

2010300J6A

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
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

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松浦 善治

平成23(2011)年4月

目次

I. 総括研究報告書

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

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 12

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
考藤達哉 15

HCV による RIG-I の機能阻害機構の解析

竹内 理 18

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
藤田尚志 20

IL28B 領域の SNP が異なる肝細胞株 (HuH-7、Li23) における抗 HCV 剤の感受性

池田正徳 22

ヒト肝細胞における自然免疫機構の解析とこの活性化による抗 HCV 戦略の開発

土方 誠 26

polyIC リポソーム製剤による肝炎ウイルス排除機構の解析

小原道法 29

ウイルス肝炎感染における自然免疫の解析と新たな治療標的の探索に関する研究

瀬谷 司 32

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

34

IV. 研究成果の刊行物・別冊 (別添)

37

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

主任研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨： HCV ゲノム持続複製細胞では、ヒアルロン酸とその受容体である CD44 と TLR2 の相互作用により IP-10 の産生が亢進した。HCV 感染に伴う炎症によって肝細胞や DC に機能性 IDO が発現し、T 細胞分化や Treg の誘導を介して免疫制御に関与することが示唆された。RIG-I の ATPase 活性を欠失させたマウスの線維芽細胞や樹状細胞では、RNA ウイルス感染に対する IFN やサイトカインの産生は RIG-I 欠損マウスと同様に低下していたが、獲得免疫応答には RIG-I とその ATPase 活性は必要ないことが示唆された。IPS-1 がシグナルを受けて凝集体を形成する際に、ミトコンドリアの分裂と融合が必須であることが明らかとなった。Huh7 細胞と Li23 細胞は、それぞれ IFN に抵抗型と感受性の SNP を持っている。Li23 細胞で複製する HCV ゲノムは HuH7 で複製するものに比べて IFN-λ の感受性が約 100 倍高かった。ヒト初代培養細胞と不死化肝細胞では、HCV 感染初期に IFN-α 遺伝子が IRF7 依存的、RIG-I 非依存的に誘導されることが示された。カチオニックリポソームと polyI:C の複合体をキメラマウスに投与すると肝臓内に IFN-λ を強力に誘導できた。ポリオウイルスの感染モデルでは、感染防御に RIG-I/IPS-1 の経路以外に、TRL3 経路の重要性が示唆された。

分担研究者

考藤達哉 阪大大学院医学系研究科・准教授
竹内 理 阪大微研・准教授
藤田尚志 京大ウイルス研・教授
池田正徳 岡山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・プロジェクトリーダー
瀬谷 司 北大学院医学研究科・教授

A. 研究目的

我が国には既に2百万人以上もの HCV 感染者が存在すると推定され、原発性肝癌の約8割はC型肝炎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。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) CD44v に特異的な抗体 (CD44v3, V4/5, V5, V6, V7, V7/8, V10) を用いた FACS 解析より、HCV 複製細胞に優位に発現している CD44v の同定を試みた。CD44v6 に特異的なノックダウン細胞株を樹立し、ヒアルロン酸及びバクテリア成分刺激における IP-10 産生の影響を定量 PCR で検討した。また、CD44 発現の特異性を検討するため、日本脳炎ウイルスのサブゲノムレプリコン細胞で比較検討を行った。

(考藤) C 型慢性肝炎患者と非感染者を対象とした。IDO はトリプトファン (Trp) をキヌレニン (Kyn) に分解する酵素であり、IDO 活性は血清中、または細胞培養液中の Trp, Kyn を HPLC で定量して評価した。末梢血から単球由来 DC を誘導し、サイトカイン (TNF- α , IFN- γ など)、TLR リガンド (Poly I:C, LPS など) を添加し、IDO 活性を定量した。DC とナイーブ CD4+T 細胞の共培養を行い、CD4+T 細胞の表現型やサイトカイン産生能を評価した。また IDO 活性の特異性は、選択的 IDO 阻害剤 (1-MT) による変化で評価した。肝癌細胞 (Huh-7) に HCV replicon や JFH-1 を導入・感染させて IDO 活性を評価した。

(竹内) RIG-I の ATPase 活性を欠失する様に RIG-I のリジン 271 をアラニンに置換したノックインマウス (RIG-I K271A マウス) を作製した。このマウスより線維芽細胞や樹状細胞を取り出し RNA ウイルス感染や合成二本鎖 RNA に対する IFN 応答を検討した。また、このマウスを C57BL/6 にバッククロスし Sendai virus 感染に対する CTL 応答、CD8 陽性 T 細胞からの IFN 産生を検討した。

(藤田) 培養細胞を用いて種々のウイルス感染時に抗ウイルス自然免疫応答を制御している蛋白質群の細胞内局在を解析した。解析には当研究室で作

製した抗 RIG-I 抗体などを用いた。ウイルス RNA の検出も FISH 法によって行った。またウイルス抗原と RIG-I などの物理的な結合は免疫沈降法によって検出した。

(池田) IL28B 近傍の SNP である rs8099917 について、HuH-7 細胞、Li23 細胞から抽出したゲノムの塩基配列をダイレクトシーケンシング法により検討した。HuH-7 細胞、Li23 細胞で複製する全長 HCV RNA レポーターアッセイ系 (OR6, ORL8) を用いて、IFN- λ に対する感受性を比較検討した。

(土方) 不死化肝細胞に IRF3, IRF7, RIG-I の shRNA を発現するプラスミドあるいはレンチウイルスベクターをトランスフェクションあるいは感染させた細胞を作製し、これらにセンダイウイルスを感染させ、各種自然免疫関連遺伝子の発現に対する影響を検討した。

(小原) polyI:C 及び肝臓特異的な DDS であるカチオニックリポソーム (LIC101) の複合体 (polyI:C/LIC) を作製し、ヒト肝臓型キメラマウスに投与し、肝臓内における I 型、II 型、III 型インターフェロンの mRNA の誘導を経時的に評価した。

(瀬谷) MyD88^{-/-}, TICAM-1^{-/-}, IPS-1^{-/-}, IRF-3^{-/-}, IRF-7^{-/-}, IFNAR^{-/-} の各種 KO マウスを PVR⁺ マウスと交配して、それらから不死化細胞株を樹立し、ポリオの複製を許す細胞株を抽出する。

(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、Huh7 細胞や日本脳炎ウイルス由来のサブゲノムレプリコン細胞に比べ、CD44 の発現が mRNA 及び蛋白質レベルで優位に亢進している事が確認された。さらに、遺伝子型 1b のみならず、遺伝子型 2a のレプリコン細胞でも CD44 の発現が亢進していた。HCV (JFH1 ウイルス) 感染細胞では、レ

プリコン細胞で観察される程の CD44 の発現亢進は認められなかったが、siRNA による発現抑制により、ヒアルロン酸の刺激による IP-10 の産生は CD44 に依存していることが示された。

CD44v に特異的な抗体を用いた FACS 解析より、HCV サブゲノムレプリコン細胞では CD44v6 の発現が優位であることが示された。そこで、CD44v6 に特異的なノックダウン細胞株を樹立し、ヒアルロン酸やバクテリア成分の刺激による IP-10 の産生を検討したが、IP-10 の産生は、CD44v6 の特異的な発現抑制に影響されなかった。(松浦)

2. C 型慢性肝炎患者では、非感染者に比べて血清中の Kyn 濃度、Kyn/Trp 比は有意に高値であった。TNF- α +PGE₂、LPS+IFN- γ などの刺激によって、DC に IDO が誘導された。他の免疫細胞(T 細胞、B 細胞など)では IDO は誘導されなかった。DC における IDO の活性は、C 型慢性肝炎患者で高値であった。IDO が誘導された DC とな一部 CD4+T 細胞との培養によって、CD4+CD25+FOXP3+の Treg が誘導され、Treg 誘導能は C 型肝炎患者 DC でより強度であった。Huh-7 細胞に HCV replicon や JFH-1 を接種すると、IDO mRNA は発現したが、IDO 活性は検出できなかった。しかし JFH-1 接種に IFN- γ を加えると、機能性 IDO が誘導された。(考藤)
3. RIG-I の ATPase 欠損マウス由来の細胞は RIG-I 欠損マウス由来細胞と同様にピコルナウイルス以外の RNA ウイルス感染に対する IFN 産生が著明に低下していた。3リン酸合成二本鎖 RNA を細胞に導入すると、70 mer の二本鎖 RNA に対しては RIG-I 依存性であるが、RIG-I の ATPase 活性非依存性に I 型 IFN を産生した。また、In vivo での Sendai virus の経気道感染に対する局所の IFN 応答は著明に低下していたが、獲得免疫応答を検討すると、CD8 陽性 T 細胞の CTL 応答や IFN 産生は、野生型と RIG-I の ATPase 欠損マウスの間で差を認めず、RIG-I と、

その ATPase 活性は RNA ウイルス感染に対する獲得免疫応答には必須ではない事が明らかとなった。(竹内)

4. まず、RIG-I と直接結合することでシグナルを受け取る分子 IPS-1 の局在を解析した。IPS-1 はミトコンドリアに局在する分子であることが既に示されているが、種々のウイルス感染によってミトコンドリア上において凝集体を形成することを見いだした。この凝集体形成にはミトコンドリアの融合を制御する分子、Mitofusin1 が必須であることを発見した。また IPS-1 の凝集は抗ウイルスシグナルの伝達にも必須であった。次に特異抗体によって RIG-I の細胞内局在を検討したところ、これも各種ウイルスの感染によって顆粒状に凝集することが判明した。この凝集の誘導にはウイルスの RNA が必須であるとともに共局在していること、さらに凝集を阻害すると抗ウイルスシグナルが著しく元弱することが判明した。ウイルス感染した細胞内では RIG-I の凝集体は IPS-1 の凝集体と密接に接触していることが見いだされた。(藤田)
5. HuH-7 細胞、Li23 細胞より抽出したゲノムの rs8099917 を含む領域に対して PCR 法にて増幅を行いダイレクトシーケンス法にて SNP を決定した。rs8099917 の SNP は HuH-7 細胞では治療抵抗型の T/G であったのに対して、Li23 細胞では治療反応型の T/T であった。HCV の IFN- α に対する感受性 (EC₅₀) は OR6 細胞と ORL8 細胞で 0.94 IU/ml と 0.18 IU/ml であった。HCV に対する IFN- α の感受性は OR6 細胞に比べて ORL8 細胞のほうが約 5 倍高かった。HCV の IFN- λ 1 に対する感受性 (EC₅₀) は OR6 細胞と ORL8 細胞で 40 ng/ml 以上と 0.02 ng/ml であった。HCV に対する IFN- λ 1 の感受性は OR6 細胞に比べて ORL8 細胞のほうが約 200 倍高かった。今回用いた HCV-O 株 (GT 1b 型) 以外の 1B-4 株、KAH5 株 (いずれも GT 1b 型) でも HuH-7 細胞のほうが Li23 細胞に比べて IFN- λ 1 に対する感受性はいずれも約

100倍以上高かった。ORL8細胞のIFN- λ 1、 λ 2、 λ 3に対する感受性を比較した。抗HCV活性の強さはIFN- λ 1、 λ 3、 λ 2の順であった。OR6細胞とORL8細胞にIFN- α (200 IU/ml)とIFN- λ 1(10 ng/ml)を6時間処理してRNAを抽出後、マイクロアレイ解析(GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0; Affymetrix)を行った。両細胞で、薬剤処理を行っていない対照に比べてIFN- α 処理で2倍以上発現が増加したISGについて検討した。これらの遺伝子のうちIFN- λ 1処理によりOR6細胞では全く発現がかわらずに、ORL8細胞で発現が2倍以上増加した遺伝子にはIFI27、TRIM22、SLC15A、DDX60L、APOL6などがあつた。これらの結果は、OR6細胞とORL8細胞ではIFN- α に対するシグナル応答とはことなるORL8細胞特異的なIFN- λ 1に対するシグナル応答の存在を示唆している。(池田)

6. 不死化肝細胞にIRF7のドミナントネガティブ体を発現させてIRF7の機能を低下させた後、センドライウイルスを感染させ、各種自然免疫関連遺伝子の発現に対する影響を検討したところ、IFN α mRNAの増加が著しく抑制され、他のIFN関連mRNAの誘導は遅延することがわかつた。不死化肝細胞にRIG-IのshRNAを発現させてRIG-IのmRNAを低下させた後、センドライウイルスを感染させ、早期のIFN β 、IFN λ 3 mRNAの増加は抑制されたがIFN α mRNAの増加は変化しないことがわかつた。またこの時IRF7のmRNAにも大きな変化は認められなかつた。(土方)
7. polyI:C投与により、ヒト肝臓キメラマウス中のHCVの顕著な減少が認められた。これは30ug/kgのPEG-IFN α を週2回(通常使用量の20倍)投与したものよりも強いものであつた。polyI:Cは、I型インターフェロンを誘導するdsRNAとして知られている。しかしながら、I型インターフェロンの顕著な発現上昇は認められず、一方でIII型インターフェロンが著明に誘

導されていることを見出した。(小原)

8. ポリオウイルスのリセプターを発現するマウス(PVR+ TG C57BL/6 mice)はウイルス感受性が低い、TICAM-1の欠損によって感染死するようになった。IPS-1の欠損マウスはTICAM-1欠損マウスほどウイルス感受性が低くなく、むしろコントロールマウスに近い傾向が見られた。ポリオウイルスをPVR+/TICAM-1欠損マウスに接種すると、liver, spleenなどマクロファージ(M ϕ)系細胞が豊富な器官でウイルス価が上がり、IFN- β のmRNAが有為になつた。PVR+/TICAM-1欠損マウスの骨髄からの誘導したM ϕ でポリオウイルスの感染とIFN- β の誘導が観察された。TICAM-1の欠損により、ポリオウイルスによる致死率はIPS-1 $^{-/-}$ 、WTのPVR+マウスよりも高くなつた。(瀬谷)

D. 考察

慢性C型肝炎患者において発現が亢進しているCD44分子は、内在性のヒアルロン酸によるIP-10の産生や、アポトーシス抵抗性を介して、HCVの持続感染の維持に関与している可能性が示唆された。また、C型肝炎患者においては血清Kynが高値であり、これは炎症メディエーターによってDCに誘導されるIDO活性が関与すると考えられた。HCV感染によって肝細胞にもIDOは発現するが、活性を発揮するには炎症刺激が必要であつた。DCに発現するIDOは、T細胞の分化やTreg誘導に関与しており、肝障害の緩和やHCV持続感染などに関与する可能性が示唆された。

RIG-IのATPase活性はIFN応答に関しそのほとんどの生理機能に関し必須の役割を果たしていると考えられた。しかしながら、RIG-I、そのATPase活性はウイルス感染に対する局所のIFN応答には重要であるが、獲得免疫応答には必須では無く、RIG-IよりもTLRシステムの方が獲得免疫系活性化に重要であると考えられた。また、70merの3リン酸二本鎖RNAはRIG-I ATPase活性

非依存性に IFN を産生することから、RNA 構造と Helicase 活性の必要性に何らかの関連が有ると考えられる。細胞内の特定の場、(例えば HCV の場合は脂肪滴の周辺) で増殖するウイルスを検出してその周辺に RIG-I をはじめとする様々な RNA 結合蛋白質が凝集し、そこで RIG-I の活性化が起きることを強く示唆している。またこのように活性化された RIG-I を含む顆粒にミトコンドリアが引き寄せられて IPS-1 の凝集体が形成されると考えられる。IPS-1 はミトコンドリア上に係留されているため、ミトコンドリア間を移動して凝集体を形成するためにはミトコンドリアのダイナミックな分裂、融合が要求されるものと考えられる。

IFN 応答に関連する IL28B 近傍の SNP (rs8099917)解析の結果、HuH-7 細胞では T/G(治療抵抗型)であったのに対して、Li23 細胞では T/T (治療反応型)であった。HuH-7 細胞、Li23 細胞で HCV RNA が複製する OR6 細胞、ORL8 細胞における HCV の IFN- λ 1 に対する感受性は OR6 細胞に比べて ORL8 細胞の方が約 100 倍高かった。IL28B 近傍の SNP の違いが IFN- λ 1 に対する感受性と相関する結果が得られたが、詳細なメカニズムについてはさらなる検討が必要である。

肝細胞では IRF7 が恒常的に発現しており、センドライウイルスの感染によって感染後 2 時間ほどから IFN や RIG-I が誘導されることが示唆された。IFN α 1 遺伝子発現の誘導は IRF7 に依存しており、他の遺伝子の早期の発現にもこの転写因子が関係していることが考えられた。肝細胞におけるウイルス感染初期の IFN α 1 遺伝子発現誘導は RIG-I の誘導などを介して、ウイルスの感染検出の感度を増強する可能性が示唆するものと考えられた。

plyIC/LIC が効果的に IFN λ を誘導することを見出した。さらに同複合体が、PEG-IFN/ribabirin 治療に抵抗性である IL28B SNPs を有するヒト肝臓型キメラマウスにおいても強力な抗 HCV 効果を示すこと証明した。

HCV は shut-off 現象が起きず、持続感染を誘起する。従って、長い経過で肝実質細胞の HCV を含む細胞片 (debris) が遊離しうる。従って、debris の遊離の際に起きる宿主応答を ex vivo/in vivo の系でマウスを用いて解析することは必須となり、持続感染の起きる分子機構の解明に寄与するであろう。

E. 結論

1. HCV RNA 複製細胞における CD44 の発現亢進は、IP-10 の産生やアポトーシス抵抗性を介して、HCV の持続感染機構に関与している可能性が示唆された。
2. HCV 感染に伴う炎症によって肝細胞や DC に機能性 IDO が発現し、T 細胞分化や Treg の誘導を介して免疫制御に関与することが示唆された。
3. RIG-I の ATPase 活性は RIG-I による RNA ウイルス認識において必須の役割を果たしていることが明らかとなった。しかしながら、RIG-I を介した RNA ウイルス認識は獲得免疫応答には必須ではなかった。
4. ウイルス RNA と RIG-I などの宿主のセンサー分子は偶然出会うのではなく、能動的に凝集体が形成されることによって感知されると考えられる。IPS-1 がなぜミトコンドリア上に局在するのかは謎であったが、本研究によってシグナルを受けて凝集体を形成することにミトコンドリアの分裂と融合が必要であることが判明し、ミトコンドリア上に発現する意義が明確になった。また抗ウイルス応答はウイルス感染時にのみ起動するものではなく、一般的な RNA の代謝機構 (合成、翻訳、分解) がシフトしたものと理解することができる。これらのことは RIG-I などの分子のみならず、RNA 代謝に関連する分子の機能を亢進させることによって、抗ウイルス状態を強化出来る可能性を強く示唆している。
5. HCV RNA 複製が可能な HuH-7 細胞と Li23 細胞の IL28B 近傍の SNP (rs8099917)は HuH-7 細胞が T/G (治療抵抗型)で Li23 細胞が T/T(治療反応型)

であった。HuH-7 細胞由来の OR6 細胞に比べて Li23 細胞由来の ORL8 細胞では、HCV の IFN- λ に対する感受性が約 100 倍高かった。

6. このことから IRF7 を効率良く活性化し、また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. plyIC/LIC が、難治性の HCV 感染者に対して有望な抗 HCV 治療薬となりうることが示唆された。
8. ポリオウイルスは 2 重鎖(ds)RNA が IPS-1 経路を活性化して type I IFN を誘導する。PVR+マウスが感染死を起こしにくいウイルス価で PVR+/TICAM-1-マウスが感染死を起こした。細胞内 IPS-1 経路の抗ウイルス作用は良く知られるがエンドソームの TLR3/TICAM-1 経路の抗ウイルス作用はポリオウイルスで初めて検証された。

F.健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

1. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, and Matsuura Y. Involvement of PA28g in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology*, 52, 411-420, 2010.
2. Tani H, Shiokawa M, Kaname Y, Kambara H, Mori Y, Abe T, Moriishi K, and Matsuura Y. Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. *J Virol.*, 84, 2798-2807, 2010.
3. Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol.*, 84, 5824-5835, 2010.
4. Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, Uchiyama H, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, and Maehara Y. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peginterferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology*, 39,1577-1585, 2010.
5. Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihara H, Moriishi K, Matsuura Y, Yamaguchi K, and Mizuochi T. Peripheral B Cells May Serve as a Reservoir for Persistent Hepatitis C Virus Infection. *J. Innate Immun.*, 2, 607-617, 2010.
6. Tripathi LP, Kataoka C, Taguwa S, Moriishi K, Mori Y, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions. *Mol. Biosyst.*, 6, 2539-2553, 2010.
7. 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, Hohsui 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 alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses. *J. Viral Hepat.*, 17, 336-344, 2010.
8. Miyagi T, Takehara T, Uemura A, Nishio K, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Li W, Sasakawa A, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Absence of invariant natural killer T cells deteriorates liver inflammation and fibrosis in mice fed high-fat diet. *J. Gastroenterol.*, 45, 1247-1254, 2010.
9. Miyagi T, Takehara T, Nishio K, Shimizu S, Kohga K, Li W, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N. Altered interferon-alpha-signaling in natural killer cells from patients with chronic hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, 53, 424-430, 2010.
10. Miyake T, Satoh T, Kato H, Matsushita K, Kumagai Y, Vandenbon A, Tani T, Muta T, Akira S, Takeuchi O. I κ B ζ is essential for natural killer cell activation in

- response to IL-12 and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107, 17680-17685, 2010.
11. Satoh T*, Takeuchi O*, Vandenbon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, Miyake T, Matsushita K, Okazaki T, Saitoh T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Tsujimura T, Standley DM, Nakanishi K, Nakai K, Akira S. (*equal contribution). The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat. Immunol.*, 11, 936-944, 2010.
 12. Schulz O, Pichlmair A, Rehwinkel J, Rogers NC, Scheuner D, Kato H, Takeuchi O, Akira S, Kaufman RJ, Reis e Sousa C. Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity. *Cell Host Microbe*, 7, 354-361, 2010.
 13. Slater L, Bartlett, NW, Haas JJ, Zhu J, Message SD, Walton RP, Sykes A, Dahdaleh S, Clarke DL, Belvisi MG, Kon OM, Fujita T, Jeffery PK, Johnston SL, Edwards MR. Co-ordinated role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the innate response to rhinovirus in bronchial epithelium. *PLoS Pathogens*, 6, e1001178, 2010.
 14. Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, Yoneyama M and Fujita T. Virus-Infection or 5'ppp-RNA Activates Antiviral Signal through Redistribution of IPS-1 Mediated by MFN1. *PLoS Pathogens*, 6, e1001012, 2010.
 15. Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Kato N. Gene expression profile of Li23, a new human hepatoma cell line enables robust hepatitis C virus replication: Comparison with HuH-7 and other hepatic cell lines. *Hepatology Res.*, 40, 1248-1253, 2010.
 16. Tanaka T, Hasegawa Y, Saito M, Ikeda M, Kato N. Generation of single-chain Fvs against detergent-solubilized recombinant antigens with a simple coating procedure. *J. Biosci. Bioeng.*, 110, 374-376, 2010.
 17. Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J. Virol.*, 84, 9118-9127, 2010.
 18. Yutaka Amako, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Yuichi Hirata, Satoshi Sekiguchi, Yoshimi Tobita, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Hiromichi Yonekawa and Michinori Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J. Virol.*, 84, 303-311, 2010.
 19. Kenichi Satoh, Hiroki Takahashi, Chiho Matsuda, Takuya Umehara, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Mikio Zeniya and Michinori Kohara. Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. *J. Med. Virol.* 82, 1545-1553 (2010).
 20. Leiyun Weng, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Ying He, Jin Zhong, Tetsuya Toyoda. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype specific manner. *J. Virol.*, 84, 11761-11770, 2010.
 21. Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN-beta inducing potential. *Eur. J. Immunol.* 40, 940-948, 2010.
 22. Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Sugiura, K. Kodama, M. Matsumoto, and T. Seya. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Sci.* 101, 1596-1603, 2010.
2. 学会発表
 - 1 松浦善治: Host factors involved in the replication of hepatitis C virus: 第62回細胞生物学会大会、大阪、5月19日-21日, 2010.

- 2 松浦善治: 温故知新・C型肝炎ウイルス研究の源流: 第52回日本消化器病学会大会、横浜、10月13日-16日、2010.
- 3 木村公則、小原道法: C型慢性肝炎に対するHCV遺伝子組換えワクチニアウイルスによる新たな治療戦略 同上。
- 4 平田雄一、井上和明、小原道法: IFN λ を強力に誘導する核酸リポソーム製剤の同定とその抗HCV効果 同上。
- 5 寒原裕登、田鍬修平、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: C型肝炎ウイルスはオートファジーを誘導して持続感染を成立させる: 第58回日本ウイルス学会総会、徳島、11月7日-9日、2010.
- 6 谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスの細胞侵入におけるフォスホリパーゼCおよびプロテインキナーゼC依存的なシグナル伝達経路の関与、同上。
- 7 福原崇介、本村貴志、二宮彰紀、阿部隆之、武富紹信、前原喜彦、松浦善治: IL28B 遺伝子多型と肝移植後のインターフェロン感受性、同上。
- 8 塩川 舞、福原崇介、後藤志典、二宮彰紀、谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: 不死化ヒト肝細胞株(Hc細胞)への患者血清由来HCVの感染、同上。
- 9 森田英嗣、藤田尚信、牛島廣治、松浦善治、吉森保: 細胞内膜輸送系を介したRNA非エンベロープウイルスの細胞外への放出、同上。
- 10 森石恆司、松浦善治: HCVによる脂質代謝障害の分子機序、同上。
- 11 温 暁玉、阿部隆之、久木原博、田鍬修平、森 嘉生、谷 英樹、加藤宣之、鈴木哲朗、巽 正志、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルス感染細胞特異的なウイルス排除システムの構築、同上。
- 12 鈴木亮介、斎藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗: C型肝炎ウイルスのtrans-packaging型粒子を用いた感染機構の解析、同上。
- 13 阿部隆之、谷 英樹、森石恆司、松浦善治: 細胞内アネキシンはC型肝炎ウイルスの複製を制御する、同上。
- 14 加藤大志、森 嘉生、寒原裕登、要 祐喜、谷英樹、阿部隆之、神谷 亘、森石恆司、松浦善治: 核小体蛋白質B23はC型肝炎ウイルスの複製を抑制する、同上。
- 15 竹内 理: ウイルスと免疫の攻防RIG-Iファミリーによるウイルス感染認識メカニズム、同上。
- 16 池田 正徳、森 京子、武田 緑、中澤 貴秀、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之 異なるHCV株、細胞株を用いたHCV RNA複製培養細胞での薬剤評価、同上。
- 17 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之 リバビリンの抗HCV活性を決定する因子の解析、同上。
- 18 上田 優輝、森 京子、池田 正徳、有海 康雄、加藤 宣之 異なる細胞株を用いて開発したHCV-RNA複製系による抗HCV活性が報告されている薬剤等の再評価、同上。
- 19 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 がん抑制因子PMLはHCVライフサイクルに必須である、同上。
- 20 有海 康雄、黒木 美沙緒、土方 誠、Qi Yue、池田 正徳、脇田 隆字、下遠野 邦忠、加藤 宣之 癌抑制因子とHCVのクロストーク、同上。
- 21 田中寅彦、黒田和道、榎島誠、池田正徳、加藤宣之 C型肝炎ウイルスNS4Bとlipid dropletの相互作用、同上。
- 22 篠原義康、藤田浩司、米田正人、野崎雄一、金城健人、鈴木香峰理、馬渡弘典、桐越博之、船越健悟、池田正徳、加藤宣之、前田慎、中島淳、斉藤聡 HCV感染におけるリボ蛋白代謝の解析、同上。
- 23 藤本雄介、前田信哉、榎本信幸、池田正徳、加藤宣之、伊藤正彦、山下篤哉 抗HCVNS2タンパク活性阻害剤High throughput screeningのためのHCV subgenomic replicon細胞の構築、同上。

- 24 山下篤哉、古田篤史、松田泰嘉、谷英典、藤田統、秋光信佳、田中淳一、池田正徳、加藤宣之、前川信哉。榎本信幸、伊藤正彦、常田聡、関口勇地、野田尚宏 沖縄産ウミシダ (*Alloecomatella polycladia*)抽出物の抗 HCV NS3 helicase 阻害活性による HCV 増殖抑制効果、同上。
- 25 久島透嘉、脇田隆宇、土方誠：Core による S-S 結合型二量体は C 型肝炎ウイルスの粒子形成に必須である、同上。
- 26 阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、脇田隆宇、下遠野邦忠、土方誠：感染性 HCV 粒子産生に関わる新規細胞内シグナル経路の探索、同上。
- 27 土方誠、阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、齊月、脇田隆宇、下遠野邦忠：シンポジウム 06 ウイルス培養系を用いた C 型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明、臨床分離 HCV 株の培養と性状、同上。
- 28 松浦善治：C型肝炎ウイルス感染による肝細胞癌の発症に関与する宿主因子：第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 7 日-10 日、2010。
- 29 飯倉南、降幡知己、池田正徳、加藤宣之、千葉寛。C 型肝炎治療薬リバビリンの薬効発現における細胞内リバビリン取込み機構の重要性、同上。
- 30 篠原義康、藤田浩司、米田正人、野崎雄一、今城健人、鈴木香峰理、馬渡弘典、桐越博之、船越健悟、池田正徳、加藤宣之、前田慎、中島淳、斉藤聡 HCV 感染における ER ストレスを介した細胞死の検討、同上。
- 31 Hiroto Kambara, Shuhei Taguwa, Naonobu Fujita, Kohji Moriishi, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori, and Yoshiharu Matsuura: Autophagy is required for cell survival in cells replicating hepatitis C virus. The American Society for Virology, 29th Annual Meeting, Montana State University, Montana, July 17-21, 2010.
- 32 Matsuura Yoshiharu: Host factors involved in the propagation and pathogenesis of HCV, 17th International Meeting on HCV and Related Viruses. 横浜, 9 月 10 日-14 日, 2010.
- 33 Takashi Motomura, Akinobu Taketomi, Takasuke Fukuhara, Ken Shirabe, Yoshiharu Matsuura, and Yoshihiko Maehara: Association of IL28B genetic variation and hepatic ISGs expression in the outcome of IFN therapy for recurrent hepatitis C after liver transplantation. 同上。
- 34 Hiroto Kambara, Shuhei Taguwa, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Inhibition of autophagy induces lysosomal vacuolation in cells replicating HCV. 同上。
- 35 Shuhei Taguwa, Hiroto Kambara, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: HCV replication enhances secretion of an immature cathepsin B through induction of an incomplete autophagy. 同上。
- 36 Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Yoshio Mori, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, Chikako Kataoka, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma in the propagation of HCV. 同上。
- 37 Takasuke Fukuhara, Akinobu Taketomi, Takashi Motomura, Akinori Ninomiya, Takayuki Abe, Yoshihiko Maehara, Yoshiharu Matsuura: IL28B variation in recipients and donors correlates with response to peg-interferon/ribavirin for recurrent hepatitis C. 同上。
- 38 Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: A splice variant of CD44 participates in the IP-10 production in cells infected with HCV. 同上。
- 39 Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of

- phospholipase C and protein kinase C-dependent signaling pathways in the entry of HCV. 同上。
- 40 Osamu Takeuchi, Evening Seminar, Host Factors and Hepatitis C virus. 同上。
- 41 Kakita N, Kanto T, Matsubara M, Higashitani K, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Crucial roles of IL-10-producing Type 1 regulatory T cells (Tr1) in the pathogenesis of hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma. 同上。
- 42 Higashitani K, Kanto T, Kakita N, Matsubara M, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Indoleamine 2, 3-dioxygenase as an active inducer of regulatory T cells in chronic HCV infection. 同上。
- 43 Miyazaki M, Kanto T, Matsubara M, Kakita N, Higashitani K, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Type-I and type-III interferon induction from myeloid and plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis C patients; lack of association with single nucleotide polymorphism near IL28B gene. 同上。
- 44 Matsubara M, Kanto T, Kakita N, Higashitani K, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Pro-angiogenic receptor TIE2-expressing monocytes/ TEMs as novel diagnostic marker for HCV-infected hepatocellular carcinoma. 同上。
- 45 Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N Mechanism of anti-HCV of ribavirin in novel HCV replication cell system. 同上。
- 46 Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N The PML tumor suppressor protein is required for HCV life cycle. 同上。
- 47 Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. 同上。
- 48 Yue Qi, Hussein H. Aly, Chieko Tsutsui, Takashi Fujita, Makoto Hijikata: IRF7 dependent IFN-alpha response in the early phase of the viral infected hepatocytes. 同上。
- 49 Nakagawa S., Hirata Y., Tokunaga Y., Hirabatashi K., Yano J., Tateno C., Tanaka Y., Mizokami M., Inoue K., Yoshiba M., Kohara M. Interferon lambda plays a critical role on antiviral effect in human hepatocyte. 同上。
- 50 Sekiguchi S., Kimura K., Chiyo T., Tobita Y., Yasui F., Kohara M. Hepatitis C virus mediated pathogenesis is dependent on inflammatory cytokines with irrespective of HCV protein level. 同上。
- 51 Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. The Association of Pacific Rim University, Research symposium on Interface between Molecular Biology and Nano Biology, Kyoto, Japan, Nov. 24-26 2010
- 52 Yuichi Abe, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: Chemical biological analysis for a mechanism of infectious HCV particle production. 同上。
- 53 Higashitani K, Kanto T, Miyazaki M, Matsubara T, Kakita N, Itose I, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Active role of tryptophan catalyzing enzyme, indoleamine 2, 3-dioxygenase, in the generation of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients. The Liver Meeting AASLD 61st Annual Meeting and Postgraduate Course Boston, MA, USA 10.29-11.2, 2010
- 54 Kakita N, Kanto T, Matsubara M, Higashitani K, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Distinctive roles of IL-10-producing Type 1 regulatory T cells (Tr1) in the pathogenesis of hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma. 同上。
- 55 Matsubara M, Kanto T, Higashitani K, Kakita N,

Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N,
Takehara T, Kasahara A, Hayashi N.

Pro-angiogenic receptor TIE2 expressing
monocytes/TEMs as novel diagnostic biomarker
for hepatocellular carcinoma. T 同上。

56 Hirata Y., Nakagawa S., Tokunaga Y., Tanaka Y.,
Mizokami M., Inoue K., Kohara M. : Interferon
lambda plays a critical role on antiviral response by
hepatotropic inducer of innate immunity in human
hepatocyte. 同上。

57 Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y.,
Taguchi R., Kohara M.: Hepatitis C virus altered
the sphingolipids metabolism for better
environment its replication. Keystone Symposia
2010.6.6-11 Kyoto

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：プロスタグランジン12のアゴニストを含む、C型肝炎ウイルスの感染抑制剤

発明者：土方 誠、阿部雄一、脇田隆宇

出願日：2010年9月30日

出願番号：特願2010-222045

発明の名称：難治性ウイルス感染症の治療剤

発明者：小原道法、中川慎一郎

出願人：東京都医学研究機構

出願日：平成22年9月9日

出願番号：特願2010-202355

2. 実用新案登録 特になし。

3. その他 特になし。

HCV 感染による肝炎慢性化機序の解明

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：慢性 C 型肝炎患者における慢性的な肝炎の誘発には、IP-10 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、ヒアルロン酸刺激により、IP-10 の発現が特異的に亢進した。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 分子と TLR2 の相互作用が重要であった。CD44 には多様なアイソフォーム(CD44v)が存在するが、HCV 複製細胞では CD44v6 が優位に発現していた。ヒアルロン酸を介した IP-10 産生は、CD44v6 の発現抑制では影響されなかったが、抗アポトーシス作用を介した HCV の持続感機構に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の感染による慢性肝炎の誘発には、CXCR3 リガンドファミリーに属する IP-10、MIG 及び I-TAC 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 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、HCV 複製細胞に発現している CD44 スプライスバリエント (CD44v)を同定し、IP-10 の産生及び慢性持続感染に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

CD44v に特異的な抗体(CD44v3、V4/5、V5、V6、V7、V7/8、V10)を用いた FACS 解析より、HCV 複製細胞に優位に発現している CD44v の同定を試みた。CD44v6 に特異的なノックダウン細胞株を樹立し、ヒアルロン酸及びバクテリア成分刺激における

IP-10 産生の影響を定量 PCR で検討した。また、CD44 発現の特異性を検討するため、日本脳炎ウイルスのサブゲノムレプリコン細胞で比較検討を行った。

(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、Huh7 細胞や日本脳炎ウイルス由来のサブゲノムレプリコン細胞に比べ、CD44 の発現が mRNA 及び蛋白質レベルで優位に亢進している事が確認された。さらに、遺伝子型 1b のみならず、遺伝子型 2a のレプリコン細胞でも CD44 の発現が亢進していた。HCV(JFH1 ウイルス)感染細胞では、レプリコン細胞で観察される程の CD44 の発現亢進は認められなかったが、siRNA による発現抑制により、ヒアルロン酸の刺激による IP-10 の産生は CD44 に依存していることが

示された。CD44v に特異的な抗体を用いた FACS 解析より、HCV サブゲノムレプリコン細胞では CD44v6 の発現が優位であることが示された。そこで、CD44v6 に特異的なノックダウン細胞株を樹立し、ヒアルロン酸やバクテリア成分の刺激による IP-10 の産生を検討したが、IP-10 の産生は、CD44v6 の特異的な発現抑制に影響されなかった。

D. 考察

CD44 には多様なスプライズバリエントが組織特異的に発現しており、その発現様式及び機能は多種多様である。HCV のサブゲノムレプリコン細胞では、Huh7 細胞に比べて CD44v6 の発現が優位であったが、ヒアルロン酸の刺激による IP-10 の産生には関与が認められなかった。

CD44v6 はリンパ球系細胞における細胞死制御(アポトーシス抵抗性)に関与する事が報告されており、B 細胞感染指向性 HCV(SB 株)では CD44v6 の発現が低下しており、アポトーシス感受性の一因である事が報告されている。肝実質細胞における HCV 感染に伴う細胞死制御には相反する報告があるが、HCV レプリコン細胞における CD44v6 の発現亢進は、アポトーシス抵抗性を介した慢性持続感染に寄与している可能性が考えられる。

以上の成績より、慢性 C 型肝炎患者において発現が亢進している CD44 分子は、内在性のヒアルロン酸による IP-10 の産生や、アポトーシス抵抗性を介して、HCV の持続感染の維持に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

HCV RNA 複製細胞における CD44 の発現亢進は、IP-10 の産生やアポトーシス抵抗性を介して、HCV の持続感染機構に関与し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

- Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, and Matsuura Y. Involvement of PA28g in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology* 2010; 52, 411-420.
- Tani H, Shiokawa M, Kaname Y, Kambara H, Mori Y, Abe T, Moriishi K, and Matsuura Y. Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. *J Virol* 2010; 84, 2798-2807.
- Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol* 2010; 84, 5824-5835.
- Kaname Y, Tani H, Kataoka C, Shiokawa M, Taguwa S, Abe T, Moriishi K, Kinoshita T, and Matsuura Y. Acquisition of complement resistance through incorporation of CD55/DAF into viral particles bearing baculovirus GP64. *J Virol* 2010; 84, 3210-3219.
- Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, Uchiyama H, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, and Maehara Y. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peginterferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology* 2010; 39,1577-1585.
- Koike K, Moriya K, and Matsuura Y. Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatology Res* 2010; 40, 69-82.
- Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihara H, Moriishi K, Matsuura Y, Yamaguchi K, and Mizuochi T. Peripheral B Cells May Serve as a Reservoir for Persistent Hepatitis C Virus Infection. *J Innate Immun* 2010; 2, 607-617.
- Tripathi LP, Kataoka C, Taguwa S, Moriishi K, Mori Y, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions. *Mol Biosyst* 2010; 6, 2539-2553.

2. 学会発表

- 松浦善治: Host factors involved in the replication

- of hepatitis C virus: 第 62 回細胞生物学会大会、大阪、5 月 19 日-21 日、2010.
- 2 松浦善治: 温故知新・C型肝炎ウイルス研究の源流: 第 52 回日本消化器病学会大会、横浜、10 月 13 日-16 日、2010.
 - 3 寒原裕登、田鍬修平、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: C型肝炎ウイルスはオートファジーを誘導して持続感染を成立させる: 第 58 回日本ウイルス学会総会、徳島、11 月 7 日-9 日、2010.
 - 4 谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスの細胞侵入におけるフォスフォリパーゼ C およびプロテインキナーゼ C 依存的なシグナル伝達経路の関与、同上。
 - 5 福原崇介、本村貴志、二宮彰紀、阿部隆之、武富紹信、前原喜彦、松浦善治: IL28B 遺伝子多型と肝移植後のインターフェロン感受性、同上。
 - 6 塩川 舞、福原崇介、後藤志典、二宮彰紀、谷英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: 不死化ヒト肝細胞株(Hc 細胞)への患者血清由来 HCV の感染、同上。
 - 7 森田英嗣、藤田尚信、牛島廣治、松浦善治、吉森保: 細胞内膜輸送系を介した RNA 非エンベロープウイルスの細胞外への放出、同上。
 - 8 森石恆司、松浦善治: HCV による脂質代謝障害の分子機序、同上。
 - 9 温 暁玉、阿部隆之、久木原博、田鍬修平、森嘉生、谷 英樹、加藤宣之、鈴木哲朗、巽 正志、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルス感染細胞特異的なウイルス排除システムの構築、同上。
 - 10 鈴木亮介、斎藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗: C型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析、同上。
 - 11 阿部隆之、谷 英樹、森石恆司、松浦善治: 細胞内アネキシンは C型肝炎ウイルスの複製を制御する、同上。
 - 12 加藤大志、森 嘉生、寒原裕登、要 祐喜、谷 英樹、阿部隆之、神谷 亘、森石恆司、松浦善治: 核小体蛋白質 B23 は C型肝炎ウイルスの複製を抑制する、同上。
 - 13 松浦善治: C型肝炎ウイルス感染による肝細胞癌の発症に關与する宿主因子: 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 7 日-10 日、2010.
 - 14 Hiroto Kambara, Shuhei Taguwa, Naonobu Fujita, Kohji Moriishi, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori, and Yoshiharu Matsuura: Autophagy is required for cell survival in cells replicating hepatitis C virus. The American Society for Virology, 29th Annual Meeting, Montana State University, Montana, July 17-21, 2010.
 - 15 Matsuura Yoshiharu: Host factors involved in the propagation and pathogenesis of HCV, 17thth International Meeting on HCV and Related Viruses. 横浜, 9 月 10 日-14 日, 2010.
 - 16 Takashi Motomura, Akinobu Taketomi, Takasuke Fukuhara, Ken Shirabe, Yoshiharu Matsuura, and Yoshihiko Maehara: Association of IL28B genetic variation and hepatic ISGs expression in the outcome of IFN therapy for recurrent hepatitis C after liver transplantation. 同上。
 - 17 Hiroto Kambara, Shuhei Taguwa, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Inhibition of autophagy induces lysosomal vacuolation in cells replicating HCV. 同上。
 - 18 Shuhei Taguwa, Hiroto Kambara, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: HCV replication enhances secretion of an immature cathepsin B through induction of an incomplete autophagy. 同上。
 - 19 Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Yoshio Mori, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, Chikako Kataoka, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma in the propagation of HCV. 同上。
 - 20 Takasuke Fukuhara, Akinobu Taketomi, Takashi Motomura, Akinori Ninomiya, Takayuki Abe, Yoshihiko Maehara, Yoshiharu Matsuura: IL28B variation in recipients and donors correlates with response to peg-interferon/ribavirin for recurrent

hepatitis C. 同上。

- 21 Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: A splice variant of CD44 participates in the IP-10 production in cells infected with HCV. 同上。
- 22 Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of phospholipase

C and protein kinase C-dependent signaling pathways in the entry of HCV. 同上。

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

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

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

研究要旨：HCVは種々の免疫細胞の機能異常を来し、持続感染を成立させる。免疫系の異常は、IFN治療に対する抵抗性や、発癌、癌細胞の増殖にも寄与している。HCVによる免疫系攪乱の機序と責任分子が明らかになれば、それを標的とした免疫制御方法を確立することが可能となる。HCV非感染細胞にも機能低下を来す機序として、伝播性免疫寛容（Infectious tolerance）が想定される。本研究では、そのメディエーターとして、トリプトファン分解酵素 Indoleamine-2,3-dehydrogenase (IDO)、制御性T細胞（Treg）などを想定し、HCVに対する治療標的としての有用性を明らかにすることを目的とした。C型慢性肝炎患者のIDO活性は非感染者より有意に高値であった。炎症性サイトカイン（TNF- α 、IFN- γ 、PGE2など）刺激によって、PBMCの中では樹状細胞（DC）に選択的にIDOが高発現となった。またHCV感染者DCでは非感染者に比べて、炎症刺激によるIDO発現が高値であった。DCに発現するIDOは、CD4+T細胞のサイトカイン産生能やTregの分化誘導に関与した。肝癌細胞におけるIDO発現機序を解明するために、HCV repliconやJFH-1発現肝癌細胞におけるIDO発現を検討した。HCV感染・複製によってIDO発現は増強するものの、炎症刺激（IFN- γ など）が加わることで、IDO発現は著明に増強することが明らかになった。以上の結果より、HCV感染に伴う炎症によって肝細胞やDCに機能性IDOが発現し、T細胞分化やTregの誘導を介して免疫制御に関与することが示唆された。

A.研究目的

HCVは種々の免疫細胞の機能異常を来し、持続感染を成立させる。免疫系の異常は、IFN治療に対する抵抗性や、発癌、癌細胞の増殖にも寄与している。HCVによる免疫系攪乱の機序と責任分子が明らかになれば、それを標的とした免疫制御方法を確立することが可能となる。HCV非感染細胞にも機能低下を来す機序として、伝播性免疫寛容（Infectious tolerance）が想定される。本研究では、そのメディエーターとして、トリプトファン分解酵素 Indoleamine-2,3-dehydrogenase (IDO)、制御性T細胞（Treg）などを想定し、HCV感染者における発現細胞と誘導機序を明らかにし、HCVに対する治療標的としての有用性を検証することを目的とした。

B.研究方法

C型慢性肝炎患者と非感染者を対象とした。IDOはトリプトファン（Trp）をキヌレニン（Kyn）に分解する酵素であり、IDO活性は血清中、または細胞

培養液中のTrp、KynをHPLCで定量して評価した。末梢血から単球由来DCを誘導し、サイトカイン（TNF- α 、IFN- γ など）、TLRリガンド（Poly I:C、LPSなど）を添加し、IDO活性を定量した。DCとナイーブCD4+T細胞の共培養を行い、CD4+T細胞の表現型やサイトカイン産生能を評価した。またIDO活性の特異性は、選択的IDO阻害剤（1-MT）による変化で評価した。肝癌細胞（Huh-7）にHCV repliconやJFH-1を導入・感染させてIDO活性を評価した。（倫理面への配慮）

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

C.研究結果

C型慢性肝炎患者では、非感染者に比べて血清中のKyn濃度、Kyn/Trp比は有意に高値であった。TNF- α +PGE2、LPS+IFN- γ などの刺激によって、DCにIDO

が誘導された。他の免疫細胞 (T 細胞、B 細胞など) ではIDO は誘導されなかった。DC におけるIDO の活性は、C 型慢性肝炎患者で高値であった。IDO が誘導されたDC と一部CD4+T 細胞との培養によって、CD4+CD25+FOXP3+のTreg が誘導され、Treg 誘導能はC 型肝炎患者DC でより強度であった。Huh-7 細胞にHCV replicon やJFH-1 を接種すると、IDOmRNA は発現したが、IDO 活性は検出できなかった。しかしJFH-1 接種にIFN- γ を加えると、機能性IDO が誘導された。

D. 考察

C 型肝炎患者においては血清 Kyn が高値であり、これは炎症メディエーターによってDC に誘導されるIDO 活性が関与すると考えられた。HCV 感染によって肝細胞にもIDO は発現するが、活性を発揮するには炎症刺激が必要であった。DC に発現するIDO は、T 細胞の分化やTreg 誘導に関与しており、肝障害の緩和やHCV 持続感染などに関与する可能性が示唆された。

E. 結論

HCV 感染に伴う炎症によって肝細胞やDC に機能性IDO が発現し、T 細胞分化やTreg の誘導を介して免疫制御に関与することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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, Hohsui 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 alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no

impact on rapid and sustained virological responses. J Viral Hepat 2010; 17: 336-44.

- Miyagi T, Takehara T, Uemura A, Nishio K, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Li W, Sasakawa A, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Absence of invariant natural killer T cells deteriorates liver inflammation and fibrosis in mice fed high-fat diet. J Gastroenterol 2010; 45: 1247-1254.
- Miyagi T, Takehara T, Nishio K, Shimizu S, Kohga K, Li W, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N. Altered interferon-alpha-signaling in natural killer cells from patients with chronic hepatitis C virus infection. J Hepatol 2010; 53: 424-30.

2. 学会発表

- Higashitani K, Kanto T, Miyazaki M, Matsubara T, Kakita N, Itose I, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Active role of tryptophan catalyzing enzyme, indoleamine 2, 3-dioxygenase, in the generation of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients. The Liver Meeting AASLD 61st Annual Meeting and Postgraduate Course Boston, MA, USA 10.29-11.2, 2010
- Kakita N, Kanto T, Matsubara M, Higashitani K, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Distinctive roles of IL-10-producing Type 1 regulatory T cells (Tr1) in the pathogenesis of hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma. The Liver Meeting AASLD 61st Annual Meeting and Postgraduate Course Boston, MA, USA 10.29-11.2, 2010
- Matsubara M, Kanto T, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Pro-angiogenic receptor TIE2 expressing monocytes/TEMs as novel diagnostic biomarker for hepatocellular carcinoma. The Liver Meeting AASLD 61st Annual Meeting and Postgraduate Course Boston, MA, USA 10.29-11.2, 2010

4. Kakita N, Kanto T, Matsubara M, Higashitani K, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Crucial roles of IL-10-producing Type 1 regulatory T cells (Tr1) in the pathogenesis of hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma. 17th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, September 10-14, 2010
5. Higashitani K, Kanto T, Kakita N, Matsubara M, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Indoleamine 2, 3-dioxygenase as an active inducer of regulatory T cells in chronic HCV infection. 17th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, September 10-14, 2010
6. Miyazaki M, Kanto T, Matsubara M, Kakita N, Higashitani K, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Type-I and type-III interferon induction from myeloid and plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis C patients; lack of association with single nucleotide polymorphism near IL28B gene. 17th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, September 10-14, 2010
7. Matsubara M, Kanto T, Kakita N, Higashitani K, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Pro-angiogenic receptor TIE2-expressing monocytes/TEMs as novel diagnostic marker for HCV-infected hepatocellular carcinoma. 17th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, September 10-14, 2010

H.知的財産権の出願・登録状況

特に予定なし