

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 による RIG-I の機能阻害機構の解析

分担研究者 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。これまで、RIG-I の ATPase 活性の役割、また、RIG-I ファミリーに属する LGP2 の役割に関し解析を行ってきた。本年は ATPase 活性を欠失するマウスに関し解析を加えた。RIG-I ATPase 活性変異マウスは RIG-I 欠損マウスと異なり正常に生まれるが、このマウス由来線維芽細胞、樹状細胞の RNA ウイルス感染に対する IFN、サイトカイン産生は RIG-I ノックアウトマウス由来細胞と同様に低下していた。しかしながら、ウイルス感染に対する獲得免疫応答には RIG-I とその ATPase 活性は必須ではないと考えられた。

A. 研究目的

RIG-I-like receptor (RLR)はRNAヘリカーゼ領域、及びC末端のRNA結合領域を持ち、RIG-I、MDA5、LGP2の3種より構成される。中でもRIG-IがHCVの認識に関わることが報告されている。しかしながら、RIG-Iのヘリカーゼ領域の役割に関してはこれまで十分明らかとなっていない。我々は、RNAウイルス感染応答における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

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-g産生を検討した。

C. 研究結果

RIG-I K271A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70mer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-g産生は共に野生型とRIG-I K271Aマウスで著変を認めず、RIG-I、及びそのATPase活性はRNA初する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。

D. 考察

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、70mer3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。今後このメカニズムに関し更に解析を加えたい。

E. 結論

本研究により、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。RIG-IのATPase活性非依存的二本鎖RNA認識機構の存在も明らかとなり今後このメカニズムを解析していく予定である。

F.健康危険情報

無し。

G.研究発表

1. 論文発表

1. Miyake T, Satoh T, Kato H, Matsushita K, Kumagai Y, Vandebon A, Tani T, Muta T, Akira S, Takeuchi O. IκBζ is essential for natural killer cell activation in response to IL-12 and IL-18. Proc Natl Acad Sci U S A.2010, 107, 17680-17685.
 2. Satoh T*, Takeuchi O*, Vandebon 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.2010, 11, 936-944.
 3. Ren D, Tu HC, Kim H, Wang GX, Bean GR, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program.Science. 2010, 330, 1390-1393.
 4. Arimoto K, Funami K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense. Proc Natl Acad Sci U S A.2010, 107, 15856-15861.
 5. 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.2010, 7, 354-361.
 6. Berger M, Krebs P, Crozat K, Li X, Croker BA, Siggs OM, Popkin D, Du X, Lawson BR, Theofilopoulos AN, Xia Y, Khovananth K, Y Moresco EM, Satoh T, Takeuchi O, Akira S, Beutler B. An Slfn2 mutation causes lymphoid and myeloid immunodeficiency due to loss of immune cell quiescence. Nat Immunol.2010, 11, 335-343.
 7. Kirsch DG, Santiago PM, di Tomaso E, Sullivan JM, Hou WS, Dayton T, Jeffords LB, Sodha P, Mercer KL, Cohen R, Takeuchi O, Korsmeyer SJ, Bronson RT, Kim CF, Haigis KM, Jain RK, Jacks T. p53 controls radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice independent of apoptosis.Science. 2010, 327, 593-596.
 8. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation.Cell.2010,140, 805-820.
- ##### 2. 学会発表
1. 第58回日本ウイルス学会シンポジウム、ウイルスと免疫の攻防 11月9日、徳島、RIG-Iファミリーによるウイルス感染認識メカニズム
 2. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Evening Seminar, 9/12/2010, Yokohama, Japan, Host Factors and Hepatitis C virus.
 3. Gordon Conference, Post-Transcriptional Gene Regulation, July 18-23, 2010 Poster presentation

H.知的財産権の出願・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

自然免疫センサーRIG-Iによる HCV 増殖阻害の解明と抗 HCV 製剤の開発

分担研究者 藤田 尚志 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨：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、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。このことはRIG-Iが単独でウイルス
RNAを認識する、と云う従来の概念を書き換えるものと考えられる。

A. 研究目的

RNA ヘリカーゼRIG-I はHCV を含む多くのウイル
スRNA の感知に必須な役割を果たしていることが
示されているが、細胞内のどこでウイルスの増殖、
そのRNA の感知が行われているのか不明であった。
本研究ではこのウイルス認識の「場」を突き止め、
それを抗HCV 応答の促進に結びつけることを目指
した。

B. 研究方法

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。倫理面へ
の配慮) 培養細胞を用いた研究であるため倫理面で
の問題はない。

C. 研究結果

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。

D. 考察

以上の結果は細胞内の特定の場、(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。

E. 結論

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、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も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。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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*. 2010, 6, e1001178.
2. Takahasi K., Horiuchi, M., Fujii, K., Nakamura, S., Nobuo N Noda, N.N., Yoneyama, M., Fujita, T. and Inagaki, F. Ser386 phosphorylation of transcription

factor IRF-3 induces dimerization and association with CBP/p300 without overall conformational change. *Gene to Cells*, 2010, 15, 901-910.

3. Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, Yoneyama M and Fujita T. Virus-Infection or 5ppp-RNA Activates Antiviral Signal through Redistribution of IPS-1 Mediated by MFN1. *PLoS Pathogens*. 2010, 6, e1001012.
4. Ranjan P, Jayashankar L, Deyde V, Zeng H, Davis WG, Pearce MB, Bowzard JB, Hoelscher MA, Jeisy-Scott V, Wiens ME, Gangappa S, Gubareva L, Garcia-Sastre A, Katz JM, Tumpey TM, Fujita T, Sambhara S. 5'PPP-RNA induced RIG-I activation inhibits drug-resistant avian H5N1 as well as 1918 and 2009 pandemic influenza virus replication. *Virology Journal*, 2010, 7, 102-112.
5. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107, 1512-1517.
6. Onomoto K, Onoguchi K, Takahasi K, Fujita T. Type I interferon production induced by RIG-I-like receptors. *J. Interferon Cytokine Res*. 2010, 30, 875-881.

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

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

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
分担研究者 池田正徳 岡山大学 准教授

研究要旨: HCV RNA 複製が可能なヒト肝細胞株の HuH-7 と Li23 の IL28B SNP (rs8099917)を検討した。HuH-7 は治療抵抗型の SNP (T/G)であり、Li23 は治療感受性型の SNP (T/T)であった。Li23 で複製する HCV RNA は HuH-7 で複製するものに比べて IFN-λ の感受性が約 100 倍高いことがわかった。

A. 研究目的

昨年、IL28B 領域の SNP が C 型慢性肝炎患者の IFN/RBV 治療の予測因子であることが報告されたが、SNP の違いにより治療効果に違いができる機序については明らかとなっていない。IL28B 領域の SNP の違いによりインターフェロン(IFN)応答が異なる機序を研究するための培養細胞モデルを開発することを本分担研究の目的とする。

B. 研究方法

最近、Tanaka ら (Nat Genet. 2009) は PEG-IFN-α/リバビリン(RBV)併用療法の治療効果を規定する宿主側の因子として IL28B 近傍の SNPs について報告した。しかしながら、IL28B 近傍の SNPs がどのように PEG-IFN-α/RBV の治療成果を規定するかについては明らかになっていない。

HCV RNA が効率良く複製できる培養細胞は IFN の感受性、シグナル伝達を研究する有用なツールである。ヒト肝癌細胞由来の HuH-7 細胞は現在まで唯一の HCV RNA 複製が可能な細胞株である。最近、我々は、HuH-7 細胞とは異なる肝細胞癌由来の Li23 細胞で HCV RNA を効率良く複製できるアッセイ系を開発した。

Tanaka らが最も PEG-IFN-α/RBV の治療に対する予測効果が高いと報告した 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ス法により検討した。

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。

OR6 細胞と ORL8 細胞に IFN-α あるいは IFN-λ1 を 6 時間処理した後に、RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行った。

C. 研究成果

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-λ1 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-λ1 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-λ1 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-λ1、λ2、λ3 に対する感受性を比較した。抗 HCV 活性の強さは IFN-λ1、λ3、λ2 の順であった。

OR6 細胞と ORL8 細胞に IFN-α(200 IU/ml)と IFN-λ1

(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。

(倫理面への配慮)

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

D. 考察

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)であつたのに対して、Li23 細胞では T/T(治療反応型)であつた。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 倍高かつた。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。

しかしながら、IFN- λ に対する感受性が異なる OR6 細胞と ORL8 細胞を用いることで今後 IFN- α とは異なる IFN- λ の HCV 増殖抑制に関わるメカニズム解明の手がかりが得られることが期待できる。その一例として、IFN- α 処理により OR6 細胞、ORL8 細胞のいずれでも発現が増強する ISG のうち、IFN- λ 1 処理で、OR6 細胞では全く応答せず、ORL8 細胞でのみ発現が増強する遺伝子群がマイクロアレイ解析により見出された。

本研究により、OR6 細胞と ORL8 細胞のセットは

IFN- λ による抗 HCV 活性のメカニズム解明のための有力なツールとなり得るものと思われる。

E. 結論

- 1) 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)であつた。
- 2) 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 倍高かつた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. Ikeda F, Dansako H, Nishimura G, Mori K, Kawai Y, Ariumi Y, Miyake Y, Takaki A, Nouse K, Iwasaki Y, Ikeda M, Kato N, Yamamoto K. Amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein are not associated with intracellular antiviral response to interferon- α in vitro. *Liver Int.* 9, 1324-1331, 2010.
3. 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.
4. Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito H, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Dereglulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Path. Int.* 60, 351-357, 2010.
5. Nozaki A, Morimoto M, Kondo M, Oshima T, Numata K, Fujisawa, Kaneko T, Miyajima E, Morita S, Mori K,

- Ikeda M, Kato N, Tanaka K. Hydroxyurea as an inhibitor of hepatitis C virus RNA replication. Arch Virol., 155, 601-605, 2010.
6. 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., 16, 184-192, 2010.
2. 学会発表
1. Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N Mechanism of anti-HCV of ribavirin in novel HCV replication cell system 69th annual meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, 2010. Sep.
 2. Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N The PML tumor suppressor protein is required for HCV life cycle 69th annual meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, 2010. Sep.
 3. 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 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年10月
 4. 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 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年10月
 5. 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 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年10月
 6. 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 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年10月
 7. 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 (シンポジウム)、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年10月
 8. 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 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年10月
 9. 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 感染におけるリポ蛋白代謝の解析 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年10月
 10. 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 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年10月
 11. 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 沖繩産ウミシダ (*Alloecomatella polycladia*)抽出物の抗 HCV NS3 helicase 阻害活性による HCV 増殖抑制効果 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年10月
 12. 池田正徳, 森京子, 武田緑, 中澤貴秀, 有海康雄, 団迫浩方, 加藤宣之 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 第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010年12月
 13. 田中寅彦, 黒田和道, 榎島誠, 池田正徳, 加藤宣之 C型肝炎ウイルス非構造タンパク質4Bにおける lipid droplet との相互作用部位の同定 第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010年12月
 14. 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 第

- 3 3 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月
15. 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、齊藤聡 HCV 感染における ER ストレスを介した細胞死の検討 第 3 3 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月
 16. Masanori Ikeda, Kyoko Mori, Takahide Nakazawa, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, Nobuyuki Kato. Development of genome-length HCV RNA replication assay systems derived from different HCV strains using HuH-7 and Li23 cells. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.
 17. Kyoko Mori, Masanori Ikeda, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, Takaji Wakita, Nobuyuki Kato. Anti-HCV mechanism of ribavirin in novel HCV replication cell systems. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.
 18. Yasuo Ariumi, Masanori Ikeda, Tkaji Wakita, Nobuyuki Kato. Role of distinct DDX DEAD-box RNA helicases in HCV RNA replication. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.
 19. Akito Nozaki, Kazushi Numata, Manabu Morimoto, Masaaki Kondo, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato, Katsuaki Tanaka. Hydroxyurea suppresses hepatitis C virus replication in human: a phase I trial of oral hydroxyurea in chronic hepatitis C patients. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.
 20. Yoshiyasu Shinohara, Koji Fujita, Hironori Mawatari, Masato Yoneda, Yuichi Nozaki, Hiroyuki Kirikoshi, Kento Imajo, Kaori Suzuki, Kengo Funakoshi, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato, Shin Maeda, Atsushi Nakajima, Satoru Saito. Clearance of the hepatitis C virus replicon by interferon-alpha treatment restored the signal pathway involving JNK. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.
 21. Yoshiyasu Shinohara, Koji Fujita, Yuichi Nozaki, Kento Imajo, Hironori Mawatari, Masato Yoneda, , Hiroyuki Kirikoshi, Kengo Funakoshi, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato, Shin Maeda, Atsushi Nakajima, Satoru Saito. Hepatitis C Virus infection changes the lipoprotein profiles in the replicon system. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
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

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

分担研究者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

研究要旨 C 型肝炎ウイルス(HCV)はヒトの肝細胞に感染し増殖することで肝炎を引き起こすが、本来肝細胞に備わっている自然免疫系がどのようなものであるのかについては全く不明であった。そこで我々がヒト初代培養細胞や独自に開発した新たな不死化肝細胞を用いてヒト肝細胞における自然免疫機構について解析をおこなった。ヒト初代培養細胞と不死化肝細胞においてはその他の細胞ではあまり認められない IRF7 の恒常的な発現が認められている。ヒト初代培養細胞と不死化肝細胞にセンダイウイルス(SV)を感染させることにより、各種インターフェロン(IFN)遺伝子の発現誘導をその mRNA を RT-PCR および半定量 RT-PCR によって検出することで解析した。これらの細胞において SV 感染後 2 時間で、IFNalpha1 と IFNbeta と IFNlambda3 そして RIG-ImRNA の誘導が認められた。dominant negative 体の発現や shRNA をもちいて IRF7 を抑制した不死化肝細胞を作製して同様の解析をおこなったところ、IFNalpha1 の誘導は強く抑制され、他の遺伝子発現誘導は遅延することがわかった。RIG-I に対する shRNA を発現するレンチウイルスを感染させ RIG-ImRNA 量を低下させた不死化肝細胞では SV の感染による上記のほとんどの遺伝子発現が抑制され、それらの誘導が RIG-I に依存しておこなわれる事がわかったが、IFNalpha1 の誘導は抑制されなかった。このことから肝細胞におけるウイルス感染初期には IFNalpha 遺伝子が IRF7 依存性的にかつ RIG-I 非依存的に誘導されることが明らかになった。このことから 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。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルスが本来感染増殖するヒト肝細胞の本来有する自然免疫システムを解析にすることにより、ヒト肝細胞特異的な自然免疫機構、特に IRF7 の肝細胞における機能の詳細を明らかにして、効果的にこの自然免疫機構を亢進させることによって抗 HCV 戦略構築することを目的とした。

B. 研究方法

1. 市販の初代培養肝細胞および既に樹立している新規ヒト不死化肝細胞、そして組み換え体

HCV が効率良く感染増殖する肝癌由来細胞 HuH7 細胞にセンダイウイルスを感染させた後、1 時間後から 9 時間後における各種自然免疫関連遺伝子の発現を RT-PCR 法ならびに半定量リアルタイム PCR 法を用いて経時的に解析した。

2. 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。
3. 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。

(倫理面への配慮)

この研究で用いられているか不死化肝細胞はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認された研究に基づくものである。不死化肝細胞作製に用いた肝臓提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題は無い。

C. 研究結果

1. ヒト初代培養肝細胞にを感染させ、細胞から経時的に総 RNA を回収し、RT-PCR 法によりインターフェロン関連の mRNA を検出した。IFNalpha1、IFNbeta、IFNlambda3 そして RIG-I の mRNA 感染0時間後には検出されなかったが、3時間後には誘導されることがわかった。さらに感染後初期の応答を検討するために検出感度の高い SYBR-Green Real Time PCR 法を用いて各 mRNA を検出したところ、各 mRNA は感染2時間で上昇していることがわかった。
2. 不死化肝細胞にセンダイウイルスを感染させ、1と同様の検討をおこなったが、RIG-I mRNA が感染 0 時間にわずかに発現が確認された点が初代培養肝細胞と異なり、誘導のパターンが少し異なる場合があるがほぼ初代培養肝細胞と同様の IFN mRNA の誘導パターンが観察された。また組換え体 HCV が効率良く感染し増殖することが知られている肝癌由来細胞 HuH-7 細胞においては SV 感染後9時間までに有為な IFN 関連 mRNA の増加は観察されなかった。
3. 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とこ

ろ、IFNalpha1 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った。

4. 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、センダイウイルスを感染させ、早期の IFNbeta、IFNlambda3 mRNA の増加は抑制されたが IFNalpha1 mRNA の増加は変化しないことがわかった。またこの時 IRF7 の mRNA にも大きな変化は認められなかった。

D. 考察

1. 他の多くの細胞とは異なり肝細胞では IRF7 が恒常的に発現しており、センダイウイルスの感染によって感染後2時間ほどから IFNalpha1、IFNbeta、IFNlambda3 そして RIG-I 遺伝子発現が誘導されることが示唆された。IFNalpha1 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。しかしながら、IFNbeta と IFNlambda3 遺伝子発現は RIG-I 依存的に誘導されるが、IFNalpha1 遺伝子の発現誘導は RIG-I 非依存的におこなわれると考えられた。このことは肝細胞におけるウイルス感染初期の IFNalpha1 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。

E. 結論

肝細胞では IFNalpha1、IFNbeta、IFNlambda3 そして RIG-I の mRNA がほとんど検出されないが、IRF7 は恒常的に発現している。ウイルス感染初期において RIG-I 非依存的に IRF7 は活性化され、IFNalpha 遺伝子を発現誘導させる。このことにより RIG-I 遺伝子を誘導してウイルス RNA の検出効率を上昇させ、また RIG-I 活性化後はインターフェロン遺伝子の誘導に機能するというように HCV 感染初期において重要な役割を果たすことが考えられた。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。

G. 研究発表

1. 論文

1. 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(18), 9118-9127, 2010

2. 学会発表

1. Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. 17th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sept 10-14 2010
2. 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. 17th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sept 10-14 2010
3. 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
4. Yuichi Abe, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: Chemical biological analysis for a mechanism of

infectious HCV particle production. The Association of Pacific Rim University, Research symposium on Interface between Molecular Biology and Nano Biology, Kyoto, Japan, Nov. 24-26 2010

5. 久島透嘉、脇田隆字、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、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、平成 22 年 11 月 7-9 日、徳島 2010
6. 阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、脇田隆字、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、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、平成 22 年 11 月 7-9 日、徳島 2010
7. 土方誠、阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、齊月、脇田隆字、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、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、平成 22 年 11 月 7-9 日、徳島 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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、脇田隆字、出願日2010年9月30日、出願番号 特願2010-222045

2. 実用新案登録 特になし。

3. その他 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

polyI:C リポソーム製剤による肝炎ウイルス排除機構の解析

分担研究者 小原道法 東京都臨床医学総合研究所・感染制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究要旨：我々は 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(plyIC/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。これにより、IFN-λ を強力に誘導する核酸リポソーム製剤を同定した。さらにインターフェロン治療抵抗性とされている IL28B minor allele のヒト肝臓を移植したキメラマウスに HCV を感染させ、本製剤を投与し抗 HCV 効果を評価した。

A. 研究目的

IFN-λ は、IL28A, 28B, 29 からなるサイトカインであり、IFN-α,β の Ⅰ型インターフェロンに対しⅡ型インターフェロンと呼ばれ、抗ウイルス作用を持つことが知られている。近年になり HCV の自然排除や PEG-IFN 治療の反応性に IFN-λ の 1 つである IL28B が関与していることが報告され、IFN-λ が HCV 排除に重要な役割を担っていることが示唆されている。今回、我々は IFN-λ を強力に誘導する核酸リポソーム製剤を同定した。さらにインターフェロン治療抵抗性とされている IL28B minor allele のヒト肝臓を移植したキメラマウスに HCV を感染させ、本製剤を投与し抗 HCV 効果を評価した。

B. 研究方法

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(plyIC/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。さらに、本製剤が IFN-λ を効果的に誘導することが判明したため、IL28B minor allele のヒト肝臓を移植し、HCV (genotype 1a) を持続感染させたヒト肝臓キメラマウスに投与し、経日的に血清中 HCV 量を定量した。さらに、本製剤を IL28B minor allele のヒト肝臓を移植し、HCV (genotype 1a) を持続感染させた

ヒト肝臓キメラマウスに投与したところ、血清中 HCV-RNA において 3-4log の低下させ、IL28B major allele のヒト肝臓を移植したものと同等の強力な抗 HCV 効果を認めた。

(倫理面への配慮)

動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従う。また、東京都臨床医学総合研究所動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

plyIC/LIC 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-IFNα 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った。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、Ⅱ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。

D. 考察

plyIC/LIC が効果的に IFNλ 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。

E. 結論

以上のことから、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. Virology* 84(1):303-311 (2010).
2. 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(9):1545-1553 (2010).
3. Yuri Kasama, Satoshi Sekiguchi, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Masaaki Satoh, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Motohiro Takeya, Yoichi Hiasa, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas *in vivo*. *Blood* 116(23):4926-4933 (2010).
4. Hideko Nuriya, Kazuaki Inoue, Takeshi Tanaka, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Kyosuke Kaji, Seishu Hayashi, Shuichi Kaneko and Michinori Kohara. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based *in situ* hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 48(11):3843-3851 (2010)

5. 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. Virology* 84(22):11761-11770 (2010).

2. 学会発表

1. 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
2. Nakagawa S., Hirata Y., Tokunaga Y., Hirabatashi K., Yano J., Tateno C., Tanaka Y., Mizokami M., Inoue K., Yoshida M., Kohara M. : Interferon lambda plays a critical role on antiviral effect in human hepatocyte. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2010.9.10-14. 横浜
3. 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. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2010.9.10-14. 横浜
4. 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 第18回日本消化器関連学会 2010.10.13-16. 横浜
5. 平田雄一、井上和明、小原道法 : IFNλ 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 第18回日本消化器関連学会 2010.10.13-16. 横浜
6. 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. American Association for the Study of Liver Diseases 2010.10.29-11.2. Boston.

G.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

出願日：平成22年9月9日、出願番号：「特願2010-202355」、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

2.実用新案登録

なし

3.その他

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

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

分担研究者 瀬谷 司 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨 RNA ウイルスは 2 重鎖(ds)RNA の認識経路を活性化して type I IFN を誘導する。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検証に到っていない。本研究ではポリオウイルスと HCV の感染モデルマウス系を用いて樹状細胞 TICAM-1 の細胞性免疫誘導と抗ウイルス効果を査定する。

A. 研究目的

RNA ウイルスの感染防御は一般に細胞内の IPS-1 経路によって達成される。TLR3 による外因性 IFN 誘導経路 (TICAM-1 経路) がどのウイルス感染の防御に実働しているかは未だ検証性に乏しい。本研究ではヒト RNA ウイルスの感染系をマウスモデルとして作製し、TICAM-1 経路のウイルス防御機能を検討する。HCV 感染において肝実質細胞の傷害と細胞断片 (debris) が見られ、debris は TLR3/TICAM-1 経路によって樹状細胞を成熟させることが *in vitro* で証明されている (Ebihara Hepatology 2008)。本研究ではこのような自然免疫応答が *in vivo* で HCV 感染時に再現できるかマウスモデルを使って検討し、ウイルス防御における TICAM-1 経路の生理的意義を解明する。本年度は HCV の感染モデル系をマウスで組める前に、ポリオウイルスのマウス感染系を用いて TICAM-1 経路によって抗ウイルス応答が起きることを証明する。

B. 研究方法

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。現在いくつかの垂株を継代培養している。ポリオウイルス感染モデルは Koike らの報告 (Koike et al., PNAS 1990) に準じて

行った。NK, CTL 活性の測定や ELISA など免疫学的手法は既報に準じた。HCV 感染マウスモデルの TLR3/TICAM-1 経路の生理的意義の検討は次年度以降に取り組む。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。

C. 研究結果

ポリオウイルスの感染マウス (PVR+ TG C57BL/6 mice) は低ドーズのウイルスに抵抗性だ (ウイルス感受性が低い) が、TICAM-1 KO によって感染死するようになった。IPS-1 KO マウスは TICAM-1 KO ほどウイルス感受性が高くなるむしろコントロール PVR+ マウスに近い傾向が見られた。

ポリオウイルスを PVR+/TICAM-1 KO マウスに *i.p.* 投与すると liver, spleen などマクロファージ (Mφ) 系細胞が豊富な器官でウイルス価が上がり、IFN-β の mRNA が有為に低くなった。PVR+/TICAM-1 骨髄からの誘導 Mφ で実際にポリオ感染と IFN-β の誘導が効率よく見られた。TICAM-1 KO によって感染死の頻度は IPS-1^{-/-}, WT の PVR+ マウスより高くなった。

Mφ のの応答は 3 時間以内に起きる早期応答で、マウスがウイルス感染死するのは 3~6d 後の麻痺のせいである。その関連についても検討している。NK, CTL がその前に起動するかも調べる。

D. 考察

ポリオウイルスはプラス鎖 RNA の picomavirus 属だがその感染は MDA5/IPS-1 経路でなく、TICAM-1 経路によって主に防御される。TICAM-1 経路は IPS-1 経路のような抗ウイルスの IFN, サイトカイン産生よりむしろ細胞性免疫の起動に関与する。ポリオ感染マウスでこのような細胞免疫応答が起きるかを本課題で解析する。最終的に HCV で主要な防御経路と細胞性免疫の起動に関与する経路を細胞株などを使って解明する。マウスを使った HCV 感染解析ができれば樹状細胞・自然免疫の活性化を含めて HCV 病態解明に進展が期待できる。

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。予想される結果としては HCV RNA が debris として樹状細胞に取り込まれると細胞性免疫の起動トリガーとなるが、HCV 感染はこの免疫を回避して持続感染するはずである。

HCV の NS 蛋白 processing は多く NS3/4A 依存性である。一方、ポリオウイルスでは 3C protease が processing に関与する。両者の IPS-1 経路、TICAM-1 経路の蛋白分解活性を比較検討し、両経路の感染抑制活性と protease の関与の可能性を検討する必要がある。

HCV 感染の制御に TICAM-1 経路が関与する機構が判れば新たな HCV の治療標的を開発しうる。また、同経路はワクチンを含めた HCV の創薬ターゲットとなりうる。

E. 結論

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。本研究ではポリオウイルスと HCV の感染モデルマウス系を用いて樹状細胞 TICAM-1 の細胞性免疫誘導と抗ウイルス効果を査定する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasai, M., H. Oshiumi, K. Funami, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Molec. Immunol.* 47: 1283-1291.
2. Kubota, N., T. Ebihara, M. Matsumoto, S. Gando, and T. Seya. 2010. IL-6 and interferon-alpha induced by polyI:C-stimulated bone-marrow-derived dendritic cells regulate peripheral expansion of regulatory T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391: 1421-1426.
3. Hirata, N., Y. Yanagawa, M. Satoh, H. Ogura, T. Ebihara, M. Noguchi, M. Matsumoto, H. Togashi, T. Seya, K. Onoé, and K. Iwabuchi. 2010. Dendritic cell-derived TNF- α is responsible for development of IL-10-producing CD4⁺ T cells. *Cell. Immunol.* 261: 37-41.
4. Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. 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.
5. Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Sugiura, K. Kodama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Sci.* 101: 1596-1603.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|----------------------------|-----|-------------|------|
| Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, and <u>Matsuura Y.</u> | Involvement of PA28 γ in the propagation of hepatitis C virus. | Hepatology | 52 | 411-420 | 2010 |
| Tani H, Shiokawa M, Kaname Y, Kambara H, Mori Y, Abe T, Moriishi K, and <u>Matsuura Y.</u> | Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. | Journal of Virology | 84 | 2798-2807 | 2010 |
| Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, <u>Matsuura Y.</u> , Wakita T, and Suzuki T. | Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. | Journal of Virology | 84 | 5824-5835 | 2010 |
| Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, Uchiyama H, Soejima Y, Shirabe K, <u>Matsuura Y.</u> , and Maehara Y. | Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to pe-ginterferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. | Gastroenterology | 39 | 1577-1585 | 2010 |
| Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihara H, Moriishi K, <u>Matsuura Y.</u> , 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 |
| Tripathi LP, Kataoka C, Tagawa S, Moriishi K, Mori Y, <u>Matsuura Y.</u> , and Mizuguchi K. | Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions. | Mol. Biosyst. | 6 | 2539-2553 | 2010 |
| 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, <u>Kanto T.</u> 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 |
| Miyagi T, Takehara T, Uemura A, Nishio K, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Li W, Sasakawa A, Tatsumi T, Ohkawa K, <u>Kanto T.</u> 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 |
| Miyagi T, Takehara T, Nishio K, Shimizu S, Kohga K, Li W, Tatsumi T, Hiramatsu N, <u>Kanto T.</u> Hayashi N. | Altered interferon-alpha-signaling in natural killer cells from patients with chronic hepatitis C virus infection. | J. Hepatol. | 53 | 424-430 | 2010 |
| Miyake T, Satoh T, Kato H, Matsushita K, Kumagai Y, Vandenbon A, Tani T, Muta T, Akira S, <u>Takeuchi O.</u> | I κ B ζ is essential for natural killer cell activation in response to IL-12 and IL-18. | Proc. Natl. Acad. Sci. USA | 107 | 17680-17685 | 2010 |
| Satoh T*, <u>Takeuchi O*</u> , Vandenbon A, Yasuda K, | The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host | Nat. Immunol. | 11 | 936-944 | 2010 |

| | | | | | |
|---|--|---------------------|-----|-----------|------|
| 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). | responses against helminth infection. | | | | |
| Schulz O, Pichlmair A, Rehwinkel J, Rogers NC, Scheuner D, Kato H, <u>Takeuchi O</u> , 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 |
| Slater L, Bartlett, NW, Haas JJ, Zhu J, Message SD, Walton RP, Sykes A, Dahdaleh S, Clarke DL, Belvisi MG, Kon OM, <u>Fujita T</u> , 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 |
| Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, Yoneyama M and <u>Fujita T</u> . | Virus-Infection or 5'ppp-RNA Activates Antiviral Signal through Redistribution of IPS-1 Mediated by MFN1. | PLoS Pathogens | 6 | e1001012 | 2010 |
| Mori K, <u>Ikeda M</u> , Ariumi Y, Kato N. | Gene expression profile of Li23, a new human hepatoma cell line that enables robust hepatitis C virus replication: Comparison with HuH-7 and other hepatic cell lines. | Hepatology Res. | 40 | 1248-1253 | 2010 |
| Tanaka T, Hasegawa Y, Saito M, <u>Ikeda M</u> , Kato N. | Generation of single-chain Fvs against detergent-solubilized recombinant antigens with a simple coating procedure. | J. Biosci. Bioeng. | 110 | 374-376 | 2010 |
| Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, <u>Makoto Hijikata</u> | A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. | Journal of Virology | 84 | 9118-9127 | 2010 |
| Yutaka Amako, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Yuichi Hirata, Satoshi Sekiguchi, Yoshimi Tobita, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Hiromichi Yonekawa and <u>Michinori Kohara</u> . | Pathogenesis of hepatitis C virus infection in <i>Tupaia belangeri</i> . | Journal of Virology | 84 | 303-311 | 2010 |
| Kenichi Satoh, Hiroki Takahashi, Chiho Matsuda, Takuya Umehara, Toshiyuki Tanaka, Masayuki | Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. | J. Med. Virol. | 82 | 1545-1553 | 2010 |

| | | | | | |
|---|---|---------------------|-----|-------------|------|
| Miyasaka, Mikio Zeniya and <u>Michinori Kohara</u> . | | | | | |
| Leiyun Weng, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, <u>Michinori Kohara</u> , Takaji Wakita, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Ying He, Jin Zhong, Tetsuya Toyoda. | Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype- specific manner. | Journal of Virology | 84 | 11761-11770 | 2010 |
| Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, and <u>T. Seya</u> . | 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 |
| Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Sugiura, K. Kodama, M. Matsumoto, and <u>T. Seya</u> . | Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. | Cancer Sci. | 101 | 1596-1603 | 2010 |

Involvement of PA28 γ in the Propagation of Hepatitis C Virus

Kohji Moriishi,¹ Ikuo Shoji,² Yoshio Mori,¹ Ryosuke Suzuki,³ Tetsuro Suzuki,³ Chikako Kataoka,¹
and Yoshiharu Matsuura¹

We have reported previously that the proteasome activator PA28 γ participates not only in degradation of hepatitis C virus (HCV) core protein in the nucleus but also in the pathogenesis in transgenic mice expressing HCV core protein. However, the biological significance of PA28 γ in the propagation of HCV has not been clarified. PA28 γ is an activator of proteasome responsible for ubiquitin-independent degradation of substrates in the nucleus. In the present study, knockdown of PA28 γ in cells preinfection or postinfection with the JFH-1 strain of HCV impaired viral particle production but exhibited no effect on viral RNA replication. The particle production of HCV in PA28 γ knockdown cells was restored by the expression of an small interfering RNA (siRNA)-resistant PA28 γ . Although viral proteins were detected in the cytoplasm of cells infected with HCV, suppression of PA28 γ expression induced accumulation of HCV core protein in the nucleus. HCV core protein was also degraded in the cytoplasm after ubiquitination by an E3 ubiquitin ligase, E6AP. Knockdown of PA28 γ enhanced ubiquitination of core protein and impaired virus production, whereas that of E6AP reduced ubiquitination of core protein and enhanced virus production. Furthermore, virus production in the PA28 γ knockdown cells was restored through knockdown of E6AP or expression of the siRNA-resistant wild-type but not mutant PA28 γ incapable of activating proteasome activity. **Conclusion:** Our results suggest that PA28 γ participates not only in the pathogenesis but also in the propagation of HCV by regulating the degradation of the core protein in both a ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent manner. (HEPATOLOGY 2010;52:411-420)

Over 170 million individuals worldwide are infected with hepatitis C virus (HCV), which is a major etiological agent of liver diseases, including hepatic steatosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC).¹ HCV is classified into the genus

Hepacivirus of the *Flaviviridae* family and has a positive, single-strand RNA genome that encodes a single polypeptide consisting of about 3,000 amino acids.² The N-terminal one-third of the polypeptide is occupied by the structural proteins, and the remaining portion consists of nonstructural proteins involved in viral replication and assembly. Host and viral proteases cleave the appropriate sites of the polypeptide, resulting in generation of at least 10 viral proteins. The capsid (core), E1 and E2 proteins, and p7 are cleaved off by signal peptidase from the polypeptide. Furthermore, the C-terminal signal sequence of the core protein is processed by signal peptidase.³ Our recent data indicate that signal peptidase cleaves the polypeptide between Phe¹⁷⁷ and Leu¹⁷⁸ in the signal sequence, and this processing is required for HCV propagation.⁴ The mature core proteins make nucleocapsid with viral RNA, and HCV particles bud into the lumen of the endoplasmic reticulum bearing E1 and E2 glycoproteins on the host lipid components, and are released from the host cells.

Several reports suggest that HCV core protein plays an important role in the development of various outcomes of liver failure, including steatosis and HCC.^{5,6}

Abbreviations: HA, hemagglutinin; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; JEV, Japanese encephalitis virus; moi, multiplicity of infection; shRNA, short hairpin RNA; siRNA, small interfering RNA.

From the ¹Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan; the ²Division of Microbiology, Kobe University Graduate School of Medicine, Hyogo, Japan; and the ³Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

Received February 3, 2010; accepted March 13, 2010.

Supported in part by grants-in-aid from the Ministry of Health, Labor, and Welfare; the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology; the Osaka University Global Center of Excellence Program; and the Foundation for Biomedical Research and Innovation.

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Address reprint requests to: Yoshiharu Matsuura, D.V.M., Ph.D., Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. E-mail: matsuura@biken.osaka-u.ac.jp; fax: (81)-6-6879-8269.

Copyright © 2010 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.23680

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.