

肝炎ウイルスに対するパターン認識受容体を介する自然免疫認識機構

高岡 晃教^{1,2}, 梶谷 亜美子^{1,2}, 勝山 直哉^{1,3}

1. はじめに

自然免疫研究は、ショウジョウバエの背腹軸の決定に重要な受容体分子であったTollが真菌感染防御に働くという報告や、そのヒトホモログが脊椎動物において発見されたことで革新的な進歩を遂げた¹⁾。ヒトホモログとして知られるToll様受容体 (Toll like receptor: TLR) はその下流で炎症性サイトカインや抗ウイルス活性を有するI型インターフェロン (interferon: IFN) などの発現を誘導する。そしてTLRの他にも自然免疫システムにおける微生物等の認識には数多くのセンサー分子が関与していることが明らかとなってきた。このような自然免疫に関わるセンサー分子群は自然免疫系においてパターン認識受容体 (pattern recognition receptor: PRR) と総称される。PRRのリガンドは、病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular pattern: PAMP) と呼ばれ、宿主とは異なる微生物由来の核酸や脂質、タンパク質などの構成分子が含まれる。PRRを介するシグナルは、免疫細胞以外の細胞においては第一線での感染防御として働く一方で、特に樹状細胞においては適応免疫活性化へ連携させる重要な役割を担っている。ウイルス感染においてはウイルス由来の核酸 (RNA/DNA) がPAMPとなってPRRに認識されることが知られている (図1A)。

図1Aの核酸センサーのなかでもRIG-I (retinoic acid-inducible gene-I) は細胞質においてウイルス由来のRNAを認識することで知られ、インフルエンザウイルスやC型肝炎ウイルスなどヒトに感染症を引き起こす多くのウイル

スの認識に関わる重要なRNAセンサー分子として働く²⁾。RIG-IはDEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box型RNAヘリカーゼに属するPRRであり、そのN末端にCARDドメイン、中央にヘリカーゼドメイン、C末端にC-terminal domain (CTD) を持つ (図1B)。このうちヘリカーゼドメインにはATPase活性がありRIG-Iの活性化に必須であることが知られている。非感染時にはRIG-IのCARDドメインはヘリカーゼドメインの一部分と結合して非活性化型となっているが、RIG-IがCTDを介してウイルス由来のRNAの5'-三リン酸モチーフ (あるいは二リン酸) を認識することでATP依存的な分子内構造変化およびオリゴマー化を生じ、CARDドメインを介してアダプター分子であるMAVS (mitochondrial antiviral signaling) と結合することでシグナルが伝達する³⁾。その後、図1Bに示したように、TBK1 (TANK-binding kinase 1)/IKKε (IκB kinase ε) やIKKα/IKKβ/IKKγの活性化を引き起こし、各々転写因子であるIRF (IFN-regulatory factor)-3/IRF-7およびNF-κB (nuclear factor-κB) の活性化と核移行を誘導し、I型/III型IFN、炎症性サイトカインの発現を来す⁴⁾。

RIG-Iは基本的に約1kb以下の二本鎖RNA (double-stranded RNA: dsRNA) や5'末端に三リン酸 (あるいは二リン酸) を持つRNAを認識する。一方で、RIG-Iと同じRIG-I like receptor (RLR) に属するMDA5はより長いdsRNAを認識するというリガンド特異性があるということがわかっている⁵⁾。

一方で、RIG-Iは、単純ヘルペスウイルスI型やエプスタイン・バーウイルスなどのDNAウイルスの認識にも関与することが示唆されている。この場合、ウイルス由来のATに富んだ配列を持つdsRNAが、宿主のRNAポリメラーゼIIIによって5'末端に三リン酸を持つRNAに変換され、RIG-Iのリガンドとなりうるということが報告されている⁶⁾。

自然免疫系でのウイルスに対する認識は、抗ウイルス応答を引き起こす第一線での重要なプロセスであり、その理解は、感染防御の戦略を考える上で必要となる。本稿ではヒトの肝炎ウイルス、中でもB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus: HBV) とC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) に着目して、自然免疫系によるウイルス認識機構について、我々の最近の知見も含めて概説する。

¹北海道大学遺伝子病制御研究所分子生体防御分野 (〒060-0815 北海道札幌市北区北15条西7丁目)

²北海道大学大学院総合化学院生物化学コース分子医化学講座

³北海道大学大学院医学研究科

Pattern recognition receptor-mediated sensing mechanism during hepatitis virus infection

Akinori Takaoka^{1,2}, Amiko Masuya^{1,2} and Naoya Katsuyama^{1,3}

(¹Division of Signaling in Cancer and Immunology, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido, 060-0815, Japan, ²Molecular Medical Biochemistry Unit, Biological Chemistry and Engineering Course, Graduate school of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University, ³Graduate School of Medicine, Hokkaido University)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880419

© 2016 公益社団法人日本生化学会

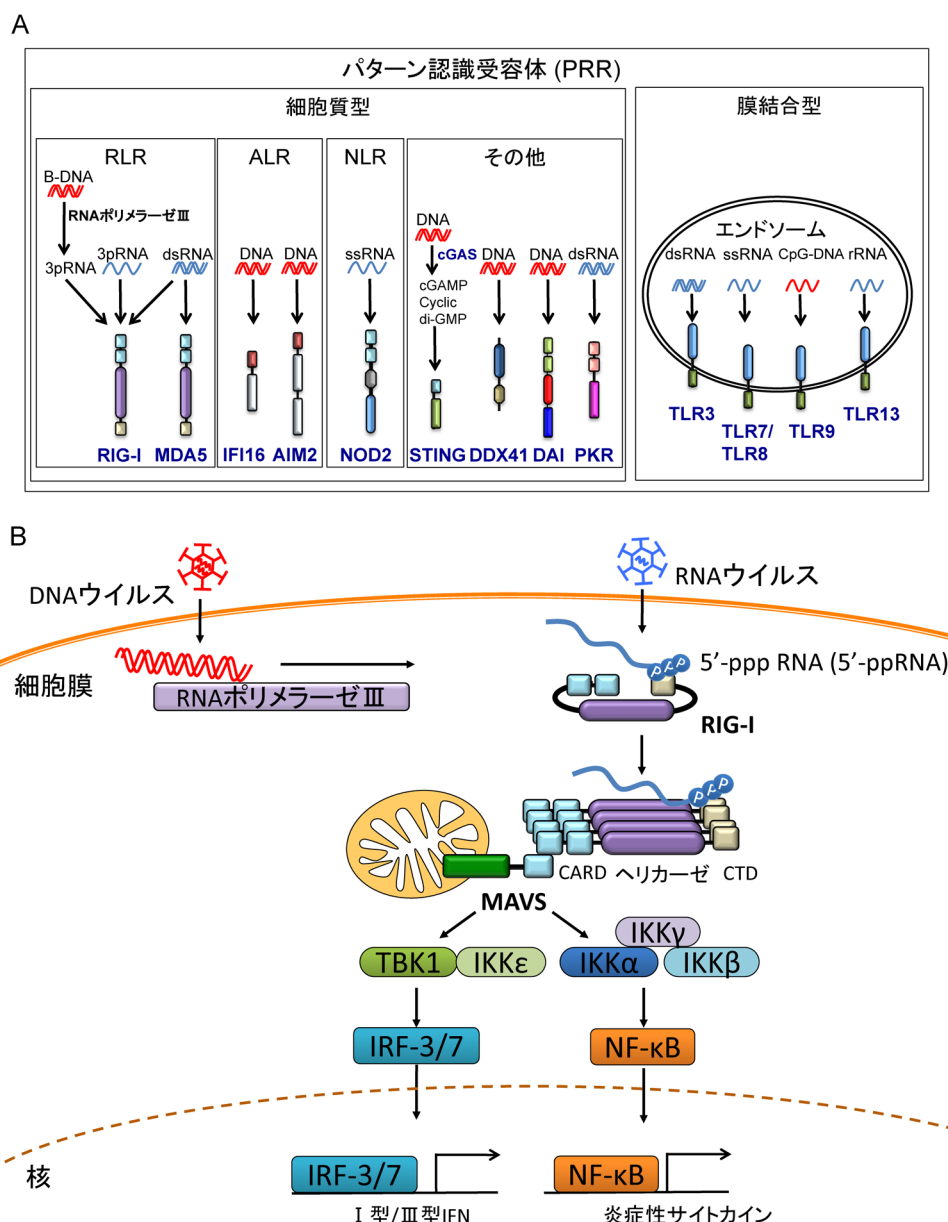


図1 自然免疫核酸認識受容体

(A) 自然免疫系の核酸認識に関わる PRR. 自然免疫系の核酸認識に関わる PRR は膜結合型と細胞質型に分けられる。細胞質型には RLRs, ALRs, NLRs 等が、膜結合型には TLR が含まれる。(B) RIG-I を介する主要なシグナル伝達経路. RIG-I は 5'-三リン酸 (5'-ppp-RNA) あるいは 5'-二リン酸 (5'-pp-RNA) を認識し、CARD ドメインを介してアダプター分子である MAVS と結合する。次にリン酸化酵素 TBK1 や IKK を活性化することで、一つは IRF-3/7 転写因子による I 型/Ⅲ 型インターフェロンを、もう一つは NF-κB 依存的に炎症性サイトカインを発現する。

2. HBV の自然免疫認識機構

HBV は 3.2kb の環状の不完全二本鎖 DNA をゲノムとして持ち、エンベロープを有するウイルスである。全世界において約 4 億人が HBV に持続的に感染していると考えられており⁷⁾、肝炎のみならず、肝硬変や肝臓がんを発症するリスクのあることが知られている。

HBV が細胞に感染すると、そのウイルス DNA は細胞の

核へ輸送される。そこで完全な二本鎖 DNA となると、これを鋳型とし宿主細胞由来の RNA ポリメラーゼの働きによって 4 種類の mRNA が合成される。そのうち最も長い mRNA である プレゲノム RNA (pregenomic RNA : pgRNA) を鋳型にして、今度はウイルス由来の HBV ポリメラーゼ (P タンパク質) が有する逆転写酵素活性を用いてマイナス鎖の DNA が合成され、さらにこのマイナス鎖を鋳型として、P タンパク質のポリメラーゼ活性によりプラス鎖の

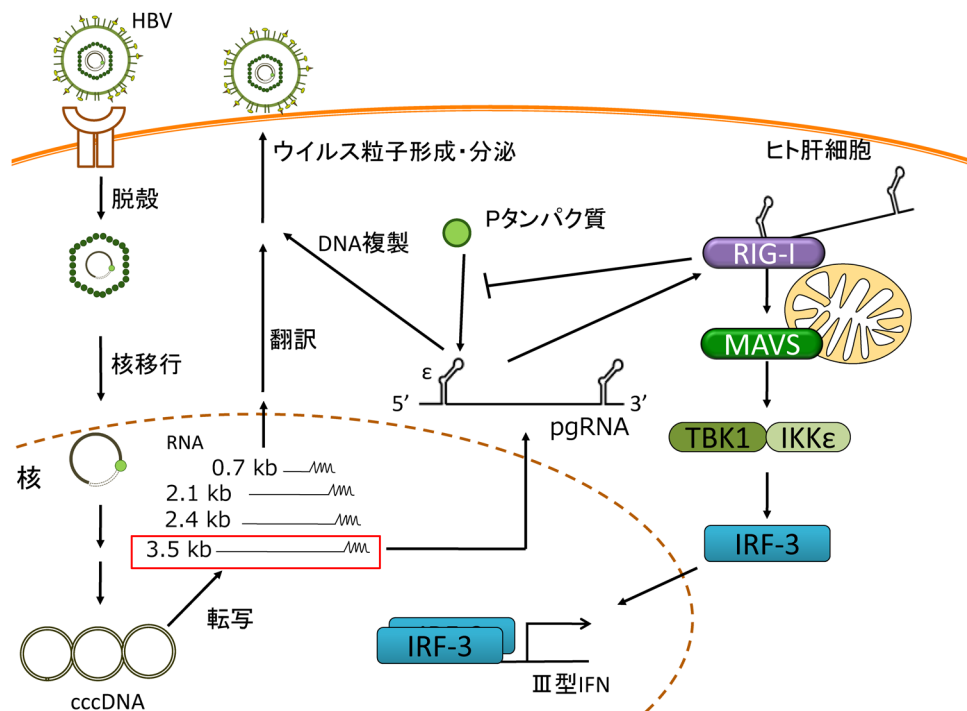


図2 HBVのゲノム複製と自然免疫応答

HBVの複製過程で作られるプレゲノムRNA (pgRNA) の5'末端のステムループ構造 (ϵ 領域) がRIG-Iと直接結合し、下流のアダプタータンパク質であるMAVS, TBK1, IRF-3を介してIII型IFNを誘導する。一方で、RIG-Iは、HBVのPタンパク質とpgRNAの5'末端 ϵ 領域との会合を阻害する。このようにRIG-Iは二つの局面においてHBVに対する感染防御の役割を担う。cccDNA: covalently closed circular DNA.

合成が始まる。そして合成されたHBVゲノムは特異的なエンベロープに覆われ、ゴルジ体を経て細胞外に放出される。

DNAウイルスであるHBVの認識機序は近年まで十分には明らかにされていなかったが、ヒト肝細胞においては細胞質核酸センサーであるRIG-IがHBVを認識するセンサーの一つであることが示された(図2)⁸⁾。上述したような複製過程をたどるHBVのmRNAは長さの違いにより4種類(3.5kb, 2.4kb, 2.1kb, 0.7kb mRNA)に分類される⁹⁾。特に最も長いmRNAはpgRNAと呼ばれ、ウイルスDNAのマイナス鎖の鋳型となりウイルス複製に重要であることが知られるが、RIG-IはこのpgRNAを認識し、その下流であるMAVS, TBK1, IRF-3を活性化させ、IFNを産生することが明らかとなった。また、この際にI型IFNはほとんど検出されないが、弱いレベルではあるもIII型IFN (IFN- λ) が誘導されることが見いだされた。次にこのIII型IFNの誘導がどのような自然免疫センサーを介して誘導されるかを調べた結果、ヒト肝細胞においてはDNAセンサーとして知られているcGAS (cyclic GMP-AMP synthase) やIFI16 (interferon, gamma-inducible protein 16) ではなくRIG-Iが認識を行っていることが明らかとなった。一方、pgRNAは5'末端および3'末端側にステムループ構造 (ϵ 領域) を持ち、いずれもRIG-Iと直接結合するが、このうち5'末端の

ϵ 領域のみがRIG-Iシグナル経路の活性化に関与していることが明らかとなった。なぜ、5'末端の ϵ 領域に結合することがRIG-Iシグナル誘導につながるかについては、今後の解決すべき課題であるが、おそらく5'末端の ϵ 領域の周辺の構造の影響、あるいは5'末端が結合すると考えられる何らかの関連因子の関与も推測される。さらにI型IFNの誘導がほとんど認められず、III型IFNが誘導されるという事実については、興味深い現象である。この現象は、ヒト肝細胞自体の特性である可能性も考えられるが、そのメカニズムについては不明な点が多い。一方、鼻粘膜上皮や肺胞上皮の細胞でもこれと同様に、ウイルス感染時にI型IFNがほとんど産生されず、III型IFNが優勢に発現されるというプロファイルを示す報告があり、肝細胞以外でも同様の現象が起きている可能性がある^{10, 11)}。

その一方でRIG-IはHBVを認識するだけではなく、HBVに対して直接的な抗ウイルス因子として機能していることを示す結果も得られた。RIG-Iが認識するpgRNAの5'末端 ϵ 領域はウイルス複製の際に重要な役割を担っており、HBVのPタンパク質がこの領域に会合することで逆転写が開始される。そこで、我々はRIG-IがこのPタンパク質とpgRNAの5'末端 ϵ 領域との会合を競合的に阻害するのではないかと仮説を立てた。IFN産生誘導が起らない系で解析を進めた結果、RIG-IがPタンパク質と ϵ 領域の結合を

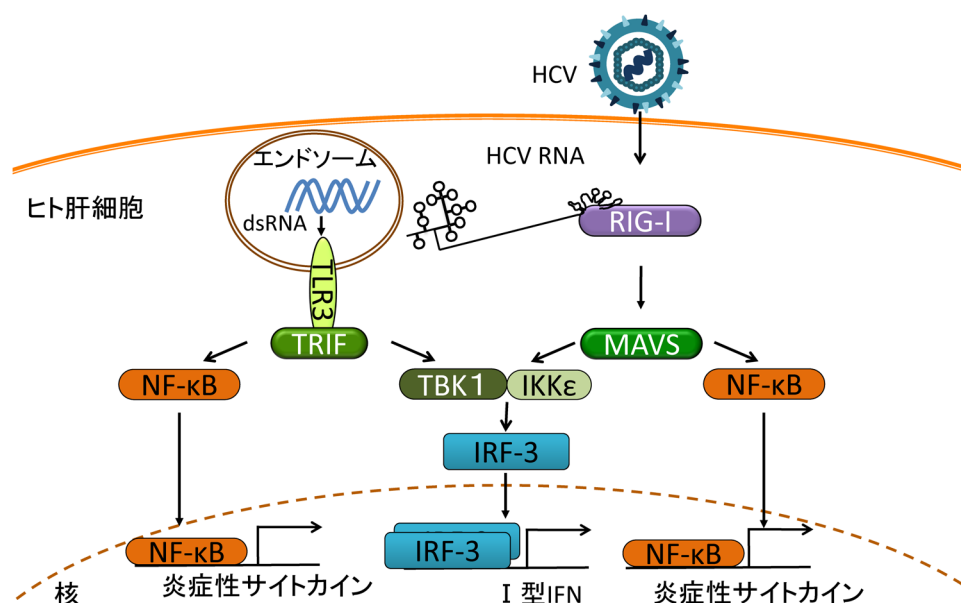


図3 HCVの自然免疫応答

HCVは少なくともRIG-IとTLR3によって認識を受け、I型IFNや炎症性サイトカインの産生などの自然免疫応答が誘導される。HCVが感染すると、はじめにPKRが活性化し、その後、RIG-Iが活性化する。TLR3は感染後期に活性化し、下流にシグナルを伝達する。

直接阻害し、HBVの複製が抑制されることが示唆された。

したがって、ヒト肝細胞においては、RIG-Iはセンサー分子としてその下流で抗ウイルス応答を誘導するのみならず、HBVに対する直接的な抗ウイルス因子としても機能していることを見いだした。今後は、前述したように、HBV感染防御におけるIII型IFN優位な発現誘導の意義やウイルスの自然免疫回避機構についてさらに研究が進められることで新たなHBV感染制御戦略の創出につながることを期待される。

3. HCVの自然免疫認識機構

HCVはフラビウイルス科のヘパシウイルス属に分類される、約9.6kbのゲノムを持つプラス鎖の一本鎖RNAウイルスである。RNAゲノムは5'末端に三リン酸と3'非翻訳領域にpoly-U/UC配列を持っており、約3000アミノ酸からなるポリプロテインをコードしている。このポリプロテインは宿主のペプチダーゼによって構造タンパク質に、ウイルスがコードする二つのプロテアーゼによって非構造タンパク質に翻訳される。非構造タンパク質は細胞内膜で複製複合体を形成し、ゲノムを合成する。合成されたゲノムは、構造タンパク質によってウイルス粒子の中にパッケージングされ、細胞外へと放出される¹²⁾。このようなHCVの生活環での自然免疫認識に関わるセンサーとして、細胞質に存在するRIG-IとPKR (dsRNA-dependent protein kinase)、またエンドソームに存在するTLR3が報告されて

いる。

RIG-IはHCV感染後数時間以内に、5'-三リン酸モチーフを有するHCV RNAを認識することによって、前述したようにRIG-Iが活性化し、MAVSと結合する。その結果、IRF-3やNF-κBといった下流の転写因子が活性化・核移行し、I型IFNや炎症性サイトカインの産生を誘導する(図3)。この場合、5'-三リン酸モチーフとともに構造的に近接して会合するHCV RNAの3'非翻訳領域の中のpoly-U/UC配列もRIG-Iの認識の標的として重要な領域であることが示されている¹²⁾。

PKRはHCV RNAの5'非翻訳領域に存在するIRES (internal ribosome entry site) を構造的に認識するPRRとして働く。PKRがHCV RNAと結合すると、RIG-I非依存的に、MAVSを介して下流のIRFやNF-κBの転写因子を活性化し、抗ウイルス応答が誘導される¹³⁾。なお、PKRによるHCVの認識は、RIG-Iよりも早期になされと考えられているが、RIG-I非依存的なMAVSの活性化機構の詳細についてはまだ明らかになっていない。

TLR3は一般にエンドソームで発現しており(図1A)、dsRNAを認識することで、TLR3は二量体化してアダプタータンパク質のTRIF (Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-β) と会合し、IRF-3やNF-κBを活性化することで、I型IFNや炎症性サイトカイン、ケモカインの誘導を引き起こす。TLR3を異所性発現させた肝がん細胞株(Huh7.5)にHCV(JFH1株)を感染させた実験では、感染3~4日後というウイルス複製の時期に合わせ

てTLR3を介したケモカインや炎症性サイトカインの発現誘導が認められるとの報告がある¹⁴⁾。さらに初代ヒト肝細胞をTLR3のリガンドであるpoly (I:C)で刺激をした際に、サイトカイン誘導が検出されることが示されているが、どのような機序によりエンドソーム内のTLR3がHCV由来のRNAを認識するのか、また実際のヒト肝細胞でのHCV感染時にTLR3がRIG-Iと比較してどの程度関与するのかについては明らかではない。

4. HBV, HCVによる自然免疫回避機構

HBVの複製に必須のタンパク質であることで知られるXタンパク質はMAVSと結合し、MAVSの136番目のリシンのユビキチン化を引き起こし、それを分解させることでRIG-I経路を阻害する。一方でHBVのPタンパク質(HBV-P)にはRIG-IおよびTLR3経路の両方を抑制する働きがある¹⁵⁾。DDX3というDEAD box RNAヘリカーゼはIKK ϵ と相互作用し、TBK1/IKK ϵ の活性を高めることが知られているが、HBV-PはDDX3と会合することでTBK1/IKK ϵ の活性に対して抑制的に作用することが示されている^{15,16)}。

PKRは、翻訳開始複合体eIF2の α サブユニットをリン酸化することで、cap依存的なタンパク質合成を阻害することが知られている。HCVの感染後期にはPKRの活性化を来し、そのキナーゼ依存的にIFN- β などの抗ウイルス作用を示すタンパク質の遺伝子発現を抑制する。一方で、HCVはIRES依存的に遺伝子発現を引き起こすため、eIF2 α のリン酸化には影響を受けずにウイルスタンパク質を発現誘導することができる。NS3/NS4Aプロテアーゼは、MAVSやTRIFを標的として切断することで、各々RIG-IやTLR3の経路を阻害することが知られている。さらにE2タンパク質はそのN末端領域にPKRによるリン酸化を受ける領域と相同な配列を持っており、PKRのキナーゼ活性に対して阻害的に働く。また、NS5Aタンパク質はPKRと会合し、PKRの自己リン酸化を引き起こすことでeIF2 α のリン酸化を阻害する。逆にHCV感染早期には、PKRをキナーゼ活性非依存的に介してMAVS-TRAF3-IRF-3経路を活性化し、ユビキチン様タンパク質であるISG15(interferon-stimulated gene 15)を発現誘導させる¹⁷⁾。ここでは、RIG-Iを必要とせず、IFNの産生は認めないという。以上の結果、ISG15はRIG-Iタンパク質のTRIM25(tripartite motif containing 25)によるユビキチン化を負に制御することで、RIG-Iシグナルを阻害することが報告されている。この場合のPKRの活性化のメカニズムについては明らかにされていない。

5. おわりに

本稿ではヒトに感染する肝炎ウイルスの中でもHBVとHCVに着目して、その自然免疫系における宿主による認識機構について近年の報告を基にレビューした。HBVもHCVも少なくともRIG-Iがヒト肝細胞においてIFNを誘導する自然免疫センサーの一つであると考えられる。一方で、HBV感染時はI型IFNがほとんど検出されず、III型IFNが軽度誘導されることが見いだされた。同様にHCV感染においても実際にはIII型IFNが優位に誘導されることが示されており¹⁸⁾、おそらくヒト肝細胞には、I型IFNの発現が抑制され、III型IFNが誘導される何らかの仕組みがあることが予想される。この意義や分子機序については、今後の興味深い課題であると考えている。さらに、RIG-I経路に対するウイルス回避機構の存在は、その経路の重要性を逆に示唆している。両肝炎ウイルスとも慢性化を引き起こすことで知られているが、ウイルス感染早期の自然免疫回避機構は、感染の持続化を助長させている一つの原因であると予想され、こういった宿主とウイルスとの相互作用を自然免疫シグナルの観点から考えることで、肝炎ウイルス制御の新しい戦略につながる可能性が期待される。

文 献

- 1) Lemaître, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., & Hoffmann, J.A. (1996) *Cell*, **86**, 973–983.
- 2) Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., & Fujita, T. (2004) *Nat. Immunol.*, **5**, 730–737.
- 3) Kawai, T., Takeuchi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K., Takeuchi, O., & Akira, S. (2005) *Nat. Immunol.*, **6**, 981–988.
- 4) Takeuchi, O. & Akira, S. (2010) *Cell*, **6**, 805–820.
- 5) Goubau, D., Schlee, M., Deddouch, S., Pruijssers, A.J., Zillinger, T., Goldeck, M., Schuberth, C., Van der Veen, A.G., Fujimura, T., Rehwinkel, J., Iskarpatyoti, J.A., Barchet, W., Ludwig, J., Dermody, T.S., Hartmann, G., & Reis e Sousa, C. (2014) *Nature*, **514**, 372–375.
- 6) Chiu, Y.H., Macmillan, J.B., & Chen, Z.J. (2009) *Cell*, **138**, 576–591.
- 7) Neuveut, C., Wei, Y., & Buendia, A.M. (2010) *J. Hepatol.*, **52**, 594–604.
- 8) Sato, S., Li, K., Kameyama, T., Hayashi, T., Ishida, Y., Murakami, S., Watanabe, T., Iijima, S., Sakurai, Y., Watashi, K., Tsutsumi, S., Sato, Y., Akita, H., Wakita, T., Rice, M.C., Harashima, H., Kohara, M., Tanaka, Y., & Takaoka, A. (2015) *Immunity*, **42**, 123–132.
- 9) Rehmann, B. & Nascimbeni, M. (2005) *Nat. Rev. Immunol.*, **5**, 215–229.
- 10) Jewell, N.A., Cline, T., Mertz, S.E., Smirnov, S.V., Flaño, E., Schindler, C., Grieves, J.L., Durbin, R.K., Kotenko, S.V., & Durbin, J.E. (2010) *J. Virol.*, **84**, 11515–11522.

- 11) Okabayashi, T., Kojima, T., Masaki, T., Yokota, S., Imaizumi, T., Tsutsumi, H., Himi, T., Fujii, N., & Sawada, N. (2011) *Virus Res.*, **160**, 360–366.
- 12) Horner, S.M. & Gale, M. Jr. (2013) *Nat. Med.*, **19**, 879–888.
- 13) McAllister, C.S. & Samuel, C.E. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 1644–1651.
- 14) Li, K., Li, N.L., Wei, D., Pfeffer, S.R., Fan, M., & Pfeffer, L.M. (2012) *Hepatology*, **55**, 666–675.
- 15) Wang, H. & Ryu, S.W. (2010) *PLoS Pathog.*, **6**, e1000986.
- 16) Yu, S., Chen, J., Wu, M., Chen, H., Kato, N., & Yuan, Z. (2010) *J. Gen. Virol.*, **91**, 2080–2090.
- 17) Arnaud, N., Dabo, S., Akazawa, D., Fukasawa, M., Shinkai-Ouchi, F., Hugon, J., Wakita, T., & Meurs, E.F. (2011) *PLoS Pathog.*, **7**, e1002289.
- 18) Marukian, S., Andrus, L., Sheahan, P.T., Jones, T.C., Charles, D.E., Ploss, A., Rice, M.C., & Dustin, B.L. (2011) *Hepatology*, **54**, 1913–1923.

著者寸描

●高岡 晃教 (たかおか あきのり)



北海道大学遺伝子病制御研究所分子生体防御分野教授。医学博士。

■略歴 1996年札幌医科大学医学院医学研究科博士課程修了。97年より、東京大学大学院医学系研究科免疫学講座のリサーチアソシエイト、その後、同講座の助手、講師を経て、2007年より現職に着任。09年より同所感染癌研究センター長、12年より同所長。

■研究テーマと抱負 自然免疫系における微生物認識機構（パターン認識受容体）および下流のシグナル伝達経路の解明（特に感染や腫瘍分野を中心としている）を研究テーマとし、一人でも多くの患者のためになる研究を目指すことをはじめ、社会に還元できる研究を推進したいと考えている。

■ウェブサイト <http://www.igm.hokudai.ac.jp/sci/>

■趣味 ピアノ。

●榎谷 亜美子 (ますや あみこ)

北海道大学大学院総合化学院修士課程。

■略歴 1993年北海道に生る。2016年北海道大学理学部化学科卒業。

■研究テーマと抱負 ウイルス感染に対する自然免疫応答の解析。

■ウェブサイト <http://www.igm.hokudai.ac.jp/sci/>

●勝山 直哉 (かつやま なおや)

北海道大学大学院医学研究科修士課程。

■略歴 1992年長野県に生る。2016年北海道大学理学部化学科卒業。

■研究テーマと抱負 自然免疫応答シグナルの解析。

■ウェブサイト <http://www.igm.hokudai.ac.jp/sci/>