

厚生労働科学研究研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

C型肝炎ウイルスの感染による肝炎・肝硬変及び
肝がん発生等の病態の解明に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 紀夫

平成16（2004）年 3月

**C型肝炎ウイルスの感染による肝炎・肝硬変及び
肝がん発生等の病態の解明に関する研究**

班員名簿

班長 班員	林 紀夫	大阪大学大学院医学系研究科・分子制御治療学	教授
	下遠野邦忠	京都大学ウイルス研究所	教授
	加藤宣之	岡山大学大学院医歯学総合研究科・ 病態制御科学専攻 腫瘍制御学講座分子生物学	教授
	小原道法	東京都臨床医学総合研究所・生体防御研究部門	室長
	岡本宏明	自治医科大学感染免疫学講座・ウイルス学部門	教授
	岡上 武	京都府立医科大学大学院・消化器病態制御学	教授
	坪内博仁	宮崎大学医学部・第二内科	教授
	森脇久隆	岐阜大学医学部・消化器病態学	教授
	金子周一	金沢大学大学院医学系研究科・がん遺伝子治療学	助教授
	小池和彦 脇田隆宇	東京大学大学院医学系研究科・生体防御感染症学 東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門	助教授 副参事研究員

[事務局]

大阪大学大学院医学系研究科・分子制御治療学
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘二番二号
Tel: 06-6879-3441
Fax: 06-6879-3449

目 次

I. 総括研究報告書

- C型肝炎ウイルスの感染による肝炎・肝硬変及び肝がん発生等の病態の解明に関する研究・・・ 1
林 紀夫

II. 分担研究報告

1. HCV感染回復期血清およびキャリア血清中のHCV粒子に対する抗体に関する研究・・・ 10
岡本 宏明
2. C型肝炎ウイルス複製阻害法の開発に関する研究・・・ 13
小原 道法
3. 遺伝子型2aのHCVレプリコンの複製・・・ 14
脇田 隆字
4. インターフェロン抵抗性HCVレプリコン細胞株に関する研究・・・ 17
加藤 宣之
5. C型肝炎ウイルスタンパク質の複製および細胞増殖に及ぼす機能解析・・・ 21
下遠野 邦忠
6. 樹状細胞サブセットに対するC型慢性肝炎ウイルス感染機構の解析・・・ 23
林 紀夫
7. C型肝炎と糖代謝異常に関する研究・・・ 24
小池 和彦
8. C型慢性肝炎へのIFN/Rib併用療法時のHCV dynamicsの有用性・・・ 27
岡上 武
9. 樹状細胞におけるNKG2D活性化リガンドMICA/Bの発現誘導機構：C型肝炎での
IFN α / β 不応答性におけるIL-15産生障害の意義・・・ 36
林 紀夫
10. C型肝炎ウイルスによる肝炎・肝硬変および肝がんの病態解明に関する研究・・・ 41
金子 周一
11. C型肝炎ウイルスによる肝炎・肝硬変及び肝がんの病態解明に関する研究・・・ 44
森脇 久隆
12. コホートを用いたHCVによる肝細胞障進展因子の解明・・・ 46
坪内 博仁

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 57

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷 66

I .総括研究報告

厚生労働科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
総括研究報告

C型肝炎ウイルスの感染による肝炎・肝硬変及び肝がん発生等の
病態の解明に関する研究

主任研究者： 林 紀夫 大阪大学 教授

研究要旨：3年計画の最終年度にあたる平成15年度は、1) 培養細胞における HCV 増殖システムを用いた薬剤の抗 HCV 効果のスクリーニングとそのメカニズムの解明、2) HCV 発現動物モデルを用いた HCV 感染に伴う病態発生のメカニズムの解明、3) C型肝炎患者における遺伝子発現プロファイルの解析、4) C型肝炎における樹状細胞機能低下のメカニズムの解明を軸に研究を行った。HCV 増殖システムとしては新たに 2a 型レプリコンや IFN 抵抗性のレプリコンが樹立された。HCV の 5'非翻訳領域に対する RNAi やサイクロスポリンによる抗 HCV 効果が明らかにされ、また後者のメカニズムが免疫抑制作用とは独立した現象であることが示された。C型肝炎患者では糖代謝異常が出現することが知られているが、HCV コア遺伝子のマウスでの強制発現が肝性のインスリン抵抗性を生じることが示された。C型肝炎においては樹状細胞機能の多彩な変調が認められ、その一つのメカニズムとして 1 型 IFN による NKG2D 活性化リガンド MICA/B の発現欠損に IL-15 の産生障害が関与していることを明らかにした。また、樹状細胞はある特定の分化段階において HCV 感染に対して感受性になることを示した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は持続感染をきたし、慢性肝炎、肝硬変を経て高率に肝癌を引き起こす。わが国における HCV 感染者は 200 万人以上と推定されており、年間約 3 万人の新規肝発癌が認められている。C型慢性肝炎に対する現在最も有効な治療は IFN とリバビリンの併用療法であるが、C型慢性肝炎の約 1/3 はこれらの治療法にも抵抗性であり、現行の IFN を中心とした C型肝炎の治療のみでは限界があると言わざるを得ない。かかる現状から、今後本邦にて急増が

予想される肝癌の発生を抑止するためには、C型肝炎に対する新しい治療戦略の開発が急務となっており、このためには HCV 感染がもたらす各種病態の詳細な分子機構を解明することが重要である。HCV によって引き起こされる病態の要点をまとめると、1)HCV によって惹起される肝細胞死(肝炎)は、HCV 感染に伴う宿主の免疫反応によって肝細胞障害機構が働くことに加え、肝細胞自身が持続的なウイルス蛋白の発現に曝されることにより肝細胞死に対する感受性に変化が生じる結果もたらされること、

2)HCV が高率に持続感染を引き起こすのは、HCV 自身の抗原性が低いことに加え、HCV 感染に伴い宿主の免疫反応に異常が生じ、十分なウイルス排除機構が働かない結果であること、3) HCV 感染に伴う肝発癌は肝細胞が持続的なウイルス蛋白の発現により細胞応答性の変化を起こすことに加え、繰り返す肝細胞死と肝再生により肝細胞が高癌化状態におかれ、これらの総和として肝細胞が悪性形質転換をきたし、さらに肝臓での免疫監視機構を逃れて画像上認識される肝癌にまで生育すること、の3点が挙げられ、これらのいずれが欠けても HCV 感染の終末像である肝発癌は成立しない。言い換えれば、これらの3点はいずれも独立した C 型肝炎治療のターゲットであり、このうち1つでも制御することができれば肝発癌に対する有効な治療法となりうる。本研究はこの観点に基づき、C 型肝炎患者の病態を多面的に解明しようとするものである。本研究を遂行することにより、C 型肝炎ならびに肝発癌に対する新しい治療戦略が提唱できるものと考えられる。

B. 研究方法

1) 培養細胞での HCV 増殖システムを用いた解析

RNAi を用いた HCV 増殖阻害法の開発：HCV レプリコン細胞に HCV の 5'あるいは 3'非翻訳領域をターゲットにした siRNA を導入し、ノーザンブロットにより複製抑制効果を検討した。

遺伝子型 2a の HCV 増殖システムの開発：遺伝子型 2a の HCV cDNA を劇症肝炎および慢性肝炎患者よりクローニングし、これをもとにレプリコン RNA を作製し Huh7 に

導入した。

サイクロスポリンの抗 HCV 効果の分子機構解析：HCV レプリコンシステムに対するサイクロスポリンの抑制効果を解析した。

IFN 抵抗性レプリコンの開発：HCV レプリコンシステムに低用量の IFN α を長期間投与し、IFN α 抵抗性のクローンを選択し、IFN に対する反応性を解析した。

2) HCV による肝炎および肝発癌の動物モデルの作製とその解析

トランスジェニックマウスを用いた解析：昨年度の脂質代謝異常に関する研究に引き続き、本年度は HCV コア遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いて、糖尿病の発症の有無について解析した。

3) C 型肝炎における遺伝子発現プロファイルの解析

遺伝子発現プロファイルの解析：正常肝組織、HCV 感染慢性肝炎、HCV 関連肝細胞癌、HBV 感染慢性肝炎、HBV 関連肝細胞癌について RNA を調整し、SAGE 法を用いて解析した。

4) C 型肝炎における樹状細胞機能の解析
樹状細胞における HCV 感染に関する研究：健常者の末梢血より種々の樹状細胞を調整し、HCV 被感染能をシュードウイルスおよび HCV 患者血清を用いて解析した。

樹状細胞の免疫制御機構の解析：末梢血の単球分画より GM-CSF および IL-4 を用いて樹状細胞を誘導した。IFN α 刺激後の MICA/B の発現を FACS 解析し、IL-15 の関与を中和抗体を用いて検討した。

5) C 型肝炎治療効果の予測因子の解明
HCV dynamics の解析：IFN/リバビリン療法を行った C 型慢性肝炎患者について治療開始後経時的に HCV RNA 量をリアルタイム

ム PCR にて測定し、HCV RNA 陰性化を予測する因子について検討した。

6) その他

肝癌におけるレチノイン酸に対する反応性に関する研究：ヒト肝癌細胞株を用いてレチノイドレセプターの一つである RXR α の活性化後の細胞死誘導メカニズムについて解析を行った。

HCV 粒子に対する抗体に関する研究：昨年度に開発した中和活性のある HCV 抗体測定系を用いて、HCV 感染チンパンジーの血清中の HCV 中和抗体の有無について解析した。

コホートをを用いた HCV による肝細胞障害機序の解析：昨年度に引き続き T 町住民の追跡調査を行い、HCV 抗体陽性者の予後解析および各種病態と HLA 多様性の関連について解析した。

C. 研究成果と考案

1) 培養細胞での HCV 増殖システムと HCV 関連蛋白の機能解析

RNAi による HCV 複製阻害：5'非翻訳領域に設定した siRNA により、10 nM で 80% の複製阻害が認められた。3'非翻訳領域に対する RNAi では阻害効果が乏しかった。

遺伝子型 2a の HCV レプリコンの IFN 感受性に関する研究：劇症肝炎患者から作成した 2a 型レプリコンは高効率に複製した。このレプリコンは従来の 1b 型レプリコンに比し IFN に抵抗性であった。

サイクロスポリンによる HCV 複製阻害効果：HCV レプリコン複製細胞にサイクロスポリン A を投与することにより、強い HCV 複製阻害効果が観察された。この効果はサ

イクロスポリンの免疫抑制効果とは独立した機構により発揮されることが示された。

IFN 抵抗性 HCV レプリコンの樹立：IFN α 1000~2000 U/mL に対して抵抗性を示すレプリコンを樹立した。これらのレプリコンにおいて NS4B や NS5B に変異が認められ、ウイルス側の要因が IFN α 抵抗性に寄与していることが示された。

2) HCV による肝炎および肝発癌の動物モデルの作製とその解析

トランスジェニックモデルを用いた解析：HCV コアトランスジェニックマウスでは血糖値はコントロールと有意差がなかったが、有意なインスリン抵抗性が認められた。また、高脂肪食負荷を与えることにより、糖尿病を発症した。

3) C 型肝炎における遺伝子発現プロファイルの解析

SAGE を用いて正常肝、HCV および HBV 感染慢性肝炎および関連肝細胞癌の包括的な発現遺伝子プロファイルを作成した。HCV と HBV は、臨床的には慢性肝炎あるいは肝硬変を引き起こし、肝細胞癌を合併するが、その過程で発現している遺伝子は異なっていたことから、発癌にいたる機序も異なっている可能性が示唆された。本研究により、今後 HCV 発癌に関連する遺伝子を解析するためのデータベースが整備された。

4) C 型肝炎における樹状細胞機能の解析

樹状細胞における HCV 感染の解析：シュードウイルスを用いた検討により、DC はある特定の成熟段階において特異的に HCV 感染に対して感受性になることが示された。この HCV 感染のメカニズムとして DC に発現するレクチンが重要な役割を持っていた。

樹状細胞における MICA/B の発現と IL-15 産生能：ヒトの単球分画より誘導した樹状細胞は 1 型 IFN の刺激により MICA/B を発現したが、これは autocrine IL-15 に依存した現象であった。C 型肝炎患者ではこの IL-15 の産生が低下しており、これにより MICA/B 発現が起こらないことが示された。

5) HCV dynamics による IFN/リバビリン 治療効果の予測

治療開始 1 日後の HCVRNA 量を測定することにより 1 ヶ月後の HCVRNA の陰性化と同等の治療効果の予測が可能であった。

6) その他

肝癌におけるレチノイン酸に対する反応性に関する研究：肝癌においては、RXR α の下流のシグナルとして、STAT1 が IFN に対する感受性を高めることによりアポトーシスに導き、組織 transglutaminase は核内転写調節因子群を架橋することにより失活化させ細胞死を誘導することを見出した。

HCV 粒子に対する抗体に関する研究：2 頭のチンパンジーにおいて、HCV 感染初期には HCV 粒子と結合し得る抗体は陰性であったが、8 ヶ月後から 8 年後の血清では抗体が検出された。

コホートを用いた HCV による肝細胞障害機序の解析：HCV RNA 陽性者は陰性者に比し、HLA-B*0702、HLA-DRB1*0406 の頻度が少なく、HLA-B*1501 の頻度が高かった。肝機能正常者からは 169 名中 1 例の肝細胞癌の発生を認めたと、肝機能異常者からは 342 例中 26 例に肝細胞癌の発生をみた。

D. 結論

HCV レプリコンシステムについては、劇症

間患者から樹立した 2a 型のレプリコンと IFN により選択を加えたレプリコンが新たに樹立されており、ともに IFN に対して抵抗性を示すことから、IFN に対するウイルス側の抵抗機序を解析する上で有用なツールになることが期待される。また、HCV レプリコンシステムは HCV 増殖阻害薬剤のスクリーニングやその抗 HCV 機序の解明に極めて有用であり、本年度の研究においても siRNA が HCV 複製阻害に有用であることや、サイクロスポリン A にその免疫抑制活性とは独立した抗 HCV 活性があることが示された。

HCV コア蛋白が HCV 感染症の各種病態に与える影響として、本年度は糖代謝異常を取り上げ、HCV コア蛋白の肝臓での発現が個体レベルでインスリン抵抗性を惹起することを明らかにした。HCV 感染者では種々の程度の糖代謝異常を合併するが、その発生機構を解明していく上で示唆に富む成果である。

免疫学的な検討としては、樹状細胞は特定の分化段階において HCV 感染に対して感受性となることを明らかにした。また、HCV 感染者における樹状細胞機能低下に重要な役割を持っていると考えられる MICA/B の発現低下に IL-15 の産生不全があることを示した。

IFN/リバビリン治療については、早期の治療効果予測因子の同定が期待されているが、治療 24 時間後の dynamics が効果予測に有用であることを示した。

E. 研究発表

1. Nakamura M, Wang J, Murrakami T,

- Ajiki T, Hakamata Y, Kaneko T, Takahashi M, Okamoto H, Mayumi M, Kobayashi E: DNA immunization of the grafted liver by particle-mediated gene gun. *Transplantation* 76: 1369-1375, 2003
2. Kyoko Tsukiyama-Kohara, Shigenobu Tone, Isao Maruyama, Kazuaki Inoue, Asao Katsume, Hideko Nuriya, Hiroshi Ohmori, Jun Ohkawa, Kazunari Taira, Yutaka Hoshikawa, Futoshi Shibasaki, Michael Reth, Yohsuke Minatogawa and Michinori Kohara. Activation of the CKI-cdk-Rb-E2F Pathway in Full-Genome Hepatitis C Virus Expressing Cells. *J. Biol.Chem.* (2004) inpress.
 3. Takeshi Tanaka, Kazuaki Inoue, Yukiko Hayashi, Aki Abe, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Hideko Nuriya, Yoshikazu Aoki, Ryuji Kawaguchi, Kiichi Kubota, Makoto Yoshiba, Morio Koike, Satoshi Tanaka, and Michinori Kohara. Virological significance of low level hepatitis B virus infection in patients with hepatitis C liver disease. *J. Med. Virol.*(2004) 72: 223-229.
 4. Yoichi Hiasa, Yoshitaka Kamegaya, Hideko Nuriya, Morikazu Onji, Michinori Kohara, Emmett V Schmidt, Raymond T Chung. PKR is increased and is functional in Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. *Amer. J. Gastroenterology.* (2003) 98: 2528-2534.
 5. Shun Takaku, Yohko Nakagawa, Masumi Shimizu, Yoshihiko Norose, Isao maruyama, Takaji Wakita, Teruo Takano, Michinori Kohara and Hidemi Takahashi. Induction of hepatic injury by HCV structural protein-specific CD8+ class I MHC molecule-restricted murine CTLs in transgenic mice expressing the HCV structural genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) 301(2):330-337.
 6. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, Wakita T. Efficient Replication of the Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon. *Gastroenterology* 2003, 125:1808-1817.
 7. Takaku S, Nakagawa Y, Shimizu M, Norose Y, Maruyama I, Wakita T, Takano T, Kohara M, Takahashi H. Induction of hepatic injury by hepatitis C virus-specific CD8+ murine cytotoxic T lymphocytes in transgenic mice expressing the viral structural genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 301:330-337
 8. Zhao Z, Wakita T, Yasui K. Inoculation of plasmids encoding Japanese encephalitis virus PrM-E proteins with colloidal gold elicits a protective immune response in BALB/c mice. *J Virol* 2003 77:4248-4260
 9. Kato T, Miyamoto M, Furusaka A, Date T, Yasui K, Kato J, Matsushima S, Komatsu T, Wakita T. Processing of Hepatitis C Virus Core Protein is regulated by its C-terminal Sequence. *J Med Virol* 2003 69:357-366
 10. Naganuma, A., Dansako, H., Nakamura, T., Nozaki, A., and Kato, N. Promotion of microsarellite instability by hepatitis C virus core protein in human non-neoplastic hepatocyte cells. *Cancer Res.*, (2004) in press.

11. Kato, N., Sugiyama, K., Namba, H., Dansako, H., Nakamura, T., Takami, M., Naka, K., Nozaki, A., and Shimotohno, K. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2003) 306, 756-766.
12. Suzuki, K., Aoki, K., Ohnami, S., Yoshida, T., Kazui, T., Kato, N., Inoue, K., Kohara, M., and Yoshida, T. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon alpha improves dimethinitro-samine-induced liver cirrhosis in rat model. *Gene Ther.*, (2003) 10, 765-773.
13. Suzuki, K., Aoki, K., Ohnami, S., Yoshida, K., Kazui, T., Kato, N., Inoue, K., Kohara, M., and Yoshida, T. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon alpha inhibits hepatitis C virus replication in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2003) 307, 814-819 (2003)
14. Nozaki, A., Ikeda, M., Naganuma, A., Nakamura, T., Inudoh, M., Tanaka, K., and Kato, N. Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. *J. Biol. Chem.*, (2003) 278, 10162-10173.
15. Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 38 :1282-1288. 2003
16. Watashi K, Hijikata M, Tagawa A, Doi T, Marusawa H, Shimotohno K. Modulation of retinoid signaling by a cytoplasmic viral protein via sequestration of Sp110b, a potent transcriptional corepressor of retinoic acid receptor, from the nucleus. *Mol Cell Biol*. 23 :7498-7509.2003
17. Kato N, Sugiyama K, Namba K, Dansako H, Nakamura T, Takami M, Naka K, Nozaki A, Shimotohno K. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003, 306:756-66.
18. Miyanari Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotohno K. Hepatitis C virus Non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral RNA replication. *J Biol Chem*. 2003
19. Ohshima T, Shimotohno K. TGF- β mediated signaling via the p38 MAP kinase pathway activates Smad-dependent transcription through SUMO-1 modification of Smad4. *J Biol Chem*. 2003
20. Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T. Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology* 38:820-828, 2003.
21. Moriishi K, Okabayashi T, Nakai K, Moriya K, Koike K, Murata K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki R, Miyamura T, Matsuura Y. PA28 γ -dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. *J Virol* 77:10237-10249, 2003.
22. Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004 in

- press.
23. Murakami Y, Minami M, Daimon Y, et al. Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol* 72(2): 203-214, 2004
 24. Yamaguchi K, Itoh K, Ohnishi N, et al. Engineered long terminal repeats of retroviral vectors enhance transgene expression in hepatocytes in vitro and in vivo. *Mol Ther* 8(5): 796-803, 2003
 25. Kirishima T, Okanoue T, Daimon Y, et al. Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *J Hepatol* 37(2): 259-265, 2002
 26. Ohnishi N, Itoh K, Itoh Y, et al. High expression of transgenes mediated by hybrid retroviral vectors in hepatocytes: comparison of promoters from murine retroviruses in vitro and in vivo. *Gene Ther* 9(4):303-306, 2002
 27. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Kimura R, Miyagi T, Mochizuki K, Sasaki Y, Hayashi N. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int J Cancer* 104:354-361, 2003.
 28. Suzuki T, Takehara T, Ohkawa K, Ishida H, Jinushi M, Miyagi T, Sasaki Y, Hayashi N. Intravenous injection of naked plasmid DNA encoding hepatitis B virus (HBV) produces HBV and induces humoral immune response in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 300:784-788, 2003.
 29. 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 interferon α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: Impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 170:1249-1256, 2003.
 30. Miyagi T, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Suzuki T, Jinushi M, Sugimoto Y, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. CD1d-mediated stimulation of natural killer T cells selectively activates hepatic natural killer cells to eliminate experimentally disseminated hepatoma cells in murine liver. *Int J Cancer* 106: 81-89, 2003.
 31. Iyoda K, Sasaki Y, Horimoto M, Toyama T, Yakushijin T, Sakakibara M, Takehara T, Fujimoto J, Hori M, Wands JR, Hayashi N. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 97: 3017-3026, 2003.
 32. Hosui A, Ohkawa K, Ishida H, Sato A, Nakanishi F, Ueda K, Takehara T, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Hepatitis C virus core protein differentially regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon- γ stimuli. *J Biol Chem* 278: 28562-28571, 2003.
 33. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Suzuki T, Miyagi T, Hayashi N. Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated

- dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *J Immunol* 171: 5423-5429, 2003.
34. K Masutomi, E Y Yu, S Khurts, I Ben-Porath, J L Currier, G B Metz, M W Brooks, S Kaneko, S Murakami, J A DeCaprio, R A Weinberg, S A Stewart, W C Hahn. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114(2): 241-253, 2003.
 35. U Fuchizaki, S Kaneko, Y Nakamoto, Y Sugiyama, K Imagawa, M Kikuchi, and K Kobayashi. Synergistic antiviral effect of a combination of mouse interferon- α and interferon- γ on mouse hepatitis virus. *J Med Virol* 69: 188-194, 2003.
 36. Y Nakamoto, S Kaneko, H Takizawa, Y Kikumoto, M Takano, Y Himeda, and K Kobayashi. Analysis of the CD8-positive T cell response in Japanese patients with chronic hepatitis C using HLA-A*2402 peptide tetramers. *J Med Virol* 70(1): 51-61, 2003.
 37. M Hirano, S Kaneko, T Yamashita, H Lou, W Qin, Y Shiota, T Nomura, K Kobayashi, and S Murakami. Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B. *J Biol Chem* 278(7): 5109-5115, 2003.
 38. Matsushima-Nishiwaki R, Okuno M, Takano Y, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H. Molecular mechanism for growth suppression of human hepatocellular carcinoma cells by acyclic retinoid. *Carcinogenesis* 24: 1353-1359, 2003
 39. Adachi S, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Takano Y, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Okano Y. Phosphorylation of retinoid X receptor suppresses its ubiquitination in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 35, 35: 332-340, 2002.
 40. Yasuda I, Shiratori Y, Adachi S, Obora A, Takemura M, Okuno M, Shidoji Y, Seishima M, Muto Y, Moriwaki H. Acyclic retinoid induces partial differentiation, down-regulates telomerase reverse transcriptase mRNA expression and telomerase activity, and induces apoptosis in human hepatoma-derived cell lines. *J Hepatol* 36: 660-671, 2002
 41. Obora A, Shiratori Y, Okuno M, Adachi S, Takano Y, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda I, Yamada Y, Akita K, Sano T, Shimada J, Kojima S, Okano Y, Friedman SL, Moriwaki H. Synergistic induction of apoptosis by acyclic retinoid and interferon- β in human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 36: 1115-1124, 2002
 42. Akita K, Okuno M, Enya M, Imai S, Moriwaki H, Kawada N, Suzuki Y, Kojima S: Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF- α /kallikrein mediated activation of latent TGF- β . *Gastroenterology* 123: 352-364, 2002
 43. Yoshihiro Tahara, Akio Ido, Shojiro Yamamoto, Yoshifumi Miyata, Hirofumi Uto, Takeshi Hori, Katsuhiko Hayashi and Hirohito Tsubouchi. Hepatocyte growth factor facilitates colonic mucosal repair in experimental ulcerative colitis in rats. *Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics*

2003:307:146-151

44. Masaaki Onaga, Akio Ido, Satoru Hasuike, Akihiro Moriuchi, Kenji Nagata, Takeshi Hori, Katsuhiko Hayashi, Hirohito Tsubouchi. Osteoactivin, expressed during cirrhosis development in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet, accelerates motility of hepatoma cells. *J Hepatol.* 2003;39: 779-785

Ⅱ.分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

HCV 感染回復期血清およびキャリア血清中の HCV 粒子に対する抗体に関する研究

分担研究者 岡本宏明 自治医科大学教授

研究要旨

免疫沈降法および HCV RNA 定量測定法を用い、HCV 抗体高力価陽性の HCV 感染回復期血清および HCV キャリア血清について、遊離型 native HCV 粒子（遺伝子型 1b、あるいは 2b）に対する結合活性を測定した。その結果、HCV 感染回復期血清と同様に、持続感染状態の血清中にも HCV 粒子と結合しうる抗体が存在することが分かった。HCV (1b 型) を inoculum とする感染実験によりキャリア化した 2 頭のチンパンジーにおいて、HCV 粒子 (1b 型) と結合しうる抗体は感染初期には 2 頭でともに陰性であったが、チャレンジ後 8 ヶ月から 8 年の血清中では遺伝子型特異的に検出され、同一遺伝子型の異なる HCV 株を抗原とした場合にも検出可能であった。HCV 粒子に対する抗体は HCV の感染防御に役立つものと期待され、本研究の結果は今後の HCIG 開発研究の更なる進展に資するものと考えられる。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染予防については、能動免疫を担う HB ワクチンが開発され、受動免疫を担う高力価ヒト HBs 抗体含有免疫グロブリン製剤 (HBIG: hepatitis B immune globulin) が用いられ、母児間感染防御や院内感染予防などに於いて期待通りの成果が得られている。それに対して、C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染に於いては、このウイルスが多様性に富み、しかもインフルエンザウイルスやヒト免疫不全ウイルス (HIV) のように変異しやすいウイルスであることも一因となり、予防手段の要であるワクチン開発は難航している。受動免疫を担う HCV 中和抗体含有免疫グロブリン製剤、HCIG の研究開発も進んでいない。培養系や発現系によるウイルス粒子の産生は研究途上であって、大量入手が困難で、native なウイルス粒子の表面抗原に対する抗体 (中和抗体) をルーチンに測定する系も確立されていないのが現状である。そこで、現時点で実施可能な手法を用いて、ウイルス粒子に対する抗体が HCV 感染回復期患者血清中および HCV キャリアの血清中に存在することを実証し、その性状を解析することを本研究の目的とした。本年度は特にキャリア血清中の HCV 粒子に対する抗体について検討した。

B. 研究方法

1. 遊離型 HCV 粒子含有血清

前年度と同様に、native の HCV 粒子と結合する抗体を免疫沈降法によって測定することを目的とし、免疫複合体 (immune complex) 型の HCV 粒子を含まず、主として遊離型 (free form) の virions から構成されている HCV 感染初期の血清として、血清検体 HC1, HC2 および Ch-1 を用いた。HC1 と HC2 は前年度も使用した血清である。Ch-1 は HCV 感染実験により感染し、キャリア化したチンパンジー (CH413) (Okamoto et al. Virology 190:894-899, 1992 に記載済み) の感染初期血清に由来する。この検体は第 2 世代 HCV 抗体 (HCV core 蛋白や非構造蛋白としての NS3, NS4 蛋白などに対する抗体) が陰性で、HCV RNA は 5.8×10^6 copies/ml)。また、HCV genotype は 1b 型であった。

2. 血清検体

HCV 感染回復期血清として、HCV 抗体が高力価陽性 (PHA titer: $2^{10} \sim 2^{14}$) で HCV RNA が陰性の 32 検体、および HCV 抗体低力価陽性 (PHA titer: $2^6 \sim 2^8$) で HCV RNA が陰性の 10 検体を用いた。HCV RNA は血清 1ml より核酸を抽出し、nested RT-PCR 法により測定した (Hepatology 20:1131-1136, 1994)。Genotype 1b のキャリア血清 (HCV RNA 陽性) として 20 検体、genotype 2a のキャリア血清 (HCV RNA

陽性)として 20 検体を用いた。陰性コントロールとして、HCV 抗体および HCV RNA がともに陰性の血清 10 検体を用いた。

また、HCV 感染実験によりキャリア化した 2 頭のチンパンジー (CH413、CH197) (Virology 190: 8945-899, 1992; 195: 297-301, 1993; 204: 665-672, 1994) の感染初期から感染後 8 年目までの時系列検体を用いた。

3. 血清サンプルからの IgG 分画の精製

検体固有の HCV 粒子を予め除くことを目的として、今回使用した血清検体全て、すなわち HCV 感染回復期血清 42 検体、キャリア血清 40 検体および陰性コントロール 10 検体について、IgG 分画を精製した。精製 IgG 分画を得るために、それぞれの血清検体を生食で 5 倍に希釈し、70,000 回転で 2 時間遠心したのち、その上清を抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体 (G19: 特殊免疫研究所) を結合した affinity column に apply した。精製 IgG 分画を $OD_{280}=2.0$ に調整し、以下の免疫沈降法に供した。なお、HCV キャリア血清より調整した IgG 分画 ($OD_{280}=2.0$) 50 μ l について、nested RT-PCR 法により HCV RNA を検出し、40 検体いずれも検出感度以下であることを確認した。

4. 免疫沈降法

前年度までと同様に、遊離型 HCV 粒子含有血清 (HC1、HC2、あるいは Ch-1) を生食で 10 倍に希釈し、10% 溶液とした HCV RNA 陽性血清 10 μ l に各検体より精製した IgG 分画 ($OD_{280}=2.0$) 50 μ l を加え、37°C で 2 時間反応したのち、ヒト IgG に対するヤギ抗血清 (goat antiserum to human IgG [ICN/Cappel]) を 50 μ l 添加し、37°C で 30 分間反応した。微量遠心機を用いて 10,000 回転で 5 分間遠心し分離したのち、上清と沈澱から別々に核酸を抽出し、HCV RNA を定量測定した。コントロールとして、抗ヒト IgG ヤギ血清の代わりに正常ヤギ血清 (normal goat serum) を用いた。

5. HCV RNA の定量測定

TRIzol-LS 試薬 (Invitrogen) を用いて RNA を抽出し、LightCycler System (Roche) を用いて既報の real-time detection PCR 法 (Hepatol Res 23:105-114, 2002) により HCV RNA を定量的に測定した。

(倫理面への配慮)

研究用血清検体の採取に際して、インフォームド

コンセントが得られている。そして、検体提供者は不特定化されているため、個人のプライバシーを侵害することはなく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1. HCV 感染回復期血清および HCV キャリア血清中の HCV 粒子に対する抗体の測定

前年度までの方法に準拠し、Genotype 1b の遊離型 native HCV virions を高力価で含む HC1 血清に、HCV キャリア血清 (T153) より精製した IgG 分画を加え、さらに抗ヒト IgG ヤギ血清を添加し、遠心分離したところ、HCV RNA の 47.2% (3 重測定: 45.1%, 49.0%, 47.5% の平均値) が沈澱分画で回収された。それに対して、抗ヒト IgG ヤギ血清の代わりに正常ヤギ血清を添加した場合には、上清で 99.9% の HCV RNA が検出され、キャリア血清から精製した IgG 分画の代わりに正常血清から精製した IgG 分画を反応させた場合にも 99.7% の HCV RNA が上清で検出された。以上の結果から、HCV キャリア血清から精製した IgG 分画を用いた場合にも前年度と同様に、免疫沈降法により血清中の HCV 粒子に対する抗体を測定することが可能であることが確認された。そして、T153 血清は 47.2% の HCV (HC1) 粒子に対する結合活性を有することが分かった。

そこで、同様の方法を用いて、HCV 感染回復期血清 42 検体、HCV キャリア血清 40 検体、陰性コントロール 10 検体について、遊離型 native HCV 粒子 (HC1) に対する結合活性を測定した。その結果、HCV 抗体と HCV RNA の両者が陰性のコントロール血清 10 検体および genotype 2a のキャリア血清 20 検体、さらに HCV 抗体低力価陽性 (PHA: 2^6-2^8) の回復期血清 10 検体ではいずれも結合活性は 3% 未満に過ぎず、陰性と判定した。それに対して、HCV 抗体高力価陽性の感染回復期血清では 32 検体中 12 検体で 20% 以上の結合活性が認められ、最高 68.1% の結合活性を示す検体も認められた (3 検体が 50% 以上の結合活性を示した)。さらに、免疫沈降反応の抗原として用いた HCV 粒子と同じ genotype 1b の HCV キャリア血清 20 検体でも HCV 粒子に対する結合活性が認められ、20 検体中 5 検体が 20-40% の結合活性を示した。逆に、免疫沈降反応の抗原として genotype 2b を用いて HCV 粒子に対する抗体を測定した場合には、genotype 1b

のHCVキャリア血清20検体ではHCV粒子に対する結合活性が認められず、genotype 2aのHCVキャリア血清20検体中3検体が20%前後の結合活性を示した。

3. HCVキャリアチンパンジーでのHCV粒子に対する抗体の測定

HCV(1b型)陽性血清を共通のinoculumとして感染実験によってキャリア化した2頭のチンパンジー(CH413, CH197)において、1b型のfree-form native HCV粒子(CH413の感染初期血清:HCV RNA titer, 5.8×10^6 copies/ml)と結合しうる抗体は感染初期には2頭でともに陰性であったが、チャレンジ後8ヶ月から8年の血清中では再現性をもって検出された。すなわち、チンパンジーCH413は、チャレンジ前、チャレンジ後1ヶ月ではHCV粒子との結合活性がそれぞれ0.3%と0.2%に過ぎなかったが、8ヶ月目には21%、4年後には51%、そして8年後には29%の結合活性を示した。同様に、チンパンジーCH197でも、チャレンジ後1ヶ月目にはHCV粒子(Ch-1)との結合活性は1.1%に過ぎなかったが、4年後と8年後にはそれぞれ47%と41%の結合活性を示した。同じ遺伝子型1bではあるが、異なるHCV strainのHCV粒子(HC1)を抗原として免疫沈降反応を行った場合にも、両チンパンジーにおいて、4年以降の検体で20-30%の結合活性が認められた。それに対して、2b型のHCV粒子を抗原として免疫沈降反応を行った場合には、2頭のチンパンジーにおいて解析した全てのポイントでHCV粒子に対する抗体は陰性であった。

D. 考察

今年度の研究により、HCV抗体高力価陽性HCV感染回復期血清と同様に、HCVキャリアの血清中にもnative HCV粒子と結合しうる抗体が存在することが明らかになった。静注用免疫グロブリン製剤によるHCV感染例がこれまでに世界各地で報告されているが、第一世代、第二世代のHCV抗体測定系によるスクリーニング検査を実施する以前のlotでは静注後の肝炎発症はなかったことが知られている。そのため、抗体スクリーニングによるマイナスの効果として、結果的に中和抗体を除くことに繋がった可能性が指摘されている(Yu et al. Lancet 345:1173-1174, 1995)。また、最近、Bartoschら(Proc Natl Acad Sci USA

100:14199-14204, 2003)は、HCV E1およびE2糖蛋白を粒子表面にもつretrovirusのpseudotype粒子を用い、その粒子が培養細胞(Huh-7細胞)へ感染するのを阻止しうる抗体(中和抗体)がキャリア血清中に存在することを示している。

したがって、本研究での免疫沈降法によって測定したキャリア血清のnative HCV粒子に対する結合活性は、ウイルス粒子に対する中和抗体の存在を示唆していると考えられる。本研究において存在を明らかにしえたnative HCV粒子と結合しうる抗体(HCV粒子を沈降させうる抗体)が実際にHCV感染の防御に役立つか否かの検討は、今後のHCV感染に対する受動免疫療法の確立の可能性を追究するうえで重要である。

E. 結論

1. HCV抗体高力価陽性のHCV感染回復期血清中には遊離型native HCV粒子と結合しうる抗体が存在する。
2. HCVキャリア血清中にも、遊離型native HCV粒子に対して遺伝子型特異的に結合する抗体が存在する。
3. HCV粒子に対する抗体は、HCVの感染防御に役立つものと期待され、本研究の成果は今後のHCIG開発研究の有用性を支持するものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Nakamura M, Wang J, Murrakami T, Ajiki T, Hakamata Y, Kaneko T, Takahashi M, Okamoto H, Mayumi M, Kobayashi E: DNA immunization of the grafted liver by particle-mediated gene gun. Transplantation 76: 1369-1375, 2003

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

分担研究報告書

C型肝炎ウイルス複製阻害法の開発に関する研究

分担研究者 東京都臨床医学総合研究所 感染生体防御研究部門

室長 小原道法

研究要旨

約 21bp の二本鎖 RNA (siRNA) が RNA interference を起こし mRNA レベルでその遺伝子発現をコントロールすることが明らかとなり、核酸分子を用いた新たな遺伝子治療の可能性が示唆されている。この RNAi を、現在も治療困難である C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する遺伝子治療に応用することを目的とした。HCV レプリコン細胞および肝癌由来の培養細胞株である HepG2 細胞にトランスフェクションしその効果を検討した結果、5'UTR に設定した siE が 10nM で 80%以上の強い阻害効果を示した。

A. 研究目的

近年、線虫において二本鎖 RNA を細胞に導入したとき、それと同じ配列を持った遺伝子の発現が抑制される現象 RNAi (RNA interference) が発見され、現在では哺乳類においても約 21bp の二本鎖 RNA (siRNA) が RNAi 効果を示すことが明らかとなっている。

この本来細胞自身のウイルス感染防御機構と考えられる RNAi を、現在も治療困難である C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する遺伝子治療に応用することを目的とした。

B. 研究方法

HCV 遺伝子型間でよく保存されている 5'非翻訳領域 (5'UTR) および 3'非翻訳領域 (3'UTR) に対し任意の 9ヶ所に 21~23 塩基の siRNA を合成し、HuH-7 細胞を用いた HCV サブゲノム自律増殖細胞系である HCV レプリコン細胞および肝癌由来の培養細胞株である HepG2 細胞にトランスフェクションしその効果を検討した。

(倫理面への配慮)

施設内の動物実験委員会において研究計画について承認を受けて実施した。

C. 研究結果

5'UTR に設定した siE が未処理コントロールに対して 10nM で 80%阻害を認めた。ノーザンブロット解析によりこの阻害活性はウイルス RNA 量の減少によるものであることを確認した。siE の内部配列および設定領域の特異性は高く、1 塩基設定領域の違い及び配列内の 1 塩基置換によってその抗 HCV 効果が異なることがわかった。

D. 考察

3'UTR に対する D-siRNAs は阻害効果を認めず、5'UTR に対する D-siRNAs は siE より阻害効果が高く、5nM で約 90%阻害を認めた。現在より高い効果を示す siRNA を応用する方法を検討中である。

E. 結論

また、機能性核酸分子の治療応用への壁であったデリバリーの問題を克服するために、核酸分子と poly-L-lysine、PEG を用い高分子ミセルを用いた、新たなデリバリーシステムの開発、およびマウス、ツバイなどの HCV 実験動物を用いた siRNA の治療応用の検討を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kyoko Tsukiyama-Kohara, Shigenobu Tone, Isao Maruyama, Kazuaki Inoue, Asao Katsume, Hideko Nuriya, Hiroshi Ohmori, Jun Ohkawa, Kazunari Taira, Yutaka Hoshikawa, Futoshi Shibasaki, Michael Reth, Yohsuke Minatogawa and Michinori Kohara. Activation of the CKI-cdk-Rb-E2F Pathway in Full-Genome Hepatitis C Virus Expressing Cells. *J. Biol.Chem.* (2004) inpress.

2. Takeshi Tanaka, Kazuaki Inoue, Yukiko Hayashi, Aki Abe, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Hideko Nuriya, Yoshikazu Aoki, Ryuji Kawaguchi, Kiichi Kubota, Makoto Yoshida, Morio Koike, Satoshi Tanaka, and Michinori Kohara. Virological significance of low level hepatitis B virus infection in patients with hepatitis C liver disease. *J. Med. Virol.*(2004) 72: 223-229.

3. Yoichi Hiasa, Yoshitaka Kamegaya, Hideko Nuriya, Morikazu Onji, Michinori Kohara, Emmett V Schmidt, Raymond T Chung. PKR is increased and is functional in Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. *Amer. J. Gastroenterology.* (2003) 98: 2528-2534.

4. Shun Takaku, Yohko Nakagawa, Masumi Shimizu, Yoshihiko Norose, Isao maruyama, Takaji Wakita, Teruo Takano, Michinori Kohara and Hidemi Takahashi. Induction of hepatic injury by HCV structural protein-specific CD8+ class I MHC molecule-restricted murine CTLs in transgenic mice expressing the HCV structural genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) 301(2):330-337.

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

分担研究報告書

遺伝子型 2a の HCV レプリコンの複製

分担研究者 脇田 隆宇

東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門・副参事研究員

研究要旨

RNA レプリコンシステムを利用することにより、C型肝炎ウイルス（HCV）RNA を培養細胞内で効率よく複製することが可能となった。我々は HCV による劇症肝炎から分離したウイルス株を利用して遺伝子型 2a の HCV RNA レプリコンの樹立に成功した。この遺伝子型 2a の HCV レプリコンは複製効率が高く、様々な細胞株での複製が可能であった。さらに遺伝子型 1b のレプリコンと比べインターフェロンの感受性が異なっていた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）にはこれまで良いウイルス培養系がなかったが、RNA レプリコンシステムを利用することにより、ウイルス RNA を培養細胞内で効率よく複製することが可能となった。これまで報告された HCV レプリコンはすべて遺伝子型 1b のクローンをを用いているが、他の遺伝子型での報告はない。我が国の HCV 感染者の 7 割が 1 型、3 割が 2 型のウイルスに感染していると考えられていて、遺伝子型の違いによりインターフェロンに対する感受性や病態の違いがある。そこで、我々は遺伝子型 2a の HCV 株を用いて、RNA レプリコンの樹立した。この遺伝子型 2a の HCV レプリコンの複製について解析した。

B. 研究方法

遺伝子型 2a の HCV cDNA は劇症肝炎および

慢性肝炎よりクローニングした。Lohman らの報告に基づきプラスミド DNA に構築した。このプラスミドから合成した RNA を Electroporation 法により HuH7 肝癌細胞に導入し、G418 により選択培養をおこなった。3 週間後にコロニー形成率を判定した、また、一部の細胞はクローニングしてレプリコン RNA 持続複製細胞として樹立し、HCV タンパク質の発現、RNA の検出、DNA の組み込みの有無、複製している HCV RNA の遺伝子配列などを検討した、

C. 研究結果

2 例の劇症肝炎（JFH-1 および JFH-2）からは効率よくレプリコン複製細胞を樹立できたが、慢性肝炎から分離した HCV クローンではできなかった。JFH-1 株のレプリコンではこれまでのレプリコンと比較して複製効率（コロニー形成率およびトランジェント複製実験系）が良いことが