

200933011A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松浦 善治

平成22(2010)年4月

目次

I.	総括研究報告		
	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		
	1. HCV 感染による肝炎慢性化機序の解明		
	松浦 善治		11
	2. 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		15
	3. HCV による RIG-I の機能阻害機構の解析		
	竹内 理		18
	4. 自然免疫センサー RIG-I による HCV 増殖阻害機構の解明と それを基盤にした抗 HCV 製剤の開発		
	藤田 尚志		20
	5. HCV による自然免疫システムの攪乱機構の解析		
	池田 正徳		22
	6. IRF7 を介した血清由来 HCV の感染増殖抑制機構の解明と それを応用した HCV 増殖抑制戦略の構築		
	土方 誠		26
	7. 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		29
III.	研究成果の刊行に関する一覧表		31
IV.	研究成果の刊行物・別刷 (別添)		32

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 持続複製細胞では、CD44 の発現がウイルスの複製依存的に亢進されており、CD44 と TLR2 を介した IP-10 の発現亢進機序が、肝炎慢性化に重要な役割を演じている可能性が示唆された。RIG-I と MDA5 は RNA ウイルス RNA を認識して I 型 IFN 産生を誘導するが、LGP2 は IFN 産生の抑制因子と考えられていた。しかしながら、LGP2 欠損マウスや LGP2 の ATPase 活性欠損マウスを用いて RNA ウイルス感染における I 型 IFN 産生を検討した結果、LGP2 はこれまでの報告とは異なり、RIG-I や MDA5 による IFN 産生を正に制御していることが明らかとなった。また、ウイルス感染による RIG-I の増殖部位への移動が、抗ウイルス活性の誘導に重要であることが示唆された。患者由来ミエロイド DC では TRIF や TRAF6 の発現が低下していたが、HCV プロテアーゼ阻害剤によって、これらの発現が増加し、サイトカイン産生能と T 細胞刺激能が回復した。中空糸を用いた不死化肝細胞による患者血液由来 HCV 感染系を用いて、HCV の感染により IFN の産生とウイルス増殖の抑制を検討した。NS5B を発現させた不死化肝細胞では 2 本鎖 RNA が合成され、それを認識することにより IFN β が誘導されることが示された。慢性肝炎状態の遺伝子改変マウスに HCV 蛋白質を発現するワクチニアウイルスを接種すると、組織の正常化が観察された

研究分担者

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
池田正徳 岡山大大学院医学系研究科・准教授
土方 誠 京大ウイルス研・准教授
小原道法 都臨研・副参事研究員

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 型肝硬変を基礎に発症する。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が開発が急務である。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や慢性 C 型肝炎患者由来の肝生検における CD44 の発現プロファイルを、Real-time PCR 法及び免疫プロット法により検討した。また、CD44、TLR2 及びそのシグナルアダプター分子である MyD88 をノックダウンした細胞株を樹立し、リポペプチドやヒアルロン酸の刺激に伴う IP-10 の産生亢進に及ぼす影響を検討した。

（考藤）セロタイプ 1 型・高ウイルス量で、ペグ IFN α /リバビル併用療法が導入された C 型慢性肝炎患者を対象とした。治療開始前、治療中、治療終了後における DC サブセット、Th1/Th2、NK 細胞など、各免疫細胞の頻度を検討した。DC に関し

ては、ナイーブ CD4⁺T 細胞に対する増殖刺激活性も治療前後で評価した。治療効果、ウイルス反応性などと免疫細胞との関連性を、単変量/多変量解析により検討した。

(竹内) LGP2 欠損マウス、LGP2 の ATPase 活性を欠失したマウス更に、RIG-I の ATPase 活性を欠失した変異マウスを作製し、RNA ウイルス感染応答を検討した。

(藤田) RIG-I を特異的に検出することの出来る、抗 RIG-I 抗体を作製し、それを免疫染色に用いて HCV やその他のウイルスの感染細胞のどこに 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) 遺伝子型 2a 型 HCV 株の JFH1 あるいは HCV に近縁のウイルスである GBV-B 由来の NS5B 蛋白質を恒常的に発現するヒト不死化細胞 PH5CH8 細胞 (PH5CH8/NS5B 細胞) を作成し、IFN- β の mRNA を定量比較した。

(土方) 既に樹立している新規ヒト不死化肝細胞ならびに市販の初代培養肝細胞における各種自然免疫関連遺伝子の発現を RT-PCR 法等で解析した。この細胞センダイウイルスを感染させ、IRF3 ならびに IRF7 の経時的な活性化機構をその核内移行およびインターフェロン遺伝子プロモーターの活性化を指標に検討した。

(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可能な遺伝子改変マウスを樹立した。このマウスを用いて、HCV 蛋白質を発現する組換えワクシニアウイルスによる免疫活性化による HCV 排除を試みた。

(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細胞では、CD44 の発現が、細胞内 RNA 及び細胞表面抗原レベルにおいて亢進されている事が示された。HCV 特異的なプロテアーゼ阻害剤で HCV の複製を阻害すると、CD44 の顕著な発現の低下が認められた。肝生検における CD44 の発現を抗 CD44 抗体で検出したところ、HCV 陽性の非癌部において CD44 の発現亢進が認められた。一方、HCV 陰性の非癌部、HBV 陽性検体、ならびに脂肪肝由来の肝生検では顕著な CD44 の発現亢進は認められなかった。興味深い事に、SVR の二検体では CD44 の発現が低下している傾向が認められた。HCV レプリコン

細胞では、CD44 の本来のリガンドであるヒアルロン酸刺激においても IP-10 の産生が亢進され、TLR2/CD44/MyD88 依存的なシグナル経路により制御されている事が示された。一方で、リポペプチドによる IP-10 の産生亢進には CD44 は非依存的であった。293T 細胞を用いた免疫沈降実験により、CD44 と TLR2 の相互作用が確認され、ヒアルロン酸の添加により結合の増強が確認された。さらに、組換え抗原を用いた結合アッセイより、CD44 と TLR2 は各々の細胞外領域を介して直接結合する事が示された。また、結合アッセイから、ヒアルロン酸は TLR2 と CD44 に同程度の結合力を示す事が明らかとなった。(松浦)

(2) ペグ IFN α /リバビリン併用療法によって、HCV が排除された著効群 (SVR) においては、非著効群に比べて、治療開始前の DC、MDC 頻度が高値であった。治療終了後、SVR では PDC 頻度が増加し、DC の CD4⁺T 細胞刺激能が回復していた。治療中も SVR では、PDC 頻度が増加していたが、非著効群では PDC 頻度は一定であった。多変量解析では、開始後 12 週時点までの PDC 頻度増加は、薬剤投与量やウイルス量とは独立して、SVR に寄与した。この結果は、治療開始後 12 週目までに HCV が陰性化する早期ウイルス反応群 (EVR) に限っても同様であった。(考藤)

(3) LGP2 欠損マウス、LGP2 ATPase 活性欠失マウスの解析から、LGP2 がインフルエンザウイルス以外の様々な RNA ウイルス感染に対して、必要であることが明らかとなった。また、RIG-I ATPase 活性欠失マウスの解析より、HCV 感染に必要な poly U/UC 配列の RNA を含め様々な RIG-I リガンドの認識において ATPase 活性が必要であることが明らかとなった。(竹内)

(4) 作製した抗 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。HCV は油滴の周辺域で増殖をし、そこにウイルス抗原の集積が認められる。そこに一致して RIG-I の局在が誘導されることが明らかとなった。また、RIG-I 以外の関連蛋白質、MDA5、LGP2 およびその他の RNA 結合蛋白質も同様に局在が誘導されることが明らかとなった。(藤田)

(5) ヒト不死化細胞 PH5CH8 細胞に JFH-1 由来の NS5B を恒常的に発現させた細胞では遺伝子型 1b 型 HCV 由来の NS5B 同様 IFN- β の mRNA が誘導された。一方、ベクタープラスミドを導入した PH5CH8 細胞では IFN- β の mRNA の誘導は認められなかった。GBV-B 由来の NS5B を恒常的に発現させた PH5CH 細胞でも IFN- β の mRNA が誘導された。さらに、dsRNA を特異的に認識する抗体を用いた免疫蛍光抗体法で PH5CH8/NS5B 細胞で dsRNA を検出することが出来た。これらの結果は 1b 型 HCV 由来の NS5B のみならず 2a 型 HCV 由来の

NS5B、さらには HCV 近縁の GBV-B 由来の NS5B にも dsRNA 産生を介した IFN- β の誘導能があることを示唆しているものと思われる。(池田)

(6) ヒト各組織からの解析から肝細胞において IRF7 と TLR8 遺伝子が恒常的に発現していたが、これまで HCV レプリコンが効率良く複製し、JFH1 ウイルスが増殖可能な HuH-7 細胞では両遺伝子の発現は認められなかった。また、ウイルス RNA を検出する RIG-I の発現はすべての肝由来細胞で極めて低レベルであった。血清由来 HCV の不死化肝細胞に対する感染は、この細胞を予め RNA 干渉法を抑制した場合、効率良く観察することができたが、感染3日後に抑制した場合には感染後の増殖にはほとんど影響を与えないことがわかった。(土方)

(7) 組換えワクシニアウイルス接種後1週で、肝臓の壊死性細胞浸潤、肝細胞索の乱れ、肝細胞の膨化、グリコーゲン変性および脂肪変性といった慢性肝炎の病態の正常化が認められた。4週目の接種群では形態異常の正常化、肝臓内のHCV蛋白の減少がみられた。(小原)

D. 考察

HCV の持続複製細胞では、CD44 の発現がウイルスの複製依存的に亢進されている事が確認された。このことは、非癌部での肝生検における CD44 の発現亢進及び、SVR 由来の肝生検における CD44 の発現抑制の結果を支持するものである。さらに興味深いのは、CD44 の本来のリガンドであるヒアルロン酸刺激においても IP-10 の産生が亢進された。実際に、慢性 C 型肝炎患者の血中及び肝組織内では、TLR2 のシグナル活性のトリガーとなる低分子量ヒアルロン酸の発現が、線維化の過程において亢進している。

C 型肝炎患者に対するペグ IFN α /リバビリン併用療法の治療効果に、PDC の増加や DC 機能の回復が関与していた。IFN などの抗ウイルス剤による HCV 排除によって、免疫系が持続的に回復するか否かに関しては議論の余地がある。本研究の結果は、DC サブセットが、抗ウイルス剤による HCV 排除に関与することを示しており、DC の制御による抗 HCV 免疫治療の可能性を示唆している。

LGP2 がこれまで考えられてきたような抑制分子ではなく、RIG-I ファミリーの活性化に必要な分子であると考えられた。しかし、LGP2 の認識メカニズムに関しては今後の更なる検討が必要である。

HCV の複製場所にはウイルスセンサーである RIG-I の局在が誘導されることを明らかにした。このとき RIG-I のみではなく、その他の RNA 結合蛋白質も集まってくる。このことはウイルス RNA の認識には多くの RNA 結合蛋白質が直接、間接に関与することを示唆し

ている。また、同時に認識からシグナル伝達の段階にもこれらの複数の RNA 結合蛋白質が関与することを示唆している。

NS5B、NS3-4A による IFN- β 産生系への効果は HCV の遺伝子型全般あるいは、HCV 以外のフラビウイルスに共通した現象である可能性が示唆された。NS5B は IFN- β 産生へ、NS3-4A は IFN- β 産生抑制という、一見相反する機能を有しているが、NS5B の機能に比べて NS3-4 の機能が優っているために、IFN- β 産生系のバランスは抑制に傾き HCV の持続感染を可能にしているのかもしれない。

肝細胞では TLR8 による IRF7 依存的な RIG-I の発現誘導機構が存在し、ウイルスの感染検出の感度を増強する機能が存在している可能性が示唆された。

組換えワクシニアウイルスによる HCV 蛋白の排除には CD4 および CD8+T 細胞が重要であることが示唆された。しかし、肝臓の形態異常は抗 CD8 抗体および抗 CD4 抗体を投与したにも関わらず正常化していたことから、病態形成と HCV 蛋白排除は別の機序であることが明らかとなった。

E. 結論

1. HCV 持続複製細胞では、CD44 と TLR2 を介した IP-10 の発現亢進機序が、肝炎慢性化に重要な役割を演じている可能性が示唆された。
2. C 型肝炎患者に対するペグ IFN α /リバビリン併用療法における HCV 排除に、ウイルス学的因子とは独立して、PDC 頻度や DC 機能の回復が関与していた。
3. LGP2 がこれまで考えられてきたような抑制分子ではなく、RIG-I ファミリーの活性化に必要な分子であることが明らかとなった。
4. HCV の増殖複合体へ RIG-I の局在が誘導される時に RIG-I のみならず他の蛋白質の誘導も重要であることが強く示唆された。
5. 2a 型 HCV あるいは GBV-B 由来の NS5B による IFN- β の誘導、NS3-4A による Cardif の切断を見出した。
6. IRF7 の機能を向上させる方法の開発により肝細胞を抗 HCV 状態に変化させることが可能であることが考えられた。
7. 組換えワクシニアウイルスの接種による HCV の制御には細胞死を伴わない何らかの蛋白排除機構が働い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 Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. Taguwa S., Kambara H., Omori H., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 10427-10436 (2009).
- 2 Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Yamashita T., Mori Y., Miyazaki N., Cheng H.R., Yoshimura M., Unno H., Shima R., Moriishi K., Tsukihara T., Li T.C., Takeda N., Miyamura T., and Matsuura Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 12986-12991 (2009).
- 3 Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. Kukihara H., Moriishi K., Taguwa S., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Fukuhara T., Taketomi A., Maehara Y., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 7959-7969 (2009).
- 4 Baculovirus induces type I IFN production through TLR-dependent and -independent pathways in a cell type-specific manner. Abe T., Kaname Y., Wen X., Tani H., Moriishi K., Uematsu S., Takeuchi O., Ishii K.J., Kawai T., Akira S., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 7629-7640 (2009).
- 5 Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. Moriya K., Miyoshi H., Tsutsumi T., Shinzawa S., Fujie H., Shintani Y., Yotsuyanagi H., Moriishi K., Matsuura Y., Suzuki T., Miyamura T., Koike K. *Am. J. Pathol.* 175, 1515-1524 (2009).
- 6 Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. Hara H., Aizaki H., Matsuda M., Shinkai-Ouchi F., Inoue Y., Murakami K., Shoji I., Kawakami H., Matsuura Y., Lai M.M., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 83, 5137-5147 (2009).
- 7 Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28-Dependent Mechanism. Suzuki R., Moriishi K., Fukuda K., Shirakura M., Ishii K., Shoji I., Wakita T., Miyamura T., Matsuura Y., and Suzuki T. *J. Virol.*, 83, 2389-2392 (2009).
- 8 Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. Mori K., Amano M., Takefuji M., Kato K., Morita Y., Nishioka T., Matsuura Y., Murohara T., Kaibuchi K. *J. Biol. Chem.*, 284, 5067-5076 (2009).
- 9 Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. Noritake J., Fukata Y., Iwanaga T., Hosomi N., Tsutsumi R., Matsuda N., Tani H., Iwanari H., Mochizuki Y., Kodama T., Matsuura Y., Bredt D.S., Hamakubo T., Fukata M. *J. Cell Biol.*, 186, 147-160 (2009).
- 10 Itose, I., Kanto, T., Kakita, N., Takebe, S., Inoue, M., Higashitani, K., Miyazaki, M., Miyatake, H., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N., Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis. *J. Viral Hepat* 2009 16: 846-852.
- 11 Uemura, A., Takehara, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Kanto, T., Hiramatsu, N. and Hayashi, N., Natural killer cell is a major producer of interferon gamma that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice. *Cancer Immunol Immunother* 2009 59: 453-463.
- 12 Oze, T., Hiramatsu, N., Yakushijin, T., Kurokawa, M., Igura, T., Mochizuki, K., Imanaka, K., Yamada, A., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Ito, T., Inui, Y., Hijioka, T., Tamura, S., Yoshihara, H., Hayashi, E., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Pegylated interferon alpha-2b (Peg-IFN alpha-2b) affects early virologic response dose-dependently in patients with chronic hepatitis C genotype 1 during treatment with Peg-IFN alpha-2b plus ribavirin. *J. Viral Hepat* 2009. 16: 578-585.
- 13 Kohga, K., Takehara, T., Tatsumi, T., Miyagi, T., Ishida, H., Ohkawa, K., Kanto, T., Hiramatsu, N. and Hayashi, N., Anticancer chemotherapy inhibits MHC class I-related chain a ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009. 69: 8050-8057.
- 14 Inoue, Y., Hiramatsu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Hagiwara, H., Oshita, M., Mita, E., Fukui, H., Inada, M., Tamura, S., Yoshihara, H., Hayashi, E., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Miyagi, T., Hoshui, A., Ishida, H., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses. *J. Viral Hepat* 2009.
- 15 Hiramatsu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Inoue, Y., Igura, T., Mochizuki, K., Imanaka, K., Kaneko, A., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Nagase, T., Ito, T., Inui, Y., Hijioka, T., Katayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H., Imai, Y., Kato, M., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Ribavirin dose reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with hepatitis C responding to pegylated interferon alpha-2b

- plus ribavirin. *J Viral Hepat* 2009. 16: 586-594.
- 16 Kurokawa K, Lee H, Roh KB, Asanuma M, Kim YS, Nakayama H, Shiratsuchi A, Choi Y, Takeuchi O, Kang HJ, Dohmae N, Nakanishi Y, Akira S, Sekimizu K, Lee BL. The Triacylated ATP Binding Cluster Transporter Substrate-binding Lipoprotein of *Staphylococcus aureus* Functions as a Native Ligand for Toll-like Receptor 2. *J Biol Chem*. 2009 Mar 27;284(13):8406-11.
 - 17 Yamasaki S, Matsumoto M, Takeuchi O, Matsuzawa T, Ishikawa E, Sakuma M, Tateno H, Uno J, Hirabayashi J, Mikami Y, Takeda K, Akira S, Saito T. C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 10;106(6):1897-902.
 - 18 Kumagai Y, Kumar H, Koyama S, Kawai T, Takeuchi O, Akira S. Cutting Edge: TLR-Dependent viral recognition along with type I IFN positive feedback signaling masks the requirement of viral replication for IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2009 Apr 1;182(7):3960-4.
 - 19 Matsushita K*, Takeuchi O*, Standley DM, Kumagai Y, Kawagoe T, Miyake T, Satoh T, Kato H, Tsujimura T, Nakamura H, Akira S. (*equal contribution) Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature*. 2009 Apr 30;458(7242):1185-90.
 - 20 Abe T, Kaname Y, Wen X, Tani H, Moriishi K, Uematsu S, Takeuchi O, Ishii KJ, Kawai T, Akira S, Matsuura Y. Baculovirus induces type I interferon production through toll-like receptor-dependent and -independent pathways in a cell-type-specific manner. *J Virol*. 2009 Aug;83(15):7629-40.
 - 21 Konno H, Yamamoto T, Yamazaki K, Gohda J, Akiyama T, Semba K, Goto H, Kato A, Yujiri T, Imai T, Kawaguchi Y, Su B, Takeuchi O, Akira S, Tsunetsugu-Yokota Y, Inoue J. TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF-kappaB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA. *PLoS One*. 2009 May 25;4(5):e5674.
 - 22 Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, Coch C, Janke M, Mihailovic A, Wardle G, Juranek S, Kato H, Kawai T, Poeck H, Fitzgerald KA, Takeuchi O, Akira S, Tuschl T, Latz E, Ludwig J, Hartmann G. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity*. 2009 Jul 17;31(1):25-34.
 - 23 Miyake T, Kumagai Y, Kato H, Guo Z, Matsushita K, Satoh T, Kawagoe T, Kumar H, Jang MH, Kawai T, Tani T, Takeuchi O, Akira S. Poly I:C-induced activation of NK cells by CD8 alpha+ dendritic cells via the IPS-1 and TRIF-dependent pathways. *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2522-8.
 - 24 Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Rehwinkel J, Kato H, Takeuchi O, Akira S, Way M, Schiavo G, Reis e Sousa C. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J Virol*. 2009 Oct;83(20):10761-9.
 - 25 Kawagoe T*, Takeuchi O*, Takabatake Y, Kato H, Isaka Y, Tsujimura T, Akira S. (*equal contribution) TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling and is critical for the prevention of autoimmune nephritis. *Nat Immunol*. 2009 Sep;10(9):965-72.
 - 26 Choi MK, Wang Z, Ban T, Yanai H, Lu Y, Koshiba R, Nakaima Y, Hangai S, Savitsky D, Nakasato M, Negishi H, Takeuchi O, Honda K, Akira S, Tamura T, Taniguchi T. A selective contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 20;106(42):17870-5.
 - 27 Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*. 2009 Nov 13;36(3):487-99.
 - 28 Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Kawai T, Ishii K, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 20842-20846, 2009.
 - 29 Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 1512-1517, 2010.
 - 30 Shigemoto, T., Kageyama, M., Hirai, R., Zheng, J-P., Yoneyama, M., Fujita, T.: Identification of loss of function mutations in human genes encoding RIG-I and mda5: Implications for resistance to type I diabetes. *J. Biol. Chem.* 284, 13348-13354 (2009)
 - 31 Takahasi, K., Kumeta, H., Tsuduki, N., Narita, R., Shigemoto, T., Hirai, R., Yoneyama, M., Horiuchi, M., Ogura, K., Fujita, T., Inagaki, F.: Solution Structures of MDA5 and LGP2 C-terminal Domains: Identification of the RNA Recognition Loop in RIG-I Like Receptors. *J. Biol. Chem.* 284, 17465-17474 (2009)
 - 32 Sato, S., Hoshino, K., Satoh, T., Fujita, T., Kawakami, Y., Fujita, T. and Kuwana, M.: RNA helicase encoded by melanoma differentiation-associated gene 5 is a major autoantigen in patients with clinically amyopathic dermatomyositis: association with rapidly progressive interstitial lung disease. *Arthritis & Rheumatism*. 60, 2193-2200 (2009)
 - 33 Spiropoulou CF, Ranjan P, Pearce MB, Sealy TK,

- Albariño CG, Gangappa S, Fujita T, Rollin PE, Nichol ST, Ksiazek TG, Sambhara S.: RIG-I activation inhibits ebolavirus replication. *Virology*. 329, 11-15 (2009)
- 34 1) Matsumoto A, Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Hirano K, Fujimoto M, Akiyama M, Miura S, Ozawa E, Shibata H, Takeshita S, Yamasaki H, Ikeda M, Kato N, and Eguchi K. Interferon-alpha-induced mTOR activation is an anti-hepatitis C virus signal via the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-independent pathway. *J. Gastroenterol.*, 44:856-863, 2009.
- 35 2) Nishimura G, Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, and Kato N. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. *Antiviral Res.*, 82:42-50, 2009.
- 36 3) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, and Kato N. Arsenic trioxide inhibits hepatitis C virus RNA replication through modulation of the glutathione redox system and oxidative stress. *J. Virol.*, 83:2338-2348, 2009.
- 37 4) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, and Ikeda M. Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture. *Arch. Virol.*, 154:77-85, 2009.
- 38 5) Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, and Kato N. Double-stranded RNA-induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. *Arch. Virol.*, 154:801-810, 2009.
- 39 6) Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J Hepatol.* 50: 883-894 2009.
- 40 7) Kawai Y, Ikeda M, Abe K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, and Kato N. Development of an HCV relapse model using genome-length HCV RNA-harboring cells possessing the IFN- α -resistance phenotype. *Hepatol. Res.*, 39:898-909, 2009.
- 41 8) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, and Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- α . *FEBS Letters*, 583:1434-1438, 2009.
- 42 9) Yano M, Ikeda M, Abe K, Kawai Y, Kuroki M, Mori K, Dansako H, Ariumi Y, Ohkoshi S, Aoyagi Y, and Kato N. Oxidative stress induces anti-hepatitis C virus status via the activation of extracellular signal-regulated kinase. *Hepatology*, 50:678-688, 2009.
- 43 10) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, and Ikeda M. Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new hepatoma cell line. *Virus Res.*, 146:41-50, 2009.
- 44 11) Abe KI, Ikeda M, Ariumi Y, D Hiromichi, Wakita T, Kato N. HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A. *Arch Virol.*, in press, 2009.
- 45 12) Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Hokari R, Kato N, Hibi T, Miura S. An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus. *World J Gastroenterol.*, in press, 2010.
- 46 Hussein H. Aly, Yue Qi, Kimie Atsuzawa, Noobuteru Usuda, Yasutsugu Takada, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizogami. Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Strain-dependent viral dynamics and virus cell interactions observed in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood borne HCV. *Hepatology*, 50(3), 689-696, 2009
- 47 Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379: 330-334, 2009
- 48 Takayuki Murata, Yoshitaka Sato, Sanae Nakayama, Ayumi Kudoh, Satoko Iwahori, Hiroki Isomura, Masako Tajima, Takayuki Hishiki, Takayuki Ohshima, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno, and Tatsuya Tsurumi: TORC 2, a coactivator of CREB, promotes Epstein-Barr virus reactivation from latency through interaction with viral BZLF1 protein, *J. Biol. Chem.* 284, 8033-8041, 2009
- 49 Kazuo Sugiyama, Kenji Suzuki, Takahide Nakazawa, Kenji Funami, Takayuki Hishiki, Kazuya Ogawa, Satoru Saito, Kumiko W. Shimotohno, Takeshi Suzuki, Yuko Shimizu, Seiri Tobita, Makoto Hijikata, Hiroshi Takaku, Kunitada Shimotohno: Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro. *J. Virol.*, 83(13), 6922-6928, 2009.
- 50 Kaku Goto, Koichi Watashi, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. *Cancer Science*, 100 (10), 1943-1950, 2009.
- 51 Machida K., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. et al: Disruption of IFN signaling and HCV synergistically enhance lymphoproliferation through type II CD95 and interleukins. *Gastroenterology* 137, 285-296, 2009.
- 52 Nishimura T., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K. et al: Hepatitis C virus impairs P53 via persistent over-expression of 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase. *J. Biol. Chem.* 284, 36442-36452, 2009
- 53 Uto H., Kohara M. and Tsubouchi H. et al: Increased rate of death related to presence of viremia among hepatitis C virus antibody-positive subjects in a community-based cohort study. *Hepatology* 50, 393-399, 2009
- 54 Amako Y., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. et al: Pathogenesis of hepatitis C virus infection in Tupaia

belangeri. J.Virology , 84, 303-311, 2010.

2. 学会発表

- 1 森石恆司、勝二郁夫、鈴木亮介、鈴木哲朗、松浦善治: HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御: 第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日, 2009.
- 2 谷 英樹、塩川 舞、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感染における脂質セラミドの役割、第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日, 2009.
- 3 福原崇介、谷 英樹、塩川 舞、森石恆司、前原喜彦、松浦善治: 患者血清由来 HCV の細胞内導入法、第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日, 2009.
- 4 寒原裕登、田鍬修平、藤田尚信、森 嘉生、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: HCV の増殖とオートファジー、第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日, 2009.
- 5 片岡周子、要 祐喜、阿部隆之、森石恆司、谷英樹、松浦善治: バキュロウイルスの細胞侵入機構の解析、第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日, 2009.
- 6 要 祐喜、片岡周子、阿部隆之、森石恆司、谷英樹、松浦善治: バキュロウイルス gp64 蛋白質の補体抵抗性獲得機構、第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日, 2009.
- 7 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、松浦善治: ヒアルロン酸による炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生と C 型肝炎の慢性化、第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日, 2009.
- 8 鈴木亮介、斎藤憲司、安東友美、石井孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスの trans-packaging 系を用いた NS2 蛋白質の感染性粒子形成における機能解析、第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日, 2009.
- 9 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤滋子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗: HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日, 2009.
- 10 田鍬修平、寒原裕登、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: C 型肝炎ウイルスの感染におけるオートファジーの意義: 第32回日本分子生物学会年会、横浜、12月9日-12日, 2009.
- 11 松浦善治: バキュロウイルスを用いた哺乳動物細胞への遺伝子導入: 第82回日本生化学会大会、神戸、10月21日-24日, 2009.
- 12 河合 良成、池田 正徳、森 京子、阿部 健一、矢野 雅彦、池田 房雄、有海 康雄、團迫 浩方、山本 和秀、加藤 宣之: 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略 -Teprenone(Selbex[®])と Plaunotol(Kelnac[®])の HCV 複製抑制効果- 第45回日本肝臓学会総会、神戸、平成21年6月
- 13 中村 光康、斎藤 英胤、池田 正徳、高木 俊介、穂刈 量太、加藤 宣之、日比 紀文、三浦 総一郎: 抗酸化剤 Resveratrol の C 型肝炎ウイルス複製についての検討 第45回日本肝臓学会総会、神戸、平成21年6月
- 14 森 京子、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之: C 型急性肝炎患者由来の全長 HCV-RNA 複製細胞株の樹立とその応用 第24回中国四国ウイルス研究会、岡山、平成21年7月
- 15 黒木 美沙緒、有海 康雄、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之: 亜ヒ酸は酸化ストレスとグルタチオンレドックスシステムを介して C 型肝炎ウイルス(HCV)RNA 複製を抑制する 第24回中国四国ウイルス研究会、岡山、平成21年7月
- 16 河合 良成、池田 正徳、矢野 雅彦、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、山本 和秀、加藤 宣之: 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略-Teprenone(Selbex[®])と Plaunotol (Kelnac[®])の HCV RNA 複製抑制効果- 第24回中国四国ウイルス研究会、岡山、平成21年7月
- 17 河合 良成、池田 正徳、加藤 宣之: 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略 -Teprenone は Statin のゲラニルゲラニル化阻害を増強し HCV 複製抑制効果を増強する- 第17回日本消化器関連学会週間(JDDW)、第13回日本肝臓学会大会 京都、平成21年10月
- 18 池田 房雄、團迫 浩方、西村 剛、河合 良成、有海 康雄、池田 正徳、高木 章乃夫、岩崎 良章、加藤 宣之、山本 和秀: HCV コア蛋白質のアミノ酸の違いと IFN 応答性との関係についての培養細胞を用いた解析 第17回日本消化器関連学会週間(JDDW)、第13回日本肝臓学会大会 京都、平成21年10月
- 19 中村 光康、斎藤 英胤、池田 正徳、穂刈 量太、加藤 宣之、日比 紀文: 各種抗酸化剤の C 型肝炎ウイルス複製についての影響 第17回日

- 本消化器関連学会週間(JDDW)、第13回日本肝臓学会大会 京都、平成21年10月
- 20 野崎 昭人、近藤 正晃、森本 学、沼田 和司、池田 正徳、加藤 宣之、田中 克明 C型肝炎治療薬としてのHydroxyureaの可能性 第17回日本消化器関連学会週間(JDDW)、第13回日本肝臓学会大会 京都、平成21年10月
 - 21 齋藤 誠、池田 正徳、加藤 宣之、田中 寅彦 C型肝炎ウイルス非構造タンパク質NS3とNS4Bの相互作用における責任部位の解析 第82回日本生化学会大会、神戸、平成21年10月
 - 22 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之 リバビリンの抗HCV活性を解析評価できるLi23細胞由来のHCV-RNA複製システム 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成21年10月
 - 23 池田 正徳、森 京子、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之 オンコスタチンMはインターフェロンの抗HCV活性を相乗的に増強する 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成21年10月
 - 24 河合 良成、池田 正徳、矢野 雅彦、阿部 健一、西村 剛、團迫 浩方、有海 康雄、脇田 隆宇、山本 和秀、加藤 宣之 抗潰瘍剤によるC型慢性肝炎の新たな治療戦略-TeprenoneはStatinのゲラニルゲラニル化阻害を増強しHCV複製抑制効果を増強する- 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成21年10月
 - 25 有海 康雄、黒木 美沙緒、牧 正敏、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之 ESCRT小胞輸送系のHCV産生への関与 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成21年10月
 - 26 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 癌抑制因子PMLはHCV粒子産生に必要なである 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成21年10月
 - 27 齋藤 誠、池田 正徳、加藤 宣之、田中 寅彦 1b型C型肝炎ウイルス非構造タンパク質NS3とNS4Bの相互作用の解析 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成21年10月
 - 28 齋藤 誠、池田 正徳、加藤 宣之、田中 寅彦 C型肝炎ウイルス由来非構造タンパク質NS3-NS4B間の相互作用 第32回日本分子生物学会年会、横浜、平成21年12月
 - 29 久島透嘉、脇田隆宇、土方誠：coreの変異体を用いたC型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析、第57回日本ウイルス学会学術総会、平成21年10月26日、東京 2009
 - 30 阿部雄一、脇田隆宇、土方誠：ケミカルバイオロジー手法を用いたC型肝炎ウイルス感染性粒子形成機構解明の試み、第32回日本分子生物学会年会、平成21年12月9-12日、横浜 2009
 - 31 筒井智恵子、アリ・ハッサン・フセイン・久島透嘉、土方誠：C型肝炎ウイルスを抑制する転写因子IRF7の肝特異的発現制御機構の解析、第32回日本分子生物学会年会、平成21年12月9-12日、横浜 2009
 - 32 Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Viral elimination by a selective expression of IRF7 in human hepatocytes infected with HCV. 第15回日本遺伝子治療学会、大阪、6月10日-12日,2009.
 - 33 Yoshio Mori, Tetsuo Yamashita, Naoyuki Miyazaki, Masato Yoshimura, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, R. Holland Cheng, Tomitake Tsukihara, and Yoshiharu Matsuura: Structure-based analysis of hepatitis E virus-like particle. The American Society for Virology, 28th Annual Meeting, The University of British Columbia, Vancouver, July 11-15, 2009.
 - 34 Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with both HCV NS5A and Hsp90 and regulates replication of hepatitis C virus. The American Society for Virology, 28th Annual Meeting, The University of British Columbia, Vancouver, July 11-15, 2009.
 - 35 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Hyaluronan participates in the IP-10 induction in cells infected with HCV through an engagement of TLR2 and CD44, 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7, 2009.
 - 36 Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Suppression of HCV replication in hepatocytes through a selective induction of IRF7. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7, 2009.
 - 37 Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma- and E6AP-dependent degradation of HCV core protein in the viral production. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7, 2009.
 - 38 Ryosuke Suzuki, Kenji Saito, Tomomi Ando, Koji Ishii, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Plasmid-based production of trans-complemented HCV particles: its use for functional analysis of NS2. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7,

- 2009.
- 39 Hideki Aizaki, Mami Yamamoto, Koji Goto, Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada, Shigeo Sato, Nobuhiro Takahashi, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV replication. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7, 2009.
 - 40 Kakita N, Kanto T, Itose I, Takebe S, Inoue M, Matsubara T, Higashitani K, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Feasibility of IL-10-producing regulatory Type 1 cells for the monitoring of viable hepatocellular carcinoma through local ablation therapy. The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course (Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)
 - 41 Miyazaki M, Kanto T, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Inoue M, Itose I, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Myeloid dendritic cells as a therapeutic target for immune restoration by HCV NS3 protease inhibitor in chronic hepatitis C patients. The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course (Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)
 - 42 Kanto T, Itose I, Inoue M, Oze T, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Dynamics of plasmacytoid dendritic cells as a predictor of relapse regardless of virological response in pegylated interferon- α and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course (Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)
 - 43 Inoue Y, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Mochizuki K, Mita E, Fukuda K, Imai Y, Kato M, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. Prediction of early response to pegylated interferon and ribavirin in chronic hepatitis C based on amino acid substitutions in the viral core region. The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course (Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)
 - 44 Inoue Y, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Mochizuki K, Hagiwara H, Oshita M, Mita E, Fukui H, Inada M, Tamura S, Yoshihara H, Hayashi E, Inoue A, Imai Y, Kato M, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon α -2b plus ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses. The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course (Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)
 - 45 Fujita, T.: How cells recognize viruses: offense and defense. The Joint Symposium of the 4th International Symposium of Institutes Network. 2009.2.1 Osaka
 - 46 Fujita, T.: Solution Structures of MDA5 and LGP2 C-Terminal Domains: Identification of the RNA Recognition Loop in RIG-I Like Receptors. Keystone Symposia, Pattern Recognition Molecules and Immune Sensors of Pathogens. 2009.4.1 Banff, Canada
 - 47 Onomoto, K., Yoneyama, M., Fujita, T.: Signal transduction by oligomerization of RIG-I CARD and its physiological functions. Keystone Symposia, Pattern Recognition Molecules and Immune Sensors of Pathogens. 2009.4.1 Banff, Canada
 - 48 Kyoko Mori, Masanori Ikeda, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, and Nobuyuki Kato. Li23 cell-derived HCV-RNA replicating systems enabling analysis for anti-HCV mechanism of ribavirin. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
 - 49 Masanori Ikeda, Kyoko Mori, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, and Nobuyuki Kato. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- α . 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
 - 50 Yoshinari Kawai, Masanori Ikeda, Masahiko Yano, Ken-ichi Abe, Go Nishimura, Hiromichi Dansako, Yasuo Ariumi, Takaji Wakita, Kazuhide Yamamoto, and Nobuyuki Kato. Anti-ulcer agent, teprenone, enhanced statin's anti-HCV activity by augmenting the inhibition of geranylgeranylation. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
 - 51 Yasuo Ariumi, Misao Kuroki, Masatoshi Maki, Masanori Ikeda, Hiromichi Dansako, Takaji Wakita, and Nobuyuki Kato. The ESCRT pathway is required for HCV production. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
 - 52 Misao Kuroki, Yasuo Ariumi, Masanori Ikeda, Hiromichi Dansako, Takaji Wakita, and Nobuyuki Kato. The PML tumor suppressor protein is required for HCV production. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
 - 53 Go Nishimura, Masanori Ikeda, Kyoko Mori, Takahide Takazawa, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, and Nobuyuki Kato. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
 - 54 Masahiko Yano, Masanori Ikeda, Ken-ichi Abe, Yoshinari Kawai, Misao Kuroki, Kyoko Mori,

- Hikomichi Dansako, Yasuo Ariumi, Yasunobu Matsuda, Shougo Ohkoshi, Yutaka Aoyagi, and Nobuyuki Kato. Involvement of the MEK-ERK1/2 Signaling Pathway in the Anti-HCV Mechanism of Oxidative Stress. The Liver Meeting 2009, AASLD Boston, Massachusetts, USA, October. 30-November. 3, 2009
- 55 Hussein H. Aly, Chieko Tsutsui, Yue Qi, Yukihiro Kushima, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: TLR8 induces RIG-I gene expression and efficient interferon response against HCV infection in human hepatocytes. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Nice, France, Oct 3-7 2009-
- 56 Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Drug screening of blood-borne HCV using 3D cultured immortalized human hepatocytes. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Nice, France, Oct 3-7 2009
- 57 Hirata Y., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Tsukuda T., Kohara M.: NA 808 has the strong effect to hepatitis C virus and in vivo. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses, 2009.10.3-7. Nice, France
- 58 Munakata T., Inada M., Nomoto A., Kohara M.: Anti-hepatitis C virus activity of cyclin-dependent kinase inhibitors. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses 2009.10.3-7. Nice, France

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし

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）
分担研究報告書

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。HCV レプリコン細胞では、TLR2 リガンドであるグラム陽性菌由来のリポペプチドやヒアルロン酸(ヒト臍帯由来)刺激において、IP-10 の発現が特異的に亢進される事が示された。さらに、ヒアルロン酸による IP-10 の産生亢進には、その受容体である CD44 分子が必要であり、TLR2 と細胞外領域で結合する事が示された。慢性 C 型肝炎患者由来の肝組織では、恒常的に CD44 の高い発現が維持されており、特に非癌部での発現が高い傾向で認められた。以上の成績より、内在性ヒアルロン酸及び CD44 の持続的な発現が慢性的な肝炎の要因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巣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)治療予後のバイオマーカーとしても有用であり、慢性肝炎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。

昨年度までの研究により、HCV レプリコン細胞や JFH1 ウイルス感染細胞では、自然免疫認識受容体である TLR2 のシグナル経路の活性化に伴い、IP-10 の発現が特異的に亢進される事が示された。また、TLR2 を介した IP-10 の産生亢進に関与する候補分子として CD44 を同定した。本年度は、TLR2 を介した IP-10 の産生亢進に及ぼす CD44 の役割を詳細に検討した。

B. 研究方法

HCV サブゲノムレプリコン細胞や慢性 C 型肝炎患者由来の肝生検における CD44 の発現プロファイルを、Real-time PCR 法及び免疫プロット法により検討した。また、CD44、TLR2 及びそのシグナルアダプター分子である MyD88 をノックダウンした細胞株を樹立し、リポペプチドやヒアルロン酸(ヒト臍帯

由来)標品の刺激に伴う IP-10 の産生亢進に及ぼす影響を検討した。さらに、パキキュロウイルス発現系を用いて、TLR2 と CD44 の組換え抗原を作製し、両分子の相互作用ならびに各リガンドに対する結合実験を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の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に係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

HCV サブゲノムレプリコン細胞では、CD44 の発現が、細胞内 RNA 及び細胞表面抗原レベルにおいて亢進されている事が示された。HCV 特異的なプロテアーゼ阻害剤で HCV の複製を阻害すると、CD44 の顕著な発現の低下が認められた。肝生検における CD44 の発現を抗 CD44 抗体(3C11)で検出したところ、HCV 陽性の非癌部において CD44 の発現亢進が認められた。一方、HCV 陰性の非癌部、HBV 陽性検体、ならびに脂肪肝由来の肝生検では顕著な CD44 の発現亢進は認められ

なかった。興味深い事に、SVR の二検体では CD44 の発現が低下している傾向が認められた。HCV レプリコン細胞では、CD44 の本来のリガンドであるヒアルロン酸刺激においても IP-10 の産生が亢進され、TLR2/CD44/MyD88 依存的なシグナル経路により制御されている事が示された。一方で、リポペプチドによる IP-10 の産生亢進には CD44 は非依存的であった。293T 細胞を用いた免疫沈降実験により、CD44 と TLR2 の相互作用が確認され、ヒアルロン酸の添加により結合の増強が確認された。さらに、組換え抗原を用いた結合アッセイより、CD44 と TLR2 は各々の細胞外領域を介して直接結合する事が示された。また、結合アッセイから、ヒアルロン酸は TLR2 と CD44 に同程度の結合力を示す事が明らかとなった。

D. 考察

CD44 は活性化リンパ球の制御のみならず、TLR シグナル伝達経路への制御にも関与する事が遺伝子改変マウスを用いた系により報告されている。

本研究により、HCV の持続複製細胞では、CD44 の発現がウイルスの複製依存的に亢進されている事が確認された。このことは、非癌部での肝生検における CD44 の発現亢進及び、SVR 由来の肝生検における CD44 の発現抑制の結果を支持するものである。さらに興味深いのは、CD44 の本来のリガンドであるヒアルロン酸刺激においても IP-10 の産生が亢進された。実際に、慢性 C 型肝炎患者の血中及び肝組織内では、TLR2 のシグナル活性のトリガーとなる低分子量ヒアルロン酸の発現が、線維化の過程において亢進している。近年、TLR は外的な異物のみならず、生体内に存在する様々な内在性のリガンド (HSP、ECM 及び常在細菌など) をも認識し、炎症性シグナルの誘発に寄与している事が報告されている。

以上の成績より、慢性 C 型肝炎患者において発現が亢進されている内在性のヒアルロン酸分子が、TLR2 と CD44 を介した IP-10 の産生亢進に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

HCV 持続複製細胞では、CD44 と TLR2 を介し

た IP-10 の発現亢進機序が、肝炎慢性化に重要な役割を演じている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. Taguwa S., Kambara H., Omori H., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. J. Virol., 83, 10427-10436 (2009).
2. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Yamashita T., Mori Y., Miyazaki N., Cheng H.R., Yoshimura M., Unno H., Shima R., Moriishi K., Tsukihara T., Li T.C., Takeda N., Miyamura T., and Matsuura Y. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 12986-12991 (2009).
3. Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. Kukihara H., Moriishi K., Taguwa S., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Fukuhara T., Taketomi A., Maehara Y., and Matsuura Y. J. Virol., 83, 7959-7969 (2009).
4. Baculovirus induces type I IFN production through TLR-dependent and -independent pathways in a cell type-specific manner. Abe T., Kaname Y., Wen X., Tani H., Moriishi K., Uematsu S., Takeuchi O., Ishii K.J., Kawai T., Akira S., and Matsuura Y. J. Virol., 83, 7629-7640 (2009).
5. Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. Moriya K., Miyoshi H., Tsutsumi T., Shinzawa S., Fujie H., Shintani Y., Yotsuyanagi H., Moriishi K., Matsuura Y., Suzuki T., Miyamura T., Koike K. Am. J. Pathol. 175, 1515-1524 (2009).
6. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. Hara H., Aizaki H., Matsuda M., Shinkai-Ouchi F., Inoue Y., Murakami K., Shoji I., Kawakami H., Matsuura Y., Lai M.M., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. J. Virol., 83, 5137-5147 (2009).

7. Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28-Dependent Mechanism. Suzuki R., Moriishi K., Fukuda K., Shirakura M. Ishii K., Shoji I., Wakita T., Miyamura T., Matsuura Y., and Suzuki T. J. *Virology*, 83, 2389-2392 (2009).
 8. Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. Mori K., Amano M., Takefuji M., Kato K., Morita Y., Nishioka T., Matsuura Y., Murohara T., Kaibuchi K. J. *Biol. Chem.*, 284, 5067-5076 (2009).
 9. Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. Noritake J., Fukata Y., Iwanaga T., Hosomi N., Tsutsumi R., Matsuda N., Tani H., Iwanari H., Mochizuki Y., Kodama T., Matsuura Y., Brecht D.S., Hamakubo T., Fukata M. J. *Cell Biol.*, 186, 147-160 (2009).
2. 学会発表
- 1 森石恆司、勝二郁夫、鈴木亮介、鈴木哲朗、松浦善治: HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御: 第 57 回日本ウイルス学会総会、東京、10 月 25 日-27 日, 2009.
 - 2 谷 英樹、塩川 舞、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感染における脂質セラミドの役割、同上。
 - 3 福原崇介、谷 英樹、塩川 舞、森石恆司、前原喜彦、松浦善治: 患者血清由来 HCV の細胞内導入法、同上。
 - 4 寒原裕登、田鍬修平、藤田尚信、森 嘉生、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: HCV の増殖とオートファジー、同上。
 - 5 片岡周子、要 祐喜、阿部隆之、森石恆司、谷 英樹、松浦善治: バキュロウイルスの細胞侵入機構の解析、同上。
 - 6 要 祐喜、片岡周子、阿部隆之、森石恆司、谷 英樹、松浦善治: バキュロウイルス gp64 蛋白質の補体抵抗性獲得機構、同上。
 - 7 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: ヒアルロン酸による炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生と C 型肝炎の慢性化、同上。
 - 8 鈴木亮介、斎藤憲司、安東友美、石井孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 系を用いた NS2 蛋白質の感染性粒子形成における機能解析、同上。
 - 9 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤滋子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗: HCV 粒子形成に關与する脂肪滴周辺蛋白質の同定と機能解析、同上。
 - 10 田鍬修平、寒原裕登、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: C 型肝炎ウイルスの感染におけるオートファジーの意義: 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9 日-12 日, 2009.
 - 11 松浦善治: バキュロウイルスを用いた哺乳動物細胞への遺伝子導入: 第 82 回日本生化学会大会、神戸、10 月 21 日-24 日, 2009.
 - 12 Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Viral elimination by a selective expression of IRF7 in human hepatocytes infected with HCV. 第 15 回日本遺伝子治療学会、大阪、6 月 10 日-12 日, 2009.
 - 13 Yoshio Mori, Tetsuo Yamashita, Naoyuki Miyazaki, Masato Yoshimura, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, R. Holland Cheng, Tomitake Tsukihara, and Yoshiharu Matsuura: Structure-based analysis of hepatitis E virus-like particle. The American Society for Virology, 28th Annual Meeting, The University of British Columbia, Vancouver, July 11-15, 2009.
 - 14 Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with both HCV NS5A and Hsp90 and regulates replication of hepatitis C virus. 同上。
 - 15 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Hyaluronan participates in the IP-10 induction in cells infected with HCV through an engagement of TLR2 and CD44, 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7, 2009.
 - 16 Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei

- Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Suppression of HCV replication in hepatocytes through a selective induction of IRF7. 同上。
- 17 Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma- and E6AP-dependent degradation of HCV core protein in the viral production. 同上。
- 18 Ryosuke Suzuki, Kenji Saito, Tomomi Ando, Koji Ishii, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Plasmid-based production of *trans*-complemented HCV particles: its use for functional analysis of NS2. 同上。
- 19 Hideki Aizaki, Mami Yamamoto, Koji Goto, Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada, Shigeko Sato, Nobuhiro Takahashi, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV replication. 同上。
- G. 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の持続感染や、インターフェロン（IFN）治療への抵抗性には、HCVに対する免疫応答の低下が関与する。樹状細胞（DC）は抗HCV免疫の賦活や制御に関与している。今年度は、HCV排除に関与する免疫細胞を同定することを目的として、ペグIFN α /リバビリン併用療法における免疫細胞の動態と治療効果との関連性を検討した。ペグIFN α /リバビリン併用療法による著効例（SVR）では、非著効例（Non-SVR）に比べて、治療開始前のDC頻度が有意に高値であった。SVR群では、治療中にプラスマサイトイドDCが増加し、終了後はDC機能の回復が顕著であった。この結果は、治療開始12週までにHCVが陰性化した早期ウイルス反応群（EVR）に限っても同様であった。以上の結果より、IFN治療によるHCVの排除には、DC頻度と機能の活性化が重要であり、DCを標的とした免疫治療の可能性が示唆された。

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型慢性肝炎に対してペグ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HCVNS3/4A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。今年度は、IFN治療効果との関連性から、HCV排除に関与する免疫細胞を同定することを目的とした。

B. 研究方法

セロタイプ1型・高ウイルス量で、ペグIFN α /リバビリン併用療法が導入されたC型慢性肝炎患者を対象とした。治療開始前、治療中、治療終了後におけるDCサブセット、Th1/Th2、NK細胞など、各免疫細胞の頻度を検討した。DCに関しては、ナイーブCD4⁺T細胞に対する増殖刺激活性も治療前後で評価した。治療効果、ウイルス反応性などと免疫細胞との関連性を、単変量/多変量解析により検討した。

（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

ペグIFN α /リバビリン併用療法によって、HCVが排除された著効群（SVR）においては、非著効群に比べて、治療開始前のDC、MDC頻度が高値であった。治療終了後、SVRではPDC頻度が増加し、DCのCD4T細胞刺激能が回復していた。治療中もSVRでは、PDC頻度が増加していたが、非著効群ではPDC頻度は一定であった。多変量解析では、開始後12週時点までのPDC頻度増加は、薬剤投与量やウイルス量とは独立して、SVRに寄与した。この結果は、治療開始後12週目までにHCVが陰性化する早期ウイルス反応群（EVR）に限っても同様であった。

D. 考察

C型慢性肝炎患者に対するペグIFN α /リバビリン併用療法の治療効果に、PDC頻度の増加やDC機能の回復が関与していた。IFNなどの抗ウイルス剤によるHCV排除によって、免疫系が持続的に回復するか否かに関しては、議論の余地がある。本研究の結果は、DCサブセットが、抗ウイルス剤によるHCV排除に関与することを示しており、DCの制御による抗HCV免

疫治療の可能性を示唆している。

E. 結論

C型慢性肝炎患者に対するペグ IFN α /リバビリン併用療法における HCV 排除に、ウイルス学的因子とは独立して、PDC 頻度や DC 機能の回復が関与していた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Itose, I., Kanto, T., Kakita, N., Takebe, S., Inoue, M., Higashitani, K., Miyazaki, M., Miyatake, H., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N., Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis. *J Viral Hepat* 2009 16: 846-852.
2. Uemura, A., Takehara, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Kanto, T., Hiramatsu, N. and Hayashi, N., Natural killer cell is a major producer of interferon gamma that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice. *Cancer Immunol Immunother* 2009 59: 453-463.
3. Oze, T., Hiramatsu, N., Yakushijin, T., Kurokawa, M., Igura, T., Mochizuki, K., Imanaka, K., Yamada, A., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Ito, T., Inui, Y., Hijioka, T., Tamura, S., Yoshihara, H., Hayashi, E., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Pegylated interferon alpha-2b (Peg-IFN alpha-2b) affects early virologic response dose-dependently in patients with chronic hepatitis C genotype 1 during treatment with Peg-IFN alpha-2b plus ribavirin. *J Viral Hepat* 2009. 16: 578-585.
4. Kohga, K., Takehara, T., Tatsumi, T., Miyagi, T., Ishida, H., Ohkawa, K., Kanto, T., Hiramatsu, N. and Hayashi, N., Anticancer chemotherapy inhibits MHC class I-related chain a ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009. 69: 8050-8057.
5. Inoue, Y., Hiramatsu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Hagiwara, H., Oshita, M., Mita, E., Fukui, H., Inada, M., Tamura, S., Yoshihara, H., Hayashi, E., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Miyagi, T., Hoshui, A., Ishida, H., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses. *J Viral Hepat* 2009.
6. Hiramatsu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Inoue, Y., Igura, T., Mochizuki, K., Imanaka, K., Kaneko, A., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Nagase, T., Ito, T., Inui, Y., Hijioka, T., Katayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H.,

Imai, Y., Kato, M., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Ribavirin dose reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with hepatitis C responding to pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin. *J Viral Hepat* 2009. 16: 586-594.

2. 学会発表

1. Kakita N, Kanto T, Itose I, Takebe S, Inoue M, Matsubara T, Higashitani K, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Feasibility of IL-10-producing regulatory Type 1 cells for the monitoring of viable hepatocellular carcinoma through local ablation therapy. The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course (Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)
2. Miyazaki M, Kanto T, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Inoue M, Itose I, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Myeloid dendritic cells as a therapeutic target for immune restoration by HCV NS3 protease inhibitor in chronic hepatitis C patients. The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course (Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)
3. Kanto T, Itose I, Inoue M, Oze T, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Dynamics of plasmacytoid dendritic cells as a predictor of relapse regardless of virological response in pegylated interferon-a and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course (Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)
4. Inoue Y, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Mochizuki K, Mita E, Fukuda K, Imai Y, Kato M, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. Prediction of early response to pegylated interferon and ribavirin in chronic hepatitis C based on amino acid substitutions in the viral core region. The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course (Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)
5. Inoue Y, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Mochizuki K, Hagiwara H, Oshita M, Mita E, Fukui H, Inada M, Tamura S, Yoshihara H, Hayashi E, Inoue A, Imai Y, Kato M, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses.

The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting
and Postgraduate Course
(Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)

G. 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のATPase活性の役割、また、RIG-Iファミリーに属するLGP2の役割はこれまで明らかでなかった。本研究では、LGP2欠損マウス、及びそのATPase活性を欠失するマウスを作製し、LGP2がRIG-Iファミリーで認識されるウイルスに対するIFN産生を正に制御していることを明らかにした。また、RIG-IのATPase活性を欠失する変異マウスの作製により、RIG-Iの機能にATPaseが必須であることを明らかにした。

A. 研究目的

RIG-IファミリーはRNAヘリカーゼ領域を持ち、HCVの認識に関わることが報告されている。RIG-Iファミリーの内、LGP2はRIG-IのインヒビターであることがIn vitroの解析から想定されていた。本研究ではLGP2のIn vivoにおける役割、また、RIG-IファミリーのATPase活性の役割の解析を目的とした。

B. 研究方法

LGP2欠損マウス、LGP2のATPase活性を欠失したマウス更に、RIG-IのATPase活性を欠失した変異マウスを作製し、RNAウイルス感染応答を検討した。

C. 研究結果

LGP2欠損マウス、LGP2ATPase活性欠失マウスの解析から、LGP2がインフルエンザウイルス以外の様々なRNAウイルス感染に対して、必要であることが明らかとなった。また、RIG-IATPase活性欠失マウスの解析より、HCV感染に必要なpoly U/UC配列のRNAを含め様々なRIG-Iリガンドの認識においてATPase活性が必要であることが明らかとなった。

D. 考察

本研究により、LGP2がこれまで考えられてきたような抑制分子ではなく、RIG-Iファミリーの活性化に必要な分子であると考えられた。しかし、LGP2の認識メカニズムに関しては今後の更なる検討が必要である。

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、LGP2がこれまで考えられてきたような抑制分子ではなく、RIG-Iファミリーの活性化に必要な分子であることが明らかとなった。また、RIG-IファミリーにおいてATPase活性はHCVを始め様々なRNAウイルス感染に対するIFN応答に重要であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 140(6):805-20, 2010
2. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.*,107; 1512-1517,2010
3. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Kawai T, Ishii K, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.*,106: 20842-20846,2009
4. Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*,36:487-499,2009.
5. Kawagoe T*, Takeuchi O*, Takabatake Y, Kato H, Isaka Y, Tsujimura T, Akira S. (*equal contribution) TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling and is critical for the prevention of autoimmune nephritis. *Nat Immunol*.10:965-972,2009.
6. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Rehwinkel J, Kato H, Takeuchi O, Akira S, Way M, Schiavo G, Reis e