

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

C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた
治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウス
HCV感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 茶山 一彰
平成 19 年 (2007) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウス HCV 感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究 1
茶山 一彰

II. 分担研究報告

1. 2次元電気泳動解析を用いたHCV感染キメラマウス肝臓タンパク質のプロファイリング 5
吉里 勝利
2. C型肝炎ウイルス感染の伴うヒト肝細胞キメラマウスの遺伝子発現プロファイル解析 7
金子 周一
3. レプリコンを用いたC型肝炎ウイルス増殖に関与する宿主分子の網羅的解析、リバーシジェネティックスの構築 9
土方 誠
4. インターフェロン遺伝子導入による治療効果最適化の試み 12
高倉 喜信
5. 脂質代謝制御による抗HCV戦略の検討 14
榎本 信幸
6. HCVのエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換えVSVの作製 17
松浦 善治
7. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルスの感染実験 20
高橋 祥一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷り 33

I. 総括研究報告

C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウス HCV 感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究

主任研究者 茶山一彰 広島大学医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨：我々は、C型肝炎に対する新規治療を開発するために、抗ウイルス作用を有する薬剤の探索、ウイルス増殖に関連する人遺伝子の探索を行うとともに、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換された、ヒト肝細胞キメラマウスに肝炎ウイルスを感染させた動物モデルを作製し、探索された分子の薬剤としての可能性を検証する系の開発を行ってきた。これまでの研究で、患者血清を投与することにより、B型肝炎ウイルスの感染が可能となった。さらに、条件の良い保存血清を使用することにより、C型肝炎ウイルスも感染させることができるようになった。これらのマウスは、インターフェロン、ラミブジンといった薬剤に感受性を示し、薬剤の効果判定に有用なモデルになることが明らかになった。さらに、B型肝炎ウイルス遺伝子をクローニングし、1.4倍長のゲノムを培養肝がん細胞株に transfection することにより、感染性のウイルスを作製し、これをキメラマウスに感染させることが可能となった。この系を用いて、e抗原を産生しないクローンを感染させることができ、B型肝炎ウイルスのリバースジェネティクスが可能となった。この技術を利用し、野生型や薬剤耐性の変異型のB型肝炎ウイルスを投与し、持続感染させることに成功した。2006年度には、この研究をさらに発展させC型肝炎ウイルスのリバースジェネティクスの系を確立することができた。これらの系はB型、C型肝炎ウイルスのウイルス学的解析、各種耐性ウイルスに対する治療薬の効果判定、感染の成立、予防に関する研究に有用なモデルになると考えられる。さらに班員により多数の候補化合物、候補遺伝子が見いだされており、新規治療法の開発に向けた研究を継続している。

【分担研究者】

吉里勝利 広島大学大学院理学系研究科
教授
金子周一 金沢大学大学院医学系研究科
教授
土方 誠 京都大学ウイルス研究所
助教授
高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科
教授
榎本信幸 山梨大学医学部内科学講座第一
教授
松浦喜治 大阪大学微生物研究所
教授
高橋祥一 広島大学自然科学研究支援開発センター
助手

【班長研究協力者】

脇田隆宇 国立感染症研究所ウイルス第二部

A. 研究目的

我々は、2004年度から、患者血清の投与による肝炎ウイルスに感染する小動物モデルの作製に取り組んできた。このマウスは、広島大学理学研究科において作製された、免疫不全マウスにヒト肝細胞を移植したものであり、既報の同様のマウスと比較して、高いヒト肝細胞置換率を有した人肝細胞キメラマウスである。このマウスを使用し、B型肝炎ウ

イルス、C型肝炎ウイルスの感染実験を行った。さらに、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスのリバースジェネティクスの系も確立することを目的として研究を行った。

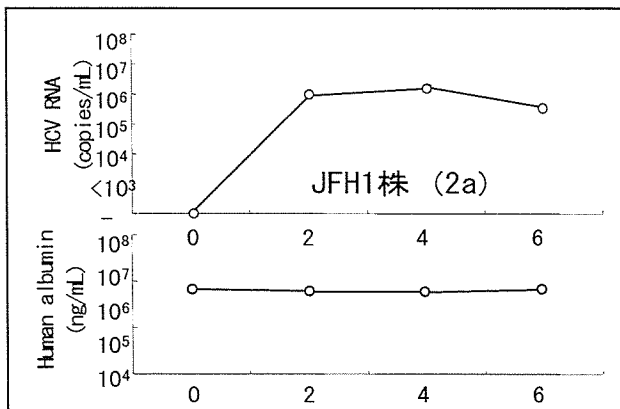
B. 研究方法

Albプロモーター下にuPAを高発現し、生後、肝細胞がアポトーシスを起こす Alb-uPA Tgマウスと重症免疫不全であるSCIDマウスを交配させたuPA-SCIDマウスにヒト肝細胞を経脾的に投与し、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換された、ヒト肝細胞キメラマウス（以後キメラマウスと略す）を使用した。HBV キャリア、HCV感染患者の血性をキメラマウスへ投与した。また、ウイルスが陽性となったマウスの血清を用いて、パッセージの実験も行った。さらに、1.4倍長のHBV genomeを有するconstructを作製し、HepG2細胞、Huh7細胞に transfection を行った。Site directed mutagenesisにより、各クローンを点突然変異を導入し、薬剤耐性株に関する検討を行った。また、HCVに関しては、国立感染症研究所、脇田博士から供与されたJFH1株を使用して、in vitro transcriptionによりRNAを合成した。このRNAをelectroporationによりHuh7細胞株にトランスフェクションした。培養上清に産生されたウイルスを経静脈的に投与した。また、金沢大学との共同研究として、genotype 1aの感染性クローンも使用し、感染実験を行った。

C. 結果

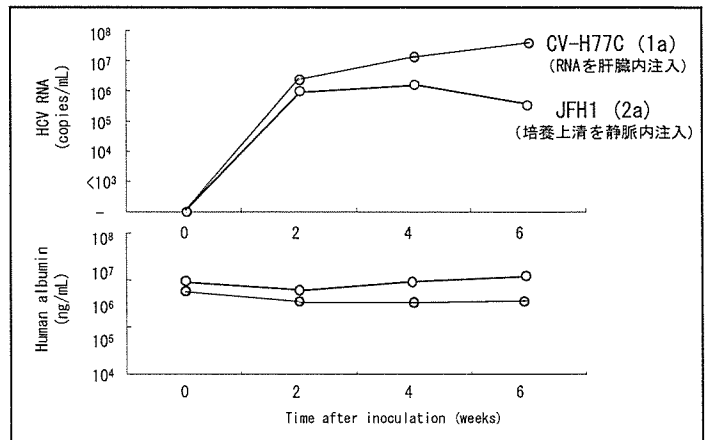
まず、B型肝炎ウイルスキャリアの血清を投与する

ことにより、B型肝炎ウイルスを持続的に感染させることができるようになった。このB型肝炎ウイルスを感染させたマウスに、ラミブジンを投与し、B型肝炎ウイルスの減少を観察することができた。また、同様にC型肝炎ウイルス陽性の患者血清を人肝細胞キメラマウスに投与することにより、同様にウイルス血清を呈するマウスを作製することができた。このマウスにインターフェロンを投与すると、用量依存的にウイルスの減少が見られ、C型肝炎ウイルスに対する治療薬の検定にも有用なものであることが明らかになった。さらに、2005年には、B型肝炎ウイルス遺伝子をクローニングし、1.4倍長のゲノムを培養肝がん細胞株に transfection することにより、感染性のウイルスを作製することができるようになった。そこで、e抗原を作製できないように pre-core 領域に stop codon を導入したウイルスを点突然変異により作製し、HepG2 細胞に導入してキメラマウスに投与した。すると、e抗原陰性のウイルスの感染が見られ、e抗原はウイルスの感染、増殖に必須ではないことが明らかになった。このようにしてB型肝炎ウイルスのリバースジェネティックスの系も確立された。この系を用いて、lamivudine 耐性株では野生株と比較して効果が明らかに無くなっていることが検証できた。さらに、2006年には、YMDDモチーフに変異のない新たな変異株も発見し、そのラミブジン耐性の計測において、キメラマウスの系が細胞系を用いた実験では判定が難しいような耐性株の薬物感受性の検討において、きわめて有用であることを示した。Huh7細胞株にJFH1株をtransfectionした上清に産生されたgenotype 2aのウイルスをキメラマウスに静脈内に投与した。下図に示すようにを投与後2週間目からHCV RNAが陽性となり、その後もほぼ同様のウイルス血症が持続した。このウイルス血症となったマウスの血清をナイーブなマウスに投与すると、やはり感染が成立し、ヒト、チンパンジーでのみ可能であった感染、パッセージの実験がウイルスクローンを用いた系で可能となった。



この結果を受けて、さらに他のgenotypeのウイルスの感染も試みることにした。金沢大学、金子教授との共同研究により、チンパンジーに対してinfectiousであることが明らかにされているCV-H77Cクローンを用いて実験を行った。このウイルスはJFH1とは異なり、細胞株でウイルス粒子を作

ることは明らかでないため、キメラマウスの腹部に麻酔下に小切開を加え、in vitro transcriptionによりRNAを合成したものを直接キメラマウスの肝臓に接種した。その結果、同様に、接種2週間から定量可能なウイルス血漿が認められるようになり、また、パッセージも可能であった。



Genotype 1aのウイルスの増殖性は、genotype 2aのウイルスよりも高く、より高いウイルス力価を示した。また、これらのマウスにインターフェロンを投与したところ、genotype 1bのマウスはgenotype 2aのウイルスが感染したマウスよりもインターフェロンの効果が不良であり、臨床的によく経験されるgenotypeによるインターフェロンの効果の差異がマウス内で再現されているものと考えられた。

新規治療薬の候補薬剤、あるいは候補遺伝子として班員らにより研究が行われており、以下のような成果が報告されている。

吉里班員はこのマウスモデルのさらなる改良に取り組んでおり、ヒト肝細胞の効率のよい培養系を構築した(Yamasaki et al. *J. Hepatol.* 44: 749-757 (2006))。このような細胞のキメラマウスへの移植についても検討している。さらに、C型肝炎ウイルスの増殖に関連して増減する蛋白について、プロテオーム解析により網羅的に検索を行っている。

松浦班員

HCVの増殖に必要な因子としてVAP-B (*J. Virol.*, 79:13473-13482 (2005))、FKBP8 および Hsp90. (*EMBO J.* 25, 5015-5025 (2006))が重要な働きをしていることを明らかにした。また、小池班員との共同研究でPA28 γ 依存性の経路がHCVコア蛋白のもたらすインスリン抵抗性に重要な役割を果たしていることを明らかにした(*J. Virol.*, (in press))。さらに、C型肝炎ウイルス(HCV)のエンベロープ蛋白質を被ったシュドタイプウイルス(HCVpv)を用いて感染機構の解析を進めており、水疱性口内炎ウイルス(VSV)のエンベロープ遺伝子を欠損させ、代わりにHCVのエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換えVSV(HCVrv)を作製し、その感染様式を解析している。そして、293TやHuh7細胞で作製したHCVrvは、Huh7細胞に最も高い感染性を示し、抗hCD81抗体やC型肝炎患者血清で感染が中和されること、

一部の Huh7 細胞株では、HCVrv の感染拡大がみられることを確認している。

土方班員

HCV の増殖に Cyclophilin B が重要であること、(Mol. Cell. 19(1), 111-122. 2005)、Cyclosporin がこの分子を介してウイルス増殖を抑制することを明らかにした(J. Virol 80(9) 4510-4520, 2006)。さらに免疫抑制剤シクロスポリン A の免疫抑制効果を持たない誘導体である NIM811 の阻害効果についてその詳細を検討したところ、NIM811 は CsA に比較して低濃度でより効果的に HCV 複製を抑制する効果を示すことを明らかにした。

金子班員

nucleolin と NS5B との interaction が HCV の増殖に関与していることを明らかにした。さらに、HCV 感染キメラマウスの肝組織遺伝子発現プロファイルを検討し、HCV 感染キメラマウスでは IFN シグナルの活性化が顕著であり、ウイルス感染状態を強く反映していることを明らかにした。また、C 型慢性肝炎症例の肝組織では加えて線維化、アポトーシス誘導シグナルの活性化が認められ、免疫応答を主体とした肝炎状態を反映していることも見いだした。

榎本班員

cyclosporin が cyclophilin を介して HCV の増殖を抑制することを明らかにした(Nakagawa et al. Gastroenterol 2005)。また、ISDR の特定の部位の変異がウイルス増殖を規定することを明らかにした(Kohashi et al. J Viral Hepatitis 2006)。さらに、脂質ラフトを構成するスフィンゴ脂質、コレステロール、飽和脂肪酸に注目し、これらの合成阻害剤であるミリオシン、スタチン等によって HCV レプリコン増殖が特異的に抑制されることを明らかにした。またビスフォスフォネートなどを含む、より効果の高い脂質代謝制御薬剤の探索を行い、抗 HCV 治療薬としての脂質代謝制御薬剤の可能性について検討している。

さらに高倉班員は肝臓への遺伝子デリバリーに関する研究を行っており、肝炎に対するインターフェロン (IFN) 遺伝子治療に応用可能なプラスミドベクターの開発を行っており、CpG配列と遺伝子発現の持続性との関連を明らかにしている。この情報に基づき、CpG配列を全く持たない骨格に IFN- γ cDNA を組み込んだ発現ベクターを設計し、治療域に IFN の血中濃度を長期間維持できることを示している。高橋班員は C 型肝炎ウイルスが感染したキメラマウスにインターフェロンを投与し、genotype1a および genotype1b に対する治療効果が genotype2a よりも不良であることを明らかにした。このことから、我々の開発したキメラマウスモデルが、臨床上経験されるウイルスの増殖、抗ウイルス状態を良好に反映していることを示した。

D. 考察

genotype 2a, genotype 1a でのリバーシジェネティックスの系を構築することができた。今後、日本に最も多く、インターフェロン抵抗性である genotype 1b についても、同様の系の構築を行うことが急務と考えられる。また、班員らの研究により

発見された多くの候補薬、候補遺伝子が実際の治療の開発に有用であることをさらに明らかにしてゆく必要がある。

E. 結論

キメラマウスを用いて B 型肝炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルスのリバーシジェネティックスの系を構築することができた。リバーシジェネティックス法により種々の変異ウイルスを血中に有するマウスの作製が可能であり、生体内における肝炎ウイルスの分子生物学的な検討に、広く応用が可能であると思われる。特に、薬物耐性の研究には重要な価値を有すると考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hatakeyama T, Noguchi C, Hiraga N, Moril N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Kawakami Y, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Kawakami H, Yatsuji H, Aisaka Y, Kohno H, Aimitsu S, Chayama K. Serum HBV-RNA is a predictor of early emergence of YMDD mutant in patients treated with lamivudine. *Hepatology* 2007, in press
2. Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Yatsuji H, Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Chayama K. Dual effect of APOBEC3G on hepatitis B virus. *J Gen Virol.* 2007;88:432-40.
3. Uka K, Aikata H, Takaki S, Shirakawa H, Jeong SC, Yamashina K, Hiramatsu A, Kodama H, Takahashi S, Chayama K. Clinical features and prognosis of patients with extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2007;21:13:414-20.
4. Ohishi W, Fujiwara S, Suzuki G, Kishi T, Sora M, Matsuura S, Hakoda M, Tatsukawa Y, Yamada M, Chayama K. Feasibility of freeze-dried sera for serological and molecular biological detection of hepatitis B and C viruses. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4593-5.
5. Yatsuji H, Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato K, Suzuki F, Kumada H, Chayama K. Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus

variant with a substitution outside the YMDD motif. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3867-74.

6. Kohno H, Aimitsu S, Kitamoto M, Aisaka Y, Kawakami H, Chayama K. Prolonged negative HCV-RNA status led to a good outcome in chronic hepatitis C patients with genotype 1b and super-high viral load. *Intervirology.* 2006;49:362-9.
7. Arataki K, Kumada H, Toyota K, Ohishi W, Takahashi S, Tazuma S, Chayama K. Evolution of hepatitis C virus quasispecies during ribavirin and interferon-alpha-2b combination therapy and interferon-alpha-2b monotherapy. *Intervirology.* 2006;49:352-61.
8. Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Iwai M, Horiuchi M, Chayama K. Anti-fibrogenic function of angiotensin II type 2 receptor in CCl4-induced liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346:658-64.
9. Umehara T, Sudoh M, Yasui F, Matsuda C, Hayashi Y, Chayama K, Kohara M. Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346:67-73.
10. Tanaka E, Matsumoto A, Suzuki F, Kobayashi M, Mizokami M, Tanaka Y, Okanoue T, Minami M, Chayama K, Imamura M, Yatsushashi H, Nagaoka S, Yotsuyanagi H, Kawata S, Kimura T, Maki N, Iino S, Kiyosawa K; HBV Core-Related Antigen Study Group. Measurement of hepatitis B virus core-related antigen is valuable for identifying patients who are at low risk of lamivudine resistance. *Liver Int.* 2006;26:90-6.
4. 今村道雄、茶山一彰. モデルマウスを用いた肝炎ウイルスの分子生物学的検討. 第42回日本肝臓学会総会、京都、2006
5. 野口千笑、茶山一彰. HBV の G to A hypermutation の APOBEC3G 発現による増加. 第42回日本肝臓学会総会、京都、2006
6. 脇浩司、茶山一彰. 肝細胞と肝星細胞の不死化の試み. 第42回日本肝臓学会総会、京都、2006
7. 高橋祥一、茶山一彰. 当院における HIV/HCV 重複感染の現況. 第42回日本肝臓学会総会、京都、2006
8. 八辻寛美、茶山一彰. YMDD motif に変異のない lamivudine 耐性 HBV genome の解析. 第42回日本肝臓学会総会、京都、2006
9. 川上由育、茶山一彰. C 型肝炎の PEG-IFN, リバビリン併用治療の現状と新たな展開. 第92回日本消化器病学会総会、札幌、2006
10. 川上由育、茶山一彰. 当科におけるペガシスの臨床研究について. 第3回中国C型肝炎研究会、岡山、2006
11. 川上由育、茶山一彰. 高齢者における2型高ウイルス量のC型慢性肝炎に対するIFN療法の適応. 第10回日本肝臓学会大会、札幌、2006
12. 山科敬太郎、茶山一彰. Adefovir 内服による薬剤性 Fanconi 症候群・低リン血症により歩行困難を来した Lamivudine 耐性 B 型肝炎硬変の1症例. 第10回日本肝臓学会大会、2006
13. Imamura M, Hiraga N, Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon- α . 第7回 AASLD、ボストン、2006

2. 学会発表

1. 川上由育、茶山一彰. C型肝炎の PEG-IFN, リバビリン併用療法の現状と新たな展開. 第92回日本消化器病学会総会、北九州、2006
2. 森奈美、茶山一彰. B型慢性肝疾患に対する抗ウイルス療法の治療選択. 第92回日本消化器病学会総会、北九州、2006
3. 今村道雄、茶山一彰. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス感染モデル. 第2回肝免疫・ウイルス・フロンティア、名古屋、2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし

II. 分担研究報告

厚生労働省科学研究費

C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウス HCV 感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究班

研究報告書

2次元電気泳動解析を用いたHCV感染キメラマウス肝臓タンパク質のプロファイリング

分担研究者 吉里勝利 広島大学大学院理学研究科 教授

研究要旨：ヒト肝細胞をもつキメラマウスに HCV を感染させ、感染により発現量変動する肝臓タンパク質をプロテオーム解析により調べた。発現量が 2 倍以上増加するタンパクとして 34 種類、0.5 倍以下に減少するタンパク質として重複も含めて 20 種類を同定した。また、インターフェロン投与後のスポット濃度の経時変化プロファイルを調べることにより、HCV 感染後のインターフェロン作用のマーカーあるいは標的となりうるタンパク質を多数同定した。さらに、HBV Pre-S 抗原に結合する肝細胞タンパク質の網羅的探索を行い、肝細胞表面に吸着するウイルスタンパク質の存在を確認した。今後、本結合タンパク質の同定を進める必要がある。

A. 研究目的

これまでの研究からヒト肝細胞キメラマウス(以下、キメラマウス)にはヒト肝炎ウイルス(HCV)が感染し増幅することが既に確認されている。本年度は、肝臓のプロテオーム解析による肝炎、繊維化、発癌に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索と新規治療法の開発の一環として、(1) HCV 感染キメラマウス肝臓のプロテオーム解析、(2) 肝炎に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索を目指した。

B. 研究方法

肝臓のプロテオーム解析による肝炎、繊維化、発癌に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索と新規治療法の開発

(1) HCV 感染キメラマウス肝臓のプロテオーム解析
キメラマウス肝臓中のヒト肝細胞のプロテオーム解析を実施した。標本は、HCV 感染の有無及び感染群についてはインターフェロン投与無し、投与後 6 時間、24 時間の合計 6 群から採取することとした。各群それぞれ同一ドナーの肝細胞を移植して得られた 70% 以上の高置換キメラマウス 3 頭より採取した肝臓組織のヒト置換部を用いた。

(2) 肝炎に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索

昨年に引き続き、C型肝炎の新規薬剤標的分子候補となりえる HCV レセプター探索法の確立を目指した。実験従事者の感染リスクが低い感染モデル系として HBV Pre-S 抗原をキメラマウスに投与する疑似感染系を採用した。これを用いて HBV Pre-S 抗原のキメラマウス体内のヒト肝細胞表面に対する親和性の確認をプロテオーム解析および免疫沈降法により実施した。キメラマウスに尾静脈から HBV Pre-S 抗原を注入後に、キメラマウスの門脈より生理食塩水を注入し、肝臓内より血液を除去し架橋剤

を注入した。架橋反応後に、キメラマウス肝臓のヒト置換領域を採取し、タンパク質を抽出した。昨年に引き続き、本年度は、得られたタンパク質画分より得られた架橋反応物について、膜画分及び細胞質画分に分け、それぞれを Pre-S 抗体を用いた免疫沈降を得て、SDS-PAGE 及び 2 次元電気泳動の両方の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本年度の解析は、ヒト肝細胞キメラマウス及び組換え型 Pre-S 抗原を用いて実施した。ヒト肝臓組織およびキメラマウスに移植するヒト肝細胞は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 13 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)に基づく手続きを経て入手したもの、あるいは海外から正式な手続きをもって購入した凍結保存ヒト肝細胞を用いた。

動物実験においては、動物愛護ならびに福祉の観点から、必要最低限の供試動物を使用し、実験動物の生理、生態や習性等を理解し、動物に苦痛を与えないように最大限の配慮をした。

C. 結果

(1) HCV 感染キメラマウス肝臓のプロテオーム解析

各群の 3 個体間における 2 次元電気泳動像の比較において、大きな違いが見られるケースが発生し、厳密なゲルイメージ間比較が困難な状況が生じた。個体の背景情報を確認したところ、この違いは、非感染群においてはキメラマウス個体間における血清中のヒトアルブミン濃度及び感染群においては感染後の日数にそれぞれ起因する問題であることが判明した。このため血清中のヒトアルブミン濃度および感染後の日数がそろった個体のみを解析に用いることによりこの問題を克服し、各群 3 検体、合

計 18 枚のゲルにおける比較解析を実施した。

この解析により、HCV 感染によりタンパク質発現量において、2 倍以上の増加が見られたものが 24 スポット、1/2 (0.5 倍) 以下に減少したものが 23 スポット見いだされた。2 倍以上増加が見られたスポットからは 34 種類、0.5 倍以下に減少が見られたスポットからは 20 種類 (重複のため) のタンパク質が同定された。また、インターフェロン投与後の経時変化については、スポット濃度の変動プロファイルを、自己組織化マップ法などを用いて解析し、HCV 感染後の interferon 作用のマーカーあるいは標的となりうるタンパク質が多数見いだされた。

これらの候補タンパク質については、今後の詳細な解析が必要となるが、これらの中には interferon regulatory factor との相互作用が確認されているタンパク質や interferon inducing MX protein などが見いだされた。

(2) 肝炎に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索
蛍光標識 HBV Pre-S 抗原を分離キメラマウス肝細胞に *in vitro* で反応させたところ、肝細胞への蛍光標識 HBV Pre-S 抗原の取り込みが確認できた。そこで、Pre-S 抗原のキメラマウス投与実験を行い、抗 Pre-S 抗体を CNBr-activated Sepharose に固定化したビーズを用いた免疫沈降法により HBV Pre-S 抗原結合タンパク質の検出を行った。

SDS-PAGE 及び 2 次元電気泳動像の泳動像を比較した結果、膜画分の免疫沈降物より複数の候補タンパク質を得ることが出来た。これらの候補タンパク質が HBV 及び HCV 感染に際して、ウイルスリセプターあるいはリセプターの補助因子として機能しているか否かについては、次年度以降の検討課題である。

D. 考察

(1) HCV 感染キメラマウス肝臓のプロテオーム解析
キメラマウスの肝臓のヒト置換領域からタンパク質を分離し 2 次元泳動することにより、キメラマウス肝臓におけるヒト肝細胞タンパク質のプロファイリングが可能と考えられた。

(2) 肝炎に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索
細胞表面へのウイルス由来タンパク質の吸着が確認された。今後、HBV Pre-S 抗原結合タンパク質の同定を進める必要があると考えられる。今回の結果から、C 型肝炎の新規薬剤標的分子候補となりえる HCV レセプター探索にもこの手法が使えることが示唆された。次年度以降、HCV ウイルスを用いた探索を計画している。

E. 結論

キメラマウス肝臓を利用したヒト肝細胞のプロテオーム解析を実施し、複数の候補タンパク質を得

ることが出来た。今回得られた候補タンパク質については、今後の詳細な解析が必要となるが、これらの中には interferon regulatory factor との相互作用が確認されているタンパク質や interferon induced MX protein などが見いだされており、HCV 感染および interferon 投与による細胞内タンパク質の変化をとらえている可能性が極めて高く、今後の解析によって大きな発展に繋がる可能性が高いと期待される。また、免疫沈降法とプロテオーム解析を利用した HCV レセプター探索法の確立に成功した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・吉里勝利 (2006) ヒト肝細胞キメラマウス. 化学と生物 Vol. 44, No. 6, 352-354
- ・大房 健、吉里勝利. プロテオミクス研究とそれに注目した動機及びその後の発展について (2006) 月刊細胞 Vol. 38, No. 11, 2-4
- ・吉里勝利. キメラマウス (2006) 医学のあゆみ vol. 218 NO.9 P805-807
- ・立野知世、森川良雄、吉里勝利. ヒト肝細胞キメラマウス Chimric mice with human hepatocytes (2006) メディカルサイエンスダイジェスト in press

2. 学会発表

プロテオミクスを利用したヒト成長ホルモン投与キメラマウスのヒト肝細胞の評価. 妙見夕佳、片岡美穂、立野知世、大房 健、吉里勝利. 日本ヒトプロテオーム機構第 4 回大会 (新宿京王プラザホテル・東京) 2006. 7. 19

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 出願予定
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウスHCV感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究班 分担研究報告書

C型肝炎ウイルス感染に伴うヒト肝細胞キメラマウスの遺伝子発現プロファイル解析

分担研究者 金子 周一 金沢大学がん遺伝子治療学 教授

研究要旨：HCV 感染キメラマウスの肝組織遺伝子発現プロファイルを検討した。HCV 感染キメラマウスでは IFN シグナルの活性化が顕著であり、ウイルス感染状態を強く反映していた。一方、C 型慢性肝炎症例の肝組織では加えて線維化、アポトーシス誘導シグナルの活性化が認められ、免疫応答を主体とした肝炎状態を反映していた。興味深いことに外来 IFN 投与に伴う IFN 誘導遺伝子の発現誘導は HCV 感染キメラマウスでは非感染マウスに比し有意に抑制され、HCV による IFN 誘導シグナルの抑制機構の存在が示唆された。

A. 研究目的

これまでに我々は、C 型慢性肝炎症例の肝組織における遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイを用いて解析し、肝炎組織内での情報伝達機構の変化を報告してきた (Honda et al 2006)。本研究では患者血清や感染クローンを用い、キメラマウスに HCV を感染させ、肝組織における遺伝子発現変化を網羅的に解析し、HCV の複製・慢性化に伴う宿主側の変化とその機構を解明することを目的とした。

B. 研究方法

C 型慢性肝炎(CH-C)患者血清 (Genotype 1b 2800 K IU/ml) 100 μ l を 6 匹のキメラマウスに感染させた (図 1)。2 匹の感染マウスより肝組織を採取し HCV 非感染マウスの肝組織と比較した (図 2)。4 匹の HCV 感染キメラマウスには IFN を投与し、IFN 投与後それぞれ 6 時間 (2 匹)、24 時間後 (2 匹) に肝組織を採取した。同様に HCV 非感染マウスに IFN を投与し IFN 投与後それぞれ 6 時間 (2 匹)、24 時間後 (2 匹) に肝組織を採取し遺伝子発現を比較した (図 1, 2)。解析には SAGE (serial analysis of gene expression) 法により様々な肝疾患で発現する遺伝子より選出された約 1 万クローンを有する In-house cDNA マイクロアレイを用いた。

C. 研究結果

患者血清感染 6 匹において感染 2 週より血清中の HCV-RNA が陽性化した。HCV-RNA は感染 4-6 週で 10^6 - 10^7 copies/ml を推移し IFN 投与 (7000 IU/g) によりにおよそ 1log (24 時間後) の低下を認めた。ヒト・アルブミンから推定される各群のヒト肝細胞のキメラ率には差異を認めなかった。

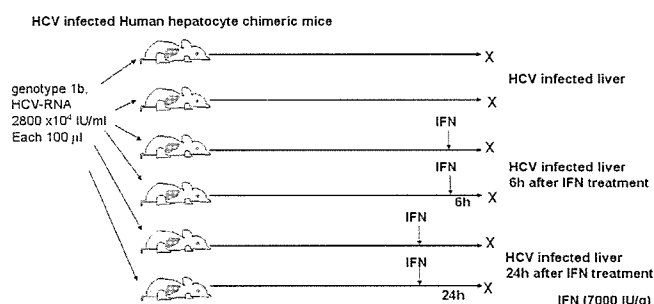


図1.キメラマウスへのHCV感染とIFN投与

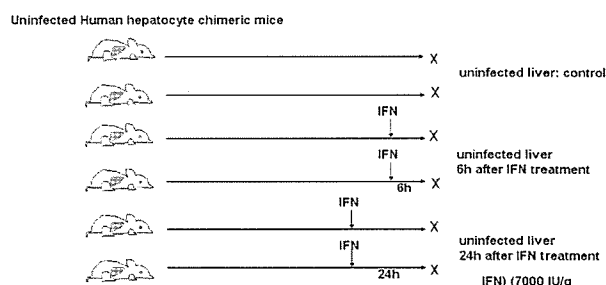


図2.HCV非感染キメラマウスへのIFN投与

HCV 感染に伴い、非感染マウスと比較し 3 倍以上の発現誘導を認めた遺伝子は 206 個、3 倍以下の低下を認めた遺伝子は 104 個であった。CH-C 症

例の肝生検組織から得られた遺伝子発現プロファイルと比較し、キメラマウスではケモカイン、JAK-STAT パスウェイの亢進が認められた。一方、CH-C 症例では細胞接着因子、アポトーシスに関する遺伝子発現の亢進が認められた。

HCV 非感染マウスに IFN を投与した遺伝子発現プロファイルから、キメラマウスにおける IFN 誘導遺伝子の同定を行った。IFN 投与 6 時間後では 548 個、24 時間後では 308 個の遺伝子が 3 倍以上の変動を示した。HCV 感染キメラマウスで変動を認めた遺伝子の 62% は IFN で誘導される遺伝子であり、キメラマウスではウイルス感染状態を強く反映していると考えられた。

IFN により 4 倍以上の強い発現誘導を示す遺伝子に注目し IFN 投与に伴う遺伝子発現変動を HCV 感染マウスと非感染マウスで比較した (図 3)。興味深いことに、HCV 感染マウスでは非感染マウスに比べ IFN 誘導遺伝子の発現誘導が有意に抑制されていることが明らかとなった。

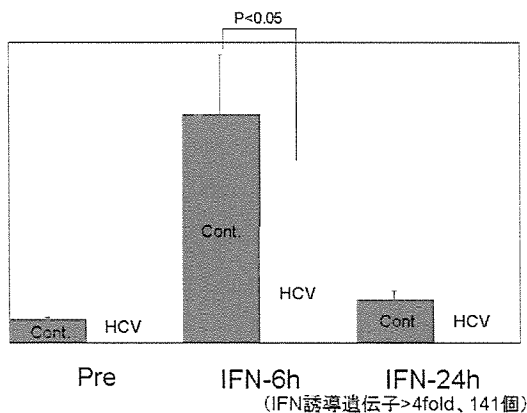


図3. HCV感染キメラマウスのIFN誘導遺伝子発現抑制

D. 考察

HCV 感染キメラマウス、非感染キメラマウスの肝組織遺伝子発現プロファイルを検討し、CH-C 症例の肝組織発現プロファイルと比較した。HCV 感染キメラマウスでは IFN シグナルの活性化が顕著であり、ウイルス感染状態を強く反映していた。一方、CH-C 症例では加えて線維化、アポトーシス誘導シグナルの活性化が認められ、免疫応答を主体とした肝炎状態を反映していた。興味深いことに外来 IFN 投与に伴う IFN 誘導遺伝子の発現誘導

は HCV 感染キメラマウスでは非感染マウスに比し有意に抑制されており、HCV による IFN 誘導シグナルの抑制機構の存在が示唆された。今後、パスウェイ解析を中心に、より詳細な検討を行い、IFN シグナル抑制機構を検討する予定である。

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

1. Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S, Murakami S. Effect of Hepatitis C Virus (HCV) NS5B-Nucleolin Interaction on HCV Replication with HCV Subgenomic Replicon. J Virol. 2006 Apr;80(7):3332-40.
2. Yamashita T, Arai K, Sakai A, Mizukoshi E, Sakai Y, Kagaya T, Nakamoto Y, Honda M, Wada T, Yokoyama H, Kaneko S. Virological effects and safety of combined double filtration plasmapheresis (DFPP) and interferon therapy in patients with chronic hepatitis C: A preliminary study. Hepatol Res. 2006 Nov;36(3):167-75. Epub 2006 Sep 7.
3. Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Kaneko S. Different signaling pathways in the livers of patients with chronic hepatitis B or chronic hepatitis C. Hepatology. 2006 Nov;44(5):1122-38.
4. Tateno M, Honda M, Kawamura T, Honda H, Kaneko S. Expression profiling of peripheral-blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C undergoing interferon therapy. J Infect Dis. 2007 Jan 15;195(2):255-67. Epub 2006 Dec 13.
5. Sunagozaka H, Tsuji H, Mizukoshi E, Arai K, Kagaya T, Yamashita T, Sakai A, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S. The development and clinical features of splenic aneurysm associated with liver cirrhosis. Liver Int. 2006 Apr;26(3):291-7.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし。

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウスHCV感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究班
分担研究報告書

レプリコンを用いたC型肝炎ウイルス増殖に関与する宿主分子の網羅的解析、リバースジェネティクスの構築

分担研究者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所 助教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)が効率良く感染増殖する培養細胞ならびに実験動物を作成し、これを用いて新規抗HCV薬開発のための標的分子を見いだすことを目指した。これまでに我々がHCV増殖に抑制的な効果を示す薬剤として見いだした免疫抑制剤シクロスポリンAの免疫抑制効果を持たない誘導体であるNIM811の阻害効果についてその詳細を検討したところ、NIM811はCsAに比較して低濃度でより効果的にHCV複製を抑制する効果を示した。インターフェロンalphaとの同時処理でもより高い効果が得られたことから、この薬剤が免疫抑制効果をもたない利点とともに強いHCV増殖抑制効果を有する抗HCV薬剤の候補となることが考えられた。また前年度樹立した不死化ヒト肝細胞の自然免疫系を抑制することでHCVに対する感受性を高め、さらに効率の高いHCV感染増殖を可能とする培養細胞実験系の構築を目指した。細胞の自然免疫機構で重要な役割を果たす転写因子IRF3とIRF7のそれぞれについてドミナントネガティブ体やshRNAによる抑制を試みたところ、IRF7の抑制によりこの細胞へのHCVの感染増殖の亢進が認められた。IRF7のドミナントネガティブ体を恒常的に発現する不死化肝細胞を作成したところ、様々な遺伝子型のHCVが感染し、増殖することが確認され、種々の遺伝子型のHCVに対する薬剤の評価系として有用であることがわかった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルスが効率良く感染増殖する培養細胞ならびに実験動物を作成し、これを用いてHCVの感染増殖機構を解析することにより、このウイルスの感染増殖を抑制する新規薬剤の標的分子を見いだすことで抗HCV戦略構築を目指した。

B. 研究方法

1. 独自に樹立したHCVのゲノムRNAが自律複製している培養細胞、所謂、レプリコン細胞を用いて、既に抗HCV活性を持つことを明らかにしているシクロスポリンAの誘導体に関して、この細胞内におけるHCV部分ゲノム複製に対する効果の詳細を検討した。
2. これまでに樹立した肝細胞と類似した特性をもつ不死化肝細胞についてその自然免疫機構を操作することによって、よりHCV感染増殖の高い培養細胞実験系への改良を試みた。

(倫理面への配慮)

ヒト初代培養肝細胞作成ならびに移植後HCV再発患者血清の使用した研究はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請

し、審査の後に承認されたものである。肝臓提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

1. レプリコン細胞を種々の薬剤で処理することで、これまでにHCV部分ゲノム複製を抑制する薬剤としてシクロスポリンA(CsA)を同定しているが、今回CsAの誘導物質であるNIM811がCsAよりも低濃度で効率よくその複製を阻害することを見出した。IFN-alphaと同時に処理した場合も細胞毒性を示すことなく、強い抗HCV効果を示すことがわかった。
2. 新規に作成した不死化肝細胞に対する血清由来HCVの感染増殖性を増加させ、種々の遺伝子型に属する多様なHCVの感染を解析することができるような改良を試みた。自然免疫において重要な役割を果たす転写因子であるIRF3ならびにIRF7の抑制をそれぞれのドミナントネガティブ体(DN)やshRNAを発現させることでおこなった。IRF3の抑制はHCVの増殖に対して大きな影響を与えな

ったが、IRF7 の抑制により感染増殖性が著しく亢進した。IRF7 の DN を恒常的に発現させた不死化肝臓細胞を作成したが、この細胞は患者由来血清由来の種々の遺伝子型に属する HCV ならびに組み換え体 HCV である JFH-1 株の感染が親株に比べて亢進されていた。

D. 考察

1. CsA は HCV のゲノム複製に対して抑制効果を持つことがわかっているが、細胞毒性があり、また免疫抑制など効果を有するため、そのまま効果の高い濃度では治療に使用できなかった。そこで今回 CsA の誘導体で免疫抑制効果を示さない NIM811 の HCV ゲノム複製に対する効果を検討したところ、より低濃度で強い抑制効果を示し、インターフェロンと併用する場合も低濃度で高い効果を示すことがわかった。このことから NIM811 は CsA よりも実用的な HCV 治療薬の候補となりうると考えられた。
2. 新規に作成した不死化肝細胞は IRF7 の抑制によって HCV の感染増殖性が上昇した。このことは本来の肝臓における HCV 感染に対する肝細胞の初期応答には IRF7 が重要な役割を果たしている可能性を示している。また、逆にこのことは少なくとも細胞における自然免疫の初期応答は機能していることを示しており、HCV の感染による自然免疫機構の抑制についてはさらに検討する必要があることが考えられた

E. 結論

1. CsA 誘導体 NIM811 は CsA に比較してより低濃度で有効な HCV ゲノム複製抑制効果を持ち、インターフェロンとの同時処理でも有効性が高いことから実用的な抗 HCV 薬剤の候補となる可能性が考えられた。
2. IRF7 を抑制することで患者血清中の HCV が比較的効率良く感染増殖することが

可能な不死化肝細胞クローンを樹立した。

F. 研究発表

1. 論文

- 1) Ishii N., Watashi K., Hishiki T., Goto K., Inoue D., Hijikata M., Wakita T., Kato N., Shimotohno K. Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J. Virol.* 2006;80:4510-4520
- 2) Goto K, Watashi K., Murata T., Hishiki T., Hijikata M., Shimotohno K. Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;343:879-884
- 3) Aly H.H., Watashi K., Hijikata M., Kaneko H., Takada Y., Egawa H., Uemoto S., Shimotohno K. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J. Hepatol.* 2007;46:26-36

2. 学会発表

- 1) Goto K., Watashi K., Murata T., Hishiki T., Hijikata M., Shimotohno K.. Evaluation of the anti-HCV effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporine A and NIM811. 13th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2006, Cairns, Australia
- 2) Watashi K., Ishii N., Goto K., Hijikata M., Wakita T., Kato N., Shimotohno K.. Cyclophilin B, a cellular cofactor for HCV replication, determines the diverse anti-HCV efficacy of cyclosporine A among strains. 13th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2006, Cairns, Australia
- 3) Ali H.H., Watashi K., Hijikata M.,

Kaneko H., Takada Y., Egawa H., Uemoto S., Shimotohno K. Serim-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. 13th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2006, Cairns, Australia

4) 渡士幸一、後藤覚、土方誠、脇田隆字、加藤宣之、下遠野邦忠：シクロフィリン阻害剤によるC型肝炎ウイルス複製の抑制。第65回日本癌学会学術総会、横浜、2006年9月

5) 後藤覚、渡士幸一、土方誠、下遠野邦忠：シクロフィリン阻害剤のC型肝炎ウイルス

複製阻害とその薬剤耐性ウイルス株樹立。第54回日本ウイルス学会学術総会、名古屋、2006年11

6) 渡士幸一、後藤覚、土方誠、下遠野邦忠：抗C型肝炎ウイルス化合物をバイオプローブに用いたウイルス複製機構の解析。第54回日本ウイルス学会学術総会、名古屋、2006年11月

G. 知的所有権取得状況

1. 特許取得 特になし。
2. 実用新案登録 特になし。
3. その他 特になし。

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウスHCV感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究班
分担研究報告書

インターフェロン遺伝子導入による治療効果最適化の試み

分担研究者 高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨：肝炎に対するインターフェロン（IFN）遺伝子治療に応用可能なプラスミドベクターの開発に必要なベクター設計最適化に必要な情報を得ることを目的に、luciferase をコードするモデルベクターを用いて cDNA 部分やプロモータ部分等に含まれる CpG 配列と遺伝子発現の持続性との関連を明らかにした。得られた情報に基づき、CpG 配列を全く持たない骨格に IFN- γ cDNA を組み込んだ発現ベクターを設計し、治療域に IFN の血中濃度を長期間維持できることが示された。

A. 研究目的

肝炎に対する IFN 遺伝子治療に応用可能なプラスミドベクターの開発に必要なベクター設計の最適化に必要な情報を確立する。

B. 研究方法

pDNA の構築：CpG 配列が豊富に存在する pDNA として、CMV プロモータの下流に luciferase cDNA がコードされた pCMV-Luc を用いた。Ori 以外の部分の CpG 配列を除去した pGZB ベクター（Genzyme）の CpG 配列のない CMV プロモータ（ Δ CMV）の下流に luciferase cDNA を組み込んだ pGZB-Luc を CpG 配列数削減ベクターとして用いた。また CpG 配列を全く持たない pDNA 骨格（pCpG-mcs: InvivoGen）の human EF1 プロモータの下流に、CpG 配列を削除した合成 luciferase cDNA（ Δ Luc:InvivoGen）を組み込むことで、全く CpG 配列がない luciferase 発現 pDNA（pCpG- Δ Luc）を構築した。このとき、通常の luciferase cDNA を組み込むことで cDNA 部分のみに CpG 配列を持つ pCpG-Luc も併せて構築した。さらに、pCMV-Luc の CMV プロモータを pGZB-Luc の Δ CMV プロモータに置換することでプロモータ領域の CpG 配列のみを削除した p Δ CMV-Luc も構築した。それぞれの pDNA 骨格（pCpG, pCMV, pGZB）に IFN- γ cDNA を組み込むことで IFN 発現 pDNA（pCpG-Mu γ , pCMV-Mu γ , pGZB-Mu γ ）を構築した。pDNA のメチル

化：pCMV-Luc、pCpG- Δ Luc を CpG-methylase SssI で処理することで、pCMV-Luc に含まれる CpG 中シトシンをメチル化し、制限酵素 HpaII を用いた DNA 切断に対する抵抗性獲得を指標にメチル化を確認した。ハイドロダイナミクス法を利用した in vivo 遺伝子導入：naked pDNA をマウス体重の約 8% に相当する大容量の生理食塩水溶液として 5 秒間で急速に尾静脈内投与することで、マウス肝臓への遺伝子導入を行った。luciferase 遺伝子発現は、肝臓中の luciferase 活性の測定により、また IFN- γ の遺伝子発現は血清中 IFN- γ 濃度を ELISA 法により測定することにより評価した。

C. 結果

pCMV-Luc に比較して CpG 配列数を削減した pGZB-Luc では遺伝子発現の延長傾向が認められ、さらに CpG 配列のない pCpG- Δ Luc ではさらに持続的な遺伝子発現が得られた。pCpG- Δ Luc と pCpG-Luc の遺伝子発現にほとんど差が認められず、cDNA 部分の CpG 配列は遺伝子発現にほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった。プロモータ領域の CpG 配列の有無だけが異なる pCMV-Luc と p Δ CMV-Luc との比較では、p Δ CMV-Luc の場合により持続的な発現が得られたこと。また、同じ Δ CMV プロモータと luciferase cDNA を有する p Δ CMV-Luc と pGZB-Luc からの遺伝子発現は、CpG 配列数の少ない pGZB-Luc

のほうが持続的であった。さらに、メチル化処理した pCMV-Luc と pCpG-Luc を投与した後の遺伝子発現を測定した結果、pCpG-Luc ではメチル化処理の影響が認められなかったが、pCMV-Luc の場合にはメチル化により劇的に遺伝子発現が低下した。従って、CpG 配列のメチル化は遺伝子発現を抑制する一因であることが確かめられた。

構築した IFN- γ 発現 pDNA を投与した後の血清中 IFN- γ 濃度は、luciferase の場合同様 cDNA 部分に CpG 配列のない pCpG-Muy の場合に最も持続し、単回投与で治療に有効な IFN- γ 濃度が長期間にわたり検出された。

D. 考察

luciferase をコードするモデルベクターを用いた一連の検討結果から、遺伝子発現は、cDNA 部分にある CpG 配列にはあまり影響されないものの、プロモーターをはじめそれ以外の領域の CpG 配列を除去することで持続化することが示された。得られた情報に基づき、CpG 配列を全く持たない骨格に IFN- γ cDNA を組み込んだ発現ベクターを設計・評価した結果、昨年度に有用性を証明した pGZB-Muy に比較して、さらに持続的な発現が得られると共に、治療域により長期間血中濃度を維持できることが明らかとなった。

E. 結論

プラスミドベクター中の CpG 配列数・存在部位と遺伝子発現の持続性との関連を明らかにできた。得られた情報に基づき設計した IFN- γ 発現ベクターは有効性、安全性に優れた IFN 遺伝子治療に応用できるベクターである可能性が示された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshinaga T, Yasuda K, Ogawa Y, Nishikawa M, Takakura Y; DNA and its cationic lipid complexes induce CpG motif-dependent activation of murine dendritic cells. Immunology, 2006 Dec 20; [Epub ahead of print]
2. Kawano H, Nishikawa M, Mitsui M, Takahashi

Y, Hattori K, Yamaoka K, Watanabe Y, Takakura Y; Improved anti-cancer effect of interferon gene transfer by sustained expression using CpG-reduced plasmid DNA. Int. J. Cancer. 2007, in press.

2. 学会発表

1. CpG 配列削減によるインターフェロン遺伝子発現の持続化による癌遺伝子治療効果の増強、光井優、西川元也、河野博樹、高橋有己、山岡清、渡部好彦、高倉喜信、日本薬学会第 126 年会、仙台、2006 年 3 月
2. プラスミド DNA の CpG 配列削減による持続的遺伝子発現、光井優、西川元也、高橋有己、吉田寛幸、高倉喜信、第 2 回創剤フォーラム若手発表討論会、京都、2006 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウスHCV感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究班
分担研究報告書

脂質代謝制御による抗 HCV 戦略の検討

分担研究者 榎本信幸 山梨大学医学工学総合研究部 教授

研究要旨：近年、ウイルス増殖における脂質の重要性が次第に明らかにされているが、HCV（C型肝炎ウイルス）においても複製複合体形成の足場として、細胞内小器官膜上の「脂質ラフト」構造が重要であることが解明されつつある。我々は、脂質代謝制御を通じたHCV増殖制御を目的として、HCVレプリコン・システムを用い、脂質ラフトを構成するスフィンゴ脂質、コレステロール、飽和脂肪酸に注目し、これらの合成阻害剤であるミリオシン、スタチン等によってHCVレプリコン増殖が特異的に抑制されることを明らかとしてきた。本年度はこれらの結果を踏まえた上で、さらに発展させ、ビスフォスフォネートなどを含む、より効果の高い脂質代謝制御薬剤の探索を行い、抗HCV治療薬としての脂質代謝制御薬剤の可能性について検討した。

共同研究者：前川 伸哉 山梨大学医学部・肝疾患地域先端医療システム学 講師

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の複製は、複製複合体と考えられる構造物“membranous web”が、小胞体などの細胞内小器官膜における脂質構造“脂質ラフト”上で形成されてなされることが次第に明らかとされ、HCV増殖における脂質の重要性が注目を集めている。

我々は、昨年度本研究において、脂質ラフト構成成分であるスフィンゴミエリン、およびコレステロールに注目し、これらの合成阻害剤であるミリオシン、スタチン等が特異的な抗HCV作用を有することを明らかとし、これら薬剤の抗HCV治療薬としての可能性について報告した。本年度は、この結果を踏まえてさらに発展させ、宿主の脂質代謝制御を通じたHCV増殖制御を目的として、脂質代謝関連薬剤のHCV増殖に対する影響について、さらなる検討を行った。

B. 研究方法（2006年度）

脂質ラフトはスフィンゴミエリン、コレステロール、さらに飽和脂肪酸の3種類の脂質より構成される。昨年度に引き続いて、これらの脂質成分に着目し、昨年とは異なる作用点にて脂質合成を阻害する薬剤、あるいはこれらの脂質を脂質膜から直接除去する薬剤等を用い、HCV増殖に与える影響をHCV-subgenomic replicon システム、および完全粒子産生システム（JFH システム）を用いて解析した。

C. 研究成果

(1) コレステロール合成系路 Mevalonate pathway 阻害剤はHCV増殖を強力に抑制する
我々は、昨年度 Mevalonate pathway 阻害剤であるスタチンについて、simvastatinを用いてその抗 HCV 効果について明らかにしていたが、薬効を表す selectivity index は 10 程度で必ずしも高いとは言えなかった。今回我々は、Mevalonate pathway 下流のファルネシル酸シンターゼに対して強い阻

害効果をもつビスフォスフォネートに注目し、抗 HCV 活性の有無について検討したところ、Nitrogen-containing Bisphosphonate である Risedronate、Alendronat、Zoledronic acid において、スタチンを遙かに凌ぐ著明な抗 HCV 効果を持つこと (selectivity index 300~400) が明らかとなった。

(2) Mevalonate pathway 阻害剤による HCV 増殖抑制は、ゲラニルゲラニオールによって改善する。

強力な抗 HCV 活性を有するビスフォスフォネートの効果がコレステロールそのものの低下作用によるものか、他の機序によるものかを確認した。同経路の阻害によって、コレステロール合成のみならず、ゲラニルゲラニル化などの、タンパク質プレニル化が阻害されるが、同剤投与下においてゲラニルゲラニオールを投与することによって、HCV 増殖抑制はrescueされる傾向となった。すなわち、ビスフォスフォネートによる HCV 増殖抑制にはタンパク質のゲラニルゲラニル化抑制が重要な機序と考えられた。

(2) コレステロール吸着剤βサイクロデキストリンにより、HCV 増殖は抑制される。

一方、脂質ラフト構成成分であるコレステロールそのものの、HCV 増殖への関与を検証するため、直接脂質膜からコレステロールを吸着する作用を持つβサイクロデキストリンの効果を検討したところ、特異的な HCV 増殖抑制が認められ、コレステロールそのものも HCV 増殖に必須であることが考えられた。

D. 考察と結論

脂質ラフトを構成する脂質成分であるスフィンゴミエリン、コレステロール、飽和脂肪酸、各々の合成を阻害することによって、さらに、これらの脂質ラフト構成成分のみならず、蛋白質の脂質修飾のひとつであるゲラニルゲラニル化の阻害によっても、HCV 増殖が特異的に抑制されることが示され、脂質代謝制御が重要な抗HCV治療戦略のターゲットとなることが示された。

E. 研究発表

論文発表

1. Yamashiro T, Sakamoto N, Kurosaki M, Kanazawa N, Tanabe Y, Nakagawa M, Chen CH, Itsui Y, Koyama T, Takeda Y, Maekawa S, Enomoto N, Sakugawa H, Watanabe M.

Negative regulation of intracellular hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 3.

J Gastroenterol. 2006 Aug;41(8):750-7.

2. Itsui Y, Sakamoto N, Kurosaki M, Kanazawa N, Tanabe Y, Koyama T, Takeda Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Sekine Y, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M.

Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication.

J Viral Hepat. 2006 Oct;13(10):690-700.

3. Kohashi T, Maekawa S, Sakamoto N, Kurosaki M, Watanabe H, Tanabe Y,

Chen CH, Kanazawa N, Nakagawa M, Kakinuma S, Yamashiro T, Itsui Y, Koyama T, Enomoto N, Watanabe M. Site-specific mutation of the interferon sensitivity-determining region (ISDR) modulates hepatitis C virus replication. *J Viral Hepat.* 2006 Sep;13(9):582-90.

4. Koyama T, Sakamoto N, Tanabe Y, Nakagawa M, Itsui Y, Takeda Y, Kakinuma S, Sekine Y, Maekawa S, Yanai Y, Kurimoto M, Watanabe M. Divergent activities of interferon-alpha subtypes against intracellular hepatitis C virus replication. *Hepatol Res.* 2006 Jan;34(1):41-9.

5. Hosogaya S, Ozaki Y, Enomoto N, Akahane Y. Analysis of prognostic factors in therapeutic responses to interferon in patients with chronic hepatitis C. *Transl Res.* 2006 Aug;148(2):79-86.

学会発表

1. Amemiya F, Maekawa S, Kanayama A, Itakura Y, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Okada H, Enomoto N. Inhibition of sphingolipid synthesis attenuates HCV replication in vitro. International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (13th Annual Meeting) August 27-31, 2006; Cairns (Australia).

2. Maekawa S, Itakura Y, Amemiya F,

Kanayama A, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Sakamoto N, Enomoto N. HCV modulates RIG-I signaling pathway differently dependent on HCV isolates. International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (13th Annual Meeting) August 27-31, 2006; Cairns (Australia).

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他