慢性C型肝炎におけるインターフェロン抵抗性とIL28B の関連性についての検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 畑山, 祐輝 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/32434

金沢大学十全医学会雑誌　第121巻　第2号　76－77（2012）

【要約】

修士課程優秀論文

慢性C型肝炎におけるインターフェロン抵抗性とIL28Bの関連性についての検討

Analysis of relationship between Interleukin - 28B (IL28B) and Interferon resistance with Chronic Hepatitis C

金沢大学大学院医学系研究科恒常性制御学
（内科学第一）
畑　山　祐　輝

はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) は，フラビウイルス科ヘパシウイルス属に属するRNAウイルスである．感染すると慢性肝炎を引き起こし，肝硬変，肝細胞癌へと移行しやすく，我が国における肝細胞癌の原因の70%以上を占める．現在，慢性C型肝炎の治療にはペグインターフェロン＋リバビリンの併用療法が用いられるが，日本人に最も多いGenotype 1型高ウイルス量の症例ではウイルス根治が50%程度しか得られず，治療効果が低いのが問題となっている．

近年，インターフェロンの一種であるインターロイキン-28B (IL28B) 遺伝子及びその遺伝子周辺に存在する遺伝子多型 (SNPs) に関して，その危険遺伝子 (マイナーアレル) を持つHCV患者群は危険遺伝子を持たない (メジャーアレル) 患者群に比較して，危険率30倍以上の確率でペグインターフェロン＋リバビリン併用療法が無効になること，さらにマイナーアレル群ではIL28の発現が有意に低いことが明らかになった[1)2)3)]．

また，IL28Bとインターフェロン誘導遺伝子 (Interferon-stimulated Genes; ISGs) の関連についても指摘されており，マイナーアレル群の治療無効群において，治療前のISGsの発現がメジャーアレル群に比べ有意に高く，インターフェロン治療を行ってもISGsが誘導されず，ウイルス駆除に至らないことが報告されている[4)]．

IL28BはIFNλファミリーに属するサイトカインで，IFNλ3とも呼ばれる．19番染色体 (19q13) に存在し，IL28A (IFNλ2)，IL29 (IFNλ1) と近接しており末梢血単核球や樹状細胞から主に産生されるが，詳細な機能は不明である．そこで今回，IL28Bの機能解析をISGsの誘導を中心に行った．

結　　果

IL28BはJAK-STAT経路を介してISGsを誘導し，HCVの複製を抑える

インターフェロンによる抗ウイルス効果はJAK-STAT経路を通じてISGsを誘導することでもたらされる．そこでIFNαとIL28Bで抗ウイルス活性にどのような違いがみられるか，ヒト肝癌細胞株 (Huh7) を用いてSTATのリン酸化とMX1，OAS2をはじめとした抗ウイルス活性をもつISGsの発現に着目し実験を行った．ウエスタンブロットによるSTATのリン酸化の評価はp-STAT1 (Tyr 701) とp-STAT3 (Tyr 705) について検討した．IL28BはIFNαよりも早期にSTAT1をリン酸化するが，STAT3のリン酸化はIFNαよりも弱く，早く消失する．

Real-Time PCRにてISGsの発現を調べた．IFNαのISGsの発現ピークは投与後6時間後であるのに対し，IL28Bの発現ピークは24時間後と違いがみられ，IL28BのISGsの誘導はIFNαに比べて有意に低いことがわかった．IFNαとIL28Bを併用して投与した場合には，IFNα単独投与した場合と比べてISGsの発現が延長していることが確認された．STAT3の下流に存在するISGsのdown regulation factorであるSOCS3は，IFNαにより直ちに発現が誘導されるが，IL28B投与ではほとんど発現しなかった．

IFNαとIL28BはJAK-STAT経路を介し抗ウイルスにはたらくISGsを誘導する．そこでHCV感染状態にあるHuh7における抗ウイルス活性の違いの評価を行った．HCVサブゲノムレプリコンが恒常的に複製しているMH14Cを用い，IFNα単独投与，IFNαとIL28Bの併用投与したときには12時間後には強い抗ウイルス作用を発揮するが，IL28B単独投与したときは24時間後にウイルスの減少が確認できた．

IL28Bはヒト初代肝細胞において生体防御や各種代謝系に関与している

IL28Bの肝細胞における詳細な機能を解析するため，ヒト初代肝細胞を用いて，誘導される遺伝子，生物学的プロセスをDNAチップを用いて解析した．IL28Bにより発現が亢進した生物学的プロセスは，Interferon

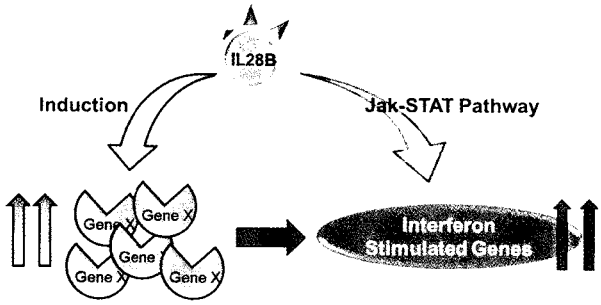

図1. IL28BはJak-STAT経路以外に遺伝子Xを介して間接的にISGsの発現を誘導している可能性が示唆された.

signaling, Innate immune response to RNA viral infection, Inflammasome, Antigen presentationなど生体防御に関するプロセスが有意に上昇していた. Inflammation, Interferon signalingやImmune responseなどIFNαによるそれと共通するものが多いが, これらのプロセスに関与する遺伝子群の誘導は有意に弱いことも確認できた. またIL28Bにより特異的に誘導される遺伝子として, 遺伝子Xを同定した. 本実験で遺伝子XはIFNαではほとんど誘導されず, IL28B投与後6時間, 12時間後に強く誘導された.

遺伝子XはISGsの発現に関与している

マウス由来遺伝子Xのプラスミドを Huh7にトランスフェクションし, 遺伝子X過剰発現モデルを作製し各種実験を行った. IFNα, IL28Bまたは併用投与を行い, 24時間後のISGsの発現量について検討した. いずれの系においてもISGsの発現量は, 遺伝子Xの過剰発現下では有意に増加する傾向がみられた. また, siRNAを用いて遺伝子Xをノックダウンし12時間後のISGsの発現量について検討した. 遺伝子Xをノックダウンするとの発現が有意に抑制された. これらの結果より, 遺伝子XはISGsの発現を誘導することが明らかとなった.

考　　察

IL28BはIFNαと同様にJAK-STAT経路を介し, ISGsの発現を誘導することで抗ウイルス活性を有することを明らかにした. またISGsの誘導はIFNαに比して弱く, 発現のピークも24時間後と遅れてくるという点が, IFNαと異なるということも明らかになった. 両者とも投与してまもなくSTAT1のリン酸化を起こすにもかかわらず, ISGsの誘導あるいは発現のピークがIFNαは6時間後, IL28Bは24時間後と大きく違うこと, またIFNαとIL28Bを併用投与したときのISGsの誘導はそれぞれの発現量に対して相乗的に増加しているなどの結果より, IL28BがJAK-STAT経路以外の経路に作用している可能性があると仮定し, DNAチップによる網羅的解析を試みた. DNAチップによる解析の結果, IL28Bにより発現が誘導された生物学的プロセスはIFNαと同様にInflammation, Interferon signalingやImmune responseなどIFNαによるそれと共通するものが多いが, これらのプロセスに関与する遺伝子群の誘導は有意に弱いことも確認できた. そこでIL28Bにのみ発現が誘導される遺伝子に注目し, 遺伝子Xを同定した. 遺伝子XはヒトIFNαではほとんど誘導されないが, IL28Bによって強く誘導される.

遺伝子XをHuh7に過剰発現させIFNα, IL28Bをこれまでと同様に処理しISGの発現量を評価した. IFNα, IL28B投与後24時間後のISGsの発現量は遺伝子X過剰発現状態では有意に上昇した. また遺伝子Xをノックダウンするとが抑制されることも確認された. このことから遺伝子XはIL28Bにより誘導され, ISGsの発現の調節に関与し, IFNαとIL28Bを併用投与することによりISGsの発現が相乗的に上昇する機序に遺伝子Xが関与する可能性が示唆された. IL28BはJak-STAT経路の他にも遺伝子Xを介してISGsを誘導することが明らかになった (図1).

結　　語

本研究によりIL28BはJak-STAT経路以外に, 異なるプロセスに作用しISGsを誘導している可能性が示唆された. IL28Bによる抗ウイルス機構を解明することにより, インターフェロン治療無効群における治療成績が改善されることが期待できる.

参 考 文 献

1) Tanaka Y, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nature Genetics. 2009 Oct; 41 (10): 1105-9

2) Ge D, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature. 2009 Sep 17; 461 (7262): 399-401

3) Suppiah V, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. 2009 Oct; 41 (10): 1100-4

4) Honda M, et al. Hepatic ISG Expression Is Associated With Genetic Variation in Interleukin 28B and the Outcome of IFN Therapy for Chronic Hepatitis C. Gastroenterology. 2010 Aug; 139 (2): 499-509

Profile

2009年3月　金沢大学医学部保健学科卒業
2012年3月　金沢大学大学院医学系研究科修士課程修了
2012年4月　鳥取大学医学部附属病院勤務