

1. HCV と自然免疫

海老原 敬, 松本 美佐子, 瀬谷 司

北海道大学大学院医学研究科 微生物学講座免疫学分野

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染症は高率に慢性化すること, その結果, 肝硬変・肝癌を発症しうることにその特徴がある. 高率に慢性化する原因としては, ウイルス側の要因と宿主側の要因があるとされてきた. 特に宿主側の要因として, HCV に対する免疫反応 (特に CTL や NK 細胞活性) が弱いことと感染の慢性化には相関があるといわれている. 中でも自然免疫反応の起点である樹状細胞についての報告は多く, HCV の樹状細胞への感染により機能が阻害されている可能性が示唆されている. しかし, 相矛盾する報告もあり現在まで一致した見解には至っていない. 2005年脇田らにより *in vitro* で HCV の培養 (JFH1 株) が可能になり, *in vitro* での自然免疫応答の解析が可能になった. 本総説では HCV による自然免疫制御について現在までの知見を概説するとともに JFH1 株を用いた樹状細胞応答について紹介する.

はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) は+鎖の ssRNA ウイルスであり, フラビウイルス科に属し, 4つの構造蛋白領域 (Core-E1-E2-P7) と6つの非構造蛋白領域 (NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B) で構成される. コアはゲノム RNA を包むカプシドを形成し, E1/E2 はエンベロープ蛋白である. NS2, NS3/NS4A はそれぞれメタロプロテアーゼ活性, セリンプロテアーゼ活性をもち, NS5B は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである. 世界で約 1.7 億人の感染者があり, 世界の人口の ~3% にあたる. 感染者の約 7割が慢性 C型肝炎感染症に至り, 慢性肝炎・肝硬変の主要な原因の一つになっている. そして, 肝硬変患者の ~3% が肝細胞癌へと進展する⁴⁶⁾. HCV 感染症の問題点は高率に慢性化する点と最終的な病態像として癌を発症しうる点にある. HCV 感染症が高率に慢性化する理由は疫学的な研究によりいわゆる

不十分な免疫応答が推測されており^{6,23,52,53)}, 特に樹状細胞を中心に議論がなされてきた⁴³⁾.

樹状細胞は大きく骨髄性樹状細胞 (myeloid dendritic cells: mDC) と形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells: pDC) に分類される. pDC は CpG や ssRNA を認識し I 型インターフェロン (IFN) を産生することを主たる機能としており, mDC は抗原の取り込みと提示によりナイーブ T 細胞活性化のために必須な細胞である²⁾. HCV 患者における樹状細胞機能に関しては現在まで相矛盾する報告がなされており^{3,4,19,20,21,34,35,45,47,57)}, 混沌とした状況である. そもそも mDC や pDC に HCV が感染し, 自然免疫応答を阻害しているかどうかについても一定の見解に至っていない. その原因の一つに HCV を *in vitro* で増殖させる技術がなかったことがあげられる. しかし, 2005年, 脇田らにより感染性 HCV 粒子 (JFH1 株: type 2a) を *in vitro* で作成することが可能になった^{56,60)}. 本稿では抗 HCV 自然免疫応答についての概説と共に, JFH1 株を用いた樹状細胞応答について紹介したい.

連絡先

〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目
北海道大学大学院医学研究科
微生物学講座免疫学分野
海老原 敬
TEL : 011-706-5056
FAX : 011-706-7866
E-mail : ebitaq@med.hokudai.ac.jp

1. 樹状細胞に対する HCV の感染性

HCV 患者の血球を用いて抗 HCV 自然免疫応答の解析なされるようになった当初は, 単球由来樹状細胞 (Monocyte-derived dendritic cells: MoDC) が研究のターゲットであった. MoDC は末梢血より CD14 陽性の単球を用いて IL-4 と GM-CSF にて誘導される樹状細胞であり, 末梢血中 mDC とほぼ同じ細胞表面マーカーを持つ細胞として

表1 HCV患者における樹状細胞機能

樹状細胞機能	HCV患者における機能	参考文献
mDC, MoDC		
細胞数 (mDC)	肝障害があれば減少 不変	22,57 50
樹状細胞の成熟化	減少 不変 肝臓内病変で上昇	3,20 4,34,35 25
MICA/MICBの発現	減少	17
IL12の産生	減少 不変	20,21 4
T細胞刺激能	低下 不変 肝臓内病変で上昇	3,4,19-21 34,35 25
NK細胞刺激能	低下	17
pDC		
細胞数	肝障害があれば減少	22,57
樹状細胞の成熟化	減少	59
T細胞刺激能	減少	59
IFN α の産生	減少 不変	21,57 35

表2 HCV蛋白による自然免疫応答の制御

ウイルス蛋白	機能	参考文献
core	アロ抗原刺激能の低下 (MoDC)	10,48
	単球から mDC への成熟化阻害(MoDC)	10
	IRF1の阻害	8
	TLR2刺激 (マクロファージ)	7
	STAT1の阻害	32,33
	IL12の産生阻害 (マクロファージ)	13,28
NS3	アロ抗原刺激能の低下 (MoDC)	10
	単球から mDC への成熟化阻害(MoDC)	10
	TBK1の阻害	42
	TLR2刺激 (マクロファージ)	7
NS3/4A	IPS-1/MAVS/Cardifの分解	14,31
	TICAM1/TRIFの分解	30
E1	アロ抗原刺激能の低下 (MoDC)	48
E2	PKRの阻害	51
	NK細胞の不活性化	55
	mDC, pDC 遊走能の低下	39
	MoDCの成熟化	61
NS5A	PKRの阻害	15,44
	MyD88の阻害	1

mDCの研究に使用されてきた細胞である¹⁶⁾。HCV患者の末梢血単核球や単球よりHCV genomeを検出できるため²⁹⁾、その単球より誘導したMoDCからもHCV genomeが検出

できるとされた⁴⁾。しかし、その後、HCV患者やHCV感染チンパンジーから誘導したMoDCにHCV genomeを認めなかったとする報告がなされた^{27,34,35)}。MoDCでHCVを

検出したとする報告においても HCV genome のコピー数は非常に少なく、樹状細胞 1000 個あたりたったの 0.1~35 コピー程度しか検出できなかった^{4,40,43}。

mDC には HCV のエントリーレセプターとされる分子のうち、CD81、スカベンジャーレセプター class B type 1、DC-SIGN が発現している^{9,58}。JFH1 株が作成される以前は HCV エンベロップ蛋白である E1/E2 を発現するシュードタイプウイルスで mDC への取り込みが研究された。レンチウイルスにより作成されたシュードタイプウイルスは、DC-SIGN を介して DC に結合し、trans-infection に関与していることが示唆された⁹。VSV シュードタイプウイルスは MoDC には取り込まれるが pDC には取り込まれない。そしてこの取り込みは抗 DC-SIGN 抗体では阻害がからず、マンナン処理で阻害がかかったため未知のレクチンにより取り込まれるとされた¹⁸。バキュロウイルスを用いて作成されたシュードタイプウイルスは MoDC により取り込まれ、MoDC の成熟化を誘導する⁵。このシュードタイプウイルスも抗 DC-SIGN 抗体で阻害がからず、樹状細胞の HCV 取り込みにおける DC-SIGN の関与は否定的だった。

2. HCV による樹状細胞の機能制御

HCV 患者における樹状細胞機能、HCV 蛋白による自然免疫の阻害をそれぞれ表 1、表 2 にまとめた。樹状細胞における HCV の増幅が一致した見解にいたっていない分、HCV 患者における樹状細胞機能についても controversial である。HCV 蛋白による自然免疫の阻害は細胞内と細胞外で機能する。E2 は NK 細胞の CD81 を介して NK 細胞の活性を低下させ⁵⁵、コアと NS3 は樹状細胞からの IL-10 産生を誘導し、アロ抗原提示能を低下させる¹⁰。細胞内の機能については I 型 IFN 応答の阻害機構が研究されている。HCV は +鎖の RNA ウイルスであるため増幅過程で dsRNA が生じる。この dsRNA を検出し I 型 IFN を産生する経路はいくつかの HCV 蛋白により阻害を受ける。RIG-I や MDA5 は dsRNA を感知し、ミトコンドリア上の IPS-1/MAVS/Cardif/ VISA にシグナルを伝え、TBK1 や IKK ϵ を介した IRF3/IRF7 の活性化により I 型 IFN を産生させる²。NS3/NS4A は IPS-1 を分解することで^{14,31}、NS3 は TBK1 を阻害することで I 型 IFN 応答を阻害する⁴²。外来性に取り込まれた dsRNA はエンドソーム内の TLR3 で認識され³⁶、アダプター分子である TICAM1/TRIF を介して TBK1 や IKK ϵ を活性化させ、I 型 IFN を産生させる^{2,37,41}。NS3/4A は TICAM1/TRIF を分解することで TLR3 のシグナルを阻害する³⁰。また、TLR3 以外の TLR のアダプター分子である MyD88 が NS5A によって阻害をうけるという報告もある¹。

mDC に HCV が増幅しているというデータを受け、アデノウイルスベクターを用いて MoDC に HCV 蛋白を発現させ、樹状細胞の機能をみた報告もある。彼らによるとコア

と E1 を発現させた MoDC はアロ抗原提示能が低下しており、その MoDC で刺激を受けた CD4⁺ T 細胞は増殖能や IL-2 産生能が低下する⁴⁸。しかし、別のグループから、コア、E1、E2 を MoDC にアデノウイルスベクターで強制発現させてもアロ抗原提示能も成熟化マーカー (CD80, 83, 86 等) も変化がないと報告された⁵⁴。

樹状細胞の NK 細胞活性化能については報告が限られている。樹状細胞は T 細胞を活性化させるだけでなく、NK 細胞を活性化させ、早期の生体防御に対応する。樹状細胞は IFN α や IL-12 等の液性因子、NK 細胞活性化リガンドである NKG2D リガンドや細胞膜結合型 IL-15 等の細胞同士の接着により NK 細胞を活性化する。ヒト NKG2D リガンドには ULBP1, 2, 3, 4, RAET1G, MICA/B が報告されている。MoDC に IFN α 刺激を行うと、MICA/B の発現が上昇するが、この MICA/B の発現が HCV 患者で低下していることが報告された¹⁷。しかし、筆者らは MoDC に感染するいくつかの RNA ウイルス (麻疹ウイルス、インフルエンザウイルス、RS ウイルス) を MoDC に感染させ、MICA/B の発現を FACS で評価したがその発現誘導は非常にわずかであった¹¹。また、ウイルス感染 MoDC と NK 細胞との共培養を行い、NK 細胞 IFN γ 産生能を評価したが、全ての NKG2D リガンドを抗 NKG2D 抗体で阻害しても、たったの 20% 程度しか阻害がからなかった。すなわち、RNA ウイルス感染において樹状細胞上の NKG2D リガンドは NK 細胞活性化には部分的にしか関与していないことが示唆された。

3. JFH1 株に対する樹状細胞応答

筆者らはまず、in vitro で培養が可能になった JFH 株を用いて MoDC に対する HCV の感染性を評価した¹²。しかし、10 コピーを検出できる real time PCR 法を用いても HCV の増幅は認めず、コアの発現も認めなかった (図 1)。HCV に対して I 型 IFN 応答が起こり、HCV ウイルスの増幅が起こらないという可能性も考えたが、IFN α 産生も炎症性サイトカインである IL-6 の産生も起こらなかった。また、JFH1 株を pDC やマクロファージに接種し HCV の感染性を評価したが、いずれも HCV の増幅を認めなかった。

次に JFH1 株を接種した MoDC を用いて HCV 感染時の樹状細胞機能について解析した。HCV を接種した MoDC では成熟化マーカー (CD80, CD83, CD86) の発現上昇は認めず、アロ抗原刺激能も NK 活性化機能も有意な変化を認めなかった。したがって、JFH1 株が MoDC に直接機能を、樹状細胞機能を制御している可能性は否定的であった。

実際の HCV 感染急性期には HCV 特異的な CTL 応答や NK 細胞の活性化が起こっているため、樹状細胞は抗原の取り込みとともに成熟化しなくてはならない。そこで、HCV 感染細胞が樹状細胞を活性化させているのではないかと考えた。まず、JFH1 株を肝細胞セルライン (Huh7.5.1)

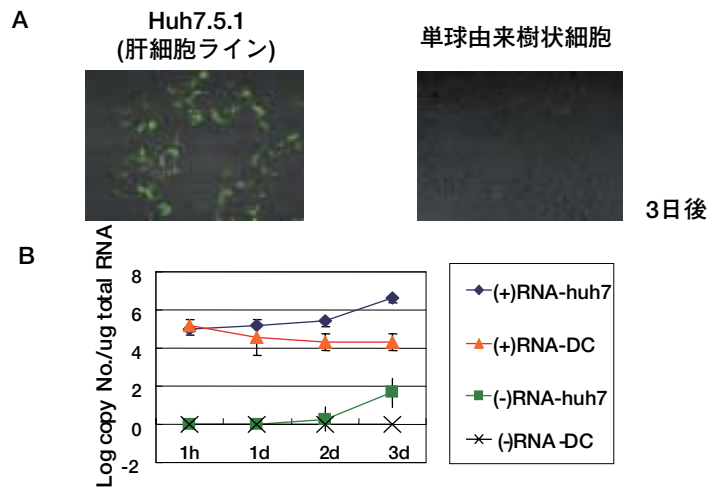


図1 単球由来樹状細胞への JFH1 株の感染性

Huh7.5.1 細胞、単球由来樹状細胞に JFH1 株を moi=1 で接種し、1 時間～3 日後に回収した。

A：抗 HCV コア抗体による免疫染色。B：配列特異的定量 PCR。(文献 12 を改変)

に感染させ、4 日後に回収し樹状細胞と共培養したところ、有意なサイトカイン産生 (IFN α , IL-6) を認めた。しかし、HCV 感染細胞はコントロールの非感染細胞と比べてアポトーシスやネクローシスを起こしているため、この影響で樹状細胞が活性化している可能性を考えた。そのために TNF α とシクロヘキシミドを用いて、HCV 感染細胞と非感染細胞に強いアポトーシスを誘導し、ほとんど全ての細胞がアポトーシスを起こす条件で、樹状細胞応答を解析した。すると、非感染細胞ではアポトーシスを誘導してもほとんど IL-6 産生が起こらないのに対し、HCV 感染細胞ではアポトーシスを誘導したほうが IL-6 の産生が上昇した。すなわち、HCV 感染アポトーシス細胞に樹状細胞を活性化させる因子が存在していることが示唆された。

この HCV 感染アポトーシス細胞は MoDC に IL-6 だけでなく、IFN β の産生も誘導し、アロ抗原刺激能も上昇させ、CD4T 細胞を Th1 優位に分化させ、NK 細胞障害活性も上昇させた。NK 細胞活性化は樹状細胞と NK 細胞を transwell で分けて培養することで活性が消失したため、細胞同士の接着が必須であることが示唆された。

次に HCV 感染アポトーシス細胞が樹状細胞を活性化させる機序を解析した。前述のとおり HCV は + 鎖の RNA ウイルスであり、増幅過程で dsRNA が産生されるため、この dsRNA に着目した。dsRNA を抗 dsRNA 抗体で検出すると HCV 感染細胞にのみ dsRNA の存在を確認できた。この dsRNA はアポトーシス細胞ごと取り込まれ、TLR3 と一部共局在することがわかった。MoDC の TLR3 を siRNA でノックダウンさせたところ、樹状細胞成熟化の指標である IL-6 産生が低下した。したがって、HCV 感染アポトーシス細胞内の dsRNA によりエンドソーム内の TLR3 が活性化

し、樹状細胞の成熟化を誘導されていることが明らかになった。MoDC は dsRNA を直接取り込むという報告があるため^{2,37}、HCV 感染細胞内の dsRNA を Freeze/thaw や sonication により胞体から外に出してやると樹状細胞の成熟化 (CD86 の発現上昇) は起こらなくなった。また、HCV 感染アポトーシス細胞の貪食をメチル β シクロデキストラン (カベオリン経路等のリポドラフト依存的貪食経路阻害剤)、クロロプロマジン (クラスリン経路阻害剤) で抑制すると、メチル β シクロデキストランでのみ樹状細胞の成熟化が抑制された。以上より、HCV 感染アポトーシス細胞内の dsRNA は胞体に包まれたまま、リポドラフト依存的経路で貪食されることが樹状細胞の成熟化に必須であることがわかった (図 2)。実際に HCV 肝炎の病理組織では肝細胞がアポトーシスを起こすことがわかっている²⁴。これらの HCV 感染アポトーシス細胞を樹状細胞が取り込み、dsRNA を介して樹状細胞が活性化することは非常に妥当な現象であり、抗 HCV 免疫誘導システムにおいて TLR3 シグナルの重要性が示唆された。

直接 RNA ウイルスが樹状細胞に感染し、増幅する場合は、細胞内 RNA センサーである RIG-I や MDA5 も総動員され、強烈な I 型 IFN 応答が惹起されるとともに MHC class I を介して内在性のウイルス抗原を T 細胞に提示する。HCV 感染の場合は、*in vivo* でも *in vitro* でも樹状細胞への感染性が低い。肝実質細胞は RIG-I/IPS-1 を発現するが³⁸、HCV はこの細胞質内 IFN 誘導経路を阻害して感染を成立させる^{14,31}。したがって、HCV 感染肝細胞を外來性に取り込むことで樹状細胞が活性化し、外來性抗原を CTL に提示するクロスプレゼンテーションの経路と TLR3 活性化が抗 HCV 生体防御に重要であると考えている。

HCV感染アポトーシス細胞⇒アポトーシス小胞

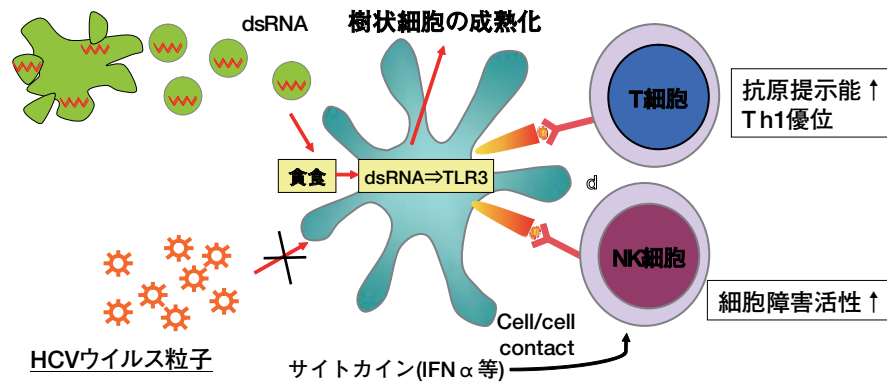


図2 HCV感染アポトーシス細胞による樹状細胞の活性化

HCV (JFH1株)は樹状細胞機能に直接影響を与えない。樹状細胞はHCV感染アポトーシス細胞をリポドラフト依存的貪食経路にて取り込むことにより成熟化が惹起される。HCV感染アポトーシス細胞内にはウイルス増殖によるdsRNAが含まれており、そのdsRNAが樹状細胞エンドソーム内のTLR3と相互作用し、I型IFNや炎症性サイトカインが誘導される。この樹状細胞成熟化の結果としてTh1優位のCD4+T細胞応答が誘導され、NK細胞障害活性が上昇する。

4. おわりに

JFH1株に対する樹状細胞応答の報告は筆者ら以外にShiinaらによっても報告されている⁴⁹⁾。彼らも筆者らと同様にMoDC, pDCでのHCVの増幅を認めず、MoDCの機能低下は認めなかった。しかし、JFH1株で処理したpDCはCpG刺激によるIFN α 応答が低下しており、HVC患者で言われているpDC機能低下の一部が再現された。

これらのJFH1株での結果から、HCV患者で報告されている抗HCV免疫機能低下はHCVの樹状細胞への感染により規定されるものではないことが示唆される。しかし、非常に限られた株での結果であり、DCから検出されやすいHCV株の存在も報告されているので²⁶⁾、HCV株によって異なる結果が得られる可能性もある。チンパンジーでJFH1株による持続性肝炎の発症が再現できなかったこともあり、type 2a以外のHCV株の確立と免疫応答の解析が望まれる。

謝辞

本総説に紹介した研究はJFH1株を頂いた脇田隆字先生との共同研究であり、技術的協力、貴重なご意見を頂きました。また、Dr. Francis V. ChisariよりHuh7.5.1細胞を頂きました。ここに深く深謝いたします。

文献

- 1) Abe T, Kaname Y, Hamamoto I, Tsuda Y, Wen X, Taguwa S, Moriishi K, Takeuchi O, Kawai T, Kanto T, Hayashi N, Akira S, Matsuura Y.: Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *J Virol* 81:8953-8966, 2007.
- 2) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801, 2006.
- 3) Auffermann-Gretzinger S, Keeffe EB, Levy S.: Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 97:3171-3176, 2001.
- 4) Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspe G.: Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 120:512-524, 2001.
- 5) Barth H, Ulsenheimer A, Pape GR, Diepolder HM, Hoffmann M, Neumann-Haefelin C, Thimme R, Henneke P, Klein R, Paranhos-Baccala G, Depla E, Liang TJ, Blum HE, Baumert TF.: Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. *Blood* 105:3605-3614, 2005.
- 6) Chang KM, Thimme R, Melpolder JJ, Oldach D, Pemberton J, Moorhead-Loudis J, McHutchison JG, Alter HJ, Chisari FV.: Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 33:267-276, 2001.
- 7) Chang S, Dolganiuc A, Szabo G.: Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *J Leukoc Biol* 82:479-487, 2007.
- 8) Ciccaglione AR, Stellacci E, Marcantonio C, Muto V, Equestre M, Marsili G, Rapicetta M, Battistini A.: Repression of interferon regulatory factor 1 by hepatitis C virus core protein results in inhibition of antiviral and immunomodulatory genes. *J Virol* 81:202-214, 2007.
- 9) Cormier EG, Durso RJ, Tsamis F, Boussemart L, Manix C, Olson WC, Gardner JP, Dragic T.: L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14067-14072, 2004.

- 10) Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, Marshall C, Do T, Romics L Jr., Mandrekar P, Zapp M, Szabo G.: Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J Immunol* 170:5615-5624, 2003.
- 11) Ebihara T, Masuda H, Akazawa T, Shingai M, Kikuta H, Ariga T, Matsumoto M, Seya T.: Induction of NKG2D ligands on human dendritic cells by TLR ligand stimulation and RNA virus infection. *Int Immunol* 19:1145-1155, 2007.
- 12) Ebihara T, Shingai M, Matsumoto M, Wakita T, Seya T.: Hepatitis C virus-infected apoptotic cells extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T and NK cells. *Hepatology* 48: 2008 in press.
- 13) Eisen-Vandervelde AL, Waggoner SN, Yao ZQ, Cale EM, Hahn CS, Hahn YS.: Hepatitis C virus core selectively suppresses interleukin-12 synthesis in human macrophages by interfering with AP-1 activation. *J Biol Chem* 279:43479-43486, 2004.
- 14) Evans JD, Seeger C.: Cardif: a protein central to innate immunity is inactivated by the HCV NS3 serine protease. *Hepatology* 43:615-617, 2006.
- 15) 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.
- 16) Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5, 987-995.
- 17) Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, Miyagi T, Suzuki T, Sasaki Y, Hayashi N.: Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 170:1249-1256, 2003.
- 18) Kaimori A, Kanto T, Kwang Limn C, Komoda Y, Oki C, Inoue M, Miyatake H, Itose I, Sakakibara M, Yakushijin T, Takehara T, Matsuura Y, Hayashi N.: Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology* 324:74-83, 2004.
- 19) Kakumu S, Ito S, Ishikawa T, Mita Y, Tagaya T, Fukuzawa Y, Yoshioka K.: Decreased function of peripheral blood dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma with hepatitis B and C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 15:431-436, 2000.
- 20) Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M.: Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 162:5584-5591, 1999.
- 21) Kanto T, Inoue M, Miyatake H, Sato A, Sakakibara M, Yakushijin T, Oki C, Itose I, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N.: Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 190:1919-1926, 2004.
- 22) Kanto T, Inoue M, Miyazaki M, Itose I, Miyatake H, Sakakibara M, Yakushijin T, Kaimori A, Oki C, Hiramatsu N, Kasahara A, Hayashi N.: Impaired function of dendritic cells circulating in patients infected with hepatitis C virus who have persistently normal alanine aminotransferase levels. *Intervirology* 49:58-63, 2006.
- 23) Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M.: HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305:872-874, 2004.
- 24) Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D.: Apoptosis in hepatitis C. *J Viral Hepat* 10:335-342, 2003.
- 25) Lai WK, Curbishley SM, Goddard S, Alabraba E, Shaw J, Youster J, McKeating J, Adams DH.: Hepatitis C is associated with perturbation of intrahepatic myeloid and plasmacytoid dendritic cell function. *J Hepatol* 47:338-347, 2007.
- 26) Laporte J, Bain C, Maurel P, Inchauspe G, Agut H, Cahour A.: Differential distribution and internal translation efficiency of hepatitis C virus quasispecies present in dendritic and liver cells. *Blood* 101:52-57, 2003.
- 27) Larsson M, Babcock E, Grakoui A, Shoukry N, Lauer G, Rice C, Walker C, Bhardwaj N.: Lack of phenotypic and functional impairment in dendritic cells from chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *J Virol* 78:6151-6161, 2004.
- 28) Lee CH, Choi YH, Yang SH, Lee CW, Ha SJ, Sung YC.: Hepatitis C virus core protein inhibits interleukin 12 and nitric oxide production from activated macrophages. *Virology* 279:271-279, 2001.
- 29) Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, Berby F, Trabaud MA, Trepo C, Inchauspe G.: In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* 91:3841-3849, 1998.
- 30) Li K, Foy E, Ferreón JC, Nakamura M, Ferreón AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M Jr., Lemon SM.: Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2992-2997, 2005.
- 31) Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ.: Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17717-17722, 2005.
- 32) Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, Blackard JT, Schmidt EV, Chung RT.: Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology* 128:1034-1041, 2005.
- 33) Lin W, Kim SS, Yeung E, Kamegaya Y, Blackard JT, Kim KA, Holtzman MJ, Chung RT.: Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J Virol* 80:9226-9235, 2006.
- 34) Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Albert ML, Rice CM.: Presence of functional dendritic cells in patients

- chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* 103:1026-1029, 2004.
- 35) Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Rice CM, Albert ML.: Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 192:497-503, 2005.
 - 36) Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T.: Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171:3154-3162, 2003.
 - 37) Matsumoto M, Seya T.: TLR3 signaling inducing IFN in response to dsRNA and polyI:C. *Adv Drug Deliv Rev* 60:805-812, 2008.
 - 38) Nakamura M, Funami K, Komori A, Yokoyama T, Aiba Y, Araki A, Takii Y, Ito M, Matsuyama M, Koyabu M, Migita K, Taniguchi K, Fujioka H, Yatsuhashi H, Ishibashi H, Matsumoto M, Seya T.: Increased expression of TLR3 in human intrahepatic biliary epithelial cells at the site of ductular reaction in primary biliary cirrhosis. *Hepatology Internat.* (in press) 2008.
 - 39) Nattermann J, Zimmermann H, Iwan A, von Lilienfeld-Toal M, Leifeld L, Nischalke HD, Langhans B, Sauerbruch T, Spengler U.: Hepatitis C virus E2 and CD81 interaction may be associated with altered trafficking of dendritic cells in chronic hepatitis C. *Hepatology* 44:945-954, 2006.
 - 40) Navas MC, Fuchs A, Schvoerer E, Bohbot A, Aubertin AM, Stoll-Keller F.: Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Med Virol* 67:152-161, 2002.
 - 41) Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T.: TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4:161-167, 2003.
 - 42) Otsuka M, Kato N, Moriyama M, Taniguchi H, Wang Y, Dharel N, Kawabe T, Omata M.: Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* 41:1004-1012, 2005.
 - 43) Pachiadakis I, Pollara G, Chain BM, Naoumov NV.: Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence? *Lancet Infect Dis* 5:296-304, 2005.
 - 44) Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R Jr., Wang C, Ware F, Sodora DL, Gale M Jr.: Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4650-4655, 2002.
 - 45) Piccioli D, Tavarini S, Nuti S, Colombatto P, Brunetto M, Bonino F, Ciccorossi P, Zorat F, Pozzato G, Comar C, Abrignani S, Wack A.: Comparable functions of plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells in chronic hepatitis C patients and healthy donors. *J Hepatol* 42:61-67, 2005.
 - 46) Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL.: Viral hepatitis C. *Lancet* 362:2095-2100, 2003.
 - 47) Rollier C, Drexhage JA, Verstrepen BE, Verschoor EJ, Bontrop RE, Koopman G, Heeney JL.: Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment. *Hepatology* 38:851-858, 2003.
 - 48) Sarobe P, Lasarte JJ, Zabaleta A, Arribillaga L, Arina A, Melero I, Borrás-Cuesta F, Prieto J.: Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. *J Virol* 77:10862-10871, 2003.
 - 49) Shiina M, Rehmann B.: Cell culture-produced hepatitis C virus impairs plasmacytoid dendritic cell function. *Hepatology* 47:385-395, 2008.
 - 50) Szabo G, Dolganiuc A.: Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection. *Immunobiology* 210:237-247, 2005.
 - 51) Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM.: Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285:107-110, 1999.
 - 52) Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pamberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV.: Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15661-15668, 2002.
 - 53) Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV.: Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194:1395-1406, 2001.
 - 54) Thumann C, Schvoerer E, Abraham JD, Bohbot A, Stoll-Keller F, Aubertin AM, Kiény MP.: Hepatitis C virus structural proteins do not prevent human dendritic cell maturation. *Gastroenterol Clin Biol* 32:59-68, 2008.
 - 55) Tseng CT, Klimpel GR.: Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 195:43-49, 2002.
 - 56) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ.: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11:791-796, 2005.
 - 57) Wertheimer AM, Bakke A, Rosen HR.: Direct enumeration and functional assessment of circulating dendritic cells in patients with liver disease. *Hepatology* 40:335-345, 2004.
 - 58) Yamada E, Montoya M, Schuettler CG, Hickling TP, Tarr AW, Vitelli A, Dubuisson J, Patel AH, Ball JK, Borrow P.: Analysis of the binding of hepatitis C virus genotype 1a and 1b E2 glycoproteins to peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Gen Virol* 86:2507-2512, 2005.
 - 59) Yonkers NL, Rodriguez B, Milkovich KA, Asaad R, Lederman MM, Heeger PS, Anthony DD.: TLR ligand-dependent activation of naive CD4 T cells by plasmacytoid dendritic cells is impaired in hepatitis C virus infection. *J Immunol* 178:4436-4444, 2007.
 - 60) Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV.: Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9294-9299, 2005.
 - 61) Zhou Y, Lukes Y, Anderson J, Fileta B, Reinhardt B, Sjogren M.: Hepatitis C virus E2 envelope protein induces dendritic cell maturation. *J Viral Hepat* 14:849-858, 2007.

HCV and innate immunity

Takashi EBIHARA, Misako MATSUMOTO, Tsukasa SEYA

Department of Microbiology and Immunology, Hokkaido University Graduate School of Medicine,
Kita-15, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan

Hepatitis C virus (HCV) is a single-strand, positive sense RNA virus belonging to the flaviviridae family. HCV develops persistent infection in >70% of infected patients, and eventually causes chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma in some patients. Once chronic infection is established in patients with HCV, spontaneous viral clearance fails, although how HCV remains persistently infecting the liver is largely unknown. Insufficient immune response, involving antiviral innate immune response including dendritic cells (DCs), has been focused. A number of controversial studies have been reported as to HCV genome replication and HCV-mediated immune responses in human DCs. A tantalizing point of these earlier studies is the lack of the system for viral propagation in HCV. Recently, an *in vitro* system was exploited to propagate HCV particles using the JFH1 strain. In this review, we review the previous reports about the subversion of innate immunity by HCV and show the innate response of monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) against the JFH1 strain. We could not observe HCV direct interaction with MoDC maturation. MoDCs matured by phagocytosing HCV-infected apoptotic cells containing virus-derived dsRNA, which interacted with TLR3 in the phagosomes. All of these data suggests the importance of TLR3 signal for the induction of anti-HCV innate immunity.