HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Hepatitis B virus x protein impairs alpha interferon signaling through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3 and protein Phosphatase 2A [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	常松, 聖司
Description	配架番号：2220
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12116号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61819
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Seiji_Tsunematsu_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　常松　聖司

学 位 論 文 題 名

Hepatitis B virus x protein impairs alpha interferon signaling through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3 and protein Phosphatase 2A

（HBx 蛋白は SOCS3 及び PP2A の発現亢進を介してインターフェロンシグナルを阻害する）

【背景と目的】B 型肝炎ウイルス（HBV）は慢性肝炎や肝硬変の主因であり、肝細胞癌の主要な原因疾患の一つである。現在、全世界に 4 億人の保有者が推定されており世界的に重大な問題とされている感染症である。B 型慢性肝炎の治療には大きく、インターフェロン療法と核酸アナログ療法が存在する。本邦でも核酸アナログの一つであるエンテカビルが多くの慢性 B 型肝炎患者へ使用されているが、核酸アナログ製剤には耐性ウイルス，投与期間，妊孕性への影響などの問題が存在し，依然としてインターフェロン療法は B 型慢性肝炎の重要な治療選択肢の一つである。インターフェロン療法は長期的な発がん抑制などの利点が報告されているが、その奏功率は十分でない。インターフェロン療法が十分に奏功しない原因として、HBV が他の慢性感染を起こすウイルスと同様にインターフェロン伝達系に対して抑制的に働くメカニズムを有している事が想定されている。インターフェロン伝達系を抑制する HBV の機構を明らかにすることは、インターフェロン療法の治療効果を改善するために重要である。我々は、多機能蛋白である Hepatitis B virus X（HBx）に着目し HBV のインターフェロン伝達系に対する影響について検討を行った。

【方法と結果】HepG2 細胞に HBV 発現プラスミドのトランスフェクションを行い、インターフェロンを複数の濃度で投与した。投与後に Hepatitis B surface （HBs）抗原及び Hepatitis B early（HBe）抗原量の測定を行ったところ、インターフェロンの濃度依存性に HBs 抗原及び HBe 抗原の低下が認められ、インターフェロンは HBV の複製を抑制した。次に、HepG2 細胞にレトロウイルスを用いて HBx を導入し、HBx 発現細胞を作成した。HBx とインターフェロン抵抗性との関係を見るため、HBx 発現細胞に HBV 発現プラスミドのトランスフェクションを行い、インターフェロンで刺激を与え、培養上清中の HBs 抗原を測定した。コントロール細胞と比して HBx 発現細胞では培養上清中の HBs 抗原量の低下が乏しく、HBx 発現細胞がインターフェロン抵抗性を有していることが想定された。HBx 発現細胞のインターフェロン抵抗性の機序を検討する為に、インターフェロン伝達系の最下流である Interferon stimulated gene（ISG）のインターフェロン投与時の発現について検討を行った。HBx 発現細胞にインターフェロンを投与し、リアルタイム PCR 法で 2′-5′ OAS（2'-5'-oligoadenylate synthetase）及び PKR（protein kinase R）の発現について検討を行ったところ、HBx 発現細胞では ISG の発現が抑制されていた。次に、インターフェロンシグナルの上流である STAT1 のリン酸化についてウエスタンブロット法で検討を行ったところ、HBx 発現細胞では STAT1 のリン酸化が抑制されていた。HBx 発現細胞における STAT1 リン酸化及び ISG の発現の抑制というインターフェロン伝達系の抑制機序を明らかにするために、HBx 発現細胞における既知の負の調節因子について、RNA レベルでの発現量についてリアルタイム PCR 法で確認した。HBx 発現細胞ではコントロール細胞と比較して SOCS3（Suppressor of cytokine signaling 3）及び PP2A（protein phosphatase 2A）の発現量が有意に高かった。次に、ウエスタンブロット法で蛋白レベルでの SOCS3 及び PP2A の発現を確認した。その結果 HBx 発現細胞では SOCS3 及び PP2A の発現が亢

進しているという結果であった。SOCS3 及び PP2A が HBx 発現細胞でインターフェロン抵抗性に寄与する分子であるかを明らかにするため、siRNA を用いてこれらの発現を抑制するという実験を行った。SOCS3 及び PP2A に対する siRNA を用いて HBx 発現細胞における発現抑制を行った。発現抑制を行った HBx 発現細胞に対してインターフェロンで刺激を与え、インターフェロン伝達系の最下流である ISG の測定を行った。インターフェロン刺激後の細胞内 ISG の発現は si-RNA により SOCS3, PP2A の発現を抑制する事により改善が認められた。次に、HBx 発現細胞における SOCS3 及び PP2A の発現亢進の機序を探ることとした。肝炎ウイルス領域において SOCS3 と STAT3 活性化との関係、PP2A と小胞体ストレスとの関連が報告されているため、HBx 発現細胞における、STAT3 のリン酸化及び小胞体ストレスマーカーとして Binding Protein (BiP)の発現量をウエスタンブロット法で測定することとした。結果は、HBx 発現細胞では細胞内の STAT3 のリン酸化の亢進、BiP の発現亢進が認められた。次に、高い HBV 産生能をもつ HepG2.2.15.7 細胞を用いて、HBx の発現抑制がインターフェロン感受性に関連するかどうかの実験を行った。siRNA を用いて HBx の発現抑制を行ったところ、HBx の発現低下とともに、SOCS3 及び PP2A の発現低下が認められた。加えて、インターフェロンで刺激を与えたところ、インターフェロンに誘導された ISG の発現は HBx 発現抑制細胞で改善が認められた。臨床的な肝内での SOCS3 及び PP2A の発現を調べるために、B 型肝炎患者の凍結標本から RNA を抽出しリアルタイム PCR 法を用いて SOCS3 及び PP2A の定量を行った。B 型慢性肝炎検体では SOCS3 及び PP2A の発現が亢進していることが確認された。

【考案】HBx が STAT3 リン酸化を介して SOCS3 の発現亢進を導き、インターフェロン伝達系の STAT1 リン酸化を阻害することによりインターフェロン伝達系を阻害すること、小胞体ストレスを介して PP2A 発現亢進を導くことによりインターフェンロン伝達系に抑制的に働くことが考えられた。また、HBV 全長ゲノム存在下でも HBx 発現を抑制することによりインターフェロン抵抗性を改善できる可能性が示唆された。このように HBx が SOCS3、PP2A 発現亢進、その機序を示した報告は初めてであった。

【結論】HBx は STAT3 リン酸化を介して SOCS3 の発現亢進を導き、また小胞体ストレスを介して PP2A 発現亢進を導くことによりインターフェロン伝達系を抑制する。HBx はインターフェロン治療抵抗性を解除し、より効率的な治療を行うための手がかりとなる可能性がある。