

201227010A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松浦 善治

平成25(2013)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に関する研究

松浦善治 1

II. 分担研究報告書

HCV 感染により誘導されるオートファジーは ATG13 非依存的である

松浦善治 12

HCV による RIG-I の機能阻害機構の解析

竹内 理 16

HCV 感染症におけるトリプトファン代謝酵素 (IDO) と IFN- λ の意義

考藤達哉 18

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

藤田尚志 21

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 23

制限酵素を用いた肝細胞株の IL28B SNP の判定

池田正徳 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 30

新たな RIG-I 賦活化因子による HCV 制御に関する研究に関する研究

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

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に関する研究

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 感染に伴って誘導されるオートファゴソームの形成機構を明らかにするために、人工ヌクレアーゼを用いて ATG5 および ATG13 のノックアウト Huh7 細胞株を樹立した。核内分子 Akirin2 が RIG-I の下流でクロマチンリモデリングを調節し IL-6 や IFN β 産生に重要である事を明らかにした。IPS-1 の凝集によって下流のアダプター TRAF がリクルートされることを明らかにした。RIG-I 認識に必須のユビキチンリガーゼ Riplet が HCV の NS3/4A プロテアーゼの基質として分解され、IFN 応答が減弱することが示された。ヒト肝細胞では恒常的に IFN α 1 遺伝子が微量ながら発現していた。BDCA3+DC は HCV を感知して多量の IFN- λ を産生する Unique な樹状細胞であることが示された。新規の IL28B SNP (rs8113007) の制限酵素による簡便な判定法を開発し、臨床での C 型慢性肝炎に対する治療予測効果の有用性を明らかにした。ヒト肝細胞での HCV 排除に IFN- λ が重要な役割を果たしていることが *in vivo* の解析で示唆された。

分担研究者

竹内 理 京大ウイルス研・教授
考藤達哉 阪大医学系研究科・准教授
藤田尚志 京大ウイルス研・教授
土方 誠 京大ウイルス研・准教授
池田正徳 岡大医学系研究科・准教授
小原道法 都医学総研・副参事研究員
瀬谷 司 北大医学系研究科・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 型肝硬変を基礎に発症する。さらに、未だ臨床サンプルから HCV を効率よく分離培養できる細胞培養系はなく、しかも、感受性を示す実験動物はチンパンジー以外にいないことから、ワクチンや抗ウイルス剤の開発は困難を極めている。HCV はその多様性や可変性、さらに、巧妙な手

段によって宿主の免疫監視機構から逃避して持続感染を成立させていると考えられている。最近研究が進んでいる TLR や外来核酸の細胞内認識センサーは、病原因子の侵入を感知する自然免疫認識受容体であり、自然免疫の誘導は獲得免疫系の発動にも重要な役割を演じていることが明らかになってきた。HCV のプロテアーゼが自然免疫の誘導に関与するアダプター分子を特異的に切断し、巧みに宿主の自然免疫機構から回避している可能性が示唆されている。したがって、HCV が宿主の自然免疫の発動を阻害し、持続感染を成立させている可能性が考えられる。C 型慢性肝炎に対するワクチンや抗ウイルス剤の開発には、まず、HCV が如何にして自然免疫と獲得免疫を回避して持続感染を成立させているのかを明らかにすることが最重要課題である。現在、C 型慢性肝炎に対してペグ化 IFN とリバビリンの併用療法が開始されたが、遺伝子型が 1 型でウイルス量の多い HCV 感染者に対する著効率は約 50% であり、これらの難治例に対しては新たな治療法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) In vitro で合成した人工ヌクレアーゼをコードする mRNA を Huh7 細胞に導入し、細胞をクローニングした後に、遺伝子解析をすることによって、ATG5 および ATG13 のノックアウト Huh7 細胞を樹立した。次にノックアウト Huh7 細胞における血清飢餓によるオートファジーの誘導を検討した。また、HCV の感染性や HCV 感染によって引き起こされるオートファゴソームの形成を Western Blotting および蛍光染色により評価した。

(竹内) マウス線維芽細胞において LPS に対する IL6 産生に重要な Airin2 という核内分子に着目し、マウスマクロファージを用いてウイルス感染に対する機能を解析した。

(考藤) 末梢血から DC サブセットを分離し、TLR リガンド、HCVcc、HCV-JFH-1 感染 Huh7.5.1 など刺激し、IFN- α/β 、IFN- λ を ELISA で定量した。また Huh7.5.1 での ISG 誘導を定量的 PCR で評価した。

(藤田) IPS-1 の活性化に焦点を当て、人為的に IPS-1 の凝集体を形成してシグナルを発生させる実験系を立ち上げた。この系を用いて IPS-1 のどの部分がシグナルを伝達するのかについて詳細な解析を行なった。

(土方) 初代培養ヒト肝細胞と類似した性質を有するヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞に、センダイウイルスを感染させ、その自然免疫関連遺伝子群の発現パターンを解析した。

(池田) IL28B 近傍の SNP である rs8099917、rs12979860、および rs8113007 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。rs8099917 の遺伝子型判定については制限酵素 *BsrDI* を用いて遺伝子型を判定することが可能であったので、PCR 産物を *BsrDI* 処理して電気泳動を行い、DNA 断片サイズのパターンを検討した。

(小原) HCV 感染および pIC-LIC の投与によるヒト肝臓型キメラマウスでの肝臓内 IFN λ 、IFN β の発現量の変化を評価した。

(瀬谷) Riplet や DDX60 と RIG-I の結合を yeast two-hybrid 法で解析した。

(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

1. ATG5 のヘテロノックアウト Huh7 細胞と ATG13 のホモノックアウト Huh7 細胞が樹立できたため、HCV 感染に伴うオートファジーの誘導における ATG13 の意義を検討した。ATG13 のノックアウト Huh7 細胞に対する HCVcc の感染性はコントロールと同レベルであった。また、HCV サブゲノム RNA の複製効率もコントロールと同程度であり、ATG13 は HCV の感染性に影響を及ぼさないことが明らかになった。さらに、ATG13 のノックアウト Huh7 細胞では血清飢餓によるオートファジーの誘導が抑制されているにも関わらず、HCV 感染に伴うオートファゴソームの形成はコントロールと同程度であり、HCV 感染によるオートファジーの誘導は ATG13 非依存的であることが示唆された。
(松浦)
2. マクロファージ特異的 Akirin2 欠損マウス由来マクロファージは LPS に対する IL6 産生のみでなく、RIG-I により認識されるウイルス感染に対する IL-6、IFN β 産生も低下していた。また、Akirin2 は RIG-I、TLR の下流でクロマチンリモデリングを調節し IL6、IFN β 遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。
(竹内)
3. 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り、Systemic IDO 活性は亢進していた。Kyn

値は肝組織炎症 (A 因子)、線維化 (F 因子) と正相関した。LPS+IFN- γ などの刺激によって、DC に機能性 IDO が誘導された。IDO が誘導された DC と CD4+T 細胞との培養によって、CD4+CD25+FOXP3+ の制御性 T 細胞 (Treg) が誘導された。DC による Treg 誘導能は C 型肝炎患者でより強度であった。BDCA3+DC は HCV を感知して多量の IFN- λ を、PDC は多量の IFN- α/β を産生し、いずれも肝細胞の ISG を誘導した。(考藤)

4. PS-1 は CARD、TRAF binding Motif (TBM) を含む細胞質ドメイン、ミトコンドリア外膜貫通ドメインからなっている。人為的に凝集体を形成させると、抗ウイルスシグナルが発生し、インターフェロン産生などの応答が誘導された。IPS-1 の部分を欠く変異体を凝集させたところ、CARD、膜貫通ドメインはシグナルの活性化には必須ではないことが判明した。一方、TBM を欠く変異体は凝集体を形成させてもシグナルを発生させる能力を持たないことが明らかとなった。特にアミノ酸置換により TBM のみを変異させた場合でも同様な活性の著しい低下が観察された。(藤田)

5. ヒト初代培養肝細胞と HuS-E/2 細胞にセグダイウイルスを感染させ、自然免疫応答反応を解析したところ、両細胞において非感染時において IFN α 1 の mRNA が発現していることがわかった。ウイルス非感染 HuS-E/2 細胞の培養上清を転写プロモーター内に IFN α 応答配列をもつレポーター遺伝子が染色体上に挿入されている細胞株の培地に加えることでレポーター活性が上昇したことから、この培養上清に IFN α 活性が存在することがわかった。ウイルス非感染 HuS-E/2 細胞を IFN α に対する中和活性を持つ抗 IFN α 抗体や IFN 受容体抗体で細胞を処理するとこの細胞内で発現していた RIG-I や IFR7 などの mRNA 量が低下した。HuS-E/2 細胞に IFN α に対する中和活性を持つ抗 IFN α 抗体や IFN 受容体抗体存在下でセグダイウイルスを感染させると本来著しく誘導される IFN β や IFN λ mRNA の発現が抑制され、遅延することがわかった。HuS-E/2 細胞に IFN α に対する中和活性を持つ抗 IFN α 抗体や IFN 受容体抗体存在下でセグダイウイルスを感染させると感染 3 時間後

など早期におけるウイルス感染細胞数が著しく上昇することがわかった。(土方)

6. rs8099917 および rs8113007 においてダイレクトシーケンス法と制限酵素法による肝細胞株の遺伝子型の判定は 100%一致したことから、ダイレクトシーケンス法の代わりに制限酵素法で判定が可能ながわかった。13 種類の肝細胞株で rs8113007、rs8099917 および rs12979860 の遺伝子型は HepG2 細胞を除いては全て一致した。HepG2 細胞の IL28B 遺伝子型は rs8099917 ではメジャー型であったのに対して、rs8113007 および rs12979860 ではヘテロ型と乖離する結果となった。新規の IL28B SNP である rs8113007 は 62 塩基しか離れていない rs8009997 よりも、4378 塩基離れている rs12979860 と遺伝子型においてより強い相関を示した。肝細胞株において IL28B SNP の遺伝子型が乖離する HepG2 細胞のような例が見つかったことから、臨床症例での検討を実施した。インターフェロン/リバビリン療法で治療効果の明らかでない 16 例の C 型慢性肝炎患者のうち 2 例で IL28B SNP 間で遺伝子型が乖離していた。2 例とも rs8099987 では IFN 反応型のメジャー型であったが、rs8113007 および rs12979860 では IFN 抵抗型のヘテロ型であった。この 2 例は治療成功例であるため rs8113007 は rs8099917 と遺伝子型が乖離する症例において rs8099917 の治療予測を補える可能性があることが示唆された。また、興味深いことに肝細胞株のみならずヒトにおいても rs8113007 の遺伝子型は近傍に存在する rs8099917 よりも離れて存在する rs12979860 とより強い相関を示すことがわかった。(池田)
7. HCV 感染及び polyIC-LIC 投与により、ヒト肝臓キメラマウスの肝臓内では IFN λ が IFN β に比べ著明に誘導されていることを見出した。in vitro の実験では、pIC-LIC 投与により、HepG2 では IFN λ が誘導されるのに対し、MRC5、HEK293T では IFN β が優位に誘導された。(小原)
8. HCV 感染の初期認識機構に関与する DDX、ユビキチン化酵素などを KO 細胞の網羅的解析から抽出し、これらを機能解析した。HCV 感染肝細胞で polyU/UC ウイルス RNA が存

在するにも拘らず type I インターフェロンが誘導されにくい原因として (NS3/4A による MAVS 分解の他に) この Riplet ユビキチン修飾が関与することを明らかにした。また、新規 RIG-I 修飾ヘリケースとして DDX60 を同定し、その機能解析も行った。HCV 感染肝細胞は dsRNA を含んだ debris となる。樹状細胞が dsRNA/debris を取り込んだ場合に起きる樹状細胞応答と細胞性免疫の活性化を検討した。樹状細胞 dsRNA 認識経路は MAVS 経路でなく、TLR3/TICAM-1 を介することとそれによる樹状細胞成熟化が NK 活性化と cross-priming (CTL 誘導) を行うことを証明した。これらのエフェクターを誘導する分子機構として複数の IFN 誘導遺伝子が関与することを明らかにした。NK, CTL ドライブの樹状細胞内標的分子を siRNA や lentivector による遺伝子導入で検討している。Hydrodynamics 法で in vivo の解析も行っている。(瀬谷)

D. 考察

血清飢餓に伴うバルクオートファジーにおいて、ATG13 は重要な役割を果たしているが、HCV 感染においては ATG13 を介さない異なった経路によって LC3 の Lipidation が起きていることが予想される。今後は、ATG5 および ATG14 のノックアウト Huh7 細胞を樹立し、さらに詳細に HCV 感染によって誘導されるオートファゴソームの形成機構を明らかにしていく予定である。

RIG-I は HCV 認識、I 型 IFN 産生に重要であるが、そのシグナルは細胞内で精巧に調節されている。本研究により、RIG-I シグナルを調節する新規分子を同定して今後ヒト HCV 感染における機構の解明が興味深い。

C 型慢性肝炎患者においては Systemic IDO 活性が高値であり、これは肝臓の炎症や線維化によって誘導されることが示唆された。また BDCA3+DC は HCV を感知して多量の IFN- λ を産生する Unique な細胞であることが明らかになった。

IPS-1 の機能は二つのステップから成ると考えられる。シグナルの受容：IPS-1 の CARD、膜貫通ドメインは RIG-I からのシグナルを受け取り、ミトコンドリア上で効率良く凝集体を形成するのに重要である。シグナルの下流への伝達：上流からのシグナルを自らの凝集体形成に転換し、さらに

TRAF 分子をリクルートすることで新たなシグナルを伝えて最終的な遺伝子発現プロファイルを誘導する。

ヒト肝細胞では恒常的に IFN α 1 遺伝子が微量ながら発現していることが示唆された。この IFN α 1 は培養液中に活性型として分泌されており、細胞のウイルス感染初期における抗ウイルス自然免疫活性を高めている可能性が考えられた。C 型肝炎患者において IFN 治療抵抗性の患者では IFN 誘導に関連する遺伝子の発現が高い傾向があると報告されており、今回の結果がどのように関連するのかを明らかにする必要があると考えられた。恒常的な IFN α 遺伝子発現については他の上皮系細胞などで報告がなされている。肝臓も小腸から肝門脈を介して感染性因子にさらされることから、ウイルス感染に対する早期の対応のために微量の IFN α 1 を発現していることが考えられた。今後この遺伝子発現がどのようなメカニズムで制御されているのか HCV 感染との関連を明らかにする必要があると考えられた。

新規に見出した rs8113007 の遺伝子型に対する制限酵素 (*BpmI*) を用いた簡便な遺伝子型の判定法を開発した。13 種類の肝細胞株のうち HepG2 細胞では IL28B 遺伝子型は rs8099917 ではメジャー型であったのに対して、rs8113007 および rs12979860 ではヘテロ型と乖離する結果となった。また、16 例の C 型慢性肝炎患者のうち、2 例で rs8099987 では IFN 反応型のメジャー型であるのに対して rs8113007 および rs12979860 では IFN 抵抗型のヘテロ型となる乖離例が存在した。2 例の治療結果は治療失敗例であったので、このケースでは rs8113007 および rs12979860 の予測が正しかったといえる。臨床における IL28 遺伝子型が異なる SNP で乖離する症例数を増やしたさらなる検討が今後の課題となる。

ヒト肝細胞での自然免疫応答において IFN- λ が重要な役割を果たしていることが in vivo, in vitro で示された。また細胞株を使用した実験から、臓器により IFN 応答が異なることが示された。また細胞株を使用した実験から、臓器により IFN 応答が異なることが示された。

肝細胞のウイルス dsRNA 認識からシグナル起動に Riplet による RIG-I の C 末ユビ

キチン化が必須であり、この過程をHCVのNS3/4A proteaseが阻害することが初めて検証された。このRiplet の機能はIFN-Iを含むIFN起動に重要である。肝細胞が障害されれば樹状細胞が貪食・抗原提示を行うが、その際NK細胞、CTLの誘導が如何に起きるかをin vivo解析する系がない。免疫解析に使えるHCVのマウス感染モデルを作製する必要がある。HCVに罹るKOマウスの肝細胞株を作製して樹状細胞などの共培養の系でNK, CTLを誘導させるのに必要な因子を同定したので、ヒトの相同分子の解析と肝炎における免疫系への影響を調べることがある。

E. 結論

- 1 人工ヌクレアーゼを用いて ATG13 のノックアウト Huh7 細胞が樹立できた。
- 2 ATG13 は HCV の感染性や HCV 感染によるオートファゴソームの形成には関与していない。
- 3 RIG-I による I 型 IFN、IL6 産生を調節する新規分子 Akirin2 の同定に成功した。
- 4 HCV 感染によって誘導される IDO は Treg を介して免疫抑制的に、一方 BDCA3+DC から産生される IFN- λ は ISG を介して抗 HCV 的に作用することが示された。IDO、BDCA3+DC、IFN- λ が HCV 排除の治療標的として有用であることが示唆された。
- 5 ウイルス感染によるストレス顆粒（各種の RNA 結合蛋白質の凝集体）形成、ミトコンドリア上での IPS-1 の凝集体形成は重要な自然免疫応答であり、HCV は IPS-1 の凝集体形成を阻害する事により免疫応答から逃れている。新たな抗 HCV ストラテジーとしてこれら抗ウイルス分子の発現強化、効率的な凝集体形成が示唆された。
- 6 肝細胞における IFN α 1 遺伝子の恒常的な発現はウイルス感染初期における迅速な抗ウイルス応答に関与することが考えられるがその発現誘導の機能はまだ不明である。まだ HCV 感染との関連が不明であるため、今後、HCV の感染に対する抑制効果については十分に検討すべき課題であると考えられる。このことによりヒト肝細胞の自然免疫機構を効率良く活性化し、また機能を向上させる方法の開発

することが可能になり、そのことで肝細胞を抗 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 新規の IL28B SNP (rs8113007) の制限酵素による簡便な判定法を開発し、臨床での C 型慢性肝炎に対する治療予測効果の有用性を明らかにした。
- 8 これらの結果は、ヒト肝細胞に感染する HCV に対する治療法に重要な示唆を与えるものであると考えられた。
- 9 RIG-I の活性化因子として Riplet を同定し、機能解析を行った。MAVS KO マウスの肝細胞株が HCV 許容性になることを証明したので同系で Riplet の抗 HCV 活性を IFN-I、NK 細胞、CTL の誘導などに分けて解析を進めている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, and Matsuura Y. Expression of miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with HCV. *J. Virol.*, 2012, 86, 7918-7933.
- 2 Abe T, Fukuhara T, Wen X, Ninomiya A, Moriishi K, Maehara Y, Takeuchi O, Kawai T, Akira S, and Matsuura Y. CD44 participates in the IP-10 induction in cells replicating HCV RNA through an interaction with TLR2 and hyaluronan. *J. Virol.*, 2012, 86, 6159-6170.
- 3 Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. *J. Virol.* 2012, 86, 1382-1393.
- 4 Fukuhara T, and Matsuura Y. Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection. *J. Gastroenterol.*, 2012, doi:10.1007/s00535-012-0661-5.
- 5 Moriishi K, and Matsuura Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.*, 2012, 3, 54, doi:10.3389/fmicb.2012.00054.

- 6 Maruyama K, Fukasaka M, Vandenbon A, Saitoh T, Kawasaki T, Kondo T, Yokoyama KK, Kidoya H, Takakura N, Standley D, Takeuchi O, Akira S. The transcription factor Jdp2 controls bone homeostasis and antibacterial immunity by regulating osteoclast and neutrophil differentiation. *Immunity*, 2012, 37, 1024-1036.
- 7 Maruyama K, Kawagoe T, Kondo T, Akira S, Takeuchi O. TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK) is a negative regulator of osteoclastogenesis and bone formation. *JBC*, 2012, 287, 29114-29124.
- 8 Kanto T, Inoue M, Oze T, Miyazaki M, Sakakibara M, Kakita N, Matsubara T, Higashitani K, Hagiwara H, Iio S, Katayama K, Mita E, Kasahara A, Hiramatsu N, Takehara T and Hayashi N, Dynamics of regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells as immune markers for virological response in pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. *J. Gastroenterol.*, 2012, 47, 169-178.
- 9 Kakita N, Kanto T, Itose I, Kuroda S, Inoue M, Matsubara T, Higashitani K, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A and Hayashi N, Comparative analyses of regulatory T cell subsets in patients with hepatocellular carcinoma: a crucial role of CD25(-) FOXP3(-) T cells. *Int. J. Cancer.*, 2012, 131, 2573-2583.
- 10 Tsunematsu H, Tatsumi T, Kohga K, Yamamoto M, Aketa H, Miyagi T, Hosui A, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N and Takehara T, Fibroblast growth factor-2 enhances NK sensitivity of hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Cancer.*, 2012, 130, 356-364.
- 11 Takamatsu S, Onoguchi K, Onomoto K, Narita R, Takahashi K, Ishidate F, Fujiwara TK, Yoneyama M, Kato H, and Fujita T, Functional Characterization of Domains of IPS-1 Using an Inducible Oligomerization System. *PLoS ONE*, 2013, 8(1) : e53578.
- 12 Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, and Watanabe M, Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology*, 2013, 57, 46-58.
- 13 Onomoto K, Jogi M, Yoo JS, Narita R, Morimoto S, Takemura A, Sambhara S, Kawaguchi A, Osari S, Nagata K, Matsumiya T, Namiki H, Yoneyama M, and Fujita T, Critical Role of an Antiviral Stress Granule Containing RIG-I and PKR in Viral Detection and Innate Immunity. *PLoS ONE*, 2012, 7(8) : e43031.
- 14 Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, and Kato N, Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Virus Genes*, 2012, 44, 374-381.
- 15 Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, and Kato N. Development of hepatitis C virus production reporter assay systems using two different hepatoma cell lines. *J. Gen. Virol.*, 2012, 93, 1422-1431.
- 16 Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, and Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. *Virus Res.*, 2012, 167, 74-85.
- 17 Takeda M, Ikeda M, Mori K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, and Kato N, Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication. *FEBS Open Bio.*, 2012, 2, 279-283.
- 18 Hirata Y, Ikeda K, Sudoh M, Suzuki A, Nishijima M, Taguchi R, and Kohara M, Self-enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis. *PLoS Pathog.*, 2012, e1002860.
- 19 Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Matsuda C, Yoneyama M, Fujita T, and Kohara M, Impairment of interferon regulatory factor-1 3 activation by hepatitis C virus core protein basic region 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, 428, 494-499.
- 20 Sekiguchi S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F, Matsushima K, and Kohara M, Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS ONE*.2012, e51656.

- 21 Azuma M, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, and Seya T. Cross-presentation and antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C largely depend on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c+/CD8a+ dendritic cells. *OncoImmunol.*, 2012, 1, 581-592.
 - 22 Shime H, Matsumoto M, Oshiumi H, Tanaka S, Nakane A, Iwakura Y, Tahara H, Inoue N, and Seya T. TLR3/TICAM-1 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, 109, 2066-2071.
 - 23 Yamazaki S, Maruyama A, Okada K, Matsumoto M, Morita A, and Seya T. Dendritic cells from oral cavity induce Foxp3⁺ regulatory T cells upon antigen stimulation. *PLoS ONE*, 2012, 7(12), e51665.
 - 24 Tatematsu, M., F. Nishikawa, T. Seya, M. Matsumoto. 2013. Toll-like receptor 3 recognizes single-stranded RNA with incomplete stem structures. *Nat. Commun.*, (in press).
 - 25 Aly H.H, Shimotohno K, Hijikata M, and Seya T. Toward establishment of in vitro systems for analysis of HCV life cycle. *Microbiol. Immunol.*, 2012, 56, 1-9.
 - 26 Oshiumi H, Matsumoto M, and Seya T. Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J. Biochem.* (Tokyo), 2012, 151, 5-11.
 - 27 Seya T, Shime H, and Matsumoto M, TAMable tumor-associated macrophages in response to innate RNA sensing. *Oncoimmunol.*, 2012, 1, 1000-1001.
 - 28 Seya T, Shime H, Takaki H, Azuma M, Oshiumi H, and Matsumoto M, TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis. *Oncoimmunol.*, 2012, 1, 917-923.
2. 学会発表
- 1 松浦善治、C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関する宿主因子第132回日本薬学会年会、札幌、3月28-30日、2012
 - 2 Yoshiharu Matsuura, Expression of miR122 and lipid metabolism determine the cell tropism of hepatitis C virus, 7th International Virus Assembly Symposium, Menorca, May, 13-17, 2012.
 - 3 松浦善治、C型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略～HCVの増殖を制御する宿主側因子について～: 第48回日本肝臓学会総会、金沢、6月7-8日、2012
 - 4 Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Yoshiharu Matsuura, miR122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of hepatitis C virus infection. The American Society for Virology, 31st Annual Meeting, University of Wisconsin-Madison, Madison, July 21-25, 2012.
 - 5 Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of mouse liver cell lines susceptible to hepatitis C virus infection, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
 - 6 Mai Shiokawa, Takasuke Fukuhara, Chikako Ono, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of human liver-specific factors in a complete propagation of hepatitis C virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
 - 7 Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
 - 8 Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Masaru Arimoto, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura. miR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of HCV infection. 19th International Meeting on HCV and Related Viruses, Venice, October, 5-9, 2012.
 - 9 Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell

- tropism of hepatitis C virus, The 34th Naito Conference, 札幌、10月16日-19日, 2012
- 10 Yoshiharu Matsuura: Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, The 34th Naito Conference, 札幌, 10月16日-19日, 2012
 - 11 塩川 舞、福原崇介、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生に関するヒト肝臓特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 - 12 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本 徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臓細胞株の樹立、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 - 13 福原崇介、塩川 舞、小野慎子、山本聡美、寒原裕登、加藤大志、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、C型肝炎ウイルスの細胞親和性はmiR-122の発現と脂質代謝系によって規定される、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 - 14 加藤大志、岡本 徹、福原崇介、寒原裕登、森田英嗣、森 嘉生、神谷 亘、松浦善治、日本脳炎ウイルスコアタンパク質によるStress Granule抑制機構の解析、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 - 15 松田麻未、鈴木亮介、渡士幸一、相崎英樹、松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの一過性感染性粒子を用いた細胞内侵入機構の解析、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 - 16 Yoshiharu Matsuura, miR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of hepatitis C virus infection: The 10th JSH Single Topic Conference, 東京, 11月21-22日, 2012.
 - 17 塩川 舞、福原崇介、小野慎子、岡本 徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生に関するヒト肝臓特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
 - 18 福原崇介、本村貴志、塩川 舞、小野慎子、寒原裕登、岡本 徹、調 憲、前原喜彦、松浦善治、C型肝炎ウイルスの細胞親和性における Quasispecies の意義、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
 - 19 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本 徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臓細胞株の樹立、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
 - 20 葛西宏威、河上國洋、平田有佳理、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、岡本 徹、松浦善治、楠木正己、森石恆司、HCV複製に関わる新規宿主因子FKBP6:FKBP6はNS5Aと結合しHCV複製を制御する、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
 - 21 Higashitani K, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Matsubara T, Kakita N, Oze T, Hiramatsu N, Mita E, Imai Y, Kasahara A, Okuno A, Takikawa O, Hayashi N, Takehara T. Association of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the generation of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients. The Liver Meeting AASLD 63rd Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA, 2012.
 - 22 Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Mizokami M, Hayashi N, Takehara T. Human BDCA3+ dendritic cells in blood and in the liver are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. The Liver Meeting AASLD 63rd Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA, 2012.
 - 23 Matsubara T, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Higashitani K, Miyazaki M, Hiramatsu N, Kasahara A, Takehara T. TIE2-expressing monocytes are feasible angiogenesis-related cellular diagnostics for hepatocellular carcinoma: Involvement of inflammatory cytokines in the generation. The Liver Meeting AASLD 63rd Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA, 2012.
 - 24 Fujita T.: Detection of cytoplasmic non-self RNA and activation of antiviral innate immunity. October 23-26 2012 International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012, Tokyo

- 25 Funabiki M, Kato H, Fujita T.: Autoimmunity and nephritis caused by MDA5 mutation depend on IPS-1. 10. 16-19 2012 The 34th Naito Conference on Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine, Sapporo
- 26 Ng C-S, Kato H, Fujita T.: Inhibition of virus-induced interferon gene activation through modulation of cytoplasmic stress granules by a viral protease. 10. 16-19 2012 The 34th Naito Conference on Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine, Sapporo
- 27 Vo DN, Kato H, Fujita T.: The anti-tumor agent DMXAA induces IFN- β response via STING. 9. 11-14 2012 The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji
- 28 Go S, Onomoto K, Ishidate F, Kato H, Fujita T.: Mechanism and Physiological Role of Granules Formed by Viral Nucleocapsid Protein. 9. 11-14 2012 The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji
- 29 Fujita T.: Cytoplasmic sensing of viral RNA by RIG-I-like receptors. August 27-Sept 1 2012 Non-self RNA sensing in virus infected cells and activation of antiviral immunity. Le Treilles, France
- 30 Fujita, T.: Antiviral Innate Immunity: Control of Interferon Production. NF-kappaB Signaling and Biology: From Bench to Bedside, Keystone Symposia, March 20, 2012 Whistler, British Columbia, Canada
- 31 Fujita, T.: Sensing Viral RNA in Cytoplasm and Activation of Antiviral Innate Immunity. Innate Immunity: Sensing the Microbes and Damage Signals, Keystone Symposia, March 5, 2012 Keystone Colorado, USA
- 32 Yoji Tsugawa and Makoto Hijikata: Hepatocyte-specific innate immune systems in response to RNA virus infection. The 10th International Student Seminar. Kyoto, 5-8 March 2012.
- 33 Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Critical role of Interferon alpha constitutively produced in-human hepatocytes in response to virus infection. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 11-14 September 2012
- 34 Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Hepatocyte-specific innate immune systems in response to viral infection. 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Venice, Italy, Oct 5-9, 2012
- 35 Misao Kuroki, Mariko Inoue. Makoto Hijikata, Masanori Ikeda Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Nobuyuki Kato, Yasuo Ariumi: Can P-body associated host factors APOBEC3G and MOV10 restrict HCV infection? 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Venice, Italy, Oct 5-9, 2012
- 36 津川 陽司、土方 誠: ヒト肝細胞における抗ウイルス自然免疫応答機構の解析、第8回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島、平成24年7月6日
- 37 土方 誠: C型肝炎ウイルス培養系開発過程で最近わかったこと、国立感染症研究所肝炎セミナー、国立感染症研究所、東京平成24年年10月31日
- 38 津川陽司、加藤博己、藤田尚志、下遠野邦忠、土方誠: ヒト肝細胞における抗ウイルス自然免疫応答機構の解析、第60回日本ウイルス学会学術集会。大阪2012年11月13-15日
- 39 有海康雄、黒木美沙緒、井上万里子、土方誠、池田正徳、脇田隆字、下遠野邦忠、加藤宣之: P-body 因子とHCVのクロストーク、第60回日本ウイルス学会学術集会。大阪2012年11月13-15日
- 40 Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Constitutively produced Interferon $\alpha 1$ functions in prevention of viral infection in human hepatocytes、第35回日本分子生物学会年会、福岡2012年12月11~14日
- 41 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆字、加藤 宣之 Li23細胞を用いた新しいJFH-1株HCV感染レポーターアッセイ系の開発と感受性を規定する因子の検討 第16回日本肝臓学会大会、神戸、2012年10月。
- 42 池田 正徳、是永 匡紹、武田 緑、有海 康雄、日野 啓輔、加藤 宣之 IL28B SNPsの制限酵素法による判定法と比較、第16

- 回日本肝臓学会大会、神戸、2012年10月
- 43 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆字、加藤 宣之 2種類 of 肝細胞株(HuH-7とLi23)を用いたJFH-1株HCV感染レポーターアッセイシステムの開発と感染効率を規定する宿主因子の検討、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
池田 正徳、是永 匡紹、武田 緑、有海 康雄、日野 啓輔、加藤 宣之 新規IL28B SNP(rs8113007)のHCVに対するIFN応答性の検討、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
- 44 武田緑、池田正徳、有海康雄、脇田隆字、加藤宣之 異なる2種類のヒト肝癌細胞株を用いたHCV感染レポーターアッセイ系の開発とHCV感染への感受性を規定する因子の検討、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月
- 45 池田正徳、武田緑、是永匡紹、有海康雄、日野啓輔、加藤宣之 IL28B SNP rs8113007によるC型慢性肝炎患者の治療効果予測、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月
- 46 上田 優輝、森 京子、池田 正徳、加藤 宣之 抗マラリア薬として開発中の化合物に見出された強力な抗HCV活性、第48回日本肝臓学会総会、石川、2012年6月
- 47 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之 C型肝炎ウイルスのゲノム複製が長期間に及ぶことで発現レベルに変動を来した宿主遺伝子の同定、第48回日本肝臓学会総会、石川、2012年6月
- 48 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之 3年半にわたるC型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現が不可逆的に変動した宿主遺伝子の同定、第27回中国四国ウイルス研究会、鳥取、2012年6月
- 49 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之 3年半にわたるC型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現が変動した9個の宿主遺伝子の同定、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月
- 50 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之、長期にわたるC型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現レベルに変動を来した宿主遺伝子の同定、第60回日本ウイルス学会学術総会、大阪、2012年11月
- 51 上田 優輝、森 京子、團迫 浩方、金 惠淑、綿矢 有佑、池田 正徳、加藤 宣之、強力な抗HCV活性が見出された抗マラリア薬として開発中の化合物、第27回中国四国ウイルス研究会、鳥取、2012年6月
- 52 上田 優輝、森 京子、團迫 浩方、金 惠淑、綿矢 有佑、池田 正徳、加藤 宣之、抗マラリア薬として開発中の化合物に見出された強力な抗HCV活性、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月
- 53 上田 優輝、森 京子、團迫 浩方、金 惠淑、綿矢 有佑、池田 正徳、加藤 宣之、酸化ストレスを介して強い抗HCV活性を示す抗マラリア薬として開発中の化合物、第60回日本ウイルス学会学術総会、大阪、2012年11月
- 54 Kuroki M, Inoue M, Hijikata M, Ikeda M, Wakita T, Shimotohno K, Kato N, Ariumi Y. Can P-body associated host factors APOBEC3G and MOV10 restrict HCV infection? In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
- 55 Ariumi Y, Kuroki M, Inoue M, Hijikata M, Ikeda M, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. Dynamic Regulation of cytoplasmic mRNA-containing bodies in HCV systems. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
- 56 Ueda Y, Mori K, Dansako H, Kim HS, Wataya Y, Ikeda M, Kato N. Potent anti-HCV activities found in preclinical anti-malarial drugs is promptly exerted through oxidative stress. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
- 57 Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with Li23 cell-based long-term replication of Hepatitis C virus RNA. 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
- 58 Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Development of HCV reporter-assay systems using two hepatoma cell lines and analysis of the factors

- determining sensitivity to HCV infection.
In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
- 59 Ikeda M, Takeda M, Korenaga M, Ariumi Y, Hino K, Kato N. New IL28B single nucleotide polymorphism compensates rs8099917 in the response to therapy for chronic Hepatitis C. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
- 60 Hara Y, Yanatori I, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Ikeda M, Kishi F, Kato N, Hino K. Hepatitis C virus protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
- 61 Kasai H, Kawakami K, Yamashita Y, Ikeda M, Kato N, Enomoto N, Matsuura Y, Kusunoki M, Moriishi K. FKBP6 plays an important role in HCV replication through binding to HCV NS5A. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
- 62 Hirata Y.,et al: Self-enhancement of Hepatitis C Virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2012.10.4-11. Venice (Italy)

HCV 感染により誘導されるオートファジーは ATG13 非依存的である

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：C型肝炎ウイルス（HCV）の感染に伴ってオートファジーが誘導されることが知られている。これまでに我々は、HCV-RNAの複製がおきている細胞でオートファゴソームの形成を阻害すると、空胞化を伴う細胞死が誘導されることから、オートファジーはHCV感染細胞を保護する作用があることを示してきた。しかしながら、HCV感染に伴って誘導されるオートファゴソームの性状は未だ不明な点が多い。オートファゴソームの形成機構を明らかにするために、人工ヌクレアーゼを用いたATG5およびATG13のノックアウトHuh7細胞の樹立を試みた。ATG5はヘテロノックアウト、ATG13はホモノックアウトのHuh7細胞が樹立できたため、HCV感染時のオートファジー誘導におけるATG13の役割を解析した。ATG13ノックアウトHuh7細胞では血清飢餓によってはオートファゴソームの形成が亢進しないにも関わらず、HCV感染によってはコントロールと同程度にオートファジーが誘導されることが明らかになった。この結果より、HCV感染によって誘導されるオートファジーはATG13非依存的であることが示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の感染によってオートファジーが誘導されることが明らかになって以来、その役割を解明するために、多くの検討がなされ報告されてきた。我々は、HCVが複製している細胞株であるレプリコン細胞でオートファゴソームの形成を抑制することによって細胞質内の空胞化を伴う細胞死が誘導されることから、オートファジーはHCV感染細胞を細胞死から保護していることを示した。一方、HCV感染に伴うオートファゴソームの形成機構には未だ不明な点が多い。そこで今回、人工ヌクレアーゼを用いてATG5およびATG13のノックアウトHuh7細胞を樹立し、HCV感染細胞におけるオートファゴソーム形成機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

In vitroで合成した人工ヌクレアーゼをコードするmRNAをHuh7細胞に導入し、細胞をクローニングした後に、遺伝子解析をすることによって、ATG5およびATG13のノックアウトHuh7細胞を樹立した。次にノックアウトHuh7細胞における血清飢餓によるオートファジーの誘導を検討した。また、HCVの感染性やHCV感染によって引き起こされるオートファゴソームの形成をWestern Blottingおよび蛍光染色に

より評価した。

（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、個人情報等を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

ATG5のヘテロノックアウトHuh7細胞とATG13のホモノックアウトHuh7細胞が樹立できたため、HCV感染に伴うオートファジーの誘導におけるATG13の意義を検討した。ATG13のノックアウトHuh7細胞に対するHCVccの感染性はコントロールと同レベルであった。また、HCVサブゲノムRNAの複製効率もコントロールと同程度であり、ATG13はHCVの感染性に影響を及ぼさないことが明らかになった。さらに、ATG13のノックアウトHuh7細胞では血清飢餓によるオートファジーの誘導が抑制されているにも関わらず、HCV感染に伴うオートファゴソームの形成はコントロールと同程度であり、HCV感染によるオ

オートファジーの誘導は ATG13 非依存的であることが示唆された。

D. 考察

血清飢餓に伴うバルクオートファジーにおいて、ATG13 は重要な役割を果たしているが、HCV 感染においては ATG13 を介さない異なった経路によって LC3 の Lipidation が起きていることが予想される。今後は、ATG5 および ATG14 のノックアウト Huh7 細胞を樹立し、さらに詳細に HCV 感染によって誘導されるオートファゴソームの形成機構を明らかにしていく予定である。

E. 結論

1. 人工ヌクレアーゼを用いて ATG13 のノックアウト Huh7 細胞が樹立できた。
2. ATG13 は HCV の感染性や HCV 感染によるオートファゴソームの形成には関与していない。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, and Matsuura Y. Expression of miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with HCV. *J. Virol.*, 2012, 86, 7918-7933.
- 2 Abe T, Fukuhara T, Wen X, Ninomiya A, Moriishi K, Maehara Y, Takeuchi O, Kawai T, Akira S, and Matsuura Y. CD44 participates in the IP-10 induction in cells replicating HCV RNA through an interaction with TLR2 and hyaluronan. *J. Virol.*, 2012, 86, 6159-6170.
- 3 Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. *J. Virol.* 2012, 86, 1382-1393.
- 4 Fukuhara T, and Matsuura Y. Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection. *J. Gastroenterol.*, 2012, doi:10.1007/s00535-012-0661-5.
- 5 Moriishi K, and Matsuura Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.*, 2012, 3, 54, doi:10.3389/fmicb.2012.00054.
- 6 Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, and Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology*, 2012, 432, 29-38.
- 7 Kobayashi F, Yamada S, Taguwa S, Kataoka C, Naito S, Hama Y, Tani H, Matsuura Y, and Sugahara K. Specific interaction of the envelope glycoproteins E1 and E2 with liver heparan sulfate involved in the tissue tropism infection by hepatitis C virus. *Glycoconj. J.*, 2012, 29, 211-220.
- 8 Tripathi L.P, Kambara H, Moriishi K, Morita E, Abe T, Mori Y, Chen Y.A, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28 γ Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study. *J. Proteome Res.*, 2012, 11, 3664-3679.
- 9 Kondo M, Moriishi K, Wada H, Noda T, Marubashi S, Wakasa K, Matsuura Y, Doki Y, Mori M, and Nagano H. Upregulation of nuclear PA28 γ expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Exp. Ther. Med.*, 2012, 3, 379-385.
- 10 Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, and Takehara T. Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology*, 2013 (in press).

2. 学会発表

- 1 松浦善治、C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関する宿主因子第132回日本薬学会年会、札幌、3月28-30日、2012
- 2 Yoshiharu Matsuura, Expression of miR122 and lipid metabolism determine the cell tropism of hepatitis C virus, 7th International Virus Assembly Symposium, Menorca, May, 13-17, 2012.
- 3 松浦善治、C型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略～HCVの増殖を制御する宿主側因子について～: 第48回日本肝臓学会総会、金沢、6月7-8日、2012
- 4 Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi

- Katoh, Yoshiharu Matsuura, miR122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of hepatitis C virus infection. The American Society for Virology, 31st Annual Meeting, University of Wisconsin-Madison, Madison, July 21-25, 2012.
- 5 Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of mouse liver cell lines susceptible to hepatitis C virus infection, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
 - 6 Mai Shiokawa, Takasuke Fukuhara, Chikako Ono, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of human liver-specific factors in a complete propagation of hepatitis C virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
 - 7 Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
 - 8 Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Masaru Arimoto, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura. miR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of HCV infection. 19th International Meeting on HCV and Related Viruses, Venice, October, 5-9, 2012.
 - 9 Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus, The 34th Naito Conference, 札幌, 10月16日-19日, 2012
 - 10 Yoshiharu Matsuura: Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, The 34th Naito Conference, 札幌, 10月16日-19日, 2012
 - 11 塩川 舞、福原崇介、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生に関するヒト肝臓特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 - 12 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本 徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臓細胞株の樹立、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 - 13 福原崇介、塩川 舞、小野慎子、山本聡美、寒原裕登、加藤大志、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、C型肝炎ウイルスの細胞親和性は miR-122 の発現と脂質代謝系によって規定される、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 - 14 加藤大志、岡本 徹、福原崇介、寒原裕登、森田英嗣、森 嘉生、神谷 亘、松浦善治、日本脳炎ウイルスコアタンパク質による Stress Granule 抑制機構の解析、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 - 15 松田麻未、鈴木亮介、渡士幸一、相崎英樹、松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆字、C型肝炎ウイルスの一過性感染性粒子を用いた細胞内侵入機構の解析、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 - 16 Yoshiharu Matsuura, miR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of hepatitis C virus infection: The 10th JSH Single Topic Conference, 東京, 11月21-22日, 2012.
 - 17 塩川 舞、福原崇介、小野慎子、岡本 徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生に関するヒト肝臓特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
 - 18 福原崇介、本村貴志、塩川 舞、小野慎子、寒原裕登、岡本 徹、調 憲、前原喜彦、松浦善治、C型肝炎ウイルスの細胞親和性における Quasispecies の意義、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
 - 19 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本 徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臓細胞株の樹立、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
 - 20 葛西宏威、河上國洋、平田有佳理、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、岡本 徹、松浦善治、楠木正己、森石恆司、HCV複製に

関わる新規宿主因子 FKBP6 : FKBP6 は
NS5A と結合し HCV 複製を制御する、第
35 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月
11 日-14 日, 2012

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）
研究分担報告書

HCVによるRIG-Iの機能阻害機構の解析

分担研究者 竹内 理 大阪大学微生物病研究所 准教授

研究要旨：HCVの認識に関わるRIG-Iシグナル伝達に関わるの新規分子に関し探索を行い、核内分子Akirin2がRIG-Iの下流でクロマチンリモデリングを調節しIL-6やIFN β 産生に重要である事を明らかにした。

A. 研究目的

自然免疫によるHCV認識にはRIG-I経路が重要であるが、そのシグナル分子機構の全貌は明らかでない。新規自然免疫関連分子のウイルス感染における役割の解明を目的とした。

B. 研究方法

これまで、マウス線維芽細胞においてLPSに対するIL6産生に重要なAkirin2という核内分子に着目し、マウスマクロファージを用いてウイルス感染に対する機能を解析した。

（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、個人情報に厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

マクロファージ特異的Akirin2欠損マウス由来マクロファージはLPSに対するIL6産生のみでなく、RIG-Iにより認識されるウイルス感染に対するIL-6、IFN β 産生も低下していた。また、Akirin2はRIG-I、TLRの下流でクロマチンリモデリングを調節しIL6、IFN β 遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。

D. 考察

RIG-IはHCV認識、I型IFN産生に重要であるが、そのシグナルは細胞内で精巧に調節されている。本研究により、RIG-Iシグナルを調節する新規分子を同定して今後ヒトHCV感染における機構の解明が興味深い。

E. 結論

本研究により、RIG-IによるI型IFN、IL6産生を調節する新規分子Akirin2の同定に成功した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Maruyama K, Fukasaka M, Vandenbon A, Saitoh T, Kawasaki T, Kondo T, Yokoyama KK, Kidoya H, Takakura N, Standley D, Takeuchi O, Akira S. The transcription factor Jdp2 controls bone homeostasis and antibacterial immunity by regulating osteoclast and neutrophil differentiation. *Immunity*, 2012, 37, 1024-1036.
- 2 Maruyama K, Kawagoe T, Kondo T, Akira S, Takeuchi O. TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK) is a negative regulator of osteoclastogenesis and bone formation. *JBC*, 2012, 287, 29114-29124.
- 3 Abe T, Fukuhara T, Wen X, Ninomiya A, Moriishi K, Maehara Y, Takeuchi O, Kawai T, Akira S, and Matsuura Y. CD44 participates in the IP-10 induction in cells replicating HCV RNA through an interaction with TLR2 and hyaluronan. *J. Virol.*, 2012, 86, 6159-6170.
- 4 Lee KG, Xu S, Kang ZH, Huo J, Huang M, Liu D, Takeuchi O, Akira S, Lam KP. Bruton's tyrosine kinase phosphorylates Toll-like receptor 3 to initiate antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2012, 10, 5791-5796.
- 5 Schuessler A, Funk A, Lazear HM, Cooper DA, Torres S, Daffis S, Jha BK, Kumagai Y, Takeuchi O, Hertzog P, Silverman R, Akira S,

- Barton DJ, Diamond MS, Khromykh AA. West Nile virus noncoding subgenomic RNA contributes to viral evasion of the type I interferon-mediated antiviral response. *J. Virol.*, 2012, 86, 5708-5718.
- 6 Deshmukh SD, Müller S, Hese K, Rauch KS, Wennkamp J, Takeuchi O, Akira S, Golenbock DT, Henneke P. NO is a macrophage autonomous modifier of the cytokine response to streptococcal single-stranded RNA. *J. Immunol.*, 2012, 188, 774-780.
- 7 Abe Y, Fujii K, Nagata N, Takeuchi O, Akira S, Oshiumi H., Matsumoto M., Seya T, and Koike S. The toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J. Virol.*, 2012, 86, 185-194.

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）
研究分担報告書

HCV 感染症におけるトリプトファン代謝酵素（IDO）と IFN-λ の意義

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。また、IL-28B(IFN-λ3)の遺伝子多型（SNP）が、HCV の自然排除やペグインターフェロン+リバビリン治療の効果に関与することが報告されている。HCV による免疫系攪乱の機序や IFN-λ の生物学的意義が明らかになれば、HCV 排除のための免疫制御方法を確立することが可能となる。本研究では、免疫系攪乱の責任分子としてトリプトファン分解酵素 Indoleamine-2,3-dehydrogenase (IDO)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。また IFN-λ 産生細胞としての樹状細胞（DC）の機能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。IDO 活性は肝組織炎症（A 因子）、線維化（F 因子）と正相関した。炎症性サイトカイン（TNF-α, IFN-γ など）刺激によって、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 IDO 発現が高値であった。DC に発現する IDO は制御性 T 細胞の分化誘導に関与した。患者血清中キヌレニン濃度は、末梢血での制御性 T 細胞の頻度と正相関した。BDCA3+DC は HCV を感知して多量の IFN-λ を産生し、肝細胞の ISG を誘導した。以上の結果より、HCV 感染に伴う炎症や肝線維化によって DC に機能性 IDO が発現し、制御性 T 細胞の誘導などを介して抗 HCV 免疫の抑制に関与することが示唆された。一方、BDCA3+DC は HCV 感染症における主な IFN-λ 産生細胞であり、その制御が抗 HCV 免疫の活性化に重要であ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。また、IL-28B(IFN-λ3)の遺伝子多型（SNP）が、HCV の自然排除やペグインターフェロン+リバビリン治療の効果に関与することが報告されている。HCV による免疫系攪乱の機序や IFN-λ の生物学的意義が明らかになれば、HCV 排除のための免疫制御方法を確立することが可能となる。本研究では、免疫系攪乱の責任分子としてトリプトファン分解酵素 Indoleamine-2,3-dehydrogenase (IDO) 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。また IFN-λ 産生細胞としての樹状細胞（DC）の機能を明らかに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。末梢血から DC サブセットを分離し、TLR リガンド、HCVcc、HCV-JFH-1 感染 Huh7.5.1 など刺激し、IFN-α/β、IFN-λ を ELISA で定量した。また Huh7.5.1 での ISG 誘導を定量的 PCR で評価した。

（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