

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服実用化研究事業
(B型肝炎創薬実用化等研究事業)
分担研究報告書 (平成26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 志馬寛明 北海道大学大学院医学研究科 助教
研究協力者 瀬谷司 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

B型肝炎ウイルス (HBV) 排除に肝細胞のインターフェロン誘導系、特に IRF-3/7 と IFNAR が重要と判明した。IFN-inducible genes の中から HBV 複製阻害因子を網羅的に探索したところ、細胞質内エクソヌクレアーゼの ISG20 が HBV 複製阻害に最も有効と分かった。ISG20 の HBV 抑制機構を調べている。

A. 研究目的

HBV はI型インターフェロン (IFN) が奏効する肝炎を誘起して肝硬変・肝がんになる。本研究はHBV感染とIFN経路を含む自然免疫のHBV応答に関するものである。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RNA、DNAウイルス認識に関与する経路のHBV応答を調べる。2. RNA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を同定する。

B. 研究方法

HBVに感受性のIFNAR欠損マウス肝細胞株は当研究室のHussein が樹立した。IFNAR^{-/-}マウスにHBV plasmids (茶山先生より恵与) をHydrodynamic injection するin vivo系とヒトHepG2細胞株 (またはNTCP発現株) をHBV感染させる細胞培養系を用いた。ISG20は当研究室でcDNAクローニングして発現ベクターに組み込んだ。Northern, southern 解析は既報に拠った。

(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

IFNAR欠損マウス肝細胞株でIFN-inducible genes のHBV複製阻害活性を評価した。2つの遺伝子に強いHBVs産生阻害活性があった。IFNAR^{-/-}マウスのHBV plasmid増幅系でIFN-inducible genes のHBV抑制活性を検証したところ、その中の1つ、ISG20にin vivoのHBV増幅阻害活性を再現できた。RNAiによるISG20

の阻害実験でもpolyI:CなどによるHBVの産生抑制がISG20に依ると判明した。ISG20は過剰発現でHBVのRNAを分解したが、肝細胞由来のRNAは分解しなかった。また、HBV plasmid のDNAも殆ど分解しなかった。HBV RNAから産生されるゲノムDNAは減少した。以上からISG20はウイルスRNAに特異的なエクソヌクレアーゼと判明した。HBVがIFN投与で改善する理由の1つはISG20がHBVのpgRNA, mRNAを積極的に分解するためである。

D. 考察

Takaokaらの最近の論文ではRIG-IがHBVのpgRNAのε stem鎖を認識してIFN-λを発現誘導させることがHBVの排除に重要だとしている。この場合、HBV DNAではなくRNAがRIG-I sensorで検知される結果IFN誘導とIFN-inducible genesが発現することになる。我々の検討ではIFN-λもISG20を誘導するので、(マウス肝細胞と違いヒト細胞では) RIG-IがHBVを認識する可能性はありうる。しかし、RIG-IがpgRNAを認識するなら、pgRNAはISG20などを回避して安定に存在する必要がある。

我々の別の結果はHBVのDNA polymerase がMAVS経路のIFN誘導を強く阻害することを示唆した。ISG20が宿主RNAを分解せずpgRNAを分解し易いことを考慮すると、HBVのRNAではなくDNAがRIG-I/MAVS経路を活性化してIFNを産生誘導し、ISG20の発現上昇とRNA分解を起こしているかもしれない。これらは今後の検討課題である。

ISG20が常に活性型でRNAを分解する活性を持つのか、どのようにウイルスRNAだけを識別して分解するのか、細胞質内で如何なる分子会合を作って機能発揮するのか、等の解決すべき問題を残すが、本研究はHBVの自然免疫はISG20というエフェクター分子の活性化を目指すことを検証した。ISG20はRNaseLと異なり、HBV RNAのみを標的とする。

ISG20を活性化する（または発現上昇させる）低分子化合物の探索はHBV創薬に重要な主題となりうる。

E. 結論

ISG20はIFN誘導性に産生され、HBV RNAを標的として、これらを分解することでウイルスの増殖を阻害することを検証した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takaki, H., K. Honda, K. Atarashi, F. Kobayashi, T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, M. Shingai, and T. Seya. 2014. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon β -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Molec. Immunol.* 57: 100-110.
2. Shime, H., A. Kojima, A. Maruyama, Y. Saito, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor models. *J. Innate Immun.* 6: 293-305.
3. Okamoto, M., H. Oshiumi, M. Azuma, N. Kato, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. IPS-1 is essential for type III IFN production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* 192: 2770-2777.
4. Kasamatsu, J., M. Azuma, H. Oshiumi, Y. Morioka, M. Okabe, T. Ebihara, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. INAM Plays a Critical Role in IFN- γ Production by NK Cells Interacting with Polyinosinic-Polycytidylic Acid-Stimulated Accessory Cells. *J. Immunol.* 193: 5199-207.
5. Ishii, N., K. Funami, M. Tatematsu, T. Seya, and M. Matsumoto. 2014. Endosomal Localization of TLR8 Confers Distinctive Proteolytic Processing on Human Myeloid Cells. *J. Immunol.* 193: 5118-28.
6. Nakai, M., T. Seya, M. Matsumoto, K. Shimotohno, N. Sakamoto, and H. H Aly. 2014. The J6JFH1 strain of hepatitis C virus infects human B-cells with low replication efficacy. *Viral Immunol.* 27: 285-294.
7. Kumeta H, H. Sakakibara, Y. Enokizono, K. Ogura, M. Horiuchi, M. Matsumoto, T. Seya, and F. Inagaki. 2014. The N-terminal domain of TIR domain-containing adaptor molecule-1, TICAM-1. *J Biomol NMR.* 58: 227-230.
8. Takaki, H., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. Dendritic cell subsets involved in type I IFN induction in mouse measles virus infection models. *Int J Biochem Cell Biol.* 53C: 329-333.

9. Tatematsu, M., T. Seya, and M. Matsumoto. 2014. Beyond double-stranded RNA: TLR3 signaling in RNA-induced immune responses. *Biochem. J.* 458: 195-201.

10. Seya, T. 2014. Measles virus takes a two-pronged attack on PP1. *Cell Host Microbe.* 16: 1-2.

11. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tatematsu, M. Azuma, and T. Seya. 2014. Assessment of the Toll-like receptor 3 pathway in endosomal signaling. *Methods. Enzymol.* 535: 149-165.

12. Leong, C. R., H. Oshiumi, M. Okamoto, M. Azuma, H Takaki, M. Matsumoto, K.Chayama, and T. Seya. 2015. A MAVS/TICAM-1-Independent Interferon-Inducing Pathway Contributes to Regulation of Hepatitis B Virus Replication in the Mouse Hydrodynamic Injection Model. *J. Innate Immun.* 7: 47-58.

13. Kasamatsu, J., S. Takahashi, M. Azuma, M. Matsumoto, A. Morii-Sakai, M. Imamura, T. Teshima, A. Takahashi, Y. Hirohashi, T. Torigoe, N. Sato, and T. Seya. 2015. PolyI:C and mouse survivin artificially embedding human 2B peptide induce a CD4+ T cell response to autologous survivin in HLA-A*2402 transgenic mice. *Immunobiol.* 220: 74-82.

14. Matsumoto, M., M. Tatematsu, F. Nishikawa, M. Azuma, H. Shime, and T. Seya. 2015. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and cytotoxic T cell activation without significant cytokine production *in vivo*. *Nat Commun.* 6: 6280.

15. Maruyama, A., H. Shime, Y. Takeda, M. Azuma, M. Matsumoto, and T. Seya. 2015. Pam2 lipopeptides systemically increase myeloid-derived suppressor cells through TLR2 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* (in press).

2. 学会発表

省略

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし