

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 茶山 一彰

平成 20 年 (2008) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
C型肝炎ウイルス感染モデルの改良と創薬へ応用可能なモデルの確立・ リバースジェネティクスシステムの開発・考察・総括	
茶山 一彰	1
II. 分担研究報告	
1. 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	
吉里 勝利	9
2. 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	
金子 周一	13
3. レプリコンを用いたウイルス増殖に関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	
土方 誠	17
4. RNA 干渉を利用した肝疾患治療に関する基礎的検討	
高倉 喜信	21
5. 脂質代謝制御による抗 HCV 戦略の検討	
榎本 信幸	25
6. ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた HCV の感染機構の解析	
松浦 善治	29
7. C型肝炎ウイルス感染モデルの改良と創薬へ応用可能なモデルの確立	
高橋 祥一	33
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	49

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、B型あるいはC型肝炎の患者血清を投与することにより、マウスへのウイルス感染が可能となることを示した。これらのマウスは、インターフェロン、核酸アナログといった抗ウイルス剤に感受性を示し、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型およびC型肝炎ウイルスのリバースジェネティクスが可能となり、この技術を利用し、野生型や薬剤耐性の変異型の肝炎ウイルスを投与し、持続感染させることに成功した。2007年度には、この研究をさらに発展させ、genotype 1b型のC型肝炎ウイルス全長をクローニングし、このクローンを用いて、genotype 1b型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。この系を用いて、これまでレプリコン細胞を用いて報告されている、U-stretchの長さやHCV増殖の関係を*in vivo*においても明らかにした。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 (株)フェニックスバイオ
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 助教

【班長研究協力者】

脇田隆字 国立感染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い、これらのクローンを用いて、リバースジェネティクスの系も確立した。これらの研究を発展させるため、genotype 1b型のHCVクローンを用いたリバースジェネティクスによる感染マウスの作製を行った。

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。国立感染症研究所、脇田博士から供与されたgenotype 2a形HCVの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HCVクローンも使用し、感染実験を行った。さらに、genotype 1b型の重症急性C型肝炎患者の血清よりHCV全長をクローニング、このクローンをを用いた感染実験も行った。

C. 結果

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とした。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 週間後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。

さらには、genotype 1b 型の感染実験にも取り組んだ。genotype 1b 型の重症急性 C 型肝炎患者の血清より HCV 全長をクローニングした。この際、同じアミノ酸配列でも、U-stretch が 115 bp と最も長いクローン (KT9) および 86 bp と最も短いクローン (KT1) の 2 種類のクローンを作製した。KT9 より HCV RNA を合成し、マウス肝臓内に直接注入したところ、10 頭中 8 頭 (80%) のマウスで感染が確認され、マウス血中 HCV RNA は、 10^6 copy/mL に上昇した。また、パッセージも可能であった。これらの結果より、このクローンは感染性であることが確認され、リバーシジェネティクスにより、genotype 1b 型 HCV 感染マウスの作製に成功した。一方、KT1 を投与したマウスでは、感染の成立は 7 頭中 1 頭 (14%) のみであり、かつ、この 1 頭の血中 HCV RNA の増加は KT9 感染マウスに比べ、緩やかであった。U-stretch の長さの違いによる HCV 増殖の違いは、これまでレプリコン細胞を用いた報告があるが、われわれは、in vivo においても、U-stretch が長いほど、HCV の感染、増殖に有利であることを初めて見いだした。

また、Genotype 1a および 1b 型のウイルスの増殖性は、genotype 2a 型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 1a および 1b 型のマウスは genotype 2a 型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、このマウスモデルを用いて、肝線維化、発癌に対する新規治療法の開発に資するため、肝炎に対する新規薬剤標的分子を、プロテオーム技術を利用して網羅的に探索した。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。その中の 1 つは、ヒト遺伝子産物であり、全長はアミノ酸 650 個（同定されたのは分泌型断片）からなり、分泌シグナルを有し、ER と細胞表面に局在（分泌後細胞表面に再結合）する糖タンパク質であることを明らかにした。

松浦班員は、HCV 感染マウスを用いて、新規レセプター候補分子の精製標品の感染阻害効果を評価した。(hFGFR)5 の Fc キメラ可溶性蛋白質(hFGFR5/Fc)、およびコントロールとして hFGFR1 の Fc キメラ可溶性蛋白質(hFGFR1/Fc)をあらかじめ *in vitro* で反応させ、さらにこれらの可溶性蛋白質を前投与したキメラマウスに接種して、経時的な残存感染価を評価した。FGFR5/Fc 処置群では 2 週間目においても FGFR1/Fc 処置群と比較してウイ

ルスの増殖性が抑制されている傾向が観察された。今後は、HCV の感染レセプターとして有力視されているヒト CD81 の可溶性蛋白質の活性評価を行う予定である。

土方班員は、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 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)、TGF- β 、そして MAP キナーゼシグナル阻害剤である PD98059 を見出しているが、今回新たに抗がん剤として用いられているタモキシフェン(TAM)がその複製を抑制することを明らかにした。TAM の HCV ゲノム複製抑制効果はその標的であるエストロゲン受容体(ER α)を介し、ER α は HCV の RNA polymerase である NS5B と相互作用しており、TAM 処理によりその相互作用が抑制され、その結果 HCV 複製複合体中の NS5B が減少することを明らかにした。

金子班員は、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、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いることを明らかにし、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。

榎本班員は、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、検討を行っている。subgenomic HCV-replicon を用い、ミリオシン、シンバスタチン、インターフェロンの 3 剤について、併用効果を isobologram による解析にて検討を行ったところ、ミリオシンとインターフェロン、シンバスタチンをインターフェロン、またミリオシンとスタチンの、いずれの組み合

わせにおいても明らかな抗 HCV 相乗効果が認められた。インターフェロンとこれらの薬剤を併用しても、インターフェロン誘導遺伝子(ISG)群の発現はインターフェロン単独投与に比して亢進しておらず、相乗効果の機序は ISG の発現とは直接には関連のないものと考えた。脂質 raft をターゲットとした抗 HCV 戦略が、培養細胞系においては十分な効果を呈することを見いだした。

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いる。本年は、HIF-1 α を標的とする shRNA を発現ベクターに挿入し、結腸癌肝転移モデルマウスに対して、ハイドロダイナミック法により、肝臓内に遺伝子を発現をさせることにより、HIF-1 α および MMP-9 の発現は有意に抑制され、肝臓中癌細胞数も対照群の 10 % 程度にまで減少することを見いだした。これらの結果より Hif-1 α が、肝臓癌の転移・増殖に対する治療の標的と成り得る可能性が示された。高橋班員は、Genotype 1b クローンの Core 領域 および Interferon sensitive determining region (ISDR) に種々の変異を組み込み、合成した RNA をマウス肝臓内に直接注入し、変異ウイルスを感染させた。ISDR に変異が多いほど、HCV 感染の成立が低下していく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

HCV genotype 1a, genotype 1b, genotype 2a 型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。この手法を用いて、種々の変異ウイルス感染マウスの作製が可能になると思われる。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. Utoh R, Tateno C, Yamasaki C, Hiraga N, Kataoka M, Shimada T, Chayama K. Hepatitis B Virus-Infectibility of Chimeric Mice with Liver Repopulated by Serially Subcultured Human Hepatocytes. Hepatology 2008 in press
2. Uka K, Aikata H, Takaki S, Miki D, Kawaoka T, Jeong SC, Takahashi S, Toyota N, Ito K, Chayama K. Pretreatment predictor of response, time to progression, and survival to intraarterial 5-fluorouracil/interferon combination therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol. 2007 ;42(10):845-53. 2007 .
3. Yatsuji H, Hiraga N, Mori N, Hatakeyama T, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Suzuki F, Kumada H, Chayama K. Successful

- treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. *J Med Virol.* 2007 Dec;79(12):1811-7.
4. Uka K, Aikata H, Takaki S, Miki D, Jeong SC, Hiramatsu A, Kodama H, Shirakawa H, Kawakami Y, Takahashi S, Toyota N, Ito K, Chayama K. Similar effects of recombinant interferon-alpha-2b and natural interferon-alpha when combined with intra-arterial 5-fluorouracil for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2007 Nov;27(9):1209-16.
 5. Tashiro H, Itamoto T, Sasaki T, Ohdan H, Fudaba Y, Amano H, Fukuda S, Nakahara H, Ishiyama K, Ohshita A, Kohashi T, Mitsuta H, Chayama K. Asahara T. Biliary Complications after Duct-to-duct Biliary Reconstruction in Living-donor Liver Transplantation: Causes and Treatment. *World J Surg.* 2007 Nov;31(11):2222-9.
 6. Jeong SC, Aikata H, Katamura Y, Azakami T, Kawaoka T, Saneto H, Uka K, Mori N, Takaki S, Kodama H, Waki K, Imamura M, Shirakawa H, Kawakami Y, Takahashi S, Chayama K. Effects of a 24-week course of interferon-alpha therapy after curative treatment of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2007 Oct 28;13(40):5343-50.
 7. Jeong S, Aikata H, Katamura Y, Azakami T, Kawaoka T, Saneto H, Uka K, Mori N, Takaki S, Kodama H, Waki K, Imamura M, Shirakawa H, Kawakami Y, Takahashi S, Chayama K. Low-dose intermittent interferon-alpha therapy for HCV-related liver cirrhosis after curative treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2007 Oct 21;13(39):5188-95.
 8. Hiraga N, Aikata H, Takaki S, Kodama H, Shirakawa H, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Toyota N, Ito K, Tanaka S, Kitamoto M, Chayama K. The long-term outcome of patients with bleeding gastric varices after balloon-occluded retrograde transvenous obliteration. *J Gastroenterol.* 2007 Aug;42(8):663-72.
 9. 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* 45:1179-1186, 2007.
 10. 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(Pt 2):432-40.
 11. 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(3):414-20.
 12. Hiraga M, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Sakai A, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Wakita T and Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Letts.* 2007;581:1983-1987
 13. Yatsuji H, Hiraga N, Mori N, Hatakeyama T, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Suzuki F, Kumada H, Chayama K. Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. *J Med Virol.* 2007;79:1811-7.

14. Ohishi W, Fujiwara S, Zuzuki G and Chayama K. Validation of the use of freeze-dried sera for the diagnosis of hepatitis B and C virus infections in a longitudinal study cohort. Res. Adv. In Microbiology 2007;7:1-9.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得（土方班員）

2007年9月26日出願、“肝炎ウイルスの増殖方法、及び肝炎ウイルス感染細胞を培養するための中空糸並びにその利用” 発明者ならびに特許出願人：東洋紡績株式会社、山口達也、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人、下遠野邦忠、土方誠、出願番号：PCT/JP2007/068611

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
分担研究報告書（平成19年度）

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

分担研究者 吉里勝利 株式会社フェニックスバイオ 学術顧問

研究要旨：HCV を感染させたヒト肝細胞をもつキメラマウスに、インターフェロン (IFN) を東予市、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 感染の有無ならびに IFN 投与の有無によって変動するタンパク質を解析した。HCV 非感染群において IFN 投与により 2 倍以上に増加するスポットは見られなかったが、HCV 非感染群において IFN 投与により 1/2 以下に減少するタンパク質 17 種を同定した。また、HCV 感染群においては、IFN 投与により 2 倍以上増加するタンパク質 8 種、1/2 以下への減少が見られるタンパク質 27 種を同定するなど、HCV 感染並びに IFN 投与により変動するタンパク質のリストを網羅的に作成することができた。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、肝細胞表面に存在し、ウイルスタンパク質と相互作用を持つタンパク質の同定に成功した。

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、ウイルス性の肝炎、繊維化、発癌に対する新規治療法の開発に資するため、(1) HCV 感染キメラマウス肝臓に特異的に発現するタンパク質と、(2) 肝炎に対する新規薬剤標的分子を、プロテオーム技術を利用して網羅的に探索することを目指した。

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(IFN)投与無し、投与後 6 時間、24 時間の合計 6 群から採取した。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

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。その中の 1 つは、ヒト遺伝子産物であり、全長はアミノ酸 650 個（同定されたのは分泌型断片）からなり、分泌シグナルを有し、ER と細胞表面に局在（分泌後細胞表面に再結合）する糖タンパク質であることを明らかにした。

D. 考察

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。

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。HCV 感染の有無、IFN 投与の有無により変動が見られるタンパク質の変化を更に解析することによって、翻訳産物レベルにおける IFN 作用機序の解明への糸口を得ることが出来た。

さらに、ウイルス表面抗原と相互作用する肝細胞表面タンパク質の候補を見いだすことに成功した。このことから、ウイルス感染の機序解明にタンパク質間相互作用解析が有効であることが強く示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Gerashchenko B I, Yamagata A, Oofusa K, Yoshizato K, de Toledo S M, Howell R W. Proteome analysis of proliferative response of bystander cells adjacent to cells exposed to ionizing radiation. *Proteomics*. 2007;7:2000-8.
- Katoh M, Sawada T, Soeno Y, Nakajima M, Tateno C, Yoshizato K, Yokoi T. In vivo drug metabolism model for human cytochrome P450 enzyme using chimeric mice with humanized liver. *J Pharm Sci*. 2007;96:428-37.
- Okumura H, Katoh M, Sawada T, Nakajima M, Soeno Y, Yabuuchi H, Ikeda T, Tateno C, Yoshizato K, Yokoi T. Humanization of excretory pathway in chimeric mice with humanized liver. *Toxicol Sci*. 2007; 97: 533 -8.
- Shoda J, Okada K, Inada Y, Kusama H, Utsunomiya H, Oda K, Yokoi T, Yoshizato K, Suzuki H. Bezafibrate induces multidrug-resistance P-Glycoprotein 3 expression in cultured human hepatocytes and humanized livers of chimeric mice. *Hepatol Res*. 2007;37:548-56.
- Masumoto N, Tateno C, Tachibana A, Utoh R, Morikawa Y, Shimada T, Momisako H, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K. GH enhances proliferation of human hepatocytes grafted into immunodeficient mice with damaged liver. *J Endocrinol*. 2007;194:529-37.
- Tokimitsu Y, Kishi H, Kondo S, Honda R, Tajiri K, Motoki K, Ozawa T, Kadowaki S, Obata T, Fujiki S, Tateno C, Takaishi H, Chayama K, Yoshizato K, Tamiya E, Sugiyama T, Muraguchi A. Single lymphocyte analysis with a microwell array chip. *Cytometry Part A*. 2007 ;71A:1003 -1010
- Utoh R, Tateno C, Yamasaki C, Hiraga N, Kataoka M, Shimada T, Cyayama K, Yoshizato K. Susceptibility of Chimeric Mice with Livers Repopulated by Serially Subcultured Human Hepatocytes to Hepatitis B Virus. *Hepatology* 2008 in press.
- 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

厚生労働科学研究費補助金
分担研究報告書（平成19年度）

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

「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 金沢大学恒常性制御学 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。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。今後、HCV 感染に伴う細胞内シグナルの変化が IFN 誘導シグナルをどのように抑制するかをパスウェイ解析などにより詳細に検討する。

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 9 匹のキメラマウスに感染させた (図 1)。3 匹の感染マウスより肝組織を採取し HCV 非感染マウス (5 匹) の肝組織と比較した。6 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 (4 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 (5 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)。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

HCV 感染に伴い、非感染マウスと比較し有意 ($p < 0.05$) に発現誘導を認めた遺伝子は 216 個、発現低下を認めた遺伝子は 178 個であった。発現誘導遺伝子群には IFN シグナルに関わる遺伝子が多く認められ、発現低下遺伝子群には細胞周期に関する遺伝子が多く認められた。IFN 投与に伴い、多くの IFN 誘導遺伝子の発現が認められ、特

に6時間後の肝組織で多く、24時間後では漸減傾向が認められた。

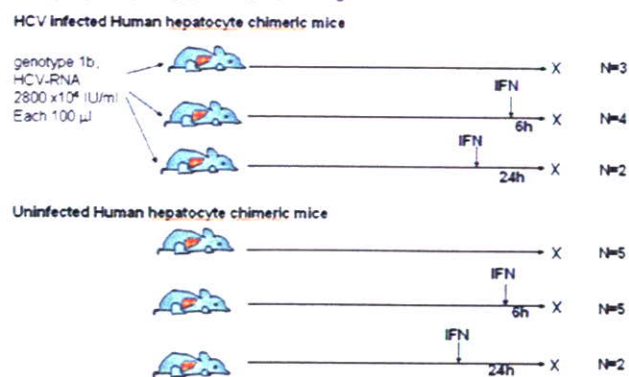


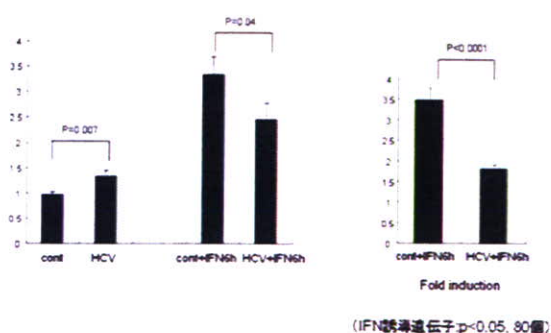
図1 解析マウス

興味深いことに IFN 誘導遺伝子の発現は HCV 感染マウスで有意に抑制されていた(図2)。

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。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、HCV 感染に伴う細胞内シグナルの変化が IFN 誘導シグナルをどのように抑制するかをパスウェイ解析などにより詳細に検討する。

図2 IFN誘導遺伝子の発現変動(キメラマウス)



E. 健康危険情報 特記事項なし

F. 研究発表

1. Minagawa H, Honda M, Miyazaki K, Tabuse Y, Teramoto R, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Ueda T, Kamijo K, Kaneko S. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Feb 1;366(1):186-92. Epub 2007 Dec 4.
2. Aburatani S, Sun F, Saito S, Honda M, Kaneko S, Horimoto K. Gene systems network inferred from expression profiles in hepatocellular carcinogenesis by graphical gaussian model. *EURASIP J Bioinform Syst Biol.* 2007;:47214.
3. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, Miyamoto K, Kaneko S. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology.* 2007 Nov;46(5):1392-403.
4. Oishi N, Shilagardi K, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S, Murakami S. Hepatitis B virus X protein overcomes oncogenic RAS-induced senescence in human immortalized cells. *Cancer Sci.* 2007 Oct;98(10):1540-8.
5. Takamura T, Honda M, Sakai Y, Ando H, Shimizu A, Ota T, Sakurai M, Misu H, Kurita S, Matsuzawa-Nagata N, Uchikata M, Nakamura S, Matoba R, Tanino M, Matsubara K, Kaneko S. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Sep 21;361(2):379-84. Epub 2007 Jul

- 16.
6. Komura T, Mizukoshi E, Kita Y, Sakurai M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Ohta T, Shimizu K, Nakamoto Y, Honda M, Takamura T, Kaneko S. Impact of diabetes on recurrence of hepatocellular carcinoma after surgical treatment in patients with viral hepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2007 Sep;102(9):1939-46. Epub 2007 Jun 15.
7. Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Sakai A, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Wakita T, Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett*. 2007 May 15;581(10):1983-7. Epub 2007 Apr 20.
8. 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.
9. Kaji K, Nakamoto Y, Kaneko S. Analysis of hepatitis C virus-specific CD8+ T-cells with HLA-A*24 tetramers during phlebotomy and interferon therapy for chronic hepatitis C. *Oncol Rep*. 2007 Oct;18(4):993-8.
10. Tachibana Y, Nakamoto Y, Mukaida N, Kaneko S. Intrahepatic interleukin-8 production during disease progression of chronic hepatitis C. *Cancer Lett*. 2007 Jun 18;251(1):36-42. Epub 2007 Jan 19.
11. Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Marukawa Y, Kitahara M, Mukaida N, Kaneko S. Prolonged, NK cell-mediated antitumor effects of suicide gene therapy combined with monocyte chemoattractant protein-1 against hepatocellular carcinoma. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):574-83. PMID: 17182598
- G. 財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
特記事項なし

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

分担研究者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所准教授

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。同時に独自に樹立したレプリコン細胞を用いて各種の薬剤等で処理し、この細胞内における HCV 部分ゲノム RNA の複製に影響与える薬剤を網羅的にスクリーニングした。今回その中から新たにタモキシフェンがその複製活性を抑制することを見出した。タモキシフェン(TAM)の効果はエストロゲン受容体(ER)αの抑制を介して HCV ゲノム RNA 複製を抑制することがわかったが、これは ERαの転写活性化能の抑制ではなかった。ERαは HCV の RNA polymerase である NS5B と相互作用しており、TAM 処理によりその相互作用が抑制されることがわかった。TAM 処理により複製複合体中の NS5B の減少が認められたため ERαは HCV 遺伝子複製複合体形成に何等かの役割をもっていることが考えられ、このような ERαの機能抑制が新たな抗 HCV 薬剤の標的となる可能性が考えられた。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

土方 誠・京都大学・准教授

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、これらを用いて 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. 既に樹立しているレプリコン細胞、つまり HCV の部分ゲノム RNA が自律複製している培養細胞を各種の薬剤等で処理し、この細胞内における HCV 部分ゲノム複製に影響与える薬剤をスクリーニングした。

また得られた薬剤の薬効機序を明らかにすることで HCV ゲノム複製機構を明らかにし、新たな薬剤をスクリーニングするための標的分子を同定することを目指した。

（倫理面への配慮）

この研究に関して、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 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)、TGF- β 、そして MAP キナーゼシグナル阻害剤である PD98059 を見出しているが、今回新たに抗がん剤として用いられているタモキシフェン (TAM) がその複製を抑制することを見出した。
2. TAM の HCV ゲノム複製抑制効果はその標的であるエストロゲン受容体 (ER α) を介したものであることがわかった。ER α は HCV の RNA polymerase である NS5B と相互作用しており、TAM 処理によりその相互作用が抑制された。その結果 HCV 複製複合体中の NS5B の減少が認められた。

D. 考察

1. TAM の標的分子である ER α は核内受容体であり、エストロゲンによる遺伝子発現誘導の機能を有するが HCV の遺伝子複製にはこの転写活性化能は関係しないと思われた。この機能には細胞質に存在する ER α が関与して、これが NS5B と相互作用し、複製複合体の形成に何等かの役割を果たす可能性が考えられ

た。

E. 結論

1. TAM は抗がん剤として使用されている薬剤であるが、その薬効はエストロゲンによる転写誘導の阻害を介したものである。つまりその標的は核内受容体としての ER α 活性である。HCV 遺伝子複製における ER α の機能は細胞質において HCVNS5B との相互作用を介すると考えられるため、その制御系は新たな抗 HCV 薬剤開発のための標的となる可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文

- 1) Hussein H. Aly, Koichi Watashi, Makoto Hijikata, Hiroyasu Kaneko, Yasutugu Takada, Hiroto Egawa, Shinji Uemoto, Kunitada Shimotohno: Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes . J.Hepatol. 46:26-36, 2007
- 2) Mohamed A. El-Farrash, Hussein H. Aly, Koichi Watashi, Makoto Hijikata, Hiroto Egawa, Kunitada Shimotohno: In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporine. Microbiol. Immunol. 51(1):127-133, 2007

3) Yusuke Miyanari, Kimie Atsuzawa, Nobuteru Usuda, Koichi Watashi, Takayuki Hishiki, Margarita Zayas, Ralf Bartenschlager, Takaji Wakita, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. Nat. Cell Biol. 9 (9), 1089-1097, 2007

4) Koichi Watashi, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Kaku Goto, Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno: Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptors with viral RNA polymerase NS5B. J. Biol. Chem., 282, 32765-32772, 2007

2. 学会発表

1) Hussein H. Aly, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: A novel culture system for HCV infection and replication. 14th International symposium on hepatitis C Virus & related viruses. Glasgow UK, Sept, 2007

2) Kaku Goto, Koichi Watashi, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: The emergence of a cyclophilin inhibitor-resistant HCV

variant with a mutation in NS5A. 14th International symposium on hepatitis C Virus & related viruses. Glasgow UK, Sept, 2007

3) 村上善基、土方誠、下遠野邦忠：マイクロRNAを用いた新規HCV治療法の確立

第66回日本癌学会学術総会、平成19年9月、横浜 2007

G. 知的所有権取得状況

1. 特許取得

2007年9月26日出願、“肝炎ウイルスの増殖方法、及び肝炎ウイルス感染細胞を培養するための中空糸並びにその利用” 発明者ならびに特許出願人：東洋紡績株式会社、山口達也、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人、下遠野邦忠、土方誠、出願番号：PCT/JP2007/068611

2. 実用新案登録 特になし。

3. その他 特になし。

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に関する研究

分担研究報告書（平成19年度）

RNA干渉を利用した肝疾患治療に関する基礎的検討

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 昨年度まで、インターフェロン（IFN）遺伝子治療の最適化に関する検討を行ってきた。本年度は、IFN 抵抗性の肝炎に対する治療法開発に向けた基礎情報の確立を目的に、hypoxia-inducible factor-1_α（HIF-1_α）を標的とした short-hairpin RNA（shRNA）発現ベクターを構築し、マウスを用いた腫瘍の肝転移モデルの系を用いて in vivo RNA 干渉誘導による効果を評価した。その結果、マウス肝臓において効率よく RNA干渉が誘導され、HIF-1_α 遺伝子ノックダウンにより肝臓における癌細胞の増殖が強力に抑制可能であることが明らかとなった。

A. 研究目的

IFN 抵抗性の肝炎治療法のアプローチの一つとしてRNA干渉を用いた治療法の開発を目的として、肝臓における効率的なRNA干渉誘導法の確立とその適用による治療効果について基礎的情報を得る。

B. 研究方法

shRNA発現ベクターの構築：piGENE-hU6（iGENE Therapeutics）のU6プロモーターの下流に HIF-1_α を標的とする shRNA 発現部位を組み込んだプラスミドDNA（pDNA）としてpshHIF-1_α を構築した。マウス肝転移腫瘍モデルの構築：ホタルルシフェラーゼを安定に発現するマウス結腸癌細胞株 Colon26/Luc をマウス門脈より移植することで肝転移モデルを作成した。ハイドロダイナミクス法を利用した肝臓における効率的な in vivo RNA干渉の誘導：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。本法の適用により肝臓構成細胞および肝臓に転移した癌細胞においてRNA干渉を誘導可能である。肝臓中HIF-1_α 発現の評価：肝臓中の HIF-1_α の発現は免疫染色法により評価した。肝臓中 matrix metalloproteinase-9（MMP-9）発現の評価：HIF-1_α 抑制の指標として、HIF1により転写が亢進することが報告されている MMP-9 に着目し、gelatin gel zymography により肝臓ホモジネート中のMMP-9 の発現を評価した。抗腫瘍効果の評価：肝臓ホモジネート中に検出される癌細胞由来のルシフェラーゼ活性を測定することで肝臓中の癌細胞数を計測し、pshHIF-1_α の抗腫瘍効果の指標とした。

C. 研究結果

免疫染色法を用いた検討から、門脈より Colon26/Luc 細胞を移植することで肝臓中のHIF-1_α 発現が亢進することが明らかとなった。このときの HIF-1_α の発現亢進は主に肝臓構成細胞において認められた。HIF-1 の転写産物である