

administration developed lamivudine resistance within 2 years. However, a negative result of HBV DNA at 6 months does not necessarily guarantee the absence of lamivudine resistance because nearly 30% of such patients developed resistance within 2 years. On the other hand, HBVcrAg levels of less than 4.7logU/ml at 6 months are a useful indicator of patients who are unlikely to develop lamivudine resistance, because no such patients developed resistance during the follow-up period in the present study. Lower serum HBVcrAg levels may reflect lower levels of cccDNA in hepatocytes because the mRNAs of HBVcrAg are transcribed from the cccDNA (18, 22, 23). This possibility may explain our finding that patients whose HBVcrAg levels decreased sufficiently were unlikely to develop lamivudine resistance, because cccDNA provides the templates for viral and pregenomic messenger RNA (18, 22, 23), which may be a source of lamivudine-resistant strains.

In conclusion, our results suggest that measurement not only of HBV DNA but also of HBVcrAg is useful for predicting the occurrence of lamivudine resistance. HBV DNA measurement is valuable for identifying patients who are at high risk of developing this resistance and HBcrAg measurement is valuable for identifying those who are at low risk.

#### Acknowledgements

This research was supported in part by a research grant on hepatitis from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

#### References

- DOONG S L, TSAI C H, SCHINAZI R F, LIOTTA D C, CHENG Y C. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8495-9.
- BENHAMOU Y, DOHIN E, LUNEL-FABIANI F, POYNARD T, HURAOX J M, KATLAMA C, et al. Efficacy of lamivudine on replication of hepatitis B virus in HIV-infected patients. *Lancet* 1995; 345: 396-7.
- DIENSTAG J L, GOLDIN R D, HEATHCOTE E J, HANN H W, WOESSNER M, STEPHENSON S L, et al. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* 2003; 124: 105-17.
- DIENSTAG J L, PERRILLO R P, SCHIFF E R, BARTHOLOMEW M, VICARY C, RUBIN M. A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection. *N Engl J Med* 1995; 333: 1657-61.
- LAI C L, CHIEN R N, LEUNG N W, CHANG T T, GUAN R, TAI D I, et al. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. N Engl J Med* 1998; 339: 61-8.
- LIAW Y F, SUNG J J, CHOW W C, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1521-31.
- MATSUMOTO A, TANAKA E, ROKUHARA A, et al. Efficacy of lamivudine for preventing hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: a multicenter retrospective study of 2,795 patients. *Hepatol Res* 2005; 32: 173-84.
- LING R, MUTIMER D, AHMED M, et al. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996; 24: 711-3.
- LOK A S, LAI C L, LEUNG N, YAO G B, CUI Z Y, SCHIFF E R, et al. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003; 125: 1714-22.
- TIPPLES G A, MA M M, FISCHER K P, BAIN V G, KNETEMAN N M, TYRRELL D L. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996; 24: 714-7.
- LIAW Y F, CHIEN R N, YEH C T, TSAI S L, CHU C M. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology* 1999; 30: 567-72.
- SUZUKI F, TSUBOTA A, ARASE Y, SUZUKI Y S, AKUTA N, HOSAKA T, et al. Efficacy of lamivudine therapy and factors associated with emergence of resistance in chronic hepatitis B virus infection in Japan. *Intervirology* 2003; 46: 182-9.
- ZOLLNER B, SCHAFER P, FEUCHT H H, SCHROTER M, PETERSEN J, LAUPS R. Correlation of hepatitis B virus load with loss of e antigen and emerging drug-resistant variants during lamivudine therapy. *J Med Virol* 2001; 65: 659-63.
- KIMURA T, ROKUHARA A, SAKAMOTO Y, YAGI S, TANAKA E, KLYOSAWA K, et al. Sensitive enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigens and their correlation to virus load. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 439-45.
- ROKUHARA A, TANAKA E, MATSUMOTO A, KIMURA T, YAMAURA T, ORII K, et al. Clinical evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigen; a marker distinct from viral DNA for monitoring lamivudine treatment. *J Viral Hepatol* 2003; 10: 324-30.
- BRUSS V, GERLICH W H. Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein. *Virology* 1988; 163: 268-75.
- GARCIA P D, OU J H, RUTTER W J, WALTER P. Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J Cell Biol* 1988; 106: 1093-104.
- LEE W M. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337: 1733-45.
- MIZOKAMI M, NAKANO T, ORITO E, TANAKA Y, SAKUGAWA H, MUKAIDE M, et al. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Lett* 1999; 450: 66-71.
- KOBAYASHI S, SHIMADA K, SUZUKI H, TANIKAWA K, SATA M. Development of a new method for detecting a mutation in the gene encoding hepatitis B virus reverse transcriptase active site (YMDD motif). *Hepatol Res* 2000; 17: 31-42.
- MASON W S, HALPERN M S, ENGLAND J M, SEAL G, EGAN J, COATES L, et al. Experimental transmission of duck hepatitis B virus. *Virology* 1983; 131: 375-84.
- SUMMERS J, SMITH P M, HORWICH A L. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol* 1990; 64: 2819-24.
- TUTTLEMAN J S, POURCEL C, SUMMERS J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 1986; 47: 451-60.

**Tanaka et al.**

24. MORALEDA G, SAPUTELLI J, ALDRICH C E, AVERETT D, CONDREAY L, MASON W S. Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J Virol* 1997; 71: 9392-9.
25. WERLE-LAPOSTOLLE B, BOWDEN S, LOCARNINI S, WORS-THORN K, PETERSEN J, LAU G, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004; 126: 1750-8.
26. ZHU Y, YAMAMOTO T, CULLEN J, et al. Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *J Virol* 2001; 75: 311-22.
27. LAU D T, KHOKHAR M F, DOO E, GHANY M G, HERION D, PARK Y, et al. Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology* 2000; 32: 828-34.
28. YUEN M F, SABLON E, HUI C K, YUAN H J, DE-CRAEMER H, LAI C L. Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2001; 34: 785-91.
29. MIHM U, SARRAZIN C, HERRMANN E, TEUBER G, VON WAGNER M, KRONEA BERGER B, et al. Response predictors and results of a long-term treatment with lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *Z Gastroenterol* 2003; 41: 249-54.



# 今日の話



## ヒト肝細胞キメラマウス

再生医療，創薬などの動物モデルとして有用．様々な病態モデルの開発にも期待

組織の再生力を利用して，損傷組織の治療を行なう新しい医療技術が注目されている．生体組織は，分化細胞と未分化細胞によって構成されている．前者は，組織の構造形成と機能の発現に寄与している．後者は，前者に比べてその数が著しく少なく，組織の特殊な部位（ニッチ）に存在し，分裂せず静止期（G<sub>0</sub>）に留まっているが，組織が損傷すると，分裂を開始し，失われた細胞を補給する．このような細胞は組織幹細胞と呼ばれている．

筆者らは，肝臓の再生に関する研究を行なっている．肝臓は，終生，高い再生能力を有する器官として知られているが，その実質組織を構成する肝細胞の細胞周期時間がおよそ1年と長いので，その幹細胞（肝臓幹細胞）の性質に関しては不明なことが多い．幹細胞の性質を調べるためには，これを増殖させ分化させるための実験系が必要である．そのような実験系として，*in vivo* および *in vitro* の2つの実験系がある．前者は，生体組織に傷害を与え，目的とする細胞を適当な方法で標識後，その組織に移植し，増殖分化させるものである．後者は，生体外に分離し，これを培養し，増殖分化させるものである．通常は，この2つの方法を併用して，組織幹細胞の性質に関する情報を得ている．本稿では，ヒト肝細胞を *in vivo* で増殖分化させる方法を紹介する．

筆者は，成人肝細胞をマウスに移植し，ホストの肝細胞のほとんどをヒト肝細胞で置換させる方法を開発した．このようなマウスをヒト肝細胞キメラマウスと呼ぶ．このキメラマウスは，ヒト肝細胞で構成されている肝臓を有するため，実験研究として利用することが不可

能な人体肝臓の代わりに，ヒト細胞の性質を動物実験的に研究することを可能にしてくれるばかりでなく，医学的あるいは薬学的研究の動物モデルとしても価値が出てきた．また，大量のヒト肝細胞を得ることが可能なので，これを医療用に利用する可能性も秘めている．

マウスにヒト肝細胞を移植してこれを増殖させるためには，ホストは免疫不全と肝不全の2つの条件を満たす必要がある．免疫不全マウスとしては，スキッド（SCID, severe combined immunodeficiency）マウス（SCIDマウス）を利用した．SCIDマウスは，BおよびTリンパ細胞を欠如している．NK細胞，マクロファージおよび補体系は有している．肝不全マウスとしては，アルブミンエンハンサープロモーターの下流にウロキナーゼ型線溶活性化酵素（プラスミノゲンアクチベータ）（uPA）を連結した遺伝子を導入したマウス（uPA-トランスジェニックマウス，以下，uPAマウス）<sup>(1)</sup> を利用した．PAはプラスミン（線溶酵素）の不活性前駆体であるプラスミノゲンをプラスミンに変換させる酵素である．プラスミンは止血栓（フィブリン fibrin）の分解作用ばかりでなく，細胞外基質の分解や肝細胞増殖因子（HGF）の不活性前駆体（proHGF）を活性HGFに変換させる作用もある<sup>(2)</sup>．このマウス肝臓は，出生時から急性/亜急性障害に似た症状を示す．その色は，正常肝の赤色ではなく，詳しい理由は不明であるが，脂肪顆粒を多く含むため白い色をしている．

uPA遺伝子のヘテロ接合体トランスジェニックマウスでは，導入遺伝子の欠失を起こした細胞が野生型の表

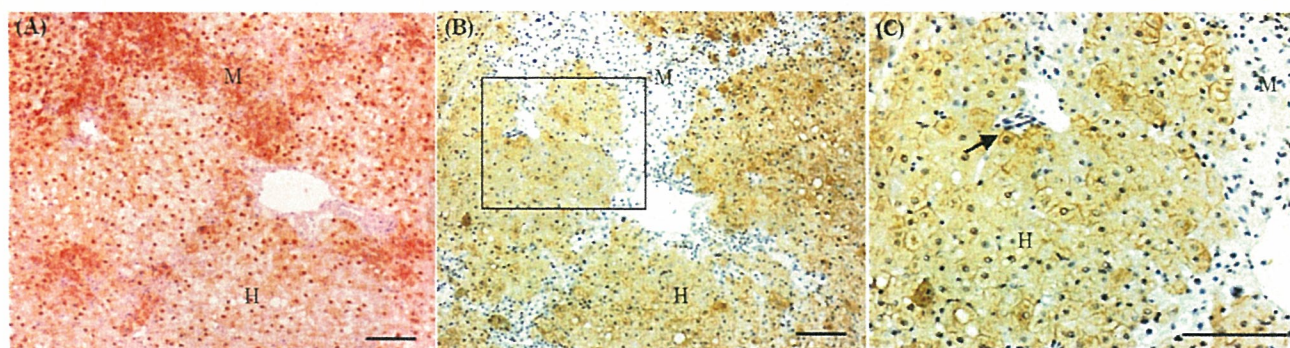


図1 ■ マウス肝臓のヒト肝細胞による置換

(A) 9ヵ月男児の肝細胞を移植した。置換率67%。ヒトゲノムDNAプローブによる *in situ* ハイブリダイゼーション。H: ヒト肝細胞領域 (核が茶色に染まっている領域), M: マウス肝細胞領域。(B) (A) のキメラマウス肝臓切片の隣接切片をヒトサイトケラチン8/18を特異的に染色する抗体で反応させた。Hは茶色に染まっているヒト領域。(C) (B) の図中の長方形で囲んだ部位の拡大写真。矢印は胆管細胞を示しているが、抗体に反応していない。バーは100  $\mu$ m。

現型を示すため正常肝細胞となり、増殖を開始し、正常肝細胞集落 (赤いコロニー) を形成する。この集落はいわば再生コロニー (regenerative nodule) である。白い障害肝の中で赤い再生コロニーは次第に大きくなり、またコロニーどうしが融合して、8週齢までには完全に正常肝が構築される。したがって、この肝臓は障害肝の再生過程の研究のモデルとして利用されている。障害領域では、肝細胞が TGF- $\beta$ 1 や p53 などのアポトーシス誘導因子を合成分泌し、そのオートクライン作用でアポトーシスを起こす。一方、非実質細胞は、HGF などの肝細胞増殖因子を活発に合成分泌し、隣接する再生コロニーの肝細胞の増殖をパラクライン作用で誘導する<sup>(3)</sup>。

uPA マウスと SCID マウスを交配させることによって、肝障害で免疫不全マウス (uPA/SCID マウス) を得ることができる。このマウスに、正常ヒト肝細胞を移植する。マウスの肝門脈は径が細いため、通常、脾臓に移植する。移植細胞は、血管を流れ、肝臓に到達し、肝細胞索に侵入し、そこに生着する。このヒト肝細胞が増殖する仕組みは、上述のヘテロ接合体肝臓における再生コロニーの出現と増大の仕組みと同じであると考えられる。ホストの障害肝細胞はアポトーシスを起こす一方、ホストの非実質細胞は HGF などの肝細胞増殖促進因子を分泌し、ヒト肝細胞の増殖を促す。ホスト肝細胞から分泌される uPA は、増殖しようとしているドナー肝細胞の周辺の細胞外基質を分解するであろう。これによって生じたスペースを利用してドナー肝細胞はその数を増やす。この過程を繰り返しながら、ドナーのヒト肝細胞は次第に正常肝を構築していくと考えられる。この置換

の様子は、キメラマウスの肝臓切片を作製して、ヘマトキシリンによる一般組織染色とヒト特異的抗原染色を行なうことにより (図1), あるいは、肝臓のゲノムDNAに対して、ヒトおよびマウス細胞に特異的配列をPCR法で増幅して見ることができる。

ところが、ヒト肝細胞が分泌する補体系因子がホストの腎臓などの器官を攻撃して壊死させるためと思われるが、ヒト肝細胞がある程度以上増殖するとホストが死ぬ。筆者らは、移植後、ホストに補体因子の活性阻害物質を投与することによってこの問題を解決することができた<sup>(4)</sup>。高置換率のヒト肝細胞キメラマウスを得ることは、種々の要因が関係しており、かなり困難であるが、現在、筆者らは、70%以上の置換率をもつキメラマウスを50%の効率で作製可能な方法を確立できている。

以上の研究の結果、ヒト肝細胞は、異種動物の体内環境でも増殖して正常な肝臓組織を構築することができることが示された。このようなヒト肝細胞は、はたしてヒト体内環境で表現している正常な機能を発現しているであろうか。この疑問に答えるために、筆者らは、薬物の代謝機能と肝炎ウイルス被感染性を調べた。薬物代謝に関与するチトクローム P450 (CYP) のうち代表的な6種類のサブメンバーのヒト遺伝子の発現パターンを調べたところ、移植に利用したドナーの発現パターンに酷似していた<sup>(4)</sup>。また、キメラマウスをリファンピシンあるいは3-メチルコラントレンで処理したところ、前者では CYP3A4, 後者では CYP1A1 と CYP1A2 の遺伝子が特異的にその発現を高めていた<sup>(4)</sup>。これらのことから、キメラマウスでのヒト肝細胞は化合物特異的に正常な代謝



反応を行なっていると考えられる。また、BおよびC型ウイルス性肝炎の患者血清をキメラマウスの鎖骨下静脈から注入すると、マウス血清中のこれらウイルスタイターが増加すること、このとき、既知の抗ウイルス剤の投与を開始するとタイターが減少することがわかった<sup>(5)</sup> (一部未発表)。肝炎ウイルスは培養ヒト肝細胞では感染増殖しないので、これらの結果は、キメラマウスのヒト肝細胞の正常性を示している。

今後、ヒト肝細胞キメラマウスはヒト肝臓を有するモデル動物として、生物学、医学、医療、薬学、および創薬などの分野で利用価値が増大するものと考えられる。特に、次のような研究に関してはすでに活発な活動が始まっている。

①障害肝臓を、正常ヒト肝細胞を移植して治療するこ

とを目指す再生医療の方法開発と理論の構築のためのモデル研究

②医薬品候補化合物の代謝パターンの解析

③抗肝炎ウイルス剤の開発

筆者らは、今後、キメラマウスを肝炎、肝硬変、肝癌などの有効な病態モデル動物として利用するための研究を行なう予定である。

- 1) J. L. Heckel *et al.* : *Cell*, 62, 447 (1990).
- 2) T. H. Kim *et al.* : *Hepatology*, 26, 896 (1997).
- 3) S. Locaputo *et al.* : *Hepatology*, 29, 1106 (1999).
- 4) C. Tateno *et al.* : *Am. J. Pathol.*, 165, 901 (2004).
- 5) M. Tsuge *et al.* : *Hepatology*, 42, 1046 (2005).

(吉里勝利, 文部科学省・広島県知的クラスター創成事業, 広島大学大学院理学研究科)



## 重要農作物を荒らす疫病菌の繁殖ホルモンをつきとめた 遺伝子多様化のチャンス逃さない疫病菌の性の仕組み

疫病菌とは、植物に感染してしばしば甚大な被害を与える *Phytophthora* 属の病原糸状菌の総称である。 *Phytophthora* という属名はギリシャ語の *phyton* (植物) と *phthora* (破壊者) に由来することからも、たちの悪さが伺える。疫病菌は60種以上が知られており、その多くが植物病原性である。なかでもジャガイモとトマトを宿主にする *P. infestans* は、1840年代中ごろジャガイモを主食としていたアイルランドで蔓延し、約100万人の餓死者と100~150万人のアメリカ移民を出す「アイルランド飢饉」をひき起こした<sup>(1)</sup>。このときのアメリカ移民の中にケネディ家の祖先も含まれていたといわれる。ジャガイモ疫病による経済的損失は世界で年間数十億ドルにのぼり、膨大な量の農薬が防除に用いられるため環境への影響が懸念されている。最近では、新種の疫病菌 *P. ramorum* の感染による樹木の大規模な立枯れ (sudden oak death) が欧米で広がりつつある<sup>(2)</sup>。

疫病菌は、最近まで五界説という菌界 (Fungi) に分類されていたが、カビやキノコとは異なる点が多く、今では原生生物界 (Protista) に分類されている。菌糸状の外観 (図1) からは想像しがたいが、珪藻や褐藻に近い。疫病菌は、後で述べるように有性生殖において耐久性の「卵胞子」を形成することから卵菌類と呼ばれ、金魚の死骸や水中のスルメなどに生えるミズカビと同類

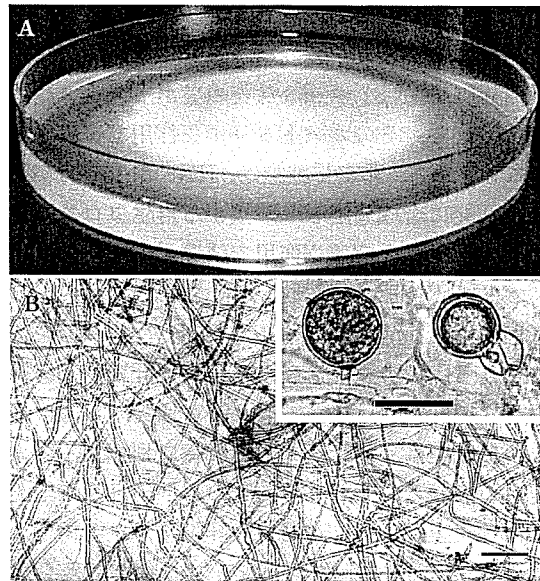


図1 ■ 疫病菌のすがた

(A) 寒天培地上のコロニー。(B) 菌糸および無性胞子 (囲み左) と卵胞子 (囲み右)。卵胞子は二重膜構造で小型球状の造精器を伴う。バーは50  $\mu\text{m}$

である。

さて、疫病菌には植物病原菌という恐ろしい特徴に加え、有性生殖を営むという興味深い側面がある。有性生殖では菌糸から分化した造卵器と造精器が融合し、受精

# 【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】

Proteomics: encounter and research progress with mass-spectrometer

大房 健<sup>1)</sup>・吉里 勝利<sup>2)</sup>

Oofusa Ken Yoshizato Katsutoshi

Keywords

MS, 2D-PAGE, STAP

## 要旨

プロテオーム用質量分析装置の登場により、少量のタンパク質の同定作業が可能になったことで、2次元電気泳動の再評価が行われ、HPLCとならんでプロテオーム解析を支える柱の一つとなった。最初に導入した質量分析装置は場所取りで、ペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)解析がメインであったが、基礎生物学の立場からタンパク質に焦点を当てながら研究するための強力なツールであった。その後の質量分析装置の改良に加えて、ヒトゲノムの解析完了につづき、マウスゲノムの解析も進行しており、医歯薬分野における質量分析装置を用いたプロテオーム解析プラットフォームは確立された。これにより従来のタンパク質化学的解析手法が汎用化され、医療応用を可能にするブレークスルーを生み出すきっかけとなった。これにより、医療に関与する研究者によるタンパク質解析が広く行われ、今後の成果が期待されている。

子産物の解明は、相同・相似塩基配列を持つヌクレオチドプローブを用いた $\lambda$ gt10ライブラリのスクリーニング、あるいは、原因となるタンパク質を精製し抗体を得て、 $\lambda$ gt11ライブラリ(発現ライブラリ)の抗体スクリーニングによってクローニングされてきた。しかし、これらのアプローチにおいても、入手できたプローブと目的遺伝子の配列類似性が低く擬陽性プラークが多いケースや、精製に手間と時間がかかるため原因となるタンパク質をcDNAが得られるより前の段階で、1つに絞り込む必要があった。そのため、真の原因タンパク質である確証が無い状態で研究資源を投入すべきか悩むケースが多かった。このような状況下では、精製されたタンパク質が目的遺伝子の産物かどうか確認できない場合もあった。

## 2. プロテオーム用質量分析装置の実用化と2次元電気泳動の復権

### 1. タンパク質解析用質量分析装置登場以前

タンパク質解析用質量分析装置登場以前には、2次元電気泳動により発現するタンパク質の差異を解析しても、小さいスポットでは、エドマンシーケンサによるアミノ酸配列が決定できず、抗体を得ることも難しく、限定された用途にしか使われていなかった。このため生命現象の原因遺伝子あるいは遺伝

プロテオーム用質量分析装置の登場により、少量のタンパク質の同定作業が可能になったことで、1970年代に既に確立されていた古い技術である2次元電気泳動の再評価が行われ、HPLCとならんでプロテオーム解析を支える柱の一つとなった。さらに、2次元電気泳動の技術も合成両性電解質とそれを利用した固定化pH勾配を用いたプレキャストゲル(IPGストリップ)の開発、実用

<sup>1)</sup> 株式会社プロフェニックス: ProPhoenix Company Limited

<sup>2)</sup> 広島大学大学院理学研究科 生物科学専攻(発生生物学): Hiroshima University Graduate School science research course biology major (developmental biology)

<sup>1)</sup> 〒739-0046 広島県東広島市鏡山3丁目13番26号 広島テクノプラザ内クリエイトコア Fax:082-493-8834 E-mail:proteome@prophoenix.co.jp

<sup>2)</sup> 〒739-8526 広島県東広島市鏡山1-3-1 Fax:082-424-1492 E-mail:kyoshiz@hiroshima-u.ac.jp

化によって、再現性（繰り返し再現性と研究室間における再現性）が大きく改善されたことも再評価に大きく寄与している。

### 3. 筆者のラボで活躍した質量分析装置

筆者らの研究グループが最初に導入した質量分析装置はBruker Daltonics社のreflex IIIであった。セットアップのためにドイツから来訪した技術者は、理論上はデータベースに依存せず、内部アミノ酸配列情報が得られる「de novo sequence」も可能であるとの説明を行ったが、運用を始めると同装置で可能な解析は、ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF)解析が主であった。また、当時はデータベースが充実しておらず、同定できないタンパク質も多くあった。さらに、設置室が居室と兼用になったため部屋が狭くなり動作音も大きく悩まされたスタッフも多かった。しかし、発生生物学、再生学、細胞生物学などの研究プロジェクトをタンパク質に着目して推進するためのきわめて有力なツールであることには偽りがなかった。

続いて、筆者らは、Micromass社のQ-ToFを運用する機会に恵まれた。この装置は、Q-TrapとToFを組み合わせることにより、MS/MSモードでの運用が可能であり、2次元電気泳動後のゲルより抽出したタンパク質のトリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列をde novo sequencingによって決定することが可能であった。これにより、我々は多くのタンパク質の同定に成功した。その中には、肝星細胞の活性化に伴って増加するスポットに由来するタンパク質も含まれており、当時はこの配列がデータベースに収載されていなかったためSTAP (stellate cell activation-associated protein)と命名した。STAPは、酸素結合能を持つ第四のグロビンとして注目を浴びている。その生物学的機能は現在のところ不明であるが、臓器の線維化や酸素濃度のセンサーとして発生過程など種々の生命現象で重要な役割を果たしている可能性が高い。

### 4. プロテーム解析プラットフォームの確立

質量分析装置の改良と進歩に加えて、ゲノム解析の進行により、高感度にタンパク質同定が可能となり、研究対象の組織・細胞で発現しているタンパク質を網羅的に解析対象とする「プロテオミクス」が脚光を浴びるようになった。感度と速度の向上により、2次元電気泳動によってゲル上に分離展開された1000～数千のスポットの解析が可能になり、Protein-omicsつまり、定義に即したプロテオミクス解析が現実のものとなった。

ヒトゲノムの解析完了につづき、マウスゲノムの解析も進行しており、医歯薬分野における質量分析装置を用いたプロテーム解析プラットフォームは確立したと言っても良く、同定作業はPMFで行える環境が整備されつつあるため、医用応用分野においては、感度よりコスト、操作性、あるいは解析速度を優先した質量分析装置が用いられるケースも多い。もちろん、ゲノムデータベースが整備されていない生物種を対象とした基礎生物学分野においては、PMF解析では同定が行えず、de novo sequencingによる同定作業が要求される場面も多く残されており、高感度化への要求も高く、超伝導状態においた高感度で広い質量レンジに対応したディテクター（検出器）の開発が行われている。

### 5. 網羅的解析から標的を絞った解析へ

タンパク質について、網羅的解析を突き詰めていくと、ゲノム情報に行き着く部分と、ゲノム情報には含まれていない部分が見えてくる。ゲノム情報に行き着く部分については、ゲノムDNAあるいはその翻訳産物であるRNAの解析が容易であり、かつハイスループットである。しかし、設計図であるDNAから中間体であるRNAを経て作られた部品としてのタンパク質は、転写と翻訳の過程を経た後に、酵素として働く他のタンパク質の作用によって完成品となるものがある。このプロセスは、翻訳後修飾と呼ばれ、リン酸化、酸化、糖鎖付加、及び脂質付加などが知られている。この中で特にリン酸化では、多くのプロテインキナ

ーゼやプロテインホスファターゼなどの酵素によって生じるタンパク質のリン酸化状態の変化が、細胞の分裂、分化、及びガン化などに深く関わっていることが知られており、多くの研究者の研究対象となっている。この翻訳後修飾に関して、ゲノム解析のみから得られる情報はきわめて限られており、実際のタンパク質の修飾状態を確認していく必要があり、研究者の期待を集めている解析手法である。

このニーズを満たすために、翻訳後修飾を解析するための機構が付加された質量分析装置が開発・販売されている。とくに、トリプシン消化ペプチドの翻訳後修飾部位を残したままでイオンを

分離し、質量を計測するための新しい電場型トラップ（目的の質量数を持つイオンだけを一時的にためておくユニット）を用いたMSnが開発され、翻訳後修飾解析に力を発揮している。

プロテオーム用質量分析装置の登場は、従前のタンパク質化学的解析手法を汎用化し、医用応用を可能にするブレークスルーを生み出すきっかけとなった。これにより、本特集においても紹介するとおり、医療に関与する研究者によるタンパク質解析が広く行われ、その成果も得られている。今後のタンパク質解析のさらなる発展とその応用が社会にもたらす果実に期待したい。

<細胞ニュース>

第14回 日本消化器関連学会週間 (DDW-Japan)

下記日程で日本消化器関連学会（第48回日本消化器病学会大会 第72回日本消化器内視鏡学会総会 第10回日本肝臓学会大会 第44回日本消化器癌検診学会大会 第37回日本消化吸収学会総会）が開催されます。

2006年10月11日（水）～14日（土）

会場：札幌コンベンションセンター・道立総合体育センター

シンポジウム（抜粋）

- 1.炎症と消化器発がん
- 2.消化管腫瘍の分子診断と標的治療
- 3.大腸癌に対する抗癌剤のシンポとQOL
- 4.肝移植後のウイルス肝炎再発対策
- 5.内視鏡でみた胃炎・十二指腸炎と腹部症状の関連
- 6.膵がん診療におけるトランスレーショナルリサーチの現状と展望 他

招待講演（抜粋）

1. Multiple Pathways to Colorectal Cancer
2. Endoscopic diagnosis of esophageal columnar metaplasia or Barrett's esophagus
3. 電子内視鏡時代の胃炎粘膜拡大分類
4. Function of Neonatal Fc receptor for IgG in mucosal immunity
5. 消化器管腫瘍内視鏡-現在と未来-
6. IBDにおける内視鏡の役割-特にDALMの発見、治療について- 他

特別講演（抜粋）

1. 幹細胞生物学と再生医療への展開
2. 診療情報のセキュリティと相互利用性ーデジタル内視鏡画像の真正性確保を中心にー
3. Helicobacter pylori と胃癌；The final answer
4. 私の内視鏡人脈記ーデジタルカメラ論をふくめてー
5. これからの日本のがん対策のあり方について
6. ニュートリゲノミクスを展望するー食品の消化系調節機能の解析例を含めてー 他

ワークショップ（抜粋）

1. ペグインターフェロン・リバビリン併用療法無効例の特徴と対策
2. トランスレーショナルリサーチの現況と問題点
3. 肝疾患における酸化ストレス
4. 思い出の症例：臨床の原点
5. 膵胆道の早期癌：発見と治療のための戦略
8. 胆膵画像診断の最先端
6. 大腸がんの発育進展と治療 他



表 題

著 者 名

---

---

醫學のあゆみ 別刷

第 卷・第 号： 年 月 日号

## 病理学

## 乏突起膠細胞の免疫組織化学的マーカー

Immunohistochemical markers of oligodendrocytes

複雑な突起網を形成する神経系の研究において、細胞の識別に役立つ特異抗体は欠かすことができない。乏突起膠細胞は髄鞘形成を特徴とする中枢神経系グリア細胞の一種で、髄鞘には特異的に発現する分子が豊富に存在することから、同細胞を認識する特異抗体の開発も容易に達成できるに違いない、と多くの研究者は当初楽観的に考えていたであろう。しかし、そうした分子を標的とした抗体は培養環境においては使用可能であっても、組織切片ではほとんど役に立たなかった。なぜならば同細胞の細胞体と髄鞘の連続性は電顕を駆使しても証明がかなり困難であり、そのような事情が横たわっているのは、髄鞘を認識する抗体でいくら脳組織を免疫染色してみても細胞の同定に役立つはずもない。そのため、乏突起膠細胞の免疫組織化学的マーカーの開発は21世紀にもち越された宿題となった。

一方、乏突起膠腫は乏突起膠細胞あるいはその前駆細胞からの発生が想定される脳腫瘍で、成人の脳白質に好発し、類円形核とperinuclear halo、網目状の血管、石灰化などを特徴とする。典型的な構築を形成する症例の場合、病理診断は比較的容易であるが、個々の腫瘍細胞は特異的な指標に乏しく、しかも同腫瘍は髄鞘を形成せず、髄鞘関連分子の発現もはっきりとしない。ただし、このような形態を示す脳腫瘍が化学療法によく反応することは事実であり、適切な病理診断に役立つマーカーがこれまでずっと渴望されつづけていた。

その問題解決の糸口は乏突起膠細胞の発生学的研究から見出された。同細胞の発生分化を制御する

転写因子 Olig1, Olig2 が齧歯類やニワトリにおいてあいついで同定された<sup>1)</sup>。一般に転写因子は核内で作用する。よって Olig も核に発現しているならば、その抗体は乏突起膠細胞のよい免疫組織化学的マーカーなることが期待され、著者を含む国内外の複数のグループがそれぞれ独自に抗体を開発し、この仮説が実証された<sup>2)</sup>。乏突起膠腫においてもほぼ100%に発現することが明らかにされ、乏突起膠細胞由来であることを示唆する結果を得たが、星状膠腫においてもかなり陽性率が高いことがわかり、グリオーマの鑑別にはかならずしも役に立たないという課題は残された<sup>2)</sup>。最近の研究で Olig2 は、発生期においてニューロンとグリアの系譜を分ける重要な分子であることが指摘され<sup>3)</sup>、このことがグリオーマ全般において幅広く Olig2 が発現していることと関係があるかもしれない。

また、微小管関連蛋白である TPPP/p25 は  $\alpha$ synuclein が蓄積する Parkinson 病、びまん性 Lewy 小体病、多系統萎縮症などにおいて、 $\alpha$ synuclein とほぼオーバーラップして発現する<sup>4)</sup>。一方で、正常脳では乏突起膠細胞の細胞体に TPPP/p25 が選択的に発現しており、マーカー分子としての有用

性が示唆されている<sup>5)</sup>。

Olig2, TPPP/p25 のいずれもが完全な特異抗体とはいえないが、ともにホルマリン固定パラフィン包埋組織において使用可能であり、特性を理解して使用すれば十分な実用性を発揮する。乏突起膠細胞の核ならびに細胞体を選択的に認識する抗体が出揃い、今後は乏突起膠細胞の病理学的理解がいつそう深まることが期待される。

- 1) 竹林浩秀, 池中一裕: オリゴデンドロサイトと運動ニューロンの発生を制御する Olig2 遺伝子. 細胞工学, **22**: 406-411, 2003.
- 2) Yokoo, H. et al.: Anti-human Olig2 antibody as a useful immunohistochemical marker of normal oligodendrocytes and gliomas. *Am. J. Pathol.*, **164**: 1717-1725, 2004.
- 3) Marshall, C. A. et al.: Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells. *J. Neurosci.*, **25**: 7289-7298, 2005.
- 4) Kovacs, G. G. et al.: Natively unfolded tubulin polymerization promoting protein TPPP/p25 is a common marker of  $\alpha$ -synucleinopathies. *Neurobiol. Dis.*, **17**: 155-162, 2004.
- 5) Nishie, M. et al.: Oligodendrocytes within astrocytes ("emperipolesis") in the cerebral white matter in hepatic and hypoglycemic encephalopathy. *Neuropathology*, **26**: 62-65, 2006.

横尾英明 / Hideaki Yokoo

群馬大学大学院医学系研究科病態病理学分野

## 薬理学・毒理学

## キメラマウス

Chimeric mice with human hepatocytes

## なぜ、キメラマウスか

科学は2つの方法論を用いて自然現象を理解しようとしている。ひとつは現象に関与している物質の同定と分離である。他のひとつはその物質が現象を成立させるために演じている役割(機能)の決定

である。たとえば、10個の物質が成立させている現象があるとする、われわれは“同定”と“機能”作業をそれぞれ独立して10回行う。しかし、10回の作業では真に理解した気持ちにならないであろう。それはこの10個の物質だけ

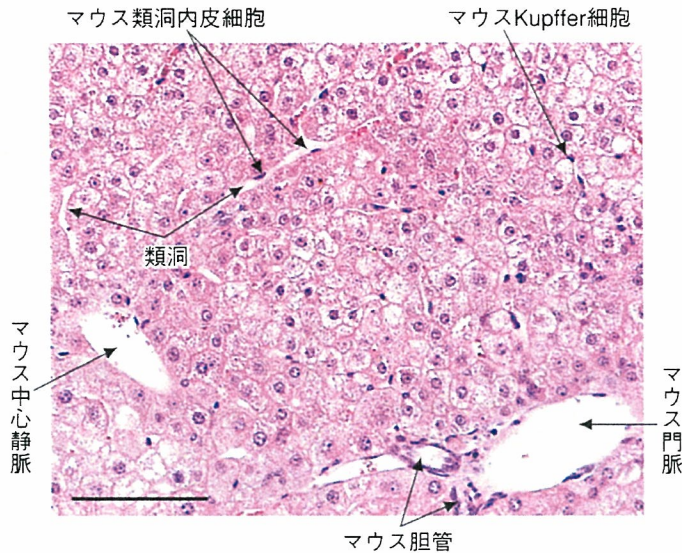


図1 ヒト肝細胞キメラマウス肝組織

ヒト肝細胞を uPA/SCID マウスへ移植し、移植後 82 日目に肝を採取した。マウス肝切片のヘマトキシリン・エオジン染色像を示す。視野のすべての領域にはマウス肝細胞はみられず、ヒト肝細胞で置換されている。ヒト肝細胞の間には類洞とよばれる毛細血管が存在し、マウス類洞内皮細胞がみられる。その他の血管や胆管構造はマウス由来の細胞で構成されている。Bar=100 $\mu$ 。

を、そしてこれをすべて使って現象を再現できるか検証していないからである。再現するには、再現系の温度や各物質の濃度などの物理パラメータを確定しなければならない。再現に成功したとき、われわれはその現象を真に理解したと思える。このような考えで、著者は個々の物質の“同定”作業とその“機能”の解明作業を“分析”作業とよび、現象の最終的理解のために必須な作業を“再構成”作業とよんでいる。科学は分析と再構成を使い分けながら自然現象の理解を進めている。

著者らは肝の再生医療の観点から再生現象に関心をもっている。肝再生現象を理解するためには多くの事項を理解する必要があるが、基本的なことは“肝細胞が生体内で示す旺盛な増殖能力の原因の理解”である。これを理解することができれば、体外に取り出したヒト肝細胞を人工環境中で必要な数だけ増殖させて肝疾患患者に移植して救命することができるのである

う。この原因解明の作業はいまだ道半ばである。

“肝細胞の旺盛な増殖能力の理解”を得るための科学的方法はまず、①肝細胞が活発に増殖することを可能にしている物質の分析である。つぎに、②これら物質だけを利用して実際に肝細胞を人工的環境下(再構成系)で活発に増殖させることである。たとえば、著者らはこれまでに同定された肝細胞増殖促進物質を添加した培養液中で、ヒト肝細胞を数代にわたって培養し、増殖させることに成功している<sup>1)</sup>。しかし、体内での増殖能力の再現にはほど遠い。肝細胞増殖現象に関する“分析”の到達点がいまだ低いのである。それどころか、人体を利用してヒト肝細胞の増殖能力を研究することができないので、分裂能力を“分析”する作業自体があまり進展していない。

さらに、肝細胞増殖能力を判定する *in vitro* の再構成系を開発することにはかなり困難があったので、

*in vivo* の再構成系の開発を行っている。人体に代わるものとして実験動物(マウス)にヒト肝細胞を移植し、ホストの肝細胞をヒト肝細胞で置換させ、ヒト肝細胞をもつ“キメラマウス”を作製できれば、ヒト肝細胞の増殖能力を自然により近いと考えられる体内で、しかも動物実験として分析できるとの期待からである。

## ヒト肝細胞キメラマウス

凍結ヒト肝細胞を、肝障害をもつ免疫不全マウスに移植した<sup>2)</sup>。肝障害マウスであるウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ(uPA)を肝に発現させたトランスジェニックマウス(uPA マウス)と、免疫傷害マウスである SCID(severe combined immunodeficiency)マウスを交配して得られる uPA/SCID マウスをホストにした、 $7.5 \times 10^5$ 個のヒト肝細胞を脾に注入すると、一部の細胞は肝に運ばれ、そこに生着し増殖を開始し、ヒト肝細胞のコロニーを形成した。その後、増殖を続け置換率が 50%を超えるようになる。ドナーの補体因子がマウス血中に分泌され、ホストの肺などに傷害を与えるようになる。そこでヒト補体因子阻害剤を注射すると、ホストは健康になりドナー肝細胞はさらに増殖を続けるようになる。

現在著者らは、移植後約 60 日で 70%以上の置換率をもつヒト肝細胞キメラマウスを 50%の生成率で作製できるようになった。最高置換率 96%を記録している。この場合、マウスの肝重量が約 1.5 g で、肝 1 g 当りの肝細胞数は約  $1.6 \times 10^8$  個であるので、キメラマウス 1 匹当たり約  $2.3 \times 10^8$  個のヒト肝細胞がいることになる。ヒト肝細胞の生着率はおおよそ 15%であると考えられるので、ヒト肝細胞は 60 日間でおおよそ 2,000 倍に増殖し、したがって、おおよそ 11 回分裂したことになる。キメラマウスの肝の切片

を組織学的に調べると、ヒト肝細胞がマウスの胆管や血管細胞などと協力して自然の肝を構築してマウスの生命活動を可能にしていることがわかる(図1)。

### おわりに

このマウスに種々の薬物を投与する研究がはじまっており、これまでの研究結果は、このマウスはヒト型の代謝反応を行うことを示している。医薬品開発のツールとして創薬開発に貢献できると期待している<sup>3)</sup>。将来的には分析して得られた物質だけを用いて、人工的にヒト肝細胞の活発な増殖能力

を再現させたいと思っている。

- 1) Yamasaki, C. et al.: Growth and differentiation of colony-forming human hepatocytes *in vitro*. *J. Hepatol.*, **44**: 749-757, 2006.
- 2) Tateno, C. et al.: Near-completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am. J. Pathol.*, **165**: 901-912, 2004.
- 3) Tsuge, M. et al.: Infection of human hepatocyte chimeric mouse which genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology*, **42**: 1046-1054, 2005.

吉里勝利/Katsutoshi YOSHIZATO  
広島大学大学院理学研究科生物科学専攻

## 腎臓内科学

### 腎病変における遺伝子治療はどこまで具現化したか

*Clinical application of gene therapy in kidney disease*

1990年アデノシンデアミナーゼ欠損症に対する遺伝子治療が開始されて以来、2006年1月の時点で1,145の遺伝子治療プロトコールが提出され、そのうち、2/3が癌の遺伝子治療であり、単一遺伝子病、血管病、感染症が10%弱を占める(<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>)。腎病変に関する遺伝子治療は腎癌に限られているが、本稿で概説する基礎研究がその他の腎疾患に臨床応用される日も遠くないと思われる。

#### 腎癌に対する遺伝子治療

わが国で行われている臨床研究はGM-CSF遺伝子治療のみである。手術で採取した腎癌細胞に*ex vivo*でレトロウイルスベクターを用いてGM-CSF遺伝子を導入し、その細胞を腎癌に接種するものである。この臨床研究でGM-CSF遺伝子治療の安全性は確認されたものの、臨床で奏功した症例は報告されていない<sup>1)</sup>。海外ではB-7.1遺伝子改変腫瘍細胞ワクチンと

interleukin-2治療を組み合わせる遺伝子治療などが行われており、従来の免疫療法を超える効果が期待されている。

#### 遺伝子病に対する遺伝子治療

本来、遺伝子治療の対象となる疾患はAlport症候群のような単一因子の遺伝性疾患が適しており、正常な遺伝子を導入し、染色体上にある欠陥のある遺伝子と組換えを行うことが理想ではあるが、現在までの遺伝子治療はすべて補充療法であり、原因遺伝子の治療ではない。Tryggvasonらはアデノウイルスを用いた遺伝子導入法により、IV型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖の遺伝子をブタの糸球体に導入し、発現した $\alpha 5$ 鎖が糸球体基底膜で $\alpha 3$ 、4鎖とトリプルヘリックスを形成することを報告しているが、新しく形成された基底膜では蛋白尿改善効果はみられなかったという<sup>2)</sup>。最近では先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子が解明されてきてお

り、遺伝子導入法の改善に伴い、現在有効な治療法のないAlport症候群など先天性疾患に対して遺伝子治療が劇的な治療法となる可能性がある。

多発性嚢胞腎もまた、遺伝子治療による根本的な治療が期待されるが、たとえばPKD1遺伝子は46個のエクソンを含む50 kb以上の遺伝子であり、正常遺伝子を導入するためには遺伝子の巨大さがネックとなる。むしろ嚢胞形成や細胞増殖の抑制を目的とした遺伝子治療が有効かもしれない。

Fabry病は $\alpha$ -galactosidase A( $\alpha$ -GalA)遺伝子異常に起因する代謝異常症であるが、腎にスフィンゴ糖脂質が進行性に沈着し、腎障害をきたす。遺伝子組換えヒト $\alpha$ -GalAを用いた酵素補充療法が開始されているが、遺伝子治療もまたよい適応となる可能性がある。アメリカでは患者の間葉系幹細胞に $\alpha$ -GalA遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、その細胞を移植する臨床研究が行われており、腎障害に対する効果も期待される。

#### 腎炎に対する遺伝子治療

遺伝子治療の臨床試験に関する指針の改正により、遺伝子治療の対象疾患は従来の致死性疾患から身体の機能を著しく損なう疾患へと拡大した。このように遺伝子治療の環境も整備され、遺伝子治療はもはや特別な治療法ではなく、疾患治療におけるひとつの選択肢として考えられる時代になってきた。著者らは非常に強力な遺伝子ノックダウンの手段として注目されているshort interference RNA (siRNA)をエレクトロポレーション法によりThy-1腎炎モデルラットに導入し、腎炎に対する治療効果があるかを検討した。遺伝子導入を行った腎炎糸球体ではターゲットとしてTGF- $\beta$ 発現が抑制され、細胞外基質産生が抑制されること



が確認された<sup>3)</sup>。現時点での腎炎に対する遺伝子治療の臨床研究は行われていないが、今後大動物などを用いて安全性や効果が確認され、これまでの基礎研究が臨床応用されることが期待される。

### 移植腎に対する遺伝子治療

現在、閉塞性動脈硬化症に対して hepatocyte growth factor (HGF) 遺伝子治療が行われているが、著者らはブタの腎に HGF 遺伝子をエレクトロポレーション法により導入し、移植腎に対する HGF 遺伝子治療の安全性と有効性に関する検討を行った。エレクトロポレーション法を用いて HGF 発現プラスミドベクターを導入後、移植腎の保護効果を検討したところ、コントロール群に比較して HGF 遺伝子導入群では間質の線維化が抑制されていた。また、腎以外の臓器への導入は認められず、遺伝子導入が局所的に行えることを確

認している<sup>4)</sup>。

- 1) Tani, K. et al. : Phase I study of autologous tumor vaccines transduced with the GM-CSF gene in four patients with stage IV renal cell cancer in Japan : clinical and immunological findings. *Mol. Ther.*, 10 : 799-816, 2004.
- 2) Heikkila, P. et al. : Adenovirus-mediated transfer of type IV collagen  $\alpha 5$  chain cDNA into swine kidney *in vivo* : deposition of the protein into the glomerular basement membrane. *Gene Ther.*, 8 : 882-890, 2001.
- 3) Takabatake, Y. et al. : Exploring RNA interference as a therapeutic strategy for renal disease. *Gene Ther.*, 12 : 965-973, 2005.
- 4) Isaka, Y. et al. : Electroporation-mediated HGF gene transfection protected the kidney against graft injury. *Gene Ther.*, 12 : 815-820, 2005.

猪阪善隆 / Yoshitaka ISAKA

大阪大学大学院医学系研究科先端移植基盤医療学

を用いた手法により、低侵襲かつ手技的にも容易に行える可能性が示唆されている。

以下に幹細胞のドナーとしての脂肪組織の有用性と、脂肪組織再生の研究の現状および臨床展望について記述する。

### 脂肪由来幹細胞とは

脂肪、骨、軟骨などの間葉系組織に分化する間葉系幹細胞のドナーとしては骨髄間質が有名であり、すでに臨床応用されており、その有用性も報告されている。しかし近年、骨髄以外の組織にも同様の細胞集団が存在することが指摘されており、脂肪組織はそのなかでも、①採取が容易である、②大量に採取可能である、③ドナーの犠牲がほとんどない、などの点で非常に有用である<sup>1)</sup>(図 1)。この脂肪由来幹細胞 (adipose derived stem cells : ASCs) は *in vitro* において、脂肪、骨、軟骨、骨格筋、心筋、神経、血管、肝細胞など非常に多くの成熟細胞に分化することが証明されている<sup>2,3)</sup>。この ASCs により三次元構造を有する大型の脂肪組織を再生することで、上述した疾患の治療に結びつくものと考えられる。

### In vivo による脂肪再生

著者らはマウスを用いた実験で、あらかじめ *in vitro* で脂肪への分化誘導をかけた ASCs をフィブリン糊に混入させ皮下に注入移植すると、移植した ASCs が脂肪組織の形成を起こすことを確認している。また、ASCs を吸引した成熟脂肪に混在させて移植することで、ASCs の血管再生効果を利用し移植後の組織吸収を抑制できるとの報告もあり、cell assisted lipotransfer (CAL) とよばれている。前者は、いったん採取した ASCs を凍結保存し必要に応じて培養増殖させることでいつでも利用可能である利点を有し、後者は、FDA が推奨す

## 形成外科学

### 脂肪由来幹細胞を利用した脂肪組織再生

*Adipose tissue regeneration by adipose-derived stem cells*

外傷や先天異常に伴う広範囲軟部組織欠損や、乳癌術後の乳房欠損に対する治療方法としては従来、マイクロサージャリーなどの技術を駆使した自家軟部組織移植が応用されてきた。しかし、本法は手

術時間が比較的長いうえ、ドナーの犠牲も少なからず問題となることがある。このような疾患に対するあらたな治療法として再生医学的アプローチが注目されている。とりわけ多分化能を有する幹細胞

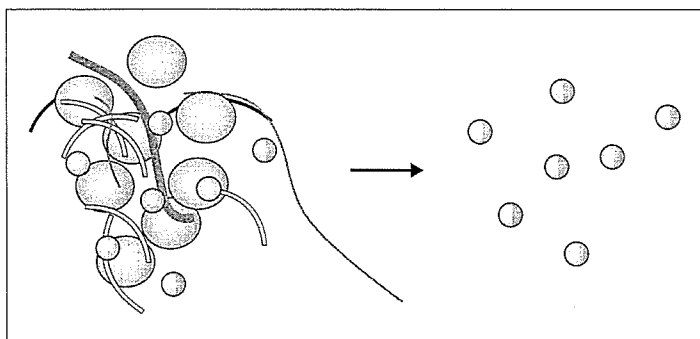


図 1 脂肪組織中の脂肪由来幹細胞

脂肪組織を酵素分解処理することで幹細胞を含んだ間質細胞を抽出できる。通常 500 ml の脂肪組織から約  $10^8$  個の ASCs が抽出可能である。



## ヒト肝細胞キメラマウス

Chimeric mice with human hepatocytes

立野知世<sup>1)</sup>・森川良雄<sup>2)</sup>・吉里勝利<sup>1, 3)</sup>

## Key Words

ヒト肝細胞, キメラマウス, 移植, ヒト化モデル動物

## ■ Abstract ■

私達はマウスの肝臓のほとんどをヒト肝細胞で置換させる技術を開発した。ヒト肝細胞は免疫不全でかつ肝障害を持つマウスの肝臓に生着し、増殖することができる。このヒトの肝細胞を持つキメラマウスはヒト肝臓における肝細胞の性質を保持していたことから、医薬候補品のヒトにおける薬物代謝、薬効、および毒性を予測するための新たなツールとして期待される。

## ■ はじめに

医薬品の開発には、マウス、ラット、イヌ、およびサルなどの多くの動物が使われているが、薬効や毒性には種差があることが知られており、動物実験結果がヒトの臨床試験結果を必ずしも反映していない。そこで、私達はマウスの肝臓のほとんどがヒト肝細胞で置換されたヒト肝細胞キメラマウス（以下、キメラマウス）を開発した。

## ■ 1. uPA/SCIDマウスの作製と性質

ウロキナーゼプラスミノージェンアクチベータトランスジェニック (uPA) マウスとSCIDマウスを掛け合わせてuPA/SCIDマウスを作製した<sup>1)</sup>。uPA遺伝子にはアルブミンエンハンサープロモーターが接続されてあるため、肝細胞においてのみuPAが高発現し血液中に分泌される。uPA/SCIDマウスの肝細胞は、uPAの発現により萎縮しており増殖することができないが、肝臓におけるHGFの活性が高いことが知られている。また、UPA/SCIDマウス

スは重度免疫不全の性質を持つため、異種であるヒト肝細胞はこのマウスの肝臓に生着することができる。現在、このuPA/SCIDマウスにSCIDマウスを繰り返し戻し交配することにより、このマウスの背景遺伝子を均一化することに努めている。

## ■ 2. ヒト肝細胞キメラマウスの作製

生後8日目のマウスの尾からDNAを抽出し、遺伝子検査によりuPAとSCIDの遺伝子をホモ接合型で持つマウスを選択した。生後3週目のホモ接合型uPA/SCIDマウスの脇腹を約5 mm切開し脾臓を引き出し、27Gの注射針を用いて約 $1 \times 10^6$ 個のヒト肝細胞を移植した (図A)<sup>1)</sup>。通常、移植には米国から輸入した子供の凍結保存肝細胞を融解して用いている。ドナーによってマウス肝臓への生着や増殖のしやすさが異なるため、キメラマウス作製に適したドナー細胞を選択する必要がある。また、大人の肝細胞より子供の肝細胞の方が高置換率のキメラマウスを高頻度で得ることができることがわかってきた。通常ヒト肝細胞の凍結保存チューブから約 $1 \times 10^7$ 個の生存肝細胞を得ることができるため、凍結チューブ1本から約10匹のキメラマウスを作製することができる。

## ■ 3. ヒト肝細胞キメラマウスの性質

子供のドナー肝細胞をuPA/SCIDマウスに移植すると、マウス血中のヒトアルブミン濃度は対数的に増加し、移植後60日頃にはプラトーに達する (図B)。マウスの肝臓切片を作製し、ヒト特異的サイトケラチン8/18 (hCK8/18) 抗体で染色すると、ヒト肝細胞のみ染め分けることができる (図C)。肝臓切片あたりのhCK8/18陽性領域の面積の割合

<sup>1)</sup> Chise Tateno, <sup>2)</sup> Yoshio Morikawa,

<sup>1, 3)</sup> Katsutoshi Yoshizato

<sup>1)</sup> 広島県産業科学技術研究所 知的クラスター創成事業 吉里プロジェクト

<sup>2)</sup> (株) フェニックスバイオ

<sup>3)</sup> 広島大学大学院理学研究科生物科学専攻

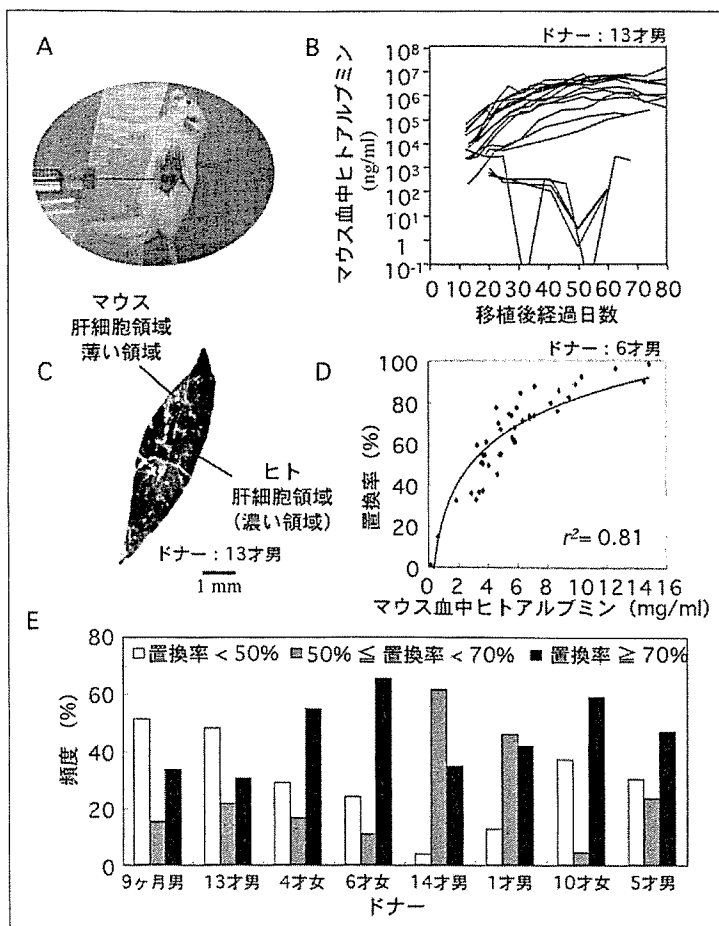


図 キメラマウスの作製と性状。A. uPA/SCIDマウスへのヒト肝細胞の移植。B. キメラマウス血中ヒトアルブミン濃度の推移。C. キメラマウス肝臓切片のhCK8/18染色像。D. キメラマウス血中ヒトアルブミン濃度と置換率の相関。E. 各ドナーで作製したキメラマウス置換率の割合。

を求め、キメラマウスの置換率とした。マウス血中ヒトアルブミン濃度と置換率には相関がある。ドナー肝細胞によって多少異なるが、マウス血中ヒトアルブミン濃度が6 mg/ml以上のキメラマウスの置換率はほぼ70%以上となる(図D)<sup>1)</sup>。また、子供の肝細胞を移植した場合、移植したマウスのうち約半分のマウスが置換率70%以上となる(図E)。

現在では、キメラマウス作製技術は(株)フェニックスバイオに移転されている。(株)フェニックスバイオでは、現在置換率70%のキメラマウスを年間1000匹以上生産することができ、さらに増産を計画している。これらのマウスは医薬品開発のための受託試験に利用されている。

キメラマウスの肝臓における薬物代謝や解毒に関わる酵素であるシトクロームP450、第2相酵素、そしてトランスポーター遺伝子やタンパク質は、

ヒトの肝臓と近いレベルで発現していることが示されている<sup>1-3)</sup>。ヒトB型、C型肝炎ウイルスはヒトやチンパンジーの*in vivo*の肝臓にしか感染しないため、これまで、ウイルスの感染メカニズムや抗ウイルス剤を開発するための実験系が存在しなかった。キメラマウスは、ヒトB型、C型肝炎ウイルスを感染させることが可能であることも示されている<sup>4)</sup>。さらに、キメラマウスは、肝臓をターゲットとした遺伝子治療ベクターの有効性や安全性を確かめる実験モデルとしても有用であることが示された<sup>5)</sup>。

## ■ おわりに

これまで、*in vivo*のヒト肝臓における遺伝子およびタンパク質発現、酵素活性に対する医薬候補品などの影響を調べることは不可能であった。また、ヒトにおける医薬候補品の薬物代謝、薬効、および肝毒性を動物実験により予測してきたが、充分なものとはいえなかった。キメラマウスは、*in vivo*における医薬候補品などのヒトにおける薬物代謝、薬効、および肝毒性を予測することができる、画期的なモデル動物になりえると考えている。現在のところ、キメラマウスは医薬候補品のヒトにおける薬物動態を予測する系や、肝炎ウイルスに対する抗ウイルス薬のスクリーニング系として実際に利用されている。現在、キメラマウスが薬効や肝毒性を調べるためのツールとしても有効かどうか、データを積み重ねているところである。

さらに、キメラマウスを用いることによって、これまで調べることが困難であった、*in vivo*におけるヒト肝細胞の増殖、分化、老化などのメカニズムについて明らかにすることが可能となり、臨床における肝臓疾患治療への一助となることを期待している。

## 文献

- 1) Tateno C, Yoshizane Y, Saitou N, et al. *Am J Pathol* 165:901-912, 2004
- 2) Katoh M, Matsui T, Okamura H, et al. *Drug Metab Dispos* 33:1333-1340, 2005
- 3) Nishimura M, Yoshitsugu H, Yokoi T, et al. *Xenobiotica* 35:877-890, 2005
- 4) Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, et al. *Hepatology* 42:1046-1054, 2005
- 5) Emoto K, Tateno C, Hino H, et al. *Human Gene Therapy* 16:1168-1174, 2005

## Effect of Hepatitis C Virus (HCV) NS5B-Nucleolin Interaction on HCV Replication with HCV Subgenomic Replicon

Tetsuro Shimakami,<sup>1</sup> Masao Honda,<sup>1</sup> Takashi Kusakawa,<sup>2</sup> Takayuki Murata,<sup>3</sup> Kunitada Shimotohno,<sup>3</sup> Shuichi Kaneko,<sup>1</sup> and Seishi Murakami<sup>2\*</sup>

Department of Gastroenterology, Kanazawa University Graduate School of Medicine,<sup>1</sup> and Department of Molecular Oncology, Cancer Research Institute, Kanazawa University,<sup>2</sup> Takara-Machi, Kanazawa, Ishikawa 920-0934, and Department of Viral Oncology, Institute for Virus Research, Kyoto University, Kawara-Cho, Sakyo-Ku, Kyoto 606-8507,<sup>3</sup> Japan

Received 25 September 2005/Accepted 5 January 2006

We previously reported that nucleolin, a representative nucleolar marker, interacts with nonstructural protein 5B (NS5B) of hepatitis C virus (HCV) through two independent regions of NS5B, amino acids 208 to 214 and 500 to 506. We also showed that truncated nucleolin that harbors the NS5B-binding region inhibited the RNA-dependent RNA polymerase activity of NS5B *in vitro*, suggesting that nucleolin may be involved in HCV replication. To address this question, we focused on NS5B amino acids 208 to 214. We constructed one alanine-substituted clustered mutant (CM) replicon, in which all the amino acids in this region were changed to alanine, as well as seven different point mutant (PM) replicons, each of which harbored an alanine substitution at one of the amino acids in the region. After transfection into Huh7 cells, the CM replicon and the PM replicon containing NS5B W208A could not replicate, whereas the remaining PM replicons were able to replicate. *In vivo* immunoprecipitation also showed that the W208 residue of NS5B was essential for its interaction with nucleolin, strongly suggesting that this interaction is essential for HCV replication. To gain further insight into the role of nucleolin in HCV replication, we utilized the small interfering RNA (siRNA) technique to investigate the knockdown effect of nucleolin on HCV replication. Cotransfection of replicon RNA and nucleolin siRNA into Huh7 cells moderately inhibited HCV replication, although suppression of nucleolin did not affect cell proliferation. Taken together, our findings strongly suggest that nucleolin is a host component that interacts with HCV NS5B and is indispensable for HCV replication.

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic hepatitis around the world (1, 7). Chronic infection with HCV results in liver cirrhosis and may lead to hepatocellular carcinoma (53, 54). HCV is an enveloped positive-strand RNA virus belonging to the genus *Hepacivirus* in the family *Flaviviridae*. The HCV RNA genome is ~9.6 kb in length and consists of a 5' nontranslated region (NTR), a large open reading frame, and a 3' NTR. The 5' NTR contains an internal ribosome entry site, which mediates the translation of a single polyprotein of ~3,000 amino acid (aa) residues (61, 64). This polyprotein is cleaved by host and viral proteases into at least 10 different products (33). At the amino terminus of the polyprotein are the core protein, E1, and E2, followed by p7, a hydrophobic peptide with unknown function, and the nonstructural (NS) proteins NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B. The 3' NTR consists of a short variable sequence, a poly(U)-poly(UC) tract, and a highly conserved X region and is critical for HCV RNA replication and HCV infection (13, 29, 69, 71).

HCV is unique among positive-strand RNA viruses in that it causes persistent and chronic infections. In addition, the high mutation rate of the gene encoding the E2 protein allows it to escape host immune surveillance, which is strongly associated with chronic inflammation of the liver (19, 23, 66, 67). As a result, HCV replication has become a target for the treatment of chronically infected individuals. The RNA-dependent RNA

polymerase (RdRp) NS5B is the central catalytic enzyme in HCV RNA replication. Several recombinant and catalytically active forms of NS5B have been expressed and purified from insect cells and *Escherichia coli*, and these proteins have provided insights into the biochemical and catalytic properties of NS5B (2, 12, 34, 68). Studies of HCV replication *in vitro* have to overcome several difficulties, since replication requires all or most NS proteins and/or host proteins and occurs at the membrane. An understanding of the biology of HCV replication has been facilitated by the development of subgenomic and full-length HCV replicons, which express HCV proteins and replicate their RNA when transfected into human hepatoma-cell-derived Huh7 cells and other cell lines (22, 24, 35).

Nucleolin is a major nucleolar phosphoprotein, and nucleolin-specific antibodies have been used to identify nucleoli (14, 59). Nucleolin has been shown to be an RNA chaperone and/or shuttling protein for various host and viral components in nucleoli, nucleoplasm, cytoplasm, and the plasma membrane (18, 37, 41). We previously reported that the transient expression of NS5B causes the redistribution of endogenous nucleolin from the nucleus to the cytoplasm and that nucleolin and NS5B interact, *in vitro* and *in vivo*, through two independent regions of NS5B, aa 208 to 214 and 500 to 506. We also showed that the C-terminal region of nucleolin inhibited NS5B RdRp activity through this interaction *in vitro* (20). Because full-length nucleolin was not available in that experimental condition (70), we could not determine the exact role of this interaction *in vivo*.

To further investigate the interaction between nucleolin and NS5B, we focused on NS5B aa 208 to 214. We prepared a

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Molecular Oncology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, 13-1 Takara-Machi, Kanazawa, Ishikawa, Japan. Phone: 81-76-265-2731. Fax: 81-76-234-4501. E-mail: semuraka@kenroku.kanazawa-u.ac.jp.

series of mutant replicons in which each amino acid within this region was altered to alanine(s). Here, we report that the W208 residue is critical for transient HCV replication as well as for binding to nucleolin *in vivo*. HCV replication was considerably inhibited in cells in which endogenous nucleolin was transiently down-regulated by small interfering RNA (siRNA). Our results strongly suggest the involvement of nucleolin in HCV replication through its interaction with NS5B and that nucleolin acts as a positive modulator of HCV replication.

## MATERIALS AND METHODS

**Construction of plasmids.** The plasmid pNNRZ2RU (28), which harbors a subgenomic replicon derived from MT-2C cells infected with HCV (a genotype 1b isolate, M1LE [GenBank accession no. AB080299]) and contains wild-type M1LE replicon (M1LE/wild) cDNA, was digested with MluI and BglII, and the obtained fragment was inserted into the MluI and BglII sites of the vector pGL3Basic (Promega) to create pGL3-*MluI*-*BglII*. The intermediate vector pGL3-*MluI*-*BglII*-S232I was constructed by introducing the point mutation S232I of NS5A into the MluI and SacI sites of pGL3-*MluI*-*BglII* by site-directed mutagenesis using primers carrying the necessary nucleotide changes. Subsequently, mutations were introduced into pGL3-*MluI*-*BglII*-S232I, which was digested with MluI and BglII. The resulting DNA fragments were subsequently ligated into the MluI and BglII sites of pNNRZ2RU. Plasmids containing the individual NS5B substitutions W208A, K209A, S210A, K211A, K212A, C213A, and P214A and the 7-amino-acid alanine substitution, cm211, were constructed by introducing each mutation into the Eco8I and NdeI sites of pGL3-*MluI*-*BglII*-S232I by site-directed mutagenesis using primers carrying the necessary nucleotide changes.

The vector pNKFLAG (49) was used to express amino-terminally FLAG-tagged proteins. The plasmid pNNRZ2RU was subcloned by PCR using the primers 5'-TATCGAGCTCGATGTCAATGTCCTACTCATGGACAGGT-3' (NS5B For), which contains an artificial initiation codon downstream of the SacI site, and 5'-ATGGATGGATCCGCGGGTCCGGCGCGAGACAGGCT-3' (NS5Bt Rev), which contains a BamHI site. NS5Bt, containing full-length NS5B truncated by 21 aa at the C terminus, was subcloned into the SacI and BamHI sites of pNKFLAG to create pNKFLAGNS5Bt.

The plasmid pNKGST/Nucleolin (20) was used for the expression of glutathione-S-transferase (GST)-fused nucleolin proteins. FLAG-labeled plasmids containing the individual NS5B substitutions W208A, K209A, S210A, K211A, K212A, C213A, and P214A and the 7-amino-acid alanine substitution cm211 were constructed by introducing fragments of pGL3-*MluI*-*BglII*-S232I containing each mutation into the EcoRI and SmaI sites of pNKGSTNS5Bt.

The sequences of all the constructs were confirmed using the dideoxy sequence method. The plasmids pLMH14 and pLMH14/GHD (40) were used as templates for replicon RNA LMH14 and LMH14/GHD, respectively.

**Cell culture.** We used two kinds of Huh7 cells, one derived from our own laboratory's original Huh7 cells, designated Huh7-DMB (56), and the other cured of MH14 gamma interferon, designated cured MH14 (40). Huh7-DMB cells were used for colony-forming assays, and cured MH14 cells were used for luciferase assays. Both types of Huh7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco-BRL, Invitrogen Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, nonessential amino acids, 100 U of penicillin, and 100 µg of streptomycin.

**In vitro transcription and purification of RNA.** All plasmids harboring replicon RNA were linearized with XbaI and column purified (PCR purification kit; Promega). RNA was synthesized and purified as described previously (56).

**RNA transfection and selection of G418-resistant cells.** Subconfluent Huh7 cells were trypsinized, washed once with phosphate-buffered saline (PBS) that does not contain Ca and Mg [PBS(-)], and resuspended at 10<sup>7</sup> cells/ml in OPTI-MEM (Gibco-BRL, Invitrogen Life Technologies). One hundred nanograms of *neo* replicon RNA, with or without 1 µM of each siRNA, was added to 400 µl of each cell suspension in a cuvette with a gap width of 0.4 cm (Bio-Rad). The mixture was immediately transfected into Huh7 cells by electroporation with a GenePulser II system (Bio-Rad) set to 270 V and 975 µF. Following a 10-min incubation at room temperature, the cells were transferred into 10 ml of growth medium and seeded into a 10-cm-diameter cell culture dish. To select G418-resistant cells, the medium was replaced with fresh medium containing 1 mg/ml of G418 (GENETICIN; Gibco-BRL, Invitrogen Life Technologies) 24 h after transfection. After changing the medium twice per week for 4 weeks, the colonies

were stained with Coomassie brilliant blue (0.6 g/liter in 50% methanol–10% acetic acid).

**DNA transfection.** Using the same electroporation protocol as described above, 500 ng of pCI-Neo (Promega), which encodes a neomycin resistance marker under the control of a cytomegalovirus (CMV) promoter/enhancer, with or without 1 µM of each siRNA, was transfected into Huh7 cells. G418-resistant cells were selected in medium containing 0.5 mg/ml G418. Four weeks after transfection, the colonies were stained with Coomassie brilliant blue.

Using DMRIE-C reagent (Invitrogen Life Technologies), 300 ng of pGL3 control (Promega), encoding luciferase under the control of a CMV promoter/enhancer, was cotransfected with or without 2 µM of each siRNA according to the manufacturer's instructions. Luciferase activity was assayed 48 and 72 h after transfection.

**RNA transfection and luciferase assay.** We used a luciferase assay to monitor luciferase replicon activity. Briefly, cured MH14 cells seeded onto 48-well plates were transfected with 250 ng of luciferase replicon RNA, with or without 2 µM of each siRNA, using DMRIE-C reagent according to the manufacturer's instructions. Cell proteins were extracted in a lysis buffer supplied in the Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega), and their luciferase activity was measured. Each assay was performed at least in triplicate, and means and standard deviations were determined.

**Preparation of cell extracts, coprecipitation with glutathione resin, and Western blot analysis.** COS1 cells were transiently transfected using the calcium-phosphate method. The cells were harvested, washed with PBS(-), and sonicated in PBS lysis buffer [PBS(-) containing 150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 1 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol] containing 10 µg each of aprotinin and leupeptin per ml. Total cell lysates were diluted 10-fold with PBS lysis buffer, mixed with 20 µl of glutathione-Sepharose 4B beads (glutathione resin) (Amersham Biosciences), and incubated for 3 h on a rotator in a cold room. After extensive washing with PBS(-) containing 1.0% Triton X-100, the bound proteins were eluted, fractionated by sodium dodecyl sulfate (SDS)-10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), transferred onto nitrocellulose membranes, and subjected to Western blot analysis with anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma). The proteins were visualized using enhanced chemiluminescence according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences). As a loading control, the nitrocellulose membranes used for Western blot analysis with anti-FLAG M2 monoclonal antibody were reprobed with anti-GST monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences).

**siRNA.** We purchased siRNA for luciferase GL3 duplex (si-Luc), siRNA for nonspecific control RNA duplex (si-Mix), siRNA for nucleolin (si-Nuc) (GGAAGCGGUGAAAUGAU-deoxyribosylthymine [dT]dT), and siRNA for HCV (CCUCAAGAAAACCAAC-dTdT) from B-Bridge International, Inc., and we purchased siRNA for GFP from QIAGEN.

**Western blot analysis for endogenous nucleolin.** Using the electroporation protocol described above, 1 µM of each siRNA was transfected into Huh7-DMB cells. After 48 h, the cells were harvested, washed with PBS(-), and sonicated in PBS lysis buffer. Total cell lysates were fractionated by SDS-10% PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes, and subjected to Western blot analysis with rabbit polyclonal anti-nucleolin antibody (103C) (20), mouse monoclonal anti-nucleolin antibody (C23, sc-8031; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), and mouse monoclonal anti-β-actin antibody (Sigma). The proteins were visualized by enhanced chemiluminescence according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences).

## RESULTS

We previously reported that NS5B from HCV subtype 1b isolate JK-1 and nucleolin interact *in vitro* and *in vivo* and that two regions of NS5B, amino acids 208 to 214 and 500 to 506, are both indispensable for binding to nucleolin. We also reported that the C-terminal region of nucleolin inhibited the RdRp activity of NS5B in a dose-dependent manner (20). Although the effect of full-length nucleolin could not be determined, because we could not obtain recombinant full-length nucleolin, these results strongly suggested that nucleolin may be a component of the HCV replication complex and, through its interaction with NS5B, may modulate HCV replication. To further investigate this question, we determined the biological effect of the interaction between NS5B from HCV subtype 1b

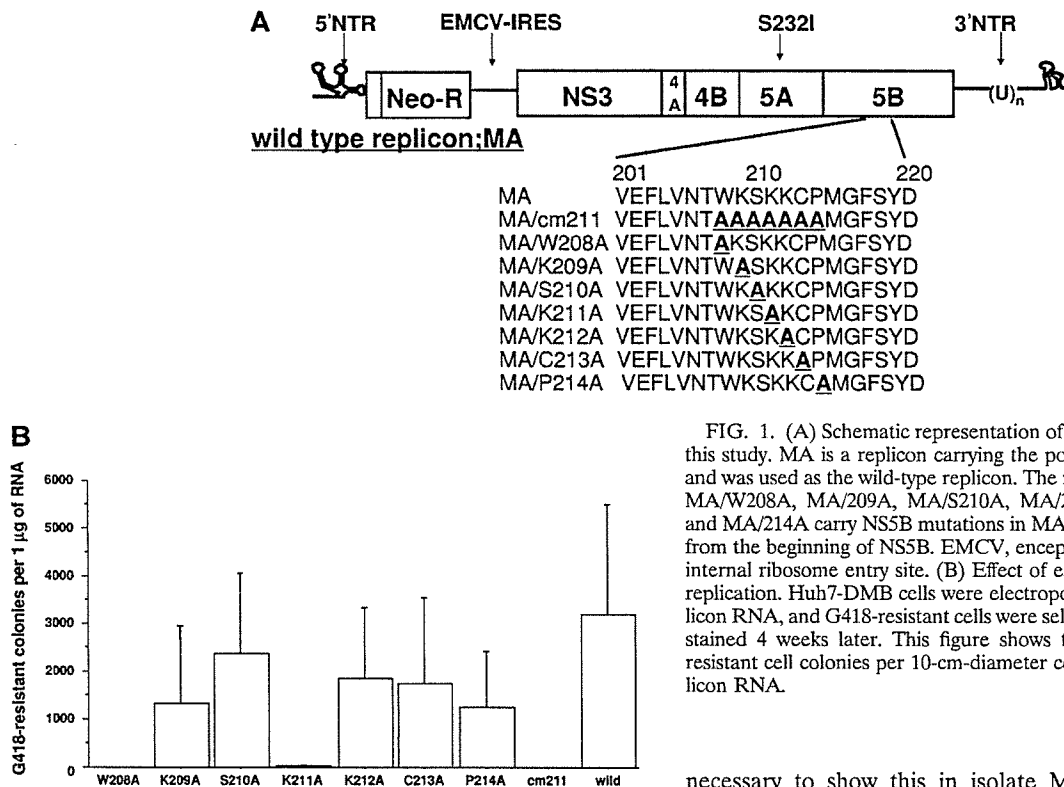


FIG. 1. (A) Schematic representation of the mutant replicons used in this study. MA is a replicon carrying the point mutation S232I in NS5A and was used as the wild-type replicon. The mutant replicons MA/cm211, MA/W208A, MA/209A, MA/S210A, MA/211A, MA/212A, MA/213A, and MA/214A carry NS5B mutations in MA, as shown. Numbering starts from the beginning of NS5B. EMCV, encephalomyocarditis virus; IRES, internal ribosome entry site. (B) Effect of each mutation on HCV RNA replication. Huh7-DMB cells were electroporated with 1 µg of each replicon RNA, and G418-resistant cells were selected with 1 mg/ml G418 and stained 4 weeks later. This figure shows the mean number of G418-resistant cell colonies per 10-cm-diameter cell culture dish per 1 µg replicon RNA.

isolate M1LE and nucleolin on HCV replication using an HCV subgenomic replicon system.

#### Scanning of aa 208 to 214 in an HCV subgenomic replicon.

First, we tested the importance of NS5B aa 208 to 214, a region essential for nucleolin binding, in HCV RNA replication. For this purpose, we prepared eight mutant replicons (Fig. 1A). The wild-type replicon was represented by MA, in which S232 of NS5A was altered to I, because this mutant replicon can efficiently replicate in Huh7 cells (36, 56). In the replicon MA/cm211, each of the amino acids at positions 208 to 214 of NS5B was changed to alanine, whereas in the replicons MA/W208A, K209A, S210A, K211A, K212A, C213A, and P214A, each individual amino acid residue was changed to alanine. All of these mutant replicons were transfected into Huh7-DMB cells, which were selected with G418, and the number of G418-resistant colonies was used as an indication of HCV RNA replication. In cells transfected with MA/cm211 and MA/W208A, we observed no G418-resistant colonies, whereas in cells transfected with the six other point mutant replicons, as well as in cells transfected with MA/K211, we detected G418-resistant colonies, but they were fewer than those detected with wild-type replicon MA (Fig. 1B). Our negative control, the mutant replicon M1LE/5B-VDD, in which the GDD motif of NS5B was mutated to VDD, yielded no G418-resistant colonies (data not shown). The results of this experiment indicated that the region of NS5B at aa 208 to 214, especially W208, is essential for HCV RNA replication.

**Interaction between nucleolin and NS5B.** Although we have shown that NS5B from isolate JK-1 binds to nucleolin, it was

necessary to show this in isolate M1LE. Due to the poor recovery of soluble full-length NS5B, we utilized NS5Bt (68), a soluble form of NS5B in which the C-terminal 21 aa were truncated, to dissect the interaction between NS5B and nucleolin. Previously, we confirmed that these 21 deleted amino acids were not essential for this interaction (20). FLAG-NS5Bt and GST-nucleolin were transiently coexpressed in COS1 cells, after which the lysates were subjected to a GST pull-down assay and the bound proteins were immunologically detected with anti-FLAG M2 and anti-GST antibodies. We found that GST-nucleolin could bind FLAG-NS5Bt from the M1LE isolate, whereas GST could not, indicating that nucleolin interacts with NS5B in both JK-1 and M1LE isolates (Fig. 2). To determine the essential region/residues of NS5B required for its binding to nucleolin, we again focused on aa 208 to 214 using the alanine scanning method (3). We prepared FLAG-NS5Bt/cm211, in which aa 208 to 214 were all replaced by alanine residues, and showed that it could not bind to GST-nucleolin in an *in vivo* immunoprecipitation assay (Fig. 2), indicating that aa 208 to 214 of NS5B in both M1LE and JK-1 isolates constitute a critical region for the binding of nucleolin. To identify the exact residue(s) within aa 208 to 214 critical for binding to nucleolin, we prepared seven alanine-substituted point mutants in which each amino acid was replaced by alanine, and we tested the ability of each point mutant to bind to GST-nucleolin. Using an *in vivo* immunoprecipitation assay, we found that of the seven point mutants, only FLAG-NS5Bt/W208A could not bind to GST-nucleolin (Fig. 2), indicating that W208 of NS5B is essential for this binding and may be essential for HCV replication.

**Suppression of endogenous nucleolin by siRNA.** To identify the siRNA sequence that knocks down the expression of endogenous nucleolin, we used the prediction services of



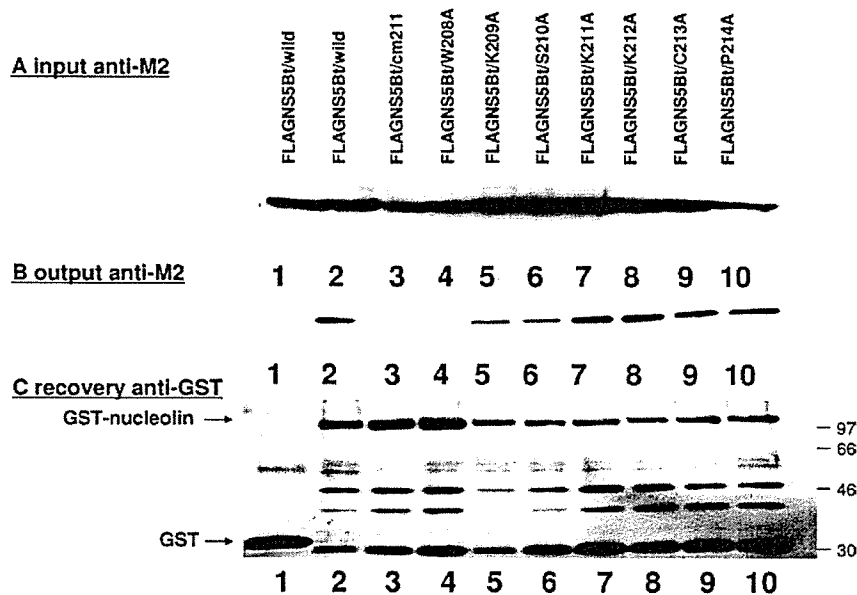


FIG. 2. Interaction between nucleolin and NS5B of HCV isolate M1LE and an essential residue for this interaction. COS1 cells were transiently cotransfected with mammalian expression vectors expressing FLAG-NS5Bt proteins (lanes: 1 and 2, wild type; 3, cm211; 4, W208A; 5, K209A; 6, S210A; 7, K211A; 8, K212A; 9, C213A; 10, P214A) and GST protein alone (lane 1) or GST-nucleolin protein (lanes 2 to 10). (A) Input of FLAG-NS5Bt proteins. Total lysates were fractionated by SDS-10% PAGE and subjected to Western blot analysis with anti-FLAG M2 monoclonal antibody. (B) Output of FLAG-NS5Bt proteins. Coprecipitants by glutathione resin were washed with PBS(-) containing 1.0% Triton X-100, fractionated by SDS-10% PAGE, and subjected to Western blot analysis with anti-FLAG M2 monoclonal antibody. (C) Recovery of GST or GST-nucleolin proteins. The nitrocellulose membrane used for Western blot analysis of coprecipitants with anti-FLAG M2 antibody was reprobed with anti-GST antibody. Molecular masses (kilodaltons) are indicated to the right of the panel.

iGENE (Tsukuba, Japan). We selected one sequence, si-Nuc, and, as a control for siRNA transfection, we utilized siRNA for luciferase (si-Luc) (GL3 luciferase duplex). Forty-eight hours after electroporation of each siRNA, at a concentration of 1  $\mu$ M, into Huh7-DMB, the lysates were analyzed by Western blotting analysis with two kinds of antibody to nucleolin. We found that both anti-nucleolin antibodies detected the expression of endogenous nucleolin. Although si-Nuc efficiently knocked down the expression of endogenous nucleolin, si-Luc did not (Fig. 3), showing the specificity of the former. In addition, real-time PCR showed that si-Nuc decreased nucleolin mRNA by about one-third compared with si-Luc (data not shown).

**Effect of nucleolin suppression on HCV replication.** To test the effect of nucleolin knockdown on HCV RNA replication, we transfected 1  $\mu$ M of si-Nuc or si-Luc along with 100 ng of replicon MA RNA into Huh7-DMB cells and selected the cells with G418. As shown in Fig. 4, we found that cotransfection of si-Nuc reduced the number of G418-resistant colonies, whereas cotransfection of si-Luc did not (Fig. 4). As a control for the efficient transfection of siRNA, we used si-HCV, which targets the HCV internal ribosome entry site and can efficiently suppress HCV replication, as described previously (51). Using this siRNA, we observed no G418-resistant colonies, indicating that siRNA was efficiently transfected under these experimental conditions. To rule out the possibility that suppression of nucleolin may have a detrimental effect on cells and may inhibit HCV RNA replication, we transfected pCI-Neo, which encodes a neomycin resistance gene under the control of a CMV promoter/enhancer, into Huh7-DMB cells,

with or without si-Nuc and si-Luc, and selected the cells with 0.5 mg/dl G418. We found that the suppression of nucleolin expression did not significantly reduce the number of G418-resistant colonies (data not shown). In addition, massive cell death was not observed after the transfection of any siRNA (data not shown). These results indicate that the transient suppression of nucleolin may not affect cell proliferation but that nucleolin may affect the HCV replication complex itself.

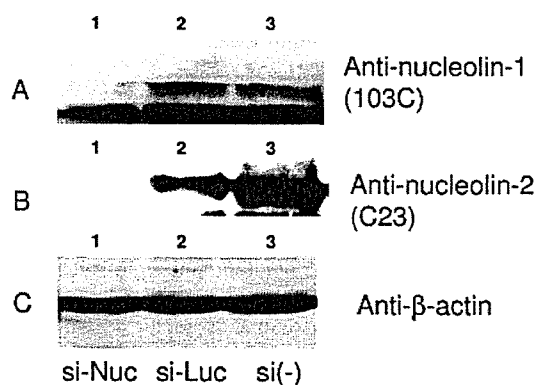


FIG. 3. Knockdown of endogenous nucleolin by siRNA. Huh7-DMB cells were electroporated with 1  $\mu$ M si-Nuc and si-Luc. After 48 h, total cell lysates were fractionated by SDS-10% PAGE and subjected to Western blot analysis with the anti-nucleolin antibodies anti-nucleolin-1 (103C) in A and anti-nucleolin-2 (C23) in B and anti- $\beta$ -actin antibody in C. Lanes: 1, cells transfected with si-Luc; 2, cells transfected with si-Nuc; 3, no siRNA [si(-)].

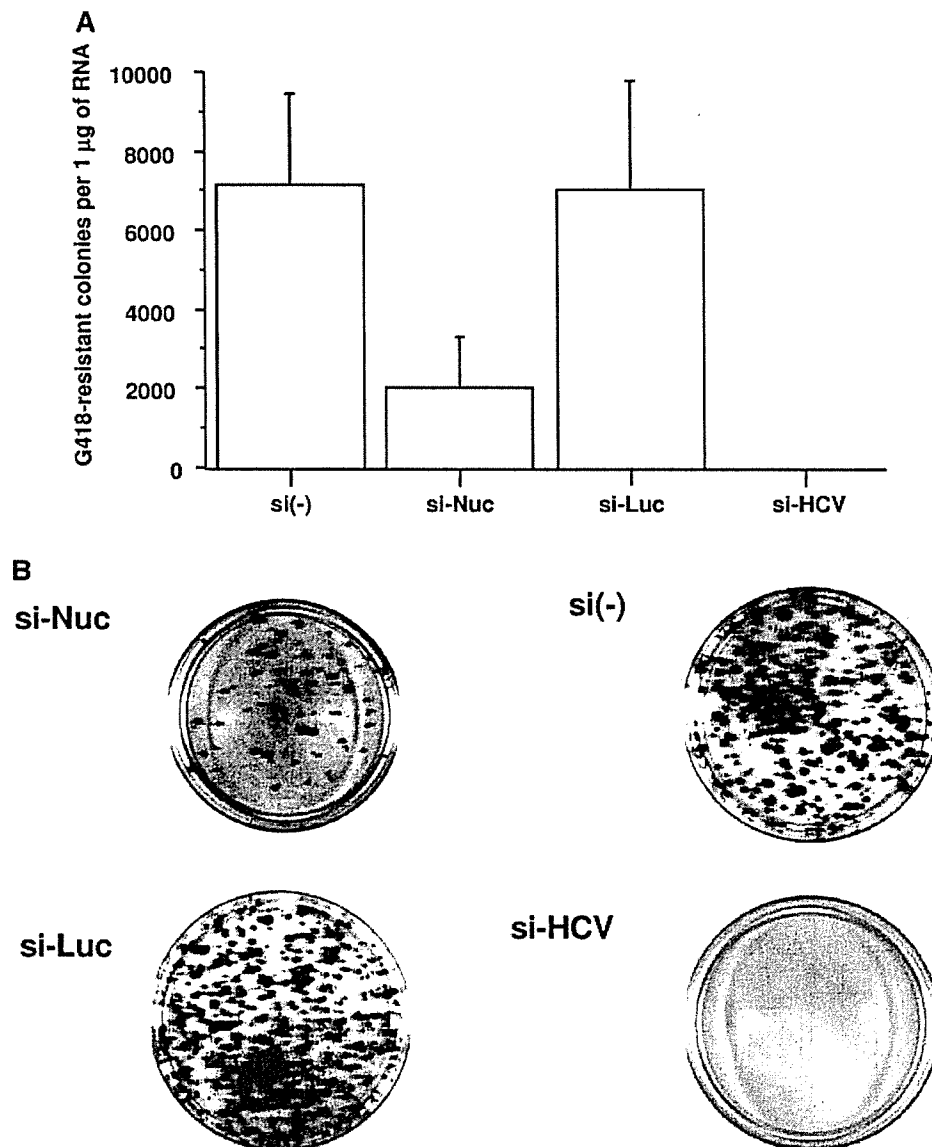


FIG. 4. Effect of suppression of endogenous nucleolin on HCV replication in the MA replicon. Huh7-DMB cells were electroporated with 1 µg of in vitro-transcribed MA RNA plus si-Nuc, si-Luc, si-HCV, or no siRNA [si(-)], and G418-resistant cells were selected with 1 mg/ml G418 and were stained 4 weeks later. (A) Mean number of G418-resistant colonies per 10-cm-diameter cell culture dish per 1 µg replicon RNA. Error bars indicate the standard deviations of the results from at least three independent experiments. (B) Visualization of G418-resistant colonies, as described in Materials and Methods.

Because the knockdown effect of siRNA does not continue for more than 3 weeks after transient transfection, the number of G418-resistant colonies may not be a good indicator of HCV RNA replication. We therefore performed a transient replication assay using a replicon in which the neomycin resistance gene was replaced by a luciferase gene, and luciferase activity was used as a marker of HCV RNA replication. Transfection of MH14 RNA, which was used as the wild-type replicon, into a subline of Huh7 cells resulted in highly efficient luciferase activity, whereas a polymerase-defective RNA replicon of MH14, MH4GHD, in which the catalytic GDD motif of NS5B polymerase was replaced by an inactive GHD motif, was used

as a negative control (Fig. 5A). si-HCV and si-Luc suppressed the luciferase activity even at 24 h after transfection, but other siRNAs did not affect the luciferase activity, and luciferase activities in these siRNAs were similar to that of the control (no siRNA) at this point (Fig. 5B). We found that cotransfection of si-Nuc moderately suppressed both luciferase activity at 72 h after transfection and relative luciferase activity, whereas cotransfection of si-GFP and si-Mix did not (Fig. 5B and C). Cotransfection of si-HCV and si-Luc almost completely suppressed luciferase activity at 72 h after transfection. In a transient replication assay, the suppression of endogenous nucleolin also inhibited HCV replication.