

5. C型肝炎ウイルスによるウイルス感染初期応答の阻害

小原 道法¹、井上 和明^{1,2}

1. 東京都臨床医学総合研究所・感染生体防御研究部門

2. 昭和大学藤が丘病院消化器内科

C型肝炎ウイルスは感染後に宿主の免疫応答により排除されず、高率に持続感染して慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の原因となる。これまでは持続感染が成立した後のHCVに対する獲得免疫の解析やHCV蛋白のインターフェロン(IFN)のシグナル伝達に及ぼす影響が主として解析されてきた。一方感染直後に応答する自然免疫とHCVとの関係はほとんど解析されてこなかった。そこで、HCVが初期ウイルス応答に与える影響について検討した。HCVの全長遺伝子がコンディショナルに発現し、かつ細胞内でウイルスが複製しうる系を作成して、HCV遺伝子をスイッチング発現させることに伴って修飾阻害されるインターフェロンシグナル伝達経路を明らかにし、その機序を解析した。特に、複製中間体である2本鎖RNAにより活性化されるIRF-3とHCVの関係について解析した。HCVのコア蛋白質により、IRF-3の2量体形成が阻害され、IRF-3の細胞質から核内への移行が阻害された。また、IFN- β の誘導が抑制されていることが明らかとなった。IRF-3のリン酸化およびpolyICにより誘導されるIFN- β の誘導には変化は認められなかった。HCVコア蛋白質はインターフェロンシグナル伝達系のもっとも初期の反応であるIRF-3の2量体形成および核内移行による活性化を阻害しており、その結果として細胞内持続感染の成立に関与している可能性が示された。

はじめに

1999年の世界保健機関(WHO)の報告によると、C型肝炎ウイルスの感染者は全世界で約一億七千万人以上のヒトが感染し慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の主要な原因であり、肝移植の原因の筆頭もHCVの感染症である¹⁻⁷⁾。

C型肝炎ウイルスも1989年に発見されて以来、はじめは遺伝子がクローニングされ診断法が確立された後にその病原性の解析のためにトランスジェニックマウスの作成も行われた。しかし研究の前途を阻んでいたものは、HCVの効率の良い増殖システムが無かったことである。近年になりレプリコンによる増殖システムが構築されて、その利点を生かした様々な研究が行われている。さらに近年の分子細胞生物学的手法を用いてHCVと宿主免疫応答の研究も本格化しつつある。

宿主の免疫応答からいかにすり抜けて持続感染するかについては、従来は獲得免疫に関するものが主体であった。はじめはHIVと同様に宿主のimmune pressure(獲得免疫)からウイルスが変異によりいかに逃れるかを中心に検討が行われた。しかし獲得免疫が作動する前にHCVは自然免疫系に様々な修飾を加えて持続感染の基盤を成立させている可能性はないだろうか。ヒトに何らかの病原因子が加わった場合に、はじめに立ち上がる生体防御システムは自然免疫系である。自然免疫の中で中心となるメディエータはインターフェロンであるが、これからうまく逃れるシステムをHCVは持っており幾つかのメカニズムが報告された。近年に至りToll-like receptor(TLR)による病原体のパターン認識の発見により、従来の病原微生物と宿主の相互関係を新たな視点で捉え直す必要も出てきている⁸⁾。

自然免疫と獲得免疫⁹⁾

我々が生存して行く上で外来の病原微生物を認識し排除するシステムの免疫系が不可欠である。この免疫系が破綻すれば、個体は病原細菌やウイルスの感染症や発癌などにより死に至る。免疫系は、獲得免疫系と自然免疫系の2つに大別される。獲得免疫系とは脊椎動物の持つ免疫系であり、病原体の認識はリンパ球(T細胞, B細胞)を中心

連絡先

〒113-8613 東京都文京区本駒込3-18-22

TEL: 03-3823-2101

FAX: 03-3828-8945

E-mail: mkohara@rinshoken.or.jp

とした免疫細胞の発現する免疫グロブリンや T 細胞レセプターなどの抗原特異的な分子により行われる。獲得免疫に用いられる抗原レセプターは、遺伝子再構成により多様なレパートリーが形成され、微妙な抗原特異性を認識している。遺伝子再構成を必要とするため、微生物感染を契機として獲得免疫の成立までに、通常一週間前後の日を要する。しかしながら、免疫記憶として残るため、2 回目の感染以降には素早く対処できる。

もう1つの自然免疫系とは、獲得免疫と異なり遺伝子再構成を伴わない分子により病原微生物を認識する反応で、生体防御の最前線を担う重要な役割を果たしている。その基本システムはショウジョウバエからヒトまで保存されており、系統発生的に古いものと考えられる。この自然免疫系は、病原微生物に存在する特有の分子構造 (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) を識別し、生体防御反応を誘起している。さらにそれに続く獲得免疫の誘導にも必須であることが明らかになった。自然免疫における外界認識の中心を担っているのは Toll like receptor (TRL) である。TLR のリガンドは極めて多彩であるが、いずれも細菌・ウイルスに普遍的に存在する物質であるところが特徴であり、ヒトでは少なくとも10種類存在しており (図 1-A)、共通の構造をとっている (図 1-B)。これまでのTLRの機能解析により、これらは病原微生物と宿主の相互関係において、宿主が長い時間をかけて進化・分化させた第一線の基本免疫システムであることが明らかになって

きた。この系に関する検討は日進月歩でありさまざまな刺激が TLR のリガンドとなりインターフェロンを産生に関与することが明らかにされつつある。

HCV の特性

ウイルスが感染した場合に作動する宿主の防御システムの代表例として解析されてきたものの代表例はインターフェロンシステムである。HCV は持続感染しかつインターフェロン療法が十分に効かない。これまでも図に示した様に自然免疫系・獲得免疫系と HCV の持続感染の関係が検討されてきた (図 2)。

インターフェロンから見た HCV 感染症の特徴

インターフェロンは本来ウイルス疾患の治療に有効である。とくにRNAウイルスの治療には有効であると一般に考えられてきた。しかし持続感染する多くのウイルスは何らかの積極的な手段により、つまり受動的な逃避ではなく能動的にインターフェロン系を働かなくして持続感染を成立させるのである (図3)^{10, 11)}。インターフェロン治療に反応するHCV感染者は特に1b高ウイルス量の患者に限ると数パーセントである。なぜ HCV がインターフェロン治療に抵抗性を示すかについてははじめに注目された標的分子はPKR (二本鎖 RNA 依存性蛋白リン酸化酵素) であった。HCV 以外の多くのウイルスがこの分子の働きを抑制することにより持続感染状態を作っていると考えられる。言い

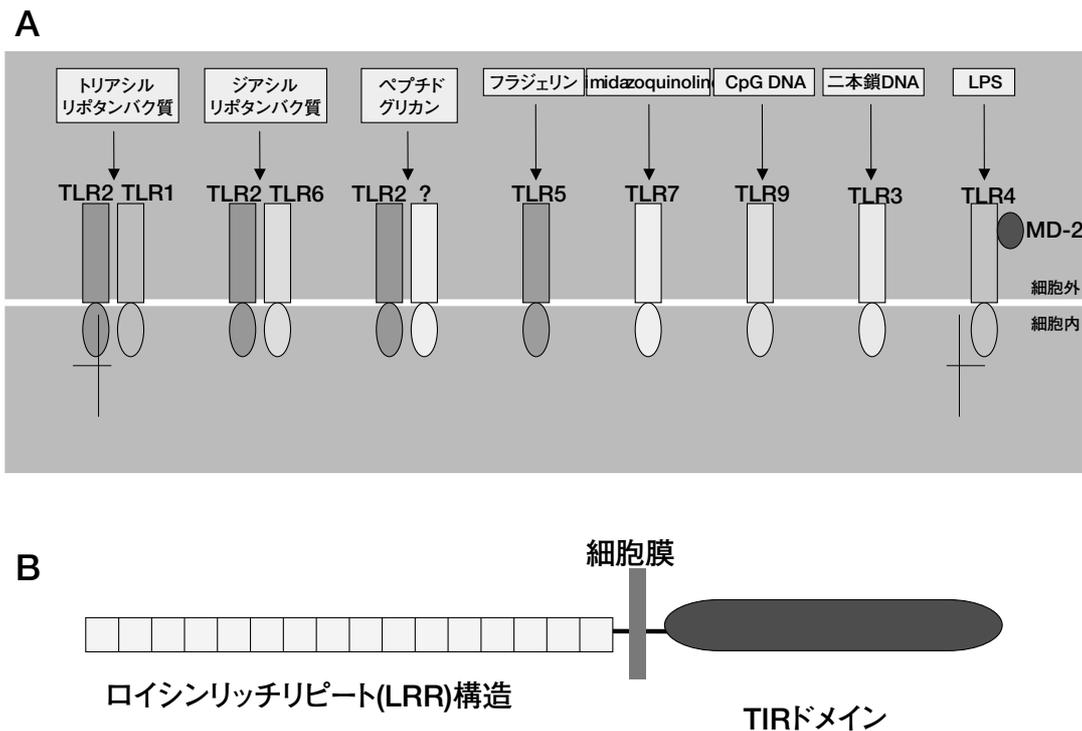


図 1 TLRのリガンドと構造

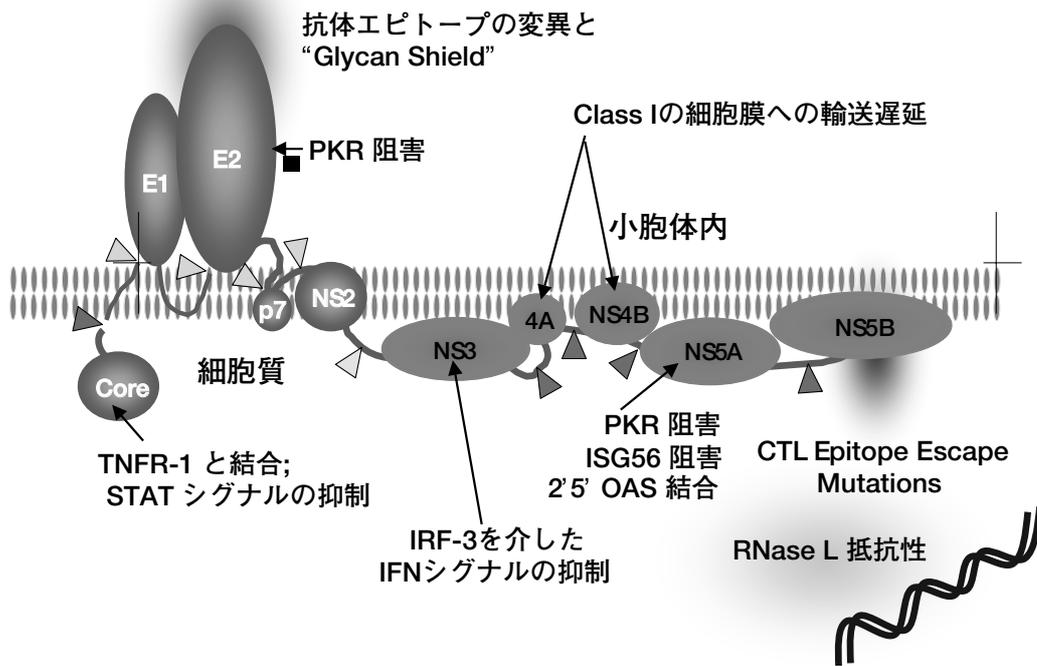


図2 現在考えられているHCV持続感染機構

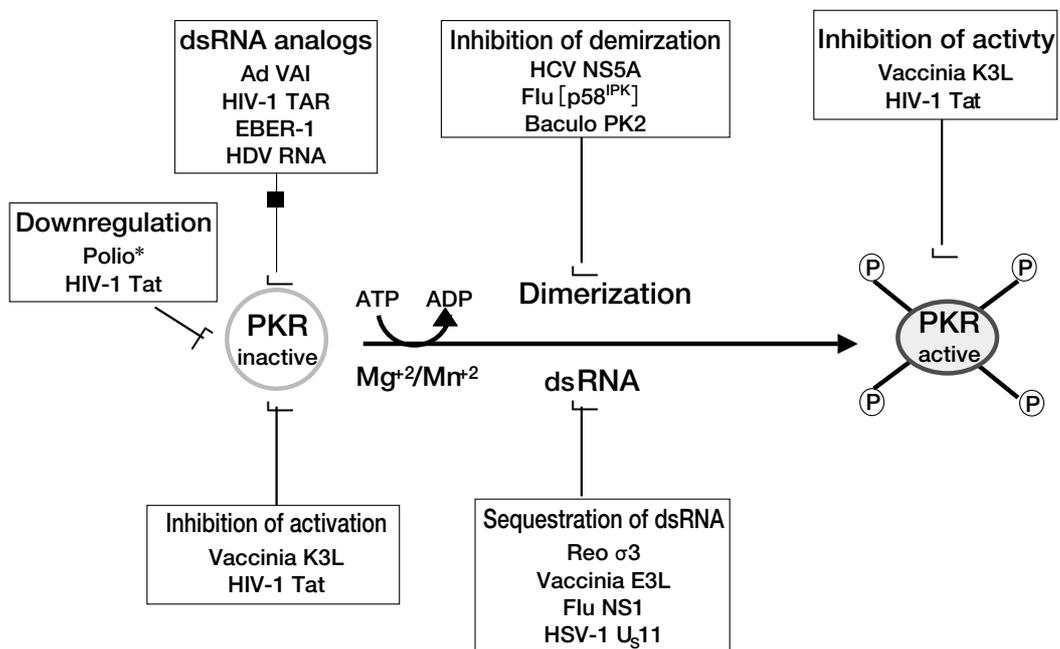


図3 ウイルス持続感染の成立

換えるとういう手段, つまり宿主の免疫応答を抑える方略を持たないウイルスは持続感染できないのである.

近年酵母および哺乳類細胞において HCV の genotype 1 の NS5A 蛋白が PKR と結合することが報告された. NS5A が PKR と相互作用するドメインはアミノ酸2209から2274の66アミノ酸であることが示された. さらに相互作用には NS5A の C 端領域 2/3 以上が必要であるという報告もある. NS5A は, PKR のヌクレオチド結合および触媒作用に関与すると想定されているアミノ酸244-296に作用する. この領域は活性型 PKR となるための二量体の形成にも必要とされている. *In vitro* で NS5A は PKR が二量体を形成して活性型をとることを阻害することで PKR 機能を抑制し, eIF-2 α のリン酸化を阻害, 蛋白合成および細胞増殖を維持すると考えられている. HCV の他の領域では E2 蛋白にも IFN 誘導性の PKR や eIF2 α と相同の一連の配列があることが明らかになり, これは「PKR-eIF2 α リン酸化相同領域 (PKR-eIF2 α phosphorylation homology domain: PePHD, 図 4)」と呼ばれている. この領域は, HCV genotype1 感染患者のPKR 活性を抑制することによって, PKR の蛋白合成と細胞増殖に対する阻害作用を妨害し IFN 抵抗性を獲得すると考えられる¹³⁾. しかし, PePHD と同一の共通配列と, IFN 療法に対する反応パターンとは無関係であることが報告もある¹⁴⁾. 外から与えたインターフェロンに対する抵抗性は説明できるが, これだけでは, 持続感染のメカニズムを説明するのは不十分である.

HCV によるウイルス感染初期応答の阻害

これまでは持続感染が成立した後の HCV に対する獲得免疫の解析や HCV 蛋白のインターフェロン (IFN) のシグナル伝達に及ぼす影響が主として解析されてきた. 一方感染直後に応答する自然免疫と HCV との関係はほとんど解析されてこなかった. 2003年になって HCV がウイルス感染後にインターフェロン系の作動を HCV が止めてしまうという興味深い事実がGaleらより報告された¹⁵⁾. ウイルス感染後にまず細胞内で二本鎖RNAが合成されると, virus dependent IRF-3 kinase が活性化されて IRF-3 の二量体化が起こり, 核内へ移行して CBP300 と一緒に働いてインターフェロン β の遺伝子発現を誘導する¹⁶⁾. ウイルス感染後にリン酸化酵素を活性化する因子として, 最近YoneyamaらによってRIG-Iが同定された¹⁷⁾. 一旦インターフェロン β が発現するとこれはインターフェロン α をはじめとする関連遺伝子の発現を次々と引き起こし, 細胞を抗ウイルス状態へと移行させる. つまり IRF-3 はインターフェロン系発動の司令塔であり, IRF-3 の作用を抑えることは自然免疫系の第一線の防御ラインを突破することにつながる. Gale らの報告¹⁵⁾ によれば HCV の NS3 のプロテアーゼが IRF-3 をリン酸化され核移行する pathway 抑えることになっており, その後 NS3 のセリンプロテアーゼがこの pathway を阻害すると報告した (図 5).

さらに, 我々の研究から HCV のコア蛋白質が IRF-3 のリン酸化を阻害していることを見いだしたので紹介する. ま

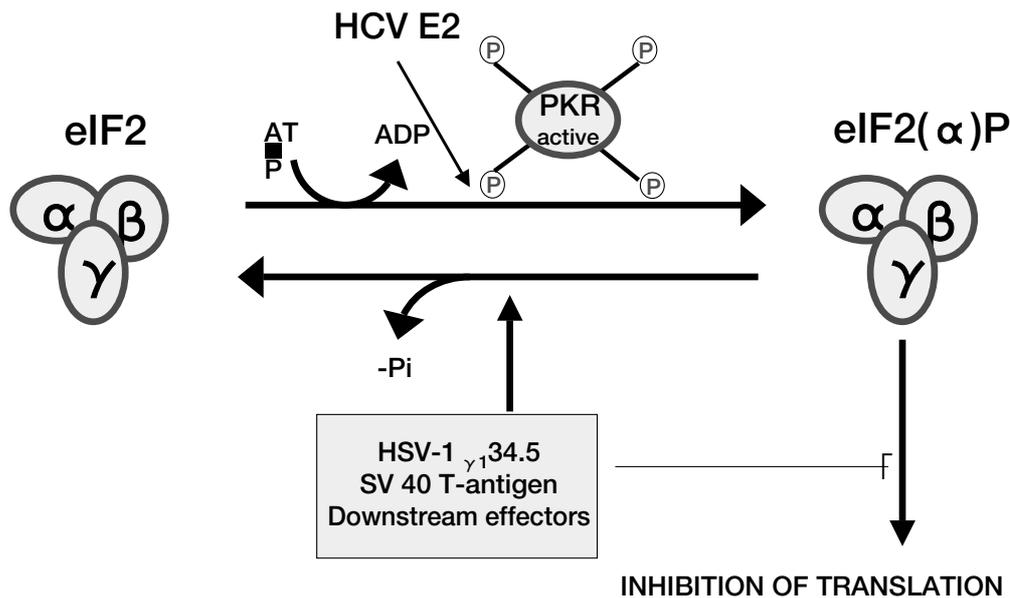
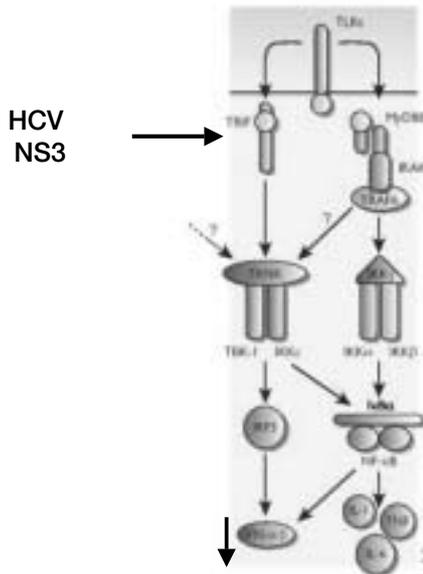


図4 PKR-eIF-2 α リン酸化相同領域 (PePHD)



X-X-Cys-(Ala/Ser)-X-X NS3/4A
Cleavage Motifs in TRIF

TRIF	192	DGVSDWSQGC	SLRSTGSPAS
	326	PILEPVKNPC	SVKDQTPLOL
	372	PPPPSSTPC	SAHLTPSSLE

図5 NS3蛋白質によるシグナル阻害機序

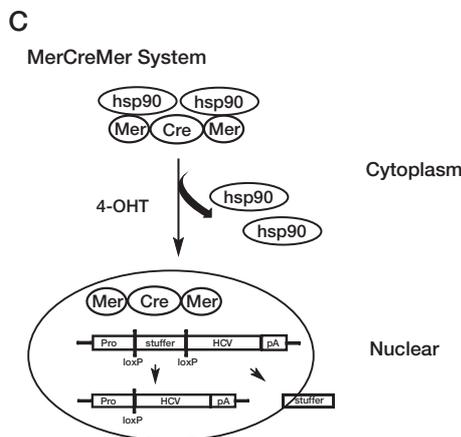
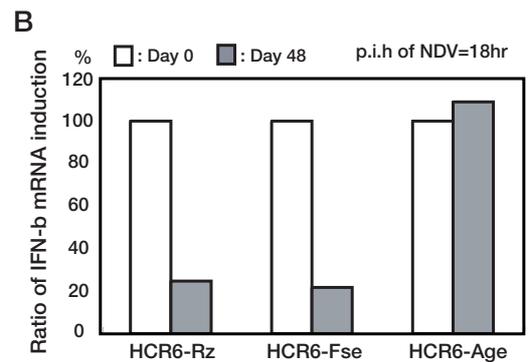
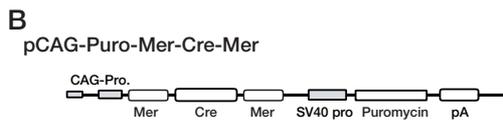
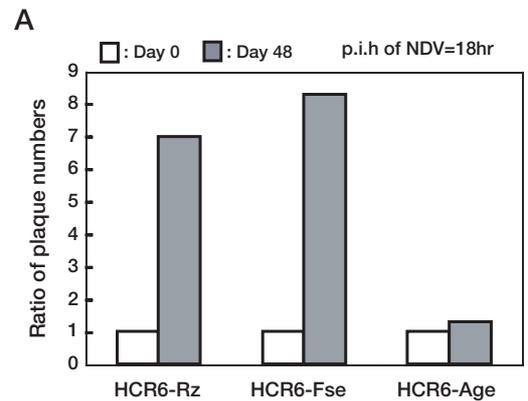
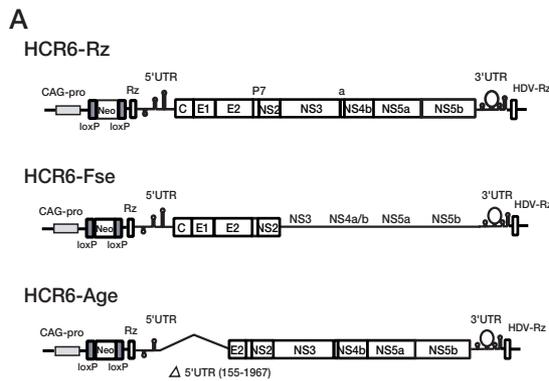


図7 NDV増殖とIFN-β mRNA誘導

図6 HCV遺伝子発現細胞の構築

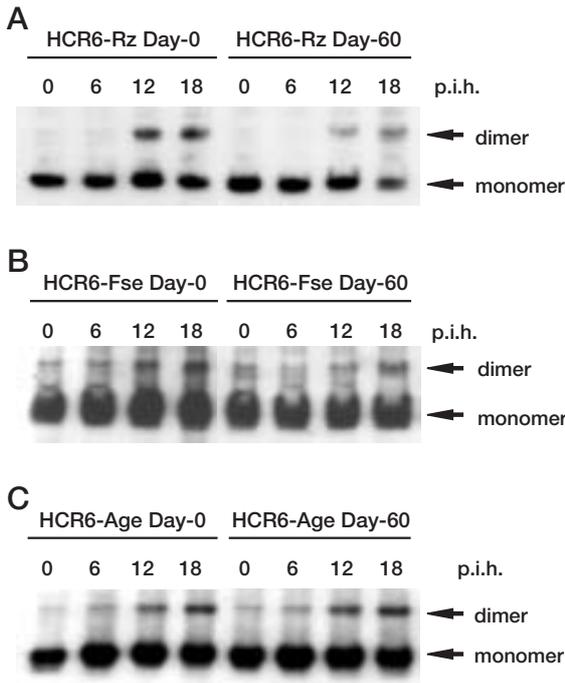


図8 HCVによるIRF-3の2量体化阻害

ず、HCV 全長、構造蛋白、非構造蛋白遺伝子のそれぞれを Cre/loxP システムでコンディショナルに発現し、かつ細胞内でウイルスが複製しうる系を HepG2 細胞に導入した (図6)。これらの細胞系を用いて NDV 感染, polyIC 刺激に対する IRF-3 の二量体化, 核移行, IFN-β の誘導に対する影響を HCV 発現前後で検討した。また、責任蛋白質を同定するために HCV の各構成蛋白発現プラスミドを導入して同様の検討を行った。HCV 全長遺伝子 (HCR6-Rz) 及び構造蛋白質遺伝子 (HCR6-Fse) を発現している細胞において、NDV 産生の増大と IFN-β mRNA の誘導阻害が認められた (図7)。これは、IRF-3 の2量体形成の阻害によるものであることが示された (図8)。また、この誘導阻害に関わる、構造蛋白質の責任因子を同定したところ、HCV のコア蛋白質により IRF-3 のリン酸化及び2量体形成が阻害され、IRF-3 の細胞質から核内への移行が阻害された。また、IFN-β の誘導が抑制されていることが明らかとなった (図9-A,B,C)。さらに、polyIC により誘導される IFN-β の誘導もコア蛋白質によって同様に阻害された (図9-D)。以上示したように、C型肝炎ウイルスコア蛋白質が IRF-3 のリン酸化と二量体化を抑制する事により IFN-β の mRNA の産生を抑えて、初期抗ウイルス応答を阻害することにより持続感染する可能性が示され、この抑制機序についてさらに解析を進めている。また、HCV の構成蛋白のうち、コア蛋白と NS3/4A 蛋白による IRF-3 活性化の抑制経路を明らかにするために、RIG-I, TRIF等の強制発現系を用いて、HCV 各蛋白の IRF-3 活性化に対す

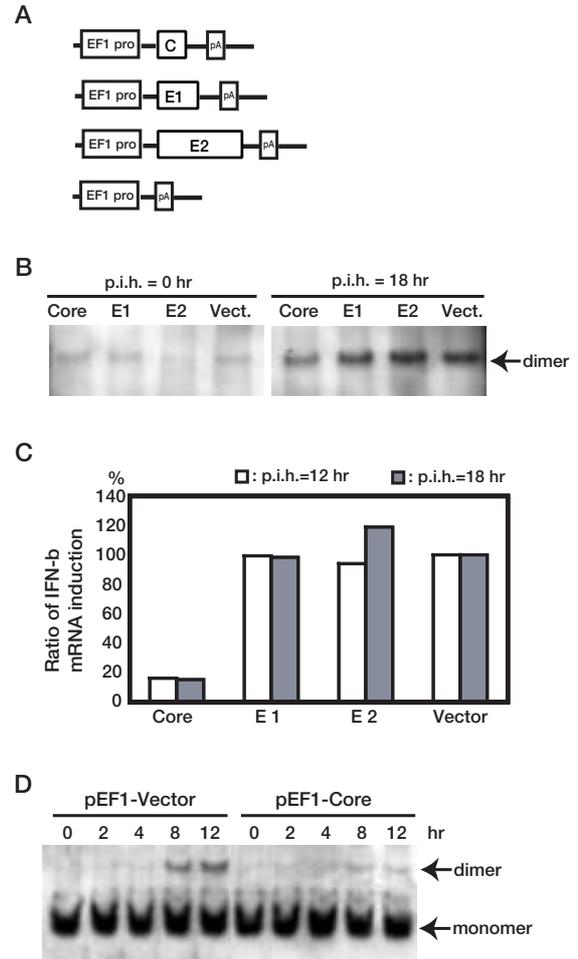


図9 HCVコア蛋白質によるIRF-3の活性化阻害

る影響を解析している。

おわりに

HCV はウイルス感染の初期応答およびそれから誘導される2次応答を複数の因子で阻害することにより、宿主細胞を殺すことなく高率に持続感染し、遺伝子複製を続けることを可能にしている。今後の研究の進展により更に新たな持続感染機構が明らかになることが期待される。

文 献

- Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, Mcquillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. : The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. N. Engl. J. Med ; 314: 556-62, 1999.
- Alter MJH. : Epidemiology of hepatitis C. Hepatology; 26: 62-65, 1997.
- Alter HJ, Seeff LB. : Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. Semin. Liver Dis.; 20: 17-35, 2000.

- 4) Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gibble J, Melpolder J, Shakil AO, Viladomiu L, Cheung L, DiBisceglie A, Hoofnagle J, Shih JW, Kaslow R, Ness P, Alter HJ. : Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.*; 334: 1691-96, 1996.
- 5) Seeff LB, Buskell-Bales Z, Wright EC, Durako SJ, Alter HJ, Iber FL, Hollinger FB, Gitnick G, Knodell RG, Perrillo RP, et al. : Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. The National Heart, Lung, and Blood Institute Study Group. *N Engl J Med.*; 327:1906-11, 1992.
- 6) Tong MJ, el-Farra NS, Reikes AR, Co RL. : Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med.*;332(22):1463-6, 1995 Jun 1.
- 7) Darby SC, Ewart DW, Giangrande PL, Spooner RJ, Rizza CR, Dusheiko GM, Lee CA, Ludlam CA, Preston FE. : Mortality from liver cancer and liver disease in haemophilic men and boys in UK given blood products contaminated with hepatitis C. UK Haemophilia Centre Directors' Organisation. *Lancet.*; 350 (9089) : 1425-31. 1997 Nov 15.
- 8) Miyake K. : Toll-like receptors and their roles in defense responses against infection *Kansenshogaku Zasshi.* Jul;77(7):473-9, 2003.
- 9) Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. : *Immunobiology* 5th edition, Garland publishing, New York 2001.
- 10) Katze MG. Games viruses play. A strategic initiative against the interferon-induced dsRNA activated 68,000 Mr protein kinase. *Semin Virol*; 4: 259-268, 1993.
- 11) Katze MG. Regulation of the interferon-induced PKR: can viruses cope? *Trends Microbiol*; 3: 75-78, 1995.
- 12) Gale MJ Jr, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. : Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*; 230: 217-227, 1997.
- 13) Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MMC. : Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*;285: 107-110, 1999.
- 14) Abid K, Quadri R, Negro F. : Hepatitis C virus, the E2 envelope protein, and α -interferon resistance. *Science* ; 287: 1555 2000.
- 15) Eileen Foy, Kui Li, Chunfu Wang, Rhea Sumpter Jr., Masanori Ikeda, Stanley M. Lemon, Michael Gale Jr. : Regulation of Interferon Regulatory Factor 3 by the Hepatitis C Virus Serine Protease. *Science*; 300:1145-48, 2003.
- 16) Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T. : Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J.*; 17:1087-95, 1998.
- 17) Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. : The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.*; 5:730-7, 2004.

Mechanism of persistence in HCV infection.

MICHINORI KOHARA¹, KAZUAKI INOUE^{1,2}

Microbiology of Cell Biology

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science,

3-18-22, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8613 Japan

E-mail : mkohara@rinshoken.or.jp

One of the prominent features of hepatitis C virus (HCV) is persistent infection, which is assumed to be a crucial event as a result of evading host defense system. Type I interferon beta (IFN- β) system is induced rapidly after viral infection and plays a central role in innate immunity. Upon immediate induction of type I IFN as host first defense line, interferon regulatory factor-3 (IRF-3) is phosphorylated, formed of homodimer and translocates to nucleus. IFN- β induction due to new castle disease virus (NDV) was significantly decreased after the expression of full HCV genome (HCR6-Rz). Similar modification was observed in cell line expressing core to the NS2 protein region (HCR6-Fse). However, this decreasing was not observed in cell line expressing NS2 to the NS5B region (HCR6-Age). IRF-3 dimer formation induced by NDV infection was also suppressed after the expression of HCR6-Rz and HCR6-Fse, but not HCR6-Age. We further analyzed using transiently expressed HCV core, E1 or E2 in HepG2 cells. The suppression of IRF-3 dimer formation was caused by HCV core protein alone. These results indicated that a new crucial biological function of HCV core protein that may be related to persistence and pathogenesis of HCV.