

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390187

研究課題名(和文) C型慢性肝炎治療成績の向上と肝発癌阻止を目指した分子基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of molecular basis for improving the treatment efficacy of chronic hepatitis C and preventing the occurrence of hepatocellular carcinoma.

研究代表者

本多 政夫 (HONDA, Masao)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：00272980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はC型慢性肝炎におけるIFN応答・不応答の機序をIL28Bに注目して解析した。末梢血と肝組織のIFN誘導遺伝子(ISGs)発現解析から、IL28Bマイナーでは両者の発現の相関が消失し、肝臓での免疫担当細胞の減少が起こっていた。IL28Bマイナーではnon-canonical wntリガンドであるWnt5Aの発現亢進が認められ、Wnt5Aは肝細胞のISGsの誘導、ストレス顆粒蛋白G3BP1の発現誘導とHCV複製増強、さらにはケモカインの発現抑制を促し肝での免疫細胞浸潤の低下を誘導していると考えられた。IL28B・KOマウスの解析から、IL28Bと肝細胞浸潤との直接的な関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate how IL28B is involved in the IFN resistance in patients of chronic hepatitis C. Comparison of gene expression profiling in PBMC and liver showed that the loss of correlation of ISGs expression between PBMC and liver in IL28B minor patients. Laser capture micro dissection analysis (LCM) of hepatocyte and liver infiltrated lymphocytes combined with immune-staining of surface marker of immune cells showed that infiltration of lymphocyte into the liver was impaired in patients with IL28B minor patients. Interestingly, non-canonical wnt ligand, WNT5A was up-regulated in the liver of IL28B minor patients and WNT5A induced ISGs and stress granule protein G3BP1, and increased HCV replication. WNT5A repressed the expression of chemokines and play roles in the impairment of lymphocytes infiltration in liver. The analysis of newly developed IL28B knockout mouse showed that IL28B was directly involved in the lymphocytes infiltration in liver.

研究分野：肝臓病学、ウイルス学、消化器癌

キーワード：肝炎 肝癌 自然免疫 C型肝炎ウイルス 肝浸潤リンパ球

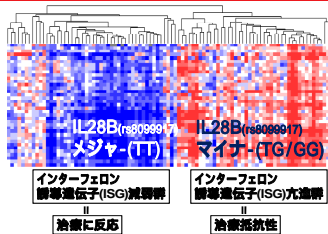
1. 研究開始当初の背景

我が国の肝癌死亡数は年間3.5万人であり、その内7割以上がC型慢性肝炎(CH-C)症例である。肝炎に対する治療法は確実に進歩しており、ペグインターフェロン(Peg-IFN)+リバビリン(Rib)併用療法により、ゲノタイプ1b(G1b)+高ウイルス症例に対して約50%のウイルス学的著効(sustained virological response: SVR)が得られるようになった。2011年末より、Peg-IFN+ Ribに加えて直接抗ウイルス剤: directly acting antivirals (DAA)であるNS3 protease inhibitor: telaprevirを加えた3剤併用療法が始まり、治療効果の改善が見込まれる。しかし、これまでに無効(non response: NR)であった症例では3剤併用療法でも低いSVR率(3割程度)となることが問題であった。IFN治療は肝癌の発生抑制、肝切除やラジオ波焼灼療法(RFA)による根治的治療後の再発抑制に有用であることが多くの施設からすでに報告されており、本研究はCH-Cの治療成績の向上に加え肝発癌、再発抑制を目的としたIFNの応答・不応答性の分子機構を明らかにし、肝疾患症例の生命予後の改善を目的とした基盤的研究を行うことを目的とした。

2. 研究の目的

CH-C症例に対するIFN治療成績を規定する因子としてウイルス側因子に加え、宿主因子も極めて重要であることが示唆され、申請者は治療前、治療中の肝生検組織の遺伝子発現解析からIFN誘導遺伝子: ISGs(interferon stimulated genes)の発現誘導が治療反応性と関連することを明らかにした(J.Hepatology 2011)。次いでGWAS(genome wide association study)を用いたホストゲノムからの解析が申請者を含む全国19施設の協力のもと溝上・田中らにより行われ、IL28Bの遺伝子多型(メジャー型/マイナー型)が治療効果と関連することが明らかとなった(Nature Genetics 2009)。申請者はIL28B遺伝子多型と治療前肝組織内ISGs発現の関連性を解析し、治療抵抗性を示すIL28Bマイナーでは治療前ISGs発現が高値であることを世界に先駆けて明らかにした(Gastroenterology 2010)(図1)。IL28Bマイナーでは治療前に既にISGs発現が誘導され、治療によるIFN投与によってもISGsが誘導されない病態が示唆された。本研究は臨床検体及びマウスモデルを用いてIL28B遺伝子多型、ISGs誘導及びIFN治療抵抗性の病態を明らかにすることを目的とした。

図1 治療前の肝組織ISGとIL28B遺伝子多型



3. 研究の方法

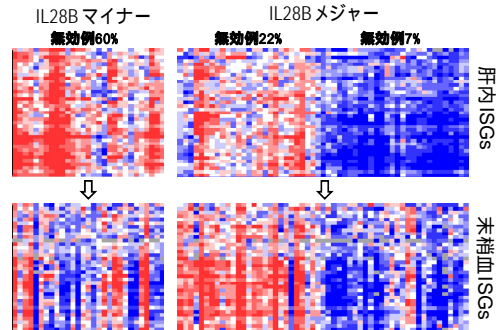
臨床サンプルを用いた解析として、同一症例における肝細胞、PALT、末梢血液の遺伝子発現の関連を明らかにし、遺伝子発現パスウェイ解析技術を用いて、IL28Bメジャー/マイナーのPALT・肝細胞・末梢血液におけるシグナルパスウェイを解析しCH-C状態でのIL28Bメジャー/マイナーの免疫学応答の違いを明らかにする。

マウスモデルを用いた解析としてIL28BK/Oマウスを新たに作成し、肝浸潤リンパ球や肝細胞の免疫応答について解析する。

4. 研究成果

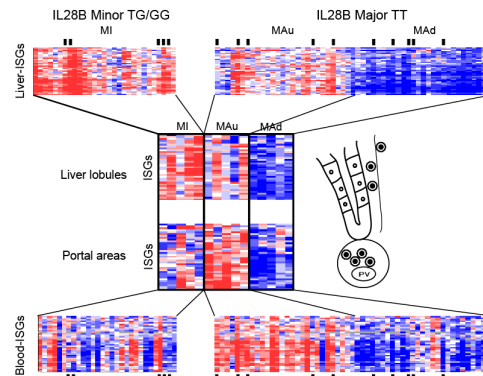
平成24年度は末梢血と肝組織のインターフェロン誘導遺伝子(ISGs)発現を148例のC型慢性肝炎で比較した。IL28Bメジャーでは両者の発現に有意な相関が見られたが、IL28Bマイナーでは両者の発現の相関が消失していた(図2)。

図2 同一症例の肝内ISGsと末梢血ISGs



LCMを用いた肝小葉部とPALTの発現解析では、IL28Bメジャーでは両者のISGs発現に相関が見られたが、IL28Bマイナーでは両者の相関が消失しており、肝浸潤リンパ球の肝小葉とPALT間の移行がIL28Bマイナーでは障害されていることが示唆された(図3)。

図3 LCMを用いた末梢血液、肝浸潤リンパ球、全肝、肝細胞の遺伝子発現の関連



免疫組織染色では、CD163、CD8細胞の肝小葉での減少がIL28Bマイナーで確認された。また、マクロファージ、樹状細胞、T細胞、B細胞、顆粒球の細胞表面マーカーの発現もIL28Bマイナーの肝臓で減少していることが

確認された。さらに、各種ケモカインの発現も IL28B マイナーの肝臓で減少しており、免疫担当細胞の減少が IL28B マイナーの肝臓で起こっていることが明らかとなった。

平成 25 年度は ISGs 誘導因子に関して検討した。IL28A/B 発現は肝内 ISGs と有意な相関を示したが、IFN- 発現は肝内 ISGs と相関せず、肝内 ISGs は主に IL28A/B で誘導されていることが明らかとなった。さらに、IL28B マイナーでは、新規に発見された IFN- 4 と肝内 ISGs が有意な相関を示したことから、IL28B マイナーの肝内 ISGs は複数の因子(少なくとも IL28A/B と IFN- 4)で誘導されることが明らかとなった。遺伝子発現プロファイルの検討から IL28B マイナーでは non-canonical wnt シグナル・リガンドである Wnt5A の発現亢進が認められた。Wnt5A とそのレセプター FZD5 の発現は IL28B マイナーで有意に発現亢進しており、肝内 ISGs と有意な相関を認めた。興味深いことに、Wnt5A はストレス顆粒蛋白である G3BP1 の発現を誘導し、HCV の複製を支持する機能を有していることが培養細胞を用いた HCV の複製実験で明らかとなった。また、Wnt5A は HCV 感染細胞のケモカインの発現を抑制し、IL28B マイナーでの免疫細胞浸潤の低下と関連していると考えられた。

平成 26 年度は、作成した IL28B-KO マウスを用いて innate immunity の解析を行った。IL28B-KO マウスと WT マウスから初代肝細胞を分離し、Poly:IC の反応を比較すると IL28B-KO 肝細胞では WT マウス肝細胞に比し Mx1、IL6、TLR3 の発現誘導の低下が顕著に認められ、IL28B 欠損に伴う肝細胞の自然免疫応答低下が示された。IL28B-KO マウスを用いて Poly:IC を尾静注後、肝組織及び脾臓のリンパ球を採取し、フローサイトメトリー解析を行った。興味深いことに投与前、IL28B-KO マウスでは Neutrophil/Macrophage、CD3・CD4・CD8・NK・NKT 及び CD8+CD25+Foxp3+ の T-reg 細胞数が WT マウスに比し有意に上昇していた。Poly:IC 投与により、それらの細胞は WT マウスでは上昇を示したが、IL28B-KO マウスでは有意な減少を認めた。一方、脾臓の免疫細胞では IL28B-KO マウスと WT マウスで著変は見られなかった。

肝臓は腸管から侵入する様々な病原体の暴露から生体を守る防御機構として重要な役割を果たしている。IL28B の欠損による肝細胞の免疫バリアーの破綻を補う目的で多数の免疫細胞が肝臓に浸潤していた可能性が示唆された。興味深いことに Poly:IC 投与により IL28B-KO マウスの肝臓における免疫細胞の減少を認めたことから、IL28B には免疫細胞を肝臓内に保持する機能があると考えられ、IL28B 欠損に伴うウイルス感染の遷延化の機構が推定された。これらの結果は、IL28B マイナー型症例における、C 型肝炎の高度慢性化、治療抵抗性の機序を説明する一つと考えられた。

今後の展望として、IL28B 本来の役割として、リンパ球肝浸潤における役割、さらには IL28B と自然免疫機構、肝発癌との関連の解析が重要と考えられる。

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 37 件)

(すべて査読あり)

- 1) Iio E, Honda M, Tanaka Y. (他 28 名、16 番目) Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hum Genet.* 2015 134(3):279-89. doi: 10.1007/s00439-014-1520-7.
- 2) Yamada K, Honda M, Kaneko S. (他 10 名、12 番目) Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 2015 35(2):582-90. doi: 10.1111/liv.12685.
- 3) Selitsky SR, Honda M, Sethupathy P. (他 9 名、3 番目) Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. *Sci Rep.* 2015 5:7675. doi: 10.1038/srep07675.
- 4) Shirasaki T, Honda M, Kaneko S. (他 10 名、2 番目) Impaired interferon signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the transforming growth factor beta signaling pathway. *Hepatology.* 2014. 60(5):1519-30. doi: 10.1002/hep.27277.
- 5) Yamashita T, Honda M, Kaneko S. (他 18 名、12 番目) Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2014 60(5):1674-85. doi: 10.1002/hep.27093.
- 6) Terashima T, Honda M, Kaneko S. (他 9 名、11 番目) Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy. *Hepatol Res.* 2014 Oct 16. doi:10.1111/hepr.12436.
- 7) Terashima T, Honda M, Kaneko S. (他 7 名、9 番目) Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib. *Hepatol Res.* 2014 44(12):1179-85. doi: 10.1111/hepr.12266.
- 8) Nakamura M, Honda M, Ishibashi H. (他 23 名、10 番目) Autoantibody status and histological variables influence biochemical response to treatment and

- long-term outcomes in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2014 Sep 14. doi: 10.1111/hepr.12423.
- 9) Takeshita Y, Honda M, Kaneko S. (他 12 名、3 番目) The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2014 57(5):878-90. doi: 10.1007/s00125-013-3149-9.
- 10) Terashima T, Honda M, Kaneko S. (他 9 名、11 番目) P53, hTERT, WT-1, and VEGFR2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2014 63(5):479-89. doi: 10.1007/s00262-014-1529-8.
- 11) Shimakami T, Honda M, Kaneko S. (他 9 名、2 番目) The acyclic retinoid peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. *Sci Rep*. 2014 4:4688. doi: 10.1038/srep04688.
- 12) Honda M, Kaneko S. (他 12 名、1 番目) Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. *Hepatology*. 2014 59(3):828-38. doi: 10.1002/hep.26788.
- 13) Nishida N, Honda M, Mizokami M. (他 40 名、27 番目) New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. *PLoS One*. 2014 9(2):e86449. doi: 10.1371/journal.pone.0086449.
- 14) Zeng SS, Honda M, Kaneko S. (他 10 名、12 番目) The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2014 60(1):127-34. doi: 10.1016/j.jhep.2013.08.024.
- 15) Higashimoto M, Honda M, Kaneko S. (他 10 名、9 番目) Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression. *Eur J Immunol*. 2013 43(11):2956-68. doi: 10.1002/eji.201343531.
- 16) Miyahara K, Honda M, Yamamoto K. (他 21 名、13 番目) Pro-angiogenic cytokines for prediction of outcomes in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2013 109(8):2072-8. doi: 10.1038/bjc.2013.554.
- 17) Spaniel C, Honda M, Lemon SM. (他 5 名、2 番目) microRNA-122 Abundance in Hepatocellular Carcinoma and Non-Tumor Liver Tissue from Japanese Patients with Persistent HCV versus HBV Infection. *PLoS One*. 2013 8(10):e76867. doi: 10.1371/journal.pone.0076867.
- 18) Seki A, Honda M, Kaneko S. (他 11 名、7 番目) Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. *Hepatology*. 2013 58(3):1133-42. doi: 10.1002/hep.26470.
- 19) Shirasaki T, Honda M, Kaneko S. (他 10 名、2 番目) MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *J Virol*. 2013 87(9):5270-86. doi: 10.1128/JVI.03022-12.
- 20) Hodo Y, Honda M, Kaneko S. (他 11 名、2 番目) Association of Interleukin 28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. *Clin Cancer Res*. 2013 19(7):1827-37. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1641.
- 21) Yamashita T, Honda M, Kaneko S. (他 14 名、2 番目) Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013 57(4):1484-97. doi: 10.1002/hep.26168.
- 22) Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Wada T, Kaneko S. ER stress induced impaired TLR signaling and macrophage differentiation of human monocytes. *Cell Immunol*. 2013 282(1):44-52. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.04.006.
- 23) Honda M, Kaneko S. (他 7 名、1 番目) Peretinoin, an acyclic retinoid, improves the hepatic gene signature of chronic hepatitis C following curative therapy of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2013 13:191. doi: 10.1186/1471-2407-13-191.
- 24) Ueda T, Honda M, Horimoto K, Aburatani S, Saito S, Yamashita T, Sakai Y, Nakamura M, Takatori H, Sunagozaka H, Kaneko S. Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling. *Genomics*. 2013 101(4):238-48. doi: 10.1016/j.ygeno.2013.02.007.
- 25) Mizukoshi E, Fushimi K, Arai K, Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Expression of chondroitin-glucuronate C5-epimerase and cellular immune responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2012 32(10):1516-1526. doi: 10.1111/j.1478-3231.2012.02853.x.
- 26) Takeshita Y, Honda M, Kaneko S. (他 10 名、12 番目) Beneficial effect of branched-chain amino acid supplementation

on glycemic control in chronic hepatitis C patients with insulin resistance: Implications for type 2 diabetes. *Metabolism*. 2012 61(10):1388-94. doi: 10.1016/j.metabol.2012.03.011.

27) Okusaka T, Honda M, Sakata K. (他 17 名、17 番目) A randomized phase II trial of intra-arterial chemotherapy using SM-11355 (Miriplatin) for hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs*. 2012 30(5):2015-25. DOI: 10.1007/s10637-011-9776-4.

28) Nakamura M, Honda M, Ishibashi H. (他 77 名、16 番目) Genome-wide Association Study Identifies TNFSF15 and POU2AF1 as Susceptibility Loci for Primary Biliary Cirrhosis in the Japanese Population. *Am J Hum Genet*. 2012 91(4):721-728. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.08.010.

29) Okada H, Honda M, Kaneko S. (他 11 名、2 番目) Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. *Cancer Res*. 2012 72(17):4459-71. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0028.

30) Mizuno H, Honda M, Kaneko S. (他 4 名、2 番目) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in association with hTERT is a potential biomarker for hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2012 32(7):1146-55. doi: 10.1111/j.1478-3231.2012.02778.x.

31) Kaneko S, Honda M, Imai Y. (他 17 名、5 番目) Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. *Hepatol Res*. 2012 42(6):523-542. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.00981.x.

32) He D, Liu ZP, Honda M, Kaneko S, Chen L. Coexpression network analysis in chronic hepatitis B and C hepatic lesion reveals distinct patterns of disease progression to hepatocellular carcinoma. *J Mol Cell Biol*. 2012 4(3):140-52. doi: 10.1093/jmcb/mjs011.

33) Sawai H, Honda M, Tokunaga K. (他 32 名、15 番目) No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet*. 2012 13:47. doi: 10.1186/1471-2350-13-47.

34) Shindo H, Honda M, Enomoto N. (他 15 名、16 番目) Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. *Hepatol Int* 2012 6(2):482-490. doi: 10.1007/s12072-011-9306-7.

35) Sato Y, Honda M, Nakanuma Y. (他 6 名、7 番目) Induction of elastin expression

in vascular endothelial cells relates to hepatoportal sclerosis in idiopathic portal hypertension: possible link to serum anti-endothelial cell antibodies. *Clin Exp Immunol*. 2012 167(3):532-42. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04530.x.

36) Nakamura S, Kawai K, Takeshita Y, Honda M, Takamura T, Kaneko S, Matoba R, Matsubara K. Identification of blood biomarkers of aging by transcript profiling of whole blood. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 418(2):313-8. doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.018.

37) Nishida N, Honda M, Mizokami M. (他 33 名、15 番目) Genome-Wide Association Study Confirming Association of HLA-DP with Protection against Chronic Hepatitis B and Viral Clearance in Japanese and Korean. *PLoS One*. 2012;7(6):e39175. doi: 10.1371/journal.pone.0039175.

〔学会発表〕(計 6 件)

1) Shirasaki T, Honda M et al. LECT2 Specifically Induced by IL28B Regulates Interferon Response and HCV Replication. 21st International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses. 2014 年 9 月 9 日. The Fairmont Banff Springs Hotel (バンフ(カナダ)).

2) Honda M et al. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2013 年 11 月 5 日. Walter E. Washington Convention Center (ワシントン D.C. (USA)).

3) Honda M et al. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2013 年 10 月 8 日. Melbourne Convention and Exhibition Centre (メルボルン (オーストラリア)).

4) Honda M et al. Impaired infiltration of immune regulatory cells into liver lobules of chronic hepatitis C patients with interferon-resistant IL28B genotype. 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2012 年 11 月 11 日. Hynes Convention Center (ボストン(USA)).

5) 本多 政夫ほか. 次世代シーケンサーを用いた肝細胞癌の全エクソーム解析. 第 48 回日本肝臓学会総会. 2012 年 6 月 7 日 石川県立音楽堂 (石川県金沢市).

6) 本多 政夫ほか. 非環式レチノイド投

与に伴う肝組織遺伝子発現変化と肝線維化・発癌抑制機構. 第 98 回日本消化器病学会総会. 2012 年 4 月 20 日. 京王プラザホテル(東京都新宿区).

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 政夫 (HONDA, Masao)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号：00272980

(2) 研究分担者

堀本 勝久 (HORIMOTO, Katsuhisa)
独立行政法人産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター・副センター長
研究者番号：40238803

(3) 連携研究者

なし