

no728024A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業
HCV感染における宿主応答の分子機構の解析と新規創薬標的の探索

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松浦 善治

平成20(2008)年4月

目次

I. 総括研究報告書	
HCV 感染における宿主応答の分子機構の解析と新規創薬標的の探索 松浦善治	1
II. 分担研究報告書	
HCV 感染における宿主免疫応答回避機構の解析 松浦善治	9
樹状細胞の機能制御に基づく統合的免疫細胞療法の開発 考藤達哉	12
HCV による RIG-I の機能阻害機構の解析 竹内 理	14
HCV 蛋白質による自然免疫センサー RIG-I の機能阻害： ウイルス持続感染と発癌機構に関する研究 藤田尚志	16
HCV による IFN システムの攪乱機構の解析 加藤宣之	19
病原性を保持した HCV の感染増殖ならびに IRF 7 を介した免疫抑制機構の解明 土方 誠	24
ウイルスの持続感染機序の解析及びその制御に関する研究 小原道法	26
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV. 研究成果の刊行物・別冊	別添

HCV 感染における宿主応答の分子機構の解析と新規創薬標的の探索

主任研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：抗ウイルス治療による HCV 排除に樹状細胞が関与しており、免疫制御治療の標的になりうるということが明らかとなった。NS5A 蛋白質が TLR シグナルアダプター分子である MyD88 と相互作用することで、TLR シグナル伝達経路に干渉していることが示唆された。RIG-I ファミリー分子である Lgp2 は RIG-I、MDA5 によるウイルス認識を正に制御し I 型 IFN 産生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。RIG-I の CTD はセンサードメインそのものであり、HCV RNA はこの部分で感知されていると考えられる。ヒトの肝臓ではウイルス感染によって IRF7 が早期に活性化され、IFN 産生に機能することが示唆された。

分担研究者

考藤達哉 阪大大学院医学系研究科・准教授
竹内 理 阪大微研・准教授
藤田尚志 京大ウイルス研・教授
加藤宣之 岡山大大学院医学系研究科・教授
土方 誠 京大ウイルス研・准教授
小原道法 都臨研・参事研究員

A. 研究目的

我が国には既に2百万人以上ものHCV感染者が存在すると推定され、原発性肝癌の約8割はC型肝炎を基礎に発症する。さらに、未だ臨床サンプルからHCVを効率よく分離培養できる細胞培養系はなく、しかも、感受性を示す実験動物はチンパンジー以外にいないことから、ワクチンや抗ウイルス剤の開発は困難を極めている。HCVはその多様性や可変性、さらに、巧妙な手段によって宿主の免疫監視機構から逃避して持続感染を成立させていると考えられている。最近研究が進んでいるTLRや外来核酸の細胞内認識センサーは、病原因子の侵入を感知する自然免疫認識受容体であり、自然免疫の誘導は獲得免疫系の発動にも重要な役割を演じていることが明らかになってきた。HCVのプロテアーゼが自然免疫の誘導に関与するアダプター分子を特異的に切断し、巧みに宿主の自然免疫機構から回避している可能性が示唆されている。したがって、HCVが宿主の自然免疫の発動を阻害し、持続感染を成立させている可能性が考えられる。C型肝炎に対するワクチンや抗ウイルス剤の開発には、まず、HCVが如何にして自然免疫と獲得免疫を回避して持続感染を成立させ

ているのかを明らかにすることが最重要課題である。現在、C型肝炎に対してペグ化IFNとリバビリンの併用療法が開始されたが、遺伝子型が1型でウイルス量の多いHCV感染者に対する著効率は約50%であり、これらの難治例に対しては新たな治療法の開発が急務である。本研究事業によりC型肝炎に対する抗ウイルス剤の開発に新しい展開をもたらすことができれば、肝癌発症の恐怖に曝され続けているC型肝炎患者にとって大きな福音になるものと思われる。

B. 研究方法

(松浦) HCVの初期感染過程に関与する宿主因子を解析した。

(考藤) 血液中に存在するミエロイドDC、単球由来DC、プラスマサイトイドDCのTLR発現プロファイル、TLRアゴニストで刺激した際のサイトカイン産生や成熟、T細胞、NK細胞、NKT細胞刺激能をC型肝炎患者と非感染者とで比較検討した。

(竹内、藤田) マウスRIG-I欠損細胞にHCV genomeを導入しRIG-Iの役割を検討する。ヒト集団ではRIG-Iの一次構造に多型が見出されており、この多型とRIG-Iの生理活性、さらにはHCV感染における臨床経過との関連について検討した。

(加藤、土方、松浦) 2本鎖RNAを細胞外から加えた場合にNS3-4AがIFNの産生を抑制できない原因を解析する。患者血清由来HCVの感染によるIRF7活性化機構を明らかにするため、IRF7活性に関与する細胞因子を同定する。TLRの誘導を阻害する

HCV 蛋白質を検索した。

(小原) HCV の持続感染成立機序をマウスの肝細胞をヒト肝細胞で置換した、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウス及び肝炎発症 HCV-Tg を用いてそれぞれを有機的に関連させながら解析した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントを必要とする材料は含まれない。

C. 研究結果

- (1) NS3 がプロテアーゼ活性非依存的に TLR シグナルを抑制することを見いだした。また、NS5A が TLR シグナル伝達系で重要な MyD88 に結合して抑制的に作用することを見いだした。(松浦)
- (2) C 型慢性肝炎患者の樹状細胞(DC)は IFN- α に対する Th1 誘導能が低下しており、リバビリンによって Th1 誘導能が改善する症例では治療効果が高いことが示された。また、C 型慢性肝炎患者の DC 数と機能がペグ IFN- α とリバビリンの治療効果に関与していた。さらに、C 型慢性肝炎患者のミエロイド DC では TLR や RIG-I の発現亢進にも関わらず、サイトカイン産生能の低下がみられたことから、HCV によるシグナル伝達抑制機構の存在が示唆された。(考藤)
- (3) RIG-I の C 末端に活性抑制領域が存在し、ウイルス RNA と宿主の RNA の識別を行なうことを明らかにした。(藤田)
- (4) IFN- α 6 の産生をモニターできるマウスを作製し、RNA ウイルスの呼吸器感染においては肺胞マクロファージが IFN- α 産生細胞であることを明らかにした。また、LCMV に対する細胞傷害性 T 細胞応答に、TLR を介した IFN 産生が重要であることを示した。さらに、Lgp2 が RIG-I/MDA5 を介した RNA ウイルスの認識を正に制御していることを明らかにした。(竹内)
- (5) ヒト血清由来の HCV が効率良く感染し増殖する新規不死化ヒト肝細胞を樹立した。また、感染性ウイルス粒子の産生に細胞の脂肪滴が重要な役割を果たすことを示した。さらに、HCV 遺伝子複製にエストロゲン受容体が機能していることを示した。(土方)
- (6) ヒト不死化 PH5CH8 肝細胞は 2 本鎖 RNA に応答し、IFN β 産生機構の解析に有用であることが示された。病態の異なる患者由来 NS3/4A は IPS-1 を切断するが、TRIF は切断しないことが示された。(加藤)
- (7) 自然免疫活性化剤の投与により、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスから HCV が排除された。また、ウイルスを排除されたキメラマウスには 1 型 IFN の産生は認められなかった。(小原)

D. 考察

慢性 C 型肝炎患者由来の DCs にて観察される TLR シグナル伝達経路の不応答性の機序に、NS5A 蛋白質が関与している可能性が示唆された。ISDR は IFN の感受性規定領域としての指標や PKR (dsRNA 依存性プロテインキナーゼ) 分子との相互作用領域としても報告されているが、今回新たに TLR シグナル伝達経路の干渉作用に及ぼす領域である可能性も示唆された。

初感染時に HCV が自然排除された症例や、抗ウイルス療法によって HCV が排除された症例では、HCV 特異的 Th1 反応が亢進していることが報告されている。Th1 の誘導には樹状細胞が重要であり、本研究によって IFN α /リバビリンによる治療効果に樹状細胞機能が深く関与することが示された。IFN α 、リバビリンによる樹状細胞の機能修飾の分子機序、HCV 感染の有無による差異に関しては今後の検討課題である。

Lgp2 は CARD を持たず、これまで RIG-I による RNA ウイルス認識を負に制御する分子と考えられてきた。しかし、本研究により Lgp2 も RIG-I、MDA5 によるウイルス認識を正に制御する事が明らかとなった。このウイルス RNA 認識の詳細はまだ明らかではない。更に、HCV の認識に Lgp2 がどのように関与しているかは今後の課題である。

HCV の RNA のうち 5' および 3' の非翻訳領域の塩基配列の保存が高く、この部分が RIG-I を活性化することが報告されている。今回の構造解析の結果と合わせて考察すると、非翻訳領域の 2 次構造及び 5' 末端の三リン酸が認識に深く関わっているものと考えられた。

ヒト不死化肝細胞における抗 HCV 効果を示す自然免疫機構では IRF7 が重要な役割をもっていることが考えられた。IRF7 mRNA はこの不死化肝細胞だけでなく、ヒト肝臓組織でも高い発現が認められ、siRNA による IRF7 の発現抑制により IFN-a だけでなく IFN-b 遺伝子転写プロモーターの活性化も抑制されることから、ヒトの肝臓細胞では IRF7 が発現しており、ウイルス感染により RIG-I からのシグナル伝達により直接活性化され、IFN-a と b 双方を誘導発現する可能性が考えられた。

細胞外からの IFN 刺激が細胞内に伝わらないレプリコン細胞で、恒常的活性型 RIG-I を発現させた場合に認められる抗 HCV サブゲノムレプリコン複製抑制機構を明らかにする必要があると思われる。スイッチング発現システムを樹立したことにより、HCV 感染に似た免疫反応状態をつくることができた。さらに、HCV 蛋白は完全に排除されることなく、持

続的に発現がみられた。

E. 結論

- 1 HCV NS5A 蛋白質が TLR シグナルアダプター分子である MyD88 と相互作用することで、TLR シグナル伝達経路に干渉していることが示唆された。
- 2 抗ウイルス治療による HCV 排除に樹状細胞が関与しており、免疫制御治療の標的になりうることが明らかとなった。
- 3 RIG-I ファミリー分子である Lgp2 は RIG-I、MDA5 によるウイルス認識を正に制御し I 型 IFN 産生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。
- 4 RIG-I の CTD はセンサードメインそのものであり、HCV RNA はこの部分で感知されていると考えられる。天然あるいは人工化合物で、「塩基性のくぼみ」に結合するものは抗 HCV 薬剤として用いる可能性が強く示唆された。今回の構造決定によってそのような化合物の探索、分子デザインが可能となった。
- 5 HCV RNA の複製により活性化される IFN 産生系における NS3-4A の抑制効果は不完全であることを明らかにした。
- 6 ヒトの肝臓では IRF7 がもともと発現しており、ウイルス感染によって早期に活性化され、IFN 産生に機能することが考えられた。この IRF7 の活性化により産生される IFN による細胞外からのシグナルによって誘導される IFN 応答遺伝子群以外に抗 HCV 活性の誘導機構が存在する可能性が考えられた。
- 7 スwitching 発現システムを樹立したことにより、受動的に免疫寛容が成立し、HCV 感染に似た免疫反応状態をつくることに成功した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y. Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. PNAS, 2007, 104, 1661-1666.
- 2 Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. J. Virol., 2007, 81, 8953-8966.
- 3 Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells. J. Virol., 2007, 81, 8477-8487.
- 4 Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. J. Virol., 2007, 81, 8601-8612.
- 5 Yamamoto M., Uematsu S., Okamoto T., Matsuura Y., Sato S., Kumar H., Satoh T., Saitoh T., Takeda K., Ishii K.J., Takeuchi O., Kawai T., and Akira S. Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. J. Exp. Med., 2007, 204, 2233-2239.
- 6 Moriishi K., and Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. Rev. Med. Virol., 2007, 17, 343-354.
- 7 Itose, I., et al. Involvement of dendritic cell frequency and function in virological relapse in pegylated interferon- α 2b and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. J Med Virol 2007. 79: 511-521
- 8 Miyatake, H., et al. Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection. J Viral Hepatitis 2007. 14: 404-412.
- 9 Jinushi, M., et al. Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4 CD25 T cells with PD-1-dependent regulatory activities. Immunology 2007. 120: 73-82.
- 10 Jung A, Kato H, Kumagai Y, Kumar H, Kawai T, Takeuchi O, Akira, S. Lymphocytoid choriomeningitis virus activates plasmacytoid dendritic cells and induces

- cytotoxic T cell response via MyD88. *J Virol.* 82:196-206, 2008
- 11 Takeuchi O, Akira S. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev.* 220:214-24, 2007
 - 12 Kumagai Y, Takeuchi O, Kato H, Kumar H, Matsui K, Morii E, Aozasa K, Kawai T, Akira, S. Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity* 27: 240-52, 2007
 - 13 Kawagoe T, Sato S, Jung A, Yamamoto M, Matsui K, Kato H, Uematsu S, Takeuchi O, Akira, S. Essential role of IRAK-4 protein and its kinase activity in Toll-like receptor-mediated immune responses but not in TCR signaling. *J Exp Med.* 204:1013-24, 2007
 - 14 Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol.* 20: 17-22, 2008
 - 15 Goto A, Matsushita K, Gesellchen V, El Chamy L, Kuttenukeuler D, Takeuchi O, Hoffmann JA, Akira S, Boutros M, Reichhart JM. Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF-kappaB-dependent gene expression in drosophila and mice. *Nat Immunol.* 9: 97-104 2008
 - 16 Ishii, K. J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Uematsu, S., Takeuchi, O., Takeshita, F., Coban, C., Akira, S. Tank-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* 451:725-729, 2008
 - 17 Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446: 916-920, 2007
 - 18 Saito, T., Hirai, R., Loo., Yueh-Ming., D, Owen., C, L. Johnson., S., C. Shinha., Akira, S., Fujita T. and Gale Jr., M. : Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 104, 582-7 (2007)
 - 19 Onoguchi, K., Yoneyama, M., Takemura, A., Akira, S., Taniguchi, T., Namiki, H., and Fujita, T. : Viral Infections Activate Types I and III Interferon Genes through a Common Mechanism. *J. Biol. Chem,* 282, 7576-7581 (2007)
 - 20 Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, Fujita T, Meurs E, Chignard M, Si-Tahar M. : Influenza A Virus Activates TLR3-Dependent Inflammatory and RIG-I-Dependent Antiviral Responses in Human Lung Epithelial Cells. *J Immunol.* 178, 3368-72 (2007)
 - 21 Guo, Z., Chen, L.M., Zeng, H., Gomez, J.A., Plowden, J., Fujita, T., Katz, J.M., Donis, R.O. and Sambhara, S. : NS1 Protein of Influenza A Virus Inhibits the Function of Intracytoplasmic Pathogen Sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 36, 263-9 (2007)
 - 22 Arimoto K., Takahashi H., Hishiki T., Konishi H., Fujita T., Shimotohno K. : Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 7500-5 (2007)
 - 23 Tasaka, M., Sakamoto, N., Itakura, Y., Nakagawa, M., Itsui, Y., Sekine-Osajima, Y., Nishimura-Sakurai, Y., Chen, C.H., Yoneyama, M., Fujita, T., Wakita, T., Maekawa, S., Enomoto, N. and Watanabe, M. : Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J. Gen Virol.* 88, 3323-3333 (2007),
 - 24 Takahasi K, Yoneyama M, Nishihori T., Hirai R., Kumeta H., Narita, R., Gale Jr. M., Inagaki F. and Fujita T. : Non-self RNA-Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. *Molecular Cell* (2007) in press
 - 25 Cui, S., Eisenacher, K., Kirchhofer, A., Brzozka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K-K., Krug, A. and Hopfner, K-P. : The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Molecular Cell* (2007) in press
 - 26 Fujita, T., Onoguchi, K., Onomoto, K., Hirai, R. and Yoneyama, M. : Triggering antiviral response by RIG-I-related RNA helicases. *Biochimie* 89, 754-60 (2007)
 - 27 Yoneyama, M. and Fujita T. :Function of RIG-I-Like receptors in antiviral innate immunity. *J. Biol. Chem.* 282, 15315-8 (2007)
 - 28 Yoneyama, M. and Fujita, T. : RIG-I family RNA helicases: Cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.*

- 18, 545-51 (2007)
- 29 Yoneyama, M. and Fujita, T.: Cytoplasmic double-stranded DNA sensor. *Nature Immunology* 8, 907-908 (2007)
- 30 Onomoto, K., Yoneyama, M. and Fujita, T.: Regulation of Antiviral Innate Immune Responses by RIG-I Family of RNA Helicases. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 316, 193-205 (2007)
- 31 小野口和英、米山光俊、藤田尚志:細胞内ウイルスセンサーによるインターフェロン誘導機構、炎症と免疫、15(2): 167-172: 2007
- 32 成田亮、米山光俊、藤田尚志: ウイルス感染に対するインターフェロン応答機構、蛋白質核酸酵素増刊、52(10): 1187-1193: 2007
- 33 尾野本浩司、米山光俊、藤田尚志: ウイルス感染における細胞内センシング機構 13-22 免疫応答と免疫病態の総合的分子理解 谷口維紹、山本一彦 編 南山堂
- 34 Dansako H, Ikeda M, Kato N. Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. *FEBS J.* 274:4161-4176 (2007).
- 35 Ikeda M, Kato N. Life style-related diseases of the digestive system: cell culture system for the screening of anti-HCV reagents: suppression of HCV replication by statins and synergistic action with interferon. *J Pharmacol Sci.* 105:145-150 (2007).
- 36 Ikeda M, Kato N. Modulation of host metabolism as a target of new antivirals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59:1277-1289 (2007).
- 37 Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus (HCV) RNA replication. *J. Virol.* 81:13922-13926 (2007).
- 38 Yano M, Ikeda, M, Abe K, H. Dansako H., Ohkoshi S, Aoyagi, Y, Kato N. Comprehensive Analysis of the Effects of Ordinary Nutrients on Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:2016-2027 (2007).
- 39 Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for hepatitis C virus (strain O of genotype 1b) replication. *Virus Res.* 125:162-168 (2007).
- 40 Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, Kato N. Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 125: 88-97 (2007).
- 41 Hussein H. Aly, Koichi Watashi, Makoto Hijikata, Hiroyasu Kaneko, Yasutugu Takada, Hiroto Egawa, Shinji Uemoto, Kunitada Shimotohno: Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J. Hepatol.* 46:26-36, 2007
- 42 Mohamed A. El-Farrash, Hussein H. Aly, Koichi Watashi, Makoto Hijikata, Hiroto Egawa, Kunitada Shimotohno: In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporine. *Microbiol. Immunol.* 51(1):127-133, 2007
- 43 Yusuke Miyanari, Kimie Atsuzawa, Nobuteru Usuda, Koichi Watashi, Takayuki Hishiki, Margarita Zayas, Ralf Bartenschlager, Takaji Wakita, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* 9 (9), 1089-1097, 2007
- 44 Koichi Watashi, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Kaku Goto, Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno: Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptors with viral RNA polymerase NS5B. *J. Biol. Chem.*, 282, 32765-32772, 2007
- 45 Kitabatake M., et al. : SARS-CoV spike protein recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in spite of pre-immunization with vaccinia virus. *Vaccine* 25 : 630-637 (2007)
- 46 Nakagawa S., et al. : Inhibition of Hsp90 suppresses HCV replication in replicon cell lines and in chimeric mice with humanized liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353:882-888 (2007)
- 47 Inoue K., et al. : Evaluation of the cyclophilin inhibitor DEBIO-025 in hepatitis C virus-infected chimeric mice in vivo. *Hepatology* 45:921-928 (2007)
- 48 Watanabe T., et al. : Liver target delivery of small interfering RNA to the HCV gene by

lactosylated cationic liposome. J. Hepatology 47: 744-750 (2007)

2. 学会発表

- 1 Shuhei Tagawa, Toru Okamoto, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with HCV NS5A and regulates HCV replication. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, September 9-13, 2007.
- 2 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Xiaoyu Wen, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Enhancement of IP-10 expression via TLR signaling pathway in cells expressing HCV proteins. 同上。
- 3 Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Eiko Matsuo, Kensuke Suzuki, Itsuki Hamamoto, Tetsuo Yamashita, Kohji Moriishi, Kazuhito Fujiyama, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Ania Owsianka, Arvind H. Patel, Michael A. Whitt, and Yoshiharu Matsuura: Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding HCV envelope proteins. 同上。
- 4 Yoshio Mori, Kiyoko Okamoto, Toru Okamoto, Yasumasa Komoda, Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Intramembrane processing by SPP regulates membrane localization of HCV core protein and viral propagation. 同上。
- 5 Toru Okamoto, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: FKBP8 Plays a Crucial Role in the Replication of Hepatitis C Virus, HEP DART 2007, Hawaii, 9-13 December, 2007.
- 6 森石恆司、森屋恭爾、村田茂穂、田中啓二、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治: HCV コア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症における PA28 γ の役割: 第43回日本肝臓学会総会ワークショップ、東京、5月31日-6月1日、2007.
- 7 田鍬修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスゲノム複製に關与する宿主蛋白質B-ind1の機能解析: 第55回日本ウイルス学会総会、札幌、10月21日-23日、2007.
- 8 阿部隆之、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治: C型肝炎ウイルスによるTLRシグナル伝達経路を介した炎症性ケモカインIP-10の過剰産生、同上。
- 9 谷 英樹、菰田泰正、鈴木健介、山下哲生、稲田大彦、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: シュードタイプと組換え水疱性口内炎ウイルスを用いたC型肝炎ウイルスの感染機構の解析、同上。
- 10 岡本 徹、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスゲノム複製におけるFKBP8の役割、同上。
- 11 森 嘉生、岡本貴世子、岡本 徹、菰田泰正、鈴木哲朗、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼによるプロセッシングの生物学的意義、同上。
- 12 山下哲生、森 嘉生、森石恆司、李 天成、宮村達男、武田直和、月原富武、吉村政人、松浦善治: E型肝炎ウイルス様粒子の結晶化とX線結晶構造解析、同上。
- 2 藤田尚志: 抗ウイルス自然免疫機構制御するウイルスセンサー、RIG-I like receptor. 第13回広島肝臓研究会 2007. 5. 17 広島
- 3 藤田尚志: ウイルスの複製を感知するCARDヘリカーゼ、RIG-Iファミリー 第3回神戸膠原病研究会 2007. 5. 25 神戸
- 4 Fujita, T.: Sensing viruses and antiviral response. Gordon Research Conferences: Viruses and Cells 2007. 6. 5 Tilton School, Tilton NH USA
- 5 小野口和英、米山光俊、審良静男、谷口維紹、藤田尚志: III型インターフェロンはI型インターフェロンと同じ転写制御を受ける 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2007. 7. 5-6 京都
- 6 米山光俊、平井玲子、成田亮、藤田尚志: 細胞内ウイルス感染センサーRIG-Iによる非自己RNA認識のメカニズム 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2007. 7. 5-6 京都
- 7 尾野本浩司、米山光俊、大島宏之、藤田尚志: RIG-I CARDのオリゴマー形成に夜シグナル伝達機構と生理的機能の解析 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2007. 7. 5-6 京都
- 8 Fujita, T.: RIG-I family helicases: Cytoplasmic sensor for non-self RNA. Viral Immunology Symposium 2007. 7. 23 Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD USA
- 9 藤田尚志: 抗ウイルス生体防御のセンサー、

- RIG-I like receptors. 第31回阿蘇シンポジウム 2007.7.27 熊本
- 10 Fujita, T.: Non-self RNA Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. 3rd Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society 2007. 10.5 Langenbeck-Virchow Auditorium, Berlin, Germany
 - 11 成田亮、平井玲子、米山光俊、藤田尚志: 細胞内ウイルス感染センサーRIG-Iによる非自己RNA認識のメカニズム 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 2007.12.11-15 横浜
 - 12 Fujita, T.: Regulation of interferon gene expression and virus infection of the liver. Hepatic Inflammation and Immunity. Jan. 25-27 2008 Moody Gardens Resort, Galveston, Texas
 - 13 團迫浩方、池田正徳、加藤宣之. Limited suppression of the interferon- β production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2007年7月.
 - 14 池田正徳、矢野雅彦、阿部健一、有海康雄、團迫浩方、加藤宣之. 新しいC型肝炎治療を目指した培養細胞系の開発. 第17回抗ウイルス化学療法研究会、高松、2007年5月.
 - 15 矢野雅彦、池田正徳、阿部健一、團迫浩方、大越章吾、青柳豊、加藤宣之. 抗HCV剤治療効果の増強が期待される物質の網羅的スクリーニング—C型肝炎に対する治療効果の最大化を目指して— 第43回日本肝臓学会総会、東京、2007年5月.
 - 16 Kato N., Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. HCV genetic variability and dynamics in long-term culture of genome-length HCV RNA replicating cells. 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月.
 - 17 Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月.
 - 18 Ikeda M, Yano M, Abe K, Dansako H, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Comprehensive screening of ordinary nutrients expected to enhance the effects of anti-HCV reagents. 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月.
 - 19 森京子、阿部健一、團迫浩方、有海康雄、池田正徳、加藤宣之. C型急性肝炎患者血清由来のHCV1bレプリコン複製細胞株の樹立 第23回中国四国ウイルス研究会、松山、2007年6月
 - 20 阿部健一、池田正徳、有海康雄、團迫浩方、加藤宣之. 持続的な全長HCV RNA複製を維持できる無血清培地を用いた細胞培養系の開発. 第23回中国四国ウイルス研究会、松山、2007年6月.
 - 21 矢野雅彦、池田正徳、阿部健一、團迫浩方、大越章吾、青柳豊、加藤宣之. 全長HCV RNAの複製に影響を与える日常的に摂取する栄養成分の同定および評価. 第23回中国四国ウイルス研究会、松山、2007年6月.
 - 22 Kato N., Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. HCV genetic variability and dynamics in long-term culture of genome-length HCV RNA-replicating cells. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
 - 23 Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for genome-length HCV RNA replication. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
 - 24 Yano M, Ikeda M, Abe K, Dansako H, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Comprehensive analysis of the ordinary nutrients as the novel partners of anti-HCV reagents. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
 - 25 Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Kato N. A new antiviral assay system using the living cells harboring genome-length HCV RNA. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
 - 26 Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Trono D, Kato N. DNA damage sensors, ATM and Chk2, are required for hepatitis C virus RNA. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
 - 27 池田正徳、矢野雅彦、阿部健一、有海康雄、團迫浩方、加藤宣之. C型慢性肝炎に対する新しい治療剤候補の培養細胞アッセイ系を用いた探索・評価. 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2007年7月.
 - 28 加藤宣之、阿部健一、森京子、有海康雄、團迫浩方、池田正徳. 全長HCV RNA複製細胞の長期培

- 養により生じるHCVの遺伝的多様性. 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月.
- 29 團迫浩方、池田正徳、阿部健一、森京子、有海康雄、加藤宣之. 全長HCV-RNAの複製レベルを指標として生細胞のままアッセイできる新しい抗ウイルス剤評価システム. 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月.
- 30 森京子、阿部健一、團迫浩方、有海康雄、池田正徳、加藤宣之. C型急性肝炎患者血清由来の1b型HCVレプリコン複製細胞株の樹立. 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月.
- 31 矢野雅彦、池田正徳、阿部健一、團迫浩方、大越章吾、青柳豊、加藤宣之. 日常的に摂取し抗HCV効果を有する栄養成分の全長HCV RNA複製細胞を用いた網羅的探索. 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月.
- 32 有海康雄、黒木美沙緒、阿部健一、團迫浩方、池田正徳、脇田隆宇、Didier Trono、加藤宣之. DNA損傷センサーATMとChk2はHCVのRNA複製に必要な宿主因子である. 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月.
- 33 有海康雄、黒木美沙緒、阿部健一、團迫浩方、池田正徳、脇田隆宇、加藤宣之. HCVのRNA複製に必要な宿主因子DDX3 DEAD box RNAヘリカーゼ. 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月.
- 34 Hussein H. Aly, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: A novel culture system for HCV infection and replication. 14th International symposium on hepatitis C Virus & related viruses. Glasgow UK, Sept, 2007
- 35 Kaku Goto, Koichi Watashi, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: The emergence of a cyclophylin inhibitor-resistant HCV variant with a mutation in NS5A. 14th International symposium on hepatitis C Virus & related viruses. Glasgow UK, Sept, 2007
- 36 村上善基、土方誠、下遠野邦忠: マイクロRNAを用いた新規HCV治療法の確立. 第66回日本癌学会学術総会、平成19年9月、横浜 2007
- 37 小原道法: スフィンゴ脂質とC型肝炎ウイルス複製. 第49回日本脂質生化学会 2007.6.5-6. 札幌

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

HCV 感染における宿主免疫応答回避機構の解析

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：HCV 感染による TLR シグナル伝達経路への干渉作用を検討するために、各 HCV 構造蛋白質及び非構造蛋白質領域を発現するマウスマクロファージ安定発現細胞株を樹立した。これらの細胞株に対する MyD88 依存的な TLR リガンド刺激に伴う炎症性サイトカイン及び MAPKs の活性化を検討したところ、NS5A 蛋白質を発現する細胞株にて特異的な阻害効果が認められた。さらに、293T 細胞内での免疫沈降実験の結果から、NS5A の ISDR 領域に TLR シグナルアダプター分子である MyD88 が相互作用することが確認された。これらのことから、TLR シグナル伝達経路への干渉作用に NS5A が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) は主に血液や血液製剤を介して生体内に侵入後、血流を介して肝細胞に感染するものと考えられている。しかしながら、感染後、HCV が生体の第一線の防御機構であるマクロファージ、NK 細胞及び樹状細胞 (DCs) などの免疫担当細胞の認識、排除を逃れ、如何にして肝組織で持続感染を成立させているかは明らかにされていない。また、実際に慢性 C 型肝炎患者においては DCs の機能低下 (T 細胞活性化能及びサイトカイン産生の抑制など) が報告されている。

近年同定された自然免疫認識受容体である Toll-like receptor (TLR) は、病原因子の侵入を感知する受容体であり、主に DCs などの免疫担当細胞において重要な役割を演じている。さらに、TLR を介したシグナル伝達系が DCs による innate immunity 及び adaptive immunity の発動成否にも重要であることが示唆されている。本研究では、HCV による免疫細胞の活性化機能の低下に及ぼす影響に対して、特に、TLR シグナル伝達経路に着目して解析を行った。

B. 研究方法

HCV 構造及び非構造蛋白質を発現するマウスマクロファージ安定発現細胞株を樹立し、各種 TLR リガンド (PGN, LPS, R-837 及び CpG DNA) 刺激に対する炎症性サイトカイン (IL-6) の産生 (ELISA 法) 及び MAPKs の活性化 (Immunoblot 法) を検討した。また、TLR シグナルアダプター分子群と HCV 蛋白質との相互作用を 293T 細胞内での免疫沈降実験にて検討した。さらに、相互作用分子との詳細な結合領域の決定を同様の手法にて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントを必要とする材料は含まれない。

C. 研究結果

HCV 蛋白質発現細胞株に対する種々の TLR リガンドの応答性を解析した所、NS5A を発現する細胞株にて炎症性サイトカインの産生抑制や ERK のリン酸化の阻害が特異的に認められた。293T 細胞内での免疫沈降実験の解析から、MyD88 と NS5A の特異的な相互作用が確認された。詳細な結合領域を検討した所、MyD88 は NS5A の ISDR 領域に、また、NS5A は MyD88 の N 末側の Death-Domain (DD) に結合することが確認された。MyD88 の DD 領域にはセリンスレオニンキナーゼである IRAK が相互作用することが知られており、NS5A を含めた 3 分子の共発現実験から、NS5A は IRAK の MyD88 へのリクルートを競合阻害することが示された。

D. 考察

慢性 C 型肝炎患者由来の DCs にて観察される TLR シグナル伝達経路の応答性の機序に、NS5A 蛋白質が関与している可能性が示唆された。ISDR はインターフェロン (IFN) の感受性規定領域としての指標や PKR (dsRNA 依存性プロテインキナーゼ) 分子との相互作用領域としても報告されているが、今回新たに TLR シグナル伝達経路の干渉作用に及ぼす領域である可能性も示唆された。

E. 結論

HCV NS5A 蛋白質が TLR シグナルアダプター分子である MyD88 と相互作用することで、TLR シグナル伝達

経路に干渉していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y. Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. PNAS, 2007, 104, 1661-1666.
- 2 Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. J. Virol., 2007, 81, 8953-8966.
- 3 Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells. J. Virol., 2007, 81, 8477-8487.
- 4 Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. J. Virol., 2007, 81, 8601-8612.
- 5 Yamamoto M., Uematsu S., Okamoto T., Matsuura Y., Sato S., Kumar H., Satoh T., Saitoh T., Takeda K., Ishii K.J., Takeuchi O., Kawai T., and Akira S. Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. J. Exp. Med., 2007, 204, 2233-2239.
- 6 Moriishi K., and Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. Rev. Med. Virol., 2007, 17, 343-354.

2. 学会発表

- 1 Shuhei Taguwa, Toru Okamoto, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with HCV NS5A and regulates HCV replication. 14th

International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, September 9-13, 2007.

- 2 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Xiaoyu Wen, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Enhancement of IP-10 expression via TLR signaling pathway in cells expressing HCV proteins. 同上。
- 3 Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Eiko Matsuo, Kensuke Suzuki, Itsuki Hamamoto, Tetsuo Yamashita, Kohji Moriishi, Kazuhito Fujiyama, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Ania Owsianka, Arvind H. Patel, Michael A. Whitt, and Yoshiharu Matsuura: Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding HCV envelope proteins. 同上。
- 4 Yoshio Mori, Kiyoko Okamoto, Toru Okamoto, Yasumasa Komoda, Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Intramembrane processing by SPP regulates membrane localization of HCV core protein and viral propagation. 同上。
- 5 Toru Okamoto, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: FKBP8 Plays a Crucial Role in the Replication of Hepatitis C Virus, HEP DART 2007, Hawaii, 9-13 December, 2007.
- 6 森石恆司、森屋恭爾、村田茂穂、田中啓二、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治: HCV コア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症における PA28 γ の役割: 第 43 回日本肝臓学会総会ワークショップ、東京、5 月 31 日-6 月 1 日, 2007.
- 7 田鍬修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスゲノム複製に関与する宿主蛋白質 B-ind1 の機能解析: 第 55 回日本ウイルス学会総会、札幌、10 月 21 日-23 日, 2007.
- 8 阿部隆之、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、審良 静男、松浦善治: C 型肝炎ウイルスによる TLR シグナル伝達経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上。
- 9 谷 英樹、菰田泰正、鈴木健介、山下哲生、稲田大彦、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: シュードタイプと組換え水疱性口内炎ウイルスを用いた C 型肝炎ウイルスの感染機構の解析、同上。
- 10 岡本 徹、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスゲノム複製における FKBP8 の役割、同上。
- 11 森 嘉生、岡本貴世子、岡本 徹、菰田泰正、鈴木哲朗、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼによるプロセッシングの生物学的意義、同上。
- 12 山下哲生、森 嘉生、森石恆司、李 天成、宮村

達男、武田直和、月原富武、吉村政人、松浦善治：
E型肝炎ウイルス様粒子の結晶化とX線結晶構造解析、同上。

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

樹状細胞の機能制御に基づく統合的免疫細胞療法の開発

分担研究者 考藤 達哉 大阪大学大学院医学系研究科樹状細胞制御治療学寄附講座准教授

研究の要旨：C型慢性肝疾患におけるHCVの持続感染成立、肝病変の進展には、HCVに対する免疫応答の低下が関与する。HCVによる免疫細胞機能低下の責任分子を明らかにすることで、それを標的とした新たな免疫制御療法の開発が可能となる。本年度は難治性C型慢性肝炎患者に対する抗ウイルス療法の治療効果に関与する免疫細胞マーカーの探索を行った。インターフェロン（IFN） α /リバビリン併用療法において、リバビリン添加によって樹状細胞のTh1誘導能が回復する症例では治療効果が高かった。またpeg IFN α /リバビリン併用療法においては、治療経過中のプラズマサイトイド樹状細胞の頻度が高く、終了時に樹状細胞機能が回復している症例は、終了後の再発率が低かった。以上の結果はIFN α によるHCV排除に樹状細胞が関与することを示しており、樹状細胞が免疫制御療法の標的となり得ることが明らかとなった。

A. 研究目的

本邦の肝癌の約8割はHCV感染による肝硬変を基盤として発生する。HCVの初感染時には約80%の症例で持続感染が成立する。慢性肝炎へ移行すると、HCVが自然に排除される可能性は極めて低く、肝硬変、肝癌へと進展する。従って肝発癌を予防するためには、1) 持続感染の成立を阻止すること、2) 慢性肝炎患者からHCVを排除することが重要である。C型慢性肝炎に対してpeg IFN α /リバビリン療法が導入され、難治例でも約50%の患者でHCVが排除できるようになった。しかし残りの50%は肝発癌の高リスク群として残されており、新たな治療法の開発が必要である。抗ウイルス薬は直接的なHCV増殖抑制作用以外に、免疫系の賦活作用を有している。本研究では抗ウイルス療法によるHCV排除の免疫応答の分子機構を解明し、その責任分子を標的とした免疫制御療法を開発することを目標とする。

B. 研究方法

セロタイプ1型・高ウイルス量のC型慢性肝炎患者を対象にした。末梢血より樹状細胞を分離しIFN α 、リバビリンを添加し、樹状細胞のサイトカイン産生能、Th1誘導能を非感染者と比較した。またpeg IFN α /リバビリン併用療法を施行した患者群において、治療経過中の樹状細胞サブセット、Th1、Th2細胞などの免疫細胞頻度、樹状細胞機能（T細胞刺激能）を解析し、治療効果との関連性を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は大阪大学医学部倫理委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える。

C. 研究結果

C型慢性肝炎患者では樹状細胞のIFN α 反応性Th1誘導能が低下していた。リバビリン投与により樹状細胞のTh1誘導能が回復する症例では、IFN α /リバビリン治療により高率にHCVが排除された。またpeg IFN α /リバビリン治療経過中、プラズマサイトイド樹状細胞の頻度が高く、樹状細胞のT細胞増殖能が維持されている症例では、治療後の再発率が低かった。

D. 考察

初感染時にHCVが自然排除された症例や、抗ウイルス療法によってHCVが排除された症例では、HCV特異的Th1反応が亢進していることが報告されている。Th1の誘導には樹状細胞が重要であり、本研究によってIFN α /リバビリンによる治療効果に樹状細胞機能が深く関与することが示された。IFN α 、リバビリンによる樹状細胞の機能修飾の分子機序、HCV感染の有無による差異に関しては今後の検討課題である。

E. 結論

抗ウイルス療法によるHCV排除に樹状細胞が関与しており、免疫制御療法の標的になりうることが明らかとなった。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

Itose, I., et al. Involvement of dendritic cell

frequency and function in virological relapse in pegylated interferon- α 2b and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. *J Med Virol* 2007. 79: 511-521

Miyatake, H., et al. Impaired ability of interferon- α -primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepatitis* 2007. 14: 404-412.

Jinushi, M., et al. Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4 CD25 T cells with PD-1-dependent regulatory activities. *Immunology* 2007. 120: 73-82.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特に予定なし

HCV による RIG-I の機能阻害機構の解析

分担研究者 竹内 理 阪大微研・准教授

研究の要旨：HCV RNA の細胞質内における認識にヘリカーゼ分子 RIG-I が関与することが明らかとなってきたが、RIG-I ファミリーにはMDA5、Lgp2 と言う蛋白質が存在する。Lgp2 の生体内における役割を Lgp2 欠損マウスを作製することにより解析し、Lgp2 が RIG-I、MDA5 によるウイルス認識に必須の分子であることが明らかとなった。

A. 研究目的

RIG-I は CARD 領域と RNA ヘリカーゼ領域からなり、HCV の認識に関与することが報告されている。RIG-I は IPS-1 蛋白質を介して細胞内にシグナルを伝え、I 型 IFN 産生を誘導する。RIG-I ファミリー分子 MDA5 は RIG-I とは異なるウイルス認識に関与することが知られている。RIG-I ファミリーには CARD を持たない Lgp2 が存在するがその RNA ウイルス認識における役割は十分に分かっていない。Lgp2 の生体内における役割を明らかにする目的で以下の研究を行った。

B. 研究方法

Lgp2 欠損マウスを作製し、解析を行った。Lgp2 欠損マウスより調製した線維芽細胞、樹状細胞を様々な RNA ウイルスを感染させ培養上清中に産生される IFN- β の産生を測定した。また、これまでに RIG-I、MDA5 により認識されることが明らかとなっている VSV、EMCV を Lgp2 欠損マウスに感染させ、生存率を検討した。

C. 研究結果

Lgp2 欠損マウスはメンデルの法則を下回って誕生し、その一部は胎生致死であった。誕生したマウス由来の樹状細胞や線維芽細胞からの EMCV 感染に対する IFN や IL-6 産生は野生型と比べ著明に低下していた。また、RIG-I により認識される VSV、Sendai Virus、日本脳炎ウイルス感染に対する IFN 産生も低下していた。また、EMCV、VSV を感染後 Lgp2 欠損マウスは野生型より早期に死亡し、Lgp2 がウイルス感染制御に重要な役割を果たしていることが示された。

D. 考察

Lgp2 は CARD を持たず、これまで RIG-I による RNA ウイルス認識を負に制御する分子と考えられてきた。しかし、本研究により Lgp2 も RIG-I、MDA5 によるウイルス認識を正に制御する事が明らかとなった。このウイルス RNA 認識の詳細はまだ明らかではない。更に、HCV の認識に Lgp2 がどのように関与している

かは今後の課題である。

E. 結論

RIG-I ファミリー分子である Lgp2 は RIG-I、MDA5 によるウイルス認識を正に制御し I 型 IFN 産生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Jung A, Kato H, Kumagai Y, Kumar H, Kawai T, Takeuchi O, Akira, S. Lymphocytoid choriomeningitis virus activates plasmacytoid dendritic cells and induces cytotoxic T cell response via MyD88. *J Virol.* 82:196-206, 2008
2. Takeuchi O, Akira S. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev.* 220:214-224, 2007
3. Kumagai Y, Takeuchi O, Kato H, Kumar H, Matsui K, Morii E, Aozasa K, Kawai T, Akira, S. Alveolar macrophages are the primary interferon- α producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity* 27: 240-252, 2007
4. Abe T, Kaname Y, Hamamoto I, Tsuda Y, Wen X, Taguwa S, Moriishi K, Takeuchi O, Kawai T, Kanto T, Hayashi N, Akira S, Matsuura Y. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A modulates TLR-MyD88-dependent signaling pathway in the macrophage cell lines. *J Virol.* 81: 8953-8966, 2007
5. Kawagoe T, Sato S, Jung A, Yamamoto M, Matsui K, Kato H, Uematsu S, Takeuchi O, Akira, S. Essential role of IRAK-4 protein and its kinase activity in Toll-like receptor-mediated immune

- responses but not in TCR signaling. *J Exp Med.* 204:1013-1024, 2007
6. Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol.* 20: 17-22, 2008
7. Goto A, Matsushita K, Gesellchen V, El Chamy L, Kutteneuler D, Takeuchi O, Hoffmann JA, Akira S, Boutros M, Reichhart JM. Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF-kappaB-dependent gene expression in *Drosophila* and mice. *Nat Immunol.* 9: 97-104 2008
8. Ishii, K. J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Uematsu, S., Takeuchi, O., Takeshita, F., Coban, C., Akira, S. Tank-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* 451:725-729, 2008
9. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446: 916-920, 2007
2. 学会発表
- 1 BMB2007 12/14/2007
- 2 第55回日本ウイルス学会学術集会 10/21/2007
- 3 第24回和漢医薬学会大会 9/8/2007
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

HCV 蛋白質による自然免疫センサーRIG-I の機能阻害：ウイルス持続感染と発癌機構に関する研究

分担研究者 藤田 尚志 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨：組換え RIG-I 蛋白質の生化学的解析並びに立体構造解明により、HCV の RNA は RIG-I のカルボキシル末端に存在する「塩基性のくぼみ」で認識されていることが示唆された。この部分に特異的に相互作用する化合物の探索、分子デザインが可能となり、新たな抗 HCV 薬の開発が可能となった。

A. 研究目的

HCV とインターフェロン系は深い関係にあり、インターフェロン系が機能している細胞では HCV の増殖が殆ど起きないこと、HCV はインターフェロン系を阻害する蛋白質をコードしてその作用が増殖に必須であることが知られている。特に宿主の自然免疫センサー RIG-I は HCV の RNA を感知することによりインターフェロン系を活性化する鍵となる分子である。この宿主による HCV の RNA の識別機構を明らかにすることを目的とした。このことは HCV がどのようにして免疫監視機構を逃れて持続感染を成立させ、ひいては肝癌を発症するのかを解明することになる。

B. 研究方法

組換え RIG-I 蛋白質をバキュロウイルスベクターと昆虫細胞を用いることによって大量生産、精製を行ない、その機能を試験管内での生化学的方法によって解析した。また、HCV RNA の認識を行なっているドメインの立体構造を NMR 法によって決定した。

C. 研究結果

- 1) 全長 RIG-I 蛋白質は比較的短い（最短 25 塩基対）二重鎖 RNA (dsRNA) または 5' 三リン酸を有する一本鎖 RNA (5' pppRNA) を特異的に認識したが、5' OH 一本鎖 RNA とは結合しなかった。
- 2) dsRNA および 5' pppRNA との結合により全長 RIG-I 蛋白質の ATPase 活性が強く誘導された。
- 3) 全長 RIG-I 蛋白質は 3' 一本鎖部分を有する dsRNA を解く、ヘリカーゼ活性を有している。
- 4) RNA の特異認識にはカルボキシル末端にあるドメイン (CTD) が行なっていることが明らかとなった。
- 5) CTD の立体構造を明らかにしたところ、特徴的な塩基性残基に富むくぼみが存在しており、NMR 滴定、アミノ酸置換体の解析等により「塩基性のくぼみ」が RNA を認識していると結論された。

D. 考察

HCV の RNA のうち 5' および 3' の非翻訳領域の塩基配列の保存が高く、この部分が RIG-I を活性化することが報告されている。今回の構造解析の結果と合わせて考察すると、非翻訳領域の 2 次構造及び 5' 末端の三リン酸が認識に深く関わっているものと考えられた。

E. 結論

RIG-I の CTD はセンサードメインそのものであり、HCV RNA はこの部分で感知されていると考えられる。天然あるいは人工化合物で、「塩基性のくぼみ」に結合するものは抗 HCV 薬剤として用いる可能性が強く示唆された。今回の構造決定によってそのような化合物の探索、分子デザインが可能となった。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Saito, T., Hirai, R., Loo., Yueh-Ming., D, Owen., C, L. Johnson., S., C. Shinha., Akira, S., Fujita T. and Gale Jr., M. : Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 582-587 (2007)
- 2 Onoguchi, K., Yoneyama, M., Takemura, A., Akira, S., Taniguchi, T., Namiki, H., and Fujita, T. : Viral Infections Activate Types I and III Interferon Genes through a Common Mechanism. J. Biol. Chem, 282, 7576-7581 (2007)
- 3 Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, Fujita T, Meurs E, Chignard M, Si-Tahar M. : Influenza A Virus Activates TLR3-Dependent Inflammatory and RIG-I-Dependent Antiviral Responses in Human Lung Epithelial Cells. J Immunol. 178, 3368-72 (2007)
- 4 Guo, Z., Chen, L.M., Zeng, H., Gomez, J.A., Plowden, J., Fujita, T., Katz, J.M., Donis, R.O. and Sambhara, S. : NS1 Protein of Influenza A

- Virus Inhibits the Function of Intracytoplasmic Pathogen Sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 36, 263-9 (2007)
- 5 Arimoto K., Takahashi H., Hishiki T., Konishi H., Fujita T., Shimotohno K.: Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 7500-5 (2007).
 - 6 Tasaka, M., Sakamoto, N., Itakura, Y., Nakagawa, M., Itsui, Y., Sekine-Osajima, Y., Nishimura-Sakurai, Y., Chen, C.H., Yoneyama, M., Fujita, T., Wakita, T., Maekawa, S., Enomoto, N. and Watanabe, M.: Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J. Gen Virol.* 88, 3323-3333 (2007),
 - 7 Takahashi K, Yoneyama M., Nishihori T., Hirai R., Kumeta H., Narita, R., Gale Jr. M., Inagaki F. and Fujita T.: Non-self RNA-Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. *Molecular Cell* (2007) in press
 - 8 Cui, S., Eisenächer, K., Kirchhofer, A., Brzozka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K-K., Krug, A. and Hopfner, K-P.: The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Molecular Cell* (2007) in press
 - 9 Fujita, T., Onoguchi, K., Onomoto, K., Hirai, R. and Yoneyama, M.: Triggering antiviral response by RIG-I-related RNA helicases. *Biochimie* 89, 754-60 (2007)
 - 10 Yoneyama, M. and Fujita T.: Function of RIG-I-Like receptors in antiviral innate immunity. *J. Biol. Chem.* 282, 15315-8 (2007)
 - 11 Yoneyama, M. and Fujita, T.: RIG-I family RNA helicases: Cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18, 545-51 (2007)
 - 12 Yoneyama, M. and Fujita, T.: Cytoplasmic double-stranded DNA sensor. *Nature Immunology* 8, 907-908 (2007)
 - 13 Onomoto, K., Yoneyama, M. and Fujita, T.: Regulation of Antiviral Innate Immune Responses by RIG-I Family of RNA Helicases. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 316, 193-205 (2007)
 - 14 小野口和英、米山光俊、藤田尚志: 細胞内ウイルスセンサーによるインターフェロン誘導機構 炎症と免疫 15(2): 167-172: 2007
 - 15 成田亮、米山光俊、藤田尚志: ウイルス感染に対するインターフェロン応答機構 蛋白質 核酸 酵素 増刊 52(10): 1187-1193: 2007
 - 16 尾野本浩司、米山光俊、藤田尚志: ウイルス感染における細胞内センシング機構 13-22 免疫応答と免疫病態の総合的分子理解 谷口維紹、山本一彦 編 南山堂
2. 学会発表
 - 1 藤田尚志: 抗ウイルス自然免疫機構制御するウイルスセンサー、RIG-I like receptor. 第13回広島肝臓研究会 2007. 5. 17 広島
 - 2 藤田尚志: ウイルスの複製を感知するCARDヘリカーゼ、RIG-Iファミリー 第3回神戸膠原病研究会 2007. 5. 25 神戸
 - 3 Fujita, T.: Sensing viruses and antiviral response. *Gordon Research Conferences: Viruses and Cells* 2007. 6. 5 Tilton School, Tilton NH USA
 - 4 小野口和英、米山光俊、審良静男、谷口維紹、藤田尚志: III型インターフェロンはI型インターフェロンと同じ転写制御を受ける 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2007. 7. 5-6 京都
 - 5 米山光俊、平井玲子、成田亮、藤田尚志: 細胞内ウイルス感染センサーRIG-Iによる非自己RNA認識のメカニズム 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2007. 7. 5-6 京都
 - 6 尾野本浩司、米山光俊、大島宏之、藤田尚志: RIG-I CARDのオリゴマー形成に夜シグナル伝達機構と生理的機能の解析 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2007. 7. 5-6 京都
 - 7 Fujita, T.: RIG-I family helicases: Cytoplasmic sensor for non-self RNA. *Viral Immunology Symposium* 2007. 7. 23 Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD USA
 - 8 藤田尚志: 抗ウイルス生体防御のセンサー、RIG-I like receptors. 第31回阿蘇シンポジウム 2007. 7. 27 熊本
 - 9 Fujita, T.: Non-self RNA Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. 3rd Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society 2007. 10. 5 Langenbeck-Virchow Auditorium, Berlin, Germany
 - 10 成田亮、平井玲子、米山光俊、藤田尚志: 細胞内ウイルス感染センサーRIG-Iによる非自己RNA認

識のメカニズム 第 30 回日本分子生物学会年会、
第 80 回日本生化学会大会 2007. 12. 11-15 横
浜

11 Fujita, T.: Regulation of interferon gene
expression and virus infection of the liver.

Hepatic Inflammation and Immunity. Jan. 25-27
2008 Moody Gardens Resort, Galveston, Texas

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし