci Rep. 2016 Jul 8;6:29358. doi: 10.1038/srep29358. 査読有
⑤Kawai-Kitahata F, Asahina Y, Itsui Y, Watanabe M (他 20名, 2番目, 16番目, 24番目)
Comprehensive analyses of mutations and hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma with clinicopathological features.
J Gastroenterol. 2016 May;51(5):473-86. doi: 10.1007/s00535-015-1126-4. 査読有
⑥Murakawa M, Asahina Y, Itsui Y, Watanabe M (他 12名, 2番目, 13番目, 16番目)
Impaired induction of interleukin 28B and expression of interferon λ 4 associated with nonresponse to interferon-based therapy in chronic hepatitis C.
J Gastroenterol Hepatol. 2015 Jun;30(6):1075-84. doi: 10.1111/jgh.12902. 査読有
⑦井津井康浩、朝比奈靖浩、渡辺守
肝細胞癌のシグナル伝達と治療標的、先端医学社、分子消化器病、11巻3号、277-282 査読無

[学会発表] (計 9 件)

①井津井康浩、朝比奈靖浩、渡辺守、他
免疫抑制状態における E 型急性肝炎の慢性化リスクについて
第 41 回日本肝臓学会東部会、2016 年 12 月 8 日～12 月 9 日京王プラザホテル(東京都新宿区)
②村川美也子、朝比奈靖浩、井津井康浩、渡辺守、他
C 型慢性肝疾患の DAA 治療効果に関わるウイルス・宿主因子の解析
第 20 回日本肝臓学会大会、2016 年 11 月 3 日～11 月 4 日神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)
③北畑富貴子、朝比奈靖浩、井津井康浩、渡辺守、他
HBV 持続感染と HBV 既感染肝細胞癌における宿主ゲノム変異と HBV integration の比較検討、第 52 回日本肝臓学会 2016 年 5 月 19 日～5 月 20 日ホテルニューオータニ幕張、東京ベイ幕張ホール(千葉県千葉市)
④Hiroko Nagata, Yasuhiro Itsui, Yasuhiro Asahina, Mamoru Watanabe, etc.
Variations of the host genome and

interaction of hepatitis B viral X protein associated with hepatocarcinogenesis
The Liver Meeting 2015, AASLD(国際学会), 2015 年 11 月 15 日～11 月 19 日 Sanfrancisco (米国)

⑤井津井康浩、朝比奈靖浩、渡辺守、他
炎症性腸疾患コホートにおける HBV 再活性化の実態と再活性化及び de novo B 型肝炎に関わる要因の解析

第 51 回日本肝臓学会総会、2016 年 5 月 21 日～5 月 22 日 ホテル日航熊本(熊本県熊本市)

⑥井津井康浩、朝比奈靖浩、渡辺守
高齢者 C 型慢性肝炎への IFN 治療後肝発癌と発癌に関与する因子の解析

第 18 回日本肝臓学会大会、第 56 回日本消化器病学会大会 2014 年 10 月 23 日～10 月 26 日 ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

⑦渡辺貴子、井津井康浩、朝比奈靖浩、渡辺守、他

次世代シーケンサーを用いた NS3 阻害剤 3 剤併用療法における NS3 及び NS5A 耐性変異株の解析

第 18 回日本肝臓学会大会、第 56 回日本消化器病学会大会 2014 年 10 月 23 日～10 月 26 日 ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

⑧渡辺貴子、井津井康浩、朝比奈靖浩、渡辺守、他

次世代シーケンサーを用いた NS3 及び NS5A 耐性変異株の解析とシメプレビルまたはテラプレビル 3 剤併用療法の治療効果との関連

第 50 回日本肝臓学会総会 2014 年 5 月 29 日～5 月 30 日ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

⑨村川美也子、井津井康浩、朝比奈靖浩、渡辺守、他

C 型慢性肝炎治療における IFN 不応性に関わる IL28 近傍遺伝子多型(SNP)と血球内 IFN λ 産生能の関連

第 50 回日本肝臓学会総会 2014 年 5 月 29 日～5 月 30 日ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

[図書] (計 1 件)

①井津井康浩、朝比奈靖浩、最新医学社
【免疫不全患者における感染症の現状と展望】肝硬変患者に合併する細菌感染症
2016、781-784

[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）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/gast/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

井津井 康浩 (ITSUI, Yasuhiro)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20401341

(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

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()