

令和元年5月17日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21058

研究課題名(和文)肝疾患におけるIFN 4の機能的役割の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms and biological, clinical significance of IFNL4

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：IFN 4の機能的役割や臨床学的意義について検討した。(1) 肝動注化学療法奏効例12例の肝組織IFN 4の発現は非奏効例8例のIFN 4発現より有意に高発現を示した。(2) IFN 4は他のIFNとは異なり非常に強い抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。また、IFN 4により特異的に誘導される遺伝子群を同定した。(3) これまでの解析からIFN 4特異的なレセプターの存在が示唆された。その新規候補レセプターとしてレセプターA及びBが新規レセプターであることを同定した。(4) NOD-SCIDマウスを用いたxenograftモデルにてIFN 4が抗腫瘍効果を示すことをin vivoで確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IFN 4の詳細な機能的役割の解明は、C型慢性肝炎の治療抵抗性の機序、持続感染、発癌機序の解明に繋がる。更に、本研究成果は、C型肝炎のみならず、種々の感染症、感染免疫、病態形成、発癌、抗癌作用等の研究に重要な情報を提供できるため学術的にも大いに意義がある。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms and the biological, clinical significance of IFN 4 is poorly understood.

(1) We examined the expression of IFN 4 in patients' samples and evaluated its clinical significance. Hepatic IFN 4 expression is related to the response to the chemotherapy to advanced HCC. (2) We revealed that IFN 4 has functional roles quite different from other IFNs. We revealed that IFN 4 has a strong anti-viral activity and has a strong anti-tumor activity. We identified IFN 4-dependent gene expression patterns that support the specific phenotype of IFN 4. (3) We identified new IFN 4 receptors; A and B. Detailed signaling pathway down streaming of receptor A and B are now under investigating. (4) Anti-tumor activity of IFN 4 in vivo was evaluated by using xenograft model to NOD-SCID mice. IFN 4 expressing HepG2 cells established significant small tumors compared to the control tumors or IFN 3 expressing tumors.

研究分野：肝臓病学

キーワード：IFN 4 ウイルス 感染症 癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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、肝癌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 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) 本研究は IFN 4 に着目する。近年、IFN 3 周辺に存在する SNP を有する患者群で IFN 4 という未知の遺伝子が新たに発見された (Nature Genetics, 2012)。この新発見の遺伝子は IFN ファミリーの一員であり抗ウイルス活性を有するタンパク質をコードする。しかしながら、その機能的役割、生物学的意義、臨床学的意義についてはほとんど理解されていない。

(3) IFN 4 の発現プラスミドを構築し HCV 感染培養細胞に導入した結果、IFN 4 は IFN や IFN 3 よりも少ない ISGs 誘導で IFN や IFN 3 同等以上の抗ウイルス活性を示した。更に、肝癌細胞株に抗癌剤と IFN 及び抗癌剤と IFN 4 を処置し抗腫瘍効果を検討した結果、IFN 4 と抗癌剤の併用が最も強い抗腫瘍効果を示した。このことは、IFN 4 は独自の機能的役割を有していること示唆する。

2. 研究の目的

IFN 4 の詳細な機能解析から、C 型慢性肝炎の治療抵抗性の機序、持続感染、発癌機序の解明に繋げる基礎的研究を行うことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

IFN 4 の機能的役割を培養細胞、マウス、臨床サンプルを用いた研究から解明する。

(1) IFN 4 リコンビナントタンパク質を作成し、肝細胞に処置する。次世代シーケンス解析により、IFN 4 特異的な機能的役割を IFN , IFN 3 との相違を焦点において解析する。同時に IFN 4 のレセプターを同定する。

(2) 肝疾患肝組織の IFN 4 をリアルタイム PCR 法で定量し、臨床学的意義を解明する。

(3) 様々な肝癌誘発モデルマウスや xenograft モデルマウスを作成し、IFN 4 と抗癌剤を併用することで IFN 4 の抗腫瘍効果及びその作用機序を解明する。

4. 研究成果

(1) IFN 4 の新規シグナル伝達経路の解明

IFN 4 は IFN よりも少ない ISGs の誘導にも関わらず、IFN 同等の抗 HCV 活性を示すことを明らかにした。また、IL28B よりも抗 HCV 活性を示した。IFN 4 の抗ウイルス活性は HCV のみならず、HBV やインフルエンザウイルスにおいても IFN 同等以上の効果を示した。興味深いことに、IFN 4 は抗ウイルス活性のみならず、他の IFN とは異なり非常に強い抗腫瘍活性を示すことも本研究で明らかにした。その作用機序として、IFN 4 は他の IFN とは異なり、JNK-ATF2 シグナルを活性化することを見出した。これらの結果から、IFN 4 は IFN 4 特異的なシグナル伝達経路を有していることが示唆された。そこで、各種 IFN (IFN , IL28B, IFN 4) のリコンビナントタンパク質をヒト初代肝細胞にそれぞれ処置した後、次世代シーケンス解析を行った。その結果、IFN 4 により特異的に誘導される遺伝子群を同定した。IFN 4 は 179 個のアミノ酸によるタンパク質であるが、それ以外にも 107 アミノ酸、130 アミノ酸、170 アミノ酸を有する isoform が存在する。本研究では、これら isoform の発現系を構築しその表現系も検討した。その結果、これら isoform は IFN 4 とは異なり、ISGs の誘導、抗ウイルス作用には関与しないことが分かった。しかし、これら isoform は抗腫瘍活性を有していた。

(2) 臨床サンプルにおける IFN 4 の発現解析から臨床学的意義を解明

DAA 治療例 150 例の治療成績は SVR141 例 (94.1%)、non-SVR9 例 (5.9%) であった。non-SVR9 例中、IL28B メジャーは 3 例、マイナーは 6 例であった。IL28B マイナー 6 例と肝生検組織が得られており臨床背景がマッチする SVR11 例を選出し肝組織の IFN 4 及び ISGs を測定した。その結果、SVR11 例と non-SVR6 例との肝組織中の ISGs 発現量には有意差を認めなかった。しかし、肝組織の IFN 4 の発現は non-SVR6 例で有意に発現上昇していた。このことから、肝組織の IFN 4 の発現は LDV/SOF 治療例の治療成績と関連していることが示唆された。また、肝動注化学療法が施行された肝癌症例の解析を行った。肝動注化学療法奏効例 12 例の肝組織 IFN 4 の発現は非奏効例 8 例の IFN 4 の発現に比し有意に高発現を示した。

(3) IFN 4 のレセプターの解明

これまでの報告では IFN 4 レセプターは IL28B (IFN 3) と同じ IL28R と IL10R のヘテロダイマーを介してシグナル伝達すると報告されており、それ以外の伝達経路は存在しないと報

告されている。しかし、本研究のこれまでの解析から IFN γ 特異的なレセプターの存在が示唆された。その新規候補レセプターとしてタイプ II サイトカインレセプターに対する siRNA スクリーニングを行いレセプター A 及び B が新規レセプターであることを同定した。レセプター A をノックダウンすると IFN γ による p-STAT1 の発現誘導が消失した。一方、レセプター B をノックダウンすると p-STAT1 の誘導は保たれるものの JNK-ATF2 シグナルの活性化が抑制された。IFN γ の新規レセプター A 及びレセプター B の下流のシグナルを解析することにより IFN γ の新たな機能的役割が明らかとなることが期待される。

(4) IFN γ を用いた癌治療への応用を目指した研究

HepG2 細胞に IFN γ , IL28B, IFN γ を過剰発現させた細胞を樹立し NOD-SCID マウスに xenograft した。IFN γ は IFN γ と同程度の強い抗腫瘍効果を示した。IFN γ は免疫不全マウスにおいても抗腫瘍効果が認められた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Shirasaki T, Honda M, Yamashita T, Nio K, Shimakami T, Shimizu R, Nakasyo S, Murai K, Shirasaki N, Okada H, Sakai Y, Sato T, Suzuki T, Yoshioka K, Kaneko S. The osteopontin-CD44 axis in hepatic cancer stem cells regulates IFN signaling and HCV replication. *Sci Rep*. 2018 Sep 3;8(1):13143.

DOI: 10.1038/s41598-018-31421-6 査読有り

Murai K, Shimakami T, Welsch C, Shirasaki T, Liu F, Kitabayashi J, Tanaka S, Funaki M, Omura H, Nishikawa T, Sumiyadorj A, Honda M, Kaneko S. Unexpected Replication Boost by Simeprevir for Simeprevir-Resistant Variants in Genotype 1a Hepatitis C Virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Jun 26;62(7).

DOI: 10.1128/AAC.02601-17 査読有り

Funaki M, Kitabayashi J, Shimakami T, Nagata N, Sakai Y, Takegoshi K, Okada H, Murai K, Shirasaki T, Oyama T, Yamashita T, Ota T, Takuwa Y, Honda M, Kaneko S. Peretinoin, an acyclic retinoid, inhibits hepatocarcinogenesis by suppressing sphingosine kinase 1 expression in vitro and in vivo. *Sci Rep*. 2017 Dec 5;7(1):16978.

DOI: 10.1038/s41598-017-17285-2 査読有り

Suda T, Shimakami T, Shirasaki T, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Reactivation of hepatitis B virus from an isolated anti-HBc positive patient after eradication of hepatitis C virus with direct-acting antiviral agents. *J Hepatol*. 2017 Nov;67(5):1108-1111.

DOI: 10.1016/j.jhep.2017.07.014 査読有り

Hayashi T, Yamashita T, Okada H, Oishi N, Sunagozaka H, Nio K, Hayashi T, Hara Y, Asahina Y, Yoshida M, Hashiba T, Suda T, Shirasaki T, Igarashi Y, Miyanouchi K, Yamashita T, Honda M, Kaneko S. A Novel mTOR Inhibitor; Anthracimycin for the Treatment of Human Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res*. 2017 Jul;37(7):3397-3403.

DOI: 10.21873/anticancerS.11706 査読有り

Okada H, Takabatake R, Honda M, Takegoshi K, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Sakai Y, Shimakami T, Nagata N, Takamura T, Tanaka T, Kaneko S. Peretinoin, an acyclic retinoid, suppresses steatohepatitis and tumorigenesis by activating autophagy in mice fed an atherogenic high-fat diet. *Oncotarget*. 2017 Jun 20;8(25):39978-39993.

DOI: 10.18632/oncotarget.18116 査読有り

Tajima-Shirasaki N, Ishii KA, Takayama H, Shirasaki T, Iwama H, Chikamoto K, Saito Y, Iwasaki Y, Teraguchi A, Lan F, Kikuchi A, Takeshita Y, Murao K, Matsugo S, Kaneko S, Misu H, Takamura T. Eicosapentaenoic acid down-regulates expression of the selenoprotein P gene by inhibiting SREBP-1c protein independently of the AMP-activated protein kinase pathway in H4IIEC3 hepatocytes. *J Biol Chem*. 2017 Jun 30;292(26):10791-10800.

DOI: 10.1074/jbc.M116.747006 査読有り

Takegoshi K, Honda M, Okada H, Takabatake R, Matsuzawa-Nagata N, Campbell JS, Nishikawa M, Shimakami T, Shirasaki T, Sakai Y, Yamashita T, Takamura T, Tanaka T, Kaneko S. Branched-chain amino acids prevent hepatic fibrosis and development of hepatocellular carcinoma in a non-alcoholic steatohepatitis mouse model. *Oncotarget*. 2017 Mar 14;8(11):18191-18205.

DOI: 10.18632/oncotarget.15304 査読有り

Murata K, Asano M, Matsumoto A, Sugiyama M, Nishida N, Tanaka E, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N, Shirasaki T, Honda M, Kaneko S, Gatanaga H, Oka S, Kawamura YI, Dohi T, Shuno Y, Yano H, Mizokami M. Induction of IFN- λ 3 as an additional effect of nucleotide, not nucleoside, analogues: a new potential target for HBV infection. *Gut*. 2016 Oct 27. pii: gutjnl-2016-312653.

DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312653 査読有り

Liu F, Shimakami T, Murai K, Shirasaki T, Funaki M, Honda M, Murakami S, Yi M, Tang H, Kaneko S. Efficient Suppression of Hepatitis C Virus Replication by Combination Treatment with miR-122 Antagonism and Direct-acting Antivirals in Cell Culture Systems. Sci Rep. 2016 Aug 3;6:30939.

DOI: 10.1038/srep30939 査読有り

〔学会発表〕(計5件)

Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Kazuhisa Murai, Tetsuro Shimakami, Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Shuichi Kaneko. A liver-derived secretory protein, LECT2, enhances the innate immune response and suppresses RIG-I mediated virus infection. 69th AASLD The Liver Meeting, San Francisco, USA, 2018

Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Kazuhisa Murai, Tetsuro Shimakami, Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Shuichi Kaneko. A liver-derived secretory protein, LECT2, enhances the innate immune response and suppresses HCV replication. 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, ICIS 2017, Kanazawa, Japan, 2017

Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Rika Horii, Tetsuro Shimakami, Kazuhisa Murai, Ryogo Shimizu, Shuichi Kaneko. Differential microRNA expression in the liver during the advanced stage of chronic hepatitis C. 24th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, Cape cod, USA, 2017

Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Kazuhisa Murai, Tetsuro Shimakami, Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko. A liver-derived secretory protein, LECT2, enhances the innate immune response and suppresses HCV replication. 67th AASLD The Liver Meeting, Boston, USA, 2016

Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Kazuhisa Murai, Tetsuro Shimakami, Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko. A liver-derived secretory protein, LECT2, enhances the innate immune response and suppresses HCV replication. 23rd International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, Kyoto, Japan, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 抗癌作用増強剤及び癌治療支援方法

発明者: 金子周一、本多政夫、白崎尚芳

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-216168

出願年: 平成 28 年

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://lab-science.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。