

HCVによるIFNシステムの攪乱機構の解析

分担研究者 加藤宣之 岡山大学 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）によるインターフェロン（IFN）システムの攪乱機構の解明を目的として実験を行い、以下のような成果を得た。（1）ヒト不死化肝PH5CH8細胞内でHCVのNS3-4AはCardifを介するシグナル伝達経路をほぼ完全に抑制するが、TRIFを介するシグナル伝達経路を抑制することができない（2）TRIFを介するシグナル伝達経路を抑制できないのはNS3-4AがTRIFを切断できないものによる（3）HCV RNA複製細胞である0細胞においても、TRIFを切断しないことを確認した（4）肝病態の異なる患者由来のNS3-4A（15種類のHCV株）もCardifを介するシグナル伝達経路を抑制するが、TRIFを介するシグナル伝達経路を抑制することができないことを示した。以上の結果、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。

A. 研究目的

我が国における肝がんによる犠牲者は毎年3万人を超えており、その9割以上には肝炎ウイルスの感染が認められる。特に、C型肝炎ウイルス（HCV）の感染は肝がん患者の8割を占めている。HCVの持続感染状態であるC型慢性肝炎は肝細胞のがん化の重要な因子であるが、HCVによる持続感染機構およびそれに起因する肝発がん機構については未だよく理解されていない。

肝発がんを予防するためには、HCVを体内から排除して持続感染状態を脱することが必須であることが明らかになっている。しかしながら、C型慢性肝炎に対する有効な治療薬はインターフェロン（IFN）しかなく、我が国における治癒率も30%と低い。最近ようやく、IFNとの併用により効果を示すリバビリンやIFNの安定性を高めたペグIFNが登場してきているが、それでも治癒率は50%程度であり、依然として半数は難治性という状態が続いている。また、リバビリンには貧血などの副作用が高齢者を中心に目立つという問題もある。従って、HCVがどのような手段を使ってウイルスに対する宿主の防御機構（自然免疫機構）としてのIFNシステムを攪乱抑制しているのかを解明することができれば、IFNの治療効果の向上に大きく貢献できるものと考えられる。本研究では、HCVがどのような分子機構によりIFNシステムを攪乱しているかを明らかにすることを目的として以下に示すような実験を行った。

B. 研究方法

2本鎖RNAの添加および細胞内導入によるIFN- β 遺伝子プロモーターのレポーターアッセイ

（Dual-Luciferase Assay）は以下に示す方法により行った。

レポーターベクター等のトランスフェクションの前日に、PH5CH8細胞（或はHuH-7細胞）を1ウェルあたり 0.3×10^4 ずつ24ウェルプレートに蒔き込んだ。これらの細胞に、pCX4bsrレトロウイルス発現ベクター（NS3-4Aなど） $0.4 \mu\text{g}$ 、レポータープラスミド（pIFN- β (-125)-Luc） $0.1 \mu\text{g}$ およびpRL-CMV internal controlベクター 0.2 ng をFuGENE6を用いてトランスフェクションした。培養42時間後にpoly I:Cにより刺激を行った。

細胞外から刺激する場合は、poly I:Cを $50 \mu\text{g/ml}$ となるように、培地に添加し、6時間後にDual-Luciferase Assayを行った。一方、細胞内で刺激する場合は、poly I:C $1 \mu\text{g}$ をLipofectamine 2000を用いて、トランスフェクションし、6時間後にDual-Luciferase Assayを行った。

IRF-3の2量体については、回収した祖蛋白質画分をNative-PAGEにて分離して抗IRF3抗体により検出した。また、IRFのリン酸化の状態については、IRF-3の386番目と396番目のセリン残基のリン酸化を特異的に認識する抗体を用いて検出した。

RNA干渉法によるToll-like Receptor（TLR）familyの発現抑制はTLR3とTLR4特異的siRNAを用いて行った。TLR3のアダプター分子であるTRIFの発現抑制はTRIF特異的siRNAを用いて行った。コントロールとしてはルシフェラーゼ遺伝子のGL2用に化学合成したsiRNAを用いた。

アミノ末端部にMycタグを有するCardifを発現するようにアレンジしたpCX4purレトロウイルス発現ベクター（アミノ末端部にHAタグ、カルボキシル末

端部に Flag タグを有する Cardif を発現するようにアレンジした pCX4pur レトロウイルス発現ベクターも構築) を構築し、これらのベクターを PH5CH8 細胞に導入して Myc-Cardif (或は HA-Cardif-Flag) を発現させた。

また、アミノ末端部に Myc タグを有する TRIF や、これまでに報告されている NS3-4A による切断部位近傍のアミノ酸配列に近い配列に改変した TRIF 変異体を発現するベクターも同様に構築した。

細胞内で発現させた Myc-TRIF (或は TRIF 変異体) および Myc-Cardif 分子 (或は HA-Cardif-Flag 分子) の NS3-4A による切断状況については、抗 Myc 抗体 (或は抗 Flag 抗体) を用いたウェスタンブロット法により解析した。

HCV 陽性を示した各種病態由来の患者血清から、NS3-4A をコードする遺伝子領域を単離し、pCX4bsr レトロウイルス発現ベクターに導入した。これらの発現ベクターを用いて、IFN- β 誘導に対する抑制効果や Myc-TRIF および HA-Cardif-Flag 分子に対する切断状況についても同様に調べた。

NS3-4A を恒常的に発現する PH5CH8 細胞や O 細胞 (HCV RNA 複製細胞) および Oc 細胞 (O 細胞から IFN- α により HCV RNA を排除した治癒細胞) の内在性 Cardif の切断状況は抗 Cardif 抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。同様に、内在性 TRIF の切断状況は抗 TRIF 抗体を用いた IP-ウェスタンブロット法により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのため倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究成果

ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞は poly I:C の細胞内および細胞外刺激に応答して IFN- β の産生誘導を生じることが分かっている。これまでの実験により、HCV の NS3-4A は細胞内刺激による IFN- β の産生を抑制するが、細胞外刺激の場合には抑制できないことを見出している。今年度は、poly I:C の導入方法によるこのような顕著な違いを引き起こす分子機構を明らかにすることを目的として以下の実験を行った。

まず、PH5CH8 細胞の細胞外および細胞内 poly I:C 刺激により IRF-3 が活性化されているかどうかを調べた。その結果、poly I:C の細胞内や細胞外の刺激に関わらず、IRF-3 の 2 量化やリン酸化が生じていることがわかった。この結果から、IRF-3 より下流

は同一のシグナル経路をたどるものと考えられた。poly I:C の細胞内刺激による IRF-3 の 2 量化やリン酸化は NS3-4A のプロテアーゼ活性依存的に抑制されたが、poly I:C の細胞外刺激により生じた IRF-3 の 2 量化やリン酸化はやはり NS3-4A ではまったく抑制されなかった。これらの結果から細胞内刺激と細胞外刺激による違いは IRF-3 より上流に起因しているものと推測された。

次に poly I:C の細胞外刺激による IRF-3 の活性化が TLR3 を介するものであることを確認した。TLR3、TLR4 および TRIF 特異的 siRNA (機能することは確認済み) を PH5CH8 細胞に導入し、IFN- β 遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイを行った。その結果、TLR3 や TRIF 特異的 siRNA を導入した PH5CH8 細胞の場合で、poly I:C の細胞外刺激によるルシフェラーゼ活性が顕著に低下し、IRF-3 の 2 量体形成やリン酸化も顕著に抑制された。以上の結果から、poly I:C の細胞外刺激は TLR3 およびそのアダプタータンパク質である TRIF を介していることが示された。

これまでに、幾つかのグループより RIG-I (或は MDA5) のアダプター分子である Cardif が NS3-4A により切断され 2 本鎖 RNA の細胞内刺激によるシグナル伝達が抑制されることが示されている。一方、NS3-4A は 2 本鎖 RNA の細胞外刺激に関与する TRIF も切断して TLR3 からのシグナル伝達を抑制するという報告もある。

そこで、本研究では、これらの点を PH5CH8 細胞を用いて検証した。まず、細胞内で Cardif や TRIF を発現させた場合 NS3-4A が実際に Cardif や TRIF を切断してこれら分子の機能を無能化させるかどうかを調べた。

その結果、NS3-4A が発現している場合のみ、Myc-Cardif は他の研究グループの結果と同じく 508 番目のシステイン残基の位置で切断を受けていたが、Myc-TRIF は他のグループによる報告 (Proc. Natl. Acad. Sci., 102: 2992, 2005) とは異なり NS3-4A によってまったく切断されないことが分かった。

以上の結果から、poly I:C の細胞外刺激により活性化した TLR3 を介したシグナル伝達系を NS3-4A が抑制できないのは、NS3-4A が TRIF 分子を切断することができないためであると推察された。

TRIF 分子の NS3-4A による切断部位は論文 (Proc. Natl. Acad. Sci., 102: 2992, 2005) によると 372 番目のシステイン残基のところであるとされている。確かにこの部位近傍のアミノ酸配列は NS 蛋白質の切断部位や Cardif 分子の切断部位に似ている。しかし、切断部位から 6 アミノ酸上流の P6 位が酸性アミノ酸 (切断に重要) になっておらず、プロリンになっている。また、NS3-4A による切断のためには、切断部位上流の P6 位までに酸性アミノ酸が 2 残基以上必要

とされているが、TRIFの予想される切断部位上流には酸性アミノ酸がない。そこで、P6位やp6とp5位の両方に酸性アミノ酸を導入したTRIF変異体を細胞内で発現させNS3-4Aにより切断を受けるようになるかどうかを調べた。その結果、酸性アミノ酸を導入しても、NS3-4Aにより切断されることはないことが分った。

これまでの実験に使用してきたのは、ヘルシーキャリアー（無症候）由来のHCV株NS3-4Aであったことから、次に、肝病態の異なるHCV株由来のNS3-4Aを用いても我々がこれまで観察してきた現象が認められるかどうかを検討した。ヘルシーキャリアー、急性肝炎、慢性肝炎および肝がん患者由来の（計15名）NS3-4Aを用いて検討した。その結果、多少の程度の差はあるが、どのHCV株から得られたNS3-4AもCardifを介するシグナル伝達経路を効率よく抑制するが、TRIFを介するシグナル伝達経路を抑制しなかった。さらに、どのHCV株由来のNS3-4AもCardifは切断できるが、TRIFは切断しないという結果も得られた。これらの結果から、我々が最初に見出した現象はHCV株の特殊性によるものではなく、一般的現象であることが示唆された。

これまでの実験ではCardifやTRIFにタグを付加して強制発現させる方法を用いていたが、内在性のCardif本体がNS3-4Aにより切断を受けていることや内在性のTRIFが切断されていないことを確認する実験を次に行った。

PH5CH8細胞にNS3-4Aを発現させた場合と全長HCV RNA複製細胞である0細胞について、抗Cardif抗体と抗TRIF抗体を用いて調べた。その結果、予想どおり、PH5CH8と0の両細胞において、切断されたCardif分子とまったく切断されないTRIF分子が検出された。

D. 考察

Poly I:Cのような2本鎖RNAの細胞外刺激ではTLR-3およびそのアダプタータンパク質であるTRIFが活性化され、IRF3の活性化を経てIFN- β が産生されることになっている。この場合においても、NS3-4AはTRIF分子を切断して、このシグナル伝達をブロックするということが報告されている(Proc. Natl. Acad. Sci., 102: 2992, 2005)。しかしながら、本研究によりNS3-4AはTRIFを切断しないことが明らかになった。2005年に報告された上記論文との食い違いの原因は明らかではないが、本研究では、2種類の細胞（PH5CH8と0細胞）と15種類のNS3-4Aを用いて、いずれからも同様の結果を得たこと、NS3-4AによるCardif分子の切断は再現性よく確認できていることから、実験手技上のものとは考えにくい。

従って、NS3-4AによるIFN- β システムの攪乱は、

これまで考えられていたほど強力ではないことが示唆された。TLR3分子がまったく細胞表面に表出していない細胞の場合は、NS3-4AによりIFN- β 産生がほぼ完全に抑えられるものと考えられるが、今回用いた肝細胞株の場合には、その抑制は部分的なものとなることが予想される。また、TLR3分子が細胞表面に発現していることが予想される樹状細胞(HCVの感染増殖が起こると仮定した場合)ではほとんど抑制効果を持たないことが予想される。

一方、我々は同じPH5CH8細胞を用いて、HCVのコアとNS5BがNS3-4Aとは逆にIFNシステムを活性化する相反的現象を見出している。この現象がなぜ引き起こされるのか及びNS3-4Aとの関係もわかっていない。今後はこの現象を含めてHCV全蛋白質が存在する場合におけるHCVとIFNシステムとの関係を探る必要がある。

自然免疫システムを攪乱して無能化しようとするHCVに対抗する手段を得ることは、HCVの持続感染を断ち切ることができる可能性を示唆しており、今後も重要な研究課題であると考えられる。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 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).
- 2 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).
- 3 Ikeda M, Kato N. Modulation of host metabolism as a target of new antivirals. Adv. Drug Deliv. Rev. 59:1277-1289 (2007).
- 4 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).
- 5 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).
- 6 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).
 - 7 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).
2. 学会発表
- 1 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。
 - 2 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。
 - 3 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。
 - 4 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。
 - 5 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。
 - 6 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。
 - 7 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。
 - 8 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。
 - 9 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。
 - 10 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.
 - 11 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.
 - 12 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.
 - 13 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.
 - 14 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.
 - 15 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。
 - 16 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。
 - 17 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。
 - 18 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。

- 19 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。
- 20 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。
- 21 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。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

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

分担研究者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所准教授

研究要旨初代培養ヒト肝細胞に極めて類似した形質を有する、独自に樹立した不死化肝細胞を用いてヒト血清由来の C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染増殖を抑制する自然免疫機構の解析をおこなった。これまでに転写因子であるインターフェロン (IFN) 調節因子 (IRF) 7 の機能抑制により血清由来 HCV の感染増殖が効果的に亢進することを明らかにしていたが、通常 IFN シグナル系において IRF7 上流に位置する IRF3 の機能抑制はほとんど HCV の感染増殖に影響は認められなかった。この細胞にセンダイウイルスを感染させて IFN-a と b の各遺伝子転写プロモーターの活性化を解析したが、同様に IRF7 の機能抑制により双方の活性化が効果的に抑制された。IFN 受容体発現が認められず、IFN による細胞内 IFN シグナルが誘導できない肝癌由来細胞 Huh7 の垂株を用いて同様の解析をおこなっても IRF7 の抑制が IFN-a と b の各遺伝子転写プロモーター活性化を抑制した。このことはウイルス感染によって IRF3 活性化を介して IFN-b 遺伝子が発現誘導され、産生された INF-b が IFN 受容体を介して IRF-7 遺伝子を発現誘導し、シグナルをさらに下流へと伝えていくのではなく、ウイルスの感染は直接 IRF-7 の活性化を引き起こす可能性が考えられた。各種ヒト組織の RNA をノーザン法で検討した結果、ヒト肝臓においては IRF7 mRNA の高い発現が認められた。したがってヒト肝細胞ではウイルス感染防御のための自然免疫系において IRF-7 が主要な役割を果たしている可能性が考えられた。

A. 研究目的

血清由来 C 型肝炎ウイルスが効率良く感染増殖する不死化肝細胞を用いて HCV の感染増殖機構を解析することにより、このウイルスの感染増殖を抑制する自然免疫機構の詳細を明らかにして、これを効果的に亢進させることによる抗 HCV 戦略構築を目指した。

B. 研究方法

1. 既に樹立している新規ヒト不死化肝細胞に対する患者血清由来 HCV の感染増殖を指標にして、この細胞におけるインターフェロン (IFN) シグナル系各因子の機能阻害実験をおこない、血清由来 HCV の感染増殖抑制に主要な役割を果たす因子の解析をおこなった。各因子の機能阻害にはそのドミナントネガティブ体の発現ならびに siRNA による mRNA 分解促進法を用いた。
2. IFN 受容体の発現が認められない肝癌由来レプリコン細胞およびその cured 細胞を樹立し、これらを用いて細胞外からの IFN による細胞内 IFN シグナルの活性化を排除することで細胞内にお

ける IFN シグナルの詳細な解析をおこなった。
(倫理面への配慮)

ヒト初代培養肝細胞作成は、京都大学附属病院移植外科においておこなわれた先天性代謝異常症患者への生体肝臓移植において切除された患者肝臓組織を用いておこなった。この研究はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認されたものである。肝臓提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題は無い。

C. 研究結果

1. IRF3 および IRF7 のドミナントネガティブ体の発現による機能抑制あるいは siRNA によるそれぞれの mRNA 量の低下によって検討したところ、ヒト不死化肝細胞においてウイルス感染による IFN-a 及び IFN-b 遺伝子の転写プロモーター活性化には IRF7 が重要な役割をもつことがわかった。
2. IFN 受容体が発現しておらず、細胞外からの IFN

刺激が細胞内に伝わらないHuH-7細胞を用いてもウイルス感染はRIG-Iを介したシグナル系でIFN- α 遺伝子の転写を誘導し、この活性化にもIRF7が主要な役割を果たしていることがわかった。

3. ヒト各組織からのRNAのノーザン法による解析結果では肝臓においてIRF7mRNAが高発現していることがわかった。
4. 本研究においてIFN受容体が発現しておらず、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において、恒常的活性型RIG-Iを発現させた場合でも、HCVサブゲノムレプリコン複製を抑制することがわかった。

D. 考察

1. 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。IRF7mRNA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- α だけでなくIFN- β 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- α と- β 双方を誘導発現する可能性が考えられた。
2. 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。

E. 結論

1. 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。
2. 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。

F. 研究発表

1. 論文

- 1) 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
- 2) 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

- 3) 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

- 4) 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

2. 学会発表

- 1) 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

- 2) Kaku Goto, Koichi Watashi, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: The emergence of a cyclophilin inhibitor-resistant HCV variant with a mutation in NS5A. 14th International symposium on hepatitis C Virus & related viruses. Glasgow UK, Sept, 2007

- 3) 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

G. 知的所有権取得状況

1. 特許取得

2007年9月26日出願、“肝炎ウイルスの増殖方法、及び肝炎ウイルス感染細胞を培養するための中空糸並びにその利用” 発明者ならびに特許出願人：東洋紡績株式会社、山口達也、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人、下遠野邦忠、土方誠、出願番号：PCT/JP2007/068611

2. 実用新案登録 特になし。

3. その他 特になし。

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

分担研究者 小原道法（財）東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所 参事研究員

研究要旨：持続感染機序を解明するためにC型肝炎発症動物モデルを樹立した。スイッチング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。

A. 研究目的

HCV感染ヒト肝臓組織ではHCVが持続的に複製している。持続感染が成立する理由の一つとしてHCVに対して宿主側が免疫寛容状態になっていることが推測され、持続感染機序の解明にはC型肝炎発症動物モデルを用いて解析を行った。

B. 研究方法

HCVの持続感染成立機序、慢性肝炎・肝硬変・肝癌への推移機構解明の為に、病態モデルのトランスジェニック（Tg）マウス作製が行われてきた。HCV感染により近いモデルとして、任意の時期にHCV遺伝子をスイッチング発現することができるCre/loxP recombinant systemを用いたHCV構造蛋白質領域発現Tgマウス、HCV全長遺伝子発現Tgマウスを樹立した。

（倫理面への配慮）

動物実験は東京都臨床医学総合研究所の実験動物指針に基づいて行った。

C. 研究結果

pIpCを1日置きに3回腹腔内投与した。初回投与後0.5日目からHCV core蛋白質の発現が認められ、この発現は12ヶ月を過ぎても同レベルで維持され、慢性肝炎の症状を呈した。

D. 考察

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蛋白質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

スイッチング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 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)
- 2 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)
- 3 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)
- 4 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) 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. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：「抗ウイルス剤」、特願：2007-070028、発明者：小原道法、中川慎一郎、出願日：2007年3月19日、出願人：東京都医学研究機構、日本新薬株式会社

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	頁
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	谷口維紹, 山本一彦 編	免疫応答と免疫病態の総合的分子理解	南山堂	東京都	2007	13-22

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 PA28y in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis.	PNAS	104	1661-1666	2007
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.	81	8953-8966	2007
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.	81	8477-8487	2007
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.	81	8601-8612	2007
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.	204	2233-2239	2007
Moriishi K., and Matsuura Y.	Host factors involved in the replication of hepatitis C virus.	Rev. Med. Virol.	17	343-354	2007
Itose, I., Kanto, T., Inoue, M., Miyazaki, M., Miyatake, H., Sakakibara, M., Yakushijin, T., Oze, T., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N.,	Involvement of dendritic cell frequency and function in virological relapse in pegylated interferon-a2b and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients.	J Med Virol	79	511-521	2007
Miyatake, H., Kanto, T., Inoue, M., Sakakibara, M., Kaimori, A., Yakushijin, T., Itose, I., Miyazaki, M., Kuzushita, N., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N.,	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	14	404-412	2007

Kanto, T., Hayashi, N.	Innate immunity in hepatitis C virus infection: Interplay among dendritic cells, natural killer cells and natural killer T cells.	Hepatology Research	37	S319-S326	2007
Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Yamaguchi, S., Sakamori, R., Hiramatsu, N., Kanto, T., Ohkawa, K. and Hayashi, N.,	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	120	73-82	2007
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
Takeuchi O, Akira S.	Recognition of viruses by innate immunity.	Immunol Rev.	220	214-224	2007
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	240-252	2007
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
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
Takeuchi O, Akira S.	MDA5/RIG-I and virus recognition.	Curr Opin Immunol.	20	17-22	2008
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
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
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
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
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
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	3368-3372	2007

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	263-269	2007
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	7500-7505	2007
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
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	in press		
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	in press		
Fujita, T., Onoguchi, K., Onomoto, K., Hirai, R. and Yoneyama, M.	Triggering antiviral response by RIG-I-related RNA helicases	Biochimie	89	754-760	2007
Yoneyama, M. and Fujita T.	Function of RIG-I-Like receptors in antiviral innate immunity	J. Biol. Chem	282	15315-15318	2007
Yoneyama, M. and Fujita T.	RIG-I family RNA helicases: Cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity	Cytokine Growth Factor Rev	18	545-551	2007
Yoneyama, M. and Fujita, T.	Cytoplasmic double-stranded DNA sensor	Nature Immunology	8	907-908	2007
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
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	167-172	2007
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	52	1187-1193	2007
Dansako H, Ikeda M, Kato N.	Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes.	FEBS Journal	274	4161-4176	2007
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.	Journal of Pharmacological Sciences	105	145-150	2007
Ikeda M, Kato N.	Modulation of host metabolism as a target of new antivirals.	Advanced Drug Delivery Reviews	59	1277-1289	2007
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.	Journal of Virology	81	13922-13926	2007
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.	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	51	2016-2027	2007

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 Research	125	162-168	2007
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 Research	125	88-97	2007
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
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 cyclosporin	Microbiol. Immunol.	51	127-133	2007
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	1089-1097	2007
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
Tsunamasa Watanabe, Takuya Umehara, Fumihiko Yasui, Shin-ichiro Nakagawa, Junichi Yano, Tadaaki Ohgi, Satoru Sonoke, Kenichi Satoh, Kazuaki Inoue, Makoto Yoshida, Michinori Kohara	Liver target delivery of small interfering RNA to the HCV gene by lactosylated cationic liposome	J. Hepatology	47	744-750	2007
Tsunamasa Watanabe, Takuya Umehara, Michinori Kohara	Therapeutic application of RNA interference for Hepatitis C Virus	Advanced Drug Delivery Reviews	59	1263-1276	2007
Toshinori Totsugawa, Chen Yong, Jorge David Rivas-Carrillo, Alejandro Soto-Gutierrez, Nalu Navarro-Alvarez, Hirofumi Noguchi, Teru Okitsu, Karen A. Westerman, Michinori Kohara, Michael Reth, Noriaki Tanaka, Philippe Leboulch, Naoya Kobayashi	Survival of liver failure pigs by transplantation of reversibly immortalized human hepatocytes with Tamoxifen-mediated self-recombination	J. Hepatology	47	74-82	2007
Toshie Mashiba, Keiko Uda, Yasuko Hirachi, Yoichi Hiasa, Tomoya Miyakawa, Yoko Satta, Tsutomu Osoda, Sayo Kataoka, Michinori Kohara, Morikazu Onji	Identification of CTL epitopes in hepatitis C virus by a genome-wide computational scanning and a rational design of peptide vaccine	Immunogenetics	59	197-209	2007

Shin-ichiro Nakagawa, Takuya Umehara, Chiho Matsuda, Shusuke Kuge, Masayuki Sudoh, Michinori Kohara	Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice	Biochem. Biophys. Res. Commun.	353	882-888	2007
Kazuaki Inoue, Takuya Umehara, Urs T. Ruegg, Fumihiko Yasui, Tsunamasa Watanabe, Hiroshi Yasuda, Jean-Maurice Dumont, Pietro Scalfaro, Makoto Yoshida, Michinori Kohara	Evaluation of a Cyclophilin Inhibitor in Hepatitis C Virus-Infected Chimeric Mice In Vivo	Hepatology	45	921-928	2007
Masahiro Kitabatake, Shingo Inoue, Fumihiko Yasui, Shoji Yokochi, Masaaki Arai, Kouichi Morita, Hisatoshi Shida, Minoru Kidokoro, Fukashi Murai, Mai Quynh Leh, Kyosuke Mizuno, Kouji Matsushima, Michinori Kohara	SARS-CoV spike protein recombinant Vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in spite of pre-immunization with vaccinia virus	Vaccine	25	630-637	2007

2 ウイルス感染における細胞内センシング機構

尾野本浩司 米山光俊 藤田尚志

要旨

生体内に侵入してきたウイルスや細菌などを認識することは自然免疫を誘導する最初のステップである。この自然免疫で中心的な役割を担っているI型IFNはウイルス感染に伴い一過的に産生・分泌され細胞に抗ウイルス状態を誘導する。これまでの研究によって細胞にはウイルス感染を認識しI型IFNを誘導するセンサーが細胞外と細胞質内に独立に存在し機能していることが明らかにされつつある。近年細胞質内に存在しているRNAヘリカーゼであるRIG-I/MDA5がウイルス由来のRNAを特異的に認識するセンサーとして同定された。また最近、RIG-I/MDA5とは全く別の受容体が細胞質内のdsDNAを認識しI型IFNを誘導するという報告もされ注目を集めている。本章では細胞質内に存在するウイルス感染センサーの機能とシグナル伝達メカニズムについて最新の知見を交えて解説する。

キーワード

● 自然免疫 ● IFN ● RNAヘリカーゼ ● CARD

2-1 はじめに

われわれの体は、ウイルスや細菌を含む多種多様な病原体微生物の侵入に絶えずさらされている。これに対して高等脊椎動物には自然免疫と獲得免疫の2種類の免疫系が備わっており、迅速かつ正確な防御機構として働いている。獲得免疫は、T細胞やB細胞などのリンパ球による抗原特異性および記憶を特徴とする強力な免疫機構であるが、発動までに1週間以上の時間を要する。一方、自然免疫は昆虫から哺乳類までに幅広く存在し生体が先天的にもつ免疫機構で、感染後数時間以内に働く第一線の防御機構である。この二つの免疫系を調節する重要な役割をもっているのがインターフェロンinterferon (IFN) である。現在IFNは一次構造や作用する受容体の違いからI型、II型、III型にまで分類されており、自然免疫では複数のIFN- α と単一のIFN- β からなるI型IFNが感染直後に速やかに誘導される¹⁾。IFN産生にはATF/c-jun, IRF (IFN regulatory factor), NF- κ Bといった複数

の転写因子の関与が知られているが、すべてのIFN遺伝子のプロモーター配列にはIRFの結合配列が存在し、なかでもIRF-3/IRF-7がIFN遺伝子の発現に深く関わっている。分泌されたI型IFNは周囲の細胞に発現しているIFN受容体と結合し、JAK (Janus kinase)-STAT (signal transducer and activator of transcription) 経路を介して多種のIFN誘導遺伝子群IFN-stimulated genes (ISGs)の発現を誘導する²⁾。ISGsは細胞にウイルス増殖の阻害、アポトーシスの誘導などの抗ウイルス作用を誘導し、ウイルス感染の拡大を阻止する。さらにIFNは、樹状細胞やT細胞の成熟を誘導することにより獲得免疫の調節を行い、ウイルス感染に対する獲得免疫系をも制御している(図2-1)。

2-2 自然免疫を発動させる受容体

感染初期に非常に重要な働きを示す自然免疫は、どうやって病原体を認識しているのだろうか。

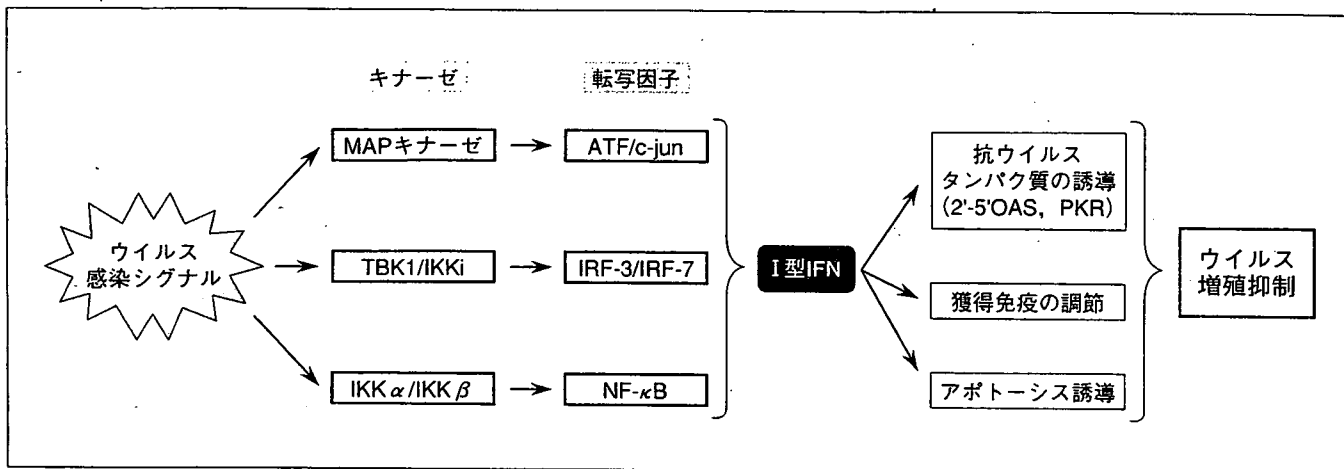


図2-1 ウイルス感染により誘導されるIFN遺伝子の発現

ウイルス感染によるシグナルは3種類のキナーゼ経路を介して、それぞれが異なる転写因子を活性化する。それらが協調して働きI型IFN産生が誘導される。I型IFNは感染した細胞だけでなく周囲の細胞にも働きかけ、獲得免疫の調節や抗ウイルス作用を細胞にもたらし、ウイルス感染の拡大を抑制する。

自然免疫における微生物認識機構は、獲得免疫のような高い特異性や親和性はもたないが、宿主側には存在しない微生物に特有な核酸やタンパク質などの微生物成分microbe-associated molecular patterns (MAMPs)を認識している。宿主にはこれらMAMPsを非自己と認識する受容体pattern recognition receptors (PRRs)が存在しこれまでに複数発見されている(図2-2)。このなかで最も解析が進んでいるのがマクロファージや樹状細胞などの一部の免疫系の細胞で発現しているToll-like receptor (TLR)ファミリーとよばれる一群の受容体である。TLRは細胞表面やエンドソームに発現し細菌、真菌、ウイルスなどのMAMPsを認識し、NF- κ Bなどの炎症性サイトカインやI型IFNを産生する³⁾。ウイル

ス特異的な核酸構造を認識しI型IFNを誘導するのはエンドソームに発現しているTLR3/7/8/9である。これらは細菌やウイルスもしくはウイルス感染によりアポトーシスを起こした細胞などが貪食によって取込まれ、その際に放出されるウイルス由来二本鎖RNA (double stranded RNA: dsRNA) や一本鎖RNA (single stranded RNA: ssRNA)、非メチル化DNAをそれぞれ認識している(詳細は他の章参照)。しかし、免疫系の細胞以外でもウイルス感染は起こり、TLR非依存的にIRF-3の活性化やIFN- β の産生が誘導されることから、ウイルス感染を認識する細胞質内PRRsの存在が予想されていた。これまで細胞質内に存在するPRRsとしてnucleotide-binding oligomerization domain (NOD)

キーワード解説

- **自然免疫**：多くの生物に先天的に備わっている免疫機構で、ウイルスや細菌などの病原微生物の侵入により発動され生体防御において第一線の防御壁として働く。
- **インターフェロン (IFN)**：ウイルス増殖を抑制する液性因子として約50年前に発見され、ウイルス感染などによって特異的、かつ一過的に発現が誘導される。IFN自身は直接ウイルス増殖を抑制する効果をもたないが、IFN受容体を介してさまざまな遺伝子の発現を誘導し抗ウイルス作用や抗腫瘍作用を示す。
- **RNAヘリカーゼ**：ATPの加水分解によって二本鎖RNAを一本鎖へ解く酵素として命名されている。生理的にはヘリカーゼ活性のみでなくRNAの構造変化をひき起こすことによって、転写・スプライシング・翻訳・RNA干渉などRNAが関与するさまざまな生命現象を制御していると考えられている。
- **CARD (caspase recruitment domain)**：Death-fold domainの一つでカスパーゼやそのアダプター分子に存在するドメイン。CARD同士の結合によってシグナルを伝達する。すべてのCARDが同じ機能をもつわけではなく、それぞれに特異性があり、アポトーシスやNF- κ Bの活性化などを誘導する。

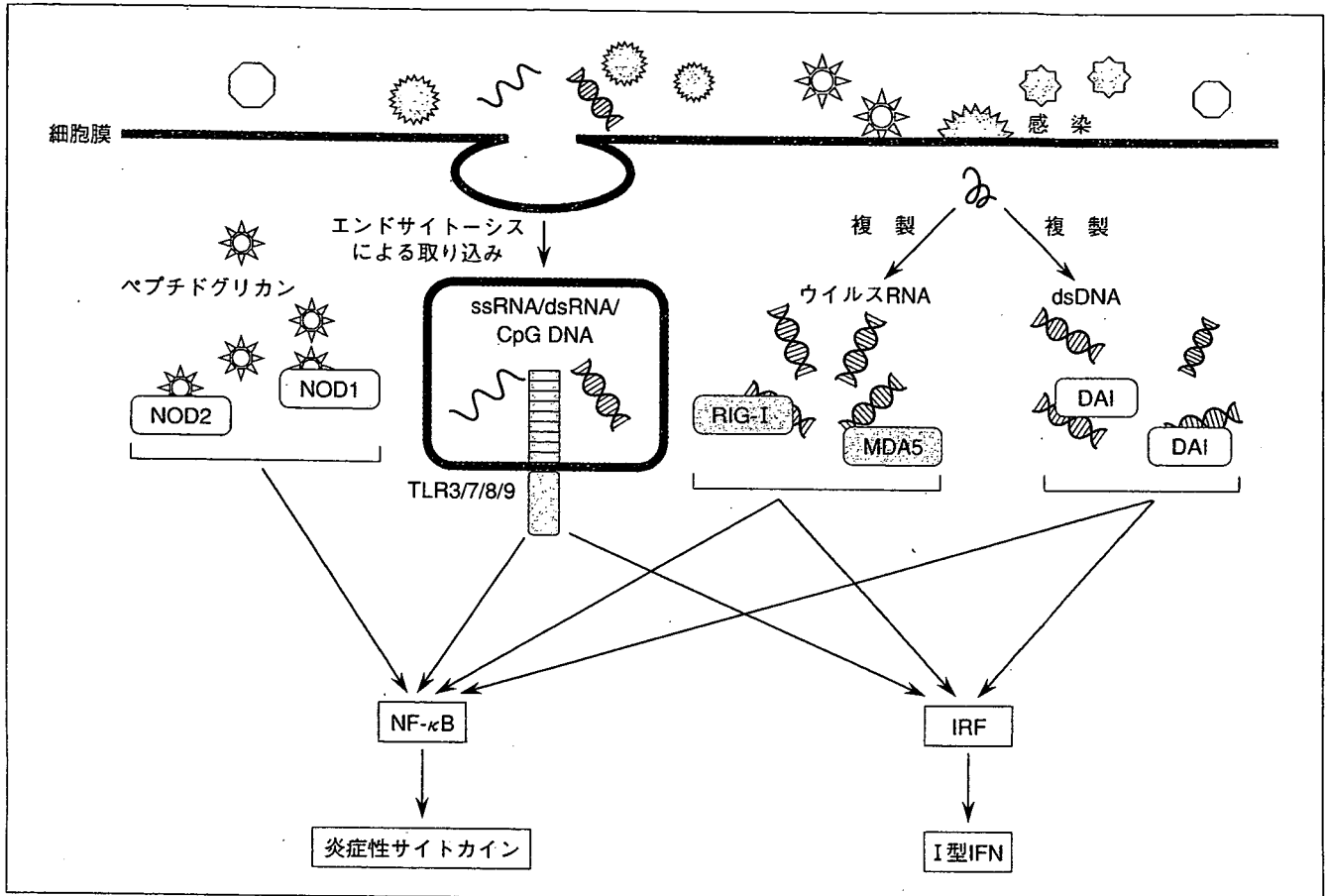


図2-2 細胞質内に存在する PRRs の感染認識とシグナル伝達経路
 NOD1/2は細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンを認識しNF-κBを活性化するが、IRFは活性化しない。TLRファミリーメンバーのうちエンドソームに発現しているTLR3はdsRNA、TLR7とTLR8はssRNA、TLR9は細菌DNAなどに多くみられる非メチル化CpG-DNAを認識しIRFとNF-κBの両方を活性化する。RIG-I/MDA5はウイルス複製の際に細胞質内に生じるdsRNAを認識し、IRFとNF-κBを活性化する。最近、dsDNAもIRFとNF-κBを活性化することが明らかにされつつあるが、詳しいシグナル伝達経路は不明である。

ファミリーとよばれる受容体が知られ、NOD1やNOD2は細菌の構成成分であるペプチドグリカンを認識する。また、NODを介したシグナルはNF-κBを活性化し炎症性サイトカインを誘導するがIRF-3は活性化しないことから、ウイルス感染を細胞質で認識しI型IFNを誘導する異なるシグナル経路の存在が示唆されていた。われわれは、2004年に発現クローニング法によって細胞質内のdsRNAを特異的に認識し、ウイルス感染センサーとして働くRIG-I(retinoic acid inducible gene-I)を同定した⁴⁾。また、MDA5(melanoma differentiation-associated gene 5)という非常に類似した分子も同様に細胞質内センサーとして機能していることも解明された⁵⁾。さらに最近、細胞質内dsDNAを感知するセンサーの存在を示唆する報告もされ^{6)~9)}、TLR非依存的にウイルス感染を認識しI型IFNを誘導する分子機構が明らかにされつつある。

2-3 ウイルス由来RNAを認識する受容体RIG-I/MDA5

1. RIG-I/MDA5の構造と機能

RNAヘリカーゼであるRIG-I/MDA5はN末端側にCARD(caspase recruitment domain)とよばれるシグナル伝達に関与するドメインを2回繰返してもち、C末端側にDEXH/DボックスをもつRNAヘリカーゼドメインをもつ分子である(図2-3)。全長のRIG-I/MDA5は細胞に強制発現させただけでは機能しないが、ウイルス感染刺激によるIFN産生を強く増強した。逆に、siRNAによってRIG-I/MDA5の発現を抑制するとウイルス感染に応答した一連の遺伝子群の発現が強く抑制されたことから、RIG-I/MDA5を介したシグナルがウイルス感染に応答した自然免疫において重要な役割を担っていることが明らかとなった。次にRIG-Iの変異体を作成しその機能ドメインの同定を行った(図2-4a)。

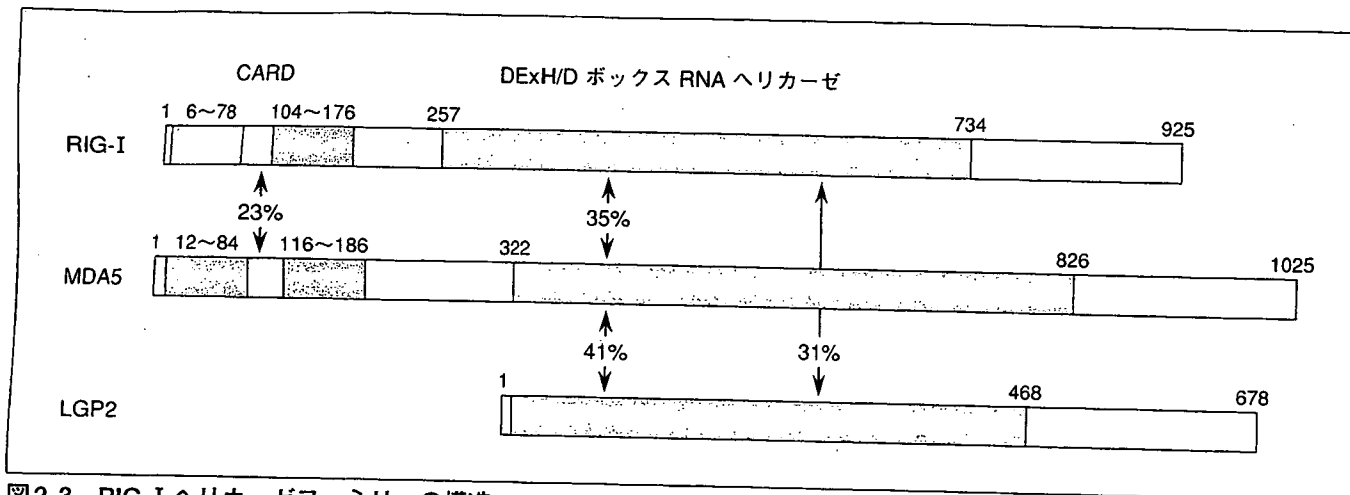


図2-3 RIG-I ヘリカーゼファミリーの構造

RIG-I/MDA5はC末端側のdsRNAを認識するヘリカーゼドメインと、N末端側の下流にシグナルを伝えるCARDを2回繰返してもった構造からなっている。一方、LGP2はCARDを欠損しておりシグナル伝達を抑制する働きがあることが示されている。%はそれぞれのアミノ酸の相同性を示している。

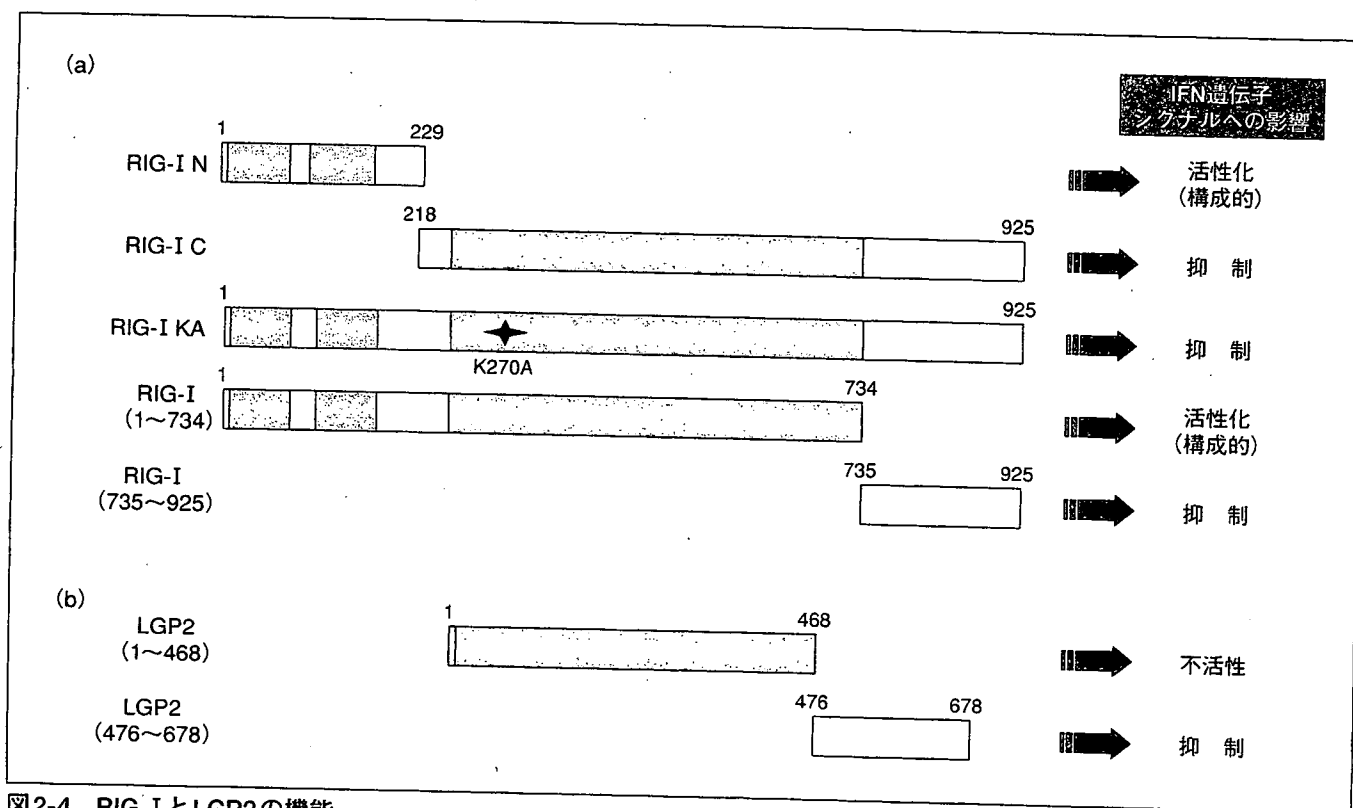


図2-4 RIG-IとLGP2の機能

(a) RIG-IのN末端側のCARDのみをもつRIG-I Nはウイルス感染刺激なしにIFNを構成的に産生する。これに対し、ヘリカーゼドメインのみをもつRIG-I CやATPaseを不活性化したRIG-I KAはドミナントネガティブに作用しウイルスによるIFN産生誘導を抑制する。またRIG-IのRD(アミノ酸735~925残基)をもたない変異体ではRIG-I N同様に構成的にIFNを産生するが、RDのみの発現では抑制されることが示された。(b) LGP2のRD(アミノ酸476~678残基)のみをもつ変異体ではIFN産生を抑制するが、RDをもたない変異体ではIFNシグナルを抑制できない。

ヘリカーゼドメインのみをもつRIG-I CやそのATPase活性が欠損したRIG-I KAは、ウイルス感染によるIFNシグナルに対してドミナントネガティブに働いた。このことはヘリカーゼのATPase活性がシグナル伝達に必須であることを示唆している。一方、RIG-IのCARDのみをもつ変異体RIG-I Nを

細胞に発現させるとウイルス感染刺激なしにIFN産生が誘導されたことからCARDを介してシグナルが伝達されている。ヒト肝臓癌細胞であるHuh7にHCVが感染してもHCV RNAはほとんど増殖することができないが、CARD内の55番目のスレオニンがイソロイシンに変異したRIG-Iを発現する

Huh7.5ではIRF-3が活性化できないことから、CARDを介してシグナルを伝達していることを示唆している¹⁰⁾。また最近、RIG-IのC末端部分(アミノ酸735~925残基)がRIG-Iのリプレッサードメイン(RD)であることが示された¹¹⁾。リプレッサードメインのみをもつ変異体ではIFNシグナルに対してドミナントネガティブに働くが、逆にリプレッサードメインを欠損した変異体を発現させた細胞ではRIG-I Nと同様に感染刺激なしにIFN産生が誘導された。さらにリプレッサードメインはRIG-IのCARDとヘリカーゼドメインの両方と結合する能力をもっていた。以上より、通常RIG-IはヘリカーゼドメインとCARDがリプレッサードメインとの結合により不活性型で存在している。ウイルス感染によって細胞質内にdsRNAが生じるとヘリカーゼドメインがそれを認識し、ATPase活性に伴う構造変化によりリプレッサードメインが外れCARDを露出させ下流へとシグナルを伝達していると考えられる。一方、MDA5のC末端部位(アミノ酸827~1025残基)のみをもつ変異体ではIFN- β のシグナルを抑制しなかったことから、MDA5は全く別の機構で不活性型となっていると考えられる。

2. RIG-I/MDA5からの下流のシグナル

RIG-I/MDA5はCARDを介してシグナルを下流へと伝達するため、そのアダプター分子もCARDをもつ分子と予想されていた。その予想通り四つのグループがほぼ同時に報告した分子IPS-1 (IFN- β promoter stimulator 1) / MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) / VISA (virus-induced signaling adaptor) / Cardif (CARD adaptor inducing IFN- β) はN末端側にCARDをもつ分子であった(本章では以下IPS-1と記載する。図2-5)¹²⁾。IPS-1ノックアウトマウスを用いた解析から、RIG-I/MDA5はI型IFNやIL-6などの発現をIPS-1依存的に誘導することが示された。またRIG-I NやRDを欠損した変異体はIPS-1のCARDと結合するが、全長のRIG-IやRDのみをもった変異体ではIPS-1と結合できなかったことから、IPS-1とのCARD同士の結合がシグナル伝達には必須であると考えられる。さらにIPS-1のC末端側には膜貫通ドメインが

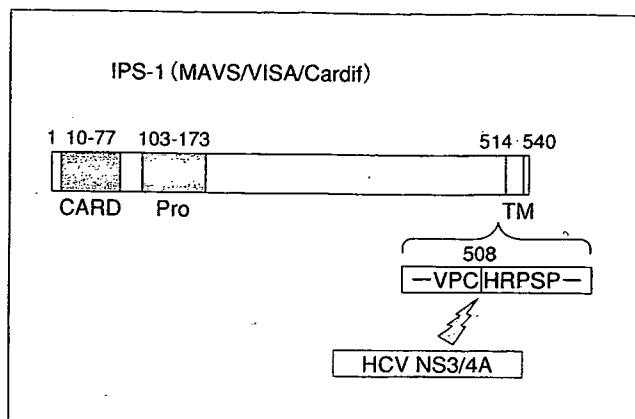


図2-5 アダプター分子IPS-1の構造

IPS-1はN末端側にCARDをもち、それに引き続きプロリンリッチ領域proline-rich domain (Pro)をもち、C末端側には膜貫通ドメインtransmembrane domain (TM)が存在する。IPS-1はTMを介してミトコンドリアに局在しシグナルを伝達している。HCVのもつタンパク質であるNS3/4AはC末端側のシステイン残基(Cys508)でIPS-1を限定分解し、ミトコンドリアから解離させシグナルを抑制する。

存在し、ミトコンドリアに局在することがシグナル伝達に必須であることも明らかとなった(後述)。ウイルス感染が生じるとIPS-1はミトコンドリア上でRIG-I/MDA5と結合し、RIP1, FADD, TRAF6をリクルートし、IKK $\alpha/\beta/\gamma$ の複合体が活性化されNF- κ Bの産生を誘導する。一方でTRAF3を介してTBK1/IKKiを活性化し、IRF-3/7のC末端側をリン酸化する。リン酸化したIRF-3/7はホモあるいはヘテロ二量体を形成し核内へ移行後、コアクチベーターであるCBP/p300との結合によりDNA結合能を獲得し、IFN遺伝子の転写誘導をひき起こす(図2-6)。産生されたI型IFNによってISGであるRIG-IとMDA5の発現量が増強され、強力なIFN産生シグナルが誘導され細胞内に抗ウイルス状態をもたらす。また、IPS-1はRIG-I/MDA5と異なり過剰発現によってIFN- β の産生が誘導されるため、通常状態ではIPS-1の機能を抑制する因子が存在していることが予測される。

3. RIG-I/MDA5によるウイルス認識の特異性

ではどうやってRIG-I/MDA5は自己と非自己のRNAを区別しているのでしょうか。またRIG-IとMDA5の機能は全く同じなのだろうか。これまでの*in vitro*での解析からRIG-I/MDA5は共にウイルス由来RNA、特にウイルス複製過程に生じる

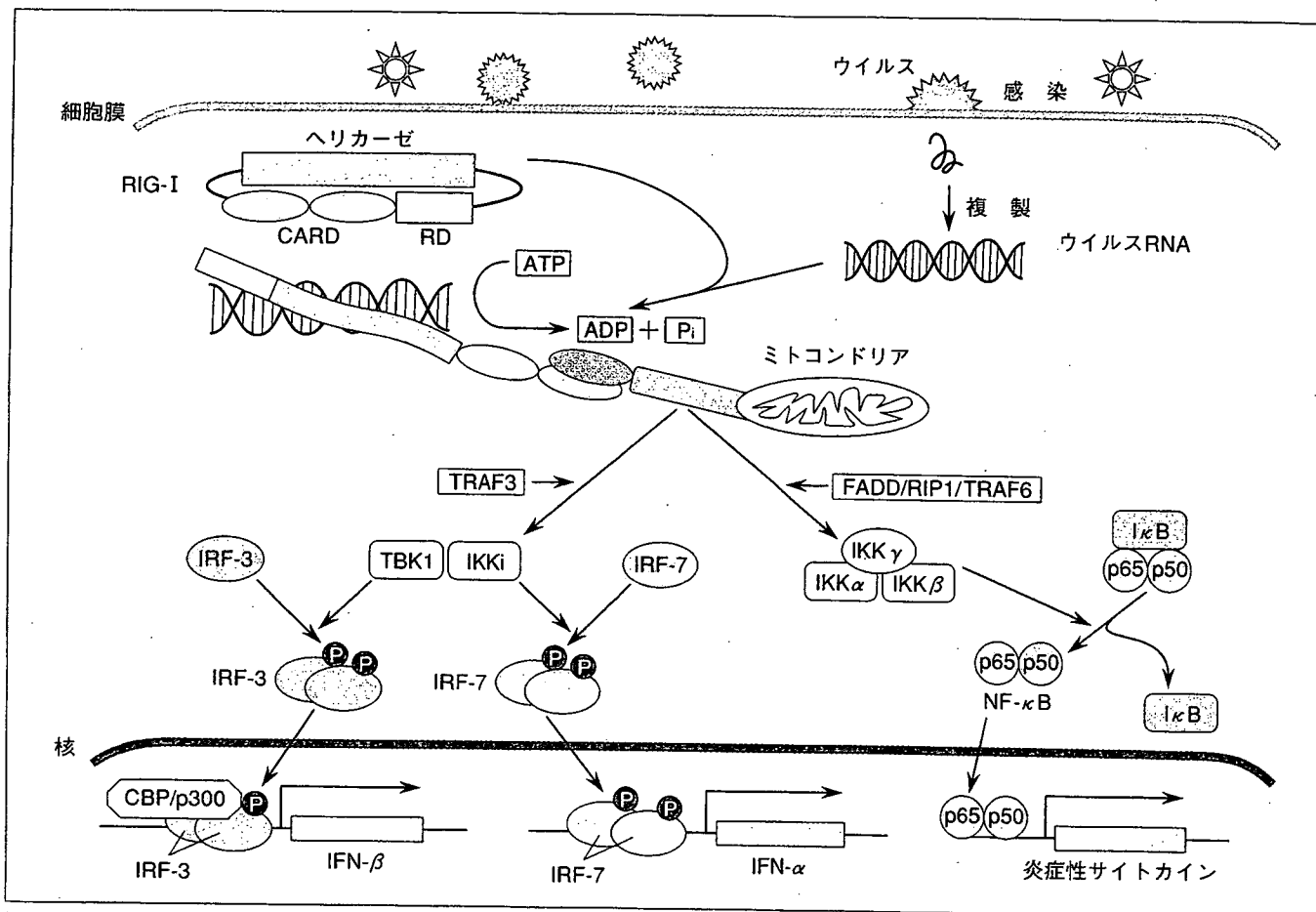


図2-6 RIG-IによるIFNシグナル伝達モデル

通常、RDとCARDの結合によって不活性化型で存在しているRIG-Iは細胞質内ウイルスRNAを認識すると、ATPase活性による構造変化によりRDが外れCARDを露出させる。活性化したRIG-Iはミトコンドリアに局在するアダプター分子であるIPS-1とCARDを介して結合し、TRAF3を介してTBK1/IKKi依存的にIRF-3とIRF-7を活性化しI型IFNを誘導する。一方、FADD/RIP1/TRAF6依存的にNF- κ Bも活性化し、炎症性サイトカインの産生を誘導する。

dsRNAを認識して、シグナルを伝達するため相補的に働くと考えられていた。しかし、それぞれのノックアウトマウスの解析によってRIG-I/MDA5は異なるRNAを認識すること、また細胞種の違いによる特異性をもつことが明らかとなった(図2-7)。

i) ウイルスの違いによる使い分け

RIG-I欠損細胞では*in vitro*で転写した50bp以上のdsRNAのトランスフェクションやNDV, SenVなどのパラミクソウイルス, VSV, HCVなどのラブドウイルスなどのRNAウイルス感染に対するIFN- β 産生が著しく抑制されていた。一方、MDA5はdsRNAの合成アナログであるpolyI:CやEMCV(encephalo myocarditis virus, 脳心筋炎ウイルス)などのピコルナウイルスに対する免疫応答に必須であったことから、両者が異なるRNAを認識することが示された¹³⁾。最近、ピコルナウイルスではウイルス複製の際に細胞質内にdsRNAが蓄積され

るが、他の多くのRNAウイルスがdsRNAを細胞質内に生じるわけではないことが示され、必ずしもRIG-Iがウイルス由来dsRNAを認識しているのではないことが示唆された。さらに興味深いことに、*in vitro*で合成された5'-リン酸RNAを細胞にトランスフェクションすると、RIG-Iを介してI型IFNが産生されることが報告され、5'-リン酸がRIG-Iによって認識されることが示された^{14), 15)}。一方で内在性RNAはmRNAのように7-メチルグアノシンによるキャップ(CAP)構造が付加されるなど、ほとんどのRNAがさまざまな修飾を受けることにより5'-リン酸をもたないことが知られており、RIG-Iに認識されないと考えられる。一方、MDA5によって認識されるピコルナウイルスのウイルスRNAは5'末端にウイルスタンパク質VPg(viral protein, genome-linked)が特異的に共有結合しているためRIG-Iには認識されず、MDA5が全く別の

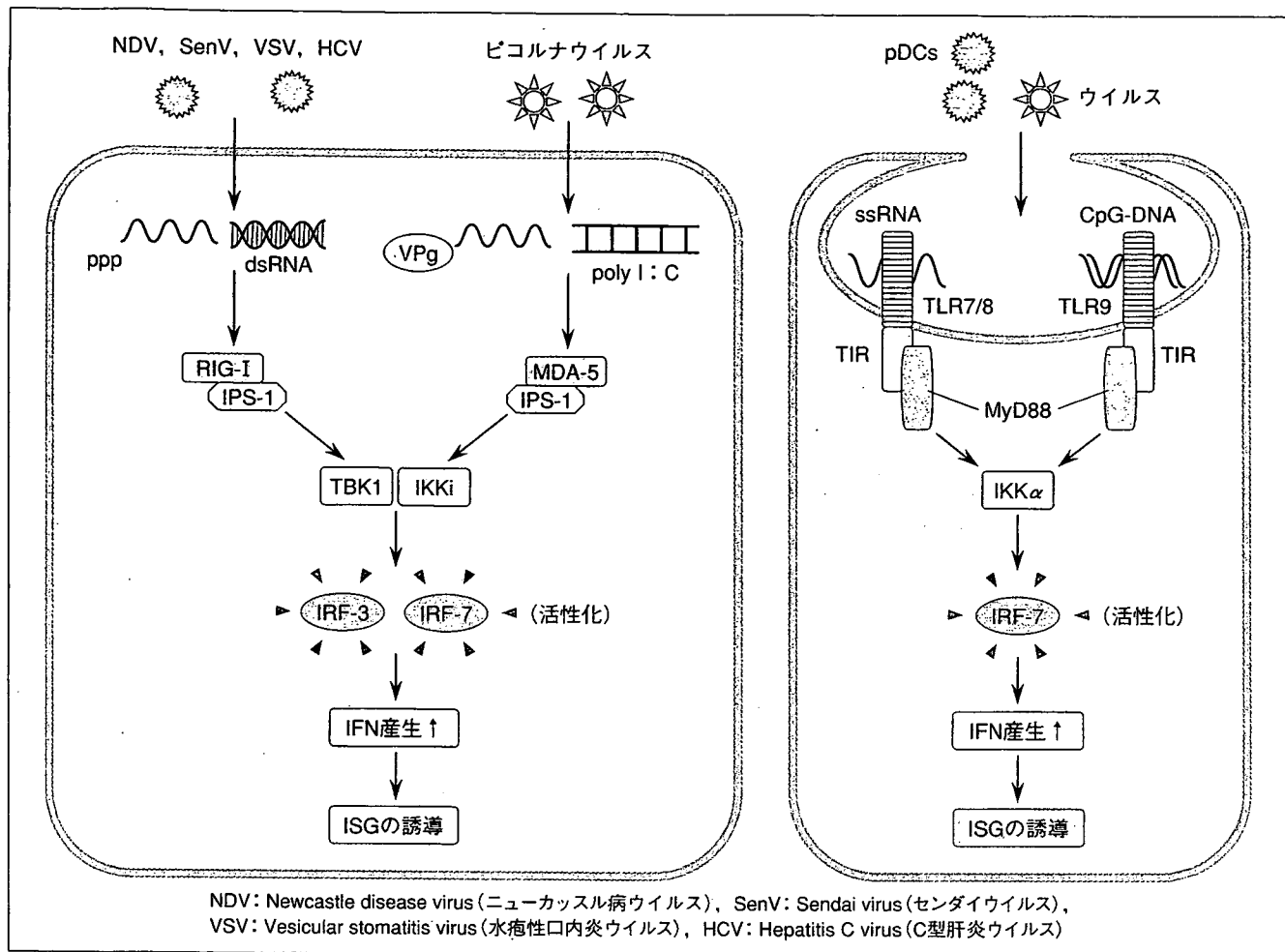


図2-7 細胞とウイルスの違いによる感染センサーの使い分け
 pDCsはウイルス由来の核酸をエンドサイトーシスで取込みTLR7/8とTLR9がssRNA, 非メチル化CpG-DNAをそれぞれ認識し, IKKα (IκB キナーゼα) を介してIRF-7を活性化しIFNを産生する. cDCsを含むその他の細胞ではRIG-IがHCV, SenV, NDVや5'-三リン酸をもつssRNAをMDA5がピコルナウイルスやpoly I : Cなどを細胞質で認識し, TBK1/IKKiを介してIRF-3/7を活性化しIFNを産生誘導する.

認識機構で認識していると考えられる。しかし細胞質内に豊富に存在している7SL RNAとよばれるRNAは5'-三リン酸をもつことから, RIG-IによるRNA認識には何か他の要素も関与していることが予測される。以上のことより, RIG-I/MDA5はそれぞれが相補的に働くわけではなく, 感染ウイルスの種類でそれぞれを使い分けてIFN誘導へ至るシグナルを伝達している。

ii) 細胞の違いによる使い分け

一方, ノックアウトマウスの解析から, 生体はウイルスが感染した細胞の違いによってRIG-I/MDA5とTLRを使い分けて感染を認識していることが明らかとなった¹⁶⁾。獲得免疫への誘導に重要な働きをもつ樹状細胞dendritic cells (DCs) の中でconventional DCs (cDCs) とよばれるサブセットでは, 繊維芽細胞などと同様にRIG-I/MDA5がIFN

産生において中心的な役割を担っている。一方で, 多量にIFN-αを産生することで知られる形質細胞様樹状細胞plasmacytoid DCs (pDCs) ではRIG-I/MDA5ではなくエンドソームに発現しているTLR7/8とTLR9がウイルス核酸 (ssRNA, CpG DNA) を認識しアダプター分子であるMyD88を介してIRF-7依存的にIFNを誘導していることが示されている¹⁷⁾。

4. RIG-I/MDA5からのIFNシグナルの沈静化機構

IFNは生体防御反応において重要な役割を担っているが, 過剰のIFN産生は逆に生体にとって大きなストレスとなるため, IFNシグナルは内在性システムによって厳密に制御されている (図2-7)。そのひとつは, 第三のRIG-Iファミリー分子であるLGP2が担っている (図2-3)。LGP2ヘリカーゼは