

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

##### (1) HCV 感染キメラマウス肝臓のプロテオーム解析

キメラマウスの肝臓のヒト置換領域からタンパク質を分離し 2 次元泳動することにより、キメラマウス肝臓におけるヒト肝細胞タンパク質のプロファイリングに成功した。とくに 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候補を複数見いだすことに成功した。これらの変化を更に解析することによって、タンパク質レベルにおける IFN 作用機序の解明への糸口となることが示唆された。

##### (2) 肝炎に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索

細胞表面へのウイルス由来タンパク質の吸着が確認された。今後、HBV Pre-S 抗原結合タンパク質の同定を進める必要があると考えられる。今回の結果から、C 型肝炎の新規薬剤標的分子候補となりえる HCV レセプター探索にもこの手法が使えることが示唆された。

#### 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

- Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K, Yokoi T. In vivo induction of human cytochrome P450 enzymes expressed in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metabolism and Disposition*. 2005;33:754 -763.
- Saito M, Kimoto M, Araki T, Shimada Y, Fujii R, Hide M, Usui T, Yoshizato K. Proteome analysis of gelatin-bound urinary proteins from patients with bladder cancers. *European Urology*.

- 2005;48:865-871.
- Nishimura M, Yokoi T, Tateno C, Kataoka M, Takahashi E, Horie T, Yoshizato K, Naito S. Induction of human CYP1A1 and CYP3A4 in primary culture of hepatocytes from chimeric mice with humanized liver. *Drug Metabol. Pharmacokin.* 2005;20:121-126.
  - Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, Noguchi C, Oga H, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Chayama K, Tateno C, Yoshizato K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse which genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology.* 2005;42:1046-1054.
  - Okumura K, Asahina K, Fujimori H, Ozeki R, Shimizu-Saito K, Tanaka Y, Teramoto K, Arii S, Takase Y, Kataoka M, Soeno Y, Tateno C, Yoshizato K, Teraoka H. Generation of hybrid hepatocytes by cell fusion from monkey embryoid body cells in the injured mouse liver. *Histochemistry and Cell Biology.* 2005;125: 247-257.
  - Katoh M, Matsui T, Okumura H, Nakajima M, Nishimura M, Naito S, Tateno C, Yoshizato K, Yokoi T. Expression of human phase II enzymes in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metabolism and Disposition.* 2005;33: 1333-1340.
  - Nishimura M, Yoshitugu H, Yokoi T, Tateno C, Kataoka M, Horie T, Yoshizato K, Naito S. Evaluation of mRNA expression of human drug-metabolizing enzymes and transporters in Chimeric mouse with humanized liver. *Xenobiotica.* 2005;35:877-890.
  - Emoto K, Tateno C, Hino H, Amano H, Imaoka Y, Asahina K, Asahara T, Yoshizato K. Efficient In Vivo Xenogeneic Retroviral Vector-Mediated Gene Transduction into Human Hepatocytes. *HUMAN GENE THERAPY.* 2005; 16:1138-1174.
  - Yamasaki C, Tateno C, Aratani A, Ohnishi C, Katayama S, Kohashi T, Hino H, Marusawa H, Asahara T, Yoshizato K. Growth and differentiation of colony-forming human hepatocytes in vitro. *J. Hepatol.* 2006;44: 749-757.
  - Aoki K, Kashiwagura Y, Horie T, Sato H, Tateno C, Ozawa N, Yoshizato K. Characterization of Humanized Liver from Chimeric Mice Using Coumarin as a Human CYP2A6 and Mouse CYP2A5 Probe. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2006;21: 277-285
  - Yoshitsugu H, Nishimura M, Tateno C, Kataoka M, Takahashi E, Soeno Y, Yoshizato K, Yokoi T, Naito S. Evaluation of Human CYP1A2 and CYP3A4 mRNA Expression in Hepatocytes from Chimeric Mice with Humanized Liver. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2006;21:465-474.
  - Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Tanaka 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 Letter.* 2006;581:1983-1987.
  - 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.
  - 吉里勝利 ヒト肝細胞キメラマウス. *化学と生物*. 2006;44:352-354.
  - 大房 健、吉里勝利. プロテオミクス研究とそれに注目した動機及びその後の発展について. *月刊細胞*. 2006;38:2-4.
  - 吉里勝利. キメラマウス. *医学のあゆみ*. 2006;218:805-807.
  - 立野知世、森川良雄、吉里勝利. ヒト肝細胞キメラマウス Chimic mice with human hepatocytes. *メディカルサイエンスダイジェスト*. 2007;33:650-651
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, <u>Yoshizato K</u> , Yokoi T.	In vivo induction of human cytochrome P450 enzymes expressed in chimeric mice with humanized liver.	Drug Metabolism and Disposition.	33	754 -763	2005
Saito M, Kimoto M, Araki T, Shimada Y, Fujii R, Hide M, Usui T, <u>Yoshizato K</u> .	Proteome analysis of gelatin-bound urinary proteins from patients with bladder cancers.	European Urology.	48	865-871	2005
Nishimura M, Yokoi T, Tateno C, Kataoka M, Takahashi E, Horie T, <u>Yoshizato K</u> , Naito S.	Induction of human CYP1A1 and CYP3A4 in primary culture of hepatocytes from chimeric mice with humanized liver.	Drug Metabol. Pharmacokin.	20	121-126	2005
Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, Noguchi C, Oga H, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Chayama K, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> .	Infection of human hepatocyte chimeric mouse which genetically engineered hepatitis B virus.	Hepatology.	42	1046-1054	2005
Okumura K, Asahina K, Fujimori H, Ozeki R, Shimizu-Saito K, Tanaka Y, Teramoto K, Arie S, Takase Y, Kataoka M, Soeno Y, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Teraoka H.	Generation of hybrid hepatocytes by cell fusion from monkey embryoid body cells in the injured mouse liver.	Histochemistry and Cell Biology.	125	247-257	2005
Katoh M, Matsui T, Okumura H, Nakajima M, Nishimura M, Naito S, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Yokoi T.	Expression of human phase II enzymes in chimeric mice with humanized liver.	Drug Metabolism and Disposition.	33	1333-1340	2005

Nishimura M, Yoshitugu H, Yokoi T, Tateno C, Kataoka M, Horie T, <u>Yoshizato K</u> , Naito S.	Evaluation of mRNA expression of human drug-metabolizing enzymes and transporters in Chimeric mouse with humanized liver.	Xenobiotica.	35	877-890	2005
Emoto K, Tateno C, Hino H, Amano H, Imaoka Y, Asahina K, Asahara T, <u>Yoshizato K</u> .	Efficient In Vivo Xenogeneic Retroviral Vector-Mediated Gene Transduction into Human Hepatocytes.	HUMAN GENE THERAPY.	16	1138-1174	2005
Yamasaki C, Tateno C, Aratani A, Ohnishi C, Katayama S, Kohashi T, Hino H, Marusawa H, Asahara T, <u>Yoshizato K</u> .	Growth and differentiation of colony-forming human hepatocytes in vitro.	J. Hepatol.	44	749-757	2006
Aoki K, Kashiwagura Y, Horie T, Sato H, Tateno C, Ozawa N, <u>Yoshizato K</u> .	Characterization of Humanized Liver from Chimeric Mice Using Coumarin as a Human CYP2A6 and Mouse CYP2A5 Probe.	Drug Metab. Pharmacokinetics.	21	277-285	2006
Yoshitsugu H, Nishimura M, Tateno C, Kataoka M, Takahashi E, Soeno Y, Yoshizato K, Yokoi T, Naito S.	Evaluation of Human CYP1A2 and CYP3A4 mRNA Expression in Hepatocytes from Chimeric Mice with Humanized Liver.	Drug Metab. Pharmacokinetics.	21	465-474	2006
Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Tanaka S, Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , 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 Letter.	581	1983-1987	2006
Gerashchenko B I, Yamagata A, Oofusa K, <u>Yoshizato K</u> , de Toledo S M, Howell R W.	Proteome analysis of proliferative response of bystander cells adjacent to cells exposed to ionizing radiation.	Proteomics.	7	2000-8	2007

Katoh M, Sawada T, Soeno Y, Nakajima M, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Yokoi T.	In vivo drug metabolism model for human cytochrome P450 enzyme using chimeric mice with humanized liver.	J Pharm Sci.	96	428-37	2007
Okumura H, Katoh M, Sawada T, Nakajima M, Soeno Y, Yabuuchi H, Ikeda T, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Yokoi T.	Humanization of excretory pathway in chimeric mice with humanized liver.	Toxicol Sci.	97	533 -8	2007
Shoda J, Okada K, Inada Y, Kusama H, Utsunomiya H, Oda K, Yokoi T, <u>Yoshizato K</u> , Suzuki H.	Bezafibrate induces multidrug-resistance P-Glycoprotein 3 expression in cultured human hepatocytes and humanized livers of chimeric mice.	Hepatol Res.	37	548-56	2007
Masumoto N, Tateno C, Tachibana A, Utoh R, Morikawa Y, Shimada T, Momisako H, Itamoto T, Asahara T, <u>Yoshizato K</u> .	GH enhances proliferation of human hepatocytes grafted into immunodeficient mice with damaged liver.	J Endocrinol.	194	529-37	2007
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, <u>Yoshizato K</u> , Tamiya E, Sugiyama T, Muraguchi A.	Single lymphocyte analysis with a microwell array chip.	Cytometry Part A.	71A	1003 -1010	2007
Utoh R, Tateno C, Yamasaki C, Hiraga N, Kataoka M, Shimada T, Cyayama K, <u>Yoshizato K</u> .	Susceptibility of Chimeric Mice with Livers Repopulated by Serially Subcultured Human Hepatocytes to Hepatitis B Virus.	Hepatplogy			in press.
<u>吉里勝利</u>	ヒト肝細胞キメラマウス.	化学と生物.	44	352-354	2006
大房 健、 <u>吉里勝利</u> .	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.	月刊細胞.	38	2-4	2006
<u>吉里勝利</u> .	キメラマウス.	医学のあゆみ.	218	805-807	2006
立野知世、森川良雄、 <u>吉里勝利</u> .	ヒト肝細胞キメラマウス Chimric mice with human hepatocytes.	メディカルサイエンスダイジェスト.	33	650-651.	2007

厚生労働科学研究費補助金

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17～19年度）

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： キメラマウスを用いることによってヒト肝細胞内での HCV 感染・複製機構の研究が可能になった。今回、Hutchinson strain (H77)から得られた感染クローン及び患者血清由来 HCV をキメラマウスに感染させ肝組織遺伝子発現プロファイルを検討した。感染クローンおよび患者血清により HCV の感染成立が認められ、HCV 感染キメラマウスでは IFN シグナルの活性化が顕著であり、ウイルス感染状態を強く反映していた。一方、C型慢性肝炎症例の肝組織では加えて線維化、アポトーシス誘導シグナルの活性化が認められ、免疫応答を主体とした肝炎状態を反映していた。興味深いことに外来 IFN 投与に伴う IFN 誘導遺伝子の発現誘導は HCV 感染キメラマウスでは非感染マウスに比し有意に抑制され、HCV による IFN 誘導シグナルの抑制機構の存在が示唆された。

感染キメラマウス肝組織の遺伝子発現では Type1-IFN 誘導遺伝子の発現亢進が認められ、感染モデルとして今後、極めて有用と考えられた。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

C型肝炎ウイルス(HCV)の感染モデルは限られており、唯一チンパンジーを用いた感染実験が行われているのみである。キメラマウスを用いることによってヒト肝組織内での HCV の感染・複製機構の研究が可能

になると同時に、感染に伴う宿主側の遺伝子発現変化も検討することが可能である。

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)。本研究班では患者血清や感染クローンを用い、キメラマウスに HCV を感染させ、肝組織における遺伝子発現変化を網羅的に解析し、HCV の複製・慢性化に伴う宿主側の変化とその機構を解明することを目的とした。

## B. 研究方法

Hutchinson strain (H77) から得られた感染クローン pCV-H77 (Yanagi et al, 1997) から合成 RNA を作成し、6 匹のキメラマウスのヒト肝組織生着部に注入した。経時的にマウスの血清を採取し HCV-RNA をリアルタイム PCR (RTD-PCR) を用いて測定し感染の成立を確認した (図 1)。また感染成立後マウスの肝臓を採取し、HCV 感染に伴う遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイを用いて解析した。肝組織より RNA を抽出し、

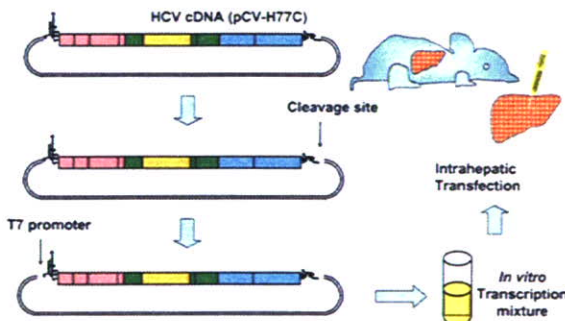
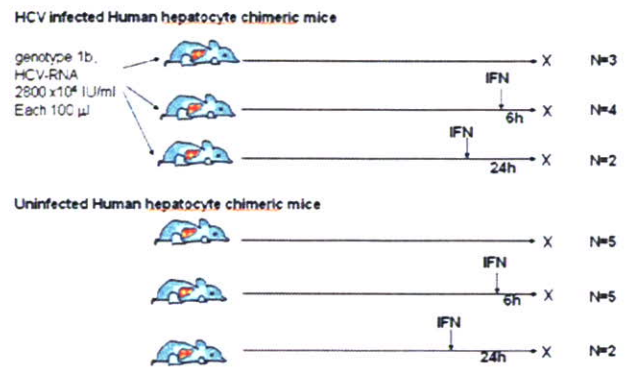


図1. HCV感染クローン: 試験管内HCV RNA合成と肝内接種

アンチセンス RNA 増幅法にて1回増幅後、ヒト正常肝組織由来 RNA を Cy3(reference), HCV 感染肝組織を Cy5(test) でラベルし、約 1 万の cDNA クローンより成る cDNA マイクロアレイを用いて解析した。解析に用いた cDNA マイクロアレイは 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クローンよりなり、肝疾患を解析するのに適している。これまでに B 型慢性肝炎、C 型慢性肝炎、肝細胞癌症例の肝組織における遺伝子発現解析を行い報告してきた (Honda et al. 2005)。

また、C 型慢性肝炎 (CH-C) 患者血清

(Genotype 1b 2800 K IU/ml)  $100 \mu\text{l}$  を 9 匹のキメラマウスに感染させ (図 2)、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 2)。



(図 2)

## C. 研究結果

Hutchinson strain (H77) 感染クローン RNA 注入 6 匹中 5 匹において 2 週より血清中の HCV-RNA が陽性となった。4 週後では一匹が死亡したが、他の 4 匹でいずれも HCV-RNA が 2 週後より更に増加し、HCV の感染成立が確認された。6 週後に更に一匹が死亡したため、3 匹において肝臓を採取し解析に用いた (図 3, 4)。

HCV-RNA			
Mouse No.	2w	4w	6w
1	$2.1 \times 10^5$	$2.0 \times 10^6$	death
2	$6.0 \times 10^6$	$2.1 \times 10^7$	analysis
3	$1.9 \times 10^6$	$3.4 \times 10^6$	analysis
4	$1.8 \times 10^5$	death	
5	death		
6	$1.3 \times 10^5$	$4.0 \times 10^6$	analysis

HCV感染クローン(H77)のキメラマウスへの感染

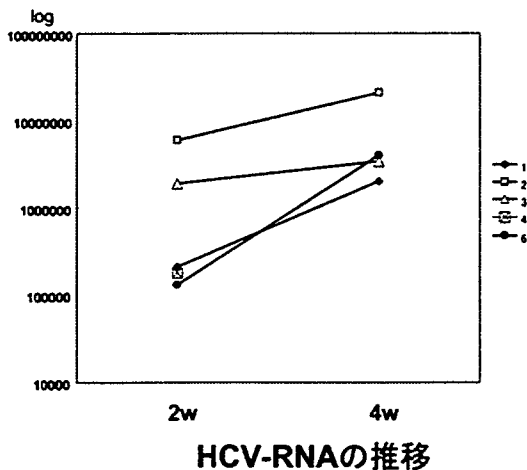
(図 3)



pCV-H77 感染肝細胞では Interferon (gamma)-induced cell line (IP-10), Interferon alpha-inducible protein 27, Interferon alpha-inducible protein (clone IFI-15K), Myxovirus (influenza virus) resistance 1 など Type I-インターフェロン誘導遺伝子の発現亢進が認められた。一方、患者血清由来 HCV 感染マウスでも、非感染マウスと比較し有意 ( $p < 0.05$ ) に発現誘導する遺伝子 216 個、発現低下する遺伝子 178 個を認めた。発現誘導遺伝子群のパスウェイ解析では 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。

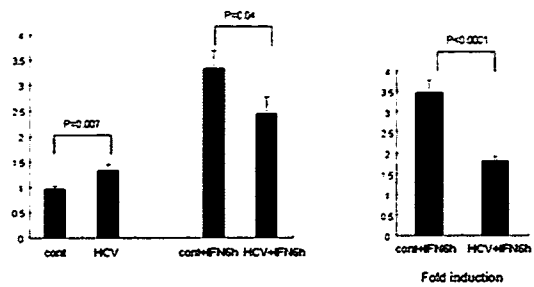
HCV 感染キメラマウス肝組織の遺伝子発現プロファイルを C 型慢性肝炎 (CH-C) 症例の肝組織発現プロファイルと比較した。CH-C 症例では IFN シグナルの活性化加えて線維化、アポトーシス誘導シグナルの活性化が認められ、免疫応答を主体とした肝炎状態を反映していた。

外来性の 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 4)

### IFN誘導遺伝子の発現変動(キメラマウス)



(IFN誘導遺伝子:  $p < 0.05$ , 80個)

(図 5)

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(図 5)。

### C. 考察

Hutchinson strain (H77)感染クローンおよび患者血清由来 HCV の感染キメラマウス、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。また実際の CH-C 症例の遺伝子発現プロファイルとの比較ではキメラマウスではケモカイン、JAK-STAT パスウェイの亢進が認められ、CH-C 症例では細胞接着因子、アポトーシスに関する遺伝子発現の亢進が認められた。

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。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今後詳細に検討する必要があると考えられる。

### 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. 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

12. Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S, Murakami S. Effect of Hepatitis C Virus (HCV) NS5B-Nucleolin Interaction on HCV Replication with HCV Subgenomic Replicon. *J Virol.* 2006 Apr;80(7):3332-40.

13. Yamashita T, Arai K, Sakai A, Mizukoshi E, Sakai Y, Kagaya T, Nakamoto Y, Honda M, Wada T, Yokoyama H, Kaneko S. Virological effects and safety of combined double filtration plasmapheresis (DFPP) and interferon therapy in patients with chronic hepatitis C: A preliminary study. *Hepatol Res.* 2006 Nov;36(3):167-75. Epub 2006 Sep 7.

14. Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Kaneko S. Different signaling pathways in the livers of patients with chronic hepatitis B or chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2006 Nov;44(5):1122-38.

15. 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.

16. Sunagozaka H, Tsuji H, Mizukoshi E, Arai K, Kagaya T, Yamashita T, Sakai A, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S.

The development and clinical features of splenic aneurysm associated with liver cirrhosis.

*Liver Int.* 2006 Apr;26(3):291-7.

D. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

別紙参照

G. 財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金

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17～19年度）

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、これらを用いて新規抗 HCV 薬開発のための標的分子を見出すことを目指した。本来の HCV 感染標的組織である肝臓の細胞と同じ特性をもつ培養肝細胞を樹立するため、ヒト初代培養肝細胞にパピローマウイルスの E6/E7 分子を導入し、不死化することを試みたところ、初代培養肝細胞と各種遺伝子発現様式が類似している不死化肝細胞クローンを得る事に成功した。この細胞には患者血清中の HCV が比較的高い効率で感染した。自然免疫、特に IRF7 の活性を抑制することで HCV の感染増殖が著しく亢進することから、さらなる自然免疫機構の改変により血清由来 HCV の感染増殖効率の高い培養細胞系への改良が期待された。これらの研究と平行して、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スクリーニングした。今回新たに TGF-beta とタモキシフェンがその複製活性を抑制し、MAP キナーゼシグナル阻害剤である PD98059 は逆に活性化することを見出した。これらのうちタモキシフェンはその標的分子である核内受容体エストロゲン受容体(ER $\alpha$ )の機能抑制を介したゲノム複製阻害効果であることがわかった。ER $\alpha$ は核内受容体としての機能ではなく、細胞質において HCV の RNA ポリメラーゼである NS5B との相互作用によって HCV のゲノム複製複合体形成に関与する可能性が考えられたため、この機能を抑制する新たな抗 HCV 薬剤開発のための標的分子となりうることが考えられた。

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. 本来の HCV 感染標的組織である肝臓の細胞と同じ特性をもつ培養肝細胞を樹立するため、ヒト初代培養肝細胞に各種がん関連遺伝子を導入し、不死化することを試みた。得られた不死化肝細胞の自然免疫機構関連分子の発現を修飾し、血清由来 HCV の感染増殖効率の上昇を試みた。またこの細胞を用いてキメラマウスの作成を試みた。
2. 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を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の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

ヒト初代培養肝細胞作成は、京都大学附属病院移植外科においておこな

われた先天性代謝異常症患者への生体肝臓移植において切除された患者肝臓組織を用いておこなった。この研究はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認されたものである。肝臓提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

## C. 研究結果

1. これまで初代培養肝細胞の不死化にはサルウイルスの一種 SV40 の Large T 抗原 (LT) が用いられてきた。しかしながら、LT は染色体変異を誘導することが知られているため、不死化した細胞の性質が安定しないことが問題となっていた。そこで LT に代わる不死化誘導分子としてパピローマウイルスの E6/E7 分子を用いて肝細胞の不死化を試みた。その結果、遺伝子発現パターンが現在までのところ初代培養肝細胞と類似している不死化肝細胞クローンを得る事に成功した。またこの細胞には患者血清中の HCV が感染し、増殖することが確認された。

ドミナントネガティブ体の発現、あるいは siRNA の発現によって自然免疫系因子の中で IRF7 の抑制を

おこなうと血清由来 HCV の感染増殖が著しく亢進することがわかった。

この細胞を用いてキメラマウスの作成を試みたが最終的な生着とマウス肝細胞との置換は観察されなかった。

2. 2 レプリコン細胞の中に存在する HCV 遺伝子複製複合体を精製しその構成因子をプロテオーム解析により明らかにする研究をおこなったが、複製複合体の精製には成功しておらずこの方法による複製複合体構成因子の検出はまだなされていない。そこでこれと同時に種々の薬剤でレプリコン細胞を処理することで、これまで HCV 部分ゲノム複製を抑制する薬剤のスクリーニングをおこなった。そして新たに TGF- $\beta$  とタモキシフェン (TAM) を同定し、また複製を活性化する薬剤として MAP キナーゼシグナル阻害剤である PD98059 を見出した。それぞれの薬効機構の解析を進めたが、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 $\alpha$ ) を介したものであることがわかった。ER $\alpha$  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. パピローマウイルス E6/E7 分子によって新たに樹立した不死化肝細胞は現時点まで比較的安定した肝細胞様形質を示している。この細胞は血清由来 HCV 感染増殖の高効率化のための標準細胞となる可能性があり、この細胞の自然免疫機構を修飾することによってさらに HCV 感染増殖効率の高い培養細胞を開発することが可能であると考えられた。ただし、現時点ではキメラマウス作成にはこの細胞利用できなかったため、この細胞の改変も含めてこれとは異なる不死化細胞の樹立が必要であると考えられた。
2. TGF- $\beta$  による HCV 遺伝子複製阻害効果は細胞増殖の抑制と関連しているように思えたが、その詳細は不明である。PD98059 はおそらく翻訳制御と関連することが示唆されたが、やはりその詳細を明らかにするまでには至らなかった。TAM の標的分子である ER $\alpha$  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 $\alpha$  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。この

#### E. 結論

1. 現時点まで初代肝細胞に近い形質を維持しており、患者血清中のHCVが感染増殖することが可能な不死化肝細胞クローンを樹立した。
2. TGF- $\beta$ およびPD98059のHCV遺伝子複製への影響はそのメカニズムの詳細が不明な点が多く、新たな抗HCV薬の標的を見出すまでには至らなかった。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 $\alpha$ 活性である。HCV遺伝子複製におけるER $\alpha$ 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) Takayuki Murata, Takayuki Ohshima, Masashi Yamaji, Masahiro Hosaka, Yusuke Miyanari, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta, *Virology* 331(2): 407-417, 2005

- 2) Hitoshi Takahashi, Masashi Yamaji, Masahiro Hosaka, Hiroe Kishine, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: Analysis of the 5' end structure of HCV subgenomic RNA replicated in a Huh7 cell line, *Intervirology*, 48(2-3): 104-111, 2005

- 3) Koichi Watashi, Naoto Ishii, Makoto Hijikata, Daisuke Inoue, Takayuki Murata, Yusuke Miyanari, Kunitada Shimotohno: Cyclophilin B is functional regulator of Hepatitis C virus RNA polymerase, *Mol. Cell.* 19(1): 111-122. 2005

- 4) Takayuki Murata, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: Enhancement of internal ribosome entry site-mediated translation and replication of hepatitis C virus by PD98059. *Virology*. 340, 105-115, 2005

- 5) Naoto Ishii, Koichi Watashi, Takayuki Hishiki, Kaku Goto, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Takaji Wakita, Nobuyuki Kato, Kunitada Shimotohno: Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J. Virol.* 80: 4510-4520, 2006

- 6) Kaku Goto, Koichi Watashi, Takayuki Murata, Takayuki Hishiki, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem.*



Biophys. Res. Commun. 343:879-884, 2006

- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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) Koichi Watashi, Naoto Ishii, Makoto Hijikata, Daisuke Inoue, Takayuki Murata, Yusuke Miyanari, Kunitada Shimotohno: Association of cyclophilin B with NS5B regulates HCV genome replication, 12th International symposium on hepatitis C virus and related viruses October, 2005, Montreal, Canada
- 2) Takayuki Murata, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: Enhancement of IRES-mediated translation and replication of HCV by PD98059. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2005, Montreal, Canada
- 3) Watashi K., Ishii N., Hijikata M., Inoue D., Goto K., Kunitada Shimotohno: Anti-hepatitis C virus effect of cyclosporine A reveals the functional regulation of RNA polymerase by cyclophilin B • 20th IUBMB International congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress • Kyoto, Japan • June, 2006
- 4) Yusuke Miyanari, Nobuteru Usuda, Kimie Atsuzawa, Koichi Watashi, Takaji Wakita, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: The analysis of HCV proteins around the

lipid droplet-associated membrane in HCV producing cells.

The 13th International meeting on hepatitis C virus and related viruses (Cairns, Australia) Aug., 2006

5) Ali H. Hussein, Koichi Watashi, Makoto Hijikata, Hiroyasu Kaneko, Yasutugu Takada, Hiroto Egawa, Shinji Uemoto, Kunitada Shimotohno:

Establishment of efficient serum-derived hepatitis C virus infectivity in innate immune response-suppressed human primary hepatocytes.

The 13th International meeting on hepatitis C virus and related viruses (Cairns, Australia) Aug., 2006

6) Kaku Goto, Koichi Watashi, Takayuki Murata, Takayuki Hishiki, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno:

Evaluation of the anti-HCV effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporine A, and NIM811.

The 13th International meeting on hepatitis C virus and related viruses (Cairns, Australia) Aug., 2006

7) Koichi Watashi, Naoto Ishii, Kaku Goto, Makoto Hijikata, Takaji Wakita, Nobuyuki Kato, Kunitada Shimotohno:

Cyclophilin B, a cellular cofactor for HCV replication, determines the diverse anti-HCV efficacy of cyclosporine A among strains.

The 13th International meeting on

hepatitis C virus and related viruses (Cairns, Australia) Aug., 2006

8) 後藤覚、渡士幸一、土方誠、下遠野邦忠、シクロフィリン阻害剤のC型肝炎ウイルス複製阻害とその薬剤耐性ウイルス株樹立

第54回日本ウイルス学会学術集会、平成18年11月、名古屋

9) 渡士幸一、後藤覚、土方誠、下遠野邦忠、抗C型肝炎ウイルス化合物をバイオプローブに用いたシクロフィリン阻害剤のC型肝炎ウイルス複製阻害とその薬剤耐性ウイルス株樹立

第54回日本ウイルス学会学術集会、平成18年11月、名古屋

10) 渡士幸一、後藤覚、土方誠、脇田隆字、加藤宣之、下遠野邦忠 シクロフィリン阻害剤によるC型肝炎ウイルス複製の抑制、第65回日本癌学会学術総会、平成18年9月、横浜

11) 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

12) 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

13) 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。

## 厚生労働科学研究費補助金

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17～19年度）

### マウスモデルによる新規薬剤の薬効、ドラッグデリバリーの効率の検定システムの 確立

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** C型肝炎治療を目的としたインターフェロン (IFN) 遺伝子治療およびIFN抵抗性の肝炎に対する治療戦略としての *in vivo* RNA 干渉誘導法の開発に向けた基礎情報の確立を目的に、マウスモデルを用いて核酸医薬品のデリバリーシステムの効率を検討した。まず、IFN 遺伝子デリバリーの最適化を実現するため、プラスミドDNA (pDNA) に含まれるCpG配列数を削減した新規IFN発現プラスミドベクターを構築した。マウスを用いた *in vivo* 遺伝子導入実験の結果、本ベクター投与により肝臓で発現させた IFN 遺伝子の発現が持続化し、長時間に渡り血中IFNレベルが有意に上昇することにより、高い IFN の効果が得られることが明らかとなった。さらに、hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) を標的とした short-hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターを構築し、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 $\alpha$ 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

HCV 感染による肝炎治療に応用可能なIFN 遺伝子デリバリーの最適化を実現するため、遺伝子発現の持続化に影響することが考えられる pDNA に含まれる CpG 配列数を低減させた新規ベクターを構築する。また、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

##### 1. IFN 遺伝子デリバリーの最適化

pDNAの構築：CMVプロモータを有する pcDNA3 (Invitrogen) を、CpG配列を多く含むプラスミドDNA (pDNA) として選択し、マウスIFN  $\beta$  の cDNA をそれぞれ組み込んだ pCMV-Mu $\beta$  を作製した。CpG 配列数を低減させた pGZB (米国Genzyme社 Dr. Yewより供

与)をもとに同様に pGZB-Mu $\beta$  を作製した。IFN $\gamma$  発現ベクターに関しても、pCMV-Mu $\gamma$  及び pGZB-Mu $\gamma$  を作製した。また、CpG 配列が全くない pCpG-mcs をもとに pCpG-Mu $\gamma$  を構築した。各pDNA中の CpG 配列は、pCMV-Mu $\beta$ 、pCMV-Mu $\gamma$  で686個、696個であるのに対し、pGZB-Mu $\beta$  及び pGZB-Mu $\gamma$  では116個、112個と、約 80 % の低減化が実現された。さらに pCpG-Mu $\gamma$  では IFN $\gamma$  cDNA 中の 20個だけと3%以下であった。pDNAの静脈内急速投与実験：pDNA のマウスへの投与は、naked pDNA をマウスの体重の約 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肝臓において高い遺伝子発現が得られるハイドロダイナミクス法を用いた。血清サンプルをマウス尾静脈より採取し、血清中 IFN 濃度を測定した。IFN  $\beta$  は抗ウイルス活性を利用したバイオアッセイにより、IFN $\gamma$  は

ELISA法により定量した。結腸癌細胞肺転移抑制：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 を尾静脈内に移植することで実験的肺転移モデルマウスを作成した。移植4日後に各 IFN $\gamma$  発現プラスミドを2 pmol/head の投与量でハイドロダイナミクス法を用いて担癌マウスに投与した。移植17日目にマウス肺を摘出し、肺中ルシフェラーゼ活性を指標に癌細胞転移・増殖を評価した。

## 2. In vivo RNA 干渉の誘導

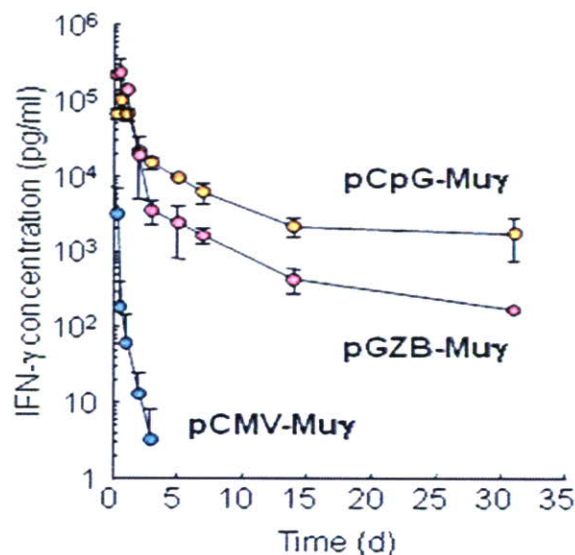
shRNA発現ベクターの構築： piGENE-hU6 (iGENE Therapeutics) のU6プロモーターの下流に HIF-1 $\alpha$ を標的とする shRNA 発現部位を組み込んだpDNAとしてpshHIF-1 $\alpha$ を構築した。ハイドロダイナミクス法を用いて、マウスにpDNAを投与した。本法の適用により肝臓構成細胞および肝臓に転移した癌細胞においてRNA干渉を誘導可能である。マウス肝転移腫瘍モデルの構築：ホタルルシフェラーゼを安定に発現するマウス結腸癌細胞株 Colon26/Luc をマウス門脈より移植することで肝転移モデルを作成した。肝臓中 HIF-1 $\alpha$  発現の評価：肝臓中の HIF-1 $\alpha$  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 $\alpha$ 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 $\alpha$ の抗腫瘍効果の指標とした。

## C. 研究結果

### 1. IFN 遺伝子デリバリー最適化

pCMV-Mu $\beta$ を投与した後の血清中 IFN $\beta$ 活性を経時的に測定したところ、投与後6時間で最大となり、その後24時間後までに急速に消失した。一方、pGZB-Mu $\beta$ を投与した場合、24時間後でも血清中のIFN $\beta$ 活性は高レベルであり、48時間程度まで維持された。ファーマコキネティック解析の結果、血中濃度-時間曲線下面積 AUC は約 14 倍、

平均滞留時間MRTは約2倍になることが示された。IFN $\gamma$  発現 pDNA を用いて検討を行った場合も同様の結果が得られたが、AUCは約60倍、MRTは約4倍となりIFN $\beta$ に比較してより顕著に遺伝子発現が増大、持続化することが示された。さらに、pCpG-Muyの場合には血中 IFN $\gamma$  濃度に持続化傾向が認められ、pCMV-Muyと比較して12倍以上のMRTが得られた。肺への癌細胞転移は、IFN $\gamma$  発現pDNAの投与により顕著に抑制され、その抑制効果には血中 IFN $\gamma$  濃度の持続と正の相関が認められた。



### 2. In vivo RNA 干渉の誘導

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 $\alpha$ 発現が亢進することが明らかとなった。このときのHIF-1 $\alpha$ 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 $\alpha$ を投与する (preload model) ことで肝構成細胞に対してのみpshHIF-1 $\alpha$ をデリバリーすることで、HIF-1 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ およびMMP-9の発現を抑制可能であった。また、therapeutic modelにおけ