

200831016A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松浦 善治

平成21(2009)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 感染による肝炎慢性化機序の解明	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	15
HCV による自然免疫システムの攪乱機構の解析	池田 正徳	17
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	22
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	24
III. 研究成果の平行に関する一覧表		26
IV. 研究成果の刊行物・別冊		29

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

研究代表者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：HCV 感染細胞では CD44 による IP-10 の発現制御が、肝炎慢性化の抑制に重要である可能性が示唆された。C 型慢性肝炎患者においてミエロイド樹状細胞では TLR2、TLR4、RIG-I の発現は非感染者より高値であったが、TLR3、MDA5 は同等であった。RIG-I とそのファミリーである MDA5 がそれぞれ、短鎖、長鎖の二本鎖 RNA を認識することを明らかにした。また、立体構造解析の成績を基に作り出した抗 RIG-I 抗体はウイルス感染細胞での RIG-I の局在の変化を検出できるプローブを開発した。NS5B を発現させた不死化肝細胞では二本鎖 RNA が合成され、それが認識されることにより IFN- β が産生誘導されることを明らかにした。中空糸を用いてヒト不死化肝細胞を立体培養する新たな培養細胞系を用いた感染実験によって、患者血液の多様な HCV の感染増殖と自然免疫を含む種々の細胞応答を解析することが可能になった。スイッチング発現システムにより、急性肝炎、慢性肝炎から肝硬変、肝細胞がんを発症し、HCV 感染病態モデルマウスを樹立した。

研究分担者

考藤達哉 大阪大学院医学系研究科・准教授
竹内 理 大阪大学微生物病研究・准教授
藤田尚志 京都大学ウイルス研究所・教授
池田正徳 岡山大学院医学系研究科・准教授
土方 誠 京都大学ウイルス研究所・准教授
小原道法 都臨研・参事研究員

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 型慢性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 型慢性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 型慢性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 型慢性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 サブゲノムレプリコン細胞及び JFH1 感染細胞について、各種 TLR リガンド刺激後の CXCR3 の発現を Real-time PCR 法にて測定した。

（考藤）C 型慢性肝炎患者および非感染者の末梢血より MDC を分離し、TLR/RIG-I の発現を検討した。TLR3、TLR4 に特異的なアゴニストを用いて MDC を刺激し、サイトカイン産生を検討した。

（竹内、藤田）合成二本鎖 RNA ホモログ poly I:C や T7 ポリメラーゼにより合成した RNA、RNA ウィ

ルス由来の RNA を用い RIG-I、MDA5 欠損細胞を刺激、I 型 IFN 産生を検討した。RIG-I の立体構造解析の結果を基に抗 RIG-I 抗体を作製し、それを免疫染色に用いて HCV 感染細胞のどこに RIG-I が局在するか光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いて検討を行なった。

(池田、土方、松浦) 新規ヒト不活化肝細胞を中空糸で立体培養することにより、患者血清由来 HCV を効率よく感染増殖できる培養実験系を構築した。この実験系を用いて、異なる患者血清由来 HCV の感染増殖ならびに感染した細胞の反応の解析をおこなった。また、自然免疫のアダプター分子群 (TLR3, RIG-I, MDA5, Cardif, TRIF, MyD88, NAP1, IRF-3, IRF-5, IRF-7, TRAF3, TRAF6) の発現を siRNA で抑制した。

(小原) 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 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。このマウスを用いて、HCV 遺伝子発現後の経過を経時的に解析した。

(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) HCV サブゲノムレプリコン及び JFH1 感染細胞では、特に TLR2 リガンド刺激による IP-10 の産生亢進が顕著であった。さらに、TLR2 リガンド刺激において、CXCR3 リガンドの中で IP-10 が特異的に、また、用量依存的に産生誘導される事が示された。これらの成績から、HCV 感染細胞では、TLR2 のシグナル経路を介した IP-10 の産生亢進機構の存在が示唆された。DNA マイクロアレイを用いた解析から、IP-10 の産生亢進に関与している候補分子として、接着分子である CD44 を同定した。CD44 の発現ベクターの一過性導入により、HCV レプリコン細胞における TLR2 リガンド刺激による IP-10 の産生は抑制された。また、HCV レプリコン細胞では、TLR のネガティブレギュレーターとして知られる IRAKM の発現が恒常的に低下していることが示されたが、IRAKM の一過性発現では部分的な IP-10 の産生抑制のみが観察された。(松浦)

(2) C 型慢性肝炎患者 MDC における TLR2、TLR4、RIG-I の発現は非感染者より亢進していたが、TLR3、MDA5 の発現は同程度であった。TLR3、TLR4 アゴニスト刺激による MDC の IFN- β 、TNF- α 、IL-12p70 の産生

量は C 型慢性肝炎で低下していた。C 型慢性肝炎患者 MDC では MyD88、IPS-1 の発現は高値であったが、IRF3、IRF7、NF κ B、TRIF、TRAF6 の発現は低下していた。NS3/4A プロテアーゼ阻害剤の前処理により、C 型慢性肝炎患者 MDC では TRIF、TRAF6 の発現とサイトカイン産生能が回復したが、非感染者では変化は認められなかった。(考藤)

(3) Poly I:C は MDA5 欠損細胞において IFN 産生が低下したが、poly I:C の鎖長を短くすることにより MDA5 欠損細胞は正常に反応し、RIG-I 欠損細胞からの IFN 産生が著明に低下した。また、RIG-I により感染認識が行われるウイルス感染時にも二本鎖 RNA が産生されていることが明らかとなった。(竹内)

(4) RIG-I の立体構造解析の結果を基に作り出した抗 RIG-I 抗体はウイルス感染細胞での RIG-I の局在の変化を検出できるプローブとして使えることが判明した。様々な抗体の中で、このようなプローブとして使えるのはこの抗体だけであった。これを用いることによってウイルスセンサーが実際に細胞内のどこで機能しているのかを知ることが初めて可能となった。(藤田)

(5) NS5B による IFN- β の産生は TLR3 経路および RIG-I/MDA5 経路の活性化、さらには両経路の下流の転写因子 IRF-3 の活性化を経て誘導されることを明らかにした。NS5B による IFN- β の産生誘導は TRAF3 や TRAF6 のノックダウンにより亢進することを示した。PH5CH8 細胞において、NS5B は二本鎖 RNA を産生していることを示した。PH5CH8 細胞と比較して、HCV-RNA 複製細胞である O 細胞や OL 細胞の RIG-I、MDA5 および IPS-1 に機能異常を引き起こすようなアミノ酸変異は確認することはできなかった。(池田)

(6) ヒト血清由来の HCV が効率よく感染し増殖する新規不活化ヒト肝細胞を樹立し、遺伝子型 1b の感染増殖様式を検討した。その結果、遺伝子型 1b (土方)

(7) 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、肝硬変の症状を呈した。(小原)

D. 考察

CD44 は、ヒアルロン酸をリガンドとする I 型膜貫通受容体であり、また、接着分子としても機能して、主に活性化リンパ球の組織への接着や浸潤に関与していることが知られている。一方、TLR2 依存的な炎症性シグナルを負に制御することが遺伝子改変マウスを用いた実験により報告されている。しかしながら、HCV レプリコン細胞では、CD44 の一過性発現においてのみ、IP-10 の産生抑制が認められたことから、実際にはその機能発現が HCV により干渉されて

いる可能性が示唆された。これまでに、CD44のリガンドであるヒアルロン酸やファイブロネクチン、Heat shock proteinなどがTLR2依存的に炎症性シグナルを惹起することが知られているが、これらの内因性リガンドがIP-10の産生亢進や慢性肝炎の促進因子である可能性も考えられる。以上の成績から、HCV感染細胞では、TLRの負の制御因子であるIRAKMよりも、CD44を介したIP-10の発現制御が肝炎慢性化の抑制に重要である可能性が示唆された。

C型慢性肝炎患者MDCにおけるTLR系の機能低下が示された。これはDCがHCVなどの病原体を十分に感知できず、効果的に免疫系を活性化できない可能性を示唆している。C型慢性肝炎MDCではNS3/4A阻害剤によってサイトカイン産生能の回復効果が得られることから、同薬剤はHCV複製抑制のみならず、免疫賦活効果も期待できる可能性が示された。

Poly I:Cの鎖長を変えることによりMDA5リガンドからRIG-Iリガンドへと変化し、また、合成2本鎖RNAを用いた解析よりRIG-Iは短鎖2本鎖RNA、MDA5は長鎖2本鎖RNAの認識に重要であることが明らかとなった。また、MDA5により認識されるウイルス以外にRIG-Iにより認識されるウイルス感染細胞においても2本鎖RNAの産生が検出され、RNAウイルス感染時にもRIG-IとMDA5が異なる2本鎖RNA認識に関わると考えられた。

HCVの複製はこれまでウイルス抗原が油滴の周辺に局在することからこれらの場所で起きていると考えられてきた。今回の結果ではウイルスセンサーであるRIG-Iも同じ所に局在することが明らかとなり、RIG-Iはウイルス複製複合体を認識しうるということが初めて明らかとなった。

HCV NS5Bにより、ヒト不死化肝PH5CH8細胞内において産生される二本鎖RNAは、細胞質に局在するRIG-IやMDA5、あるいは細胞表面やエンドソームに局在するTLR3のような二本鎖RNA認識受容体のいずれによっても認識されることが明らかとなった。自然免疫システムを攪乱するNS5B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、今後の重要な研究課題であると考えられる。

遺伝子配列やIFN治療による反応性などから患者血液の天然のHCVは非常に多様であることが分かっていたが、今回中空糸を用いてヒト不死化肝細胞を立体培養する新たな培養細胞系を用いた感染実験によって、これら多様なHCVの感染増殖とそれらことなう種々の細胞側応答を観察することが可能になった。

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。

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。さらに、急性肝炎、慢性肝炎から肝硬変、肝細胞がんを発症し、感染者と同様な経過が認められた。

E. 結論

1. HCV感染細胞では、CD44によるIP-10の発現制御が、肝炎慢性化の抑制に重要な役割を演じている可能性が示唆された。
2. C型慢性肝炎患者MDCの機能低下にTLR3-TRIF-TRAF6の系が関与しており、HCVに対する免疫療法の治療標的になり得る可能性が示された。
3. RIG-Iリガンドの詳細、また、MDA5リガンドとの違いが明らかとなった。
4. HCVの増殖可能な細胞株の中でもRIG-Iのウイルス感知能力は機能していることから、その後の下流へのシグナルの重要さがクローズアップされてきた。用いた培養細胞(Huh-7.5株)ではRIG-Iからの下流へのシグナルが遮断されていると考えられる。RIG-Iの下流分子はミトコンドリア上に発現するIPS-1であり、ミトコンドリアを含んだオルガネラ間でのシグナル伝達が重要であることが判明した。
5. HCVのNS5BはHCV-RNAの複製にかかわらず、肝細胞にて二本鎖RNAを産生する能力があり、自然免疫システムを攪乱している可能性を示した。
6. 中空糸を用いてヒト不死化肝細胞を立体培養する新たな培養細胞系を用いた感染実験によって、患者血液の多様なHCVの感染増殖と自然免疫を含む種々の細胞応答を解析することが可能になった。
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. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 8349-8361 (2008).
2. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is

- critical for the production of infectious virus particles. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 7964-7976 (2008).
- 3 A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. Aizaki H., Morikawa K., Fukasawa M., Hara H., Inoue Y., Tani H., Saito K., Hanada K., Matsuura Y., Lai M.M.C., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 5715-5724 (2008).
 - 4 A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 3480-3489 (2008).
 - 5 Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. Tagawa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 2631-2641 (2008).
 - 6 Kanto T. Virus-associated innate immunity in liver. *Front Bioscience* 2008. 13. 6183-6192
 - 7 Miyazaki, M., et al. Impaired cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-I. *J Med Virol*, 80: 980-988 (2008).
 - 8 Kohga, K., et al. Serum levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, 99: 1643-1649 (2008).
 - 9 Toyama, T., et al. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma including recurrent cases: a study of 861 patients in a single institution. *J Clin Gastroenterol*, 42: 317-322 (2008).
 - 10 Kanada, A., et al. Early emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus in a patient with hepatitis B virus/human immunodeficiency virus coinfection. *Hepatology Res*, 38: 622-628 (2008).
 - 11 Kurashige, N., et al. Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of the YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine. *Hepatology*, 38: 450-456 (2008).
 - 12 Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S. recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*. 205, 1601-1610, 2008.
 - 13 Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev*. 227: 75-86, 2008.
 - 14 Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*, 456, 264-268, 2008.
 - 15 Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, Saitoh T, Kawai T, Takeuchi O, Akira S. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol*, 9, 684-691, 2008.
 - 16 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*. 29, 428-440 (2008).
 - 17 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*. 29, 169-179 (2008).
 - 18 Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., Akira, S. : Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*. 7, 1523-1527 (2008).

- 19 Yoneyama, M. and Fujita, T.: Structural Mechanism of RNA Recognition by the RIG-I-like Receptors. *Immunity* 29, 178-181 (2008).
- 20 M. Kuroki, Y. Ariumi, M. Ikeda, H. Dansako, T. Wakita, and N. Kato. Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of the glutathione redox system and oxidative stress. *J. Virol.* in press (2008).
- 21 Y. Ariumi, M. Kuroki, H. Dansako, K. Abe, M. Ikeda, T. Wakita, and N. Kato: ATM, a DNA damage sensor, is required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 82, 9639-9646 (2008).
- 22 H. Dansako, M. Ikeda, K. Abe, K. Mori, K. Takemoto, Y. Ariumi, and N. Kato: A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res.* 137, 72-79 (2008)
- 23 K. Mori, K. Abe, H. Dansako, Y. Ariumi, M. Ikeda, and N. Kato. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun.* 371, 104-109 (2008).
- 24 K. Hirano, T. Ichikawa, K. Nakao, A. Matsumoto, H. Miyaaki, H. Shibata, S. Eguchi, M. Takatsuki, M. Ikeda, H. Yamasaki, N. Kato, T. Kanematsu, N. Ishii, K. Eguchi. Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporin A, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells. *Liver. Transpl.*, 14:292-8 (2008).
- 25 M. Nakamura, H. Saito, M. Ikeda, S. Tada, N. Kumagai, N. Kato, K. Shimotohno, T. Hibi. Possible molecular mechanism of the relationship between NS5B polymorphisms and early clearance of hepatitis C virus during interferon plus ribavirin treatment. *J. Med. Virol.*, 80:632-639 (2008).
- 26 M. Ando, M. Korenaga, K. Hino, M. Ikeda, N. Kato, S. Nishida, I. Hidaka, I. Sakaida. Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication *Liver Int.* 28:1158-66 (2008).
- 27 Sakamoto N., Tanabe Y., Yokota K., Kohara M. and Watanabe M.: Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J. Gastroenterology Hepatology*, 23:1437-47 (2008).
- 28 Inubushi S., Nagano-Fujii M., Kitayama K., Kohara M., Sada K. and Hotta H.: Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J. Gen. Virology* 89: 1231-1242 (2008).
2. 学会発表
- 1 Hiroshi Kukihara, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human vesicle-associated membrane protein-associated protein subtype C inhibits HCV replication. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, October 5-9, 2008.
- 2 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: HCV infection induces IP-10 production through the TLR signaling pathway. 同上。
- 3 Hideki Tani, Takayuki Izumi, Hiroto Kanbara, Yuuki Kaname, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Ceramide plays a crucial role on the entry of Japanese encephalitis virus. 同上。
- 4 Yoshinori Tanaka, Yoshio Mori, Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of an indicator cell line that detects the replication of HCV in sera from hepatitis C patients. 同上。
- 5 Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Proteasome activator PA28g is required for efficient growth of hepatitis C virus. 同上。
- 6 松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製および病原性発現における Rip の役割: 第31回日本神経科学大会ワークショップ、東京、7月9-11日、2008.
- 7 Xiaoyu Wen, 阿部隆之、森石恆司、松浦善治: IRF7 dominant active 変異体による HCV 感染細胞における I 型 IFN の発現増強効果: 第14回日本遺伝子治療学会、札幌、10月21日-23日、2008.
- 8 山下哲生、宮崎直幸、森嘉生、森石恆司、李天成、宮村達男、武田直和、吉村政人、月原富武、松浦善治: 分解能 3.5 Å の E 型肝炎ウイルス様粒子の X 線結晶構造解析: 第56回日本ウイルス学会総会、岡山、10月26日-28日、2008.
- 9 田鍛修平、阿部隆之、森嘉生、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製における hB-ind1 のコシヤペロン活性、同上。

- 10 森石恒司, 松浦善治: C型肝炎ウイルス感染におけるプロテアソーム活性化蛋白質 PA28 γ の役割, 同上。
- 11 森 嘉生, 山下哲生, 嶋 亮一, 森石恒司, 李天成, 武田直和, 松浦善治: E型肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製, 同上。
- 12 谷 英樹, 泉 貴之, 寒原裕登, 要 祐喜, 森嘉生, 森石恒司, 松浦善治: 日本脳炎ウイルスの細胞侵入におけるセラミドの関与, 同上。
- 13 久木原 博, 森石恒司, 松浦善治: ヒトVAP-CはC型肝炎ウイルスの複製を抑制する, 同上。
- 14 阿部隆之, 温 小玉, 田中佳典, 寒原裕登, 谷英樹, 森石恒司, 松浦善治: C型肝炎ウイルス感染細胞特異的なIFNの誘導によるウイルス排除システムの構築, 同上。
- 15 阿部隆之, 要 祐喜, 森石恒司, 考藤達哉, 林紀夫, 松浦善治: C型肝炎ウイルス感染によるTLR経路を介した炎症性ケモカインIP-10の過剰産生, 同上。
- 16 田中佳典, 森 嘉生, 谷 英樹, 阿部隆之, 森石恒司, 巽 正志, 松浦善治: 患者血清中に存在するC型肝炎ウイルスの感染・複製を検出可能な指示細胞の樹立, 同上。
- 17 松浦善治: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に関与する宿主因子: 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, シンポジウム, 神戸, 12月9日-12日, 2008。
- 18 Kanto, T: NK and NKT-dendritic cell interactions in HCV infection Hepatic Inflammation and Immunity 2008 (Galveston, TX, USA 1.25-27 2008)。
- 19 Kanto, T: Dendritic cell as a versatile controller of innate and adaptive immune response against hepatitis C virus. The 10th International Symposium on Dendritic Cells (Kobe, Japan 10.1-5 2008)。
- 20 Miyazaki, M: Impaired TLR/RIG-I-mediated innate immunity in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C patients (同上)。
- 21 Sakakibara M: Novel mature dendritic cells inducible from monocytes with OK432, PGE1 and IFN- α serve as potent vaccine vehicles for gastrointestinal cancers (同上)。
- 22 Itose, I: Dynamic changes of regulatory T cell subsets in patients with chronic HCV infection in relation to the degree of liver inflammation. The Liver Meeting AASLD 59th Annual Meeting and Postgraduate Course (San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)
- 23 Takebe, S: IL-7 as a booster of Th2 differentiation by modulating myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection (同上)。
- 24 Kakita, N: Natural regulatory T cells as biomarker for the assessment of hepatocellular carcinoma in local ablation therapy (同上)。
- 25 International Endotoxin Society Meeting (Edinburgh)。
- 26 第8回あわじしま感染症・免疫フォーラム
- 27 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.
- 28 Fujita, T.: Non-self RNA Sensing Mechanism of RIG-I-Like Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. Keystone Symposia, Innate Immunity: Signaling Mechanisms. Feb. 24-29 2008 Keystone, Colorado.
- 29 藤田尚志: Discrimination of Self and Non-self RNA and Interferon: 第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2008.7.10 札幌
- 30 尾野本浩司, 米山光俊, 藤田尚志: RIG-I CARDオリゴマー形成によるシグナル伝達機構の解析: (同上)。
- 31 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-Like Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. XIV. International Congress of Virology, August 10-15 2008 Istanbul, Turkey.
- 32 Fujita T.: Non-self RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses.: 1st International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology Workshop on Human RNA viruses. 2008.9.30-10.3 Trieste, Italy.
- 33 Fujita T.: Mechanism of Foreign RNA Recognition in the Cytoplasm. 7th Joint Conference of the ISICR 2008.10.12-16 Montreal Quebec, Canada.
- 34 H. Dansako, Y. Ariumi, M. Ikeda, and N Kato. Modulation of dsRNA-induced IFN-beta and inflammatory cytokine productions by HCV NS3-4As derived from patients with different

- hepatic diseases. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 35 K. Abe, M. Ikeda, H. Tani, Y. Ariumi, H. Dansako, Y. Matsuura, N. Kato. Low permissive cell lines obtained from a high permissive HCV RNA replication cell line by negative selection system: A new strategy for identification of novel host factors. (同上).
- 36 K. Mori, K. Abe, H. Dansako, Y. Ariumi, M. Ikeda, N. Kato. New efficient replication system with HCV genome derived from a patient with acute hepatitis. (同上).
- 37 M. Ikeda, K. Abe, M. Kuroki, Y. Ariumi, H. Dansako, N. Kato. Identification of 5-HETE as the anti-HCV molecule among the arachidonic acid metabolites. 1(同上).
- 38 N. Kato, K. Mori, K. Abe, H. Dansako, Y. Ariumi, T. Wakita, M. Ikeda. A new human hepatoma cell line enabling persistent reproduction of HCV life cycle and assay for anti-HCV reagents. (同上).
- 39 Y. Kawai, M. Ikeda, K. Abe, M. Yano, Y. Ariumi, H. Dansako, K. Yamamoto, N. Kato. Genome-length HCV RNA replicating cells possessing IFN- α resistant phenotype for the development of relapse model. (同上).
- 40 Y. Ariumi, M. Kuroki, M. Ikeda, H. Dansako, T. Wakita, N. Kato. The vacuolar protein sorting pathway is essential for HCV budding. (同上).
- 41 K. Abe, M. Ikeda, Y. Ariumi, H. Dansako, T. Wakita, N. Kato. Cyclophilins A and B mediate the anti-HCV activity of cyclosporine A in 1b/2a chimeric replicon-harboring cells. (同上).
- 42 M. Kuroki, Y. Ariumi, M. Ikeda, H. Dansako, T. Wakita, N. Kato. Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of oxidative stress. (同上).
- 43 加藤宣之, 森 京子, 阿部健一, 團迫浩方, 有海康雄, 脇田隆宇, 池田正徳, 新しいヒト肝癌細胞株 Li23 を用いた HCV 生活環再現システム. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 岡山, 2008 年 10 月.
- 44 西村 剛, 池田正徳, 有海康雄, 團迫浩方, 中沢貴秀, 加藤宣之. 異なる HCV 陽性血清由来の 1b 型 HCV レプリコン複製細胞株の樹立と薬剤感受性の評価. (同上).
- 45 有海康雄, 黒木美沙緒, 團迫浩方, 阿部健一, 池田正徳, 脇田隆宇, 加藤宣之. DNA 損傷センサー ATM 及び Chk2 と HCV NS5B との相互作用. (同上).
- 46 團迫浩方, 有海康雄, 池田正徳, 加藤宣之. 二本鎖 RNA による IFN- β 及び炎症性サイトカイン産生誘導に対する肝病態の異なる HCV NS3-4A の影響. (同上).
- 47 黒木美沙緒, 有海康雄, 池田正徳, 團迫浩方, 脇田隆宇, 加藤宣之. 亜硫酸酸化ストレスを介して HCV RNA の複製を顕著に抑制する. (同上).
- 48 池田正徳, 阿部健一, 黒木美沙緒, 有海康雄, 團迫浩方, 加藤宣之. 抗 HCV 活性を示すアラキドン酸代謝産物 5-HETE の同定. (同上).
- 49 森 京子, 加藤宣之, 阿部健一, 有海康雄, 團迫浩方, 池田正徳. 新しいヒト肝癌細胞株 Li23 由来の全長 HCV-RNA 複製細胞を用いた薬剤評価システム. (同上).
- 50 阿部健一, 池田正徳, 有海康雄, 團迫浩方, 脇田隆宇, 加藤宣之. Cyclosporine A に対し抵抗性を示す 1b/2a キメラレプリコン. (同上).
- 51 河合良成, 池田正徳, 阿部健一, 矢野雅彦, 有海康雄, 團迫浩方, 山本和秀, 加藤宣之. IFN 抵抗性全長 HCV-RNA 複製細胞の特徴および有効な治療法を見出すための治療後再発モデルの構築. (同上).
- 52 池田正徳, 森 京子, 西村 剛, 阿部健一, 有海康雄, 團迫浩方, 中沢貴秀, 加藤宣之. 異なる 1b 型 HCV 陽性血清由来の全長 HCV RNA 複製レポーターアッセイ系の開発. (同上).
- 53 阿部健一, 池田正徳, 谷 英樹, 有海康雄, 團迫浩方, 松浦善治, 加藤宣之. HCV 複製に関与する宿主因子探索用細胞株の Negative Selection 法による樹立. (同上).
- 54 森 京子, 阿部健一, 團迫浩方, 有海康雄, 池田正徳, 加藤宣之. 急性 C 型肝炎患者由来の新しい C 型肝炎ウイルスゲノム複製系. 第 67 回日本癌学会総会, 名古屋, 2008 年 10 月.
- 55 池田正徳, 森 京子, 阿部健一, 西村 剛, 團迫浩方, 有海康雄, 中沢貴秀, 加藤宣之. 異なる HCV (1b 型) 株由来の全長 HCV RNA 複製レポーターアッセイ系の開発. (同上).
- 56 有海康雄, 黒木美沙緒, 團迫浩方, 阿部健一, 池田正徳, 脇田隆宇, 加藤宣之. ATM DNA 損傷センサーは C 型肝炎ウイルスの RNA 複製に必要である. (同上).
- 57 アリ フセイン, 齊月, 山口達哉, 下遠野邦 忠, 土方誠. 不死化肝細胞の中空培養によって再現した患者血清由来天然 HCV の感染増殖. 第 56 回

- 日本ウイルス学会学術集会 2008. 10. 26 岡山.
- 58 Hussein H Aly, Yue Qi, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: A prolonged culture system for the study of the entire life cycle and the pathogenesis of natural HCV infection, 第67回日本癌学会学術総会 2008. 10. 29 名古屋.
- 59 Hussein H Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Serum derived HCV infection, replication and particle production in immortalized primary human hepatocytes, XIVth International Congress of Virology 2008. 8. 12 Istanbul.
- 60 Hussein H Aly, Tatsuya Yamaguchi, Yue Qi, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Development of the novel in vitro system supporting the entire life cycle of natural HCV, 15th International Symposium Hepatitis C Virus & Related Viruses 2008. 10. 7 San Antonio.
- 61 関口 敏、飛田良美、千代智子、小原道法: 新規HCV持続感染モデルマウスの作製とその病態解析 第56回日本ウイルス学会学術集会、2008. 10. 26-28 岡山.

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

HCV 感染による肝炎慢性化機序の解明

研究分担者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：慢性C型肝炎患者における慢性的な肝炎の誘発には、CXCR3 リガンドファミリーに属する IP-10、MIG 及び I-TAC 等の炎症性ケモカインの関与が示唆されている。本研究では、慢性C型肝炎患者にて認められる CXCR3 リガンドの産生亢進機序における自然免疫認識受容体である Toll-like receptor (TLR) シグナル伝達経路の関与について検討した。HCV レプリコン及び JFH1 感染細胞では、TLR2 リガンド刺激後による IP-10 の産生亢進が顕著であった。さらに、TLR2 シグナル経路を介した IP-10 の産生亢進には、接着分子である CD44 による TLR2 シグナル伝達経路の制御機構の関与が示唆された。以上の成績から、HCV 感染細胞では CD44 による IP-10 の発現制御が、肝炎慢性化の抑制に重要である可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の感染による慢性肝炎の誘導には、CXCR3 リガンドファミリーに属する IP-10、MIG 及び I-TAC に惹起された細胞傷害性リンパ球や、活性化マクロファージの感染細胞巢への浸潤が密接に関与していると考えられているが、その分子機構は明らかにされていない。また、特に IP-10 は、インターフェロン(IFN)治療後のバイオマーカーとしても有用であり、慢性肝炎を経た後の病原性発現にも重要な役割を演じている可能性が示唆される。

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る事が知られている。また、病原微生物及びウイルス感染時における炎症性シグナル誘発のトリガーとしても機能する事が知られている。本研究では、慢性C型肝炎患者にて認められる CXCR3 リガンドの産生亢進機序に対して、TLR シグナル伝達経路の関与について検討した。

B. 研究方法

HCV サブゲノムレプリコン細胞及び JFH1 感染細胞について、各種 TLR リガンド刺激後の CXCR3 の発現を Real-time PCR 法にて測定した。また、ヒト肝細胞癌由来細胞株(Huh7)及びHCV サブゲノムレプリコン細胞における、TLR リガンド刺激による遺伝子発現の変動を DNA マイクロアレイ (Human Genome U133 Plus2.0: クラボウ) にて解析した。さらに、TLR シグナルアダプター分子である MyD88 をノックダウンした Huh7 細胞株を樹立し、JFH1 感染時における CXCR3 リガンドの産生に及ぼす影響を検討した。

(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 サブゲノムレプリコン及び JFH1 感染細胞では、特に TLR2 リガンド刺激による IP-10 の産生亢進が顕著であった。さらに、TLR2 リガンド刺激において、CXCR3 リガンドの中で IP-10 が特異的に、また、用量依存的に産生誘導される事が示された。これらの成績から、HCV 感染細胞では、TLR2 のシグナル経路を介した IP-10 の産生亢進機構の存在が示唆された。DNA マイクロアレイを用いた解析から、IP-10 の産生亢進に関与している候補分子として、接着分子である CD44 を同定した。CD44 の発現ベクターの一過性導入により、HCV レプリコン細胞における TLR2 リガンド刺激による IP-10 の産生は抑制された。また、HCV レプリコン細胞では、TLR のネガティブレギュレーターとして知られる IRAKM の発現が恒常的に低下していることが示されたが、IRAKM の一過性発現では部分的な IP-10 の産生抑制のみが観察された。

D. 考察

CD44 は、ヒアルロン酸をリガンドとする I 型膜貫通受容体であり、また、接着分子としても機能して、主に活性化リンパ球の組織への接着や浸潤に関与していることが知られている。一方、TLR2 依存的な炎症性シグナルを負に制御することが遺伝子改変マウスを用いた実験により報告されている。しかしながら、HCV レプリコン細胞では、CD44 の一過性発現に

おいてのみ、IP-10 の産生抑制が認められたことから、実際にはその機能発現がHCVにより干渉されている可能性が示唆された。これまでに、CD44 のリガンドであるヒアルロン酸やファイブロネクチン、Heat shock protein などがTLR2 依存的に炎症性シグナルを惹起することが知られているが、これらの内因性リガンドが IP-10 の産生亢進や慢性肝炎の促進因子である可能性も考えられる。以上の成績から、HCV 感染細胞では、TLR の負の制御因子である IRAKM よりも、CD44 を介した IP-10 の発現制御が肝炎慢性化の抑制に重要である可能性が示唆された。

E. 結論

HCV 感染細胞では、CD44 による IP-10 の発現制御が、肝炎慢性化の抑制に重要な役割を演じている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 8349-8361 (2008).
- 2 Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 7964-7976 (2008).
- 3 A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. Aizaki H., Morikawa K., Fukasawa M., Hara H., Inoue Y., Tani H., Saito K., Hanada K., Matsuura Y., Lai M.M.C., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 5715-5724 (2008).
- 4 A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 3480-3489 (2008).
- 5 Human butyrate-induced transcript 1

interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. Tagawa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 2631-2641 (2008).

2. 学会発表

- 1 Hiroshi Kukihiro, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human vesicle-associated membrane protein-associated protein subtype C inhibits HCV replication. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, October 5-9, 2008.
- 2 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: HCV infection induces IP-10 production through the TLR signaling pathway. 同上。
- 3 Hideki Tani, Takayuki Izumi, Hiroto Kanbara, Yuuki Kaname, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Ceramide plays a crucial role on the entry of Japanese encephalitis virus. 同上。
- 4 Yoshinori Tanaka, Yoshio Mori, Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of an indicator cell line that detects the replication of HCV in sera from hepatitis C patients. 同上。
- 5 Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Proteasome activator PA28g is required for efficient growth of hepatitis C virus. 同上。
- 6 松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製および病原性発現における Rip の役割: 第31回日本神経科学大会ワークショップ、東京、7月9-11日、2008.
- 7 Xiaoyu Wen, 阿部隆之、森石恆司、松浦善治: IRF7 dominant active 変異体による HCV 感染細胞における I 型 IFN の発現増強効果: 第14回日本遺伝子治療学会、札幌、10月21日-23日、2008.
- 8 山下哲生、宮崎直幸、森嘉生、森石恆司、李天成、宮村達男、武田直和、吉村政人、月原富武、松浦善治: 分解能 3.5 Å の E 型肝炎ウイルス様粒子の X 線結晶構造解析: 第56回日本ウイルス学会総会、岡山、10月26日-28日、2008.
- 9 田銀修平、阿部隆之、森嘉生、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製における hB-ind1 のコシヤペロン活性、同上。
- 10 森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルス感染におけるプロテアソーム活性化蛋白質 PA28 γ の役割、同上。
- 11 森嘉生、山下哲生、嶋亮一、森石恆司、李天成、武田直和、松浦善治: E型肝炎ウイルス様

粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製、同上。

- 12 谷 英樹、泉 貴之、寒原裕登、要 祐喜、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: 日本脳炎ウイルスの細胞侵入におけるセラミドの関与、同上。
- 13 久木原 博、森石恆司、松浦善治: ヒトVAP-CはC型肝炎ウイルスの複製を抑制する、同上。
- 14 阿部隆之、温 小玉、田中佳典、寒原裕登、谷 英樹、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルス感染細胞特異的なIFNの誘導によるウイルス排除システムの構築、同上。
- 15 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: C型肝炎ウイルス感染によるTLR

経路を介した炎症性ケモカインIP-10の過剰産生、同上。

- 16 田中佳典、森 嘉生、谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、巽 正志、松浦善治: 患者血清中に存在するC型肝炎ウイルスの感染・複製を検出可能な指示細胞の樹立、同上。
- 17 松浦善治: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に関する宿主因子: 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、シンポジウム、神戸、12月9日-12日、2008。

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

研究分担者 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C型慢性肝炎患者においてミエロイド樹状細胞（MDC）のウイルス感知機構（TLR、RIG-I）の発現と機能の解析を行い、その制御方法を検討した。患者MDCではTLR2、TLR4、RIG-Iの発現は非感染者より高値であったが、TLR3、MDA5は同等であった。TLR3リガンド（Poly I:C）刺激では、患者MDCのIFN- β 、TNF- α 産生能は低下していた。この機序として、TLR3のAdaptor分子であるTRIF、TRAF6の発現低下が関与する可能性が示唆された。HCV NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤によってTRIF、TRAF6発現とサイトカイン産生能が回復した。C型肝炎患者MDCの機能回復のためにTLR3系が標的となる可能性が示された。

A. 研究目的

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。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型肝炎に対してペグ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。またHCV NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤によって治療効果の更なる改善が期待されている。しかし治療抵抗症例に対しては、新たな治療法の開発が必要である。本研究ではHCVの免疫回避機構を解明し、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

C型肝炎患者および非感染者の末梢血よりMDCを分離し、TLR/RIG-Iの発現を検討した。TLR3、TLR4に特異的なアゴニストを用いてMDCを刺激し、サイトカイン産生を検討した。MDCにおけるシグナル伝達機構を明らかにするために、TLR/RIG-Iのアダプター分子や下流の転写因子を網羅的に多数例で検討した。MDCにHCV NS3/4A阻害剤を添加した後にTLRリガンド刺激を加え、シグナル伝達分子発現やサイトカインの産生能を比較した。

（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型肝炎患者MDCにおけるTLR2、TLR4、RIG-Iの発現は非感染者より亢進していたが、TLR3、MDA5の発現は同程度であった。TLR3、TLR4アゴニスト刺激によるMDCのIFN- β 、TNF- α 、IL-12p70の産生量はC型肝炎で低下していた。C型肝炎患者MDCではMyD88、IPS-1の発現は高値であったが、IRF3、IRF7、NF κ B、TRIF、TRAF6の発現は低下していた。NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤の前処理により、C型肝炎患者MDCではTRIF、TRAF6の発現とサイトカイン産生能が回復したが、非感染者では変化は認められなかった。

D. 考察

C型肝炎患者MDCにおけるTLR系の機能低下が示された。これはDCがHCVなどの病原体を十分に感知できず、効果的に免疫系を活性化できない可能性を示唆している。C型肝炎MDCではNS3/4A阻害剤によってサイトカイン産生能の回復効果が得られることから、同薬剤はHCV複製抑制のみならず、免疫賦活効果も期待できる可能性が示された。

E. 結論

C型肝炎患者MDCの機能低下にTLR3-TRIF-TRAF6の系が関与しており、HCVに対する免疫療法の治療標的になり得る可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanto T. Virus-associated innate immunity in liver. *Front Bioscience* 2008. 13. 6183-6192
- 2) Miyazaki, M., et al. Impaired cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-I. *J Med Virol* 2008. 80: 980-988.
- 3) Kohga, K., et al. Serum levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2008. 99: 1643-1649.
- 4) Toyama, T., et al. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma including recurrent cases: a study of 861 patients in a single institution. *J Clin Gastroenterol* 2008. 42: 317-322.
- 5) Kanada, A., et al. Early emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus in a patient with hepatitis B virus/human immunodeficiency virus coinfection. *Hepatol Res* 2008. 38: 622-628.
- 6) Kurashige, N, et al. Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of the YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine. *Hepatol Res* 2008, 38: 450-456.

2. 学会発表

- 1) Kanto, T: NK and NKT-dendritic cell interactions in HCV infection
Hepatic Inflammation and Immunity 2008
(Galveston, TX, USA 1.25~27 2008)

- 2) Kanto, T: Dendritic cell as a versatile controller of innate and adaptive immune response against hepatitis C virus

The 10th International Symposium on Dendritic Cells

(Kobe, Japan 10.1~5 2008)

- 3) Miyazaki, M: Impaired TLR/RIG-I-mediated innate immunity in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C patients (poster award)

The 10th International Symposium on Dendritic Cells

(Kobe, Japan 10.1~5 2008)

- 4) Sakakibara M: Novel mature dendritic cells inducible from monocytes with OK432, PGE1 and IFN- α serve as potent vaccine vehicles for gastrointestinal cancers (poster award)

The 10th International Symposium on Dendritic Cells

(Kobe, Japan 10.1~5 2008)

- 5) Itose, I: Dynamic changes of regulatory T cell subsets in patients with chronic HCV infection in relation to the degree of liver inflammation

The Liver Meeting AASLD 59th Annual Meeting and Postgraduate Course

(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

- 6) Takebe, S: IL-7 as a booster of Th2 differentiation by modulating myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection

The Liver Meeting AASLD 59th Annual Meeting and Postgraduate Course

(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

- 7) Kakita, N: Natural regulatory T cells as biomarker for the assessment of hepatocellular carcinoma in local ablation therapy

The Liver Meeting AASLD 59th Annual Meeting and Postgraduate Course

(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

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

研究分担者 竹内 理 阪大微研・准教授

研究の要旨：RIG-Iは、5' 3リン酸を介してHCVのpoly U/UC配列を認識すると報告されている。しかし、RIG-Iが2本鎖RNAを認識するのかが十分明らかではなかった。本研究では、RIG-IとそのファミリーであるMDA5がそれぞれ、短鎖、長鎖の二本鎖RNAを認識することを明らかにした。また、実際のウイルス感染細胞でもRIG-Iは二本鎖RNAの認識に関わる事が明らかとなった。

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の認識に関わることが報告されている。これに対し、RIG-IホモログであるMDA5はピコルナウイルス科のウイルス認識に重要であることが分かっている。MDA5は二本鎖RNAをRIG-Iは5' 3リン酸RNAの認識に関わることが報告されている。本研究ではRIG-IとMDA5により認識されるRNAの構造に関して検討を加えた。

B. 研究方法

合成二本鎖RNAホモログpoly I:CやT7ポリメラーゼにより合成したRNA、RNAウイルス由来のRNAを用いRIG-I、MDA5欠損細胞を刺激、I型IFN産生を検討した。

C. 研究結果

Poly I:CはMDA5欠損細胞においてIFN産生が低下したが、poly I:Cの鎖長を短くすることによりMDA5欠損細胞は正常に反応し、RIG-I欠損細胞からのIFN産生が著明に低下した。また、RIG-Iにより感染認識が行われるウイルス感染時にも二本鎖RNAが産生されていることが明らかとなった。

D. 考察

Poly I:Cの鎖長を変えることによりMDA5リガンドからRIG-Iリガンドへと変化し、また、合成2本鎖RNAを用いた解析よりRIG-Iは短鎖2本鎖RNA、MDA5は長鎖2本鎖RNAの認識に重要であることが明らかとなった。

また、MDA5により認識されるウイルス以外にRIG-Iにより認識されるウイルス感染細胞においても2本鎖RNAの産生が検出され、RNAウイルス感染時にもRIG-IとMDA5が異なる2本鎖RNA認識に関わると考えられた。

E. 結論

本研究によりRIG-Iリガンドの詳細、また、MDA5リガンドとの違いが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S. recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med.* 205, 1601-1610, 2008.
- 2 Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev.* 227: 75-86, 2008.
- 3 Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*, 456, 264-268, 2008.
- 4 Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, Saitoh T, Kawai T, Takeuchi O, Akira S. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol*, 9, 684-691, 2008.

2. 学会発表

International Endotoxin Society Meeting (Edinburgh)
第8回あわじしま感染症・免疫フォーラム

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

研究分担者 藤田 尚志 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨：昨年度までに明らかにした RIG-I の立体構造を基に、ウイルス認識に伴って露出すると考えられる RIG-I のエピトープを予測し、それに対する抗体を作製した。本年度はこの抗体を用いて、HCV の複製を宿主の免疫機構、特に RIG-I ファミリーのウイルスセンサーが認識する細胞内の場の解析を重点的に解析する。RIG-I の認識の場が明らかになれば、HCV の増殖を抑制する薬剤の開発に応用できるものと考えられる。

A. 研究目的

HCV 感染細胞の中でウイルスの増殖が起ったとき、宿主である肝細胞はそれを感知する機構をそなえている。本研究ではウイルス RNA が細胞のどこで感知されているのかを解明することを主目的としている。この「場」の解明は抗ウイルス薬の開発等に際して重要な情報となることが期待される。

B. 研究方法

RIG-I の立体構造解析の結果を基に抗 RIG-I 抗体を作製し、それを免疫染色に用いて HCV 感染細胞のどこに RIG-I が局在するか光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いて検討を行なった。

C. 研究結果

RIG-I の立体構造解析の結果を基に作り出した抗 RIG-I 抗体はウイルス感染細胞での RIG-I の局在の変化を検出できるプローブとして使えることが判明した。様々な抗体の中で、このようなプローブとして使えるのはこの抗体だけであった。これを用いることによってウイルスセンサーが実際に細胞内のどこで機能しているのかを知ることが初めて可能となった。

D. 考察

HCV の複製はこれまでウイルス抗原が油滴の周辺に局在することからこれらの場所で起きていると考えられてきた。今回の結果ではウイルスセンサーである RIG-I も同じ所に局在することが明らかとなり、RIG-I はウイルス複製複合体を認識しうるということが初めて明らかとなった。

E. 結論

HCV の増殖可能な細胞株の中でも RIG-I のウイルス感知能力は機能していることから、その後の下流へ

のシグナルの重要性がクローズアップされてきた。用いた培養細胞 (Huh-7.5 株) では RIG-I からの下流へのシグナルが遮断されていると考えられる。RIG-I の下流分子はミトコンドリア上に発現する IPS-1 であり、ミトコンドリアを含んだオルガネラ間でのシグナル伝達が重要であることが判明した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 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*. 29, 428-440 (2008)
- 2 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*. 29, 169-179 (2008)
- 3 Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, TS., Fujita, T., Akira, S.: Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*. 7, 1523-1527 (2008)
- 4 Yoneyama, M. and Fujita, T.: Structural Mechanism of RNA Recognition by the RIG-I-like Receptors. *Immunity* 29, 178-181 (2008)

- 5 Yoneyama, M. and Fujita, T.: RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunological Reviews* 227, 54-65 (2009)
2. 学会発表
- 1 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
- 2 Fujita, T.: Non-self RNA Sensing Mechanism of RIG-I-Like Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. *Keystone Symposia, Innate Immunity: Signaling Mechanisms*. Feb. 24-29 2008 Keystone, Colorado
- 3 藤田尚志: Discrimination of Self and Non-self RNA and Interferon: 第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2008.7.10 札幌
- 4 尾野本浩司、米山光俊、藤田尚志: RIG-I CARDオリゴマー形成によるシグナル伝達機構の解析: 第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2008.7.10 札幌
- 5 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-Like Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. XIV. *International Congress of Virology*, August 10-15 2008 Istanbul, Turkey
- 6 Fujita T.: Non-self RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses.: 1st *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology Workshop on Human RNA viruses*. 2008.9.30-10.3 Trieste, Italy
- 7 Fujita T.: Mechanism of Foreign RNA Recognition in the Cytoplasm. 7th *Joint Conference of the ISICR* 2008.10.12-16 Montreal Quebec, Canada
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

HCV による自然免疫システムの攪乱機構の解析

研究分担者 池田 正徳 岡山大学 准教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)による自然免疫システムの攪乱機構の解明を目的として行った実験において、ヒト不死化肝PH5CH8細胞内でHCVのNS5Bがインターフェロン(IFN)- γ の発現を誘導し、細胞周期S期の進行遅延を引き起こすことをこれまでに報告している。今年度はこのような現象を引き起こす分子メカニズムの解明に取り組み、以下のような研究成果を得た。(1)NS5BによるIFN- γ の産生はTLR3経路およびRIG-I/MDA5経路の活性化、さらには両経路の下流の転写因子IRF-3の活性化を経て誘導されることを明らかにした。(2)NS5BによるIFN- γ の産生誘導はTRAF3やTRAF6のノックダウンにより亢進することを示した。(3)PH5CH8細胞において、NS5Bは二本鎖RNAを産生していることを示した。(4)PH5CH8細胞と比較して、HCV-RNA複製細胞であるO細胞やOL細胞のRIG-I、MDA5およびCardif(/IPS-1/MAVS/VISA)に機能異常を引き起こすようなアミノ酸変異は確認することはできなかった。以上の結果より、NS5Bを発現させた不死化肝細胞では二本鎖RNAが合成され、それが認識されることによりIFN- γ が産生誘導されることを明らかにした。また、NS5BによるIFN- γ の産生誘導を負に調節するような分子も存在し、HCVとこれら分子との相互作用により自然免疫システムを攪乱している可能性が示唆された。

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の安定性を高めたベグ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IFNに抵抗性を示すのか、すなわち、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産生システムをHCVがどのように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産生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た。これまでにHCVのNS5BがIFN- γ の発現を誘導し、細胞周期S期の進行遅延を引き起こすことを報告しているが、本年度はNS5BによるIFN- γ の産生誘導を引き起こす分子メカニズムの解明に取り組み、以下のような研究成果を得た。

B. 研究方法

HCVのNS5B蛋白質を恒常的に発現するPH5CH8細胞(PH5CH8/NS5B細胞)の培養上清中の抗ウイルス活性は以下に示す方法により調べた。PH5CH8/NS5B細胞の培養上清(10mL、5日間培養)を全長HCV RNA複製細胞株であるOR6細胞に50mL添加し、3日後ルシフェラーゼ活性を測定することにより、HCV RNA複製量を定量した。

自然免疫機構に含まれる分子群(TLR3, RIG-I, MDA5, Cardif, TRIF, MyD88, NAP1, IRF-3, IRF-5, IRF-7, TRAF3, TRAF6)の発現抑制はそれぞれの分子に特異的なsiRNAを用いるRNA干渉法により行った。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。Oligofectamineを用いてトランスフェクション後、それぞれの細胞からtotal RNAを抽出し、定量的RT-PCR法により、IFN- γ やIL-6のmRNA量を定量した。

内在性のMDA5の多量化あるいはIRF-3の二量化形成については、回収した粗蛋白質画分を

Native-PAGEにて分離して、抗MDA5抗体あるいは抗IRF-3抗体により検出した。また、IRF-3のリン酸化の状態については、IRF-3の386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。

EGFP-IRF-3変異体ベクター(IRF-3の核局在シグナルに変異を導入したもの)を用いたIRF-3の二量体形成については、以下に示す方法により調べた。ベクター等のトランスフェクションの前日に、PH5CH8/NS5B細胞(或はPH5CH8細胞)を1ウェルあたり 2.0×10^5 ずつ6ウェルプレートに蒔き込んだ。これらの細胞に、EGFP-IRF-3変異体ベクターをトランスフェクションし、培養48時間後に粗蛋白質画分を回収した。PH5CH8細胞のみ培養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時間後に粗蛋白質画分を回収した。一方、細胞内で刺激する場合は、poly I:C $5 \mu\text{g}$ をLipofectamine 2000を用いてトランスフェクションし、6時間後に粗蛋白質画分を回収した。回収した粗蛋白質画分はNative-PAGEにて分離して、抗EGFP抗体により、IRF-3の二量体を検出した。

細胞内での二本鎖RNAは免疫蛍光抗体法により調べた。カバーガラス上に播種したPH5CH8/NS5B細胞(或はpoly I:C刺激を行ったPH5CH8細胞や全長HCV RNA複製細胞)に抗二本鎖RNA認識抗体を反応させた後、蛍光色素で標識した二次抗体を反応させた。その後、レーザー共焦点顕微鏡を用い、細胞内の二本鎖RNAを観察した。

また、ヒト不死化肝細胞:PH5CH8細胞、全長HCV RNAが持続的に複製している肝がん細胞株:0細胞(HuH-7細胞系)とOL細胞(Li23細胞系)、肝がん細胞株以外のがん細胞株:HEK293細胞とHeLa細胞のRIG-I、MDA5あるいはCardifの塩基配列を調べた。各細胞のtotal RNAをRT-PCR後、それぞれの分子を含む領域をクローニングした。少なくとも3クローン以上の塩基配列を調べ、各細胞間で比較した。

(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

ヒト不死化肝細胞株であるPH5CH8細胞ではHCVのNS5Bがインターフェロン(IFN)- β の発現を誘導し、細胞周期S期の進行遅延を引き起こす(他の不死化肝

細胞株であるNKNT-3細胞でもこの現象は確認されている)ことをこれまでに報告している。今年度はこのような現象を引き起こす分子メカニズムを明らかにすることを目的として以下の実験を行った。

最初に、NS5Bにより発現誘導されたIFN- β がその分子的機能を保持しているかをIFN- β の機能の一つである抗ウイルス能を指標として調べた。NS5B蛋白質を恒常的に発現するPH5CH8細胞(PH5CH8/NS5B細胞)の培養上清を全長HCV RNA複製細胞株であるOR6細胞の一部添加したところ、その複製が抑制されることがわかった。また、PH5CH8/NS5B細胞では、自然免疫機構に含まれ、IFNにより、その発現が誘導される分子であるRIG-I、MDA5、LGP2やIRF-7の発現が誘導されていた。従って、PH5CH8/NS5B細胞ではIFN- β がその分子的機能が保持されて産生していることがわかった。

次に、NS5BによるIFN- β の産生が自然免疫機構のどの分子を介在しているかを調べた。最初に、TLR3、RIG-IやMDA5などの二本鎖RNA認識受容体をRNA干渉法によりノックダウンしたところ、いずれもNS5BによるIFN- β の産生を抑制した。また、PH5CH8/NS5B細胞ではMDA5は多量化(活性化)されていた。

次に、TLR3のアダプター分子であるTRIF、RIG-IやMDA5のアダプター分子であるCardifをそれぞれノックダウンしたところ、前者ではNS5BによるIFN- β の産生には影響がなかったのに対して、後者では顕著に抑制された。また、TLR3/TRIF経路およびRIG-I/Cardif経路の両経路に関与することが報告されているNAP1のノックダウンによっても、NS5BによるIFN- β の産生は顕著に抑制された。

さらには、IFN- β の産生に重要な転写因子であるIRF-3およびIRF-7をそれぞれノックダウンしたところ、両者ともNS5BによるIFN- β の産生は抑制された。しかしながら、IRF-3が活性化されたときに起こる内在性のIRF-3の二量体は確認することができなかった。これまでの数々の報告から示唆されているIRF-3の活性化モデルによると、IRF-3はウイルス感染などにより、細胞質でリン酸化され、二量体を形成することが知られている。一方、この二量体は核移行し、IFN- β 遺伝子の転写を活性化した後、分解されることも報告されている。そこで、IRF-3の核局在シグナルに変異を導入した発現ベクターをPH5CH8/NS5B細胞に強制発現したところ、内在性のIRF-3とは異なり、二量体形成が確認された。従って、PH5CH8/NS5B細胞では活性化された内在性IRF-3は二量体形成後、核内でIFN- β 遺伝子の転写を活性化した後分解されている可能性が示唆された。

RIG-I/Cardif経路の活性化はIRF-3の活性化によるIFN- β の産生だけでなく、Cardif分子で分岐されて、NF- κB の活性化によるIL-6を代表とする炎症性サイトカインの産生が誘導されることが報告されて