

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発

所属 財団法人東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所
研究者 脇田 隆宇

研究要旨 効率よく複製可能な HCV、JFH-1 株を用いて、培養細胞における HCV の全長ウイルス RNA 複製系および感染系を確立し、その機構を解析する。そして、ウイルスの感染、複製増殖に関与する宿主およびウイルスの因子を同定し、新たな抗ウイルス治療法の標的を探索する。

分担研究者

- (1) 名古屋市立大学大学院医学研究科
溝上 雅史
- (2) 国立感染症研究所ウイルス第二部
勝二 郁夫
- (3) 東レ株式会社医薬研究所
曾根 三郎

A. 研究目的

HCV は日本では 200 万人、世界中で 17000 万人にのぼる感染者が存在する。感染すると高率に持続感染化し、多くの症例で慢性肝炎から肝細胞癌を発症する。その治療はインターフェロンおよびリバビリン以外に無く、その効果はいまだ不十分である。新たな治療法の開発が望まれているが、HCV の良いウイルス培養系が無いことが妨げになってきた。最近、HCV レプリコンシステムが開発され、培養細胞内で HCV 遺伝子の持続的な複製が可能となり、この系により HCV に対する抗ウイルス薬の培養細胞でのスクリーニングや評価が初めて可能となった。しかし、HCV 全長遺伝子を効率よく複製する実験系および HCV の感染増殖系は未だに存在しない。

我々は、これまでウイルス培養に感染材料として用いてきたウイルス株の増殖能の低さと、感染させる細胞の感受性の低さが問題と考えた。HCV はその遺伝子配列に多様性を持ち、株間でその増殖能力や薬剤反応性が異なる。そこで我々は HCV による劇症肝炎の患者から分離された株に注目した (JFH-1 株)。最近開発された RNA レプリコンによりこの JFH-1 株を解析すると、慢性肝炎患者から分離された株に比べ、はるかに効率的な複製・増殖が可能であった (Kato T, Gastroenterology 2003, 125:1808-1817)。この JFH-1 株を用いることにより、培養細胞で安定し、再現性のある増殖が可能なウイルス感染・複製系の構築が可能になると考えた。そこで本研究の目的は、これまでにない高い効率で培養細胞において複製可能な JFH-1 株を用いて、全長 HCV 遺伝子の培養細胞におけるウイルス RNA 複製系および感染系を確立し、その機構を解析し、新たな抗ウイルス戦略の構築に供することである。

B. 研究方法

HCV のウイルス感染実験系

Huh7 細胞の亜細胞株を用いて感染感受性を比較する。ウイルス感染細胞を継代してウイルス感染力価の変化をみる。ウイルス感染力価の測定法を樹立する。チンパンジーおよびヒト肝細胞をもつキメラマウスを用いて *in vivo* の感染実験を行う。

HCVの感染過程の解析

HCV の感染に関与する細胞側の因子として LDL レセプターや CD81 などがあげられてきたが、確定していない。CD81 による感染の阻害機構をウイルス感染実験系を用いて解析する。また、ヘパリンやヘパリナーゼによりグリコサミノグリカン (GAG) の HCV 感染に対する関与を解析する。JFH-1 株の全長 cDNA より試験管内合成で RNA を作製し、Huh7 細胞に Electroporation 法で導入した。RNA 複製後細胞内より放出された HCV 粒子を含んだ培養上清を回収し、濃縮後 Huh7 細胞に接種した。感染後培養上清に放出された HCV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法にて定量した。HCV 粒子を heparin と反応させた後 Huh7 細胞に接種した。また Huh7 細胞を heparinase I または III にて処理後 HCV 粒子を接種した。さらに HCV 粒子を Hitrap Heparin column (Amersham) を用い分画した。heparin に結合する分画および非結合分画中のウイルスの Huh7 細胞への感染性を検討した。

ウイルス感性細胞におけるウイルス複製のインターフェロンなど薬剤感受性の検討

これまでレプリコンのみで解析していた抗ウイルス薬の効果を全長ウイルス複製・感染系で

解析する。さらにインターフェロン以外の抗ウイルス薬剤の効果を検討する。

レポーターレプリコンの作製

JFH-1 株のレプリコンのネオマイシン耐性遺伝子を取り除きルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーターレプリコンを作製した。このレプリコンを Huh7 細胞に遺伝子導入し、細胞内のルシフェラーゼを経時的に測定することにより、抗ウイルス剤の感受性を簡便に評価しうる系を確立した。

三次元培養系を用いた全長ウイルスゲノム HCV レプリコン細胞の培養と HCV RNA 複製および感染性の評価

全長ウイルスゲノム HCV レプリコン細胞を二種類 (遺伝子型 1b-RCYM1 および 2a-JFH1) の三次元培養系 (RFB, TGP) にて培養し、HCV RNA, HCV タンパクの発現を測定し、HCV RNA 複製を比較した。また、培養上清を naïve な Huh7 細胞に接種し、感染性が成立するか検討した。

HCV レプリコンを用いた薬剤感受性の検討

遺伝子型 1b (RCYM1) および 2a (JFH1) 由来の HCV レプリコン細胞を二次元培養し、抗 HCV 薬リバビリン添加した培養液で長期培養し、リバビリン抵抗株の単離を行った。リバビリン耐性を獲得した細胞株から HCV RNA を回収し、HCV のリバビリン感受性に関与する遺伝子変異をシーケンス解析した。

HCVレプリコン複製に及ぼすインターフェロン

の効果

pSGR-JFH1-Luc を鋳型として合成した RNA を Huh7 細胞に Lipofectamin2000 にて導入し、24 時間後にヒトインターフェロン- β で処理し、24 時間後にルシフェラーゼの活性を検出した。

HCV レプリコン高複製能細胞のスクリーニング

4X10⁵ 個の Huh7 細胞を 10%FCS 含有 D-MEM (以下、D-MEM+10F と略す) にて 10 cm ディッシュに培養し、16 時間後、2 μ g/ml のフレームシフト型突然変異誘発剤である ICR-191 を含む 10ml の D-MEM+10F に置換後、2 時間培養した。細胞を D-MEM にて 2 回洗浄し、D-MEM+10F にてコンフルエントになるまで培養を続けた。次に細胞をトリプシン/EDTA で処理後、細胞数をカウントし、4X10⁵ 個の細胞について上記の操作を行った。この操作を計 3 回行い、その後細胞を 1 個/well となるように 96well プレートに播種し、独立した 70 個のクローンを得た。ICR191 にて処理して得られたクローンに HCV レプリコン RNA を Lipofectamin2000 にて導入し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべての DNA に関して組み換え DNA 実験計画を提出し承認を得ている。取り扱うすべての病原微生物 (感染性のウイルスを含む) に関しても取り扱い届けを提出し承認を得ている。ウイルスの遺伝子をクローニングした患者血清は、すべて

その感染ウイルスの解析についてインフォームドコンセントを得て採取されている。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

C. 研究結果

1. HCV のウイルス感染実験系

昨年度の研究において、JFH-1 の全長 RNA を導入した細胞からウイルス粒子が分泌されることを確認した。また、そのウイルス粒子は Huh7 細胞に感染性があった。しかし、その感染効率は低く、全細胞の約 0.5% に感染を確認できた。感染効率を向上させるために感染の標的細胞に Huh7 細胞の亜細胞群を用いた。レプリコン細胞からインターフェロンで Curec された Huh7.5.1 細胞および米国スクリプス研究所から導入された Huh7 細胞 (Huh7S) を用いた。両細胞株共に当研究室由来の Huh7 細胞よりもはるかに感染効率が良いことが判明した。ウイルス感染後 1 週間から 2 週間でほぼ 100% の細胞が感染した。さらにウイルス感染細胞を継代培養することが可能で、ほぼ 100% 感染した状態で 1 ヶ月以上細胞を維持することが可能であった。

Huh7.5.1 細胞あるいは Huh7S 細胞を用いてウイルス感染力価の測定が可能となった。段階希釈したウイルス液を 96 ウエルプレートに撒いた細胞に感染させて 72 時間後に固定し、HCV の抗原染色を行う。顕微鏡下に infectious focus を計測して、感染力価を定量化した。培養上清中のウイルス粒子は 4 度あるいは 70 度において一定の期間安定であることが判明した。

培養上清中の HCV をチンパンジーに感染させた。チンパンジーに対する感染力価を同定するために最大希釈 (1 万倍希釈液) から段階的に

濃いウイルス液を接種したところ、1000倍希釈のウイルス液接種により、一過性のウイルス血症を発症したが、肝炎は発症しなかった。また、持続感染化はなく、抗体反応も検出できなかった。これは JFH-1 株の病原性の問題やあるいは感染時のウイルス量の問題があると考えられた。

また、最近開発されたヒト肝細胞を移植したキメラマウスに培養上清中の JFH-1 ウイルスを感染させたところ感染が成立した。マウス血清中のウイルス量は 10^4 - 10^5 copies/ml 程度であった。このマウスに感染したウイルスの遺伝子配列などについて解析を進めている。

2. HCVの感染過程の解析

heparin および、heparinase はともに HCV の Huh7 細胞への吸着を低下させた。しかしこれらの処理は、HCV の感染性は阻害しなかった。heparin に結合する分画中のウイルスは Huh7 細胞への感染性を示した。これらの結果より、感染性の HCV 粒子は heparin に結合する性質があると考えられた。しかし、HCV 粒子の Huh7 細胞への感染において、細胞表面上の heparin 様分子への吸着は認めるものの細胞内侵入において heparin 様分子は重要でないことが示唆された。

3. ウイルス感性細胞におけるウイルス複製のインターフェロンなど薬剤感受性の検討

JFH-1 ウイルスが感染した細胞に対してインターフェロンアルファや NS3 プロテアーゼ阻害剤で処理することにより抗ウイルス作用が観察できた。さらにコレステロール合成阻害剤が

ウイルス複製阻害に有効であることも確認できた。また、JFH-1 のレプリコン細胞による解析では、遺伝子型 1b のレプリコンの複製阻害に有効であったサイクロスポリンがやはり JFH-1 株に対しても有効であることがわかった。ただしその作用機序についてウイルス株間で差が認められた。

4. レポーターレプリコンの作製

JFH-1 株の増殖能を検討するため、JFH-1 株のレポーターレプリコンを Huh7 細胞内に遺伝子導入し、経時的にルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、JFH-1 株は遺伝子導入後 3 日目までルシフェラーゼ活性の強い上昇を認めた。このレポーターレプリコンシステムを用い、C 型慢性肝炎の治療に用いられる IFN およびリバビリン(RBV)の抗 HCV 作用の検出した。IFN の濃度依存性にレポーターレプリコンの増殖抑制効果を認め、JFH1 株の増殖が IFN 投与により抑制されることが確認された。また、RBV でも IFN に比較すると著しく弱いものの臨床的血中濃度 (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) での HCV 増殖抑制作用が観察され、その効果は濃度依存性であった。さらに IFN の 3、10、30 IU/ml の各濃度に、RBV を 3、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でそれぞれ加え作用させたところ、IFN の HCV 増殖抑制作用を RBV が濃度依存性に増強し、抗ウイルス作用は相加的に働いた。

5. 三次元培養系を用いた全長ウイルスゲノム HCV レプリコン細胞の培養と HCV RNA 複製および感染性の評価

遺伝子型 1b の HCV RNA を持続的に複製する RCYM1 細胞を RFB で三次元培養したところ、HCV

様粒子が産生された。このHCV様粒子を含む培養上清をnaiveなHuh7細胞へ接種したところ、72時間後にHCV RNAおよびHCV蛋白の発現が認められ、感染の成立が認められた。HCV様粒子の感染は抗E2抗体およびNOB抗体（E2蛋白と細胞との結合を阻害する）により阻害されたことから、エンベロープ依存的な感染であると考えられた。

同様な方法を用いJFH1株由来HCV RNAレプリコン細胞をRFBおよびTGPによる三次元培養を行ったが、RCYM1で認められたような感染性粒子の産生がみられなかった。そこで、JFH1-HCV RNAを2種類のHuh7由来細胞(H-SeVC-36, RCYM1-rep (-))に導入し、新たにレプリコン細胞をクローニングした。H-SeVC-36細胞はSendai virus Cタンパクを恒常的に発現し、IFN応答に欠損を有する。RCYM1-rep (-)細胞はRCYM1をIFN- α 処理し、HCV RNAを除去した細胞である。これらからJFH1-H-SeVC-36細胞を37クローン、JFH1-RCYM1-rep(-)を34クローン樹立した。これらのうちHCV RNA複製効率の高いものを各18クローン、5クローンずつ二次元培養し、HCV RNA量をReal time RT-PCR法により測定したところ、それぞれ 0.3×10^6 - 1.5×10^8 copies/ μ g total RNA, 0.2 - 1.1×10^8 copies/ μ g total RNAであった。今後、これらのうち複製効率のよいものを三次元培養し、HCV RNA複製および感染性について評価する。

6. HCVレプリコンを用いた薬剤感受性の検討

遺伝子型 1b (RCYM1)と 2a(JFH1)由来の

HCV レプリコンをもちいて抗 HCV 薬リバリバピリン抵抗株の単離を試みた。両者のレプリコン細胞の培養液中にリバピリンを添加し、長期培養を行ったところ、JFH-1 株 HCV レプリコン細胞において、リバピリン耐性を獲得した細胞株を単離した。現在、遺伝子変異のシーケンス解析を進めており、HCV の非構造領域に変異を見いだしており、今後この遺伝子変異とリバピリン耐性の関係について検討を進めていく。

7. HCV レプリコン複製に及ぼすインターフェロンの効果

10,000 IU/ml のインターフェロン- β を10倍段階で希釈し、各希釈のインターフェロンのHCVレプリコン複製に及ぼす効果を測定した。その結果、ルシフェラーゼ活性はインターフェロンの濃度に依存して減少し、100U/mlでルシフェラーゼ活性がコントロールの50%となった。

8. 突然変異誘発剤による HCV レプリコン高複製能細胞株の取得

フレームシフト型突然変異誘発剤であるICR191にて処理した細胞からクローン化した70株の内28株について細胞にHCVレプリコンRNAを導入し、その複製能をルシフェラーゼ活性で検出した結果、親株と比較して、複製能が4~6倍高いクローンは4株得られた。

D. 考察

これまでに培養細胞で複製可能な全長HCV RNAは遺伝子型 1b のウイルス株で、しかも適合変異が必要であった。この適合変異を導入

することによりウイルス遺伝子の培養細胞での複製効率は改善されるが、*in vivo* での感染性が失われることが報告されている。しかしながら、JFH-1 株は適合変異なしで、培養細胞で効率よく複製する。これまで他のウイルス株ではウイルス遺伝子が培養細胞内で複製するにも関わらず、ウイルス粒子の形成が観察できなかったが、JFH-1 株ではウイルス遺伝子の複製によりウイルス粒子の形成、培養液中への分泌が観察できた。適合変異の導入によるウイルス遺伝子複製効率の変化には本来のウイルス粒子形成を伴うウイルス複製経路とは異なる因子の関与が考えられる。この研究によって初めて HCV の培養細胞におけるウイルス培養が可能となった。

バイオリクターおよび温度感受性ゲルを用いた HCV RNA レプリコン細胞の培養により感染性を有した HCV 様粒子の産生が起こることが明らかとなった。高効率に複製することが知られている JFH1 株をこの二つの三次元培養系で培養したが、HCV RNA 複製効率の上昇、HCV RNA レプリコン細胞からの感染性 HCV 粒子の産生は認められなかった。長期培養による HCV RNA、Huh7 細胞への遺伝子変異などの可能性が考えられたため、レプリコン細胞を再度、樹立した。この際、IFN 応答に欠損がある H-SeVC-36 細胞または RCYM1-rep (-) 細胞に再度 HCV RNA を導入し、新たに HCV RNA レプリコン細胞を樹立した。これらの HCV RNA 複製能が高いことから、これらの細胞を三次元培養することにより、より効率の高い全長 HCV RNA レプリコン細胞の樹立を行っている。

JFH1-HCV レプリコン細胞にリバビリンを添加

し、長期培養を行ったところリバビリン耐性を獲得した細胞が得られた。HCV 遺伝子配列の解析から、非構造領域に数カ所の変異が認められ、リバビリン耐性に重要な領域である可能性が考えられた。変異領域とリバビリン耐性の関連について今後、さらに詳細に解析する必要があると考えられた。

フレームシフト型突然変異誘発剤である ICR191 にて処理した細胞からクローン化した細胞株をルシフェラーゼを指標とした HCV レプリコン RNA 検出系を用いてスクリーニングした結果、親株と比較して、複製能が 4~6 倍高いクローンが 4 株得られた。最近 Sumpter らにより、HCV 産生能が高い Huh7 細胞のクローンである Huh7.5 には IFN- α/β 遺伝子転写誘導経路の IRF-3 の上流に位置する RIG-I の変異があることが報告されていることから、これらの株は、IFN- α/β 遺伝子転写誘導経路に変異があるのかもしれない。

本年度の研究により、ウイルスの効率の良い培養が可能となり、ウイルスの感染力価の測定や、ウイルスの持続的あるいは反復的な培養が可能となった。この実験系によりようやく HCV をウイルス学的に解析可能となった。動物を用いた解析、HCV 感染の初期過程の解析、抗ウイルス活性に関する研究が立ち上がっている。今後さらにこの研究を通して HCV 研究に貢献していく。

E. 結論

今年度の研究により JFH-1 株による実験系がウイルス培養系としてさらに確立した。この実験系によりこれまで困難であったウイルス粒子

の形成および分泌過程の研究、ウイルス感染に必要なレセプターのクローニングなどの研究が可能となり、その成果を利用して新たな抗ウイルス療法や予防法の開発を進めていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) N Ishii, K Watashi, T Hishiki, K Goto, D Inoue, M Hijikata, T Wakita, N Kato, K Shimotohno Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus. *Journal of Virology*, 2006. in press.

2) Y Rouillé, F Helle, D Delgrange, P Roingard, C Voisset, E Blanchard, S Belouzard, J McKeating, A Patel, G Maertens, T Wakita, C Wychowski, J Dubuisson. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of Virology*, 2006. 80. 2832-41.

3) M Miyamoto, T Kato, T Date, M Mizokami, T Wakita. Comparison between Subgenomic Replicons of Hepatitis C Virus Genotype 2a (JFH-1) and 1b (Con1 NK5.1). *Intervirology*, 49:37-43, 2006.

4) T Kato, T Date, M Miyamoto, M Sugiyama, Y Tanaka, E Orito, T Ohno, K Sugihara, I Hasegawa, K Fujiwara, K Ito, A Ozasa, M Mizokami, T Wakita. Detection of Anti-Hepatitis C Virus Effects of Interferon and Ribavirin by a Sensitive Replicon System *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43:5679-84

5) Cai Z, Zhang C, Chang K-Y, Jiang J, Ahn B-C,

Wakita T, Liang, JT, Luo G. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *Journal of Virology*. 79: 13963-13973, 2005.

6) J Zhong, P Gastaminza, G Cheng, S Kapadia, T Kato, DR Burton, SF Wieland, S Uprichard, T Wakita, FV Chisari. Robust Hepatitis C Virus Infection in Vitro. *PNAS* 2005, 102:9294-9299.

7) T Wakita, T Pietschmann, T Kato, T Date, M Miyamoto, Z Zhao, K Murthy, A Habermann, H-G Kräusslich, M Mizokami, R Bartenschlager, T J Liang. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome. *Nat Med*. 2005 11:791-796.

8) Zhao Z, Date T, Li Y, Kato T, Miyamoto M, Yasui K, Wakita T. Characterisation of the E-138 (Glu/Lys) mutation in Japanese encephalitis virus using a stable full-length infectious cDNA clone. *J. Gen. Virol.* 2005, 86:2209-20.

9) Murakami K, Ishii K, Ishihara Y, Yoshizaki S, Tanaka K, Gotoh Y, Aizaki H, Kohara M, Yoshioka H, Mori Y, Manabe N, Shoji I, Sata T, Bartenschlager R, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 2006 in press.

2. 学会発表

1) 脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの感染複製系の開発、第41回日本肝臓学会総会、パネルディスカッション「ウイルス肝炎治療戦略の今後の

展望」、大阪国際会議場 (2005, 6. 17)

2) 田邊陽子、坂本直哉、中川美奈、小山知行、井津井康浩、武田嘉恵、関根裕子、田坂めぐみ、柿沼晴、陳正新、脇田隆宇、渡辺守、キメラレポーター遺伝子発現HCVレプリコンシステムを用いた多種細胞株でのウイルス増殖動態の解析、第41回日本肝臓学会総会、ワークショップ6「ウイルス性肝炎の最近の進歩」、大阪国際会議場 (2005, 6. 17)

3) 田邊陽子、坂本直哉、中川美奈、小山知行、井津井康浩、関根裕子、柿沼晴、脇田隆宇、渡辺守、キメラレポーター遺伝子発現HCV repliconを用いたウイルス増殖動態の多種細胞株での検討、第9回日本肝臓学会大会、神戸 (2005, 10. 5)

4) 森川賢一、趙子江、田邊純一、伊達朋子、宮本道子、村山麻子、脇田隆宇、C型肝炎ウイルス粒子のHuh7細胞への感染におけるheparin様分子の関与、第53回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (2005, 11. 20)

5) 田邊純一、森川賢一、伊達朋子、宮本道子、村山麻子、脇田隆宇、培養細胞から分泌されたC型肝炎ウイルス粒子の生化学的特徴化、第53回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (2005, 11. 20)

6) T. Wakita. Lessons learned from in vitro cultivation of hepatitis C. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver CO, USA (2006, 2.6).

7) T Date, J Tanabe, T Kato, M Miyamoto, T. Wakita. A full-length hepatitis C virus replicon infectious for cultured cells. IUMS 2005. 7.25, San Francisco CA, USA

8) K Morikawa, Z Zhao, J Tanabe, T Date, M

Miyamoto, A Murayama, T. Wakita. Binding of hepatitis C virus to glycosaminoglycan does not cause productive infection. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

9) J Tanabe, K Morikawa, T Date, M Miyamoto, A Murayama, S. Sone, T. Wakita. Purification and biological characterization of JFH-1 HCV particles produced in tissue culture, 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

10) J Zhong, G Cheng, P Gastaminza, T. Wakita, F Chisari. Acute cytopathic and persistent noncytopathic HCV infection in vitro. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

11) S Kapadia, T. Wakita, F Chisari. Differential regulation of HCV genotype 1b and 2a RNA replication by the cholesterol and fatty acid biosynthetic pathways. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

12) T Kato, T. Wakita, T Heller, S Saito, T Matsumura, R Sapp, K Murthy, J Liang. Production of infectious hepatitis C virus in cell culture. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

13) P Gastaminza, S Kapadia, M Wood, T. Wakita, F Chisari. Morphological aspects of HCV infection in vitro. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

- 14) S Uprichard, F Chisari, T Wakita. Replication of hepatitis C virus genotype 2a replicons in mouse cells. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 15) G Cheng, J Zhong, J Bukh, R Purcell, T Wakita, F Chisari. HuH-7 and HuH-7.5.1 cells produce hepatitis C virus after transfection by the JFH-1 molecular clone but not by H77c or J4L6S. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 16) Pietschmann T, Kaul A, Koutsoundakis G, Kallis S, Steinmann E, Kato T, Negro F, Fong S, Wakita T, Bartenschlager R. Chimeric Hepatitis C Virus Infectious in Cell Culture., 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 17) M Joyce, K Walters, T Pietschmann, LF Zhu, TJ Gao, N Kneteman, M Katze, T Wakita, R Bartenschlager, L Tyrrell. Infection of the SCID/BG alb-UPA transgenic human chimeric mouse with both full-length positive strand RNA from hepatitis C virus, and virus derived from tissue culture. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 18) G Cheng, J Zhong, T Wakita, F Chisari. Inhibition of HCV infection by structural region synthetic peptides. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 19) G Luo, Z Cai, C Zhang, K-S Chang, J Jiang, B-C Ahn, T Wakita, TJ Liang. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 20) 村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、田中恵子、小原道法、勝二郁夫、佐多徹太郎、宮村達男、鈴木哲朗、三次元肝細胞培養システムによるC型肝炎ウイルス(HCV)粒子形成とその応用、第53回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (2005. 11. 20)
- 21) 井上寧、相崎英樹、松田麻未、白倉雅之、村上恭子、勝二郁夫、松浦善治、宮村達男、鈴木哲朗、HCV RNA複製におけるT-complex polypeptide 1 ring complex及びHeat shock cognate protein 70の役割、第53回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (2005. 11. 20)
- 22) C型肝炎ウイルスCore蛋白のE6AP依存性分解 白倉雅之、勝二郁夫、市村徹、鈴木亮介、鈴木哲朗、福田浩一郎、下地徹、村上恭子、佐藤慈子、深澤征義、山河芳夫、西島正弘、宮村達男、第53回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (2005. 11. 20)
- 23) 村上恭子、石原陽介、後藤康文、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、田中恵子、小原道法、勝二郁夫、眞鍋昇、佐多徹太郎、宮村達男、鈴木哲朗、三次元肝細胞培養システムによるC型肝炎ウイルス産生系の樹立と組織学的解析、第28回日本分子生物学会年会、博多(2005. 12. 7-10)
- 24) 勝二郁夫、白倉雅之、市村徹、鈴木亮介、鈴木哲朗、福田浩一郎、下地徹、村上恭子、佐

藤慈子、深澤征義、山河芳夫、西島正弘、宮村達男、C型肝炎ウイルスコア蛋白の E6AP 依存性分解、第 28 回日本分子生物学会年会、博多(2005. 12. 7-10)。

25) K Murakami, Y Ishihara, K Ishii, S Yoshizaki, H Aizaki, K Tanaka, M Kohara, I Shoji, T Suzuki, T Sata, R Bartenschlager, T Miyamura, and T Suzuki. Thermoreversible gelation polymer-based three-dimensional culture system to produce HCV particles from cells harboring the genome-length dicistronic RNA. 12th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005.10.2-6

26) M Fukasawa, S Sato, T Osawa, Y Yamakawa, T Suzuki, I Shoji, R Suzuki, H Aizaki, T Miyamura, and M Nishijima, Interaction of DEAD box protein 1 with hepatitis C virus core protein. 12th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005.10.2-6

27) M Shirakura, I Shoji, T Ichimura, R Suzuki, T Suzuki, K Fukuda, T Shimoji, K Murakami, S Sato, M Fukasawa, Y Yamakawa, M Nishijima, and T Miyamura Identification of E6AP as an E3 ubiquitin ligase for HCV core protein., 12th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005.10.2-6

28) T Suzuki, K Moriishi, M Shirakura, I Shoji, Y Matsuura, T Miyamura, and R Suzuki., Coordinated Regulation of degradation of the hepatitis C virus core protein through

ubiquitylation and interaction with PA28gamma., 12th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005.10.2-6

G. 知的所有権の出願・登録状況
なし

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社