



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 entire text]
Author(s)	常松, 聖司
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2220 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/61822
Type	doctoral thesis
File Information	Seiji_Tsunematsu_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

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)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

常松 聖司

【背景と目的】B型肝炎ウイルス（HBV）は全世界で4億人の感染者が存在する。HBVと関連した肝臓病により年100万人もの人が死亡しており、世界的な問題となる感染症である。しかし、東ヨーロッパ、アジア、アフリカ、中東、太平洋諸島などの高流行地域からの移民ではHBV関連の肝細胞癌の有病率が高く、予防・治療におけるグローバルな対策は十分ではない。慢性B型肝炎に対する治療はインターフェロン療法と核酸アナログ療法（entecavir, lamibudine）という機序の異なる二つの薬剤のみが臨床では用いられている。核酸アナログ製剤は、HBV自身がコードするポリメラーゼを特異的に阻害することによりマイナス鎖及びプラス鎖DNAの合成を強力に抑制する。HBV複製過程を強力に抑制することにより血中のDNA量は速やかに低下し、肝機能異常も改善する。しかし、従来の核酸アナログ製剤は胎児への影響については否定できないというカテゴリーとなっており使用に制限がある。加えて、核酸アナログ製剤のHBV感染細胞を排除する作用は弱く、HBe抗原陰性化が認められた症例であっても、投与の休止で高頻度にウイルスの増殖が認められ、肝炎が再燃するという問題が存在する。もう一つが、自然免疫系で重要な働きを示すインターフェロンを外的に加え免疫系を賦活する治療である。ウイルスなど外的異物はToll-like receptor (TLR)で感知され、Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1)を介して、内因性のインターフェロンが分泌される。この内因性のインターフェロンや、治療により投与された外因性のインターフェロンは細胞膜のI型 Interferon Receptor (IFNR)に結合することにより作用する。受容体にインターフェロンが結合すると、チロシン型蛋白リン酸化酵素であるJAK1が活性化され、Signal transducers and activators of transcription (STAT) 1のリン酸化が引き起こされる。その結果、2量体の形成が起こり核内に情報が伝達される。核内に情報が伝達されると、Interferon stimulated gene (ISG)が誘導される。ISGにはProtein kinase R (PKR)、2'-5'-oligoadenylate synthetase (2'-5'OAS)などが存在し、これらの発現の結果、ウイルスタンパク質の翻訳抑制やRNaseL活性化によるウイルスのRNA分解など抗ウイルス効果が誘導される。インターフェロン療法の利点は認知されているものの、有効な治療反応が得られない症例も存在する。70%の症例で有効な効果が得られなかったとする報告もあり、HBV自体がインターフェロン治療抵抗性を惹起している可能性が想定されている。その為、インターフェロンの作用をどのような機序でB型肝炎ウイルスが減弱しているかを知る事は、インターフェロン治療をより効果的に行う事だけでなく、HBVが持つ慢性感染を成立させる為の機構を明らかにする事にも貢献できると予想される。近年、B型肝炎ウイルスx蛋白（HBx蛋白）が自然免疫系に対して抑制的に働くことが報告された。HBx蛋白は転写、シグナル伝達、細胞周期の調節、蛋白分解、アポトーシス、DNA安定性などに働く多機能の蛋白である事が報告されている。Wei, Cらは、HBx蛋白がMitochondrial antiviral signalingを抑制することにより、RIG-1シグナルを阻害する事を報告した。すなわち、HBx蛋白は、TLRから誘導される内因性インターフェロン産生の抑制する機能を有する。しかし、HBx蛋白が治療などによる外因性インターフェロンを含めたインターフェロン伝達系に及ぼす影響については未だ十分に示されていない。今回我々は、多機能蛋白であるHBx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】(1)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 72 時間後の HBs 抗原及び 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た。(2)レトロウイルスを用いて HBx 恒常発現 HepG2 細胞 (HepG2/HBx 細胞) を作成した。コントロールとして特定の遺伝子を発現しないレンチウイルスを導入した細胞も同時に作成した (HepG2/Empty 細胞)。これらの細胞の HBx 蛋白発現はウエスタンブロット法で確認した。次に HBx 発現細胞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 発現プラスミドをトランスフェクションし、その後インターフェロンを複数の濃度 (0,1,10 IU/ml) で刺激を与え、培養上清中の HBs 抗原を測定した。HepG2/Empty 細胞と比して HepG2/HBx 細胞では培養上清中の HBs 抗原量の低下が乏しく、HepG2/HBx 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。(3)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 ISG (Interferon stimulated gene) 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。HepG2/HBx 細胞及び HepG2/Empty 細胞にインターフェロンを投与し、投与前及び投与 8 時間後に細胞から total RNA を抽出し、逆転写を行い cDNA 作成後にリアルタイム PCR 法で、2' -5' OAS 及び PKR の発現について検討を行った。結果、HepG2/HBx 細胞では HepG2/Empty 細胞と比較して 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検討を行った。インターフェロンを 50IU/ml で投与し、投与後 1,2 時間後に細胞から蛋白を取り出し、ウエスタンブロット法で確認したところ、HepG2/HBx 細胞では HepG2/Empty 細胞と比較して STAT1 のリン酸化が抑制されていた。(4)HBx 発現細胞における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、既知のインターフェロン伝達系の負の調節因子について検討を行った。HepG2/HBx における SOCS1、SOCS3、PP2A、PIAS、IFNR、Tyk2 の 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。結果は HepG2/HBx 細胞では HepG2/Empty 細胞と比較して SOCS3 及び PP2A の発現量が有意に高かった。ウエスタンブロット法においても、HepG2/HBx 細胞では HepG2/Empty 細胞と比較して SOCS3 及び PP2A の発現が亢進しているという結果であった。(5)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 に対する 2 つの siRNA を用いて HepG2/HBx 細胞における SOCS3 の発現抑制を行った。発現抑制は siRNA 導入後に回収した total RNA を用いたリアルタイム PCR 法で確認し、SOCS3 の発現抑制を行った HepG2/HBx 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。結果はインターフェロン刺激後の細胞内 ISG の発現は SOCS3 の発現抑制により改善が認められた。同様の実験を PP2A についても行った。PP2A の発現抑制及び ISG の改善が SOCS3 同様に認められた。(6)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。

HepG2/HBx 細胞及び HepG2/Empty 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) の発現量をウェスタンブロット法で測定することとした。結果は、HepG2/HBx 細胞では HepG2/Empty 細胞と比較して、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。(7)HepG2.2.15 細胞は世界的に用いられている HBV 産生細胞株であるが、Wakita らはこの細胞株からシングルセルクローニングを行うことにより、より高い HBV 産生能をもつ HepG2.2.15.7 細胞を作成した。この HepG2.2.15.7 細胞を用いて、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。次にこれらの細胞に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。(8)我々は、実際の B 型肝炎患者の肝内での SOCS3 及び PP2A の発現を調べるために、患者本人の同意が得られている肝生検検体を用いて研究を行った。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。コントロール群と比較して、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。