

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：	14301
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23790790
研究課題名（和文）	C型肝炎ウイルス感染細胞による形質細胞様樹状細胞活性化機序の解明
研究課題名（英文）	Dissecting the mechanism of plasmacytoid dendritic cell activation triggered by hepatitis C virus-infected cells
研究代表者	高橋 健 (Ken Takahashi)
	京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：	60594372

研究成果の概要（和文）：

形質細胞様樹状細胞（pDC）は、C型肝炎ウイルス（HCV）感染細胞との直接接触により活性化し、HCV RNA を認識してインターフェロン（IFN）を産生する。本研究はこの現象の詳細な分子機序を明らかにすることを目的とした。HCV 感染細胞による pDC 活性化では、IFN 産生経路は強く活性化されるが、NFκB 活性化が生じないことが明かとなり、pDC 内のシグナル伝達様式が既知の pDC 活性化とは大きく異なることが示唆された。HCV 感染細胞から pDC への HCV RNA の伝達機序の解明は今後の課題である。

研究成果の概要（英文）：

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) sense hepatitis C virus (HCV)-infected cells and produce interferon (IFN) in a cell-contact-dependent manner. The aim of this study was to dissect the molecular mechanism underlying this event. In contrast to conventional pDC signaling, the results show that HCV-infected cells do not activate NFκB despite the robust IFN response, suggesting the unsuspected signaling mechanism unique to the virus-infected cell-triggered pDC activation. The mechanism of HCV RNA transfer from infected cells to pDC remains to be elucidated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学，消化器内科学

キーワード：ウイルス，感染症，免疫学

1. 研究開始当初の背景

本邦の C 型肝炎ウイルス（HCV）キャリアは約 200 万人と推定されており、HCV 感染後、慢性 C 型肝炎となり、20～30 年の経過で肝硬変、さらには肝細胞癌を発症する例が多い。しかし、現在の HCV の標準治療であるインタ

ーフェロン（IFN）・リバビリン併用治療は、日本人で患者数の最も多い Genotype 1 型高ウイルス例でのウイルス排除率が依然 50%程度に留まっていることと、治療に伴う副作用が大きな問題であり、HCV 排除のためのより効果的な治療法の確立が急務である。

近年、ウイルスと自然免疫の相互作用の解明が積極的に行われ、HCV 分野においてもその理解が進みつつある。中でも、HCV 感染細胞内でのウイルス認識による IFN 産生機序と、それを阻止するための HCV の自然免疫回避機構に関する研究が盛んに行われ注目されてきた。すはなち、ウイルス認識センサーRIG-I は感染細胞内で HCV を認識し IFN 産生の引き金を引くが、それには RIG-I の下流アダプター分子 IPS-1 が中心的役割を果たしている (*Nat Immunol.* 2005 ;6:981-8)。これに対して、HCV は自身の構成タンパクである NS3/4A により HCV 感染肝細胞内の IPS-1 を切断し、この RIG-I/IPS-1 経路を遮断して宿主からの IFN 産生を回避することが *in vitro* の実験結果から明らかとされてきた (*Nature* 2005; 437:1167-72)。

一方、チンパンジーを用いた HCV 感染実験では、HCV 感染における肝内での IFN 誘導産生が報告されており (*J. Virol* 2004; 78: 13779-92)、HCV 感染での肝臓における IFN 産生源はこれまで不明であった。

研究代表者は、樹状細胞のサブタイプである形質細胞様樹状細胞 (pDC) が、HCV 感染細胞との直接接触により活性化し、感染細胞内の HCV RNA を認識して Toll like receptor 7 (TLR7) 経路依存的に IFN を産生することを明らかにした (*PNAS* 2010; 20;107:7431-6)。

この pDC によるウイルス感染防御機構の際立った特徴として「pDC の活性化に、HCV ウイルス粒子は必要ではなく、HCV 感染細胞内で複製中のウイルス RNA の存在と、HCV 感染細胞と pDC の直接接触が必要である」という点があげられる。従来、HIV やインフルエンザ感染などの実験結果から、pDC のウイルス認識による IFN 産生では、ウイルス粒子の pDC への感染、もしくは pDC へのエンドソームへの取り込みが pDC 活性化の引き金となると考えられてきた。すなわち、この研究結果はウイルス感染に対する新たな自然免疫応答の存在を強く示唆するが、感染細胞内のウイルス核酸の近接する pDC への伝達機序や、pDC 内でのシグナル伝達機序に関しては全く不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究は、HCV 感染細胞による pDC 活性化の機序解明を目標とし、特に、HCV 感染細胞

内ウイルス核酸の近接する pDC への伝達機序と、pDC 活性化に至る pDC 内でのシグナル伝達機序に焦点をあて、これらの解明を目指した。

3. 研究の方法

基本的な実験系は、研究代表者が以前に報告したとおり確立されており (*PNAS* 2010; 20;107:7431-6)、本研究においても、pDC の分離、ヒト肝癌細胞株 Huh7 を用いた HCV 培養細胞系による HCV JFH1 ウイルス作成、pDC と HCV 感染細胞の共培養、IFN 定量などの実験方法は既報のプロトコールに従った。

HCV 感染細胞内ウイルス核酸の近接する pDC への伝達機序解明を試みるのに、細胞からの分泌小胞であるエクソソームが細胞間情報伝達機能を担うことに着目した。ここでは、培養液中に放出された HCV ウイルス粒子の影響を排除するために HCV 感染細胞は使用せず、細胞内で HCV RNA を恒常的に複製する HCV レプリコン細胞を用いた。レプリコン細胞と pDC との共培養をおこない、HCV 感染細胞の場合と同様、pDC からの IFN 産生がみられることを確認した。そのうえで、HCV レプリコン細胞から HCV RNA 含有エクソソームが分泌されるかの検討と、HCV レプリコン細胞から精製分離した HCV RNA 含有エクソソームの pDC 刺激により pDC から IFN 産生が観察されるかの検討を行った。エクソソームの分離と同定法は過去の文献ですでに確立されており (*J. Virol* 2009; 83: 512-21)、基本的にそのプロトコールに従った。CD63, CD81 などのエクソソームの表面マーカーを用いたウェスタンブロットティングアッセイや、エクソソームから抽出した RNA 内からの HCV RNA 検出を試みた。

pDC 内でのシグナル伝達機序の解明に関しては、HCV 感染細胞と pDC の共培養を行い、培養上清への IFN 分泌を ELISA で確認したうえで、TNF α や IL-6 などの NF κ B 依存性炎症性サイトカインが IFN と同様に産生されるかの検討をおこなった。また、共培養細胞を回収し、FACS による pDC の表面マーカー解析を行い、CCR7, CD80, CD86 など、NF κ B 依存性に発現上昇する分子を指標に pDC の活性化状態を評価した。

4. 研究成果

HCV ウイルス核酸の pDC への伝達機序の解明においては、HCV レプリコンより得られるエクソソームの収量が当初想定していたよりも微量で、CD63, CD81 などのエクソソームの表面マーカーを用いたウェスタンブロットティングアッセイや、エクソソームから抽出した RNA 内の HCV RNA の検出が困難であった。実験条件の改良や工夫を行い検討を重ねたが、本研究実施期間内に、HCV RNA 含有エクソソームを再現性よく分離精製することには成功しておらず、HCV RNA 含有エクソソームによる pDC の刺激実験も実施困難であったため、これらは今後の研究課題として残った。

一方、興味深いことに、pDC 内でのシグナル伝達機序の解明に関しては、HCV 感染細胞による pDC 刺激では、転写因子 IRF 依存的な IFN 産生とは対照的に、NFκB 依存的な TNFα や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が見られないという結果を得た(未発表データ)。また、炎症性サイトカイン産生の他にも、NFκB 依存的な pDC 活性化の指標となる CCR7, CD80, CD86 などの pDC 表面マーカーの発現上昇も認めなかった(未発表データ)。すなわち、HCV 感染細胞による pDC 活性化では、IRF による IFN 産生経路は強く活性化されるが、NFκB 依存的経路の活性化が生じないという結果であった(図)。pDC 内のシグナル伝達は、TLR 7 や TLR9 などの病原体認識受容体を介し、主にインターフェロン産生に至る転写因子 IRF7 の活性化経路と TNFα や IL-6 などの炎症性サイトカイン産生に至る NFκB 活性化経路のふたつに大別されるが、一般に、pDC のリガンド物質は両経路を一定のレベルで活性化させるため、以上の結果は本現象に極めて特異的といえる。現在、NFκB のリン酸化状態を併せて解析中である。

IFN 産生はウイルス感染における pDC の最も重要な役割であるが、CD80, CD86 などの表面分子の発現は pDC による有効なクロスプレゼンテーションなどに関与しており、自然免疫から獲得免疫活性化に至る一連のプロセスに欠かせない。また、効果的な病原体排除のためには IFN 以外にも TNFα や IL-6 などの炎症性サイトカインの誘導も重要である。

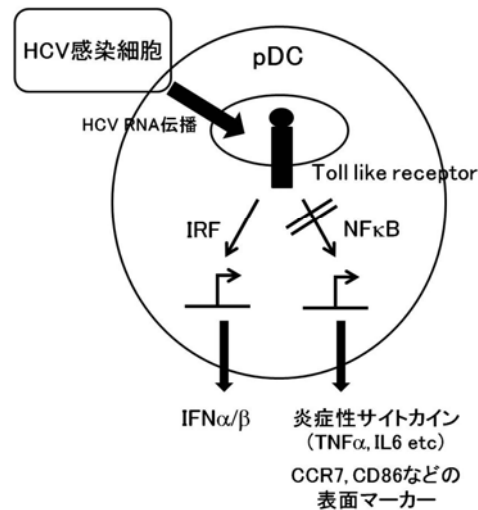
そのため、今回明らかとなった「HCV 感染細胞認識を引き金とする pDC の活性化現象における NFκB 活性化の選択的欠如」という知見の一つの解釈として、HCV による積極的な宿主自然免疫応答の回避機構の存在が考え

られる。臨床検体を用いた検討では、C 型肝炎患者の樹状細胞機能が低下しているという報告もあり、今後の詳細解明に興味を持たれる。

また、別の解釈として、ウイルス核酸の感染細胞から pDC への伝達を引き金とした pDC の活性化では、TLR 活性化とその下流シグナルの伝達様式が既知の pDC 活性化のそれとは大きく異なるという仮説も成り立つ。この点を明らかにするためには、エクソソームに着目したウイルス核酸の pDC への伝達機序の詳細解明が必須と考えられ、今後の課題である。

(図)

「HCV感染細胞によるpDC刺激ではIFN反応のみ選択的に惹起され、NFκB依存経路の活性化は生じない」



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1件)

Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K et al. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing.

PLoS One, 査読有, 7, 2012.

DOI: 10.1371/journal.pone.0035052

[学会発表] (計 1 件)

高橋 健 他. C型肝炎ウイルス薬剤耐性クロ
ーンの次世代ゲノムアナライザー解析.
第 54 回 日本消化器病学会大会 (JDDW 2012),
2012 年 10 月 10 日, 神戸ポートピアホテル
(神戸).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 健 (Ken Takahashi)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 60594372

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし