

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860523

研究課題名(和文) インターフェロンによるC型肝炎ウイルス排除機構の解明

研究課題名(英文) Analyzing mechanism of Hepatitis C Virus eradication by Interferon-lambda

研究代表者

藤田 めぐみ(田坂めぐみ)(FUJITA(TASAKA), Megumi)

東京医科歯科大学・医歯学融合教育支援センター・特任助教

研究者番号：50510369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：インターフェロン(IFN)によるC型肝炎ウイルス(HCV)排除の機構について検討を行った。

MHC Class Iは感染細胞表面に発現し、細胞障害性T細胞によって認識されることでウイルスが排除されるのを助ける。HCVについても感染細胞で細胞表面のMHC Class I発現誘導が確認され、IFN- λ 添加によっても誘導されることが報告されている(Kang et al, 2014)。そこでIFN- λ についてFlowcytometryを用いて検討し、IFN- λ を添加した細胞表面でもMHC Class Iが誘導されることを確認した。これらの結果からIFN- λ も同様の機序で作用する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For this study, we could not confirm induction of ISG expression by IFN- λ as we expected. Therefore, we tried to explore other possibility.

MHC Class I is a molecule that is known to support eradication of viruses. When cells are infected by viruses, part of virus protein is carried by MHC Class I to the surface of infected cells. Cytotoxic T cells recognize these protein conjugated MHC Class I molecules and attack these cells. As a result, viruses infecting these cells are eliminated with cells from host's body. For HCV, after infection or adding IFN- λ , induction of MHC Class I expression was also confirmed (Kang et al, 2014). Therefore we planned to evaluate the results after adding IFN- λ , and found MHC Class I induction. From these results it was suggested that IFN- λ may also affect in the same mechanism as IFN- λ .

研究分野：C型肝炎ウイルス

キーワード：C型肝炎ウイルス MHC Class I

1. 研究開始当初の背景

国内に約 200 万人の慢性感染者が存在する HCV は IFN を基軸とした最も有効な治療法を用いても約半数しかウイルス排除に達せず、また新たに承認されたプロテアーゼ阻害剤の併用でも 7 割に留まっており、いまだ多くの症例が非代償性肝不全・肝癌に発展する。従って HCV 排除の分子機構の解明および新たな抗ウイルス療法の開発が急務であった。

2. 研究の目的

ウイルスが細胞に侵入すると、増殖により精製される二重鎖 RNA が PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) として認識され IFN- α および β が産生・分泌され、それに応答した IFN 誘導遺伝子 (Interferon-stimulated genes, ISG) の発現誘導を介し、ウイルス蛋白翻訳抑制、ウイルスゲノム核酸の不安定化、さらにアポトーシスによる感染細胞排除をもたらす。さらに IFN は、ISG ある p53 を介し、細胞増殖制御・がん細胞排除を担うことが報告されている (Takaoka et al. *Nature*, 2003)。一方で当時、新たな IFN として IL28A (IFN- λ 2), IL28B (IFN- λ 3), IL29 (IFN- λ 1) からなる III 型 IFN が報告され (Kotenko, *Nature Immunology*, 2003)、Huh-7 細胞、初代培養肝細胞などで sindvis virus, dengue virus, vesicular stomatitis virus, encephalomyocarditis virus などの感染による内因性 III 型 IFN シグナルの誘導が報告された。更に IL28B 領域の遺伝子多型が慢性 C 型肝炎患者の PEG-IFN+リバビリン併用療法の治療効果や自然治癒を規定する因子として報告され (Ge *Nature* 2009, Suppiah *Nat Genet* 2009, Tanaka *Nat Genet*, 2009, Rauch *Gastroenterology* 2010)、これらの報告を機に III 型 IFN の宿主免疫への関与、および IFN- λ と HCV 排除効果の機序について注目され始めた。臨床レベルでは慢性 C 型肝炎患者に対する IFN- λ 治療の治験が進められ I 型 IFN である IFN- α と同程度の効果が確認された。また、培養細胞系で III 型 IFN の添加により HCV レプリコンが増殖抑制しうる事が示された。さらに、2012 年には HCV 陽性患者の肝組織やヒト初代培養肝細胞 (Thomas et al. *Gastroenterology*, 2012)、HCV 感染チンパンジー血清中で (Park et al. *Hepatology*, 2012) III 型 IFN が誘導されていることが報告されるなど、III 型 IFN と HCV の関係性は、HCV 治療の中軸となってゆく可能性が高いと考えられていた。近年まで HCV は安定した培養細胞系が存在しないことが研究の障壁となっていたが、1999 年に報告された HCV レプリコンシステムにより、従来不可能であった細胞内 HCV 増殖機構を培養細胞内にて安定して再現することが可能となった (Lohmann, *Science*, 1999)。さらに 2005

年に報告された、HCV-JFH1 株を用いた HCV 培養細胞系の開発により、HCV の細胞への侵入、増殖、ウイルス粒子形成・排出を含むすべての感染増殖サイクルの解析が可能となった (Wakita, *Nature Medicine*, 2005)。

これらの HCV 感染・増殖モデルがブレイクスルーとなり、現在ウイルス増殖機構解明を目的とした様々な研究が展開されている。申請者はこれまで、HCV の持続感染を可能にする機序について上記のレプリコンシステム、HCV 感染培養細胞系を用いて HCV の複製メカニズム及び宿主自然免疫系との相関関係について継続して研究を行い、報告してきた (*J Med Virol*, 2007 及び *Hepatology*, 2009, 2013 など)。このような、すでに確立された学術基盤・技術基盤をもとに、今回申請する研究においては、初代培養肝細胞における III 型 IFN 誘導の報告など新たな動向を受け、III 型 IFN によって誘導される肝細胞からの HCV 排除機構について解明したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) Huh-7 細胞のサブクローニング

Huh-7 細胞は様々な細胞から構成されるポリクローナルな細胞集団であることから、得られた結果を正確に評価する事は難しい。したがって、より詳細な解析のためモノクローナルな細胞集団を作成した。手法としては、細胞混濁液を 1 ウェル当たり細胞 1 個になるよう希釈後、96 ウェルプレートに播種し得られたコロニーをさらに培地をスケールアップしつつ継代培養していく限外希釈法を用いた。

(2) サブクローニング細胞の 2 次選別

得られたモノクローナルな細胞株に PolyI:C、HCV-RNA をそれぞれリポフェクションまたはエレクトロポレーションにより遺伝子導入し、培養する。遺伝子導入後、定めた数カ所の時点で細胞を回収し、回収した細胞から RNA を抽出後 cDNA を合成する。それぞれの ISGs に対するプライマーを用いて定量 PCR 法により ISGs 誘導を解析し、解析された結果をもとに比較検討して、最も ISGs 誘導能の高い細胞株を同定し以後の解析に用いた。

(3) HCV 感染細胞における ISGs 誘導能の検討

上記の方法によって得られた細胞に、HCV 培養上清添加によりウイルスを感染させ、培養後経時的に細胞を回収した。回収した細胞から RNA を抽出し cDNA を合成した後、Real time PCR 法によりそれぞれに対するプライマーを用いて同様に ISGs の誘導について解析した。

(4) IFN- λ による MHC Class I 誘導能の検討

Huh7 細胞に IFN- α を添加し得られた細胞表面を固定後 MHC Class I に対する抗体で染色した。染色した細胞を Flowcytometry で測定し添加していない細胞と比較し誘導される MHC Class I 量を評価した。

4. 研究成果

前述の方法(1)により Huh-7 細胞をサブクローニングし、方法(2)により ISG の誘導能の高い細胞を選出することが出来た。そこで、得られた細胞に HCV の感染を試みたが成立させることが出来なかった。更に条件を検討し、ヒト初代培養肝細胞でも試みたが感染成立は困難だった。

このため検討の方法を変更することとし、ウイルス感染時に宿主体内からの排除において重要な役割を果たす MHC Class I に着目して検討した。MHC Class I は感染細胞表面に発現し細胞障害性 T 細胞によって認識されることで細胞ごと宿主体内からウイルスが排除されるのを助ける。HCV についても感染細胞で細胞表面の MHC Class I 発現誘導が確認され、IFN- α 添加によっても誘導されることが報告されている(Kang et al, 2014)。そこで我々は IFN- α についても Flowcytometry を用いて検討し、IFN- α を添加した細胞表面でも MHC Class I が誘導されることを確認した。これらの結果から IFN- α についても同様の機序で作用する可能性が示唆された。したがって HCV 排除の分子機構の解明および新たな抗ウイルス療法の開発への方向付けを行うことができた。

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 7 件)

Fukiko Kawai-Kitahata, Yasuhiro Asahina, Syun Kaneko, Hiroko Nagata, Fumio Goto, Satoshi Otani, Miki Taniguchi, Miyako Murakawa, Sayuri Nitta, Takako Watanabe, Megumi Tasaka-Fujita, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Nobuyuki Enomoto, Mamoru Watanabe.
Gene alterations in β -catenin and p53/cell cycle control pathway are closely associated with development and prognosis of hepatocellular carcinoma: Comprehensive analyses by next generation sequencing technology. 65th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD The Liver Meeting 2014) 2014 年 11 月 9 日~11 日 Boston (USA)

新田 沙由梨, 坂本 直哉, 村川 美也子, 北詰 晶子, 藤田 めぐみ, 中川 美奈, 柿沼 晴, 朝比奈 靖浩, 渡辺 守.
HCV-NS4B による STING を標的とした自然免疫応答回避メカニズムの解析.
第 50 回肝臓学会総会 2014 年 5 月 29 日~30 日 ホテルニューオータニ(東京)

朝比奈靖浩, 中川美奈, 金子俊, 永田紘子, 後藤文男, 村川美也子, 河合富貴子, 谷口未樹, 大谷賢志, 新田沙由梨, 渡辺貴子, 櫻井幸, 藤田めぐみ, 井津井康浩, 東正新, 柿沼晴, 渡辺 守.

C 型慢性肝炎におけるインターフェロン応答性と耐性変異を考慮したプロテアーゼ阻害剤 3 剤併用療法の適応と治療効果.
第 24 回抗ウイルス療法研究会総会 2014 年 5 月 7 日~9 日 ハイランドリゾートホテル(山梨)

Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Wonseok Kang, Murayama A, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Eui-Cheol Shin, Kato T.
Substitution of amino acid 70/91 in the hepatitis C virus core region affects infectious virus production and cell surface expression of MHC class I. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013) 2013 年 11 月 1 日~2013 年 11 月 5 日 Washington D.C. (USA)

Sayuri Nitta, Yasuhiro Asahina, Naoya Sakamoto, Megumi Tasaka-Fujita, Akiko Kusano-Kitazume, Miyako Murakawa, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Mamoru Watanabe.
HCV-NS4B protein blocks both type I and type III IFN production. 20nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2013 年 10 月 7 日 Melbourne(Australia)

藤田めぐみ, 加藤 孝宣, 村山 麻子, 山田 典栄, 朝比奈 靖浩, 坂本 直哉.
HCV Core 領域アミノ酸 70/91 変異株を用いた反応機序の解析.
第 49 回日本肝臓学会総会 2013 年 6 月 6 日~7 日 京王プラザホテル(東京)

新田沙由梨, 坂本直哉, 村川美也, 北詰晶子, 藤田めぐみ, 中川美奈, 柿沼晴, 朝比奈靖浩, 渡辺守.
HCV-NS4B による STING を標的とした自然免疫応答回避メカニズムの解析.
第 49 回日本肝臓学会総会 2013 年 6 月 6 日~7 日 京王プラザホテル(東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田(田坂) めぐみ

(FUJITA (TASAKA) Megumi)

東京医科歯科大学・医歯学融合教育支援センター・特任助教

研究者番号：50510369