

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870015

研究課題名(和文) 肝臓癌を発症させるB型肝炎ウイルス核酸による自然免疫応答制御の分子機構

研究課題名(英文) Elucidation of host innate sensing mechanism for nucleic acid of hepatitis B virus that possibly cause liver cancer

研究代表者

佐藤 精一 (Sato, Seiichi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：60459724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてDNAウイルスであるB型肝炎ウイルスに感染したヒトの肝細胞において、RIG-IがB型肝炎ウイルスのプレゲノムRNAにある構造を認識することにより、I型インターフェロンではなくIII型インターフェロンの発現を優先的に誘導することを見い出した。RIG-IはB型肝炎ウイルスのポリメラーゼとプレゲノムRNAとの結合を阻害するという直接的な抗ウイルスタンパク質としての機能をもつことも見い出した。RIG-IはB型肝炎ウイルスに対しセンサータンパク質としてのみならず直接的な抗ウイルスタンパク質としても機能するという2つの機能により、感染防御に機能していることが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have revealed that HBV infection is sensed by the RIG-I protein through its recognition of certain viral RNA (pregenomic RNA) within the cells, which triggers a predominant production of type III interferons, a well-known antiviral protein. We further determined that a key element for the RIG-I-mediated recognition is the 5' region of HBV pregenomic RNA, which was previously reported to take a stem-loop structure and serve as a binding site of HBV polymerase, an essential enzyme for viral propagation. In relation to this, we also discovered a novel role of RIG-I as a direct antiviral factor that can competitively inhibit the interaction of HBV polymerase with the 5' region of viral genome. These findings indicated that RIG-I dually functions not only as an HBV sensor but also as a counteractor against viral polymerase in human hepatocyte, and also suggest that the region-derived RNA would be a therapeutic tool for the treatment of HBV infection.

研究分野：癌や感染を制御する自然免疫応答の分子基盤の解析

キーワード：B型肝炎ウイルス 自然免疫応答 核酸センサー 抗ウイルス因子 インターフェロン RIG-I シグナル伝達 肝臓癌

1. 研究開始当初の背景

感染症は人類の歴史を支配してきたといっても過言ではないほど、人類にとって古くからの大きな問題である。微生物を如何にコントロールできるかが鍵であり、微生物やウイルスに対する感染防御機構の解明は人類にとって非常に大きな課題である。B型肝炎ウイルス(HBV)は、ヘパドナウイルス科オルソヘパドナウイルス属に属するDNAウイルスであり、肝細胞に感染し、肝炎や肝硬変さらには肝臓癌を引き起こす。世界規模で約4億人がHBVに持続感染していると考えられており、国内においては、1年で約3万人が肝臓で命を落としている。HBV核酸を認識する分子(核酸センサー)は未だは同定されておらず、現在、HBVに対してインターフェロン(IFN)や核酸アナログ製剤(NA)が主に使用されているが、IFNの効果は、遺伝子型(Genotype)によって効果が異なるため不十分であり、NA投与でもHBV完全排除は困難である。さらに薬剤耐性HBV株の出現など問題が表面化している。ゆえに現在、人類にとって早急に対策を打たなくてはならない課題の一つであると考えられる。

2. 研究の目的

HBVの根絶のため、ウイルス感染機構や宿主側の防御反応を理解することは、学問そして医療発展の観点から極めて重要な課題である。現在、HBV核酸を認識するセンサーやその下流の自然免疫シグナル伝達経路は同定されていない。申請者はHBVのGenotypeのうち特に肝臓癌を引き起こし日本に多いType CのHBVウイルスゲノムによる応答機構に着目し、肝細胞感染初期の宿主における自然免疫応答を介した生体防御調節機構の分子基盤を明らかにすることを本研究の目的にした。

3. 研究の方法

ヒト肝細胞を保持したキメラマウス、初代ヒト肝細胞や肝がん細胞株を使用しHBV感染ならびに、1.24倍長ゲノム導入の系を利用して、インターフェロンのmRNAレベルをqRT-PCR法により、タンパク質レベルをELISA法により測定した。またRIP assayによりRIG-IやHBVのポリメラーゼとプレゲノムRNAの相互作用の解析を進めた。

4. 研究成果

(1) HBV感染によってIII型インターフェロンが誘導される

HBVにより活性化される自然免疫認識機構を探るために、肝臓細胞株(HepG2やHuh-7)に1.24倍長のHBV plasmidをTransfectionする系を利用してIFN遺伝子の発現変化を定量的RT-PCR法により解析した。これまでの報告と一致し、I型IFNであるIFN- α 4やIFN- β のmRNAの発現上昇は認めなかった。一方で、III型IFNであるIFN- λ 1(IL-29)のmRNAの発

現レベルの上昇を認めた。HepG2において、弱いもののELISAでIFN- λ 1のタンパク質での発現を確認した。HBV感染により誘導されるIFN- λ 1(IL-29)は、水疱性口内炎ウイルス(VSV)やHBVの複製を阻害したことから、抗ウイルス活性を有することが確認された。さらに初代ヒト肝細胞やヒト肝細胞を保持したキメラマウスを使用したHBV感染の系でも同様にIFN- α 4やIFN- β のmRNAの発現上昇は認めなかったが、IFN- λ 1のmRNAの発現レベルの上昇を認めた。またISGsであるCXCL10やOAS2、RSAD2の発現が見られた。以上の結果によりHBV感染によって、肝臓細胞においてI型IFNではなくIII型IFNが優先的に誘導されることを示した。

(2) HBV感染によるIII型インターフェロン誘導はRIG-Iを介する

HBV感染に関与する自然免疫系センサー分子の同定を行うため、RIG-I、IFI16、cGASといった既知の核酸センサーがHBV感染によるIFN- λ 誘導に関与するかを調べた。HepG2やHuh-7細胞に各種siRNAを導入し、その後、HBV 1.24倍長ゲノムを導入後、IFN- λ 誘導を解析した。siRNAによりRIG-Iを発現抑制した場合、IFN- λ 誘導は有意に阻害されたが、IFI16やcGASに対するsiRNAは有意に抑制しなかった。RIG-I遺伝子(T551)に変異をもちRIG-Iシグナルが入らないHuh-7.5細胞で検討したところ、IFN- λ 1は発現誘導されなかった。また、初代ヒト肝細胞を使用したHBV感染の系においても、同様にRIG-I依存的にIFN- λ 1 mRNAが誘導されていることがわかった。さらに、RIG-I下流のシグナル分子であるTRIM25、MAVS、TBK1、IRF-3が関与していることを明らかにした。以上の結果より、HBV感染によるIFN- λ 1の発現誘導は、RIG-I依存的であることが示された。

(3) HBV pregenomic RNAの5'-領域がRIG-Iのリガンドとなる

RIG-IはRNAおよびDNA認識との関連性が報告されていることから、HBV由来のどの核酸がRIG-Iの活性化を誘導するのか詳細を明らかにするため、HBV由来RNAを標的とするsiRNAを用いて解析した。HBVゲノム導入によって誘導されるIFN- λ 1の発現量は、HBV由来RNAに対するsiRNAを導入することにより減少したことから、HBV由来のRNAがRIG-Iの活性化に関与していることが考えられた。そこで、HBV由来の4種のRNAsをHEK293T細胞にそれぞれ過剰発現させ、IFN応答が認められるかについて調べたところ、最も長いRNAであるpgRNAを過剰発現させた時のみIFN- λ 1の発現誘導が観察された。さらに、pgRNAのどの領域がIFN- λ 1応答に関与するか調べるために、pgRNAの欠失変異体を用いた解析を行ったところ、5'末端に存在している ϵ 構造がIFN- λ 1の発現誘導に重要であることが示された。*in vitro*でこの ϵ 構造を含む

領域を転写した合成 RNA を用いて、細胞に遺伝子導入する実験系においても、これを支持する結果が得られた。さらに、RIP (RNA immunoprecipitation) アッセイや FRET (fluorescence resonance energy transfer) 解析により、RIG-I が pgRNA ならびにそのε構造と結合することが示された。以上の結果より、HBV の pgRNA のε構造が RIG-I のリガンドとなることが示された。

(4) HBV ポリメラーゼが 5' - 領域と結合するのを RIG-I は競合阻害することで HBV 複製を阻害する

次に、我々は RIG-I の抗 HBV 効果を解析するために、siRNA により RIG-I を発現抑制させた初代ヒト肝細胞に HBV 感染させ、HBV の複製に与える効果を解析した。RIG-I の発現抑制によって HBV のウイルス量は上昇した。これらの結果は RIG-I が HBV 感染において抗ウイルス活性を活性化させる因子であることが示された。さらに一方で、5' - ε は HBV の複製において重要な逆転写反応を導くポリメラーゼ(P 蛋白)が結合する部位であることが明らかにされていた。これらの結果に基づき、我々は RIG-I は P 蛋白のε構造への結合を阻害させるのではないかと仮説を立てた。実際、*in vitro* の系において RIG-I を存在させると量依存的に P 蛋白と pgRNA の相互作用が阻害された。さらに我々は、RIG-I の RNA 結合領域を Huh-7.5 細胞に発現させると、HBV の複製が阻害され、RNA 結合能が無い変異体ではその能力を失ったことから、RIG-I は HBV 感染において P 蛋白が pgRNA のε構造への結合を直接的に阻害する抗ウイルス因子であることが明らかになった。以上の結果に基づいて、我々はε構造を有する RNA (εRNA) の治療応用の可能性について解析した。RNA は *in vitro* において、P 蛋白と pgRNA の相互作用を阻害し、HBV 特異的に複製を阻害させた。リポゾームに load させた RNA-MEND (Multifunctional envelop-type nanodevice) を作成し、ヒト肝細胞を有するキメラマウスを用いた *in vivo* の HBV 感染実験系を用いて解析した。εRNA-MEND を投与したマウス群は、コントロール群に比べて、血清中の HBV ゲノム量の減少や、肝臓組織での HBV コアタンパク質の顕著な発現の減少が認められた。

今回の研究により RIG-I は、HBV 感染による III 型 IFN 誘導の核酸センサーである事を示した。また RIG-I は HBV ポリメラーゼ(P 蛋白)の 5' - 領域との結合を競合阻害することで、HBV 複製を阻害する直接的な抗ウイルス因子であることを示した。これらの結果は、RIG-I は HBV に対するセンサー分子として自然免疫応答を活性化するのみにならず、直接的な作用で抗ウイルス因子としても機能し、この両面からの作用を介して HBV に対する自然免疫感染防御に働いていることを明ら

かにした。さらに、RIG-I による複製阻害の仕組みに基づいた新たな視点からεRNA を作製し、ヒト肝臓を移植したキメラマウスを用いた HBV 感染系でウイルス量が抑制することを示した。このような本研究は、HBV 感染における核酸センサーの同定や、その認識機構の一端を明らかにしたのみならず、デコイ核酸によるウイルス抑制の可能性を示唆する結果も得られ、今後は新たな視点での HBV 治療における創薬や予防の展開が期待される。

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1件)

1. Seiichi Sato, Kai Li, Takeshi Kameyama, Takaya Hayashi, Yuji Ishida, Shuko Murakami, Tsunamasa Watanabe, Sayuki Iijima, Yu Sakurai, Koichi Watashi, Susumu Tsutsumi, Yusuke Sato, Hidetaka Akita, Takaji Wakita, Charles M. Rice, Hideyoshi Harashima, Michinori Kohara, Yasuhito Tanaka, Akinori Takaoka. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity*, 42, 123-132 (2015) doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.016. (査読有)

[学会発表](計8件)

1. 佐藤精一、李凱、亀山武志、林隆也、石田雄二、村上周子、渡邊綱正、飯島沙幸、櫻井遊、渡士幸一、堤進、佐藤悠介、秋田英万、脇田隆字、Charles M. Rice、原島秀吉、小原道法、田中靖人、高岡晃教、B 型肝炎ウイルスの感染に対する RIG-I を介した自然免疫応答機構、第 25 回抗ウイルス療法学会総会 (国立感染症研究所(東京都・新宿区))2015 年 5 月 24 日

2. 亀山武志、木口舞美、佐藤精一、石川浩三、高岡晃教、核酸による自然免疫賦活化と抗腫瘍効果に関する解析、平成 26 年度 個体レベルでのがん支援研究活動ワークショップ (琵琶湖ホテル(滋賀県・大津市)) 2015 年 2 月 5 日

3. 齋秀二、佐藤精一、高岡晃教、ステロイドホルモンによる自然免疫 RIG-I 制御機構、第 22 回日本ステロイドホルモン学会学術集会 (都道府県会館(東京都・千代田区)) 2014 年 11 月 3 日

4. 齋秀二、佐藤精一、高岡晃教、ステロイドホルモンによる自然免疫 RIG-I への制御機構について、第 48 回日本小児内分泌学会 (アクトシティ浜松(静岡県・浜松市))2014 年 9 月 25 日

5. 亀山武志、木口舞美、佐藤精一、石川浩三、高岡晃教、核酸を用いた自然免疫経路賦活化による抗腫瘍効果の検討、第 18 回 日本がん免疫学会総会（ひめぎんホール（愛媛県・松山市））2014 年 7 月 30 日

6. 亀岡章一郎、亀山武志、佐藤精一、林剛瑠、大西なおみ、紙谷尚子、東秀明、畠山昌則、高岡晃教、Helicobacter pylori 換算による Interleukin-1 産生誘導機構の解析、第 79 回日本インターフェロンサイトカイン学会学術総会（北海道大学医学部学友会館フラテホール（北海道・札幌市））2014 年 6 月 19 日

7. Kai Li, Seiichi Sato, Akinori Takaoka, Interferon induction by hepatitis B virus, 日本ウイルス学会北海道支部 第 47 回夏季シンポジウム（新しいえ温泉（北海道・空知郡））2013 年 7 月 20 日

8. Seiichi Sato, Kai Li, Akinori Takaoka, Interferon induction by hepatitis B virus, 第 78 回日本インターフェロン・サイトカイン学会総会、第 21 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム（都市センターホテル（東京・千代田区））2013 年 5 月 20 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 精一（SATO, Seiichi）
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
研究者番号：60459724