

平成 21 年 4 月 3 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790340

研究課題名 (和文) HCVによる自然免疫攪乱機構の解明

研究課題名 (英文) Disruption of innate immune response by hepatitis C virus

研究代表者

團迫 浩方 (DANSAKO HIROMICHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80379841

研究成果の概要：

C型肝炎ウイルス(HCV)による自然免疫システムの攪乱機構の解明を目的として行った研究において、以下のような成果を得た。(1) 従来の報告とは異なり、NS3-4A蛋白質はTRIF蛋白質を切断しておらず、自然免疫機構の抑制はRIG-I/IPS-1経路に限定されていた。(2) NS5B蛋白質によるIFN- β の産生はTLR3経路およびRIG-I/MDA5経路の活性化、さらには両経路の下流の転写因子IRF-3の活性化を経て誘導されていた。(3) NS5B蛋白質によるIFN- β の産生誘導はTRAF3やTRAF6のノックダウンにより亢進することを示した。また、活性化されたIRF-3の調節にTRAF6が関与している可能性が示唆された。(4) PH5CH8細胞において、NS5Bは二本鎖RNAを産生していることを示した。これらの研究成果により、HCVはこれら分子との相互作用により自然免疫システムを攪乱している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：ウイルス学、分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：分子、細胞、病原性、感染防御・ワクチン

1. 研究開始当初の背景

我が国の肝がんによる犠牲者は毎年3万人を超えており、その8割以上がC型肝炎ウイルス(HCV)に感染している。HCVの持続感染機構を詳細に解明することは既存の

インターフェロン(IFN)による治療法の改善に貢献するだけでなく、より効果的な治療薬および新たな治療法の開発に結びつく可能性が高い。

宿主細胞がウイルス感染を認識すると、

TLR3/TRIF 経路および RIG-I/IPS-1 経路を経て IRF-3 を活性化した後、IFN- β が産生され、細胞は抗ウイルス状態に誘導される。HCV においては、NS3-4A 蛋白質(セリンプロテアーゼ)が IRF-3 の活性化を抑制することにより、IFN- β の産生を阻害することが報告されている。その後、NS3-4A 蛋白質の標的分子の候補として、TRIF、IPS-1 さらにはその下流分子である TBK-1 あるいは IKK- α が報告されているが、細胞内で NS3-4A 蛋白質により切断されることが示されているのは IPS-1 のみである。NS3-4A 蛋白質による IPS-1 の切断は、遺伝子型 2a の HCV ウイルス粒子産生細胞でも確認されているが、TLR3/TRIF 経路を欠損している HuH-7 細胞(肝がん細胞株)で得られた成果である。また、NS3-4A 蛋白質非依存的な自然免疫抑制機構の存在も示唆される結果が報告されていたことから、TLR3/TRIF および RIG-I/IPS-1 両経路が機能している不死化肝細胞での結果は興味深いものであると考えられる。

2. 研究の目的

研究代表者はTLR3/TRIFおよびRIG-I/IPS-1 両経路が機能しているヒト不死化肝PH5CH8細胞を用いて、以下の目的により研究を遂行した。(1)NS3-4A蛋白質のIFN- β 産生抑制機構の解明 研究代表者はPH5CH8細胞で、NS3-4A蛋白質がIFN- β の産生を抑制できる場合(人工二本鎖RNAを細胞内添加した場合)と抑制できない場合(人工二本鎖RNAを細胞外添加した場合)があることを見出しているため、このような現象がどのような分子機序によりなされているのかを明らかにする。また、特定のHCV株のNS3-4A蛋白質だけでなく、肝病態の異なる患者由来のNS3-4A蛋白質のIFN- β 産生抑制能についても比較検討し、病態との関連性についても検討する。また、NS3-4A蛋白質非依

存的な自然免疫抑制機構の存在も示唆される結果が報告されていることから、PH5CH8細胞を用いる本研究により、NS3-4A蛋白質依存的のみならず非依存的な自然免疫攪乱機構の解明を試みる。(2)コア蛋白質とNS5B蛋白質によるIFN- β 産生誘導に関するシグナルカスケードの解明 研究代表者はHCVのコア蛋白質/NS5B蛋白質とNS3-4A蛋白質はIFN- β 産生系において相反的性質を有していることをこれまでに報告している。これらのHCV蛋白質がIFN- β 産生系においてどのような分子機序により作用しているかを明らかにし、それらがどのようにして自然免疫機構の攪乱を引き起こすのかを明らかにすることを目的とする。また、これら以外のHCV蛋白質のIFN- β 産生系に対する影響についても合わせて検討し、HCVによる自然免疫攪乱機構の全体像の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1)NS3-4A蛋白質のIFN- β 産生抑制機構の解明 研究代表者はPH5CH8細胞において、細胞内より人工二本鎖RNAを用いて刺激を与えたときにNS3-4A蛋白質はIFN- β の産生を抑制できるが、予想外に細胞外からの刺激によるIFN- β の産生は抑制できないことを見出している。このNS3-4A蛋白質の機能的な違いの原因を明らかにするために、PH5CH8細胞においてNS3-4A蛋白質はTLR3/TRIF経路あるいはRIG-I/IPS-1 経路のどちらの経路(あるいは両経路とも)を抑制しているのかを内在性IFN- β 遺伝子の発現レベルやIRF-3 の活性化などを指標として検討する。また、TLR3/TRIF経路あるいはRIG-I/IPS-1 経路に含まれる分子の発現ベクターを作成し、それぞれPH5CH8細胞で共発現させNS3-4A蛋白質により切断や結合による抑制を受けるかどうかを検討する。さらに、特定のHCV株のNS3-4A蛋白質

だけでなく、肝病態の異なる患者由来の NS3-4A 蛋白質の IFN- β 産生抑制能について比較し、病態との関連性についても検討する。

また、細胞外から人工二本鎖 RNA を用いて刺激を与えたときに NS3-4A 蛋白質が IFN- β の産生を抑制できないことは、HCV が持続感染を引き起こすことを考えると、NS3-4A 非依存的な IFN- β 産生抑制機構が存在することが示唆される。そこで、各種 HCV 蛋白質が発現している PH5CH8 細胞にそれぞれ細胞外から人工二本鎖 RNA を用いて刺激を与え、IFN- β 産生系に対する影響を検討する。

(2) コア蛋白質と NS5B 蛋白質による IFN- β 産生誘導に関するシグナルカスケードの解明

研究代表者は、ヒト不死化肝細胞において、コア蛋白質と NS5B 蛋白質が IFN- β の産生を相乗的に誘導することを見出しているが、その詳細な分子機構は明らかでない。近年、自然免疫分野におけるめざましい研究の進展により、IFN- β 産生系やその産生が過剰にならないための制御系に関わる分子群の同定が進んでいる。そこで、コア蛋白質と NS5B 蛋白質による IFN- β 産生誘導に関するシグナルカスケードにはどのような分子群が関与しているかを、RNA 干渉法による遺伝子ノックダウンにより検討する。候補となる内在性分子が見つかった場合には、コア蛋白質と NS5B 蛋白質によるこれらの内在性分子への影響（局在やリン酸化）を蛍光免疫染色法やウエスタンブロット法により解析する。また同時に、IFN- β の産生に重要な IRF-3 の二量体形成並びに蛍光免疫染色法を用いた IRF-3 の核局在を確認しながら研究を遂行する。

4. 研究成果

(1) NS3-4A 蛋白質の IFN- β 産生抑制機構の解明 最初に、IFN- β の産生抑制が NS3-4A 蛋白質のどの機能に依存しているか調べるために、セリンプロテアーゼあるいはヘリカーゼ

活性を欠失させるような変異体を作成した。これらの変異体のうち、セリンプロテアーゼを欠失させた変異体では、IFN- β の産生を抑制することはできなかった。次に、IFN- β の産生に重要な IRF-3 の二量化に対する NS3-4A 蛋白質の影響を調べた。その結果、IFN- β の産生抑制と相関して、人工二本鎖 RNA を細胞内添加した場合には NS3-4A 蛋白質は IRF-3 の二量体形成を抑制したのに対し、人工二本鎖 RNA を細胞外添加した場合には IRF-3 の二量体形成を抑制することはできなかった。また、従来の報告と同様に、人工二本鎖 RNA を細胞外添加した場合、PH5CH8 細胞においても TLR3/TRIF 経路を介して IRF-3 が活性化され、それに伴い IFN- β が産生されていることがわかった。そこで、NS3-4A 蛋白質の標的分子の候補として報告されている TRIF、IPS-1 両蛋白質に対する影響を調べたところ、NS3-4A 蛋白質は IPS-1 蛋白質を切断するが、予想外に TRIF 蛋白質を切断できないことがわかった。NS3-4A 蛋白質による TRIF 蛋白質が切断されない現象は従来の報告とは異なっているが、当研究室で樹立された HCV RNA 持続複製細胞でも確認された (*FEBS J*, 2007)。

次に、無症候性キャリアー、急性肝炎、慢性肝炎及び肝がん患者血清由来の各種病態 NS3-4A 発現ベクターを作製し、IFN- β の産生に対する抑制能に違いがあるかどうか検討したところ、いずれの NS3-4A 蛋白質も内在性の IPS-1 蛋白質をも切断するが、内在性の TRIF 蛋白質は切断していないことがわかった。また、各種病態間で、その抑制能に大きな違いはなかった。一方、PH5CH8 細胞でも人工二本鎖 RNA を細胞外添加した場合、IFN- β の産生経路とは別に、TLR3/TRIF 経路を介して NF- κ B 経路を活性化していることがわかった。そこで、NF- κ B 経路の活性化に対する各種病態由来の NS3-4A 蛋白質の影響を調べたところ、い

ずれのNS3-4A蛋白質もNF- κ B経路の活性化を抑制することはできなかった。このことはNS3-4A蛋白質による自然免疫抑制機構はRIG-I/IPS-1経路に限定されていることが示唆された(*Arch Virol*, 2009 in press)。

(2) コア蛋白質とNS5B蛋白質によるIFN- β 産生誘導に関するシグナルカスケードの解明
NS5B蛋白質を恒常的に発現するPH5CH8細胞において、抗二本鎖RNA認識抗体を用いる免疫蛍光抗体法により、二本鎖RNAの存在を確認することができたが、RNA依存RNAポリメラーゼ活性を欠失させたNS5B変異蛋白質を恒常的に発現するPH5CH8細胞では確認することはできなかった。

また、産生された二本鎖RNAは細胞質に局在するRIG-IやMDA5、あるいは細胞表面やエンドソームに局在するTLR3のような二本鎖RNA認識受容体のいずれによっても認識されることがわかった。しかしながら、RIG-IやMDA5のアダプター分子であるIPS-1はNS5BによるIFN- β の産生誘導機構に含まれていたのに対して、TLR3のアダプター分子であるTRIFは含まれていなかった。PH5CH8細胞における人工二本鎖RNAによる細胞外刺激ではTLR-3およびTRIFが活性化され、IRF-3の活性化を経てIFN- β が産生されることはすでに報告しており、PH5CH8細胞でTRIFが機能していないことは考えにくい。また、RIG-I/MDA5経路とTLR3経路の両経路に関与することが報告されているNAP1もNS5BによるIFN- β の産生誘導機構に含まれていたことから、人工二本鎖RNAの細胞外刺激とは異なるTRIFを介さない経路の存在も示唆された。

NS5B蛋白質を恒常的に発現するPH5CH8細胞において、IFN- β の産生誘導に重要な内在性のIRF-3の二量化は確認することができな

かった。これまでの数々の報告から示唆されているIRF-3の活性化モデルによると、IRF-3はウイルス感染などにより、細胞質でリン酸化され、二量体を形成することが知られている。一方、この二量体は核移行し、IFN- β 遺伝子の転写を活性化した後、分解されることも報告されている。そこで、IRF-3の核局在シグナルに変異を導入した発現ベクターをNS5B蛋白質が恒常的に発現するPH5CH8細胞に強制発現したところ、内在性のIRF-3とは異なり、二量体形成が確認された。さらに、TRAF6をノックダウンしたNS5B蛋白質が恒常的に発現するPH5CH8細胞では、内在性のIRF-3の二量化が観察されるようになった。TRAF6はE3ユビキチンリガーゼ活性を持つこと、また、IRF-3もユビキチン-プロテオソーム系において分解されることが報告されており、この点についてもさらに検討する必要がある(投稿準備中)。

自然免疫システムを攪乱するNS5B蛋白質に対抗する手段を得ることは、HCVの持続感染を断ち切ることができる可能性を示唆しており、今後の重要な研究課題であると考えられる。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計6件)

- ① H. Dansako, M. Ikeda, K. Abe, K. Mori, K. Takemoto, Y. Ariumi, and N. Kato: A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res.* 137, 72-79 (2008) 査読有り
- ② Y. Ariumi, M. Kuroki, H. Dansako, K. Abe, M. Ikeda, T. Wakita, and N. Kato: ATM, a DNA damage sensor, is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol.* 82, 9639-9646 (2008) 査読有り

- り
- ③ K. Mori, K. Abe, H. Dansako, Y. Ariumi, M. Ikeda, and N. Kato. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun.* 371, 104-109 (2008) 査読有り
 - ④ H. Dansako, M. Ikeda, and N. Kato. Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. *FEBS J.* 274, 4161-4176 (2007) 査読有り
 - ⑤ M. Yano, M. Ikeda, K. Abe, H. Dansako, S. Ohkoshi, Y. Aoyagi, and N. Kato. Comprehensive analysis of the effects of ordinary nutrients on hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother.* 51, 2016-2027 (2007) 査読有り
 - ⑥ Y. Ariumi, M. Kuroki, K. Abe, H. Dansako, M. Ikeda, T. Wakita, and N. Kato. DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol.* 81, 13922-13926 (2007) 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

- ① H. Dansako. Modulation of dsRNA-induced IFN-beta and inflammatory cytokine productions by HCV NS3-4As derived from patients with different hepatic diseases. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. 5-9, October, 2008.
- ② H. Dansako. A new antiviral assay

system using living cells harboring genome-length HCV RNA. 14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, Scotland, UK. 9-13, September, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

團迫 浩方 (DANSAKO HIROMICHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 80379841