

## 平成 21 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

課題番号：H19-肝炎一般-010

研究代表者：金子 周一

**I. 研究の意義**

- (1) ウイルス性慢性肝炎に対する治療法は、高額で長期にわたり、また副作用も大きいにもかかわらず、治療効果や副作用の発生を予測する検査法がない。
- (2) ウイルス性慢性肝炎に対する治療効果は患者により大きく異なる。しかし、個々の患者に適した治療法を選択する検査法がない。
- (3) 従来の治療法の限界は明らかである。その治療効果を補完する、あるいはまったく新規の治療法の開発が望まれている。

**II. 研究の目的、期待される成果**

- (1) 治療効果の正確な予測を行うためのジェノミクスを用いた診断法の研究開発を行う。
- (2) 最適の治療法を選択するためのジェノミクスを用いた診断法の研究開発を行う。
- (3) 分子を用いた新たな治療法の研究開発を行う。

**III. 3年間の研究成果**

・研究代表者

- (1) B型およびC型肝炎の違いを構成するRNA, micro-RNA分子から診断の候補マーカーを抽出した。
- (2) 末梢血を用いてインターフェロン反応性予測、および肝がん診断が可能であることを示した。
- (3) インターフェロン感受性と関与するC型肝炎の宿主遺伝子を明らかにし、診断の候補マーカーを抽出した。

・研究分担者(竹原徹郎)

- (1) C型肝炎では樹状細胞からT細胞への刺激が低下していることを示した。
- (2) C型慢性肝炎患者におけるNK細胞の下流シグナルの動態を明らかにした。
- (3) NK細胞内STAT1発現量が高い症例においては、治療初期の応答性が減弱していることを示した。

・研究分担者(宇都浩文)

- (1) 肝細胞癌で増加もしくは減少する特異的なタンパクを用いてマルチマーカー診断法を作成した。既存のマーカーであるAFPやPIVKA-IIよりも診断能が優れていた。
- (2) C3a断片の肝細胞癌における診断能は、AFPやPIVKA-IIよりも高く、C3a断片とAFP、PIVKA-IIを同時に測定することにより、さらに高感度で検出できた。
- (3) MALDI-TOF/MS解析によって血清MnSOD測定が肝病変の進展マーカーである可能性を示した。

・研究分担者(前川伸哉)

- (1) HCV 全塩基配列解析により、NS5A および core 領域の重要性を明らかにした。
- (2) ペグインターフェロン・リバビリン症例を施行した C 型慢性肝炎患者の末梢血解析から、無効例において発現が有意に亢進する、逆に低下する遺伝子を明らかにした。著効症例において IL-8 が有意に低く逆に治療前 RANTES が有意に高いことを明らかにした。

・研究分担者(花田賢太郎)

- (1) 網羅的解析によりコアタンパク質発現細胞で vimentin の発現が顕著に減少していることを見出した。
- (2) 高度不飽和脂肪酸代謝物などが培養細胞レベルでの HCV 産生を阻害する事を明らかにした。
- (3) オートファジー分子機構は HCV 粒子のアセンブリあるいは HCV 粒子特異的な細胞外への放出に関与している可能性を示した。

・研究分担者(田中靖人)

- (1) 化学物質等を誘因とする既存の線維化モデルと異なる HBV 感染による肝線維化モデルを樹立した。
- (2) HBV 感染後に線維化へ至る遺伝子型と至らない遺伝子型を感染させたキメラマウスを比較解析することで Notch、Wnt シグナルの亢進が明らかとなり、新規の経路を同定した。

・研究分担者(堀本勝久)

- (1) グラフィカル連鎖モデルと経路整合性アルゴリズムの組み合わせにより肝硬変から肝がんへの移行の要因となる遺伝子ネットワーク候補の抽出を行った。
- (2) ガウシアンネットワークと代数算法により MAPK パスウェイの特定状況で活性化されるサブネットワーク及びその主要パスを同定した。

・研究分担者(菅 裕明)

- (1) NS3 および NS5 領域を対象とした RaPID 探索を行った。
- (2) NS5A ドメイン I および La 蛋白質に結合する特殊環状ペプチドを選択した。

#### **IV. 今後考えられる新たな課題**

- (1) 示された候補分子群の中から、C 型慢性肝炎に対する治療法を選択する際に必要な血液診断マーカーを特定し、新たな診断法の開発研究を進める。
- (2) 本研究によって特定された、肝炎進展の診断、及び肝がんの診断における新規血液診断マーカーの有用性を検証する。
- (3) 明らかにされた治療効果に関わる分子とインターフェロン治療との関連を明確にする。
- (4) IL28B 遺伝子などの SNP と明らかにされたインターフェロン反応性に関わる分子との関連を解析する。
- (5) HCV 粒子の産生に影響を与える脂質関連分子、線維化に関連する分子、NS および IRES を標的とした新規抗ウイルス剤の開発研究を行う。

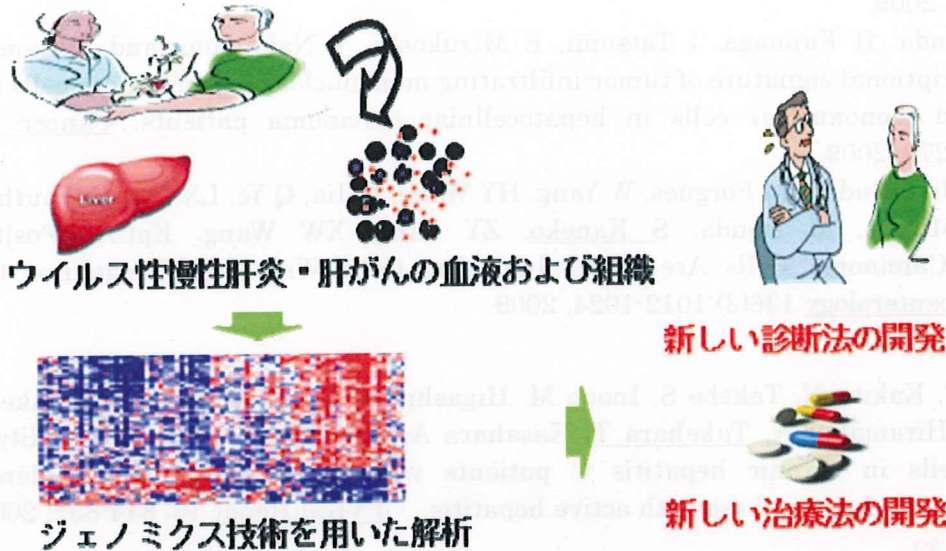
#### **V. 行政施策への貢献の可能性**

- (1) 治療法を決定するアルゴリズムを作成し、不要な治療を抑制、医療費の削減に貢献する。
- (2) 新たな治療法の開発により、患者数の減少および医療費の削減に貢献する。

## VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- ・研究代表者(金子周一)
- 1. S Ura, M Honda, T Yamashita, T Ueda, H Takatori, R Nishino, H Sunakozaka, Y Sakai, K Horimoto, and S Kaneko. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. Hepatology 49(4):1098-1112, 2009.
- 2. Y Sakai, M Honda, H Fujinaga, I Tatsumi, E Mizukoshi, Y Nakamoto, and S Kaneko. Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. Cancer Res 68(24):10267-10279, 2009.
- 3. T Yamashita, J Ji, A Budhu, M Forgues, W Yang, HY Wang, H Jia, Q Ye, LX Qin, E Wauthier, LM Reid, H Minato, M Honda, S Kaneko, ZY Tang, XW Wang. EpCAM-Positive Hepatocellular Carcinoma Cells Are Tumor-Initiating Cells With Stem/Progenitor Cell Features. Gastroenterology 136(3):1012-1024, 2009.
- ・研究分担者(竹原徹郎)
- 4. Itose I, Kanto T, Kakita N, Takebe S, Inoue M, Higashitani K, Miyazaki M, Miyatake H, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, 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 16: 844-852, 2009.
- ・研究分担者(宇都浩文)
- 5. Kanmura S, Uto H, Sato Y, Kumagai K, Sasaki F, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nagata K, Hayashi K, Stuver SO, Tsubouchi H. The complement component C3a fragment is a potential biomarker for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol 2009 (in press).
- ・研究分担者(前川伸哉)
- 6. Maekawa S, Enomoto N. Viral factors influencing the response to the combination therapy of peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C. J Gastroenterol. 2009;44(10):1009-15.
- ・研究分担者(花田賢太郎)
- 7. Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M. "Cellular vimentin content regulates the protein level of Hepatitis C virus core protein and the Hepatitis C virus production in cultured cells." Virology 383 (3), 319-327, 2009
- ・研究分担者(田中靖人)
- 8. Sugiyama M, Tanaka Y, et. al., Direct Cytopathic Effects of Particular Hepatitis B Virus Genotypes in severe combined immunodeficiency transgenic with urokinase-type plasminogen activator mouse with Human Hepatocytes. Gastroenterology. 2009;136(2):652-662.
- ・研究分担者(堀本勝久)
- 9. Nakatsui, M., Horimoto, K., Okamoto, M., Tokumoto, Y. and Miyake, J.: Parameter Optimization by Using Differential Elimination: A General Approach for Increasing Parameter Accuracy. BMC Sys. Biol. in press.
- ・研究分担者(菅 裕明)
- 10. H. Xiao, H. Murakami, H. Suga, A. R. Ferre-D'Amare "Structural basis of specific tRNA aminoacylation by a small in vitro selected ribozyme" Nature 454, 358-361 (2008).

## VII. III (3年間の研究成果)の概要図等



## 診断に用いる分子の抽出の成果

- インターフェロンの治療効果と関連する血液および肝臓内のRNA, micro-RNA分子群を明らかにし、治療効果を予測するための分子マーカー候補を抽出した
- C型慢性肝炎における治療効果と樹状細胞、NK細胞の機能低下とが関連することを示し、新たな診断マーカーを抽出した
- 肝細胞癌の新たな血中蛋白マーカーを明らかにした
- 肝疾患進展の新たな血中蛋白マーカーを明らかにした

## 治療に用いる分子の抽出の成果

- HBVキメラマウスの解析から線維化にかかわる治療の標的分子を抽出した
- 脂質代謝関連物質のHCV阻害効果を明らかにした
- NS蛋白およびLaを標的とした特殊環状ペプチドを選択した
- ゲノム情報から活性化分子を特定する方法を開発した

## ○研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

昭和 62 年～平成元年	米国国立衛生研究所 (NIH) 客員研究員
平成 5 年～平成 7 年	米国南カリフォルニア大学客員教授
平成 8 年～平成 16 年	金沢大学医学部第一内科 講師・助教授
平成 16 年～現在	金沢大学大学院医学系研究科恒常性制御学(消化器内科) 教授 金沢大学医学部長(平成 18 年より併任)

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

昭和 58 年～昭和 61 年	金沢大学 服部 信教授、吉川 寛教授、村上清史助教授
昭和 62 年～平成元年	米国国立衛生研究所 (NIH) Robert H Purcell
平成 5 年～平成 7 年	米国南カリフォルニア大学 French Anderson
平成 8 年～平成 15 年	金沢大学 小林健一教授

### ・主な研究課題

- ・肝炎ウイルスによる肝炎発症機構の解明と、その制御、治療に関する研究
- ・肝発癌の解析と、肝癌診断および治療に関する研究
- ・Genomics 技術を用いた肝臓病学、および血液を用いた診断学の研究

### ・これまでの研究実績

1. E Mizukoshi, Y Nakamoto, K Arai, T Yamashita, N Mukaida, K Matsushima, O Matsui, S Kaneko. Enhancement of tumor-specific T cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. Int J Cancer (in press)
2. S Nakamura, T Takamura, N Matsuzawa-Nagata, H Takayama, H Misu, H Noda, S Nabemoto, S Kurita, T Ota, H Ando, K Miyamoto, S Kaneko. Palmitate Induces Insulin Resistance in H4IIEC3 Hepatocytes through Reactive Oxygen Species Produced by Mitochondria. J Biol Chem 284(22):14809-14818, 2009.
3. H Ando, T Takamura, N Matsuzawa-Nagata, KR Shima, S Nakamura, M Kumazaki, S Kurita, H Misu, N Togawa, T Fukushima, A Fujimura, S Kaneko. The hepatic circadian clock is preserved in a lipid-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. Biochem Biophys Res Commun 380(3):684-688, 2009.
4. H Ando, T Takamura, N Matsuzawa-Nagata, KR Shima, T Eto, H Misu, M Shiramoto, T Tsuru, S Irie, A Fujimura, and S Kaneko. Clock gene expression in peripheral leucocytes of patients with type 2 diabetes. Diabetologia 52(2)329-335, 2009.
5. T Yamashita, M Honda, H Takatori, R Nishino, H Minato, H Takamura, T Ohta, and S Kaneko. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. J Hepatology 50(1):100-110, 2009.

6. BK Popivanova, K Kitamura, Y Wu, T Kondo, T Kagaya, S Kaneko, M Oshima, C Fujii, N Mukaida. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. J Clin Invest 118(2):560-570, 2008.
7. T Takamura, H Misu, N Matsuzawa-Nagata, M Sakurai, T Ota, A Shimizu, S Kurita, Y Takeshita, H Ando, M Honda, S Kaneko. Obesity upregulates genes involved in oxidative phosphorylation in livers of diabetic patients. Obesity 16(12):2601-2609, 2008.
8. H Minagawa, T Yamashita, M Honda, Y Tabuse, K Kamiyo, A Tsugita, and S Kaneko. Comparative analysis of proteome and transcriptome in human hepatocellular carcinoma using 2D-DIGE and SAGE. Protein J 27(7-8):409-419, 2008.
9. T Tsuchiyama, Y Nakamoto, Y Sakai, N Mukaida, and S Kaneko. Optimal amount of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy against hepatocellular carcinoma by M1 macrophage activation. Cancer Sci 99(10):2075-2082, 2008.
10. N Iida, Y Nakamoto, T Baba, K Kakinoki, YY Li, Y Wu, K Matsushima, S Kaneko, and N Mukaida. Tumor cell apoptosis induces tumor-specific immunity in a CC chemokine receptor 1- and 5-dependent manner in mice. J Leukoc Biol 84(4):1001-1010, 2008.
11. E Mizukoshi, M Honda, K Arai, T Yamashita, Y Nakamoto, and S Kaneko. Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. J Hepatol 49(6):946-954, 2008.
12. N Matsuzawa-Nagata, T Takamura, H Ando, S Nakamura, S Kurita, H Misu, T Ota, M Yokoyama, M Honda, K Miyamoto, and S Kaneko. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. Metabolism 57(8):1071-1077, 2008.
13. M Uno, S Kurita, H Misu, H Ando, T Ota, N Matsuzawa-Nagata, Y Kita, S Nabemoto, H Akahori, Y Zen, Y Nakanuma, S Kaneko, and T Takamura. Tranilast, an antifibrogenic agent, ameliorates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 48(1):109-118, 2008.
14. R Nishino, M Honda, H Takatori, H Minato, Y Zen, M Sasaki, H Takamura, K Horimoto, T Ohta, Y Nakanuma, and S Kaneko. Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma. J Hepatol 49(2):207-216, 2008.
15. R Teramoto, H Minagawa, M Honda, K Miyazaki, Y Tabuse, K Kamiyo, T Ueda, S Kaneko. Protein expression profile characteristic to hepatocellular carcinoma revealed by 2D-DIGE with supervised learning. Biochim Biophys Acta 1784(5):764-772, 2008.
16. H Minagawa, M Honda, K Miyazaki, Y Tabuse, R Teramoto, T Yamashita, R Nishino, H Takatori, T Ueda, K Kamiyo, and S Kaneko. Comparative proteomic and transcriptomic

- profiling of human hepatocellular carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 366(1):186-192, 2008.
17. S Aburatani, F Sun, S Saito, M Honda, S Kaneko, and K Horimoto. Gene systems network inferred from expression profiles in hepatocellular carcinogenesis by graphical gaussian model. EURASIP J Bioinform Syst Biol 47214, 2007.
  18. Y Kita, E Mizukoshi, T Takamura, M Sakurai, Y Takata, K Arai, T Yamashita, Y Nakamoto, and S Kaneko. Impact of diabetes mellitus on prognosis of patients infected with hepatitis C virus. Metabolism 56(12):1682-1288, 2007.
  19. T Takamura, M Honda, Y Sakai, H Ando, A Shimizu, T Ota, M Sakurai, H Misu, S Kurita, N Matsuzawa-Nagata, M Uchikata, S Nakamura, R Matoba, M Tanino, K Matsubara, and S Kaneko. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes. Biochem Biophys Res Commun 361(2):379-384, 2007.
  20. N Matsuzawa, T Takamura, S Kurita, H Misu, T Ota, H Ando, M Yokoyama, M Honda, Y Zen, Y Nakanuma, K Miyamoto, and S Kaneko. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. Hepatology 46(5):1392-1403, 2007.
  21. N Oishi, K Shilagardi, Y Nakamoto, M Honda, S Kaneko, and S Murakami. Hepatitis B virus X protein overcomes oncogenic RAS-induced senescence in human immortalized cells. Cancer Sci 98(10):1540-1548, 2007.
  22. T Tsuchiyama, Y Nakamoto, Y Sakai, Y Marukawa, M Kitahara, N Mukaida, and S Kaneko. Prolonged, NK cell-mediated antitumor effects of suicide gene therapy combined with monocyte chemoattractant protein-1 against hepatocellular carcinoma. J Immunol 178(1):574-583, 2007.
  23. T Ota, T Takamura, S Kurita, N Matsuzawa, Y Kita, M Uno, H Akahori, H Misu, M Sakurai, Y Zen, Y Nakanuma, and S Kaneko. Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Gastroenterology 132(1):282-293, 2007.

特許取得数 1件

【登録番号】特登-03955379

【発明の名称】C型肝炎ウイルス除去用吸着材、吸着装置及び吸着方法

【特許権者】株式会社カネカ

【発明者】荻野 英司、野村 道雄、旭孝 司、金子 周一、酒井 明人

政策提言：肝炎研究7カ年戦略（平成20年、平成21年）

肝がん診療ガイドライン（2005年版, 2009年度版）

・平成22年度 肝炎等克服緊急対策研究事業への新規研究課題の応募状況

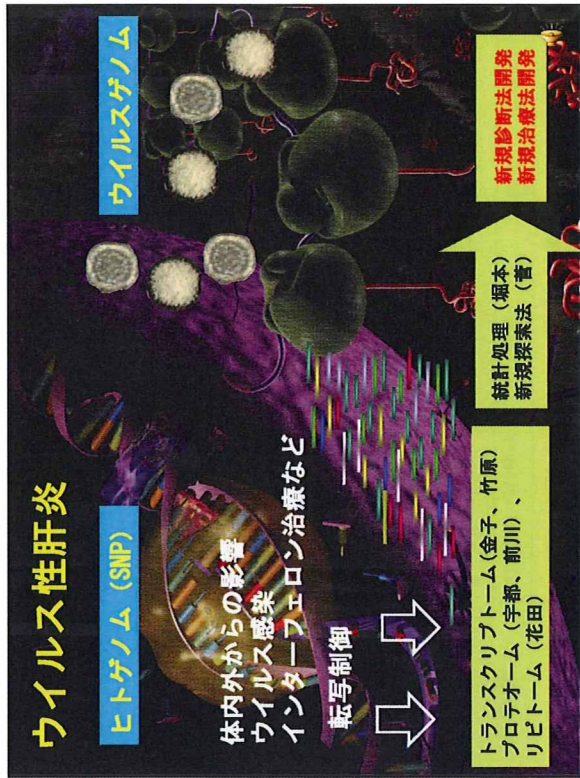
課題名「ウイルス性肝疾患に対する分子標的治療創薬に関する研究」

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

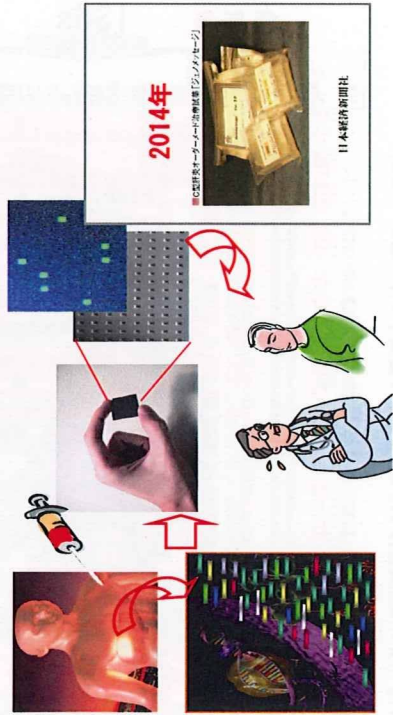
研究課題：

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎  
に対する新規診断・治療法の開発  
(H19-肝炎-一般-010)

研究代表者 金子周一

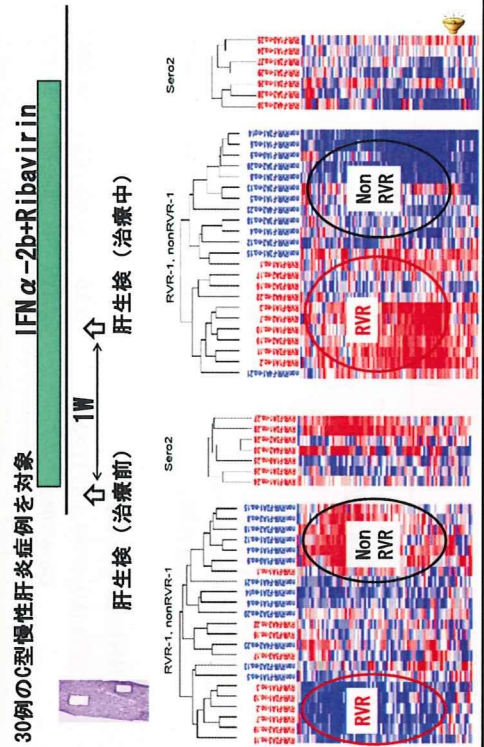


### ジェノミクス技術を用いた新規診断法開発



1. インターフェロン治療の効果予測、治療法選択を行うための診断研究開発
2. 疾病進展、肝癌の診断研究開発

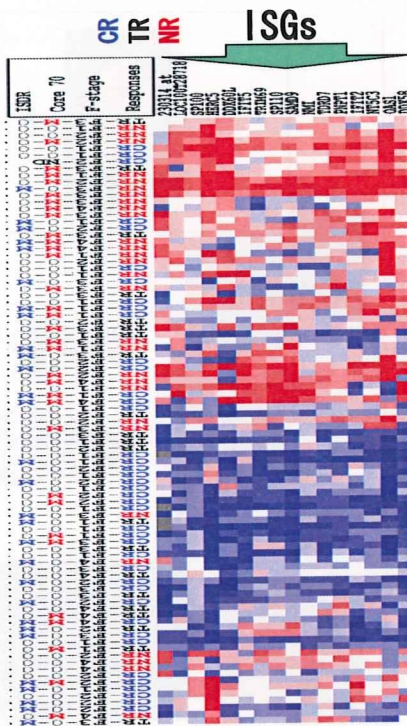
### インターフェロン治療の反応性と 肝細胞内インターフェロン誘導遺伝子 (ISGs) の発現





インターフェロン治療効果と治療前インターフェロン誘導遺伝子 (ISGs)、ウイルス変異

Peg-IFN+Rib療法を行ったセロタイプ I 型高ウイルス血症例 168例

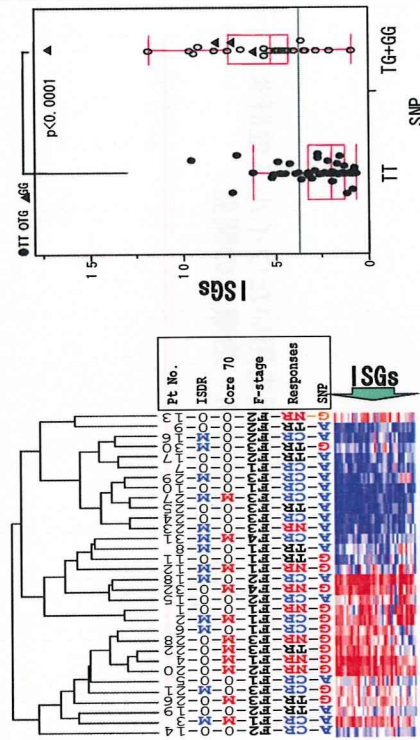


多変量ロジスティック回帰 (Peg-IFN + Rib 1 型高ウイルス血症例 n=168)

	Odds	95% CI	P value
<b>SVRに寄与する因子</b>			
ISGs (Mx, IF144, IFIT1) ≤3.5	5.50	(2.40-14.5)	0.0002
ISDR (≥2)	5.09	(2.50-14.3)	0.0002
HCV-RNA (≤1900 KIU/ml)	3.10	(1.31-6.04)	0.0073
F stage (F1-2)	2.73	(1.23-6.80)	0.0336
Age (≤58)	2.36	(1.32-6.04)	0.0481
<b>NRIに寄与する因子</b>			
ISGs (Mx, IF144, IFIT1) >3.5	8.65	(3.92-20.2)	<0.0001
Core 70M	2.43	(1.08-5.55)	0.0313

1型高ウイルス血症例におけるPeg-IFN + Rib 療法の治療効果はIFN投与前のインターフェロン誘導遺伝子発現によって規定されている

治療前のインターフェロン発現誘導遺伝子 (ISGs) と IL28B 遺伝子多型との関連

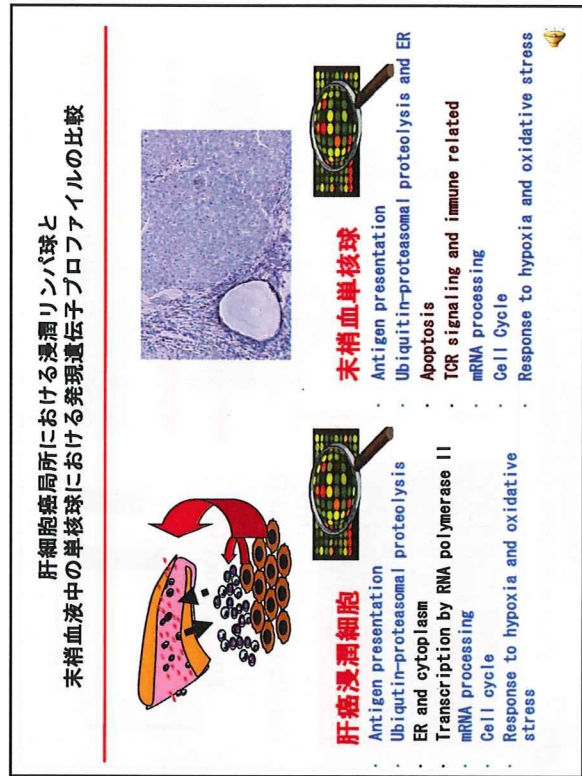
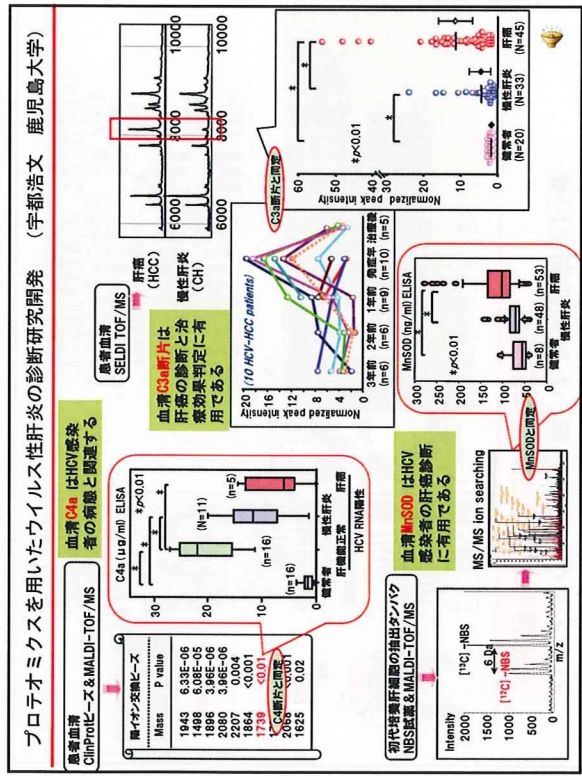
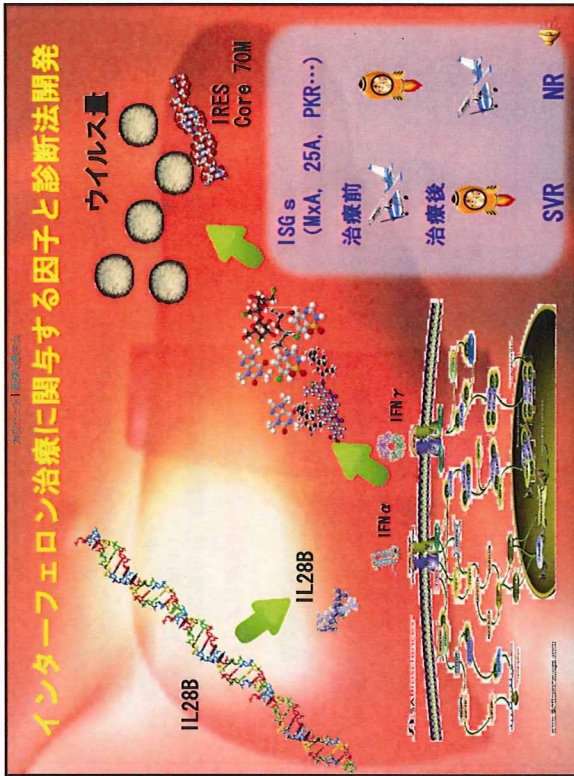
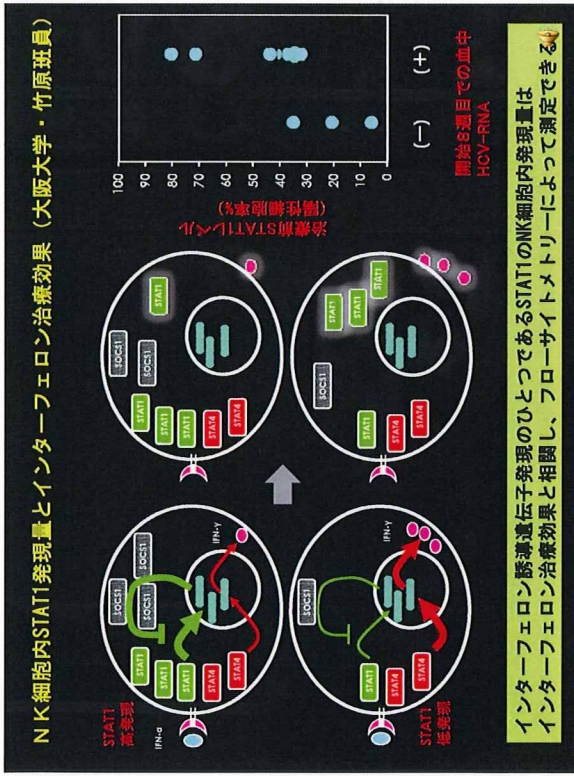


(SNP解析は田中靖人さんと共同研究)

IL28B多型と関連する因子

単変量	Clinical category	TT	TG+GG	P value					
No. of patients	Treatment response	n=60	n=31						
					SVR vs TR vs NR	33 vs 18 vs 9	7 vs 4 vs. 20	<0.001	
					Liver factors	F stage (F1-2 vs. F3-4)	36 vs. 24	23 vs. 17	0.905
						ISGs (Mx, IF144, IFIT1)	1.98	5.22	<0.001
						IL28B	19.6	22.3	0.612
					Laboratory parameters	HCV-RNA (KIU/ml)	2055	1970	0.602
						BMI	24.5	22.9	0.006
						γ-GTP (U/L)	61	53	0.517
						LDL-Chol (mg/dl)	84	69	0.052
					Viral factors	ISDR mutations ≤1 vs. ≥2	38 vs. 22	23 vs. 7	0.194
Core 70 M vs N	44 vs 11	13 vs 17	0.005						
多変量	Category	ISGs (Mx, IF144, IFIT1)	Odds						
			17.8	p<0.0001					

IL28Bの多型はISGsと高い相関を示す  
IL28Bの多型を測定することによってインターフェロン治療効果を予測することが出来る  
予測からはずれる症例が多く存在し、さらに、ISGsとの関連を明らかにする必要がある



## ジェノミクス技術を用いた新規診断法開発 消化器癌の血液を用いた診断法



**消化器がん血液判定**  
新診断法  
金沢大学  
人向けで実用期待

**1In20+**  
朝日新聞  
2014年11月20日

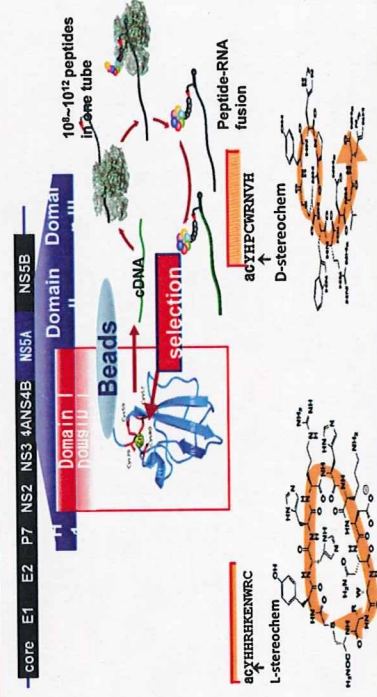
**事業化のスケジュール**  
H21年10月 特許実施許諾契約締結  
H22年01月 医薬品機構事前相談  
H22年03月 高度医療実地申請書  
→ 高度医療評価委員会  
H22年12月 先進医療制度による検査開始  
H23年12月 体外診断薬申請 (第2種医薬品)

**消化器がん検査**  
消化器がん検査  
血液検査  
早期発見  
早期治療



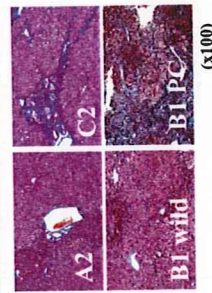
2014年

## RaPIDディスプレイ法を用いたHCVの複製を阻害する環状特殊ペプチドの獲得 (菅 裕明 東京大学)

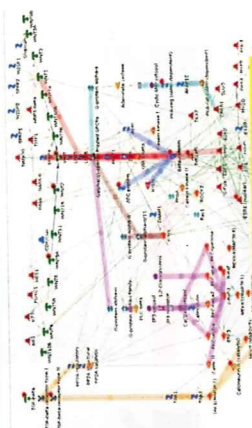


NS5Aドメインに結合する特殊環状ペプチドを $10^7$ を超る多様性ライブラリーからセレクト  
ションした。標的に対して数百から数千の解離定数をもった特殊環状ペプチドを獲得した。  
レプリコン系を用いて、数にそれら特殊環状ペプチドの評価を行っている。

## ジェノミクスを用いた治療標的の同定 (田中靖人 名古屋立大学)



HBVによる直接傷害性を反映



ROS production



HBV感染後の線維化にかかわるROS産生の  
経路など新規標的治療経路を同定した

キメラマウスで観察された遺伝子群は  
ヒトのプロファイルと異なる  
↑  
“免疫不全下におけるHBVによる直接傷害性を反映”

## 研究成果のまとめ

### ジェノミクス技術を用いた新規診断法の開発

- C型肝炎肝炎に対するインターフェロン治療の効果とインタフェロン誘導遺伝子 (ISGs) およびIL28Bとの関連を明らかにし、治療効果を予測する、あるいは治療法を選択する新規診断法の開発研究を行った。  
(金子、竹原、前川、塚本)
- 慢性肝炎の進展、および肝癌の診断に有用である新たな血液中タンパクバイオマーカーを明らかにし、検出系の開発を行った。(宇都)
- 血液の遺伝子発現を解析することによって消化器癌を診断する方法を研究し、臨床検査法の開発を行った。(金子)

### ジェノミクス技術を用いた新規治療法の開発

- ROS産生の経路など、B型肝炎肝炎の線維化にかかわる新規標的治療経路を同定した。(田中)
- HCV産生とピメンチン、脂肪酸、オートファジーとの関連を明らかにした。(花田)
- NS5Aを標的とした特殊環状ペプチドを獲得し、HCV複製に及ぼす抑制効果の評価を開始した。(菅)

## 平成 21 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：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

課題番号：H19-肝炎一般-011

研究代表者：松浦 善治

**I. 研究の意義**

- (1) 全世界には 2 億人もの HCV 感染者が存在する。
- (2) HCV 感染は、慢性肝炎、肝硬変、そして肝細胞癌の主要な原因である。
- (3) 現行の治療法の著効率は 50%ほどであり新規治療法の開発が急務である。

**II. 研究の目的、期待される成果**

- (1) HCV の宿主免疫回避機構を解明する。
- (2) HCV の持続感染機構を解明する。
- (3) 現行の慢性 C 型肝炎療法を補完する新しい免疫制御療法の開発が期待される。

**III. 3 年間の研究成果**

・研究代表者 (松浦)

- (1) HCV の NS5A 蛋白質が TLR シグナル伝達系で最も重要なアダプター分子である MyD88 に結合して、シグナル伝達を抑制することを見いだした。
- (2) HCV 感染細胞では CD44 のリガンドであるヒアルロン酸の刺激により、TLR2/CD44/MyD88 依存的なシグナル経路を介して IP-10 の産生が制御されている事が示された。
- (3) 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。

・分担研究者 (竹内)

- (1) RIG-I 受容体ファミリーは RIG-I、MDA5、LGP2 より構成されている。RIG-I と MDA5 は、それぞれ、短鎖と長鎖の二本鎖 RNA を認識して、I 型 IFN 産生を誘導していることを明らかにした。HCV の 3' 非翻訳領域をコードする RNA は RIG-I により認識された。
- (2) 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。
- (3) 細胞傷害性 T 細胞応答に、TLR を介した IFN 産生が重要であることを示した。

・分担研究者 (考藤)

- (1) IFN $\alpha$ /リバビリン併用療法においては、プラスマサイトイド樹状細胞 (DC) の増加と DC 機能の回復が HCV 排除に関与していた。
- (2) 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。
- (3) 以上の成績より、HCV の排除には DC の活性化が重要であり、MDC の TLR3-TRIF-TRAF6 の伝達経路が免疫制御治療の標的となる可能性が示された。

・分担研究者 (藤田)

- (1) RIG-I の非自己 RNA 認識ドメインの立体構造を解明し、C 末端の「塩基性のくぼみ」でウイルス RNA と宿主の RNA の識別を行なうことを明らかにした。
- (2) RIG-I は細胞質に広く分布するが、HCV 感染細胞ではウイルス抗原と共に脂肪滴の周辺に局在した。
- (3) 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と考えられた。

## ・分担研究者(土方)

- (1) ヒト血清由来 HCV が効率良く感染し増殖する新規不死化ヒト肝細胞を樹立した。
- (2) 感染性ウイルス粒子の産生に細胞の脂肪滴が重要な役割を果たすことを示した。
- (3) ヒト初代培養肝細胞では IRF-7 が高発現しており、ヒト IRF7 遺伝子プロモーターに肝臓特異的転写因子応答配列を見いだした。さらに、中空糸を用いた不死化肝細胞による患者血液由来 HCV 感染実験系を用いて、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。

## ・分担研究者(池田)

- (1) ヒト不死化肝細胞を用いて、HCV の NS3/4A プロテアーゼは IPS-1 を切断するが、TRIF を切断しないことを明らかにした。
- (2) HCV 遺伝子型 2a 型の JFH-1 株、および、HCV と近縁な GBV-B ウイルスの NS3-4A プロテアーゼでも IPS-1 は切断されるが、TRIF は切断されなかった。また、病態の異なる患者由来の NS3/4A でも IPS-1 を切断するが、TRIF を切断しないことを確認した。
- (3) 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 $\beta$  が誘導されることを見いだした。

## ・分担研究者(小原)

- (1) 任意の時期に HCV 蛋白質を発現できるトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。発現を誘導されたマウスは急性肝炎から慢性化へ移行し、肝細胞の膨化、索状配列の乱れ、脂肪変性、グリコーゲン変性などの異常が認められた。
- (2) 慢性肝炎状態の Tg 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、組織異常の正常化が観察された。
- (3) 以上の成績から、HCV 感染による病態発症には宿主免疫応答が重要であることが示された。

**IV. 今後考えられる新たな課題**

- (1) 臨床材料から病原性を保持した HCV の分離可能な培養系の構築を試みる。
- (2) RIG-I とウイルス複合体の局在を検討する。
- (3) 患者血清由来 HCV の感染による IRF7 活性化機構を解析する。
- (4) トランスジェニックマウスを用いて肝炎の増悪化に関与する免疫担当細胞を同定する。
- (5) 免疫細胞における HCV 標的分子を同定する。

**V. 行政施策への貢献の可能性**

- (1) HCV の免疫回避機構が解明され、その責任分子を標的とした免疫制御療法は、従来の治療効果を改善することが期待される。
- (2) 保健、医療、福祉の向上に直結するとともに、高齢者医療費の低減に貢献する。

**VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)**

研究代表者 (松浦)

1. 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).
2. 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).
3. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. Taguwa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y., *J. Virol.*, 82, 2631-2641 (2008).
4. Critical role of PA28 $\gamma$  in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y., *PNAS*, 104, 1661-1666 (2007).
5. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y., *J. Virol.*, 81, 8953-8966 (2007).

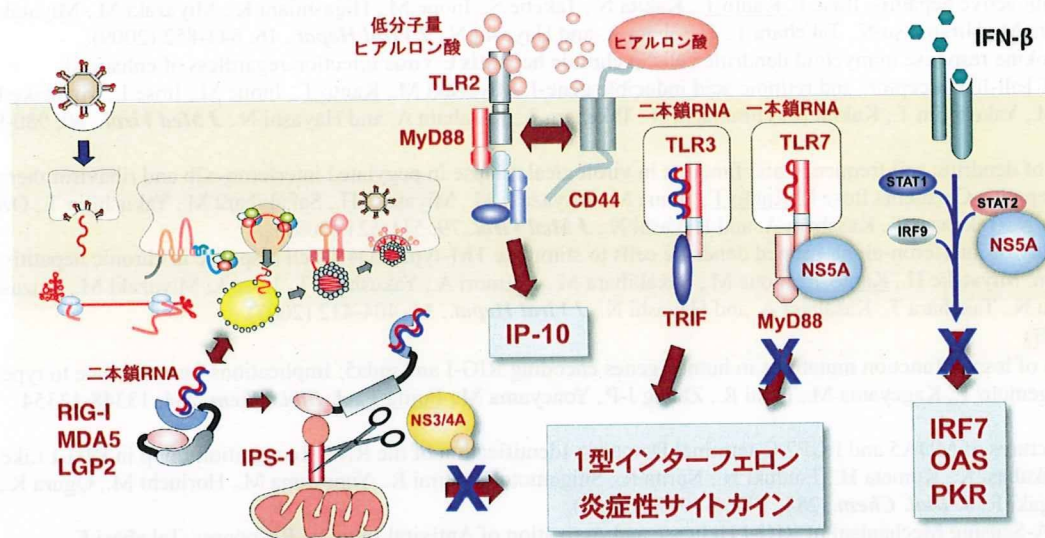
分担研究者(竹内)

6. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. Matsushita K.\*, Takeuchi O.\*, Standley DM., Kumagai Y., Kawagoe T., Miyake T., Satoh T., Kato H., Tsujimura T., Nakamura H., Akira S. (\*equal contribution) *Nature*, 458, 1185-1190 (2009).
7. TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling and is critical for the prevention of autoimmune nephritis. Kawagoe T.\*, Takeuchi O.\*, Takabatake Y., Kato H., Isaka Y., Tsujimura T., Akira S. (\*equal contribution) *Nat Immunol.*, 10, 965-972 (2009).
8. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. Satoh T., Kato H., Kumagai Y., Yoneyama

- M., Sato S., Matsushita K., Tsujimura T., Fujita T., Akira S., Takeuchi O. *PNAS*, (in press).
9. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. Kawagoe T., Sato S., Matsushita K., Kato H., Matsui K., Kumagai Y., Saitoh T., Kawai T., Takeuchi O., Akira S. *Nat Immunol.*, 9, 684-691 (2008).
  10. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. Kato H., Takeuchi O., Mikamo-Satoh E., Hirai R., Kawai T., Matsushita K., Hiiragi A., Dermody TS., Fujita T., Akira S. *J Exp Med.*, 7, 1523-1527 (2008).
- 分担研究者 (考藤)
11. Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis. 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., *J Viral Hepat.*, 16, 844-852 (2009).
  12. 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. Miyazaki M., Kanto T., Inoue M., Itose I., Miyatake H., Sakakibara M., Yakushijin T., Kakita N., Hiramatsu N., Takehara T., Kasahara A. and Hayashi N., *J Med Virol.*, 80, 980-988 (2008).
  13. Involvement of dendritic cell frequency and function in virological relapse in pegylated interferon- $\alpha$ 2b and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. Itose I., Kanto T., Inoue M., Miyazaki M., Miyatake H., Sakakibara M., Yakushijin T., Oze T., Hiramatsu N., Takehara T., Kasahara A. and Hayashi N., *J Med Virol.*, 79, 511-521 (2007).
  14. Impaired ability of interferon- $\alpha$ -primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection. Miyatake H., Kanto T., Inoue M., Sakakibara M., Kaimori A., Yakushijin T., Itose I., Miyazaki M., Kuzushita N., Hiramatsu N., Takehara T., Kasahara A. and Hayashi N., *J Viral Hepat.*, 14, 404-412 (2007).
- 分担研究者 (藤田)
15. Identification of loss of function mutations in human genes encoding RIG-I and mda5: Implications for resistance to type 1 diabetes. Shigemoto T., Kageyama M., Hirai R., Zheng J-P., Yoneyama M., Fujita T., *J. Biol. Chem.* 284, 13348-13354 (2009).
  16. Solution Structures of MDA5 and LGP2 C-terminal Domains: Identification of the RNA Recognition Loop in RIG-I Like Receptors. Takahashi K., Kumeta H., Tsuduki N., Narita R., Shigemoto T., Hirai R., Yoneyama M., Horiuchi M., Ogura K., Fujita T., Inagaki F., *J. Biol. Chem.*, 284, 17465-17474 (2009).
  17. Non-self RNA-Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. Takahashi K., Yoneyama M., Nishihori T., Hirai R., Kumeta H., Narita, R., Gale Jr. M., Inagaki F. and Fujita T., *Molecular Cell*, 29, 428-440 (2008).
  18. Viral Infections Activate Types I and  $\square$  Interferon Genes through a Common Mechanism. Onoguchi K., Yoneyama M., Takemura A., Akira S., Taniguchi T., Namiki H., and Fujita T., *J. Biol. Chem.*, 282, 7576-7581 (2007).
- 分担研究者 (土方)
19. Strain-dependent viral dynamics and virus cell interactions observed in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood borne HCV. Aly HH., Qi Y., Atsuzawa K., Usuda N., Takada Y., Tanaka Y., Mizogami M., Shimotohno K., and Hijikata M., *Hepatology*, 50, 689-696 (2009).
  20. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. Aly HH., Watashi K., Hijikata M., Kaneko H., Takada Y., Egawa H., Uemoto S., and Shimotohno K., *J. Hepatol.*, 46, 26-36 (2007).
  21. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. Miyanari Y., Atsuzawa K., Usuda N., Watashi K., Hishiki T., Zayas M., Bartenschlager R., Wakita T., Hijikata M., and Shimotohno K., *Nat. Cell Biol.*, 9, 1089-1097 (2007).
  22. Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptors with viral RNA polymerase NS5B. Watashi K., Inoue D., Hijikata M., Goto K., Aly HH., and Shimotohno K., *J. Biol. Chem.*, 282, 32765-32772 (2007).
- 分担研究者 (池田)
23. Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of the glutathione redox system and oxidative stress. Kuroki M., Ariumi Y., Ikeda M., Dansako H., Wakita T., and Kato N., *J. Virol.*, 83, 2338-2348 (2009).
  24. Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. Dansako H., Ikeda M., and Kato N., *FEBS J.*, 274, 4161-4176 (2007).
  25. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus (HCV) RNA replication. Ariumi Y., Kuroki M., Abe K., Dansako H., Ikeda M., Wakita T., and Kato N., *J. Virol.*, 81, 13922-13926 (2007).
  26. Comprehensive Analysis of the Effects of Ordinary Nutrients on Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. Yano M., Ikeda M., Abe K., H. Dansako H., Ohkoshi S., Aoyagi Y., and Kato N., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 2016-2027 (2007).
- 分担研究者 (小原)
27. Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins. Machida K., Tsukiyama-Kohara K., Sekiguchi S., Seike E., Tóne S., Hayashi Y., Kasama Y., Shimizu M., Takahashi H., Taya C., Yonekawa H., Tanaka N., and Kohara M., *Gastroenterology*, 137, 285-296 (2009).
  28. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in Tupaia belangeri. Amako Y., Tsukiyama-Kohara K., Katsume A., Hirata Y., Sekiguchi S., Tobita Y., Hayashi Y., Hishima T., Funata N., Yonekawa H., and Kohara M., *J. Virol.*, (in press).
  29. Liver target delivery of small interfering RNA to the HCV gene by lactosylated cationic liposome. Watanabe T., Umehara T., Yasui F., Nakagawa S., Yano J., Ohgi T., Sonoke S., Inoue K., Yoshiba M., and Kohara M., *J. Hepatol.*, 47, 744-750 (2007).
  30. Non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 with interferon shows synergistic anti-HCV effect in chimeric mouse. Inoue K., Umehara T., Ruegg UT., Yasui F., Watanabe T., Yasuda H., Yoshiba M., Dumont JM., Scalfaro P., and Kohara M., *Hepatology*, 45, 921-928 (2007).

## VII. III (3年間の研究成果)の概要図等

## 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

**HCV感染は自然免疫の誘導を阻害する**

IFN $\alpha$ /リバビリン併用療法においては、骨髄由来樹状細胞の増加と機能の回復がHCV排除に関与していた(考藤)

HCVのNS3/4AプロテアーゼはIPS-1を切断するが、TLR3のアダプター分子であるTRIFを切断しないことが示された(池田)

HCVのNS5A蛋白質はMyD88と結合してTLRのシグナル伝達を阻害する(松浦)

HCV感染細胞ではTLR2/CD44/MyD88依存的な経路でIP-10が産生される(松浦)

**細胞質RNAセンサーの解析**

RIG-Iの非自己RNA認識ドメインの立体構造を解明した(藤田)

RIG-IとMDA5がそれぞれ短鎖と長鎖二本鎖RNAを認識することを明らかにした(竹内)

LGP2はIFN産生の抑制因子と考えられていたが、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(竹内)

**臨床材料からのHCV分離培養系の確立**

ヒト血清由来HCVが効率良く感染し増殖する新規不死化ヒト肝細胞を樹立し、中空糸を用いた培養により、患者血液由来HCVの細胞培養系を樹立した(土方)

**自然免疫と獲得免疫**

細胞傷害性T細胞応答にはTLRを介したIFN産生が重要であることを明らかにした(竹内)

**マウスモデルを用いた解析**

自然免疫活性化剤の投与によりHCV感染キメラマウスからIFN非依存的にHCVが排除された(小原)

任意の時期にHCV遺伝子をスイッチング発現するトランスジェニックマウスに、HCV蛋白質を発現するワクチニアウイルスを接種すると、組織異常の正常化が観察された(小原)

## ○研究代表者の研究歴等

## ・過去に所属した研究機関の履歴

所 属	職 名	在職期間
第一製薬株式会社中央研究所	研究員	昭和 55 年 4 月-昭和 57 年 7 月
国立予防衛生研究所	研究員	昭和 57 年 8 月-平成 4 年 8 月
オックスフォード大ウイルス学研究所	研究員	昭和 59 年 9 月-昭和 61 年 9 月
国立感染症研究所ウイルス第二部	室長	平成 4 年 8 月-平成 12 年 3 月
大阪大学微生物病研究所	教授	平成 12 年 4 月-現在に至る

## ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

第一製薬株式会社中央研究所	大谷 剛 主幹研究員
国立予防衛生研究所	森田千春 室長
オックスフォード大ウイルス学研究所	David H. L. Bishop 所長
国立感染症研究所ウイルス第二部	宮村達男 部長 (現所長)
大阪大学微生物病研究所	森石恒司 准教授

## ・主な研究課題

- 1 HCV の感染増殖機構と病原性発現機構の分子生物学的解析。
- 2 慢性C型肝炎の新しい治療法の開発。
- 3 遺伝子治療用新規ウイルスベクターの開発。

## ・これまでの研究実績

1. 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. *PNAS*, 106, 12986-12991 (2009).
2. Co-chaperone 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).
3. 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).
4. 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).
5. Processing of capsid protein by cathepsin L plays a crucial role in replication of the Japanese encephalitis virus in neural and macrophage cells. Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 8477-8487 (2007).
6. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 8601-8612 (2007).
7. Involvement of PA28 $\gamma$ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 1727-1735 (2007).
8. Oligomerization of Hepatitis C Virus Core Protein Is Crucial for Interaction with Cytoplasmic Domain of E1 Envelope Protein. Nakai K., Okamoto T., Kimura-Someya T., Ishii K., Lim C-K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T., Nunberg J.H., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 80, 11265-11273 (2006).
9. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. Okamoto T., Nishimura Y., Ichimura T., Suzuki K., Miyamura T., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *EMBO J.*, 25, 5015-5025 (2006).
10. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K. J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C.-S., Sousa C. R., Matsuura Y., Fujita T., and Akira S. *Nature*, 441, 101-105 (2006).

## ・平成 22 年度肝炎等克服緊急対策研究事業への新規研究課題の応募状況

「肝炎ウイルス感染における自然免疫応答の解析と新たな治療標的の探索に関する研究 (22201001)」に申請準備中。



## 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	大阪大学微生物病研究所
竹内 理	大阪大学微生物病研究所
考藤達哉	大阪大学大学院医学系研究所
藤田尚志	京都大学ウイルス研究所
土方 誠	京都大学ウイルス研究所
池田正徳	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
小原道法	東京都臨床医学総合研究所

## 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

### 問題点

HCVは宿主免疫系を発動を回避して慢性持続感染を成立させる

小型実験動物が存在しない

細胞培養系が存在しない

### 研究テーマ

細胞内RNAセンサーの解析 (竹内・藤田, 土方)  
HCVの免疫回避機構の解析 (考藤・池田・松浦)  
HCV感染の慢性化機構の解析 (松浦)

動物モデルの開発 (小原)

血清由来HCVの培養法の確立 (土方)

## C型肝炎の基礎研究と征圧における問題点

### ✓ 細胞培養系が存在しない

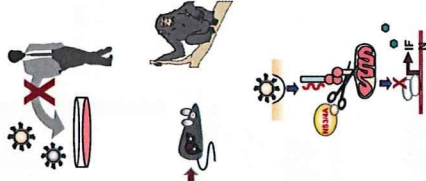
→ 培養細胞で増殖可能な実験室株が樹立されたが、未だ血清由来の野生型HCVを分離培養できない

### ✓ 感受性を示す小型動物が存在しない

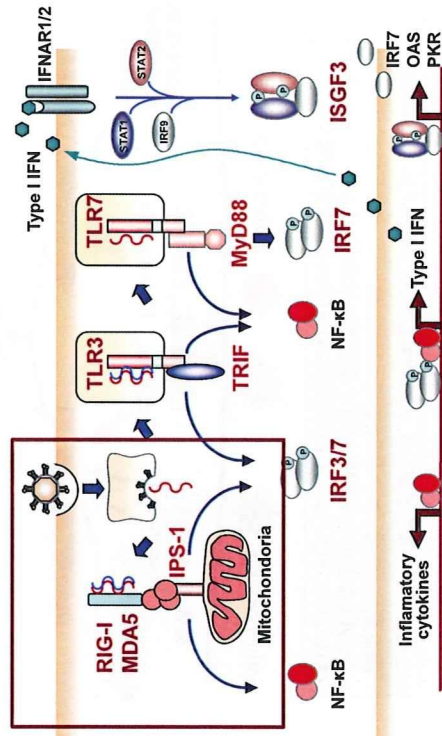
→ チンパンジー・・・倫理的な障害  
→ キメラマウス・・・免疫不全

### ✓ HCVは宿主の自然免疫を巧妙に回避する

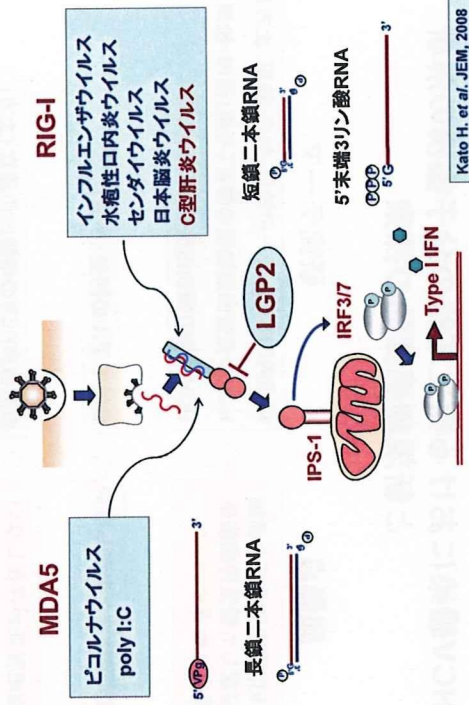
→ HCV蛋白質が自然免疫の誘導シグナルを遮断してIFNの誘導を抑制している



## ウイルスRNAによるIFNの誘導経路

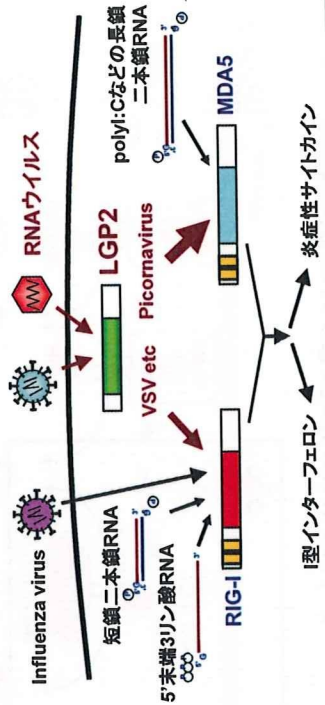


## RIG-IとMDA5が認識するウイルスRNA

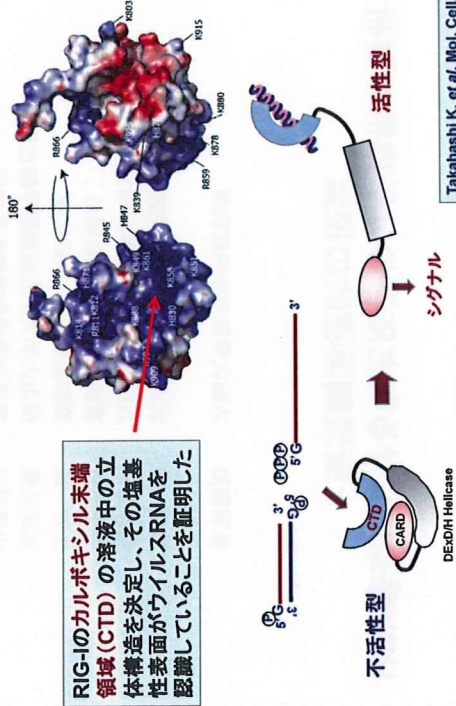


## LGP2によるウイルスRNAの認識

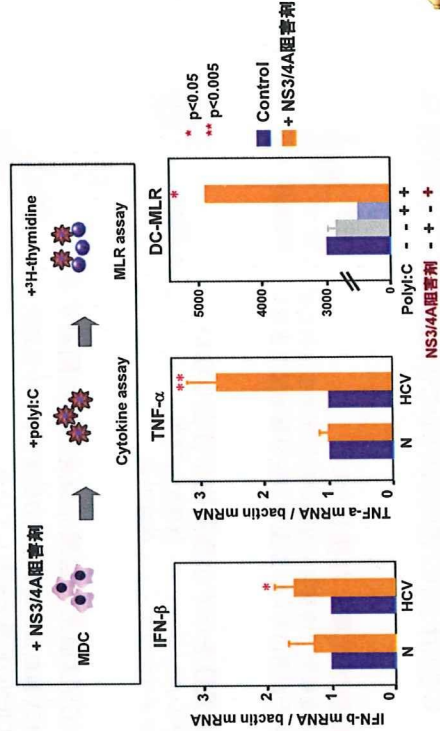
これまでの見解とは異なり、RIG-IやMDA5によるウイルスRNAの認識を**正に制御**していることを明らかにした  
 ✓ Poly I:Cなどの合成RNAに対する応答には関与しない  
 ✓ LGP2によるウイルスRNAの認識にはATPase領域が必須である



## RIG-Iの構造解析

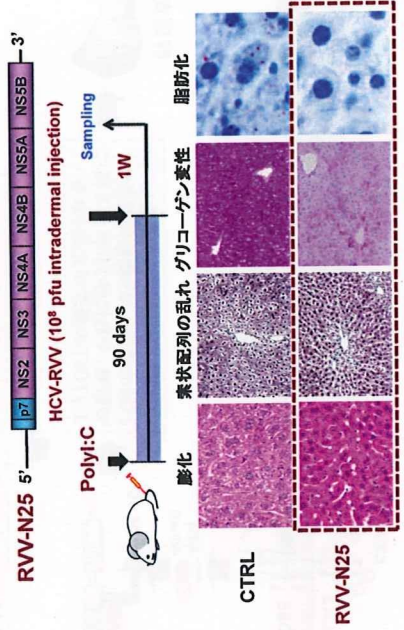


## NS3/4A阻害剤による樹状細胞機能の回復





## 組換えワクチニアウイルスで肝病態が改善する



Kohara M. et al. in preparation

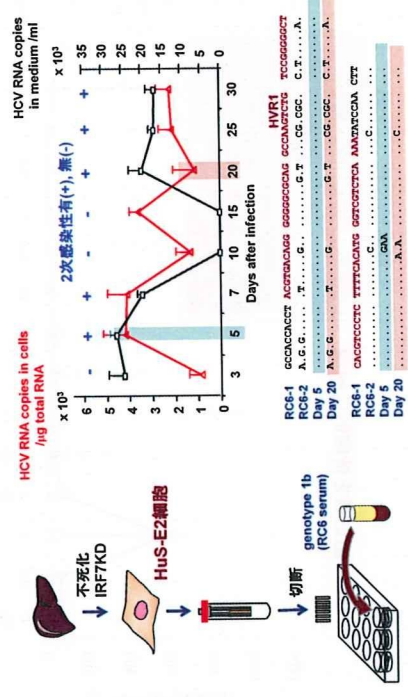
## まとめ

- ✓HCV蛋白質による自然免疫シグナル伝達経路の阻害機構を解明した
- ✓細胞内のRNAセンサーであるRIG-I/MDA5/LGP2による、ウイルスRNAの認識機構を解明した
- ✓樹状細胞の増加と機能回復がpIFN/RBV併用療法によるウイルス排除効果に相関することが示唆された
- ✓ヒアルロン酸によるCD44とTLR2を介したIP-10の発現亢進とC型肝炎慢性化との関連が示唆された
- ✓HCV蛋白質を誘導発現できる遺伝子改変マウスを作製した
- ✓患者血清由来HCVの増殖を許容できる細胞培養系を樹立した

## 今後の展開

- ✓自然免疫を賦活化させてHCVを排除できる治療法の開発
- ✓C型肝炎患者の肝硬変・肝細胞癌への進展阻止法の開発
- ✓血清由来HCVの効率の良い細胞培養系の開発

## HuS-E/2細胞の中空系培養による血清由来HCVの培養



Aly H.H. et al. BBRC, 2009