

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2014

課題番号：24890042

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスによる細胞質DNAセンサーを介した自然免疫回避メカニズムの解析

研究課題名(英文) Hepatitis B virus evades DNA sensor-mediated IFN signaling pathways through interacting with STING

研究代表者

田中 康雄 (TANAKA, YASUO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40422290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)が宿主の自然免疫系を刺激することなく慢性感染を成立させる機序には不明な点が多い。本研究ではHBVの増殖・複製における自然免疫逃避メカニズムを解析した。HBVが産生するタンパクが自然免疫系を抑制するか検討したところ、HBVポリメラーゼがSTINGによるインターフェロンシグナル活性化を直接抑制する可能性が示唆された。これらはHBVが細胞質DNAセンサーにより惹起されるインターフェロンシグナル伝達系を抑制しているという新しい自然免疫回避の分子メカニズムを示唆する結果であり、それに基づく新規抗ウイルス療法の開発につながる有望な成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is not well understood how hepatitis B virus (HBV) evades DNA sensor-mediated IFN signaling pathways. In this study, we have shown that HBV polymerase inhibits STING (stimulator of interferon genes)-mediated IFN signaling pathways. Furthermore, the interaction between HBV polymerase and STING was observed. These results provide an additional molecular mechanism how HBV counteracts the innate immunity and may pave the way for the development of new antiviral therapy.

研究分野：消化器病学

キーワード：B型肝炎ウイルス 自然免疫 DNAセンサー

1. 研究開始当初の背景

病原体の生体内侵入を感知し排除する生体防御システムである免疫系は、自然免疫系と獲得免疫系の二つから成っている。近年の研究によりこれまで病原体に非特異的な免疫反応と考えられていた自然免疫系の詳細なメカニズムが明らかになってきた。自然免疫担当細胞(マクロファージや樹状細胞)にウイルスが感染すると、細胞は細胞膜上または細胞質内に存在するパターン認識受容体(pattern recognition receptor; PRR)を介して、病原体特有の病原体関連分子パターン(pathogen-associated microbial patterns; PAMPs)を認識する。これらが下流のシグナルを活性化することにより、I型インターフェロン(IFN)や種々の炎症性サイトカインの産生を誘導し、ウイルス増殖の抑制や排除を行う。

B型肝炎ウイルス(HBV)は、1968年に発見された不完全二重鎖DNAウイルスで、我が国では約100万人のHBVキャリアがいると推定されている。HBVは人に感染すると肝細胞に侵入して増殖するものの、感染初期の段階ではHBVは宿主の自然免疫系を逃避し、炎症を起こすことはない。しかしながら、HBVが人にとって異物と認識された場合には生体の獲得免疫機能が働き、体内から排除しようと肝炎が起こるものの、一部ではウイルスが長期間にわたり肝臓で持続感染を引き起こす(HBVキャリア)。このようにHBVは何らかのメカニズムで宿主の免疫系を逃れているわけだが、そのメカニズムは必ずしも明らかでない。

近年、細胞質内に存在するDNAウイルスや細菌のゲノムに存在する2本鎖DNAが自然免疫系により認識され、I型IFNや炎症性サイトカインの産生を誘導することが知られ注目されている。細胞質内に存在するDNAセンサー、DAI、IFI16、DDX41、さらにこの細胞質DNAにより活性化されるシグナル伝達系に必須のタンパク質としてSTING(Stimulator of interferon genes)が同定された。STINGは過剰発現によりIFN-betaの発現やISREプロモーターの活性化を誘導し、細胞質DNAを認識するセンサーの下流に位置するアダプタータンパク質と考えられている。

HBVはDNAウイルスであり、HBVのゲノムDNAはDAI、DDX41、IFI-16等のDNAセンサーにより認識されると推測されるが、その真偽は明らかでない。またHBVにもHCV同様に宿主の自然免疫系を回避するメカニズムが備わっていると考えられるがその詳細はいまだ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、HBV感染における自然免疫の役割を明らかにすることを目的に以下の研究を行う。

(1) HBV感染の際にHBVは自然免疫系、特に既報のDNAセンサー(DAI、DDX41、IFI-16)により認識されるのか

HBVゲノムは、細胞内で細胞質DNAセンサーに感知され、自然免疫系を活性化する可能性がある。本研究ではHBVゲノムがDNAセンサーのリガンドになりうるか、またウイルスの複製に影響を与えるか検討する。

(2) また認識されうるとしたらHBVはどのように持続感染のためにこの自然免疫系を回避しているのか

HBVタンパクが既報のDNAセンサー及びアダプター分子STINGにより誘導されるインターフェロンシグナルに与える影響、および両者の結合を調べ、その自然免疫系に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) HBV複製系を用いた自然免疫系のウイルス複製への影響の検討

HBV DNAを導入したヒト肝癌細胞株HepG2.2.15で自然免疫関連分子をノックダウンし、HBV複製に与える影響を検討する。

(2) B型肝炎ウイルスタンパクによる自然免疫への干渉のメカニズムの解析

HBVタンパク発現プラスミド(Large S, Middle S, Small S, Polymerase, Precore, Core, X)と自然免疫関連分子を共発現させてウイルスタンパクが自然免疫関連分子によるIFN誘導能に影響を与えるか検討する。さらに細胞質DNAにより誘導されるIFNシグナル伝達系の鍵分子であるSTINGとHBVタンパクとの相互作用の検討も行う。

4. 研究成果

(1) HBVの複製に対する本自然免疫系の影響を検討するために、HBV DNAを導入したヒト肝癌細胞株HepG2.2.15で自然免疫関連分子STINGをノックダウンし、HBVの複製状態を検討した。今回の検討では培養上清中のHBV DNA量、及び細胞内のプレゲノムRNA量に明らかな差は認められなかった。

(2) HBV が産生するタンパクが自然免疫系を抑制する可能性に関して、HBV タンパク発現プラスミドと自然免疫関連分子を共発現させたところ、HBV Polymerase が STING による IFN-beta 誘導を抑制することが明らかとなった。一方で HBV Polymerase と既報の DNA センサー及び自然免疫関連分子との相互作用を検討したところ、HBV Polymerase と STING の相互作用が確認された。

(1)の結果からは HBV が自然免疫系により認識されるか明らかではなく、ある特定の実験系での結果であり、直ちに結論を下すことは難しい。また今回は細胞質 DNA により誘導される IFN シグナル伝達系の鍵分子である STING をノックダウンしたが、今後既報の DNA センサーのノックダウンによる検討も必要と思われる。さらに HBV 感染系などによる別の系での検討も重ねていく。

以上の結果から HBV Polymerase が STING によるインターフェロン系活性化を直接抑制する可能性が示唆された。これらは HBV が細胞質 DNA センサーにより惹起されるインターフェロンシグナル伝達系を抑制しているという新しい自然免疫回避の分子メカニズムを示唆する結果であり、それに基づく新規抗ウイルス療法の開発につながる有望な成果と考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

・田中 康雄、立石敬介、中塚拓馬、工藤洋太郎、浅岡良成、堤武也、小池和彦
グルココルチコイドによるエピジェネティクスを介した HBV 複製制御メカニズムの解析
第 51 回日本肝臓学会総会
2015 年 05 月 21 日～2015 年 05 月 22 日(確定)

・Yasuo Tanaka, Keisuke Tateishi, Takeya Tsutsumi, Kazuhiko Koike
Hepatitis B virus transcription is enhanced with glucocorticoid through the acetylation of covalently closed circular DNA bound histones
The 11th JSH Single Topic Conference
2014 年 11 月 20 日～2014 年 11 月 21 日

・田中 康雄、Chen Zhijian, 小池和彦
試験管内再構成系を用いた STING による I 型インターフェロン 誘導メカニズムの解析
第 50 回日本臨床分子医学会学術集会
2013 年 04 月 12 日～2013 年 04 月 13 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 康雄 (TANAKA, Yasuo)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40422290

(2)研究分担者
無し ()

研究者番号：

(3)連携研究者
無し ()

研究者番号：