

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究
分担研究報告書（平成25年度）

免疫学的手法を用いたマウスモデルの改良、B型肝炎が起きる
マウスモデルの作製に関する研究

研究分担者 瀬谷 司 北海道大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 自然免疫特にインターフェロン誘導系の活性化によるB型肝炎ウイルス（HBV）排除の機構に関与する因子を探索する。IFN誘導性遺伝子の網羅的解析からHBV感受性を高めるIRF-3下流遺伝子を同定し、機能解析を施行している。

A. 研究目的

HBVはMAVS(IPS-1)RNA認識経路でなく、STING-TBK1経路でI型インターフェロン(IFN)を誘導し、肝実質細胞のHBV感受性を下げる(Leong et al., submitted)。持続性B型肝炎もIFNの誘導性と関連する可能性がある。本研究はHBV感染から複製に至るHBVライフサイクルを肝細胞において阻害するIFN誘導経路の分子を同定することを目的とした。HBVの自然免疫に関する報告は乏しいので、申請分担者らは2つの系でHBV自然免疫系の解析を行う。1. ヒト肝細胞HBV培養系を使ってHBV複製阻害に関与するIFN誘導分子を同定しその基本機能を調べる。2. 核酸認識経路のKOマウスとその肝細胞株を使ってHBVの制御に関連する自然免疫因子のin vivo活性を同定する。

B. 研究方法

Hydrodynamics実験により、各種KOマウスのうち、IRF-3/7-/-、IFNAR-/-のKOマウスがHBV複製を助長した。この系でIFN誘導因子のどれがHBV複製阻害に直接関与するかを検討した。ヒト肝細胞株HepG2とその持続感染株は茶山研より恵与を受けた。この系で各種IFN誘導因子をKDまたは強制発現し、HBV複製効率を査定した。

(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

HBV plasmidのマウス肝細胞株へのtransfection、マウス個体を用いたhydrodynamicsの両方でISG20がHBVの複製阻害に働くことが証明できた。

一方、ISG20はIPS-1、TICAM-1のどちらでも発現上昇し、IRF-3依存性であったが、HBV複製阻害はこれらに依存せずIFNARによるISG20発現上昇に依存した。感染阻害作用は強く見られ、ヒト臨床の関節報告と一致した。

DNA transfectionの際type I IFNが誘導されるが、大部分はSTING-TBK1の経路に依存した。この際のIFN誘導因子は未報告の因子であった。この分子をヒト肝細胞でKD、強制発現するとHBVは期待通り複製上昇と抑制がそれぞれ見られた。

以上からIFNARがHBV感染阻害の鍵経路であるのはISG20を誘導するためと判明した。これとは別にHBVが肝細胞で複製すればDNA依存性に別のIFN誘導因子が誘導され、それがHBV複製阻害を誘起して感染防御に働くことが示唆された。

D. 考察

本研究でHBV感染は2つのエフェクター因子をIFN誘導に関連して誘導し、これらがHBV鎮静に機能することが示唆された。一つはIFNAR活性化による複製阻害で、これはISG20によって起動することが証明された。一方、DNAで起きるIFN誘導因子の中にもHBV抑制に働く因子があることが判明した。この因子のHBV阻害機構を現在調べている。本研究の成果はDNAウイルスでありながらRNAのphaseもとるHBVについて既報のウイルス抑制経路以外が複製抑制のエフェクターを起動することを細胞レベルで初めて明らかにした。

In vivoのhydrodynamicsの系でもこのことが証明できた。従って、ヒト培養系の知見はマウスモデルでも妥当な知見となることが予測された。次年度に向けてこれらエフェクターによるHBV阻害機構を解明する予定である。

E. 結論

HBV複製阻害の実行因子としてDNA認識のIFN誘導経路と、IFNAR経路からそれぞれ新規のHBV複製阻害因子を同定した。In vivoマウス肝細胞でも同様の知見を得た。これらの分子のウイルス抑制機能を同定している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seiya T. IPS-1 Is Essential for Type III IFN Production by Hepatocytes and Dendritic Cells in Response to Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol*. 2014 Feb 14. [Epub ahead of print]
- Tatematsu M, Seiya T, Matsumoto M. Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses. *Biochem J*. 2014 Mar 1;458(2):195-201.
- Suzuki T, Oshiumi H, Miyashita M, Aly HH, Matsumoto M, Seiya T. Cell type-specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA. *PLoS One*. 2013 Dec 9;8(12):e83639.
- Enokizono Y, Kumeta H, Funami K, Horiuchi M, Sarmiento J, Yamashita K, Standley DM, Matsumoto M, Seiya T, Inagaki F. Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor

molecules involved in interferon signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 3;110(49):19908-13.

- Takaki H, Honda K, Atarashi K, Kobayashi F, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Shingai M, Seiya T. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon β -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Immunol*. 2014 Feb;57(2):100-10.
- Takaki H, Takeda M, Tahara M, Shingai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seiya T. The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I IFN production against measles virus in a mouse infection model. *J Immunol*. 2013 Nov 1;191(9):4740-7.
- Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, Seiya T. A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003533.
- Tanaka Y, Suenaga T, Matsumoto M, Seiya T, Arase H. Herpesvirus 6 glycoproteins B (gB), gH, gL, and gQ are necessary and sufficient for cell-to-cell fusion. *J Virol*. 2013 Oct;87(19):10900-3.
- Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seiya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells. *J Virol*. 2013 Jul;87(14):8169-78.
- Tatematsu M, Nishikawa F, Seiya T, Matsumoto M. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat Commun*. 2013;4:1833.
- Seiya T, Azuma M, Matsumoto M. Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2013 May;17(5):533-44.
- Oshiumi H, Funami K, Aly HH, Matsumoto M, Seiya T. Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013 Apr;61(2):127-38.
- Toscano F, Estomes Y, Virard F, Garcia-Cattaneo A, Pierrot A, Vanbervliet B, Bonnin M, Ciancanelli MJ, Zhang SY, Funami K, Seiya T, Matsumoto M, Pin JJ, Casanova JL, Renno T, Lebecque S. Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor. *J Immunol*. 2013 Jan 15;190(2):764-73.

G. 知的所有権の出願・取得状況

- 特許取得 実用新案登録 その他
なし

