

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

IFN 遺伝子治療の最適化を実現するための新規ベクターの開発に際して、遺伝子発現の調節に深く関与している CpG 配列に着目した。CpG 配列はバクテリア由来の DNA である pDNA 中に高頻度に存在する配列であり、その大部分は哺乳類の DNA の場合と異なりメチル化されていない状態で存在している。一方、哺乳類の DNA 中では CpG 配列の頻度はかなり抑制されており、その大半はメチル化されている。その差異によりプラスミド DNA は哺乳類体内に投与されると異物として認識され、TNF- α の産生などの炎症性応答が誘導される。また、CpG 配列がメチル化を受けることで遺伝子発現が抑制されることも考えられる。そこで本研究では、CpG 配列を低減させたベクターに IFN 遺伝子を組み込んだ pDNA を新たに構築し、従来型ベクターに比較して持続的かつ高レベルの IFN 遺伝子の発現が得られることが示され、治療効果の改善に繋がる可能性が示された。

一方、in vivo RNA 干渉の標的として選択した 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

CpG 配列数を低減させた新規 IFN 発現ベクターを開発した。検討の結果、マウス肝臓で発現させた IFN 遺伝子の発現が持続化し、長期間に渡り血中 IFN レベルが有意に上昇することが明らかとなり、治療効果の改善に繋がる可能性が示された。また、HIF-1 α を標的とした shRNA 発現ベクターを開発し、マウス肝臓において RNA 干渉が誘導可能であることを明らかにした。以上の結果より、確立した核酸医薬品のデリバリーシステムが肝臓を標的とした疾患治療システムとして有用であることが示された。

F. 学会発表

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshinaga T, Yasuda K, Ogawa Y, Nishikawa M, Takakura Y; DNA and its cationic lipid complexes induce CpG motif-dependent activation of murine dendritic cells. *Immunology*, 2007;120 (3):295-302.
2. Kawano H, Nishikawa M, Mitsui M, Takahashi Y, Hattori K, Yamaoka K, Watanabe Y, Takakura Y; Improved anti-cancer effect of interferon gene transfer by sustained expression using CpG-reduced plasmid DNA. *Int. J. Cancer*. 2007; 121 (2):401-6.
3. 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

1. CpG配列削減プラスミド DNA を用いたインターフェロン遺伝子発現の持続化による抗腫瘍効果の増強、西川元也、高橋有己、高倉喜信、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月
2. Takahashi Y, Kaneda H, Nishikawa M, Takakura Y; Enhancement of antitumor activity of interferons by RNAi-mediated silencing of suppressors of cytokines signaling in tumor cells. American Society of Gene Therapy 9th Annual Meeting, Baltimore (USA), 2006
3. CpG配列削減によるインターフェロン遺伝子発現の持続化による癌遺伝子治療効果の増強、光井優、西川元也、河野博樹、高橋有己、山岡清、渡部好彦、高倉喜信、日本薬学会第126年会、仙台、2006年3月
4. プラスミドDNAのCpG配列削減による持続的遺伝子発現、光井優、西川元也、高橋有己、吉田寛幸、高倉喜信、第2回創剤フォーラム若手発表討論会、京都、2006年10月
5. RNA 干渉を利用した低酸素誘導性転写因子 HIF-1 α の抑制による肝転移抑制、高橋有己、西川元也、高倉喜信、第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、2006 年 9 月
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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.
15. 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)

厚生労働省科学研究費補助金

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）

脂質代謝制御による抗 HCV 戦略の検討

分担研究者： 榎本 信幸 山梨大学医学工学総合研究部・教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の複製は、細胞内における小胞体などのオルガネラ脂質膜上において、HCV複製複合体が形成されて行われるものと考えられる。近年、オルガネラ脂質膜構造は均一でなく、特定の脂質成分が「脂質raft」と呼ばれる機能ドメインを形成し、細胞内におけるウイルス複製複合体の足場として重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。本研究において、我々はこの脂質raftに注目し、これを構成するスフィンゴ脂質、コレステロール、飽和脂肪酸等の合成阻害を通じてHCV増殖制御を行うことを目的として、HCV培養細胞系を用い、これらの合成阻害剤のHCV増殖に対する効果の検討を行った。その結果、スフィンゴ脂質阻害剤ミリオン、コレステロール阻害剤シンバスタチン、ビスフォスフォネート等がHCV増殖を特異的に抑制することを、subgenomic HCV-replicon、さらに完全ウイルス粒子系であるJFH1システムにおいて明らかにした。またこれらは、単独のみでなく、既知の抗HCV薬であるインターフェロンを含めて、併用することによって相乗効果が認められることも明らかとし、実際の臨床の場における抗HCV治療薬としての脂質代謝薬剤の可能性を示した。

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

はなく、スフィンゴミエリン、コレステロールおよび飽和脂肪酸が”脂質raft”と呼ばれる機能ドメインを形成し、この脂質raftがオルガネラ脂質膜上においてHCV複製複合体を形成する足場として働く可能性が近年、次第に明らかとされてきた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の複製は小胞体(ER)等のオルガネラ脂質膜上において、HCV蛋白と宿主蛋白から成る複製複合体の形成を通じて行われるものと考えられ、HCVレプリコン増殖細胞においては複製複合体と考えられる構造物“membranous web”が観察される。一方、オルガネラ脂質膜構造は均一で

我々は脂質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、飽和脂肪酸に着目、これらの合成を阻害して脂質raftの形成を抑制することによって、HCVの細胞内増殖を抑制できるのではないかと考えた。

そこで本研究において、我々は、これらの脂質合成阻害剤の抗 HCV 増殖効果について検討を行い、実際にこれらの薬剤によって特異的に HCV 増殖は抑制されることを HCV 培養細胞系によって明らかとし、脂質代謝制御による HCV 治療の可能性を示した。

B. 研究方法

(2005年度)

スフィンゴミエリン、コレステロール、飽和脂肪酸の合成を各々阻害するミリオシン、シンバスタチン、不飽和脂肪酸を用いて、HCV 増殖に対する影響を subgenomic HCV replicon 用いて解析した。

(2006年度)

コレステロール合成経路である Mevalonate pathway 下流のファルネシル酸シンテターゼに対して強い阻害効果をもつビスフォスフォネートに注目し、抗 HCV 活性について機序を含めて検討した。

(2007年度)

抗 HCV 効果を持つ脂質代謝制御薬について subgenomic HCV replicon のみならず、完全粒子産生系である JFH1 システムを用いて解析した。さらにこれら薬剤の併用効果について検討した。

C. 研究成果

(1) ミリオシン、シンバスタチン、不飽和脂肪酸は HCV 増殖を制御する

スフィンゴミエリン合成経路におけるセリンパルミチルトランスフェラーゼの阻害剤ミリオシンによって、HCV 増殖は特異的に抑制されることを示した。

同様にコレステロール合成経路である Mevalonate pathway における HMG-CoA 還元酵素阻害剤シンバスタチンによっても、HCV 増殖は特異的に抑制されることを示した。さらに HCV replicon の不飽和脂肪酸であるアラキドン酸によっても HCV 増殖が抑制されることを示した。

(2) ファルネシル酸シンテターゼ阻害薬は HCV 増殖を制御する。

Mevalonate pathway における、HMG-CoA 還元酵素のさらに下流のファルネシル酸シンテターゼに対して強い阻害効果をもつビスフォスフォネート製剤 Risedronate、Alendronat、Zoledronic acid が、スタチンを遙かに凌ぐ著明な抗 HCV 効果を持つこと (selectivity index 300~400) を示した。さらに HCV 増殖抑制の機序として、ゲラニルゲラニル化阻害が重要であることを明らかにした。

(3) 脂質代謝制御剤の抗 HCV 相乗効果

脂質代謝阻害剤をインターフェロンと同時投与した場合の、抗 HCV 相乗効果について isobologram を用いて検討した。ミリオシンとシンバスタチンのいずれかとインターフェロンを用いた場合において、さらにミリオシンとシンバスタチンとの併用においても相乗効果を認めること明らかにした。

(4) 完全粒子産生系 JFH システムに対する脂質制御剤の効果

subgenomic HCV-replicon のみでなく、完全粒子産生系である JFH システムを用いて、脂質代謝関連薬剤の抗 HCV 効

果をさらに確認した。

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. Chen CH, Nagayama K, Enomoto N, Miyasaka Y, Kurosaki M, Sakamoto N, Maekawa S, Kakinuma S, Ikeda T, Izumi N, Sato C, Watanabe M. Enhancement of mitochondrial gene expression in the liver of primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 2005 Jan;31(1):24-30.
2. Tanabe Y, Nagayama K, Enomoto N, Izumi N, Tazawa J, Kurosaki M, Sakamoto N, Sato C, Watanabe M. Characteristic sequence changes of hepatitis C virus genotype 2b associated with sustained biochemical response to IFN therapy. *J Viral Hepat.* 2005 May;12(3):251-61.
3. Nakagawa M, Sakamoto N, Tanabe Y, Koyama T, Itsu Y, Takeda Y, Chen C-H, Kakinuma S, Oooka S, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M.

Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin A is mediated by blockade of cyclophilins *Gastroenterology.* 2005 Sep;129(3):1031-41.

4. Hamano K, Sakamoto N, Enomoto N, Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Ueda E, Tanabe Y, Maekawa S, Itakura J, Watanabe H, Kakinuma S, Watanabe M. Mutations in the NS5B region of the hepatitis C virus genome correlate with clinical outcomes of interferon-alpha plus ribavirin combination therapy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Sep;20(9):1401-9.
5. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2005 Oct;42(4):962-73.
6. Nakanishi H, Kurosaki M, Asahina Y, Onuki Y, Ueda K, Nishimura Y, Tsuchiya K, Kitamura T, Uchihara M, Miyake S, Enomoto N, Izumi N. Polymerase domain B mutation is associated with hepatitis relapse during long-term

- lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *Intervirol.* 2005 Nov-Dec;48(6):381-8.
7. Asahina, Izumi N, Enomoto N, Uchihara M, Kurosaki M, Onuki Y, Nishimura Y, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Kitamura T, Miyake S. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2005 Oct;43(4):623-9.
 8. Maekawa S, Enomoto N. Genetic changes in the interferon sensitivity-determining region of hepatitis C virus (HCV) during the natural course of infection: an implication for the gene function in the role of chronic infection. *J Gastroenterol.* 2005 Jan;40(1):113-5.
 9. Itakura J, Nagayama K, Enomoto N, Hamano K, Sakamoto N, Fanning LJ, Kenny-Walsh E, Shanahan F, Wanatabe M. Viral load change and sequential evolution of entire hepatitis C virus genome in Irish recipients of single source-contaminated anti-D immunoglobulin. *J Viral Hepatitis* 2005 Nov;12(6):594-603.
 10. Yamashiro T, Sakamoto N, Kurosaki M, Kanazawa N, Tanabe Y, Nakagawa M, Chen CH, Itsui Y, Koyama T, Takeda Y, Maekawa S, Enomoto N, Sakugawa H, Watanabe M. Negative regulation of intracellular hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 3. *J Gastroenterol.* 2006 Aug;41(8):750-7.
 11. Itsui Y, Sakamoto N, Kurosaki M, Kanazawa N, Tanabe Y, Koyama T, Takeda Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Sekine Y, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. *J Viral Hepat.* 2006 Oct;13(10):690-700.
 12. Kohashi T, Maekawa S, Sakamoto N, Kurosaki M, Watanabe H, Tanabe Y, Chen CH, Kanazawa N, Nakagawa M, Kakinuma S, Yamashiro T, Itsui Y, Koyama T, Enomoto N, Watanabe M. Site-specific mutation of the interferon sensitivity-determining region (ISDR) modulates hepatitis C virus replication. *J Viral Hepat.* 2006 Sep;13(9):582-90.
 13. Hosogaya S, Ozaki Y, Enomoto N, Akahane Y. Analysis of prognostic factors in therapeutic responses to interferon in patients with chronic hepatitis C. *Transl Res.*

- 2006 Aug;148(2):79-86.
14. 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.
 - 15 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.
 16. Tasaka M, Sakamoto N, 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 Dec;88(Pt 12):3323-33.
 17. 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]
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Itakura J, Yamauchi K, Minoru Sakamoto M, Saito H, Okada H, Sakamoto N, Enomoto N. Inhibition of sphingolipid synthesis attenuates HCV replication in vitro. International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (12th Annual Meeting) October 2-6, 2005; Montreal (Canada).
 2. Maekawa S, Amemiya F, Itakura Y, Itakura J, Sakamoto M, Saitoh H, Okada S, Yamauchi K, Kanayama A, Sakamoto N, Enomoto N. Identification of viral elements determining hepatitis C virus replication by homologous recombination of the viral genome. International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (12th Annual Meeting) October 2-6, 2005; Montreal (Canada).
 3. Amemiya F, Maekawa S, Kanayama A, Itakura Y, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Okada H, Enomoto N. Inhibition of sphingolipid synthesis attenuates HCV replication in vitro. International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (13th Annual Meeting) August 27-31, 2006; Cairns (Australia).
 4. Maekawa S, Itakura Y, Amemiya F, Kanayama A, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Sakamoto N, Enomoto N. HCV modulates RIG-I signaling pathway differently dependent on HCV isolates. International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (13th Annual Meeting) August 27-31, 2006; Cairns (Australia).
 5. 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：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)

C型肝炎ウイルスの感染機構

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：CHO 細胞と 293T 細胞を用いて、C型肝炎ウイルス (HCV) のエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプの水疱性口内炎ウイルス (VSV)、HCVpv/CHO と HCVpv/293T をそれぞれ作製した。HCVpv/CHO は hFGFR5 依存的に HepG2 細胞に高い感染性を示したのに対し、HCVpv/293T は hCD81 依存的に Huh7 細胞に高い感染性を示した。また、慢性 C型肝炎患者血清中には HCVpv/293T に対する高い中和抗体が高率に検出されたのに対し、HCVpv/CHO に対する中和抗体価は低かった。HCV のエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換え VSV (HCVrv) を作製し、その感染様式を解析した。293T や Huh7 細胞で作製した HCVrv は、Huh7 細胞に最も高い感染性を示し、抗 hCD81 抗体や C型肝炎患者血清で感染が中和された。ヒト肝細胞を移植したキメラマウスを用いて、ヒト繊維芽細胞増殖因子受容体 (hFGFR) 5 の感染阻害活性を評価した。可溶性 hFGFR5 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

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限局されており、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 HCV の宿主細胞への侵入メカニズムを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) これまでは、CHO 細胞に発現させた HCV のキメラエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプウイルスを用いて、HCV の感染機構の解析を進めてきた。今回新たに、遺伝子型の異なる HCV のエンベロープ蛋白質をポリプロテインの形で

発現させた CHO 細胞と 293T 細胞を用いて、シュードタイプウイルス (HCVpv) を作製した。

2) HCV エンベロープ遺伝子を、VSV のエンベロープ遺伝子の代わりに組み込んだ HCVrv を各種動物細胞で作製し、その性状ならびに、感染様式を解析した。

3) 10^3 コピー数の HCV 感染ヒト血清と hFGFR5 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。

(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

1) HCV の受容体候補分子である hCD81 を全く発現していない HepG2 細胞に HCVpv/CHO が感受性を

示すことから、HCV の感染に hCD81 以外の細胞表面因子の関与が示唆された。HCVpv/CHO の感染はヒト繊維芽細胞成長因子 (hFGF)、特に FGF2 と FGF7 によって阻害され、可溶化型の hFGFR5 が HCVpv/CHO の感染性を特異的に阻害した。また、hFGFR5 を恒常的に発現する CHO 細胞株は HCVpv/CHO の感染を許容できるようになり、siRNA によって hFGFR5 を HepG2 細胞からノックダウンさせると感受性の低下が観察されたことから、hFGFR5 が HCVpv/CHO の新規受容体であることが示唆された。一方、293T 細胞で作製したシュードタイプレトロウイルスは hCD81 依存的な感染性を示し、HepG2 細胞には全く感受性を示さなかった。そこで、HCV のエンベロープ蛋白質を発現させた 293T 細胞を用いて、HCVpv/293T を作製した。HCVpv/CHO は hFGFR5 依存的に HepG2 細胞に高い感染性を示したのに対し、HCVpv/293T は hCD81 依存的に Huh7 細胞に高い感染性を示した。また、慢性 C 型肝炎患者血清中には HCVpv/293T に対する高い中和抗体が高率に検出されたのに対し、HCVpv/CHO に対する中和抗体価は低かった。患者血清中に存在する天然の HCV 粒子も、HCVpv と同様に HepG2 細胞と Huh7 細胞に結合した。HCV 粒子の HepG2 細胞への結合は可溶型 hFGFR5 や抗 hFGFR5 抗体で、また、Huh7 細胞への結合は抗 hCD81 抗体によって阻害された。

2) HCVrv は HCVpv と同様に、293T や Huh7 細胞で作製すると感染性を示すウイルスが得られ、これらのウイルスは Huh7 細胞に最も高い感染性を示した。また、293T や Huh7 細胞で作製した HCVrv は、HCVpv と同様に、抗 hCD81 抗体や C 型肝炎患者血清で中和された。さらに、新たに樹立した JFH-1 株の増殖効率の良い Huh7 細胞では、HCVrv の感染の拡大が観察された。

3) 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、hFGFR5/Fc あるいは hFGFR1/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。hFGFR5/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 hFGFR1/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

1) hFGFR5 は HCV の新しい受容体候補分子であることが示された。293T 細胞で作製した HCVpv はレトロウイルスで作製したシュードタイプと同様に hCD81 依存的な感染指向性を示し、CHO 細胞で作製すると hFGFR5 依存的に感染することが示された。また、C 型肝炎患者血清中にも同様な親和性を示す HCV 粒子が存在することが示された。

2) 今回作製した組換え VSV は、これまでのシュードタイプウイルスや JFH-1 ウイルスと同様に、hCD81 依存的な感染性を示した。また、一部の Huh7 細胞株では、HCVrv によって発現された HCV エンベロープ蛋白質を利用して、感染を拡大していることが確認された。自立増殖可能な組換え VSV を用いることにより、各種遺伝子型の HCV の感染機構を詳細に解析することが可能になるものと思われる。

3) 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。hFGFR5/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 hFGFR5/Fc を独自に発現精製したのに対し、hFGFR1/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。

E. 結論

1) C 型肝炎患者の体内には hCD81-tropic と hFGFR5-tropic な HCV が産生されている可能性が示唆された。この性状の違いは、感染細胞の種

類(肝細胞、リンパ球など)に起因するのか、あるいは同一細胞における感染経過の違いによるものなのかは今のところ不明である。

hCD81-tropic なHCVは大量に産生されて、hCD81との相互作用を介して、主に免疫機構の攪乱やクリオグロブリン血症などの肝外病変の発症に関与し、hFGFR5-tropic なHCVは少量産生され、抗体に中和されずに持続感染に関与しているのかも知れない。今後、異なる細胞親和性を示すHCV粒子の産生様式と感染論学的な意義を明らかにしたい。

2) HCVのエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換えVSVを作製した。HCVrvは、Huh7細胞に高い感染性を示し、抗hCD81抗体やC型肝炎患者血清で中和された。一部のHuh7細胞株で、HCVrvの感染拡大が確認された。自立増殖可能なHCVrvは、各種遺伝子型のHCVの感染機構の解析に有用である。

3) 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., Tagawa 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.
- 7 Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y. Involvement of PA28 γ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. 2007, J. Virol., 81, 1727-1735.
- 8 Shirakura M., Murakami K., Ichimura T., Suzuki R., Shimoji T., Fukuda K., Abe K., Sato S., Fukasawa M., Yamakawa Y., Nishijima M., Moriishi K., Matsuura Y., Wakita T., Suzuki T., Howley P. M., Miyamura T., and Shoji I. The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. J. Virol., 2007, 81, 1174-1185.
- 9 Nakai K., Okamoto T., Kimura-Someya T., Ishii K., Lim C-K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T.,

- Nunberg J. H., Moriishi K., and Matsuura Y. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J. Virol.*, 2006, 80, 11265-11273.
- 10 Okamoto T., Nishimura Y., Ichimura T., Suzuki K., Miyamura T., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.*, 2006, 25, 5015-5025.
- 11 Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K. J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C.-S., Sousa C. R., Matsuura Y., Fujita T., and Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 2006, 441, 101-105.
- 12 Hamamoto I., Nishimura Y., Okamoto T., Aizaki H., Liu M., Mori Y., Abe T., Suzuki T., Lai M., Miyamura T., Moriishi K., and Matsuura Y. Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B. *J. Virol.* 2005, 79:13473-13482.
- 13 Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y., Wang JC, Engvall H, Hammar L, Xing L, and Cheng RH. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 2005, 79, 12999-13006.
- 14 Abe T, Hemmi H, Moriishi K, Tamura S, Takaku H, Akira S, and Matsuura Y. Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J. Virol.* 2005, 79, 2847-2858.
- 15 Kitagawa Y, Tani H, Linn CK, Matsunaga TM, Moriishi K, and Matsuura Y. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J. Virol.* 2005, 79, 3639-3652.
- 16 Mori Y, Okabayashi T, Yamashita T, Zhao Z, Wakita T, Yasui K, Hasebe F, Tadano M, Konishi E, Moriishi K, and Matsuura Y. Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *J. Virol.* 2005, 79, 3448-3458.
- 17 Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, Moriishi K, Iwasaki T, Mizumoto K, Matsuura Y., Miyamura T, and Suzuki T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 2005, 79, 1271-1281.
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 Toru Okamoto, Yorihiro Nishimura, Tooru Ichimura, Kensuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006.
- 7 Tetsuo Yamashita, Yoshio Mori, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tomitake Tsukihara and Yoshiharu Matsuura: Crystal Structure of Catalytic Domain of Japanese Encephalitis Virus NS3 Helicase/Nucleoside Triphosphatase at a Resolution 1.8 Å 同上。
- 8 Toru Okamoto, Yorihiro Nishimura, Tooru Ichimura, Kensuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. 13th International Meeting on HCV and Related Viruses, Cairns, August 27-31, 2006.
- 9 Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Hironobu Miyamoto, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura: Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. 同上。
- 10 Yoshio Mori, Yoshimi Tsuda, Tetsuya Yamashita, Yoshinori Tanaka, Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Biological significance of nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein. 同上。
- 11 Takayuki Abe, Shyu-hei Tagawa, Yuhki Kaname, Kohji Moriishi, Osamu Takeuchi, Kawai Taro, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Shizuo Akira, and Yoshiharu Matsuura: Modulation of Toll-like receptor signaling in immune cells by expression of hepatitis C virus non-structural proteins. 同上。
- 12 Itsuki Hamamoto, Yorihiro Nishimura, Toru Okamoto, Hideki Aizaki, Minyi Liu, Yoshio Mori, Takayuki Abe, Tetsuro Suzuki, Micheal M. C. Lai, Tatsuo Miyamura, Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura. Human VAP-B is involved in HCV replication through interaction with NS5A and NS5B. 121th International Meeting on HCV and Related Viruses, Montreal, Canada, October 2-7, 2005.
- 13 Hironobu Miyamoto, Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Tetsuro Suzuki, Kazuhiko Koike, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Involvement of PA28 γ in the development of insulin resistance in the HCV core gene transgenic mice. 同上。
- 14 Kosuke Nakai, Kohji Moriishi, Chang Kwang Lim, Toru Okamoto, Tetsuro Suzuki, Jack H. Nunberg, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Multimerization of HCV core protein is required for the interaction with the cytoplasmic region of E1 protein. 同上。
- 15 Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Tetsuo Yamashita, Kensuke Suzuki, Eiko Matsuo, Itsuki Hamamoto, Yoshimi Tsuda, Chang Kweng Lim, Kohji Moriishi, Arvind H. Patel, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Cell tropism of pseudotype VSV bearing HCV envelope proteins expressed in different cell lines. 同上。
- 16 Yasumasa Komoda, Hideki Tani, Chang Kweng Lim, Kensuke Suzuki, Eiko Matsuo, Yoshimi Tsuda, Kohji Moriishi, Arvind H. Patel, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Human fibroblast growth factor receptor 5 is a novel candidate entry receptor for HCV. 同上。
- 17 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.
- 18 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関する宿主蛋白質 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.
- 19 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。
- 20 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。
- 21 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。
- 22 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。
- 23 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。
- 24 岡本 徹、西村順裕、市村 徹、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルスの複製における FKBP8 の役割、第 54 回日本ウイルス学会総会、名古屋、平成 18 年 11 月 19-21 日。
- 25 阿部隆之、田鍬修平、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治：C 型肝炎ウイルス蛋白質による免疫細胞における自然免疫シグナルの阻害機構の解析、同上。
- 26 田鍬修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルスの複製に関する新規宿主因子の解析、同上。
- 27 森 嘉生、山下哲生、田中佳典、森石恆司、松浦善治：カテプシン L によってコア蛋白質がプロセスされない日本脳炎ウイルスの性状、同上。
- 28 津田祥美、森 嘉生、阿部隆之、山下哲生、岡本 徹、市村 徹、森石恆司、松浦善治：核小体蛋白質 B23 は日本脳炎ウイルスのコア蛋白質と結合しウイルス複製に関する、同上。
- 29 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、松尾栄子、岡本 徹、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治：HCV エンベロープ遺伝子を組み込んだ組換え VSV、同上。
- 30 山下哲生、海野英明、森 嘉生、森石恆司、月原富武、吾郷昌信、松浦善治：日本脳炎ウイルスの RNA ヘリケースドメインの X 線結晶構造解析、同上。
- 31 森石恆司、森屋恭爾、宮本大伸、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、同上。
- 32 松永朋子、谷 英樹、佐藤 薫、森石恆司、藤原晴彦、松浦善治：カイコ幼虫へ遺伝子導入可能な水疱性口内炎ウイルスベクターの開発、同上。
- 33 松浦善治、森屋恭爾、田中啓二、宮村達男、鈴木哲朗、小池和彦、森石恆司：C 型肝炎ウイルスによる脂肪肝および肝癌発症における PA28 γ の役割、第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、平成 18 年 9 月 28-30 日。
- 34 浜本いつき、岡本 徹、相崎英樹、西村順裕、森 嘉生、阿部隆之、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルスの複製における宿主因子 VAP-B の機能、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、平成 17 年 11 月 21-23 日。
- 35 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、鈴木健介、松尾栄子、浜本いつき、津田祥美、林 昌宏、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、宮村達男、松浦善治：HCV エンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプ VSV の感染機構、同上。
- 36 岡本 徹、西村順裕、市村 徹、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルス NS5A と相互作用する新しい宿主因子の同定、同上。
- 37 森 嘉生、山下哲生、森石恆司、松浦善治：日本脳炎ウイルスコア蛋白質のプロセッシング機構、同上。
- 38 宮本大伸、森石恆司、森屋恭爾、小池和彦、

鈴木哲朗、宮村達男、松浦善治：C型肝炎ウイルスコア蛋白質によるインスリン抵抗性誘発における PA28 γ の役割、同上。

- 39 岡本貴世子、森石恆司、大河内正康、武田雅俊、松浦善治：シグナルペプチドペプチダーゼによる HCV コア蛋白質のプロセシ

グとその生物学的意義、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、平成 17 年 12 月 8-11 日。

- 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

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 高橋祥一 自然科学開発支援開発センター 助教

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）に感染する小動物モデルの作製は、生体内における肝炎ウイルス増殖メカニズムの解明・新薬の開発に必須である。本研究において、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感染性HCVクローンを用いて、genotype 1aおよび2aのHCV感染マウスが作製した。さらには genotype 1b型の重症急性肝炎患者よりHCV全長をクローニングし、このクローンを用いて、genotype 1b型HCV感染マウスも作製した。これら種々の genotype 型のHCV感染マウスを用いて、genotype別のインターフェロン感受性の検討も可能であった。また、1b型HCVクローンを用いた検討では、HCVのU-stretchの長さが長いほど、HCV感染率が高いことも判明した。

A. 研究目的

C型慢性肝炎患者に対するインターフェロン（IFN）療法の治療成績は向上しつつあるも、未だ満足すべきものではない。この問題の克服のためには、どのようなウイルス側因子がIFN抵抗性と関与しているのか、その解明が必要と思われる。しかしC型肝炎ウイルス（HCV）は有効な動物モデルが確立されておらず、その基礎研究が困難である。我々は肝不全マウスおよび免疫不全マウスを交配させ作製したuPA/SCIDマウスにヒト肝細胞を移植し、マウス肝細胞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を用いて、B型（HBV）およびHCV陽性患者血清やHBVを産出する細胞培養上清を経静脈的に投与しHBVおよびHCV感染モデルマウスの作製に成功した。本研究は、HCVクローンを用いて

リバースジェネティクス法によりHCV感染マウスを作製し、ウイルス変異とIFN抵抗性を検討することを目的とする。

B. 研究方法

キメラマウスに、以下の方法により、クローンを用いてHCV genotype 1a、1bおよび2a型を感染させた。

- Genotype 1a型感染性HCVクローン pCV-H77C より *in vitro* transcription 法にてHCV RNAを合成し、マウス肝臓内に直接注入した。
- Genotype 1b型の急性重症C型肝炎患者よりHCV RNAを抽出し、クローニングにより、HCV全長sDNAを得た。この際、U-stretchが115 bpと最も長いHCV-KT9および86塩基と最も短いHCV-KT1をクローニングした。これらのcDNAを挿入した plasmid

より *in vitro* transcription 法にて HCV RNA を合成し、マウス肝臓内に直接注入した。

- Genotype 2a 型感染性 HCV クローン pJFH-1 より *in vitro* transcription 法にて HCV RNA を合成し、electroporation 法にて Huh7 細胞に transfection し、3 日後の培養上清 500 μ L をマウスに静脈内投与した。

C. 結果

HCV RNA を肝臓内注入 (genotype 1a 型) および培養上清を投与 (genotype 2a 型) したすべてのマウスにおいて、投与 2 週後、血中 HCV RNA は陽性となった。投与 6 週後、血中 HCV RNA は、 2.4×10^7 copies/mL (genotype 1a 型)、 2.5×10^5 copies/mL (genotype 2a 型) に上昇し、リバーシジェネティクス法により genotype 1a および 2a 型の HCV 感染マウスが作製された。また genotype 1b 型の HCV-KT9 を肝臓内注入により、10 頭中 8 頭 (80%) のマウスで HCV 感染が確認され、KT9 は感染性クローンであることが証明され、リバーシジェネティクス法により genotype 1b 型の HCV 感染マウスが作製された。一方、U-stretch の短い HCV-KT1 の肝臓内注入での感染成立は 7 頭中 1 頭 (14%) のみであった。さらにこれら感染マウスの血中 HCV RNA の増加は、HCV-KT9 に比べ、HCV-KT1

では明らかに緩やかであり、HCV の U-stretch が長いほど、感染、増殖に有利であることが示唆された。

これらのマウスに IFN- α を 2 週間投与したところ、血中 HCV RNA は genotype 1a 感染マウスで 0.7 log、genotype 1b 感染マウスでは 1.0 log の低下であったが、genotype 2a 感染マウスではすべて感度以下 (10^3 copies/mL) に低下した。これらの結果より、genotype 1a および 1b は 2a に比べ、IFN 抵抗性であることが確認された。

D. 考察

リバーシジェネティクス法により HCV genotype 1a、1b および 2a 型感染マウスが作製され、これらのマウスを用いて HCV genotype 間での *in vivo* における IFN 感受性の検討が可能であった。また HCV の U-stretch が長いほど、感染、増殖に有利であることが示唆された。

E. 結論

これらの手法を用いることにより、今後、種々の変異 HCV を血中に有するマウスの作製が可能であり、ウイルス変異と感染性および IFN 抵抗性のメカニズムの解明に有用であると思われる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Noguchi C, Ishino H, Tsuge M, Fujimoto Y, Imamura M, Takahashi S, Chayama K. G to A hypermutation of hepatitis B virus. *Hepatology* 2005;41:626-33.
- Tsuge M, Takaishi H, Hiraga N, 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 with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 2005;42:1046-54.
- Takahashi S, Chayama K. Integration of hepatitis B virus DNA and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20:1141-2.
- Yatsuji H, Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato K, Suzuki F, Kumada H, Chayama K. Emergence of a Novel Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus Variant with a Substitution Outside the YMDD Motif. *AMAC.* 50:3867-74, 2006.
- 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.
- 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。

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表