

平成 22 年 4 月 22 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790354

研究課題名（和文） C型肝炎ウイルスの感染に伴う肝炎劇症化誘発機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of induction of chronic hepatitis by HCV infection

研究代表者 阿部 隆之

(ABE TAKAYUKI)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：90403203

研究成果の概要（和文）：C型肝炎の慢性化の一因として、CXCR3 リガンドファミリーに属する IP-10 や I-TAC に惹起された、細胞障害性リンパ球や活性化マクロファージの感染巣への浸潤が考えられているが、その詳細な分子機構は未だ明らかにされていない。我々はこれまでに、C型肝炎ウイルス(HCV)のレプリコン細胞や JFH-1 ウイルスの感染細胞では、TLR2 シグナル経路依存的に IP-10 の発現が上昇しており、さらに、この IP-10 の産生亢進に関与する候補分子として CD44 を同定した。CD44 のリガンドであるヒアルロン酸は、TLR2 のリガンドとしても機能し、慢性 C 型肝炎患者の血中で高値であることが知られている。レプリコン細胞においても、ヒアルロン酸刺激による IP-10 の産生亢進には、TLR2 と CD44 の両分子の存在が必要であった。以上の成績から、慢性 C 型肝炎患者の血中に高発現しているヒアルロン酸は、CD44 と TLR2 の内在性リガンドとして作用し、IP-10 の過剰産生に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Although infiltration of lymphocytes and natural killer cells was observed in the liver of acute and chronic hepatitis C patients, the mechanisms of the liver injury during hepatitis C virus (HCV) infection are not well understood. Interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10), that selectively recruits activated T cells to the sites of inflammation, has shown to be expressed in the livers of the chronic hepatitis C patients. We have shown previously that IP-10 production was significantly enhanced in HCV RNA replicon cells and the human hepatoma cell lines infected with HCV through a TLR2-dependent signaling pathway. By the DNA microarray analysis, we have identified CD44 as a one of the candidates involved in the inflammatory response through a TLR signaling pathway. CD44 is a broadly distributed type I transmembrane glycoprotein and a receptor for glycosaminoglycan hyaluronan (HA). HA also works as a ligand for TLR2 and serum HA levels in the chronic hepatitis C patients were shown to increase according to the progression of liver fibrosis. IP-10 production was also induced by the treatment with HA in the replicon cells, but not in the naïve cells. These results suggest that the IP-10 production in the HCV replicon cells is regulated by HA stimulation through the engagement of TLR2 and CD44, and that serum HA in chronic hepatitis C patients participates in the induction of IP-10.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：病原性

1. 研究開始当初の背景

HCVは感染後、効率に慢性持続感染化し、肝臓の線維化を誘発し、肝硬変、さらに肝細胞癌を引き起こす事が問題となっている。これらの病原性の誘発機序には、慢性的な肝炎の誘発が起点となっている事が示唆されるが、その詳細な分子機序は明らかにされていない研究背景がある。

2. 研究の目的

本研究では、HCV感染に伴う肝炎の誘発機序を明らかにし、その対症療法を確立する事を主な目的とする。

3. 研究の方法

HCVが持続複製しているレプリコン細胞及び遺伝子型 2a の HCV 培養系を用いて、肝炎慢性化に寄与する液性因子の応答性を *in vitro* assay 系より検討する。さらに、その産生機序を分子生物学的及び免疫学的なアプローチから検討する。

4. 研究成果

HCV感染に伴う肝炎誘発に関与する液性因子として、CXCR3 リガンドファミリーに属する IP-10 を同定し、IP-10 が TLR2 依存的な経路を介して特異的に産生される事を示した。さらに、DNA マイクロアレイを用いた解析から IP-10 の産生亢進に関与する新規候補分子として CD44 分子を同定し、その特性評価を検討した。

HCV サブゲノムレプリコン細胞では、CD44 の発現が、細胞内 RNA 及び細胞表面抗原レベルにおいて亢進されている事が示された。HCV 特異的なプロテアーゼ阻害剤の処理において、HCV の複製を阻害する事で CD44 の顕著な発現の低下が認められた。肝臓生検における CD44 の発現を、CD44 抗体(3C11)において検出したところ、HCV 陽性の非癌部において CD44 の発現の亢進が認められた。一方、HCV 陰性の非癌部、HBV 陽性検体、ならびに脂肪肝由来の肝生検では顕著な CD44 の発現亢進は認められなかった。興味深い事に、SVR の二検体では CD44 の発現が低下している傾向が認められた。HCV レプリコン細胞では、CD44 の本来のリガンドであるヒアルロン酸刺激においても IP-10 の産生が亢進され、TLR2/CD44/MyD88 依存的なシグナ

ル経路により制御されている事が示された。一方で、リポペプチドによる IP-10 の産生亢進には CD44 は非依存的であった。293T 細胞による免疫沈降実験により、CD44 と TLR2 の相互作用が確認され、ヒアルロン酸の添加により結合の増強が確認された。さらに、組換え抗原を用いた結合アッセイより、CD44 と TLR2 は各々の細胞外領域を介して直接結合する事が示された。また、結合アッセイから、ヒアルロン酸は TLR2 と CD44 に同程度の結合力を示す事が明らかとなった。

以上の成績から、HCV 複製細胞においては、自然免疫認識受容体である TLR2 のシグナル経路が惹起される事で IP-10 の産生が亢進される事が示された。さらに、その産生亢進には、HCV 感染に伴う肝線維化の過程でその発現が亢進している内在性の CD44 とそのリガンドであるヒアルロン酸の関与が示された。これらの知見から、HCV 感染に伴う慢性的な肝炎の発症初期に重要な分子群が同定され、対症療法確立の観点からその意義は大きいと思われた。そのような観点から、*in vitro* における成果としては、十分に本研究の目的を達成したと思われる。

今後は、これまで得られた成果を実験動物モデルにて再現する事が重要になってくる。しかしながら、HCV 研究では、これまで、チンパンジー以外に感染感受性を示す小型実験動物モデルがない事が、*in vivo* における病原性発症機構解析の障壁となっていた。近年、ヒト肝臓移植キメラマウスの構築や、トランスジェニックマウス等で、肝炎の誘発を再現できる系が報告されている。従って、これらの実験動物モデルにおいて、如何にして IP-10 の産生亢進を抑制させる事が可能であるかが、慢性的な肝炎発症の抑止に重要な知見となる事が予測される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1) Abe T, and Matsuura Y (2010) Host innate immune responses induced by baculovirus in mammals. *Curr. Gene. Ther.* (in press)(査読有り)

2) Tani H, Shiokawa M, Kaname Y,

Kanbara H, Mori Y, Abe T, Moriishi K, and Matsuura Y (2010) Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. *J. Virol.*, 84, 2798-2807. (査読有り)

3) Kaname Y, Tani H, Kataoka C, Shiokawa M, Taguwa S, Abe T, Moriishi K, Kinoshita T and Matsuura Y (2010) Acquisition of complement resistance through incorporation of CD55/decay-accelerating factor into viral particles bearing baculovirus GP64. *J. Virol.*, 84, 3210-3219. (査読有り)

4) Abe T, Kaname Y, Wen X, Tani H, Moriishi K, Uematsu S, Takeuchi O, Ishii KJ, Kawai T and Matsuura Y (2009) Baculovirus induces type I interferon production through Toll-like receptor-dependent and -independent pathway in a cell-type specific manner. *J. Virol.*, 83, 7629-7640. (査読有り)

5) Taguwa S, Kanbara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Yoshimori T, Moriishi K, and Matsuura Y (2009) Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J. Virol.*, 83, 10427-10436. (査読有り)

6) Kukihara H, Moriishi K, Taguwa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T, Taketomi A, Maehara Y and Matsuura Y (2009) Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J. Virol.*, 83, 7959-7969. (査読有り)

[学会発表] (計4件)

1) 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤 達哉、林 紀夫、松浦善治: C型肝炎ウイルス感染による TLR 経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日、2009.

2) Abe T, Kaname Y, Moriishi K, Kanto T, Hayashi N, and Matsuura Y: Hyaluronan participates in the IP-10 production in cells infected with HCV through an engagement of TLR2 and CD44, 16th International symposium on HCV & related viruses, Nice, October 3-7, 2009.

3) 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤 達哉、林 紀夫、松浦善治: C型肝炎ウイルス感染による TLR シグナル伝達経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、第56回日本ウイルス学会総会、岡山、10月26日-28日、2008.

4) Abe T, Kaname Y, Wen X, Okamoto T, Moriishi K, Kanto T, Hayashi N, and Matsuura Y: Enhancement of IP-10 expression via TLR signaling pathway in cells expressing HCV proteins, 15th International symposium on HCV & related viruses, San Antonio, October 5-9, 2008.

[図書] (計3件)

1) 阿部隆之、松浦善治: (2010) C型肝炎ウイルスの持続感染機構、感染・炎症・免疫、医学の門社、6-17.

2) 阿部隆之、谷 英樹、松浦善治: (2009) ワクチンベクターとしてのバキュロウイルス、Drug Delivery System、日本医学館、608-615.

3) 阿部隆之、松浦善治: (2009) HCV の宿主免疫回避機構とワクチン開発の現状、肝・胆・膵、特集/C型肝炎のすべて、医歯薬出版株式会社、1119-1126.

6. 研究組織

(1) 研究代表者 阿部 隆之
(ABE TAKAYUKI)

大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：90403203

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：