

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- $\gamma$  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- $\lambda$  を、PDC は多量の IFN- $\alpha/\beta$  を産生し、いずれも肝細胞の ISG を誘導した。

#### D. 考察

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- $\lambda$  を産生する Unique な細胞であることが明らかになった。

#### E. 結論

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- $\lambda$  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- $\lambda$  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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 Higashitani K, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Matsubara T, Kakita N, Oze T, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Mita E, Imai Y, Kasahara A, Okuno A, Takikawa O, Hayashi N and Takehara T, Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol*. 2012 (in press)
- 2 Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Hayashi N, Mizokami M and Takehara T, Human BDCA3+ dendritic cells are a potent producer of IFN-I in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 2012 (in press).

- 3 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.
- 4 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.
- 5 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.

##### 2. 学会発表

- 1 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.
- 2 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-I in response to hepatitis C virus. The Liver Meeting AASLD 63rd Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA, 2012.
- 3 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.

特に予定なし

H.知的財産権の出願・登録状況

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

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ことが明らかとなった。その機構は一般にストレス顆粒形成として知られるものと一部共通である。ウイルス感染の場合ウイルスRNAが必須であり、かつストレス応答の引き金となっている。RIG-Iの凝集はミトコンドリア上に発現するアダプター分子IPS-1の凝集を引き起こすが、本年度は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。ウイルス感染による一連の凝集体形成は重要な自然免疫応答であり、その制御は抗HCVストラテジーとして重要と考えられた。

**A. 研究目的**

RNAヘリカーゼRIG-Iの活性化に端を発する一連の自然免疫応答は、HCVを含む多くのウイルスRNAの排除に重要な役割を果たしているが、細胞内にどのようにシグナルが伝達されるのかは不明であった。本研究では抗ウイルスシグナル伝達の「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**

本年度は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。

(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**

IPS-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。

**D. 考察**

以上より、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。

**E. 結論**

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。

**F. 健康危険情報**

特になし。

**G. 研究発表**

**1. 論文発表**

1. 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.
2. 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.
  3. Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Matsuda C, Yoneyama M, Fujita T, Kuge S, Yoshida M, and Kohara M, Impairment of interferon regulatory factor-3 activation by hepatitis C virus core protein basic amino acid region 1, *BBRC*, 2012, 428, 494-499.
  4. 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.
2. 学会発表
1. 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
  2. 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
  3. 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
  4. Vo DN, Kato H, Fujita T.: The anti-tumor agent DMXAA induces IFN- $\beta$  response via STING. 9. 11-14 2012 The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji
  5. 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
  6. 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
  7. 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
  8. 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
- 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

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)のヒト肝細胞における持続感染は慢性肝炎を引き起こすが、ヒト肝細胞に本来備わっている自然免疫系については全く不明であった。そこで我々が樹立した不死化肝細胞（HuS-E/2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研究をおこなった。まず、HuS-E/2細胞と初代培養ヒト肝細胞の自然免疫遺伝子発現プロフィールを比較することで、センダイウイルス(SV)感染後の各遺伝子発現が両細胞で類似していることがわかった。特に今年度の研究から、我々はインターフェロン(IFN) $\alpha$ 1遺伝子がウイルス非感染状態の両細胞で発現していることを見出した。IFN $\alpha$ 1は微量ながら mRNA の発現が検出されただけでなく、培地中にもその活性が検出された。IFN $\alpha$ 1に対する中和活性を持つ抗 IFN $\alpha$ 1抗体や IFN 受容体抗体でウイルス非感染状態の HuS-E/2 細胞を処理すると RIG-I など各種 IFN 応答関連遺伝子の発現が抑制されることがわかった。このような中和活性をもつ抗体による前処理は HuS-E/2 細胞に対するセンダイウイルス感染後の初期 IFN $\alpha$ 1, IFN $\beta$  と IFN $\lambda$  遺伝子の発現誘導は著しく抑制され、センダイウイルス感染伝播が増強された。このことからヒト肝細胞では恒常的に IFN $\alpha$ 1 が微量に産生されていて、細胞のウイルス感染に対する自然免疫機構の初期応答を上昇させていることが明らかになった。

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルスの本来の感染標的細胞であるヒト肝細胞における自然免疫システムを明らかにし、その活性化を増強することで、効果的に HCV 感染を抑制する戦略を構築すること、そしてまたその自然免疫機構を抑制する手段を開発し、患者由来 HCV が高い効率で感染増殖し、抗 HCV 薬剤等のインビトロでの評価を容易にする実験系を開発することを目的とした。

### B. 研究方法

1. 独自に開発したヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞に、感染性の高い RNA ウイルスである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の解析をおこなった。非感染時また感染後の 1 時間後から 12 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. IFN $\alpha$ 1 の活性測定は IFN $\alpha$ 1 応答配列をプロモーターに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レポーター活性を指標にして行った。

3. HuS-E/2 細胞にセンダイウイルスを感染させる時に、IFN $\alpha$ 1 に対する中和活性を持つ抗 IFN $\alpha$ 1 抗体や IFN 受容体抗体で細胞を処理して感染後の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。またセンダイウイルスの感染伝播を免疫蛍光抗体法により解析した。

（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ない。

### C. 研究結果

1. ヒト初代培養肝細胞と HuS-E/2 細胞にセンダイウイルスを感染させ、非感染時および感染後初期の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 $\alpha$ 1 の mRNA が発現していることがわかった。

2. 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 $\alpha$  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 $\alpha$  活性が存在することがわかった。

3. ウイルス非感染 HuS-E/2 細胞を IFN $\alpha$  に対する中和活性を持つ抗 IFN $\alpha$  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 IFI7 などの mRNA 量が低下した。

4. HuS-E/2 細胞に IFN $\alpha$  に対する中和活性を持つ抗 IFN $\alpha$  抗体や IFN 受容体抗体存在下でセンドイウイルスを感染させると本来著しく誘導される IFN $\beta$  や IFN1 mRNA の発現が抑制され、遅延することがわかった。

5. HuS-E/2 細胞に IFN $\alpha$  に対する中和活性を持つ抗 IFN $\alpha$  抗体や IFN 受容体抗体存在下でセンド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。

#### D. 考察

1. 今回の結果からヒト肝細胞では恒常的に IFN $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。

2. 恒常的な IFN $\alpha$  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 $\alpha$ 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。

#### E. 結論

肝細胞における IFN $\alpha$ 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。また 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。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, and Kato N, PML tumor suppressor protein is required for HCV production, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, in press
- 2 Aly H.A, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T, In vitro models for the analysis of HCV life cycle, *Microbiol. Immunol.*, 2012, 56, 1, 1-9.

##### 2. 学会発表

- 1 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.
- 2 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
- 3 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
- 4 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

- 5 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
- 6 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
- 7 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

- 8 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
- 9 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

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

制限酵素を用いた IL28B SNP の判定

分担研究者 池田正徳 岡山大学 准教授

**研究要旨** : C 型慢性肝炎は高頻度に慢性肝炎を引き起こし肝硬変、肝癌へと進行する。ペグインターフェロン／リバビリン療法やプロテアーゼ阻害剤を追加した 3 剤併用療法において、IL28B 領域の SNP が治療効果予測に有用であることが報告されている。しかしながら、SNP の違いがどのように治療効果に影響を及ぼすかについては明かにされていない。本研究では、IL28B SNP 研究のための肝細胞モデルの開発の過程で見出された新しい IL28B SNP (rs8113007) の制限効果による簡便な判定法を開発し、臨床での有用性について検討した。

**A. 研究目的**

肝細胞株の IL28B SNP (rs8099917 および rs12979860) を決定する過程で新規の IL28B SNP (rs8113007) を見出した。本年度は制限酵素を用いた肝細胞株の rs8113007 遺伝子型の判定法を開発し、rs8099917 および rs12979860 との関連性を明らかにする。また、C 型慢性肝炎患者における治療効果予測に対する rs8113007 の有用性を明らかにすることを目的とする。

**B. 研究方法**

肝細胞株における 3 種類の IL28B SNP (rs8099917、rs12979860、および rs8113007) の遺伝子型をダイレクトシーケンシング法および制限酵素法で検討した。用いた 13 種類の肝細胞株のうち 10 種類はヒト肝癌細胞株由来 (Li21、Li22、Li23、Li24、PLC/PRF/5、HepG2、HuH-6、HuH-7、HLE、及び HLF) で、3 種類は不死化ヒト肝細胞株 (PH5CH8、NKNT3 細胞および OUMS29) 由来である。3 種類の IL28B SNP の遺伝子型を明らかにするためダイレクトシーケンシング法を実施した。また、rs8099917 および rs8113007 の遺伝子型判定については制限酵素 *BsrDI* および *BpmI* 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 (461 bp) を *BsrDI* および *BpmI* 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。rs8099917 の遺伝子型は *BsrDI* による切断パターンからメジャー型 (T/T: 461bp)、マイナー型 (G/G: 229 および 230bp)、ヘテロ型 (T/G: 461、229 および 230bp) の判定が可能で

ある。rs8113007 の遺伝子型は *BpmI* による切断パターンからメジャー型 (A/A: 183 および 273bp)、マイナー型 (T/T: 461bp)、ヘテロ型 (A/T: 461、183 および 273bp) の判定が可能である。また、治療結果がわかっている 16 例の慢性 C 型肝炎患者において rs8113007、rs8099917 および rs12979860 の遺伝子型と治療結果を比較した。

(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。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。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。

**C. 研究結果**

rs8099917 および rs8113007 においてダイレクトシーケンシング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シング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な 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

#### D. 考察

昨年度に 13 種類の肝細胞株に対して rs8099917 および rs12979860 の遺伝子型を決定した。rs8099917 については制限酵素 (*BsrDI*) を用いた簡便な遺伝子型の判定法を開発し報告した。本年度は新規に見出した 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 IL28B 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。

#### E. 結論

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

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### GG. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 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.
- 2 Iikura M, Furihata T, Mizuguchi M, Nagai M, Ikeda M, Kato N, Tsubota A, and Chiba K. ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, 56, 1407-1413.
- 3 Takeshita S, Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H, Matsuzaki T, Otani M, Muraoka T, Akiyama M, Miuma S, Ozawa E, Ikeda M, Kato N, Isomoto H, Tkashima F, and Nakao K, Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells. *J Gastroenterol*, 2012, 47, 195-202.
- 4 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.
- 5 Yamashita A, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, and Moriishi K, Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Mar. Drugs*, 2012, 10, 744-761.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ,

Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, and Moriishi K. Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis 1 C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Amphimedon* sp. PLoS One, 2012, 7:e48685.

## 2. 学会発表

- 1 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆宇、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.
- 2 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
- 3 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆宇、加藤 宣之 2 種類の肝細胞株(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
- 4 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆宇、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
- 5 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
- 6 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
- 7 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
- 8 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
- 9 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
- 10 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
- 11 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
- 12 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
- 13 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
- 14 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
- 15 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
- 16 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
- 17 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
- 18 Takeda M, Ikeda M, Airumi 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
- 19 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
- 20 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
- 21 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

## Ⅱ. 知的所有権の出願・登録状況

- 1.特許取得  
特願 2011-099087 号、HCV 治療効果予測マーカー
- 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）  
研究分担報告書

polyIC 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 東京都医学総合研究所 プロジェクトリーダー

**研究要旨：**肝臓特異的 DDS であるカチオニックリポソームの複合体（polyIC-LIC）が、ヒト肝臓において IFN $\beta$  でなく IFN $\lambda$  を強力に誘導し抗 HCV 効果を示すことを報告した。しかし、IFN $\lambda$  と IFN $\beta$  が自然免疫においてどのような役割を果たしているかは明らかでない。そこで、ウイルス感染及び pIC-LIC 投与時の IFN $\lambda$ 、IFN $\beta$  の応答を in vivo, in vitro において評価した。

#### A. 研究目的

ウイルス感染及び pIC-LIC 投与時の IFN $\lambda$ /IFN $\beta$  の応答を in vivo, in vitro において評価した。さらに、in vitro の実験系によりその誘導メカニズムを明らかにすることを試みた。

#### B. 研究方法

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 $\lambda$ 、IFN $\beta$  の発現量の変化を評価した。また、肝臓由来の HepG2、肺由来の MRC5、及び腎臓由来の HEK293T での pIC-LIC 投与時の IFN $\lambda$ 、IFN $\beta$  の応答を評価した。

（倫理面への配慮）

研究所倫理規定に従ってすすめた。

#### C. 研究結果

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 $\lambda$  が IFN $\beta$  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 $\lambda$  が誘導されるのに対し、MRC5、HEK293T では IFN $\beta$  が優位に誘導された。

#### D. 考察

ヒト肝細胞での自然免疫応答において IFN- $\lambda$  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。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 Saito M, Kohara M, Kasama Y, and Tsukiyama-Kohara K, Hepatitis C virus induces overexpression of 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 24-reductase through Sp1. J. Med. Virol., 2012, 84, 733-746.
- 2 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.
- 3 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.

- 4 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.

## 2. 学会発表

Hirata Y., et al: Self-enhancement of Hepatitis C Virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. 19<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2012.10.4-11. Venice (Italy)

## 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

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

分担研究者 瀬谷 司 北海道大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

**研究要旨** : HCV genome の RIG-I 認識に必須のユビキチンリガーゼ Riplet が NS3/4A の基質として分解を受けるために IFN 応答が減弱することを解明した。IFN-I も Riplet に依存する。これらの因子の抗 HCV 活性をヒト細胞培養系とマウスモデルで検討した。

### A. 研究目的

HCV による自然免疫や獲得免疫の回避機構を解明し、慢性 C 型肝炎患者からウイルスを排除する新規抗 HCV 療法の開発を目的とする。

### B. 研究方法

MyD88<sup>-/-</sup>, TICAM-1<sup>-/-</sup>, IPS-1<sup>-/-</sup>, IRF-3<sup>-/-</sup>, IRF-7<sup>-/-</sup>, IFNAR<sup>-/-</sup>の各種 KO マウスから不死化肝細胞株を SV40 を用いて樹立した。HCV replicon の複製を許す細胞株を抽出し、hCD81 など HCV 受容体を遺伝子導入で発現させた。Riplet, DDX60 は RIG-I と結合する分子として yeast two-hybrid 法で抽出した。これらの KO マウスも作製中である。Cross-priming や NK 活性化因子は既報に従って抽出した。IFN-I はマウス培養細胞と hydrodynamics の手法を用いて産生を解析した。樹状細胞への遺伝子導入は lentivirus の系を使った。

（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

1. 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。
2. 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。

### D. 考察

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との共培養の系で 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必要がある。

### E. 結論

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 Abe Y, Fujii K, Nagata N, Takeuchi O, Akira S, Oshiumi H, Matsumoto M, Seiya T, and Koike S, 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.
- 2 Azuma M, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, and Seiya 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.*, 2011, 1, 581-592.
- 3 Shime H, Matsumoto M, Oshiumi H, Tanaka S, Nakane A, Iwakura Y, Tahara H, Inoue N, and Seiya T, TLR3/TICAM-1 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2012, 109, 2066-2071.
- 4 Toscano F, Estornes Y, Virard F, Garcia-Cattaneo A, Pierrot A, Vanbervliet B, Funami K, Seiya T, Matsumoto M, Pin J.J, Renno T, and Lebecque K, Cleavage of TLR3 by cathepsins generates two fragments that remain associated to form a functional receptor. *J. Immunol.*, 2013, 190, 764-773.
- 5 Yamazaki S, Maruyama A, Okada K, Matsumoto M, Morita A, and Seiya T, Dendritic cells from oral cavity induce Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells upon antigen stimulation. *PLoS ONE*, 2012, 7(12), e51665.
- 6 Tatematsu, M., F. Nishikawa, T. Seiya, M. Matsumoto. 2013. Toll-like receptor 3 recognizes single-stranded RNA with incomplete stem structures. *Nat Commun.* (in press).
- 7 Aly H.H, Shimotohno K, Hijikata M, and Seiya T, Toward establishment of in vitro systems for analysis of HCV life cycle. *Microbiol. Immunol.*, 2011, 56, 1-9.
- 8 Oshiumi H, Matsumoto M, and Seiya T, Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J. Biochem. (Tokyo)*, 2012, 151, 5-11.
- 9 Seiya T, Shime H, and Matsumoto M, TAMable tumor-associated macrophages in response to innate RNA sensing. *Oncoimmunol.*, 2012, 1, 1000-1001.
- 10 Seiya 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.
- 11 Oshiumi H, Funami K, Aly H.H, Matsumoto M, and Seiya T, Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus. *Arch. Immunol. Therap. Exp.*, 2013 (in press).
- 12 Seiya T, Azuma M, and Matsumoto M, Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Exp. Opin. Target. Therap.*, 2013 (in press).

### 2. 学会発表

## H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍  
無し

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
Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, and <u>Matsuura Y.</u>	Expression of miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with HCV.	J.Virol.	86	7918-7933	2012
Abe T, Fukuhara T, Wen X, Ninomiya A, Moriishi K, Maehara Y, Takeuchi O, Kawai T, Akira S, and <u>Matsuura Y.</u>	CD44 participates in the IP-10 induction in cells replicating HCV RNA through an interaction with TLR2 and hyaluronan.	J.Virol.	86	6159-6170	2012
Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and <u>Matsuura Y.</u>	Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122.	J.Virol.	86	1382-1393	2012
Fukuhara T, and <u>Matsuura Y.</u>	Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection.	J. Gastroenterol.		doi:10.1007/s00535-012-0661-5	2012
Moriishi K, and <u>Matsuura Y.</u>	Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection.	Front. Microbiol.	12	doi:10.3389/fmicb.2012.00054	2012
Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, <u>Matsuura Y.</u> , 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	432	29-38	2012
Maruyama K, Fukasaka M, Vandenberg 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	37	1024-1036	2012
Maruyama K, Kawagoe T, Kondo T, Akira S, <u>Takeuchi O.</u>	TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator (TANK) is a negative regulator of osteoclastogenesis and bone formation.	J.B.C.	287	29114-29124	2012
<u>Kanto T.</u> , Inoue M, Oze T, Miyazaki M, Sakakibara M, Kakita N, Matsubara T,	Dynamics of regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells as immune markers for	J. Gastroenterol.	47	169-178	2012



Higashitani K, Hagiwara H, Iio S, Katayama K, Mita E, Kasahara A, Hiramatsu N, Takehara T and Hayashi N.	virological response in pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients.				
Kakita N, <u>Kanto T</u> , 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.	130	2573-2583	2012
Tsunematsu H, Tatsumi T, Kohga K, Yamamoto M, Aketa H, Miyagi T, Hosui A, Hiramatsu N, <u>Kanto T</u> , Hayashi N and Takehara T.	Fibroblast growth factor-2 enhances NK sensitivity of hepatocellular carcinoma cells.	Int. J. Cancer.	130	356-364	2012
Takamatsu S, Onoguchi K, Onomoto K, Narita R, Takahasi K, Ishidate F, Fujiwara TK, Yoneyama M, Kato H, and <u>Fujita T</u> .	Functional Characterization of Domains of IPS-1 Using an Inducible Oligomerization System.	PLoS ONE	8	e53578	2012
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, <u>Fujita T</u> , and Watanabe M.	Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity.	Hepatology	57	46-58	2012
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 <u>Fujita T</u> .	Critical Role of an Antiviral Stress Granule Containing RIG-I and PKR in Viral Detection and Innate Immunity.	PLoS ONE	7	e43031	2012
Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, <u>Ikeda M</u> , and Kato N.	Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C.	Virus Genes	44	74-381	2012
Takeda M, <u>Ikeda M</u> , 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.	93	1422-1431	2012
Sejima H, Mori K, Ariumi Y, <u>Ikeda M</u> , and Kato N.	Identification of host genes showing differential expression profiles with cwl-based long-term replication of hepatitis C virus RNA	Virus Res.	167	74-85	2012
Takeda M, <u>Ikeda M</u> , Mori K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, and	Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication.	FEBS Open Bio.	2	279-283	2012

Kato N.					
T Hirata Y, Ikeda K, Sudoh M, Suzuki A, Nishijima M, Taguchi R, and <u>Kohara M.</u>	Self-enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis.	PLoS Pathog.	8	e1002860	2012
Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Matsuda C, Yoneyama M, Fujita T, and <u>Kohara M.</u>	Impairment of interferon regulatory factor-1 3 activation by hepatitis C virus core protein basic region 1.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	428	494-499	2012
Sekiguchi S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F, Matsushima K, and <u>Kohara M.</u>	Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver.	PLoS ONE	7	e51656	2012
Azuma M, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, and <u>Seya T.</u>	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.	1	581-592	2012
Shime H, Matsumoto M, Oshiumi H, Tanaka S, Nakane A, Iwakura Y, Tahara H, Inoue N, and <u>Seya T.</u>	Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors.	Proc Natl Acad Sci USA.	109	2066-2071	2012
Yamazaki S, Maruyama A, Okada K, Matsumoto M, Morita A, and <u>Seya T.</u>	Dendritic cells from oral cavity induce Foxp3 <sup>+</sup> regulatory T cells upon antigen stimulation.	PLoS ONE	7	e51665	2012
Aly H.H, Shimotohno K, Hijikata M, and <u>Seya T.</u>	In vitro models for analysis of the Hepatitis C virus life cycle.	Microbiol. Immunol.	56	1-9	2012
Oshiumi H, Matsumoto M, and <u>Seya T.</u>	Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I.	J. Biochem. (Tokyo)	151	5-11	2012
<u>Seya T.</u> , Shime H, and Matsumoto M.	TAMable tumor-associated macrophages in response to innate RNA sensing.	Oncoimmunol.	1	1000-1001	2012
<u>Seya T.</u> , Shime H, Takaki H, Azuma M, Oshiumi H, and Matsumoto M.	TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis.	Oncoimmunol.	1	917-923	2012

# Expression of MicroRNA miR-122 Facilitates an Efficient Replication in Nonhepatic Cells upon Infection with Hepatitis C Virus

Takasuke Fukuhara,<sup>a</sup> Hiroto Kambara,<sup>a</sup> Mai Shiokawa,<sup>a</sup> Chikako Ono,<sup>a</sup> Hiroshi Katoh,<sup>a</sup> Eiji Morita,<sup>a</sup> Daisuke Okuzaki,<sup>b</sup> Yoshihiko Maehara,<sup>c</sup> Kazuhiko Koike,<sup>d</sup> and Yoshiharu Matsuura<sup>a</sup>

Department of Molecular Virology<sup>a</sup> and DNA-Chip Developmental Center for Infectious Diseases,<sup>b</sup> Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan; Department of Surgery and Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan<sup>c</sup>; and Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan<sup>d</sup>

Hepatitis C virus (HCV) is one of the most common etiologic agents of chronic liver diseases, including liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In addition, HCV infection is often associated with extrahepatic manifestations (EHM), including mixed cryoglobulinemia and non-Hodgkin's lymphoma. However, the mechanisms of cell tropism of HCV and HCV-induced EHM remain elusive, because *in vitro* propagation of HCV has been limited in the combination of cell culture-adapted HCV (HCVcc) and several hepatic cell lines. Recently, a liver-specific microRNA called miR-122 was shown to facilitate the efficient propagation of HCVcc in several hepatic cell lines. In this study, we evaluated the importance of miR-122 on the replication of HCV in nonhepatic cells. Among the nonhepatic cell lines expressing functional HCV entry receptors, Hec1B cells derived from human uterus exhibited a low level of replication of the HCV genome upon infection with HCVcc. Exogenous expression of miR-122 in several cells facilitates efficient viral replication but not production of infectious particles, probably due to the lack of hepatocytic lipid metabolism. Furthermore, expression of mutant miR-122 carrying a substitution in a seed domain was required for efficient replication of mutant HCVcc carrying complementary substitutions in miR-122-binding sites, suggesting that specific interaction between miR-122 and HCV RNA is essential for the enhancement of viral replication. In conclusion, although miR-122 facilitates efficient viral replication in nonhepatic cells, factors other than miR-122, which are most likely specific to hepatocytes, are required for HCV assembly.

More than 170 million individuals worldwide are infected with hepatitis C virus (HCV), and cirrhosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV infection are life-threatening diseases (57). Although therapy combining pegylated interferon (IFN) and ribavirin has achieved a sustained virological response in 50% of individuals infected with HCV genotype 1 (37), a more effective therapeutic modality for HCV infection is needed (46). The establishment of *in vivo* and *in vitro* infection systems has been hampered by the narrow host range and tissue tropism of HCV. Although the chimpanzee is the only experimental animal susceptible to HCV infection, it is difficult to use the chimpanzee in experiments due to ethical concerns (3). Furthermore, robust *in vitro* HCV propagation is limited to the combination of cell culture-adapted clones based on the genotype 2a JFH1 strain (HCVcc) and human hepatoma cell lines, including Huh7, Hep3B, and HepG2 (29, 43, 62).

It is well-known that HCV mainly infects hepatocytes. However, the precise mechanism underlying the liver tropism of HCV has not been clarified. Chronic hepatitis C virus infection is often associated with at least one extrahepatic manifestation (EHM), including mixed cryoglobulinemia, non-Hodgkin's lymphoma, lichen planus, thyroiditis, diabetes mellitus, Sjögren syndrome, and arthritis (19). EHMs are frequently more serious than hepatic disease in some patients and sometimes occur even in patients with persistently normal liver functions (19). Mixed cryoglobulinemia is the most-well-characterized HCV-associated disease and is curable by viral clearance through antiviral therapies (6). Although replication of HCV RNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and neuronal cells at a low level was suggested (64), the biological significance of the extrahepatic replication of

HCV, particularly in the development of EHMs, is not well understood.

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs consisting of 20 to 25 nucleotides that modulate gene expression in plants and animals (1, 24). Most miRNAs negatively regulate translation through the interaction with the 3' untranslated region (UTR) of mRNA in a sequence-specific manner. miRNA 122 (miR-122) is liver specific, is the most abundantly expressed miRNA in the liver, and represses the translation of several mRNAs (5, 7). Jopling et al. reported for the first time that the inhibition of miR-122 dramatically decreased RNA replication in HCV subgenomic replicon (SGR) cells (28). In addition, several reports revealed that a specific interaction between the seed domain of miR-122 and the complementary sequences in the 5' UTR of HCV RNA is essential for the enhancement of translation and replication of the HCV genome (21, 25, 27, 36). Endogenous expression levels of miR-122 are significantly higher in Huh7 cells than in other hepatic and nonhepatic cell lines (Fig. 1). In addition, previous reports showed that miR-122 expression enhanced the replication of SGR RNA in human embryonic kidney 293 (HEK293) cells and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (8, 35). Furthermore, it was recently shown that exogenous expression of miR-122 facilitates the efficient propagation of HCVcc in Hep3B and HepG2 cells, which are

Received 4 March 2012 Accepted 10 May 2012

Published ahead of print 16 May 2012

Address correspondence to Yoshiharu Matsuura, matsuuura@biken.osaka-u.ac.jp.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.00567-12

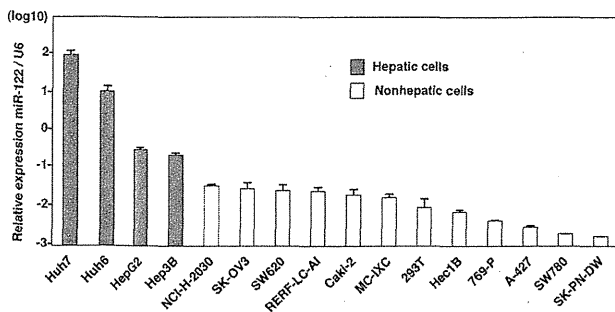


FIG 1 Endogenous expression levels of miR-122 in hepatic and nonhepatic cells. Total miRNAs were extracted from Huh7, Huh6, HepG2, Hep3B, NCI-H-2030, SK-OV3, SW620, RERF-LC-AI, Caki-2, MC-IXC, 293T, Hec1B, 769-P, A-427, SW780, and SK-PN-DW cells, and the expression levels of miR-122 were determined by qRT-PCR.

nonpermissive for HCVcc propagation (29, 43). These results suggest that the high susceptibility of Huh7 cells to the propagation of HCVcc is attributable to the high expression level of miR-122 and raise the possibility of expanding the HCV host range through the exogenous expression of miR-122 in nonhepatic cells.

In this study, we assessed the effect of miR-122 expression on the replication of HCVcc and SGR RNA in several nonhepatic cell lines. Although the exogenous expression of miR-122 in the cell lines facilitates significant RNA replication through a gene-specific interaction between miR-122 and 5' UTR of HCV RNA, no infectivity was detected in either the cells or the culture supernatants. The current study suggests that the expression of miR-122 plays an important role in HCV cell tropism, as well as in the possible involvement of nonhepatic cells in EHM, through an incomplete propagation of HCV.

## MATERIALS AND METHODS

**NextBio Body Atlas.** The NextBio Body Atlas application presents an aggregated analysis of gene expression across various normal tissues, normal cell types, and cancer cell lines. It enables us to investigate the expression of individual genes as well as gene sets. Samples for Body Atlas data are obtained from publicly available studies that are internally curated, annotated, and processed (31). Body Atlas measurements are generated from all available RNA expression studies that used Affymetrix U133 Plus or U133A Genechip arrays for human studies. The results corresponding to 128 human tissue samples were incorporated from 1,067 arrays, the results corresponding to 157 human cell types were incorporated from 1,474 arrays, and the results corresponding to 359 human cancer cell lines were incorporated from 376 arrays. Gene queries return a list of relevant tissues or cell types rank ordered by absolute gene expression and grouped by body systems or across all body systems. In the current analysis, we screened for nonhepatic cell lines expressing HCV receptor candidates, including CD81, SR-BI, claudin1 (CLDN1), and occludin (OCLN), or very-low-density lipoprotein (VLDL)-associated proteins, including apolipoprotein E (ApoE), ApoB, and microsomal triglyceride transfer protein (MTTP). A detailed analysis protocol developed by NextBio was described previously (31). The raw data used in this application are derived from the GSK Cancer Cell Line data deposited at the National Cancer Institute website (<https://array.nci.nih.gov/caarray/project/woost-00041>) and additionally from NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) accession number GSE5720 for cell lines SK-OV-3 and SW620.

**Sample collection and RNA extraction for microarray analysis.** Total RNAs extracted from cells were purified by using a miRNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's protocol. Eluted RNAs were quantified using a Nanodrop ND-1000 (version 3.5.2) spec-

trophotometer (Thermo Scientific, Wartham, MA). RNA integrity was evaluated using the RNA 6000 LabChip kit and bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Each RNA that had an RNA integrity number (RIN) greater than 9.0 was used for the microarray experiments.

**Microarray experiment.** Expression profiling was generated using the 4 × 44K whole-human-genome oligonucleotide microarray (version 2.0) G4845A (Agilent Technologies). Each microarray uses 44,495 probes to interrogate 27,958 Entrez gene RNAs. One hundred nanograms of total RNA was reverse transcribed into double-stranded cDNAs by AffinityScript multiple-temperature reverse transcriptase and amplified for 2 h at 40°C. The resulting cDNAs were subsequently used for *in vitro* transcription by the T7 polymerase and labeled with cyanine-3-labeled cytosine triphosphate (Perkin Elmer, Waltham, MA) for 2 h at 40°C using a low-input Quick-Amp labeling kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's protocol. After labeling, the rates of dye incorporation and quantification were measured with a Nanodrop ND-1000 (version 3.5.2) spectrophotometer (Thermo Scientific), and then the cRNAs were fragmented for 30 min at 60°C in the dark. Differentially labeled samples of 1,650 ng of cRNA were hybridized on Agilent 4 × 44K whole-genome arrays (version 2.0; 026652; Agilent Design) at 65°C for 17 h with rotation in the dark. Hybridization was performed using a gene expression hybridization kit (Agilent Technologies) following the manufacturer's instructions. After washing in gene expression washing buffer, each slide was scanned with the Agilent microarray scanner G2505C. Feature extraction software (version 10.5.1.1) employing defaults for all parameters was used to convert the images into gene expression data. Raw data were imported into a Subio platform (version 1.12) for database management and quality control. Raw intensity data were normalized against GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) expression levels for further analysis. These raw data have been accepted by GEO (a public repository for microarray data aimed at storing minimum information about microarray experiments [MIAME]).

**Plasmids.** The cDNA clones of wild-type (WT) and mutant (MT) pri-miR-122 and *Aequorea coerulescens* green fluorescent protein (AcGFP) were inserted between the XhoI and XbaI sites of lentiviral vector pCSII-EF-RfA, which was kindly provided by M. Hijikata, and the resulting plasmids were designated pCSII-EF-WT-miR-122, pCSII-EF-MT-miR-122, and pCSII-EF-AcGFP, respectively. Plasmids pHH-JFH1 and pSGR-JFH1, which encode full-length and subgenomic cDNA of the JFH1 strain, respectively, were kindly provided by T. Wakita. pHH-JFH1-E2p7NS2mt contains three adaptive mutations in pHH-JFH1 (53). pHH-JFH1-M1 and pHH-JFH1-M2 were established by the introduction of a point mutation of nucleotide 26 located in site 1 and nucleotide 41 in site 2 of the 5' UTR of the JFH1 cDNA construct pHH-JFH1. pSGR-Con1, which encodes SGR of the Con1 strain, was kindly provided by R. Bartenschlager. The complementary sequences of miR-122 were introduced into the multicloning site of the pmirGLO vector (Promega, Madison, WI), and the resulting plasmid was designated pmirGLO-compl-miR-122. The plasmids used in this study were confirmed by sequencing with an ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Tokyo, Japan).

**Cell lines.** All cell lines were cultured at 37°C under the conditions of a humidified atmosphere and 5% CO<sub>2</sub>. The following cells were maintained in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 10% fetal calf serum (FCS): human hepatocellular carcinoma-derived Huh7, Hep3B, and HepG2; embryonic kidney-derived HEK293 and 293T; lung-derived RERF-LC-AI, NCI-H-2030, and A-427; kidney-derived Caki-2 and 769-P; neuron-derived MC-IXC and SK-PN-DW; uterus-derived Hec1B; ovary-derived SK-OV3; colon-derived SW620; and urinary bladder-derived SW780 cells. RERF-LC-AI (RCB0444) cells were provided by the RIKEN BRC through the National Bio-Resource Project of MEXT, Japan. Hec1B (JCRB1193) cells were obtained from the JCRB Cell Bank. NCI-H-2030, A-427, Caki-2, 769-P, MC-IXC, SK-PN-DW, SK-OV3, and SW780 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). SW620 cells were kindly provided by C.