

MMP-9 も、癌細胞の門脈内移植により肝臓での発現が亢進した。癌細胞移植前に pshHIF-1_α を投与する (preload model) ことで肝構成細胞に対してのみ pshHIF-1_α をデリバリーすることで、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% 程度にまで減少した。また、癌細胞移植後に pshHIF-1_α を投与する (therapeutic model) ことで、肝構成細胞および肝臓中の癌細胞に対して pshHIF-1_α をデリバリーした検討においても、癌転移により誘導される HIF-1_α および MMP-9 の発現を抑制可能であった。また、therapeutic model における癌細胞増殖抑制効果は preload model より強力であり、pshHIF-1_α を投与することで癌移植 12 日後の癌細胞数を対照群の 1% 程度にまで抑制した。

D. 考察

HIF-1_α の発現は主に低酸素によって誘導されることから、癌細胞を門脈内に移植したときに認められた肝臓中 HIF-1_α の発現上昇は、癌細胞が流入したことにより局所的に低酸素状態が誘導された可能性を示すものと考えられる。MMP-9 は HIF-1 の転写産物の一つであり、その発現亢進により基底膜や細胞外マトリックスの分解が亢進し、癌細胞浸潤が促進されることで癌転移が増悪すると報告されている。従って、HIF-1_α の発現亢進により誘導される MMP-9 の発現も癌転移を増悪させる一因と考えられる。肝臓構成細胞における HIF-1_α の発現のみを抑制した preload model の場合においても pshHIF-1_α 投与により HIF-1 依存的な転写産物である MMP-9 の発現量が減少したこと、ならびに癌転移・増殖を有意に抑制したことから、肝臓構成細胞における HIF-1_α の発現が癌転移を促進することが明らかとなった。その一方、癌細胞および肝臓構成細胞の両細胞群での HIF-1_α の発現を抑制した therapeutic model においては、preload

model よりも顕著に癌細胞増殖が抑制されたことから、肝臓に到達した癌細胞での HIF-1_α 発現も癌転移・増殖を促進することが明らかとなった。

E. 結論

HIF-1_α を標的とすることで、肝臓に転移巣を形成した癌細胞のみならず肝臓構成細胞も標的細胞となりえること、および HIF-1_α を標的とした in vivo RNA 干渉が肝臓癌転移抑制に有効であることが示された。また、ハイドロダイナミクス法を用いた in vivo RNA 干渉の誘導による、肝臓を標的とした疾患治療システムの開発の可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y; Inhibition of tumor cell growth in the liver by RNA interference-mediated suppression of HIF-1_α expression in tumor cells and hepatocytes. *Gene Ther.* 2008 in press.

2. 学会発表

- Inhibition of hepatic metastasis of colon carcinoma cells by RNA interference-mediated suppression of HIF-1_α in tumor cells and hepatocytes. Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y; American Society of Gene Therapy 10th Annual Meeting, Seattle (USA), 2007
- Deletion of CpG motifs from plasmid DNA for sustained transgene expression in vivo: evaluation based on a statistical analysis of the expression profile. Nishikawa M, Takemoto S, Yamaoka K, Mitsui M, Lee H, Takakura Y; American Society of Gene Therapy 10th Annual Meeting, Seattle (USA), 2007
- Silencing of SOCS genes in cancer cells for effective interferon cancer therapy. Takahashi Y, Nishikawa M, Kaneda H, Takasuka N, Hattori K, Takakura Y; *Pharmaceutical Sciences World*

- Congress, Amsterdam (The Netherlands), 2007
- プラスミドベクター及び投与方法の最適化によるインターフェロン遺伝子治療効果の増強、町田一哉、西川元也、光井優、高橋有己、高倉喜信、日本薬剤学会第22年会、大宮、2007年5月
 - プラスミドベクター設計による遺伝子発現の持続化とインターフェロン遺伝子治療への適用、高橋有己、光井優、西川元也、高倉喜信、第23回日本DDS学会学術集会、熊本、2007年6月
 - RNAi-mediated silencing of SOCS genes in tumor cells to improve interferon cancer therapy. 高橋有己、西川元也、高倉喜信、第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月
 - Improved anti-cancer effect of interferon- γ gene transfer by sustained expression using CpG-depleted plasmid DNA. 西川元也、高橋有己、高倉喜信、第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月
 - インターフェロン受容体を標的としたRNA干渉による導入インターフェロン遺伝子発現の持続化、高橋有己、Elin Vikman、西川元也、高倉喜信、第17回 アンチセンスシンポジウム、金沢、2007年12月
 - Increasing anticancer activity of interferon gene transfer by prolonging the duration of transgene expression. Zang L, Nishikawa M, Mitsui M, Takahashi Y, Takakura Y; Pan-Pacific International Partnership Conference on Pharmaceutical and Life Sciences (The 4th US-Japan Joint Conference), Nagoya, 2008.
 - インターフェロン遺伝子発現の持続化によるアレルギー疾患遺伝子治療効果の増強、服部香代子、西川元也、光井優、高橋有己、高倉喜信、日本薬学会第128年会、横浜、2008年3月（予定）

H. 知的所有権の取得状況

特になし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takahashi Y Nishikawa M Takakura Y	Inhibition of tumor cell growth in the liver by RNA interference-mediated suppression of HIF-1 _α expression in tumor cells and hepatocytes	Gene Ther.	In press		2008

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
分担研究報告書（平成19年度）

脂質代謝制御による抗HCV戦略の検討

主任研究者： 榎本 信幸 山梨大学医学工学総合研究部・教授

研究要旨： HCV（C型肝炎ウイルス）の細胞内増殖過程における複製複合体形成の足場として、細胞内小器官膜上の「脂質raft」、さらに粒子形成においても細胞内小器官「脂質droplet」の役割が明らかにされるなど、脂質代謝のHCV生活環における重要性が明らかにされつつある。我々は、脂質代謝制御を通じたHCV増殖制御を目的として、HCVレプリコン・システムを用い、脂質raftを構成するスフィンゴ脂質、コレステロール、飽和脂肪酸に注目し、これらの合成阻害剤であるミリオシン、スタチン、ビスホスフォネートなど等によってHCVレプリコン増殖が特異的に抑制されることを明らかとしてきた。本年度はこれらをさらに発展させ、これらの薬剤のインターフェロンを含めた相乗効果、感染粒子系である JFH システムにおける効果、また新たな薬剤として脂質吸着剤を有するサイクロデキストリンについて、抗HCV治療薬としての可能性について検討を行った。

共同研究者：前川 伸哉 山梨大学
医学部・肝疾患地域先端医療システム学 講師

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の複製は、HCV 複製複合体が、小胞体などの細胞内小器官膜における脂質構造”脂質 raft” を足場としてなされること、さらには HCV の粒子形成過程においても、細胞内小器官”脂質 droplet” が重要な役割をはたすことなどが次々と明らかとされ、HCV 増殖における脂質代謝の重要性が非常な注目を集め

ている。

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

B. 研究方法（2007年度）

スフィンゴリエリン、コレステロール合成を阻害し、抗 HCV 効果を持つ薬剤として我々が明らかにしてきたミリオシン、スタチンの HCV 増殖における相乗効果についてインターフェロンも加え、subgenomic HCV replicon を用いて検討を行った。さらにこれら薬剤の効果を完全粒子産生システムである JFH システムを用いることによって確認した。新規脂質代謝関連薬剤として、脂質を脂質膜から直接除去するサイクロデキストリン類を用い、HCV 増殖に与える影響を解析した。

C. 研究成果

(1) HCV 増殖に対する脂質代謝制御剤の相乗作用

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られた。

(2) 完全粒子産生系 JFH システムに対する脂質制御剤の効果

脂質代謝関連薬剤の抗 HCV 効果は、

主として subgenomic HCV-replicon を用いた実験によって確認していたが、これに加えて完全粒子産生系である JFH システムにおける抗 HCV 効果について検討を行った。抗ウイルス効果は、細胞内 HCV-RNA 定量、ウエスタンブロッティングによる HCV 蛋白量の変化によって検討したが、subgenomic HCV-replicon と同様に、シンバスタチン、ミリオシンによって JFH システムにおいても HCV-RNA 量、HCV コア蛋白、NS3 蛋白の減少が確認された。しかしながら、subgenomic HCV-replicon と比較すると、HCV 増殖抑制効果はやや弱く、さらにシンバスタチンとミリオシンの相乗作用も明らかではなく、この機序についてはさらなる検討が必要と考えられた。

(2) サイクロデキストリン- α 、 β 、 γ による抗 HCV 効果

サイクロデキストリンは土管状の構造を持つ分子で、内部に脂質を吸着する性質を有する。 α 、 β 、 γ に分類され、 α はスフィンゴリエリン、 β はコレステロール、 γ は両者を特異的に吸着する。これらの抗 HCV 効果について subgenomic HCV-replicon をもちいて検討したところ、3 者とも単独で有意な抗 HCV 効果を認めた。

D. 考察と結論

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が確認された。今後は、脂質代謝関連薬剤の抗ウイルス効果機序についての基礎的な検討に加え、実

際の臨床応用に向けたin vivo のシス
テムにおける検討をさらに進めていく
予定である。

E. 研究発表
論文発表

1. Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu T, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, and Miyake S.
Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. Gastroenterology in press.
- 2 Takano S, Kanai F, Jazag A, Ijichi H, Yao J, Ogawa H, Enomoto N, Omata M, Nakao A. Smad4 is essential for downregulation of E-cadherin induced by TGF- β in pancreatic cancer cell line PANC-1 J Biochem. 2007 Mar;141(3):345-51.
3. Tasaka M, Sakamoto N, Itakura Y, Nakagawa M, Itusi 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 Dec;88(Pt 12):3323-33.
4. Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Satoh K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Cheng-Hsin C, 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 Gastroenterol Hepatol. 2007 Aug 7; [Epub ahead of print]
5. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa N, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, 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 Feb 5;371(1):71-85.
6. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui S, Takano S, Yamaguchi T, Itakura T, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita S, Sakamoto N, Itoh M, Enomoto N. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C. J Infect Dis. 2008 Feb 1;197(3):361-70.
7. Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S,

Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N,
and Ito M Griseofulvin, an oral
antifungal agent, suppresses HCV
replication in vitro. Hepatol. Res.
2008; in press.

学会発表

1. Maekawa S, Amemiya F, Takano S,
Matsu A, Kanayama A, Miyazaki C,
Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M,
Okada H, Enomoto N. Molecular
evolution of hepatitis C virus in a
patient with liver transplantation.
International Symposium on
Hepatitis C Virus and Related
Viruses (14th Annual Meeting)
September 9-13, 2006; Glasgow
(Scotland).

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他

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）
分担研究報告書（平成19年度）

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

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：ヒト肝細胞を移植したキメラマウスを用いて、HCV の新規受容体候補分子の感染阻害活性を評価した。まず、ウイルスの摂取量における、マウスの体重変化、血中アルブミン量、感染価を測定し、キメラマウスの HCV 感受性を検討した。高力価のウイルス接種群では死亡率が高く、ウイルスの増殖も観察されなかったが、低力価接種群では経時的にウイルス増殖が観察された。ヒト繊維芽細胞成長因子受容体の可溶化蛋白質により、HCV の感染が阻害される傾向が観察された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)に感染すると、高率に慢性化し、肝炎、肝硬変、肝癌へと進行する。ペグ化インターフェロン(IFN)とヌクレオチド誘導体であるリバビリンの併用療法によってC型肝炎の治療効果は飛躍的に向上したものの、すでに世界で約2億人、国内でも200万人ものHCV感染者が存在している。HCVの感染はヒトとチンパンジーに局限されており、ウイルスの感染を許容できる実験小動物はこれまでのところ存在しない。近年、特殊なクローンでHCVの感染や複製を*in vitro*で評価できる系が開発されたものの、*in vivo*での評価は病原性を含めて明らかにされていない。

本研究は、ヒト肝細胞を移植したキメラマウスを用いて、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。

B. 研究方法

それぞれ 10^3 、 10^4 、 10^5 HCVRNA コピー数の

HCV が存在するヒト血清を、3週齢のヒト肝細胞移植キメラマウスに眼窩静脈叢から接種した。経時的に最長2週間まで血液を採取し、体重、血中ヒトアルブミン濃度(6 mg/ml 以上をヒト肝細胞移植キメラマウスと判定)およびHCVRNA コピー数を測定した。 10^3 コピー数のHCV感染ヒト血清とヒト繊維芽細胞成長因子受容体(hFGFR)5のFcキメラ可溶化蛋白質(hFGFR5/Fc)、およびコントロールとしてhFGFR1のFcキメラ可溶化蛋白質(hFGFR1/Fc)をあらかじめ*in vitro*で反応させ、さらにこれらの可溶化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。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントを必要とする材料は含まれない。

C. 研究結果

キメラマウスへのウイルス接種実験では、 10^3 HCVRNA 接種群では生存率や体重増加、アルブミンの産生も正常であったのに対し、 10^4 および 10^5 接種群では、各3匹中それぞれ1匹が早期に死亡し、生存個体の体重増加が滞り、アルブミンの産生量も減少した。これに伴い、ウイルスの増殖性も 10^3 接種群ではHCVRNA コピー数が経時的に増加傾向を示したが、 10^4 と 10^5 接種群では接種後のウイルス増殖性がほとんど見られなかった。次に、FGFR5/FcあるいはFGFR1/Fcをあらかじめキメラマウスに投与し、さらに *in vitro* でこれらの精製標品と前処理した 10^3 RNA コピーのHCVを接種して、経時的なウイルスの残存率を調べた。FGFR5/Fc 処置群では3匹中、2匹が早期に死亡した。残った1匹についてウイルスの残存率を調べたところ、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。

D. 考察

キメラマウスは適正なウイルス量を接種することで、経時的にウイルスの感染、増殖が観察されることが確認された。しかしながら、感染価が高いとウイルスによるものか血清成分によるものか不明であるが、マウスへの生存率の低下傾向が示された。さらに、ウイルス接種量が多い群では生存個体においてもアルブミン量の低下が見られているため、肝細胞にも何らかの影響が出ているものと思われる。

FGFR5/Fc 処理のウイルス接種群で、生存率に影響が見られた。これはFGFR5/Fcを独自に発現精製したのに対し、FGFR1/Fcは購

入サンプルであったために、精製純度の低さによる毒性が考えられる。今後、蛋白標品の精製度を上げると共に、精製標品の毒性試験も検討しなければならない。さらに、HCVの感染レセプターとして有力視されているヒトCD81の可溶化蛋白質の活性評価も必要と思われる。ウイルス感受性がキメラマウス個体間でかなりばらつくことから、再度、個体数を増やして再度検証する必要がある。

E. 結論

キメラマウスを用いてHCVの増殖性が観察できた。さらに新規HCV受容体候補分子を用いてウイルスの増殖を阻害する傾向も観察された。しかしながら、個体間でのばらつきも大きく、今後さらに個体数を増やして再検討する必要があると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y. Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. PNAS, 2007, 104, 1661-1666.
- 2 Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y. Hepatitis C Virus

- Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. *J. Virol.*, 2007, 81, 8953-8966.
- 3 Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells. *J. Virol.*, 2007, 81, 8477-8487.
- 4 Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.*, 2007, 81, 8601-8612.
- 5 Yamamoto M., Uematsu S., Okamoto T., Matsuura Y., Sato S., Kumar H., Satoh T., Saitoh T., Takeda K., Ishii K. J., Takeuchi O., Kawai T., and Akira S. Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.*, 2007, 204, 2233-2239.
- 6 Moriishi K., and Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev. Med. Virol.*, 2007, 17, 343-354.
2. 学会発表
- 1 Shuhei Tagawa, Toru Okamoto, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with HCV NS5A and regulates HCV replication. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, September 9-13, 2007.
- 2 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Xiaoyu Wen, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Enhancement of IP-10 expression via TLR signaling pathway in cells expressing HCV proteins. 同上。
- 3 Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Eiko Matsuo, Kensuke Suzuki, Itsuki Hamamoto, Tetsuo Yamashita, Kohji Moriishi, Kazuhito Fujiyama, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Ania Owsianka, Arvind H. Patel, Michael A. Whitt, and Yoshiharu Matsuura: Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding HCV envelope proteins. 同上。
- 4 Yoshio Mori, Kiyoko Okamoto, Toru Okamoto, Yasumasa Komoda, Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Intramembrane processing by SPP regulates membrane localization of HCV core protein and viral propagation. 同上。
- 5 Toru Okamoto, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: FKBP8 Plays a Crucial Role in the Replication of Hepatitis C Virus, HEP DART 2007, Hawaii, 9-13 December, 2007.
- 6 森石恆司、森屋恭爾、村田茂穂、田中啓二、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治: HCV コア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞

- 癌発症における PA28 γ の役割:第 43 回日本 肝臓学会総会ワークショップ、東京、5 月 31 日-6 月 1 日, 2007.
- 7 田鍬修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスゲノム複製に關与する宿主蛋白質 B-ind1 の機能解析: 第 55 回日本ウイルス学会総会、札幌、10 月 21 日-23 日, 2007.
- 8 阿部隆之、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治: C 型肝炎ウイルスによる TLR シグナル伝達経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上。
- 9 谷 英樹、菰田泰正、鈴木健介、山下哲生、稲田大彦、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: シュードタイプと組換え水疱性口内炎ウイルスを用いた C 型肝炎ウイルスの感染機構の解析、同上。
- 10 岡本 徹、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスゲノム複製における FKBP8 の役割、同上。
- 11 森 嘉生、岡本貴世子、岡本 徹、菰田泰正、鈴木哲朗、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼによるプロセッシングの生物学的意義、同上。
- 12 山下哲生、森 嘉生、森石恆司、李 天成、宮村達男、武田直和、月原富武、吉村政人、松浦善治: E 型肝炎ウイルス様粒子の結晶化と X 線結晶構造解析、同上。
- H. 知的所有権の出願・登録状況特になし。

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）
（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

分担研究者 高橋 祥一 自然科学研究支援開発センター 助教

研究要旨: Genotype 1b型の急性重症C型肝炎患者の血清よりHCV全長(HCV KT9)をクローニングした。このHCV KT9はコア領域のaa 70およびaa 91にそれぞれR70QおよびL91Mのアミノ酸変異を認めた。一方、NS5AのISDR領域には変異を認めなかった。このクローンのコア領域のaa 70およびaa 91を野生型にもどしたクローンおよびISDR領域に4カ所または9カ所のアミノ酸変異を挿入したクローンを作製し、ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓内に投与し、HCV感染を惹起した。コアの変異型と野生型ではHCV感染成立は同程度であったのに対し、ISDR領域の変異数が多くなるにしたがい、感染成立率は低下した。これらの結果から、ISDR領域はIFNの感受性のみならず、感染性にも関与していることが示唆された。

A. 研究目的

近年、C型肝炎ウイルス(HCV)のコア領域70および91番目のアミノ酸変異とインターフェロン(IFN)療法の治療成績の関係が報告されている。すなわちこれらの領域のアミノ酸変異がある症例は野生型の症例に比べ、IFN抵抗性であると考えられている。これらの原因が、ウイルスそのもののIFN感受性の違いなのか、または変異ウイルスによる肝臓への何らかの影響のためであるのかは明らかでない。今回われわれはこれらの原因を解明するため、種々の変異を挿入したgenotype 1bのHCVクローンを用いて、種々の変異HCV感染マウスを作製し、それぞれのIFN感受性を検討した。

B. 研究方法

Genotype 1b型の急性重症C型肝炎患者の血清よりHCV全長(HCV KT9)をクローニングした。このHCV KT9はコア領域のaa 70およびaa 91にそれぞれR70QおよびL91Mのアミノ酸変異を認めた。一方、NS5AのISDR領域には変異を認めなかった(KT9-Core mutant-ISDR 0)。このクローンのISDR領域に4カ所(KT9-Core mutant-ISDR 4)または9カ所(KT9-Core mutant-ISDR 9)のアミノ酸変異を挿入したクローン、およびコア領域のaa 70およびaa 91のアミノ酸変異を野生型のもどしたクローン(KT9-Core wild-ISDR 0)、さらにISDR領域に4カ所(KT9-Core wild-ISDR

4) または9カ所 (KT9-Core wild-ISDR 9) のアミノ酸変異を挿入した6種類のクローンを作製した。全長cDNAを挿入した plasmid より、in vitro transcription法によりRNAを合成し、30 ugのRNAをヒト肝細胞キメラマウスの肝臓内に直接注入した。注入後、2週おきにマウス血清を採取し、real-time PCRにより、血中HCV RNAを定量した。

C. 結果

各クローンにより、マウスへの感染成立 (real-time PCR にて定量可能) 率に違いを認めた。感染成立率は、KT9-Core mutant-ISDR 0 では80% (12頭/15頭) であったのに対し、KT9-Core mutant-ISDR 4 では10% (1頭/10頭) ($p=0.001$)、KT9-Core mutant-ISDR 9 では0% (0頭/2頭) と ISDR 領域に変異が多くなるほど低下した。一方、KT9-Core wild-ISDR 0 での感染成立率は70% (7頭/10頭) と KT9-Core wild-ISDR 0 と同程度であったが ($p=0.653$)、KT9-Core wild-ISDR 4 では20% (1頭/5頭)、KT9-Core wild-ISDR 9 では70% (0頭/4頭) と ISDR に変異が多くなるほど低下した。

D. 考察

ISDR 領域のアミノ酸配列は IFN 療

法の治療効果と関与していると考えられており、変異数が多いほど、IFN 感受性であることが報告されている。今回のわれわれの結果は、ISDR 領域の変異が多いほど、HCV の感染成立率が低下する、というものであった。これらの原因として、HCV 感染によって引き起こされる生体の自然免疫と ISDR 領域のアミノ酸配列が関与していることも可能性として考えられる。

E. 結論

ISDR領域の変異が多いほど、マウスへのHCV感染成立率が低下した。原因の解明のためには、HCV RNA投与後のマウス肝細胞内でのIFNシグナル伝達の違いを検討する必要がある。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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.

- Chen H, Takahashi S, Imamura M, Okutani E, Zhang ZG, Chayama K, Chen BA. Earthworm fibrinolytic enzyme: anti-tumor activity on human hepatoma cells in vitro and in vivo. *Chin Med J*. 2007;120:898-904.
 - 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;581:1983-7.
 - Hatakeyama T, Noguchi C, Hiraga N, Mori 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 the YMDD mutant in patients treated with lamivudine. *Hepatology* 2007;45:1179-86.
 - Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Yatsuji H, Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Chayama K. Dual effect of APOBEC3G on Hepatitis B virus. *J Gen Virol*. 2007;88:432-40.
 - 高橋祥一 茶山一彰 薬の知識 バラクルード 0.5mg錠 (エンテカビル) 臨床消化器内科 2007 22 (1) : 134-136
 - 高橋祥一 茶山一彰 B型肝炎の最新治療 抗HBV療法—薬剤の選択と使用法 エンテカビル消化器の臨床 2007 10 (2) : 170-175
 - 高橋祥一 茶山一彰 消化器薬の使い方Update 消化器疾患の薬物治療 B型肝炎 *Medicina* 2007 44(9): 1707-1709
 - 高橋祥一 茶山一彰 注目される感染症：診断と治療の進歩 IV. 性感染症 2. B型肝炎 *日本内科学会雑誌* 2007 96(1): 68-73
 - 高橋祥一 茶山一彰 C型肝炎治療の進歩 *総合臨床* 2007 56(11): 3099-3100.
2. 学会発表
- Shoichi Takahashi, Kiminori Uka, Daiki Miki, Michio Imamura, Hiroshi Aikata, Yoshiiku Kawakami, Kazuaki Chayama Hideki Ohdan, Hirotaka Tashiro, Toshimasa

- Asahara. Relationship between platelet cell counts and IFN treatment on liver transplant patients with HCV. Asia-Pacific Association for the Study of the Liver Diseases (APASL), Kyoto, March 27-30, 2007.
- Shoichi Takahashi, Akira Hiramatsu, Hiroshi Aikata, Takahiro Azakami, Tomokazu Kawaoka, Kiminori Uka, Hiromi Saneto, Shintaro Takaki, Soo Cheol Jeong, Michio Imamura, Yoshiiku Kawakami, Kazuaki Chayama. Etiology and outcome of fulminant hepatic failure: Retrospective analysis of 50 patients treated in a single center. The 6th JSH Single Topic Conference. Iwate, Sep. 28-29, 2007.
 - Tomokazu Kawaoka, Hiroshi Aikata, Shoichi Takahashi, Kazuaki Chayama. Efficacy of Positron Emission Tomography CT for metastatic hepatocellular carcinomas. The 58th annual meeting of the American association for the liver diseases. Boston. Nov. 2-6, 2007.
 - 高橋祥一, 阿座上隆広, 片村嘉男. 河岡友和, 木村俊之, 宇賀公宣, 三木大樹, 高木慎太郎, 柘植雅貴, 平賀伸彦, 森 奈美, 山科敬太郎, 児玉英章, 平松 憲, 丁 守哲, 今村道雄, 川上由育, 相方 浩, 茶山一彰 当院における HIV/HCV 重複感染の現況. 第 43 回日本肝臓学会総会 東京 平成 19 年 5 月 31 日-6 月 1 日.
 - 高橋祥一, 河岡友和, 相方 浩, 茶山一彰, 大段秀樹, 田代裕尊, 板本敏行, 浅原利正. C型肝硬変肝移植後のインターフェロン療法の現況. 第 25 回日本肝移植研究会. 東京. 平成 19 年 7 月 5-6 日.
 - 高橋祥一 茶山一彰 浅原利正 当院の生体肝移植における内科・外科の連携の現況 第 11 回日本肝臓学会大会 神戸 平成 19 年 10 月 18-19 日
 - 高橋祥一, 河岡友和, 相方 浩, 茶山一彰, 大段秀樹, 田代裕尊, 板本敏行, 浅原利正 C型肝硬変肝移植後の抗ウイルス療法の現況と問題点 第 37 回日本肝臓学会西部会長崎 平成 19 年 12 月 7-8 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
今回の研究内容については特になし。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Utoh R, Chayama K, at al	Hepatitis B Virus- Infectibility of Chimeric Mice with Liver Repopulated by Serially Subcultured Human Hepatocytes	Hepatology			In press
Uka K, Chayama K, at al	Pretreatment predictor of response, time to progression, and survival to intraarterial 5- fluorouracil/interferon combination therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma	J Gastroenter ol	42	845-853	2007
Yatsuji H, Chayama K, at al	Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant	J Med Virol	79	1811- 1817	2007
Uka K, Chayama K, at al	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	27	1209- 1216	2007
Tashiro H, Chayama K, at al	Complications after Duct- to-duct Biliary Reconstruction in Living- donor Liver Transplantation: Causes and Treatment	World J Surg	31	2222- 2229	2007
Jeong SC, Chayama K, at al	Effects of a 24-week course of interferon-alpha therapy after curative treatment of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma	World J Gastroenter ol	13	5343- 5350	2007

Jeong SC, Chayama K, at al	Low-dose intermittent interferon-alpha therapy for HCV-related liver cirrhosis after curative treatment of hepatocellular carcinoma	World J Gastroenterol	13	5188-5195	2007
Hiraga N, Chayama K, at al	The long-term outcome of patients with bleeding gastric varices after balloon-occluded retrograde transvenous obliteration	J Gastroenterol	42	663-672	2007
Hatakeyama T, Chayama K, at al	Serum HBV-RNA is a Predictor of Early Emergence of YMDD Mutant in Patients Treated with Lamivudine	Hepatology	45	1179-1186	2007
Noguchi C, Chayama K, at al	Dual effect of APOBEC3G on Hepatitis B virus. J Gen Virol	J Gen Virol	88	432-440	2007
Uka K, Chayama K, at al	Clinical features and prognosis of patients with extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma	World J Gastroenterol	21	414-420	2007
Hiraga M, Chayama K, at al	Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon	FEBS Letts	581	1983-1987	2007
Yatsuji H, Chayama K, at al	Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant	J Med Virol	79	1811-1817	2007
Ohishi W, Chayama K, at al	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	7	1-9	2007
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

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 cyclosporin	Microbiol. Immunol.	51(1)	127-133	2007
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
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
Takano S, Kanai F, Jazag A, Ijichi H, Yao J, Ogawa H, Enomoto N, Omata M, Nakao A.	Smad4 is essential for downregulation of E-cadherin induced by TGF- β in pancreatic cancer cell line PANC-1	J Biochem	Mar;141(3)	345-51	2007
Tasaka M, Sakamoto N, Itakura Y, Nakagawa M, Itusi 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	Dec;88(Pt 12)	3323-33	2007
Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Satoh K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Cheng-Hsin C, 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 Gastroenterol Hepatol	[Epub ahead of print]		2007

Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa N, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, 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	Feb 5:371(1):	71-85	2008
Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui S, Takano S, Yamaguchi T, Itakura T, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita S, Sakamoto N, Itoh M, Enomoto N.	Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C	J Infect Dis	Feb 1:197(3)	361-70	2008
Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu T, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, and Miyake S.	Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response	Gastroenter ology	In press		2008
Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N, and Ito M.	Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses HCV replication in vitro	Hepatol Res	in press		2008
Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y.	Critical role of PA28_ in hepatitis C virus- associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis	PNAS	104	1661- 1666	2007
Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y	Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88- Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines	J. Virol	81	8953- 8966	2007