

厚生労働科学研究費補助金 (B型肝炎創薬実用化等研究事業)
分担研究報告書 (平成 25 年度)

B型肝臓における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

分担研究者：横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院消化器・腎臓内科学・教授
研究協力者：神田 達郎 千葉大学大学院医学研究院消化器・腎臓内科学・講師
中本 晋吾 千葉大学大学院医学研究院分子ウイルス学・助教

分担研究課題：肝発癌における自然免疫関与の解析

研究要旨：慢性B型肝炎の進展には自然免疫および獲得免疫の両者が重要であることが知られている。特にToll-like receptor (TLR), サイトカイン, インターフェロンシグナル伝達経路を含む自然免疫は特に重要と考えられている。我々はこれまでにB型肝炎ウイルス(HBV)とReceptor-Interacting Serine/Threonine Protein Kinase 2 (RIPK2)の相互作用について報告してきた。今回の研究では肝細胞においてHBV増殖はNF- κ B活性化を誘導し、この作用はTNFおよびIL1 β で増強することを明らかにした。一方、TNFやIFN α でRIPK2の発現を増強させると、HBV増殖は抑制された。RIPK2はHBV増殖に関与し、HBV増殖抑制の一つの標的分子となり得る可能性が示唆された。またHBV増殖と関連してTLR関連microRNAの発現に変化がみられ、HBVはmicroRNAを介して自然免疫に影響を与えている可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでに、我々は HBV HBe 抗原が Receptor-Interacting Serine/Threonine Protein Kinase 2 (RIPK2)と相互作用し RIPK2 の発現を抑制することにより各種サイトカイン産生を抑制することを報告してきた(Wu et al. J Infect Dis 2012)。また肝細胞においてTNFはRIPK2を誘導することも報告してきた。今回 RIPK2 の発現と HBV 増殖の関連について検討した。また HBV 感染における microRNAs (miRNAs)の関連についても検討した。

B. 研究方法

- 1) Western blotting にて各種肝細胞におけるサイトカイン受容体 TNFR1, TNFR2, IL1R1, ILR2 の発現を蛋白レベルで確認した。
- 2) ヒト肝細胞 TPH1 および Huh7 に NF- κ B レポーターベクターおよび HBV 発現ベクターを共に細胞内遺伝子導入した後、TNF および IL1 β を添加しその活性化に対する影響をルシフェラーゼアッセイにより

検討した。

- 3) HepG2.2.15 細胞をインターフェロン α (10,00IU/mL), TNF (100 ng/mL)で刺激後、120 時間での細胞内 RIPK2 mRNA レベルと Conditioned Medium および細胞内 HBV DNA 量を比較検討した。
- 4) HBV 感染増殖と miRNA 発現状態との関連を調べるため、HepG2 および HepG2.2.15 細胞で 1008 種類の miRNAs について real-time PCR によりその発現を網羅的に比較検討した。

(倫理面への配慮) 血清の解析に関しては千葉大学医学部倫理委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。また、一般論として弱者、女性、少数民族の疫学調査等を行う場合は倫理上十分配慮している。

C. 研究結果

- 1) ヒト肝細胞 HepG2, HepG2.2.15, Huh7, TPH1 において TNF および IL1 β に対する

受容体 TNFR1, TNFR2 および IL1R1,

ILR2 の発現を蛋白レベルで確認した.

2) ヒト肝細胞 Huh7 および TPH1 では HBV により NF- κ B は活性化された (3.2-fold)が, TNF (8.6-fold, $p < 0.05$) または IL1 β (8.0-fold, $p < 0.05$) により Cooperative effects がみられ, 更なる増加がみられた.

3) HepG2.2.15 細胞をインターフェロン α , または TNF 刺激すると, 細胞内 RIPK2 の発現は増加し (2.1~2.6-fold), Conditioned Medium 中 (0.03~0.05-fold) および細胞内 HBV DNA (0.21~0.38-fold) の発現減少がみられた.

4) 1008 種類の miRNAs の内, HepG2 と比較し, HepG2.2.15 で少なくとも 30 種類 (2.9%) の miRNAs で 5 倍以上の発現増加を認めた. HepG2.2.15 細胞で 5 倍以上の発現増加を認めた miRNA のうち 7 miRNAs (miR-200b-3p, miR-148a-3p, miR-145-5p, miR-146b-5p, miR-200c-3p, miR-455-3p, miR-455-5p) は TLR 伝達経路関連 miRNAs として既に報告されていた. HepG2.2.15 細胞で 5 倍以上の発現低下を認めた 35 miRNA (3.4%) のうち, 8 miRNAs (let-7e-5p, let-7a-3p, let-7i-3p, let-7a-5p, let-7d-5p, let-7i-5p, miR-132-3p, let-7b-5p) も TLR 伝達経路関連 miRNAs として既に報告されていた.

D. 考察

一般に, B 型慢性肝炎では血中炎症性サイトカイン TNF や IL1 β の増加がみられることが報告されている. 肝細胞ではそれぞれに対する受容体が発現しており, HBV は NF- κ B を活性化し, この効果は TNF や IL1 β といった炎症性サイトカインで増強されることが明らかになった.

近年 RIPK2 ノックアウトマウスでインフルエンザ感染症の重篤化が観察されている (Lupfer et al. Nat Immunol 2013). 今回我々の研究により, インターフェロン α や TNF は肝細胞において RIPK2 を発現増加させ, 肝細胞内および Conditioned Medium 中の HBV DNA レベルを低下させ

ることが明らかとなった.

一方これまでに, C 型肝炎ウイルスでは microRNA miR-122 や miR-130a が重要であり, HIV 感染症でも miRNA が持続感染に関与していることが報告されている. 今回我々の検討から, 慢性 HBV 持続性感染でも miRNAs が宿主免疫反応を修飾し重要な役割をしている可能性が改めて示唆された.

E. 結論

RIPK2 は HBV の増殖複製に関与し, HBV 治療薬の一つの標的である可能性が示唆された. また HBV 感染期間中に miRNAs の発現状態が変化し, HBV 感染に対する自然免疫が変化することが示唆され, HBV 感染症において miRNAs が重要であると考えられた.

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kanda T, Jiang X, Nakamoto S, Nakamura M, Miyamura T, Wu S, Yokosuka O. Different effects of three interferons L on Toll-like receptor-related gene expression in HepG2 cells. Cytokine 64(2): 577-83, 2013.

2) Jiang X, Kanda T, Tanaka T, Wu S, Nakamoto S, Imazeki F, Yokosuka O. Lipopolysaccharide blocks induction of unfolded protein response in human hepatoma cell lines. Immunol Lett 152(1): 8-15, 2013.

3) Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Jiang X, Miyamura T, Nakatani SM, Ono SK, Takahashi-Nakaguchi A, Gono T, Yokosuka O. Prevalence of hepatitis C virus subgenotypes 1a and 1b in Japanese patients: ultra-deep sequencing analysis of HCV NS5B genotype-specific region. PLoS One 8(9): e73615, 2013.

4) Miyauchi T, Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Kato K, Arai M, Mikami S, Sugiura N, Kimura M, Goto N, Imazeki F, Yokosuka O. Efficacy of lamivudine or entecavir against

virological rebound after achieving HBV DNA negativity in chronic hepatitis B patients. *Int J Med Sci* 10(6): 647-52, 2013.

5) Kamezaki H, Kanda T, Arai M, Wu S, Nakamoto S, Chiba T, Maruyama H, Fujiwara K, Kanai F, Imazeki F, Nomura F, Yokosuka O. Adherence to medication is a more important contributor to viral breakthrough in chronic hepatitis B patients treated with entecavir than in those with Lamivudine. *Int J Med Sci* 10(5): 567-74, 2013.

6) Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamura M, Miyamura T, Nakamoto S, Banerjee A, Yokosuka O. Regulation of miRNA by HBV infection and their possible association with control of innate immunity. *World J Gastroenterol* 2014 (in press).

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特になし