

図1 TNF/GaIN誘導性肝炎モデルにおける各種抗炎症薬の致死に対する効果

● control mutTNF-T2 □ 270 µg △ 30 µg ○ 10 µg
■ anti-human TNF-a antibody 50 µg

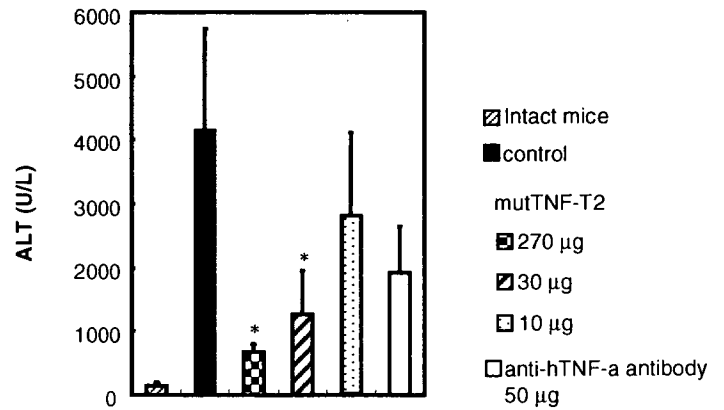


図2 TNF/GaIN誘導性肝炎モデルにおける血中ALT濃度及びその影響。エラーバーは平均±標準誤差 (* $p < 0.05$)

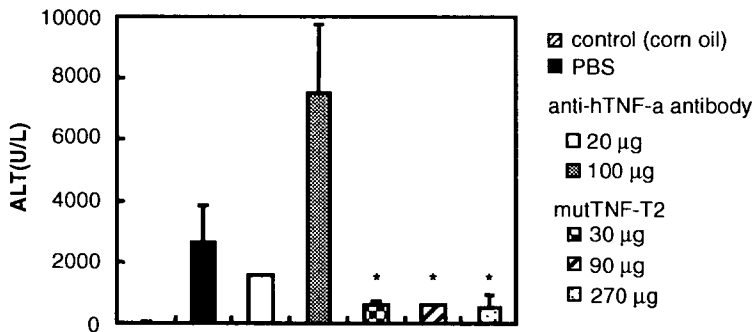


図3 四塩化炭素誘導性肝炎モデルにおける血中ALT濃度及びその影響。エラーバーは平均±標準誤差 (* $p < 0.05$)

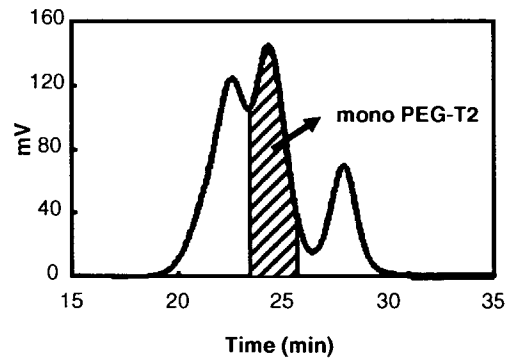


図4 mono-PEG-T2のゲル濾過パターン

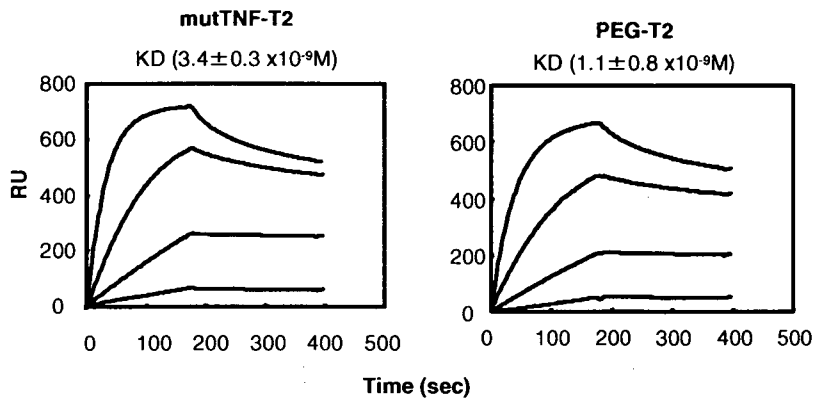


図5 BIAcoreによるPEG-T2とmutTNF-T2の結合力の変化の確認

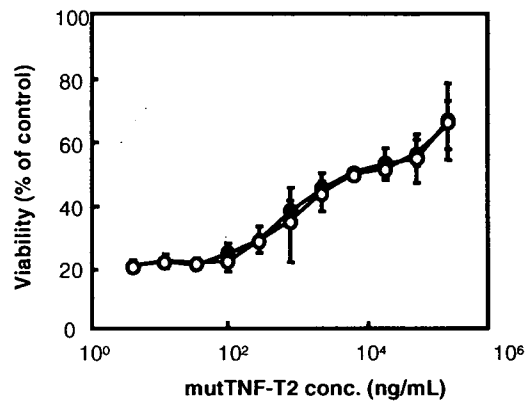


図6 L-M細胞の細胞障害活性を指標にした mutTNF-T2および PEG-T2のTNF活性阻害効果 ● mut TNF-T2, ○ PEG-T2

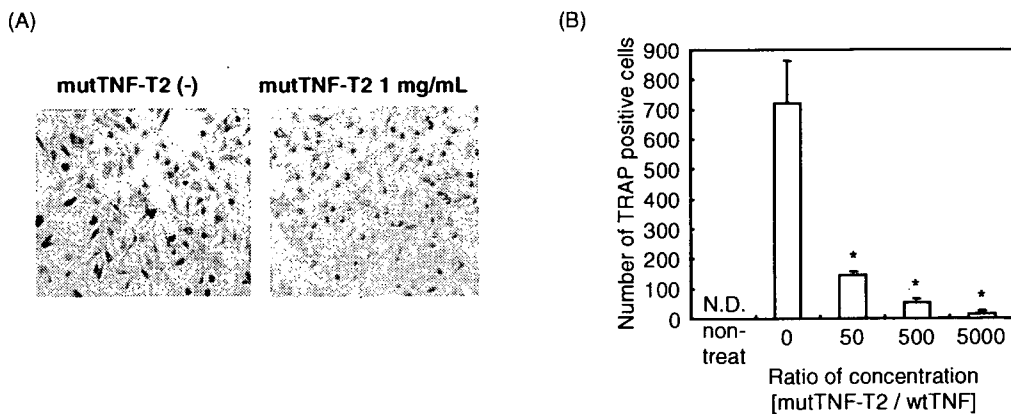


図7 マウス骨髄細胞を用いたTNF誘導性破骨細胞分化に及ぼすmutTNF-T2のTNF活性阻害効果

表2 インクルージョンボディ200 mgタンパク質から精製された各種機能性人工TNF

| TNF mutein | characterization | Vol. | Yield | Protein | Pyrogen(LPS) |
|------------|----------------------------|------|-------|---------|---------------|
| | | ml | % | mg | ng/mg protein |
| M1 | TNFR1/R2 agonist | 8 | 12.1 | 15.1 | 0.124 |
| M2 | TNFR1/R2 agonist | 8 | 23.8 | 27.4 | 0.79 |
| M3 | TNFR1 selective agonist | 8 | 35.8 | 32.2 | 0.871 |
| M4 | TNFR1 selective antagonist | 40 | 18.9 | 45.8 | 0.037 |
| M5 | TNFR2 selective agonist | 41 | 33.8 | 77.7 | 0.022 |

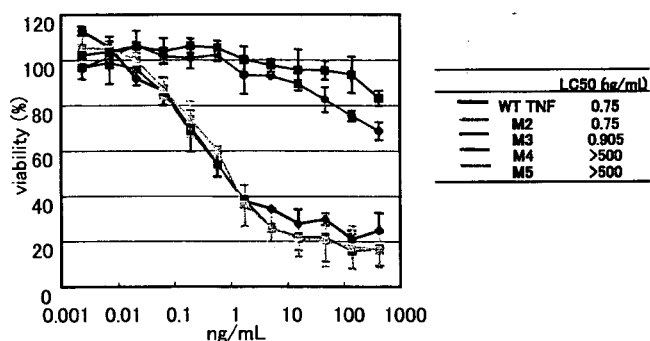


図8 HEp-2細胞に対する細胞傷害性

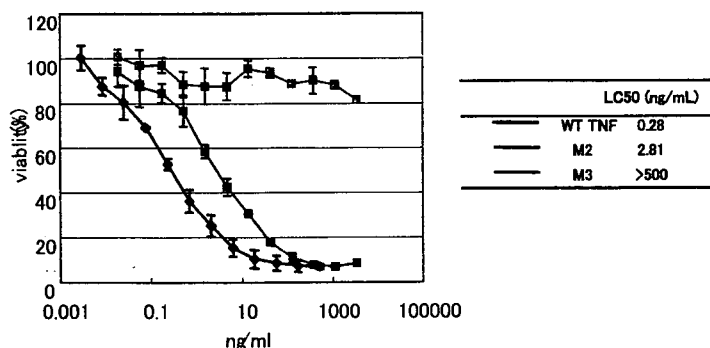


図9 マウスL-M細胞に対する細胞傷害性

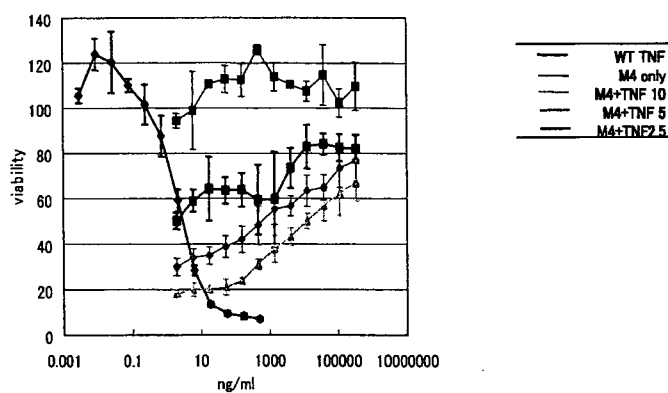


図10 マウスL-M細胞に対する細胞傷害性 (WT-TNFとの競合阻害)

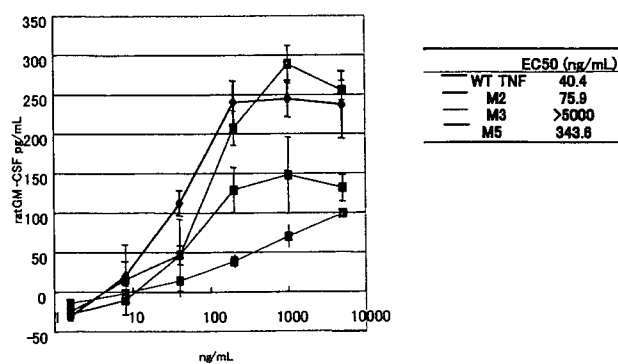


図11 PC60-hTNFR2細胞に対するシグナル伝達分析

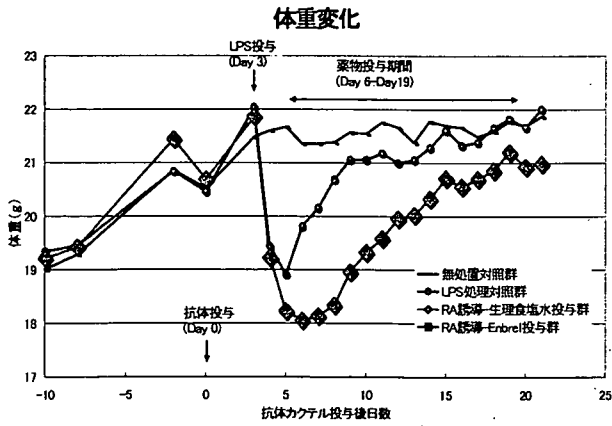


図12 関節炎惹起マウスの体重変化

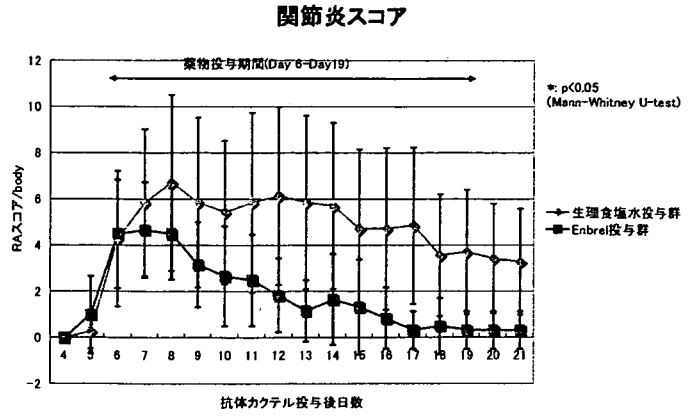


図13 関節炎誘導マウスの関節炎スコアの挙動

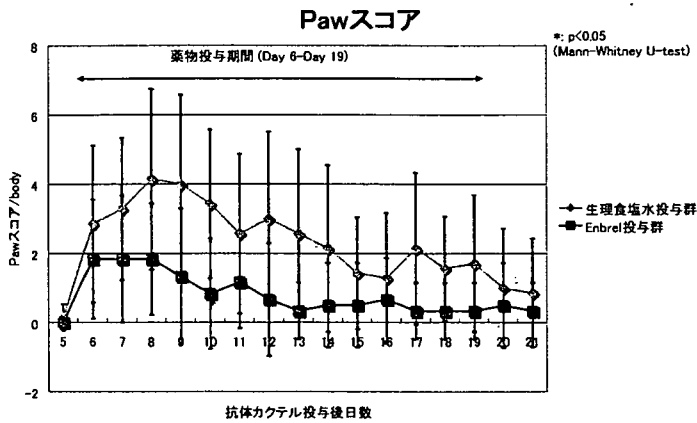


図14 関節炎誘導マウスの関節炎Pawスコアの挙動

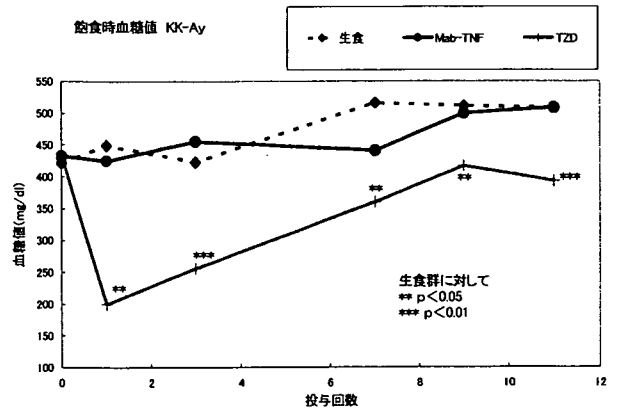


図15 飽食時血糖値の推移

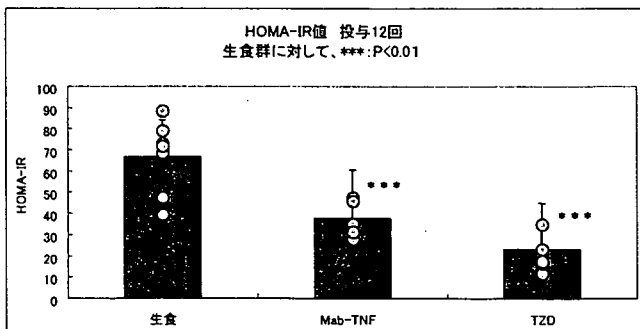


図16 インスリン抵抗性指標値:HOMA-IRの比較

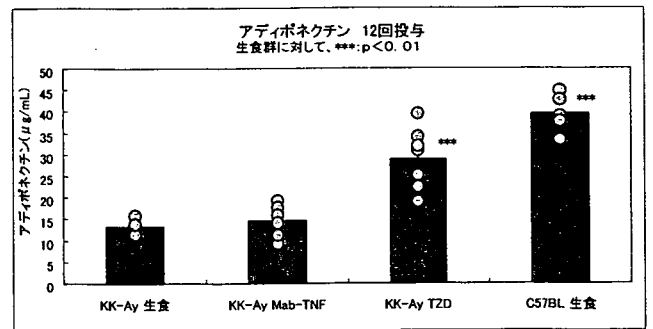


図17 血漿アディポネクチン値の比較

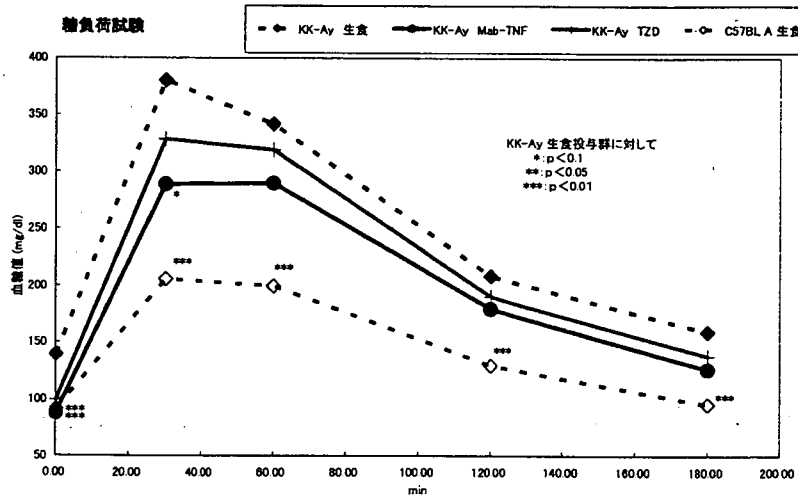


図18 経口負荷試験

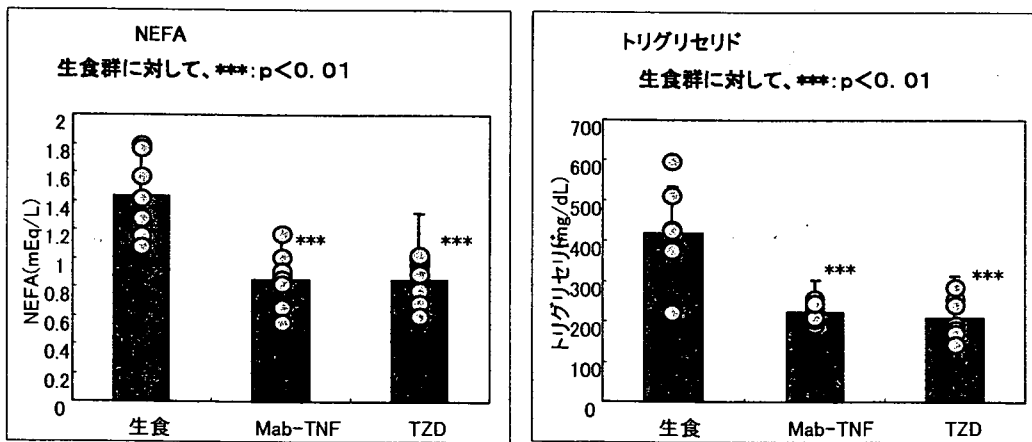


図19 血漿脂質パラメーター測定

感染性C型肝炎ウイルス株および感受性培養細胞ライブラリーの構築

所属 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究者 脇田 隆宇

研究要旨 C型肝炎ウイルス (HCV) HCV感染症に対する治療法は不十分であり、新たな抗ウイルス療法の開発が望まれる。我々はHCVのウイルス培養系を開発したが、さらに多くのウイルス株の培養を可能にして研究を進める必要がある。本研究では新たなウイルス株の分離と感染感受性のある培養細胞株を開発して、そのライブラリーを構築する。本研究により、抗ウイルス薬の開発が進行することが期待でき、我が国における肝炎対策に大きく寄与することができる。

分担研究者

- (1) 東レ株式会社医薬研究所
望月 英典
- (2) 京都大学ウイルス研究所
土方 誠
- (3) 昭和大学医学部第二内科
伊藤 敬義
- (4) 東京医科歯科大学医歯学総合研究科
坂本 直哉

妨げになってきたが、主任研究者の研究によりHCVのウイルス培養が可能となった(平成16-18年度HS研究 課題番号:KH51041、Wakita T et al. Nat Med 2005)。しかし、このウイルス培養系は未だ十分ではなく、さらなる開発が望まれる。本研究により、培養可能なHCV株と感染感受性のある培養細胞のライブラリーが構築されて、HCVの新たな治療法が開発が進めば、多くの患者の社会復帰を可能にし、医療保険のコスト軽減に寄与できると考えられる。

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重大な感染症の一つである。このため、HCV感染者のスクリーニングなどの事業が開始されている。しかし、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。多数のキャリアーがウイルス排除できなければ、長期間の療養による医療保険へのコストは莫大になる。HCVの良いウイルス培養系が無いことが新たな治療法の開発の

B. 研究方法

1. C型肝炎患者血清からのHCV遺伝子分離とレプリコンの作製

劇症肝炎患者や重症肝炎患者血清から抽出したHCV RNAをRT-PCR法により増幅する。ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定する。さらにPCR産物をクローニングしてその塩基配列を確認する。クローニングしたウイルスcDNAを用いて、レプリコンを作製する。レプリコンゲノムの配列を解析して、適合変異の有無を確認する。

2. 高い複製および感染力をもつ JFH-1 株およびキメラウイルスの解析と初代培養肝細胞を用いたウイルス感染

JFH-1 株と他の HCV 株のキメラウイルスを作製し、複製増殖およびウイルス産生能に重要なウイルス遺伝子領域を解析した。また、ヒト肝臓由来の初代培養肝細胞の HCV 感染感受性を解析した。

3. エピトープタグ配列が挿入されたキメラ HCV 遺伝子の作製

超可変領域 1 (HVR1) 中に FLAG エピトープタグを挿入した HCV 遺伝子を作製した。本遺伝子を J6/JFH-1(3XFLAG) と名付けた。

4. HuS-E/2 細胞の立体培養

HuS-E/2細胞は初代培養肝細胞と高い類似性を示す細胞であるため、天然型HCVが効率良く感染することが考えられた。HuS-E/2細胞をさらに肝組織と類似した培養条件にする同様の立体培養方法(温度可逆性ゲル化ポリマーおよびホローファイバー)を用いることで天然型HCVの感染増殖効率が上昇する可能性を検討した。患者血清を立体培養した細胞の培養液に加え、洗浄後3日後、5日後、7日後に細胞を回収し、細胞中のHCV RNA量を定量した。

5. 患者および健常人由来 B 細胞の HCV 感染感受性の解析

インフォームドコンセントを得た C 型慢性肝炎患者から末梢血単核球 (PBMC) を分離し、さらに CD19 陽性細胞分画を B 細胞分画とした得られた B 細胞中、また CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞中の HCV RNA 量を定量した。免疫グロブリン重鎖遺

伝子の超可変領域と CDR3 を含む領域の mRNA を RT-PCR で増幅し、この PCR 産物を P32 で末端ラベルした primer と Taq polymerase を用いて伸長反応した。伸長産物を電気泳動し、オートラジオグラフィーで泳動距離を解析した。LPD マーカーとしてクリオグロブリン血症 (Cg)、リウマチ因子 (RF)、C4、CH50 を測定した。細胞中 HCV RNA が $4.0 \log \text{ copis}/10^5 \text{ cells}$ 以上の B 細胞についてマイナス鎖 HCV RNA の有無を検討した。患者末梢血単核球 PBMC を RPMI+10%FCS で 1 週間培養した。また、同患者血清を健常者の PBMC と室温下で 30 分間吸着させ、その後培地で洗浄し、細胞に吸着する HCV RNA 量を real time RT-PCR で定量し、その後培養し 1 週間の細胞中及び培養上清中 HCV RNA を測定した。

6. HCV のプラークアッセイ法の確立と高増殖性 HCV-JFH1 株の構築

HCV-JFH1 ウイルス液を Huh-7.5.1 細胞に感染後、アガロース寒天包埋培地を用いて培養後、テトラゾリウム塩にて染色し、プラーク形成能 (PFU: plaque forming unit) の定量を行う。また、HCV-JFH1 感染細胞をメチルセルロース含有培地にて培養後、HCV コア蛋白による免疫蛍光染色を行い感染性 (FFU: focus forming unit) を観察する。プラーク形成 HCV-JFH1 感染細胞を回収後、非感染 Huh-7.5.1 細胞に再感染し、その RNA を回収しプラーク形成クローンの単離を試みる。単離されたクローンより RT-PCR を行い、遺伝子解析を行う。

7. 急性肝炎血清からの新たな HCV 株の単離
ゲノタイプ 1b, 2a および 2b 急性重症型 C

型肝炎血清より HCV-RNA を抽出、自律増殖する subgenomic replicon 及び全長ウイルス cDNA を構築し、培養細胞での増殖性を確認する。樹立された HCV 培養・増殖系の機能解析、及びウイルス遺伝子改変により高効率増殖系を作成する。

(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. C 型肝炎患者血清からの HCV 遺伝子分離とレプリコンの作製

劇症肝炎患者 2 例や重症肝炎患者 1 例の血清から HCV 遺伝子を増幅した。塩基配列の解析の結果、劇症肝炎 2 例の遺伝子型は遺伝子型 1b が 1 例、2a が 1 例、重症肝炎 1 例は遺伝子型 1b であった。クローニングしたウイルス遺伝子を用いて、サブジェノミックレプリコンを作製した。3 例中 2 例でコロニー形成が認められ、ウイルス遺伝子複製が確認できた。野生型のレプリコン配列と比較するとほとんどのレプリコン細胞で適合変異が確認できた。この適合変異はコロニー形成能を

向上させることが明らかとなった。

2. JFH-1 株とキメラウイルスの解析および初代培養肝細胞を用いたウイルス感染

JFH-1 株の各遺伝子領域を他の HCV 株に入れ換えたキメラウイルスプラスミドを作製した。キメラウイルスの合成 RNA を Huh7 細胞にトランスフェクションしてその複製能力とウイルス分泌能を解析すると、複製に関与するのは NS3 および NS5B から 3'X 領域であった。また、NS3 はウイルス産生にも重要であることが明らかとなった。さらにコア領域はウイルス粒子分泌に重要であった。JFH-1 株全長遺伝子の構造領域を遺伝子型 1 のウイルス株に入れかえたキメラウイルスでは、トランスフェクション直後はウイルス粒子産生が観察されるがその後の経代培養によりウイルス産生量は徐々に低下した。しかし、さらに経代培養を続けるとある時点からウイルス産生量が急激に増加することを観察できた。

ヒト肝臓由来の初代培養肝細胞を星細胞と共培養することで経代培養が可能となる。この培養肝細胞に JFH-1 株 HCV や患者由来の HCV を感染させて、その HCV に対する感染感受性を検討した。しかし、感染細胞内のウイルス量は徐々に低下し、培養液中にウイルスは分泌されなかった。

3. FLAG エピトープタグを挿入した HCV 粒子の産生

J6/JFH-1 (3×FLAG) RNA を導入した各細胞の培養上清中に含まれる HCV Core タンパク質を定量し、HCV 粒子産生の確認を行った。その結果、J6/JFH-1 RNA 導入ではその産生量に変化は見られずほぼ一定だった。しかしながら、J6/JFH-1 (3

×FLAG) RNA 導入では培養上清中の HCV Core 量は減少していったが、導入から 22 日を経過した時点で Core 量が上昇していき、35 日経過で J6/JFH-1 と同程度の Core 産生量を示した。このことから、トランスフェクション直後は高いウイルス産生能を有しておらず、その後そのウイルスゲノム内にウイルス産生に必要な適応変異が導入され、J6/JFH-1 RNA と同様のウイルス産生能を有するようになると考えられた。

4. HuS-E/2 細胞の立体培養による天然型 HCV の感染増殖

HuS-E/2 細胞を温度可逆性ゲル化ポリマー中で立体培養した場合、感染させた天然型 HCV の増殖した HCV ゲノム RNA は同一の感染条件における通常の 2 次元培養した細胞に比較して、感染後 5 日のピーク時において数十倍程度上昇することが確認された。

ホローファイバーを用いた立体培養系では、天然型 HCV が HuS-E/2 細胞に感染し、感染後 7 日あるいは 10 日において HCV-RNA が培地中に検出されることがわかった。また、立体培養した HuS-E/2 細胞に JFH-1 株を感染させたところ感染早期に培養液中に HCV-RNA ならびに HCV コアタンパク質が放出されていることがわかった。さらにその培養液には新たな HuS-E/2 細胞に感染増殖するウイルスが産生されていることを示すデータが得られた。

5. 患者および健常人由来 B 細胞の HCV 感染感受性の解析

C 型慢性肝炎患者 75 例を検討し B 細胞中 HCV RNA 陽性率は 48 例 (64.0%) と他のリンパ球分画よ

り高頻だった。B 細胞のウイルス量は平均で 3.3 log copies/ 10^5 cells であったが、T 細胞中の HCV RNA は CD4⁺ で平均 1.7、CD8⁺ T 細胞で平均 2.2 log copies/ 10^5 cells と B 細胞と比較し有意に低値だった。

HCV 感染者の免疫グロブリン重鎖遺伝子の Oligo-clonality は 75 例中 8 例 (10.7%) に認められたが、健常対照群 28 例には 1 例も認めなかった。また LPD マーカーと B 細胞中 HCV RNA 陽性との間にも有意な相関は認めなかった。

B 細胞内マイナス鎖 HCV RNA を検討した。rTth DNA ポリメラーゼの hot start 法を用いた one step の RT-PCR により、両鎖 HCV RNA が 3.0-7.0 log copies の範囲での特異的マイナス鎖 HCV RNA 検出が可能であることを確認した。細胞中 HCV RNA が 4.0 log copies/ 10^5 cells 以上と高値の患者全血 30ml 由来の B 細胞から 6 例中 2 例にマイナス鎖 HCV RNA を検出でき、B 細胞での HCV 複製が示唆された。

B 細胞中に HCV が検出され、かつマイナス鎖 RNA が検出された患者血清を健常人 (3 例) から得た PBMC に室温 30 分間それぞれ吸着し、PBMC 中の HCV RNA を定量した。PBMC に吸着した HCV RNA 量は 3 例ともに 3.6-3.7 log copies/ 10^5 cells を示した。その後 RPMI+10%FCS で培養し、細胞内と培養上清中 HCV RNA を測定すると、1 週間後、細胞内及び培養上清から HCV RNA は検出されなかった。また同時に患者 A の血液から PBMC を分離し、同様に 1 週間初代培養すると 7 日間培養上清中及び細胞内から HCV RNA が検出された。以上より患者血清と健常人 PBMC を用いた HCV 感染実験において、HCV の吸着は効率良く行われるが、培養下での感染、複製は確認できなかった。しかし、

患者から得た初代培養 PBMC を同条件下で培養することにより、B 細胞内、培養上清から 1 週間に渡って HCV RNA が検出された。この事実より B 細胞中の HCV 複製には、ウイルス側因子のみならず、宿主側の因子も関与している可能性が示唆された。

6. HCV のプラークアッセイ法の確立と高増殖性 HCV-JFH1 株の構築

HCV-JFH1 株を Huh-7.5.1 に感染後約 7 日目後に、感染細胞の死滅を伴うプラークが肉眼的に出現した。同時に施行した免疫蛍光染色ではプラーク形成部位に一致してウイルス蛋白の発現を認めた。また感染細胞のインターフェロン添加培養ではプラークの出現を認めず、プラーク形成はウイルス増殖に伴って生じると考えられた。プラークより感染細胞を回収し上清を再感染させたところ、1 個のクローン(#1)で高レベルの増殖と著明な細胞死が観察された。単離クローン(#1)は親株 JFH1 に比べ 50-100 倍増殖能・細胞傷害性が上昇していた。単離されたプラーク(#1)の遺伝子解析を行ったところ、9 個のアミノ酸変異を認め、そのうち 5 個が NS5B C 末端側に集中していた。以上より、HCV の特定の遺伝子構造がウイルスの増殖・感染能を規定していることが示された。

7. 急性肝炎血清からの新たな HCV 株の単離

散発性急性 C 型肝炎 genotype 2b 型 2 例、1b 型 1 例の血中ウイルス遺伝子配列を解析し、ウイルスゲノム全体に標準配列(HCV-J4, J8)に比べ約 20-40 箇所のアミノ酸変異が存在することを確認した。さらにこれらの配列から全長 HCV ゲノム cDNA および subgenomic replicon plasmid を構築を試み、2b 型全

長 HCV-cDNA、replicon の構築を終了し現在増殖能の解析中である。

D. 考察

主任研究者は劇症肝炎患者から分離した JFH-1 株を用いて、HCV のウイルス培養系を世界に先駆けて報告し、さらに HCV レプリコン、全長ウイルス遺伝子、キメラウイルス遺伝子など HCV のウイルス感染増殖複製実験に必要な材料の開発と、それらを用いた HCV に関する研究を推進してきた。初めてウイルス培養が可能となった JFH-1 株が劇症肝炎から分離されたことから、HCV による劇症肝炎からは複製効率の高いウイルス株が分離できる可能性を考慮して、さらに 3 例の劇症肝炎患者からウイルス遺伝子をクローニングして解析を行っている。3 例中 2 例から分離したウイルス株がレプリコンとして複製可能であった。

HCV 感染者の約 70% に B 細胞中 HCV RNA が検出され、クリオグロブリン血症陽性率が約 40% であった。更に約 20% に B 細胞内免疫グロブリン遺伝子 VH 領域の oligo-clonality を検出した。同一患者の肝組織及び B 細胞からそれぞれ検出した HCV RNA を比較検討し、IRES 領域に 4 塩基の相違があった。以上より B 細胞トロピズムを持つ HCV が存在し、B 細胞の活性化あるいは不死化に影響する可能性が示唆された。

不死化ヒト肝細胞を樹立した。この不死化肝細胞は、遺伝子発現パターンなどが初代培養肝細胞に極めて近い特徴を有すること、そして種々の血清由来 HCV や組換え体 HCV である JFH-1 株の感染増殖が可能であることが確認されている。

レプリコンのゲノムからは適合変異が多く検出された。これらの適合変異は程度は異なるものの、レプリコンの複製を増強させることを確認した。現在、これらの適合変異を含む全長遺伝子を作製して、培養細胞において感染性のウイルス粒子が産生されるかどうかを検討中である。

プラークを形成する細胞障害性の強い HCV 株は細胞内での複製能力が強いことが示唆された。複製および細胞障害性関与する変異が存在する。

E. 結論

1. C型肝炎患者血清からの HCV 遺伝子分離とレプリコンの作製をおこなった。

2. JFH-1 株の感染増殖およびウイルス粒子形成に関わる遺伝子領域を解析した。

3. FLAG エピトープタグを挿入した HCV 粒子を作製した。

4. HuS-E/2 細胞の立体培養および初代培養肝細胞による HCV の感染増殖を解析した。

5. 患者および健康人由来 B 細胞の HCV 感染感受性を解析した。

6. HCV のプラークアッセイ法を確立し、高増殖性 HCV-JFH1 株の構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Dofoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection

required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology*. 2007 46(6):1722-1731.

2. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*. 2007 Sep;9(9):961-9.

3. Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouillé Y, Dubuisson J, Wakita T, Duverlie G, Wychowski C. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol*. 2007 88(Pt 9):2495-503.

4. Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol*. 2007 81(15):8030-40.

5. Inokuchi T, Ito T, Uchikoshi M, Shimotsuna Y, Nozawa H, Shimazaki T and M.Imawari. Clonal Expansion of B cells is identified in Japanese Patients Infected with Hepatitis C virus. *The Showa University Journal of Medical Sciences*, 2008 in press.

6. Sakaki M, Hiroishi K, Baba T, Ito T, Hirayama Y, Saito K, Tonoike T, Kushima M and Imawari M. Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune liver disease and chronic viral hepatitis. *Hepatology Research* 38: 354-361. 2008

7. Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto

- N, Ito M: Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses HCV replication in vitro. *Hepatology Res*, in press.
8. Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S: Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology*, in press.
9. Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M: Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastro Hepatol* 2007; Epub.
10. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Sakamoto N, Enomoto N: Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C. *J Infect Dis* 2008; 197(3):361-370.
11. Peng LF, Kim SS, Matchacheep S, Lei X, Su S, Lin W, Runguphan W, Choe WH, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Beeler AB, Porco JA Jr, Schreiber SL and Chung RT: Identification of novel epoxide inhibitors of HCV replication . . a high-throughput screen. *Antimicrob Agent Chemother* 2007; 51 (10):3756-3759.
12. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N (equal contribution), Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Kanai T, Tsuchiya K, Wakita T, Enomoto N and Watanabe M: Development of plaque assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology* 2008;371:71-85.
13. Tasaka M, Sakamoto N (equal contribution), Itakura Y, Nakagawa M, Itsui Y, Sekine-Osajima Y, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Yoneyama M, Fujita T, Wakita T, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M: HCV nonstructural proteins responsible for suppression of RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol* 2007; 88:3323-3333.
14. Sakamoto N, Yoshimura M, Kimura T, Toyama K, Sekine-Osajima Y, Watanabe M, Muramatsu M: Suppression of hepatitis C virus replication by bone morphogenetic protein-7 and synergistic action with interferon-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357:467-473.
15. Kim SS, Peng LF, Lin W, Choe WH, Sakamoto N, Schreiber SL, Ikeda M, Kato N, Chung RT: A cell-based, high-throughput screen for small molecule regulators of HCV replication, *Gastroenterology* 2007; 132:311-320.
16. 坂本直哉: C型慢性肝炎の進展と治療抵抗性: ウイルス変異の観点から. *日本内科学会雑誌* 2007; 97(1):64-68.
17. 中川美奈、坂本直哉: C型肝炎ウイルスの構造と病態. *治療学* 2007 in press.
2. 学会発表および講演など

- 1) 脇田隆宇, 「C型肝炎のウイルス培養系の開発とその応用」、第43回肝形態科学研究会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.30)
- 2) 脇田隆宇, 「in vivoとin vitroにおけるHCV複製」、第4回ウイルス学キャンプin 湯河原、ウエルシティ湯河原、(2007, 6.6-7)
- 3) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究」、第3回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島大学廣仁会館、(2007, 6.29)
- 4) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの感染増殖機構」、The 6th Hepatitis Expert Meeting、軽井沢プリンスホテル、(2007, 8.25)
- 5) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製および増殖機構」、第27回名古屋肝炎セミナー 第116回名古屋肝疾患研究会、名古屋東急ホテル、(2007, 9.21)
- 6) 脇田隆宇, 「Infection and replication of hepatitis C virus」、アジア太平洋消化器病週間 Asian Pacific Digestive Week 2007サテライトシンポジウム、神戸商工会議所会館、(2007, 10.17)
- 7) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究」、第22回臨床肝臓カンファレンス、日本海運倶楽部、(2007, 11.10)
- 8) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルス基礎研究の進歩」、第167回高知肝疾患症例検討会、高知新阪急ホテル、(2007, 11.20)
- 9) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの感染および複製増殖機構」、第31回阿蘇シンポジウム「ウイルスと戦う」、阿蘇プリンスホテル、(2007, 7.27-28)
- 10) 箆島裕子、坂本直哉、中川美奈、田坂めぐみ、櫻井幸、井津井康浩、陳正新、榎本信幸、脇田隆宇、渡辺守、plaque-forming assayを用いた細胞障害性 HCV の選択と機能解析、第43回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.31-6.1)
- 11) 平賀伸彦、今村道雄、木村俊之、柘植雅貴、野口千笑、高橋祥一、本多政夫、金子周一、脇田隆宇、茶山一彰、リバーズジェネティクスにより作製した HCV 感染マウスを用いた genotype 別のインターフェロン感受性の検討、第43回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.31-6.1)
- 12) 伊達朋子、村山麻子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、野本明男、鈴木哲朗、脇田隆宇、遺伝子型 2a/2b 間でのキメラウイルスの作製および性状解析、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)
- 13) 村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆宇、HCV JFH-1 株の複製および感染性ウイルス粒子形成に重要な領域の解析、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)
- 14) 加藤孝宣、脇田隆宇、HCV JFH-1 株の in vivo での病原性の検討、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)
- 15) 村上恭子、勝二郁夫、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆宇、血球系細胞に HCV JFH-1 株の感染および複製の検討、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)
- 16) 赤澤大輔、伊達朋子、森川賢一、村山朝子、尾見法昭、高橋仁、白倉雅之、鈴木哲朗、脇田隆宇、肝細胞株における感染性 HCV 粒子の作製と性状解析、日本ウイルス学会第55回学術集会、

- 札幌コンベンションセンター(2007, 10. 21-23)
- 17) 高橋仁、尾見法昭、赤澤大輔、白倉雅之、鈴木哲朗、脇田隆宇、エピトープタグを付加した組換え HCV 粒子の作製と性状解析、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10. 21-23)
- 18) T Wakita. HCV replication in vitro and in vivo, 3rd Pasteur-Areva Course on Blood-Borne Viruses: Hepatitis C Virus, Shanghai, China (Oct 15-18, 2007)
- 19) G Mateu, R O. Donis, J Bukh, T Wakita, A Grakoui, Intragenotypic chimeric hepatitis C viruses produce high levels of infectious particles but cause increased cell death, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 20) P Podevin, S Lagaye, A Carpentier, L Aoudjehane, M Carrière, S Zaïdi, M Dreux, O Scatton, T Wakita, F-L Cosset, F Conti, Y Calmus, A R Rosenberg, Production of infectious hepatitis C virus in primary culture of human adult hepatocytes, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 21) Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Ishii K, Wakita T, The important regions for RNA replication and infectious virus particle formation of JFH-1, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 22) K Murakami, I Shoji, I Hamamoto, T Suzuki, T Miyamura, T Wakita, Virological characterization of HCV JFH-1 strain in B-lymphocytes, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 23) Machida K, Huang J, Wang C-H, Liu H, Kondo Y, Sung V, Wakita T, Lai M, Preferential lymphotropism vs. hepatotropism of different HCV isolates established through infectious full-length viral RNA studies, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 24) Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Mishima K, Nakagawa M, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Yamamoto M, Onui Y, Sudo G, Itsui Y, Wakita T, Watanabe M, Development of plaque-forming assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 25) Takahashi H, Akazawa D, Omi N, Nakamura N, Mochizuki H, Suzuki T, Wakita T, An adaptive mutation in E2 glycoprotein allow an efficient production of HCV particles with epitope-tagged envelope, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 26) Akazawa D, Takahashi H, Omi N, Date T, Morikawa K, Murayama A, Nakamura N, Mochizuki H, Wakita T, Characterization of infectious HCV particles produced from various liver-derived cell lines, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

- 27) Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouille Y, Dubuisson J, Wakita T, Duverlie G, Wychowski C, Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in HCV structural proteins, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9.9-13)
- 28) Hitoshi Takahashi, Noriaki Omi, Noriko Nakamura, Hidenori Mochizuki, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita. Characterization of recombinant HCV with modified envelope glycoprotein. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Glasgow, UK (2007 9.9-13)
- 29) Daisuke Akazawa, Tomoko Date, Kenichi Morikawa, Asako Murayama, Noriko Nakamura, Hidenori Mochizuki, Takaji Wakita. Production and characterization of infectious HCV particles from various liver-derived cell lines. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Glasgow, UK (2007 9.9-13)
- 30) 井口桃子、伊藤敬義、打越 学、野沢妃佐子、島崎とも江、井廻道夫、C 型慢性肝炎患者における B 細胞 HCV 感染と HCV 関連リンパ増殖性疾患マーカーに対する抗ウイルス療法の効果、第 43 回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン(2007, 5.31-6.1) ワークショップ 1 「肝炎ウイルス研究の進歩」
- 31) 井口桃子、伊藤敬義、打越 学、森川賢一、野沢妃佐子、島崎とも江、井廻道夫、C 型慢性肝炎患者における B 細胞 HCV 感染と免疫グロブリン超可変領域遺伝子 clonality 発症の解析、第 47 回京都肝セルバイオロジー研究会、ホテルオークラ京都 (2007, 7.14)
- 33) Megumi Tasaka, Naoya Sakamoto, Yoshie Itakura, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Yuko Sekine-Osajima, Yuki Nishimura-Sakurai, Chen-Hsin Chen, Mamoru Watanabe: HCV nonstructural proteins responsible for impairing RIG-I/Cardif -induced interferon responses. APASL May-27-2007, Kyoto, Japan.
- 34) 箆島裕子、坂本直哉、中川美奈、田坂めぐみ、櫻井幸、井津井康浩、陳正新、榎本信幸、脇田隆字、渡辺守: Plaque-forming assay を用いた細胞障害性 HCV の選択と機能解析. 第 43 回日本肝臓学会総会、東京(2007. 5. 31).
- 35) Naoya Sakamoto, Yuko Sekine-Osajima, Kako Mishima, Mina Nakagawa, Megumi Tasaka, Yuki Nishimura-Sakurai, Yasuhiro Itsui, Takaji Wakita, and Mamoru Watanabe: Development of plaque-forming assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. 14th. International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK (2007.9.9).
- 36) Yuki Nishimura-Sakurai, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Yuko Sekine-Osajima, Megumi Tasaka, Yasuhiro Itsui, Cheng-Hsin Chen, Mamoru Watanabe: Analysis of HCV-associated host genes and intracellular signal pathway using chimeric reporter HCV replicon system. 14th. International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK (2007.9.9).
- 37) M. Tasaka¹; N. Sakamoto¹; Y. Itakura¹; M. Nakagawa¹; Y. Itsui¹; Y. Sekine-Osajima¹; Y. Nishimura-Sakurai¹; C. Chen¹; M.

Watanabe:HCV nonstructural proteins responsible for impairing RIG-I/Cardif -induced interferon responses. 14th. International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK (2007.9.9).

38) Naoya Sakamoto, Mika Yoshimura, Tomomi Kimura, Keisuke Toyama, Yuko Sekine-Osajima, Mamoru Watanabe, and Masaaki Muramatsu:Suppression of hepatitis C virus replication by bone morphogenetic protein-7 and synergistic action with interferon-alpha. 14th. International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK (2007.9.9).

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

癌、炎症・アレルギー、眼科疾患における創薬ターゲット遺伝子の同定

所 属 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部
研究者 田中 輝幸

研究要旨 癌、炎症・アレルギー、眼科疾患における新規創薬ターゲットの発見を目指し、ハイスループット・トランスフェクションアッセイシステムを構築し、一次スクリーニングを行い候補遺伝子を見出した。また、当該遺伝子の機能解析で行う、遺伝子の機能を欠失あるいは外来遺伝子として新たに導入した個体マウス作製において、従来に比べより有用な方法の構築を目指し、モデルマウスを作製し、その解析を通して有用性について考察した。

分担研究者

- (1) 国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部
浅原 弘嗣、橋本 徳、工藤 寛枝、浅田 真紀
- (2) 北里大学 理学部 生物科学科分子発生学講座
花岡 和則
- (3) 参天製薬株式会社 研究開発センター
青野 浩之
- (4) 大鵬薬品工業株式会社 創薬研究所
生澤 公一

A. 研究目的

ヒトゲノムが解読された現在、タンパク質に翻訳される遺伝子の総数は約2万個であることが明らかとなっている。しかし、ゲノム情報から導き出されるタンパク質の一次構造だけでは生体内での機能は知り得ない。それぞれのタンパク質の機能を解明していくことが、ポストゲノム時代の新たな研究課題となっている。

細胞、組織、臓器は複雑な遺伝子発現の調節ネットワークにより秩序だてて運命付けられ形成される。すなわち取り返しのつかない調節ネットワークの“ずれ”は結果として疾病を引き起こすこととなる。このことから、組織の形成に重要な遺伝子などの「疾患関連遺伝子」の発現調節に関わる転写因子、シグナル系・レセプター・分泌因子などの全ての調節因子、ならびにそれらの協調作用を含む相互作用が決定されれば、病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの同定にきわめて有用である。

本研究でシステムとして用いる、384 ウェルプレートを用いたハイスループット・トランスフェクション機能スクリーニングは、使用するレポーター・ベクターを変更することにより生細胞における様々な遺伝子の発現調節に関わる因子について網羅的な情報を得るための、最も効率的なシステムの1つである。このシステムにより重要な疾患責任遺伝子などの発現に影響する全上流因子をスクリーニングすることが出来る(図1)。

本研究ではこのハイスループット・トランスフェクション機能スクリーニングシステムを構築し、癌、炎症・アレルギー、眼科疾患に関わる疾患関連遺伝子の発現制御に関わる調節因子を網羅的に探索し、それらの協調作用を含む全相互作用を決定し、病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの同定を目指す。この研究による成果は、癌、炎症・アレルギー、眼科疾患などの病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの発見に有用なデータベースとして利用できるほか、幅広い疾患に対する創薬アプローチへの応用が期待される。

本年度は、全長 cDNA ライブラリを用いたハイスループット・スクリーニングシステムの構築を行うための条件検討を行い、決定した条件のもと骨形成に重要な転写因子 Runx2 の転写コファクターの探索、軟骨組織形成に重要な転写因子 Smad3 の転写コファクターの探索、網膜発生に重要な Sonic hedgehog (Shh) の上流因子の探索、アレルギー・癌の病態に関わる遺伝子の上流因子の探索を行った。

また、今後それぞれの探索において見出された遺伝子の機能解析において、マウスを用いて、遺伝子の機能を欠失させた個体 (Loss of function) あるいは、当該遺伝子を外来遺伝子として新たに導入した個体 (Gain of function) を作製し、解析を行う予定である。本年度は Gain of function の従来の方法では問題であった 1) トランスジーンがマウス染色体にランダムに組み込まれることに起因する位置効果 (position effect) をさけることができないこと、2) ベクターに組み込む遺伝子サイズの制約から 1Mb 以上の遺伝子を導入することができないなどの問題点を解決する方法について検討し、より効率的かつ有用な解析を行う方法の構築を行った。モデルとして DMD-null ES 細胞に HAC-DMD を導入し、この ES 細胞由来のマウスを作成することにより、ヒトとマウスのジストロフィン遺伝子が入れ替わった新しいモデルマウスを作製した。

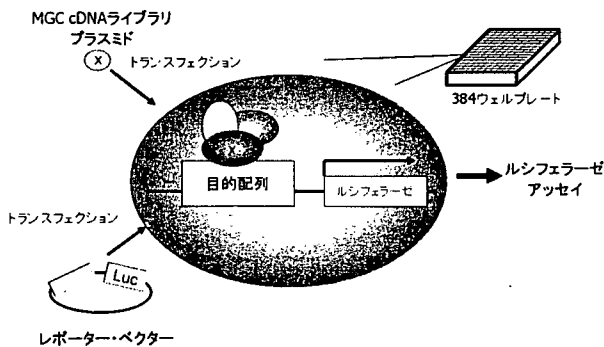


図 1. ハイスルーブット・トランスフェクションの模式図 384 ウェルプレート上で MGC cDNA ライブラリのプラスミドと疾患関連遺伝子プロモーターを含むレポーターを共遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性をもとに上流遺伝子を探索する。

B. 研究方法

1. ハイスルーブット・トランスフェクションアッセイ

骨形成に重要な転写因子 Runx2 の転写コファクターの探索を行うため、骨芽細胞の細胞外マトリクス遺伝子 *Osteocalcin* の Runx2 結合領域の配列を 6 個タンデムにつなぎ、下流にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含むコンストラクション (6xOSE2-Luc: Osteoblast Specific Element) を使用した。軟骨組織形成に重要な転写因子 Smad3 の転写コファクターの探索には Smad3 反応性 TARE (TGF-beta and Activin Response Element) レポーター・ベクターを使用した。網膜発生に重要な Shh の上流因子の探索には、組織特異的エンハンサー領域の下流にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含むようにベクターに組み込み使用した。アレルギー・癌の病態に関わる遺伝子の探索にはアレルギー、癌の創薬において特に重要と思われる遺伝子を 2 つに絞り、そのプロモーターを、特に、種間で保存性の高い部分に注目し、下流にル

シフェラーゼ遺伝子を含むようなコンストラクションでベクターを作製し、使用した。

それぞれのレポーター・ベクターを使用して最適な解析条件を検討し、決定した条件により、ヒト全長 cDNA ライブラリの発現ベクターを使用してそれぞれハイスルーブット・トランスフェクションアッセイによりスクリーニングを行った。

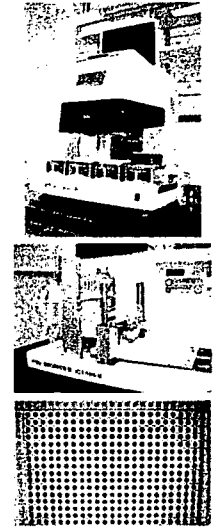
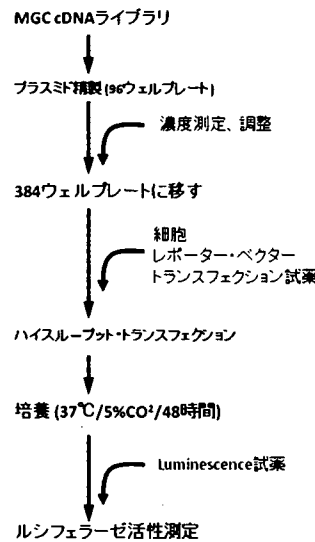


図 2. ハイスルーブット・トランスフェクションのフロー

入手した MGC cDNA ライブラリより大腸菌を培養、増殖させて遠心機にてペレットにしたのちキットを使用してプラスミドを抽出した。384 ウェルプレートに適當濃度を移し替え、配置させる。それぞれのプラスミドの配置されたウェルに条件検討により決定した適當濃度の細胞、レポーター・ベクター、トランスフェクション試薬を自動分注装置を用いて加えて培養した。48 時間後、検出試薬を加え、ルシフェラーゼ活性を測定した。

ヒト遺伝子の全長 cDNA が哺乳類細胞で発現可能なベクターに入ったコンストラクトのプラスミドのライブラリを、米国 MGC (Mammalian Gene Collection) から入手し、本研究に使用した。入手した全長 cDNA ライブラリは、大腸菌に形質転換された状態で 96 ウェルプレートに配列されているため、一部を別プレート上で LB 培地に植菌して培養、増殖させた。大腸菌の増殖後、プレート遠心機で遠心して大腸菌をペレットにし、96 ウェルフォーマットの吸引式ミニプレップキットを用いてプラスミド抽出を行った。プレート・リーダーを用いてプラスミドの濃度を測定した後、濃度調整装置によりプラスミドを目的濃度に揃えた。精製したプラスミドは 96 ウェルプレートから分注機を用いて 384 ウェルプレートに適當量分注し、解析のテンプレートとした。作製したテンプレートに 293T 細胞、目的のレポーター・ベクターおよび遺伝子導入試薬を、分注機を用いて分注して細胞に遺伝子導入し、導入した遺伝子の発現に充分な期間培養した後、ルシフェラーゼ検出試薬を加えてルシフェラーゼ活性を測定した (図 2)。

(倫理面への配慮)

本研究では、樹立されている培養細胞株を用いて実験を行っており、倫理的には全く問題のない研究である。

2. 人工染色体 HAC-DMD を保持した DMD-null マウスの作製

マウス X 染色体のジストロフィン遺伝子領域上流及び下流に、相同組み換えを利用して loxP 配列を組み込んだ ES 細胞株に、Cre-リコンビナーゼ発現ベクターを作用させることによりマウスジストロフィン遺伝子が完全に欠失した ES 細胞株を分離した。

この DMD-null ES 細胞株にマイクロセル融合法を用いて人工染色体 HAC-DMD を導入した。選択培養下で生き残った細胞をクローン株として分離した。キメラマウス形成能の高い ES 細胞クローンを得るために、分離した ES 細胞株を再クローニングし、正常核型維持率の高いクローン株を核型解析により選別し、分離した。

自然交配させた妊娠 2.5 日目の ICR マウスから 8 細胞期胚を採取し、HAC-DMD を保持した DMD-null ES 細胞をインジェクションした後、インキュベーター内で一晚培養して胚盤胞期胚にしたものを偽妊娠 2.5 日目の ICR マウスの子宮に移植し出生させた。得られたキメラマウスを ICR マウスと交配することによって、F1 マウスを作製した (図 3)。

ジストロフィン遺伝子だけが“ヒト化”したマウスの作成

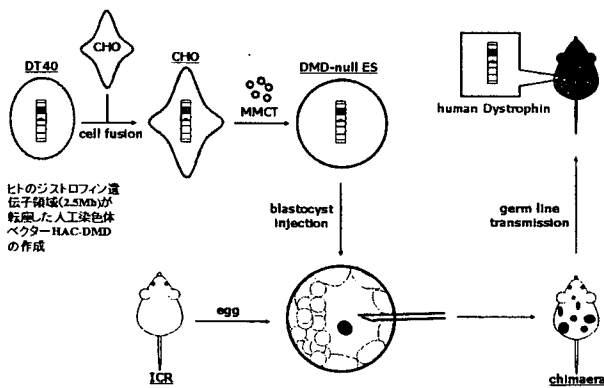


図 3. 実験系を示す模式図

(倫理面への配慮)

本研究は、北里大学医学部・病院倫理委員会の承認のもとに行われた。また、本研究で用いた生検試料 (DMD 由来筋芽細胞) は、国立精神神経センターとの契約に基づき、連結不可能匿名化された試料として研究に使用した。また、本研究は、一般的なトランスジェニックマウス作成と同等の組み換え実験の法的規制のもとで北里大学組み換え DNA 実験安全指針に則って行われた。実験動物の愛護については、北里大学実験動物愛護指針に基づき、飼育環境・安

楽死の方法など十分に配慮した。

C. 研究結果

1. ハイスループット・トランスフェクションアッセイ

それぞれ、目的の解析で使用使用するレポーター・ベクターでポジティブ、ネガティブ・コントロールにより解析条件の検討を行い、最適条件を決定した。決定した条件の下、n=2 回または 3 回の同条件でハイスループット・トランスフェクションアッセイを行い、標準化変量を算出、統計処理によりそれぞれの解析において約 100 程度の候補因子を見出した。

2. 人工染色体 HAC-DMD を保持した DMD-null マウスの作製

DMD-null ES 細胞株にマイクロセル融合法を用いて HAC-DMD を導入した後、選択培地で培養して生き残ったクローン細胞を分離した。さらに、再クローニングして核型が正常な細胞株を分離した。これらの ES 細胞を用いて作成した DMD-null マウスで HAC-DMD が安定に保持されていることをゲノミック PCR により確認した (図 4)。

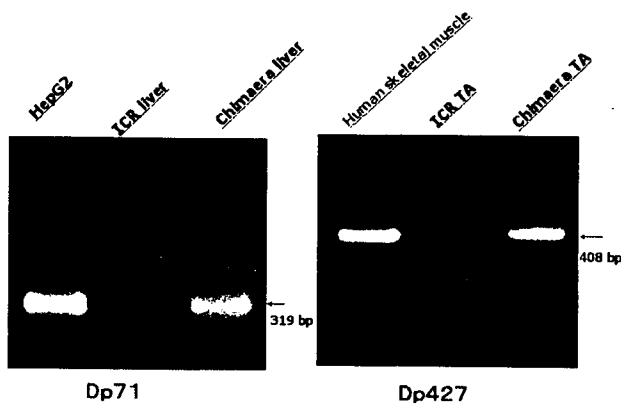
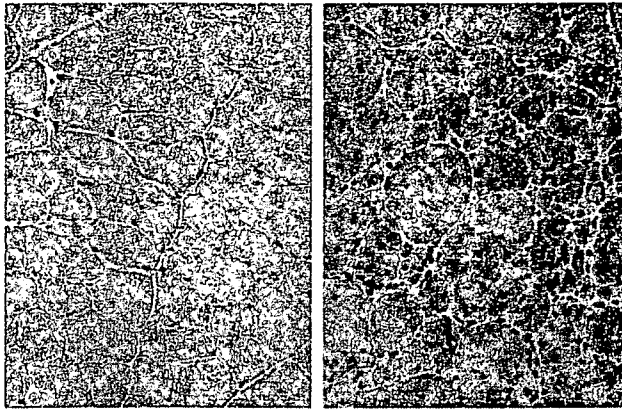


図 4. キメラマウスにおいてヒトジストロフィンが発現していることを示す RT-PCR

これらのマウスの骨格筋における表現系を詳細に解析した結果、HAC-DMD を保持した DMD-null マウスでは、筋組織の病態が正常に回復していることが観察された。DMD-null マウスで顕著に認められる崩壊した筋組織や再生筋であることを示す中心核繊維は全く認められなかった (図 5)。これらの筋組織でヒトジストロフィンタンパクが産生されていることは RT-PCR 法を用いて確認した (図 4)。また、抗ジストロフィン抗体 (MANDRA1 および Dys3) を用いた免疫組織学的解析により、これらのマウスの骨格筋の細胞膜にジストロフィンタンパクが局在していることを確認した (図 6)。これらの結果から、1) HAC-DMD がマウス個体内で安定に保持され正常に発現していること、および、2) ヒトジストロフィンタンパクはマウス筋組織で正常に機能す

ることが明らかになった。一方、興味深いことに、HAC-DMD を保持した DMD-null オスマウスは依然として不妊であることが判明し、ヒトジストロフィンを導入しても妊性は回復しないことが判った。



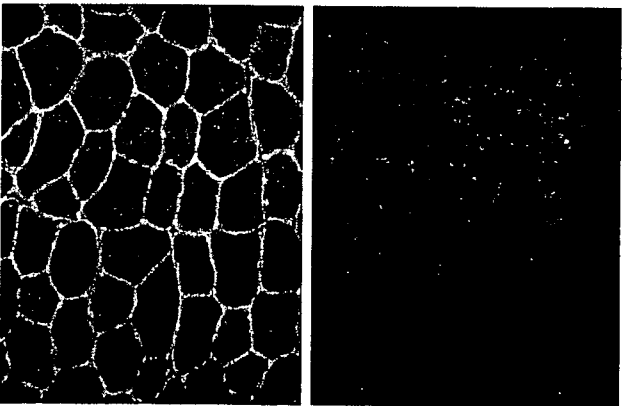
DMD-null+HAC

DMD-null

図 5. DMD-null マウスおよび HAC-DMD を保持した DMD-null マウス骨格筋の組織像

右 DMD-null マウス: 筋組織が崩壊し、貪食細胞の浸潤、中心核繊維や渦巻き繊維など筋ジストロフィー特有の病理的特徴が認められる。

左 HAC-DMD を保持した DMD-null マウス: 筋ジストロフィーの病態が完全に回復し正常筋繊維と区別できない。



DMD-null+HAC-DMD

DMD-null

図 6. DMD-null マウスおよび HAC-DMD を保持した DMD-null マウス骨格筋の免疫組織学的解析

前頸骨筋組織切片の抗ジストロフィン抗体を用いた蛍光免疫染色写真。HAC-DMD を保持する DMD-null マウスでは、ジストロフィンタンパクが筋細胞膜に局在しているのに対し、HAC-DMD を導入していない DMD-null マウスではジストロフィンの発現は認められない。

D. 考察

1. ハイスループット・トランスフェクションアッセイ

本研究で見出した候補因子は従来のマイクロアレイを用いた研究では決して見いだせない、網羅的解析による貴重なデータであり、これまでとは異なる側面での病態メカニズムの解明および新規治療ターゲ

ットの発見につながるものと考えられる。しかし、これらの因子の中にはネガティブ・フォールズが含まれている可能性があり、今後再現性の確認のため 2 次、3 次スクリーニングと複数の繰り返し実験を行い、更なる候補の絞り込みを行う必要があると考える。

また、これまでの解析により候補となった遺伝子のうち、多くの遺伝子がこれまで機能が報告されていない遺伝子であった。このことは 2 次、3 次スクリーニングと繰り返しを増やし絞り込んだ結果、やはり機能が報告されていない遺伝子が候補として絞り込まれてくる可能性を示唆する。これらの遺伝子については、モデル動物を用いた *in vivo* での解析ならびに培養細胞を用いた *in vitro* の解析を行い機能を明らかにする必要がある。そうした解析によりヒト疾患メカニズムの解明および新規創薬ターゲットの同定につながるものと考えられる。

2. 人工染色体 HAC-DMD を保持した DMD-null マウスの作製

HAC-DMD を保持する DMD-null マウスの表現型を解析した結果から、HAC-DMD 上のヒトジストロフィン遺伝子から産生されるジストロフィンタンパクは、マウス筋繊維表面に局在すること、その結果、筋組織において病状の完全な回復が認められることが判明した。一方、DMD-null マウスの雄性不妊という表現型は、HAC-DMD の導入によっても回復できなかった。この興味深い結果の原因として考えられることは 3 つある。1 つ目は、精巣におけるジストロフィンアイソフォームの機能が、ヒトとマウスでは異なる可能性が考えられる。精巣では Dp71 が発現していることが明らかになっているので、マウスとヒトでは Dp71 の働きに違いがある可能性がある。2 つ目は、ジストロフィン遺伝子がヒトとマウスでは異なる可能性が考えられる。ジストロフィン遺伝子領域は非常に巨大であり、また、イントロンが全体の 97% を占めるため、精子形成に関わる遺伝子がマウスにのみ存在している可能性は否定できない。3 つ目に考えられることは、減数分裂における人工染色体の安定性に問題があることである。今までの研究により、マウス個体に人工染色体を導入することにより雄特異的に不妊になる場合があるということが報告されている。今回使用した人工染色体 HAC-DMD のセントロメアはヒト由来のものであり、マウス個体内での減数分裂時には、ヒト由来のセントロメアがマウスの染色体分配機構において正常に機能しにくいという可能性も考えられる。これらの可能性について、今後詳細に検討する必要があると考えられる。

本研究結果により、異種の染色体の一部を安定な人