

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 肝炎等克服緊急対策研究事業

(英語) Program for Basic and Clinical Research on Hepatitis

研究開発課題名：(日本語) IFN $\lambda$ 4の機能的役割の解明及び新規診断法・治療法の開発

(英語) Functional analysis of IFN $\lambda$ 4 and the development of new diagnostic methods and the therapy

研究開発担当者 (日本語) 金沢大学医薬保健研究域保健学系 教授 本多 政夫

所属 役職 氏名：(英語) Faculty of Health Sciences, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, Professor, Masao Honda

実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) IFN $\lambda$ 4の臨床学的意義の解明

開発課題名：(英語) Elucidation of clinical significances of IFN $\lambda$ 4

研究開発分担者 (日本語) 金沢大学附属病院地域医療教育センター 特任教授 島上 哲朗

所属 役職 氏名：(英語) Center for Education in Community Medicine, Kanazawa University Hospital, Project Professor, Tetsuro Shimakami

分担研究 (日本語) IFN $\lambda$ 4の機能解析

開発課題名：(英語) Elucidation of the functional role of IFN $\lambda$ 4

研究開発分担者 (日本語) 金沢大学医薬保健研究域保健学系 助教 白崎 尚芳

所属 役職 氏名：(英語) Faculty of Health Sciences, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, Assistant professor, Takayoshi Shirasaki

分担研究 (日本語) IFN $\lambda$ 4の大量精製・結晶化・X線構造解析

開発課題名：(英語) Expression, purification and structural analysis of IFN $\lambda$ 4

研究開発分担者 (日本語) 金沢大学医薬保健研究域医学系 博士研究員 菊地 晶裕  
所属 役職 氏名: (英語) Kanazawa University Graduate School of Medical Sciences, research  
Fellow, Akihiro Kikuchi

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### 【和文】

本研究は IFN $\lambda$ 4 の機能的役割の解明及び新規診断法・治療法の開発を目的とした。

#### (1) IFN $\lambda$ 4 のシグナル伝達系の解明

CHO 細胞を用いて各種 IFN (IFN $\alpha$ , IFN $\lambda$ 3, IFN $\lambda$ 4) リコンビナントタンパク質を作成した。HCV 感染培養細胞に各種 IFN リコンビナントタンパク質を処置し、IFN 応答、ISGs 誘導能、抗ウイルス活性を評価したところ、IFN $\lambda$ 4 は IFN $\alpha$  や IFN $\lambda$ 3 と同様、ISG の誘導と抗 HCV 活性を示した。また、肝癌培養細胞株に処置したところ、IFN $\lambda$ 4 では ATF4 及び JNK の活性化が認められた。

#### (2) IFN $\lambda$ 4 の機能解析及び癌治療への応用

IFN $\alpha$ 、IL28B、IFN $\lambda$ 4 を恒常的に発現する Huh7 細胞株を作成した。これらの細胞株に HCV を感染させた結果、いずれの細胞株においても十分な抗ウイルス効果を示した。インターフェロン誘導遺伝子の誘導能は IFN $\alpha$  と IFN $\lambda$ 4 が同等であり、IL28B は弱い傾向にあった。しかし、これらの細胞株に抗癌剤を処置すると、IFN $\lambda$ 4 恒常的発現細胞株においてもっとも強い抗癌効果があることを見出した。

我々は抗がん剤であるシスプラチン耐性の肝癌細胞株 (Huh7-cisplatin resistance) 細胞を作成した。この細胞に IFN $\lambda$ 4 を処置した結果、シスプラチン耐性株に対しても IFN $\lambda$ 4 による抗癌作用は発揮された。

SiRNA を用いて IFN $\lambda$ 4 のレセプター (IL28RA, IL10R) をノックダウンした細胞株に IFN $\lambda$ 4 のリコンビナントタンパク質を処置した結果、IFN のシグナルは完全に抑制されるものの、IFN $\lambda$ 4 の抗癌作用は維持された。この結果は IFN $\lambda$ 4 の抗癌効果は未知のレセプターを介している可能性を示唆する。

Crispr-cas9 を用いて、IFNAR1, IFNAR2, IL28RA, IL10RB ノックアウト細胞を作成した。

#### (3) IFN $\lambda$ 4 の臨床学的意義の解明

本年度は CDDP を含む肝動注化学療法が行われた肝癌 191 症例の解析を行った。奏効率に関連する臨床因子として 1) 脈管浸潤の有無、2) Child-Pugh 分類及び 3) IL28B ゲノタイプが挙げられた。

また、全血液由来 RNA 中の IFN $\lambda$ 4 の mRNA 量を測定し、IFN $\lambda$ 4 の mRNA 量と様々な臨床的パラメーター (肝線維化の程度、IL28B SNPs、抗ウイルス療法の治療効果など) との関連を明らかにすることを目的とした。このためにまず、NS3/4A 阻害剤であるアスナプレビルと NS5A 阻害剤であるダクラタスビルによる抗ウイルス療法を施行された C 型慢性肝疾患 10 名を対象にした。IL28B ゲノタイプ major5 例、IL28B ゲノタイプ non-major5 例の抗ウイルス療法開始前の全血由来 (PAXgene®にて採血) RNA を抽出した。これらの RNA に関して  $\beta$  アクチン及び IFN $\lambda$ 4 に関して mRNA 量を定量 PCR 法を用いて解析した。その結果全ての症例において  $\beta$  アクチンの定量が可能であった一方、いずれの症例でも IFN $\lambda$ 4 の検出は困難であった。尚、ポジティブコントロールとして用いた IFN $\lambda$ 4 プラスミド DNA の定量は可能であった。これらの結果は、血中における IFN $\lambda$ 4 mRNA は極めて少量であることが示唆された。

#### (4) IFN $\lambda$ 4 の発現・精製

DDDDK タグを付加した IFN $\alpha$  や IFN $\lambda$ 4 の発現系を構築し、CHO 細胞を用いて発現させた。さらに、イオン交換カラムおよび DDDDK アフィニティーカラムを用いて、リコンビナントタンパク質の精製条件の検討を行い、発現・精製法を確立した。

#### 【英文】

##### (1) Examination of signaling pathways induced by IFN $\lambda$ 4.

We could express various recombinant IFNs (IFN $\alpha$ , IFN $\lambda$ 3, IFN $\lambda$ 4) in CHO cells. We treated HCV replicating cells with various IFNs (IFN $\alpha$ , IFN $\lambda$ 3, IFN $\lambda$ 4) and evaluated the IFN response, ISGs expression and antiviral efficacy. IFN $\lambda$ 4 induced ISGs expression and showed the anti-HCV activity. In addition, IFN $\lambda$ 4 induced the expression of ATF4 and JNK activation.

##### (2) Functional analysis of IFN $\lambda$ 4 and application to cancer therapy.

We generated stable Huh7 cell lines that constitutively express IFN $\alpha$ , IL28B or IFN $\lambda$ 4, respectively. These cell lines showed anti-HCV effects. The magnitude of ISG expression induced by IL28B was lower than that induced by IFN $\alpha$  and IFN $\lambda$ 4. The antitumor activity of IFN $\lambda$ 4 was more potent than IFN $\alpha$  or IL28B after anti-cancer agent treatment.

We also generated cisplatin resistant Huh7 cells. Interestingly, IFN $\lambda$ 4 exhibited a marked antitumor activity in these cisplatin resistant cell lines.

SiRNA mediated knockdown of IFN $\lambda$ 4 receptor resulted in suppression of IFN signaling by IFN $\lambda$ 4, however, the phenotype of IFN $\lambda$ 4 sensitivity of antitumor effect did not change. These results suggest that not IFN $\lambda$ 4 receptor but unknown receptor exist that interact with IFN $\lambda$ 4.

We generated IFNAR1, IFNAR2, IL28RA and IL10RB knockout cell lines using Crispr-cas9 system.

#### Clinical significance of IFN $\lambda$ 4

(3) We evaluated clinical characteristics of 191 HCC patients who had hepatic arterial infusion chemotherapy including CDDP. Multivariate analysis revealed that 1) vascular invasion, 2) Child-Pugh, 3) IL28B genotype were significantly associated with progression free survivals.

In order to clarify the relation between IFN $\lambda$ 4 mRNA amount derived from blood and several clinical parameters such as degree of liver fibrosis, IL28B SNPs, response to antiviral treatment, I sought to determine the amount of IFN $\lambda$ 4 mRNA within whole blood. For this purpose, I selected 10 HCV-infected patients, who had been treated with NS3/4A inhibitor, asunaprevir, and NS5A inhibitor, daclatasvir. Among those 10 patients, 5 were IL28B genotype major, and the other 5 were IL28B genotype non-major. I extracted total RNA from whole blood which had been taken by using PAXgene® before starting antiviral treatment. Then, abundances of IFN $\lambda$ 4 and  $\beta$ -actin mRNA were determined by quantitative PCR method. Although considerable amount of  $\beta$ -actin mRNA was detected in all patients, IFN $\lambda$ 4 mRNA was not detected in all patients tested. Since cDNA of IFN $\lambda$ 4 in plasmid was quantitated, quite small amount of IFN $\lambda$ 4 mRNA could be a reason why we failed to detect it.

##### (4) Expression and purification of IFN $\lambda$ 4

The recombinant IFN proteins (IFN $\alpha$  and IFN $\lambda$ 4) were expressed in CHO-based cells. Then, we

established a protocol for purification of the proteins with a ion-exchange and a DDDDK-affinity column.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 17 件)

【国内誌】

なし

【国際誌】

1. Honda M, Shirasaki T, Terashima T, Kawaguchi K, Nakamura M, Oishi N, Wang X, Shimakami T, Okada H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. Hepatitis B Virus (HBV) Core-Related Antigen During Nucleos(t)ide Analog Therapy Is Related to Intra-hepatic HBV Replication and Development of Hepatocellular Carcinoma. *J Infect Dis.* 2016, 213(7), 1096-106. doi: 10.1093/infdis/jiv572.
2. Nishida N, Ohashi J, Khor SS, Sugiyama M, Tsuchiura T, Sawai H, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsushashi H, Yokosuka O, Koike K, Kurosaki M, Izumi N, Korenaga M, Kang JH, Tanaka E, Taketomi A, Eguchi Y, Sakamoto N, Yamamoto K, Tamori A, Sakaida I, Hige S, Itoh Y, Mochida S, Mita E, Takikawa Y, Ide T, Hiasa Y, Kojima H, Yamamoto K, Nakamura M, Saji H, Sasazuki T, Kanto T, Tokunaga K, Mizokami M. Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis. *Sci Rep.* 2016, 6, 24767. doi: 10.1038/srep24767.
3. Sejima H, Satoh S, Dansako H, Honda M, Kaneko S, Ikeda M, Kato N. Molecular Mechanism Underlying the Suppression of CPB2 Expression Caused by Persistent Hepatitis C Virus RNA Replication. *Acta Med Okayama.* 2016, 70(2), 75-88. 2016.
4. Yamashita T, Horii R, Arai K, Kawaguchi K, Kitamura K, Yamashita T, Sakai Y, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Potential efficacy of therapies targeting intrahepatic lesions after sorafenib treatment of patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2016, 16(1), 338. doi: 10.1186/s12885-016-2380-4.
5. Takashima S, Usui S, Kurokawa K, Kitano T, Kato T, Murai H, Furusho H, Oda H, Maruyama M, Nagata Y, Usuda K, Kubota K, Takeshita Y, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Takamura M. Altered gene expression in T-cell receptor signalling in peripheral blood leucocytes in acute coronary syndrome predicts secondary coronary events. *Open Heart.* 2016, 3(1), e000400. doi: 10.1136/openhrt-2016-000400.
6. Terashima T, Yamashita T, Takata N, Nakagawa H, Toyama T, Arai K, Kitamura K, Yamashita T, Sakai Y, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Post-progression survival and progression-free survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated by sorafenib. *Hepatol Res.* 2016, 46(7), 650-6. doi: 10.1111/hepr.12601.
7. Kawaguchi K, Honda M, Yamashita T, Okada H, Shirasaki T, Nishikawa M, Nio K, Arai K, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. Jagged1 DNA Copy Number Variation Is Associated with Poor Outcome in Liver Cancer. *Am J Pathol.* 2016, 186(8), 2055-67. doi:

10.1016/j.ajpath.2016.04.011.

8. 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, 6, 30939. doi: 10.1038/srep30939.
9. Terashima T, Yamashita T, Arai K, Kawaguchi K, Kitamura K, Yamashita T, Sakai Y, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Response to chemotherapy improved hepatic reserve for patients with hepatocellular carcinoma and Child-Pugh B cirrhosis. *Cancer Sci.* 2016, 107(9), 1263-9. doi: 10.1111/cas.12992.
10. Kawaguchi K, Honda M, Kaneko S. HBcrAg predicts hepatocellular carcinoma development: An analysis using time-dependent receiver operating characteristics. *Transl Cancer Res* 2016, 5(S2), S216-S220. doi なし
11. Yamane D, Selitsky SR, Shimakami T, Li Y, Zhou M, Honda M, Sethupathy P, Lemon SM. Differential hepatitis C virus RNA target site selection and host factor activities of naturally occurring miR-122 3' variants. *Nucleic Acids Res.* 2017 [Epub ahead of print], doi: 10.1093/nar/gkw1332.
12. Kawashima M, Hitomi Y, Aiba Y, Nishida N, Kojima K, Kawai Y, Nakamura H, Tanaka A, Zeniya M, Hashimoto E, Ohira H, Yamamoto K, Abe M, Nakao K, Yamagiwa S, Kaneko S, Honda M, Umemura T, Ichida T, Seike M, Sakisaka S, Harada M, Yokosuka O, Ueno Y, Senju M, Kanda T, Shibata H, Himoto T, Murata K, Miyake Y, Ebinuma H, Taniai M, Joshita S, Nikami T, Ota H, Kouno H, Kouno H, Nakamuta M, Fukushima N, Kohjima M, Komatsu T, Komeda T, Ohara Y, Muro T, Yamashita T, Yoshizawa K, Nakamura Y, Shimada M, Hirashima N, Sugi K, Ario K, Takesaki E, Naganuma A, Mano H, Yamashita H, Matsushita K, Yamauchi K, Makita F, Nishimura H, Furuta K, Takahashi N, Kikuchi M, Masaki N, Tanaka T, Tamura S, Mori A, Yagi S, Shirabe K, Komori A, Migita K, Ito M, Nagaoka S, Abiru S, Yatsuhashi H, Yasunami M, Shimoda S, Harada K, Egawa H, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N, Takikawa H, Ishibashi H, Chayama K, Mizokami M, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M. Genome-wide association studies identify PRKCB as a novel genetic susceptibility locus for primary biliary cholangitis in the Japanese population. *Hum Mol Genet.* 2017 [Epub ahead of print], doi: 10.1093/hmg/ddw406.
13. Misu H, Takayama H, Saito Y, Mita Y, Kikuchi A, Ishii KA, Chikamoto K, Kanamori T, Tajima N, Lan F, Takeshita Y, Honda M, Tanaka M, Kato S, Matsuyama N, Yoshioka Y, Iwayama K, Tokuyama K, Akazawa N, Maeda S, Takekoshi K, Matsugo S, Noguchi N, Kaneko S, Takamura T. Deficiency of the hepatokine selenoprotein P increases responsiveness to exercise in mice through upregulation of reactive oxygen species and AMP-activated protein kinase in muscle. *Nat Med.* 2017 [Epub ahead of print], doi: 10.1038/nm.4295.
14. 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 [Epub ahead of print], doi: 10.18632/oncotarget.15304.

15. Matsuura K, Sawai H, Ikeo K, Ogawa S, Iio E, Isogawa M, Shimada N, Komori A, Toyoda H, Kumada T, Namisaki T, Yoshiji H, Sakamoto N, Nakagawa M, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Enomoto N, Kusakabe A, Kajiwara E, Itoh Y, Ide T, Tamori A, Matsubara M, Kawada N, Shirabe K, Tomita E, Honda M, Kaneko S, Nishina S, Suetsugu A, Hiasa Y, Watanabe H, Genda T, Sakaida I, Nishiguchi S, Takaguchi K, Tanaka E, Sugihara J, Shimada M, Kondo Y, Kawai Y, Kojima K, Nagasaki M, Tokunaga K, Tanaka Y; Japanese Genome-Wide Association Study Group for Viral Hepatitis.. Genome-wide Association Study Identifies TLL1 Variant Associated With Development of Hepatocellular Carcinoma After Eradication of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology*. 2017 [Epub ahead of print], doi:10.1053/j.gastro.2017.01.041.
16. Nomura Y, Yamashita T, Oishi N, Nio K, Hayashi T, Yoshida M, Hayashi T, Hashiba T, Asahina Y, Okada H, Sunagozaka H, Takatori H, Honda M, Kaneko S. De Novo Emergence of Mesenchymal Stem-Like CD105+ Cancer Cells by Cytotoxic Agents in Human Hepatocellular Carcinoma. *Transl Oncol*. 2017 Apr;10(2):184-189. doi: 10.1016/j.tranon.2017.01.005. Epub 2017 Feb 6.
17. 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-λ3 as an additional effect of nucleotide, not nucleoside, analogues: a new potential target for HBV infection. *Gut*. 2016 Oct 27.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. NS5A 耐性変異測定を基軸としたアスナプレビル、ダクラタスビル抗ウイルス療法の治療効果に関する検討, 口演, 島上哲朗, 本多政夫, 金子周一, 第 102 回消化器病学会総会, 2016/4/22, 国内
2. NS5A 耐性変異測定を基軸としたアスナプレビル・ダクラタスビル抗ウイルス療法の治療効果に関する検討, 口演, 島上哲朗, 本多政夫, 金子周一, 第 52 回日本肝臓学会総会, 2016/5/20, 国内
3. In Vitro Selection of Simeprevir-resistance Mutants for Hepatitis C Virus with NS3-Q80K Polymorphism in Genotype 1a, ポスター, Tetsuro Shimakami, Kazuhisa Murai, Christoph Welsch, Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, and Shuichi Kaneko, The 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2016/10/13, 国内
4. A liver-derived secretory protein, LECT2, enhances the innate immune response and suppresses HCV replication, 口頭, Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Kazuhisa Murai, Tetsuro Shimakami, Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko, 23rd International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, 2016/10/14, 国内
5. C 型慢性肝疾患に対する経口抗ウイルス薬治療後の肝発癌に関する検討, 口演, 島上哲朗, 本多政夫, 金子周一, 第 20 回日本肝臓学会大会 (JDDW), 2016/11/3, 国内
6. C 型肝細胞癌根治治療後の肝炎ウイルス治療の意義と宿主因子, 口頭, 本多政夫, 方堂祐治, 金子周一, JDDW2016 (肝臓学会・消化器病学会・消化器外科学会), 2016/11/5, 国内
7. A liver-derived secretory protein, LECT2, activates pDCs and protects hepatocytes against HBV infection, ポスター, Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Kazuhisa Murai, Miwako Narita, Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko, 67th AASLD The Liver Meeting, 2016/11/11, 国外
8. Effective Prevention of Direct-acting Antiviral-resistant Hepatitis C Virus by Combination with

Anti-miR-122 Therapy in Cell Culture, ポスター, Liu Fanwei, Tetsuro Shimakami, Kazuhisa Murai, Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, and Shuichi Kaneko, The 67th AASLD annual meeting, 2016/11/13, 国外

9. A liver-derived secretory protein, LECT2, enhances the innate immune response and suppresses HCV replication, ポスター, Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Kazuhisa Murai, Tetsuro Shimakami, Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko, 67th AASLD The Liver Meeting, 2016/11/13, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
なし

(4) 特許出願  
なし