

200831027A

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

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた  
治療抵抗性の肝炎に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成21(2009)年3月

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

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた  
治療抵抗性の肝炎に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 21 年 (2009 年) 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究	1
茶山 一彰	
II. 分担研究報告	
1. 薬剤感受性の分子的機構解明のためのアプローチ	
ーTandem Affinity Purification(TAP)システムを用いた野生型および	
変異型 HCV core タンパク質に相互作用するタンパク質の解析ー	7
吉里 勝利	
2. HCV 及び HBV 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	10
金子 周一	
3. HCV の感染性粒子産生機構の解明とこれを標的とした抗 HCV 戦略の構築	12
土方 誠	
4. 治療最適化を目指した長期持続型インターフェロン発現ベクターの開発	15
高倉 喜信	
5. ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いたウイルス排除機構の解析	20
菅野 雅元	
6. HCV ゲノム全翻訳領域解析による薬剤感受性領域の同定	26
前川 信哉	
7. C型肝炎ウイルス感染細胞特異的な IFN の誘導によるウイルス排除	
システムの構築	29
松浦 善治	
8. クローンによる HCV 感染マウスを用いた抗ウイルス剤の検討	32
今村 道雄	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	43

## I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
平成20年度総括報告書

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

研究代表者 茶山一彰 広島大学病院 消化器・代謝内科 教授

**研究要旨：**我々は、治療抵抗性のウイルス性肝炎に対する新規治療を開発するための研究を行っている。このために、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換された、ヒト肝細胞キメラマウスに肝炎ウイルスを感染させた動物モデルを作製し、抗ウイルス作用を有する薬剤の探索、ウイルス増殖に関連するヒト遺伝子の探索を行うとともに、探索された分子の薬剤としての可能性を検証する系の開発を行っている。本マウスは、治療抵抗性のB型あるいはC型肝炎の患者血清を投与することにより、治療抵抗性の肝炎ウイルス感染モデルとして検討が可能である。さらに、我々はB型およびC型肝炎ウイルスのリバースジェネティックスの系も確立している。本研究は、これまでの研究を発展させ、クローニングした genotype 1b 型のC型肝炎ウイルス全長にインターフェロン抵抗性と考えられている core 領域のアミノ酸変異、あるいは protease inhibitor 耐性である NS3 領域のアミノ酸変異を挿入し、これらのクローンをを用いて、HCV のアミノ酸変異がウイルス感染および生体内でのウイルス増殖に及ぼす影響、さらには抗ウイルス剤の治療効果との関係を検討した。これらの系はC型肝炎ウイルスのウイルス学的解析、各種耐性ウイルスに対する治療薬の効果判定、感染の成立、予防に関する研究に有用なモデルになると考えられる。またこれらウイルス感染マウスを用いて肝組織遺伝子発現プロファイルを検討し、B型およびC型肝炎ウイルス感染に伴うマウス肝臓内の遺伝子発現は明瞭に異なっていることを明らかにした。さらにIFN投与に伴いHCV感染ではIFNシグナルが抑制されるのに対し、HBV感染ではむしろIFNシグナルがより活性化されることが認められ、両肝炎ウイルス感染下でのIFN投与に伴う細胞内シグナル伝達が異なっていることを明らかにした。さらに班員により多数の候補化合物、候補遺伝子が見いだされており、今後、さらに新規治療法の開発に向けた研究を継続していく。

**【研究分担者】**

吉里勝利 (株)フェニックスバイオ  
学術顧問  
金子周一 金沢大学大学院医学系研究科  
教授  
土方 誠 京都大学ウイルス研究所  
准教授  
高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科  
教授  
菅野雅元 広島大学大学院免疫学  
教授  
前川伸哉 山梨大学大学院消化器内科学  
講師  
松浦喜治 大阪大学微生物研究所  
教授  
今村道雄 広島大学病院消化器・代謝内科  
助教

**【班長研究協力者】**

脇田隆宇 国立感染研究所ウイルス第二部

**A. 研究目的**

我々は、肝炎ウイルスに対する新規治療の有効性を検証するモデル系として、2004年度から肝炎ウイルスが感染するマウスモデルの作製に取り組んできた。このマウスは、広島大学理学研究科において作製された、免疫不全マウスとuPAマウスを交配して得られたuPA遺伝子をホモに有するマウスにヒト肝細胞を移植したものである。既報の同様のマウスと比較して、我々のマウスは格段に高いヒト肝細胞置換率を示す。我々は、このマウスを使用し、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)の感染実験を行い、感染の成立、パッセージ、薬剤の有効性の評価が可能であることを確認してきた。さらに、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスのクローンをを用いて、リバースジェネティックスの系も構築した。本研究では、この系を用いて変異

型肝炎ウイルスの分子生物学的検討および抗ウイルス剤の感受性の検討を行った。

## B. 研究方法

Albプロモーター下にuPAを高発現し、生後、肝細胞がアポトーシスを起こす Alb-uPA Tg マウスと重症免疫不全であるSCIDマウスを交配させたuPA遺伝子がホモであるuPA-SCID マウスにヒト肝細胞を経腭的に投与し、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換された、ヒト肝細胞キメラマウスを使用した。Genotype 1b型の急性重症C型肝炎患者の血清よりクローニングしたHCVの感染性クローン(KT9)をマウスの肝臓内に直接注入し、モノクローナルなHCVに感染したマウスモデルを作成した。これらの手法を用いて種々の変異ウイルスに感染したマウスを作成し、変異ウイルスの生物学的特徴およびインターフェロン(IFN)感受性を検討した。

## C. 結果

KT9よりHCV RNAを合成し、マウス肝臓内に直接注入したところ、28頭中26頭(93%)のマウスで感染が確認され、マウス血中HCV RNAは、 $10^6$  copy/mLに上昇した。また、感染したマウスから得られたウイルスはパッセージも可能であった。さらに、このクローンのcDNAに様々な変異を導入したクローンを作製し、リバーシジェネティックスの系を構築した。金子班員および脇田班長協力者との共同研究により、以前より確立させている genotype 1aおよび2a型のHCVクローンを用いた感染マウスとインターフェロン感受性を検討したところ、genotype 1aおよび1b型のクローンが感染したマウスは genotype 2a型のクローンが感染したマウスよりもIFNの効果が不良であり、臨床的によく経験される genotype によるIFNの効果の差異が

マウス内で再現されているものと考えられた。

最近、genotype 1b型のHCV感染患者において、Coreの70番および91番のアミノ酸変異が Peg-IFN- $\alpha$ 2b+リバビリン併用療法の治療効果に関係があることが報告されている。我々も臨床例の検討から、これらの変異が IFN- $\alpha$ 2b+リバビリン併用療法においても、Peg-IFN- $\alpha$ 2b+リバビリン併用療法と同様に治療効果との間に関係があることを見いだした。われわれがクローニングした genotype 1bクローンは、Coreの70番および91番はともに変異型であり、臨床的には治療抵抗性である株であった。そこでこのクローン(Core-Mutant)のこれらのアミノ酸を野生型のアミノ酸に置換したクローン(Core-Wild)を作成し、それぞれのクローンを用いて感染実験を行った。Core-MutantおよびCore-Wildの投与による感染成立(real-time PCRにて血中HCV RNAが定量可能)率はCore mutantが93%(26頭/28頭)であったのに対して、Core wildは94%(16頭/17頭)であり同程度であった。感染が成立したマウスでの血中HCV RNAレベルも同程度であった。Core-Mutant感染マウスおよびCore-Wild感染マウスにIFN- $\alpha$ を2週間投与したところ、血中HCV RNAの低下は、 $-1.9 \log$  vs  $-1.8 \log$  (ヒト肝細胞A移植マウス)および $-0.8 \log$  vs  $-0.9 \log$  (ヒト肝細胞B移植マウス)であり、同程度のIFN感受性を示した。これらの結果は、Coreの変異の有無により、明らかなウイルス複製能やIFN単独投与に対する感受性の違いを示すものではなかった。臨床的な治療効果の違いはリバビリンによるものも一つの可能性として考えられ、今後の検討が必要と思われた。

新規治療薬の候補薬剤、あるいは候補遺伝

子として班員らにより研究が行われており、以下のような成果が報告されている。

吉里班員はCore70番および91番のアミノ酸が野生型と変異型のHCV core蛋白に対して、細胞内で相互作用するタンパク質を網羅的に解析した。レンチウイルスベクターに、野生型および変異型のHCV core配列を挿入し、得られたウイルスをHuh7細胞に感染後、lysateを回収した。Tandem Affinity Purification(TAP)Systemを用いて、streptavidin-tag(SBP)およびcalmodulin-tag(CBP)の2種類のtagを用いて発現させたHCV coreと相互作用するタンパク質の解析を実施し、複数の候補タンパク質を得た。これら候補タンパクの詳細を今後検討予定である。

金子班員はHCV及びHBV感染ヒト肝細胞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。その結果、HCV、HBV感染に伴うマウス肝臓内の遺伝子発現は明瞭に異なっており、HBV感染では*Apoptotic Signaling*, *Ras Signaling Pathway*, *p53 Signaling Pathway*の活性化が認められ、HCV感染では*Cytokines and Inflammatory Response*の活性化が認められた。さらに、IFN投与に伴いHCV感染ではIFNシグナルが抑制されるのに対し、HBV感染ではむしろIFNシグナルが増強することが認められ、両肝炎ウイルス感染下でのIFN投与に伴う細胞内シグナルが異なっていることを明らかにした。

土方班員はJFH-1を用いての感染性粒子を産生する細胞において、HCV粒子が脂肪滴からどのような経路で細胞外に輸送されるかについて種々の阻害剤を用いて検討し、ゴルジ体を介するタンパク質輸送を阻害するプレフェルジンAがその輸送に阻害的に働くことを見いだした。さらに、独自に樹立した不死化肝細胞を中空糸によって立体的に培養す

ることで種々の患者血清由来のHCVの生活環を再現する細胞培養系を開発した。

高倉班員は肝臓への遺伝子デリバリーに関する研究を行っている。本年はCpG配列を全く持たない骨格のplasmidにマウスおよびヒトIFN- $\gamma$  cDNAを組み込んだプラスミドDNA(pDNA)ベクターを設計し、長期持続型IFN- $\gamma$ 発現ベクターを開発した。発現プロファイルをマウスで評価した結果、いずれのベクターも、低いプラスミドの投与量でIFN- $\gamma$ の血中濃度を治療域に70日以上 of 長期間に渡り維持できることを示した。

管野班員はヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HCV感染により、実際に肝炎を発症するモデルの作成を試みている。これまでのチンパンジーを用いた実験により、自然免疫系、特にDCやNK細胞の活性化がHCV感染による炎症反応・宿主免疫反応に重要な役割をしている事であることを明らかにしている。これらの結果から、ヒト肝細胞キメラマウスは、SCIDマウスであることより、これを用いた肝炎発症モデルは困難であることが予想されたが、本マウスの免疫系を解析した結果、NK細胞活性が残存していることを見いだした。この結果は、今後、本マウスを用いた肝炎モデルの樹立の可能性を高めるものであると思われる。

前川班員は多数例のgenotype 1bのHCV全翻訳領域を解析することにより、Peg-IFN+リバビリン併用療法の治療効果と関連するウイルス領域を検索した。その結果、RVR群と非RVR群の違いは、ISDR-PKR-BDを含むNS5A2209-2285の77アミノ酸領域に、non EVR群と非non EVR群においては、Core70の1アミノ酸に顕著な違いが認められることを明らかにした。

松浦班員はIFNの転写因子であるIRF7のdominant-active変異体(MR3)をレプリコン細

胞や JFH1 株の感染細胞に導入するとウイルスゲノムの複製が抑制されることを見いだした。また、HCV のプロテアーゼ認識配列と小胞体残留シグナル配列を付加したキメラ MR3 (cMR3) は、HCV プロテアーゼの発現により活性化され、感染細胞でのみ IFN を誘導できることを示した。さらに、cMR3 の発現プラスミドを HCV 感染キメラマウスの尾静脈から投与し、ウイルス価の減少が認められることを見いだした。

今村班員は Genotype 1b クローンの NS3 領域の protease inhibitor 耐性変異を組み込み、合成した RNA をマウス肝臓内に直接注入し、変異ウイルスを感染させた。耐性ウイルスは野生型に比べ生体内において複製効率が低下していること、クローン感染マウスからも薬剤耐性株が出現することを明らかにした。さらにこのリバーシジェネティクスの系を改良し、変異株の薬剤耐性能の検討が可能なシステムを開発した。

#### D. 考察

構築したリバーシジェネティクスの系を用いて、生体内における変異型ウイルスの分子生物学的検討および抗ウイルス剤の治療効果の検討が可能となった。また、班員らの研究により発見された多くの候補薬、候補遺伝子が実際の治療の開発に有用であることをさらに明らかにしてゆく必要がある。

#### E. 結論

キメラマウスを用いて B 型肝炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルスのリバーシジェネティクスの系を構築することができた。リバーシジェネティクス法により種々の変異ウイルスを血中に有するマウスの作製が可能であり、生体内における肝炎ウイルスの分子生物学的な検討に、広く応用が可能である

と思われる。特に、薬物耐性の研究には重要な価値を有すると考えられる。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- Kimura T, Imamura M, Hiraga N, Hatakeyama T, Miki D, Noguchi C, Mori N, Tsuge M, Takahashi S, Fujimoto Y, Iwao E, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Arataki K, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Okamoto T, Matsuura Y, Chayama K. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol.* 2008;89:2108-13.
- Mori N, Imamura M, Kawakami Y, Saneto H, Kawaoka T, Takaki S, Aikata H, Takahashi S, Chayama K. A randomized trial of high-dose interferon- $\alpha$ -2b combined with ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2009, 81(4):640-9.
- Noguchi C, Imamura M, Tsuge M, Hiraga N, Mori N, Miki D, Kimura T, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. G to A hypermutation in hepatitis B virus and clinical course of patients with chronic hepatitis B. *J Infectious Dis.* 2009, in press.
- Tsukada H, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Fujimoto Y, Tsuge M, Takahashi H, Kumada H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K; Hiroshima Liver Study Group; Toranomon Hospital. A Polymorphism in MAPKAPK3 Affects Response to Interferon Therapy for Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology.* 2009, in press.
- Kawaoka T, Kawakami Y, Tsuji K, Ito H, Kitamoto M, Aimitsu S, Kawakami H, Jeong SC, Imamura M, Aikata H, Takahashi S,

Chayama K. Dose comparison study of pegylated interferon-alpha-2b plus ribavirin in naïve Japanese patients with hepatitis C virus genotype 2: A randomized clinical trial. J Gastroenterol Hepatol. 2008 19

- Iwamoto K, Kanno K, Hyogo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Tazuma S, Chayama K. Advanced glycation end products enhance the proliferation and activation of hepatic stellate cells. J Gastroenterol. 2008;43(4):298-304.
- Jeong S, Kawakami Y, Kitamoto M, Ishihara H, Tsuji K, Aimitsu S, Kawakami H, Uka K, Takaki S, Kodama H, Waki K, Imamura M, Aikata H, Takahashi S, Chayama K. Prospective study of short-term peginterferon-alpha-2a monotherapy in patients who had a virological response at 2 weeks after initiation of interferon therapy. J Gastroenterol Hepatol. 2008 ;23(4):541-5.
- Utoh R, Tateno C, Yamasaki C, Hiraga N, Kataoka M, Shimada T, Chayama K, Yoshizato K. Susceptibility of chimeric mice with livers repopulated by serially subcultured human hepatocytes to hepatitis B virus. Hepatology. 2008;47(2):435-46.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

今年度はなし

## II. 分担研究報告

### 薬剤感受性の分子的機構解明のためのアプローチ

## —Tandem Affinity Purification (TAP)システムを用いた野生型および変異型 HCV core タンパク質に相互作用するタンパク質の解析—

研究分担者 吉里勝利 株式会社フェニックスバイオ 学術顧問

研究要旨：ヒトC型肝炎ウイルス（HCV）にはいくつかの変異型が見られるが、変異型によって、薬剤の効果が異なることが知られている。今回我々は、HCVのcore領域の変異型に着目して、薬剤感受性の違いの分子的機構を明らかにするために野生型と変異型のcoreタンパク質に対して、細胞内で相互作用するタンパク質を網羅的に解析した。本年度は、レンチウイルスベクターに、野生型および変異型のHCV core配列とGFPを挿入したレンチウイルスを作成し、得られたウイルスをHuh7細胞に感染させた。感染72時間後にFACS Ariaを用いてGFP陽性の細胞のみをソーティングにより回収し、継代培養した。得られた陽性細胞のlysateを作成し、Tandem Affinity Purification (TAP) Systemを用いて、streptavidin-tag (SBP)ならびにcalmodulin-tag (CBP)の2種類のtagを用いて、発現させたHCV coreと相互作用するタンパク質の解析を実施し、複数の候補タンパク質を得た。

#### A. 研究目的

ヒトC型肝炎ウイルス（HCV）にはいくつかの変異型が見られるが、これまでの研究ならびに臨床現場における薬剤の有効性データの蓄積により、変異型によって、薬剤の効果が異なることが明らかとなってきた。今回我々は、HCVのcore領域の変異型に着目して、薬剤感受性の違いの分子的機構を明らかにするために野生型と変異型のcoreタンパク質に対して、細胞内で相互作用するタンパク質を網羅的な解析を試みた。

#### B. 研究方法

HCV-Jの野生型株と突然変異型株(70R→Q, 91L→M)のcore配列並びに、streptavidin-tag(SBP), calmodulin-tag(CBP), Green Fluorescent Protein (GFP)の配列をレンチウイルスベクターplenti 7.3\_v5のaatR1~R2の間に挿入し、ウイルスを得た。なお、core配列と2種類のtagは1つのORFとして発現するが、GFPはこれとは独立したORFとして発現するように設計した。得られたウイルスをHuh7細胞に感染させた。この際、陰性対照として、core配列を挿入していないウイルスをあわせて作成した。これらをbait(疑似餌)として、細胞内に発現させ、以下に述べる手順で、これらと相互作用をする細胞内のタンパク質の解析を実施した。感染72時間後にFACS Ariaを用いてGFP陽性の細胞のみをソーティングにより回収し、継代培養した。継代後の感染細胞のGFP陽性率は80%以上であった。得

られた陽性細胞のlysateを作成し、Tandem Affinity Purification (TAP) Systemを用いて、streptavidin-tag(SBP)ならびにcalmodulin-tag(CBP)の2種類のtagを用いて、発現させたHCV coreと相互作用するタンパク質の解析を実施した。マイルドな抽出条件にて作成したlysateにProtease inhibitorを添加し、Streptavidinビーズに4度で終夜吸着させた。このビーズを洗浄した後に、吸着したタンパク質は、4度で2時間溶出液にて溶出した。得られた溶出画分をcalmodulinビーズに4度で終夜吸着させた。このビーズを洗浄した後に、吸着したタンパク質を4度で2時間溶出液にて溶出した。最終的に得られた2種類のビーズに結合した画分をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、陰性対照、HCV core野生型、HCV core変異型の3者の泳動像を比較し、異なるタンパク質を探索した。

#### （倫理面への配慮）

本研究は、樹立株化細胞を用いて、タンパク質の解析を実施したものであり、倫理的に問題は生じない。

#### C. 結果

当初は、野生型株と突然変異型株(70R→Q, 91L→M)のcore配列に対して結合するタンパク質を見いだすために、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像のタンパク質濃度を比較し、これら2者間で差のあるバンドを探索した。しかしながら、両者に共通して観察されるタンパク質バンドが複数観察されたため、陰性対照を加えた3者の比較を行うこととした。こ

れにより、陰性対照で観察されたタンパク質シグナルは、特異性が低いものと判断し、探索対象から外すことができた。その結果、複数のタンパク質候補を得ることができた。

#### D. 考察

当初は、先に述べたとおり、陰性対照を含めずに比較を行ったため、野生型と突然変異型に共通するタンパク質が多く見られた上に、得られた候補タンパク質は、ハウスキーピング的なアクチン、pyruvate carboxylaseであった。これらのことから、陰性対照を含めた比較を実施して、得られた候補タンパク質は、突然変異型株 (70R→Q, 91L→M) の core 配列を持つ bait に結合するものであった。最終的に得られた候補タンパク質の詳細については、検証と解析を行っている。

#### E. 結論

SBP, CBP を含む HCV-J の野生型株と突然変異型株 (70R→Q, 91L→M) の core 配列と bait として発現させることにより、細胞内において、これらの 2 種類の core 配列と相互作用するタンパク質の網羅的解析を行い、複数の候補タンパク質を得ることに成功した。これらのタンパク質の分子の実体を解明することにより、今回の成果は、薬剤の効果と HCV 配列の分子の関連を明らかにする端緒となることが期待される。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Igarashi Y, Tateno C, Tanaka Y, Tachibana A, Utoh R, Kataoka M, Ohdan H, Asahara T, Yoshizato K. Engraftment of human hepatocytes in the livers of rats bearing bone marrow reconstructed with immunodeficient mouse bone marrow cells. *Xenotransplantation* 2008;15:235-45.
- 2) Lin YC, Goto S, Tateno C, Nakano T, Cheng YF, Jawan B, Kao YH, Hsu LW, Lai CY, Yoshizato K, Chen CL. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in livers following hepatectomy prolongs survival of allogeneic hepatocytes after transplantation. *Transplant Proc* 2008;40:2706-8.
- 3) Kimura T, Imamura M, Hiraga N, Hatakeyama T, Miki D, Noguchi C, Mori N, Tsuge M, Takahashi S, Fujimoto Y, Iwao E, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Arataki K, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Okamoto T, Matsuura Y, Chayama K.

Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*. 2008;89:2108-13.

- 4) Sato Y, Yamada H, Iwasaki K, Tateno C, Yokoi T, Yoshizato K, Horii I. Human hepatocytes can repopulate mouse liver: histopathology of the liver in human hepatocyte-transplanted chimeric mice and toxicologic responses to acetaminophen. *Toxicol Pathol*. 2008;36:581-91
  - 5) Park TJ, Jeong BR, Tateno C, Kim HS, Ogawa T, Lim IK, Yoshizato K. Pleiotrophin inhibits transforming growth factor beta1-induced apoptosis in hepatoma cell lines. *Mol Carcinog*. 2008;47:784-96.
  - 6) Motoi, N., Suzuki, K., Hirota, R., Johnson, P., Oofusa, K., Kikuchi, Y., and Yoshizato, K. Identification and characterization of nucleoplasmin 3 as a histone-binding protein in embryonic stem cells. *Devel. Growth & Differ*. 2008;50:307-320
  - 7) Tatsumi K, Ohashi K, Kataoka M, Tateno C, Shibata M, Naka H, Shima M, Hisanaga M, Kanehiro H, Okano T, Yoshizato K, Nakajima Y, Yoshioka A. Successful in vivo propagation of factor IX-producing hepatocytes in mice: potential for cell-based therapy in haemophilia B. *Thromb Haemost*. 2008;99:883-91.
  - 8) Emoto C, Yamato Y, Sato Y, Ohshita H, Katoh M, Tateno C, Yokoi T, Yoshizato K, Iwasaki K. Non-invasive method to detect induction of CYP3A4 in chimeric mice with a humanized liver. *Xenobiotica*. 2008;38:239-48.
  - 9) Katoh M, Tateno C, Yoshizato K, Yokoi T. Chimeric mice with humanized liver. *Toxicology*. 2008;246:9-17.
  - 10) Utoh R, Tateno C, Yamasaki C, Hiraga N, Kataoka M, Shimada T, Chayama K, Yoshizato K. Susceptibility of chimeric mice with livers repopulated by serially subcultured human hepatocytes to hepatitis B virus. *Hepatology* 2008;47:435-46.
  - 11) Lin YC, Chen CL, Nakano T, Goto S, Kao YH, Hsu LW, Lai CY, Jawan B, Cheng YF, Tateno C, Yoshizato K. Immunological role of indoleamine 2,3-dioxygenase in rat liver allograft rejection and tolerance. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23:e243-50
- ##### 2. 学会発表
- 1) The molecular mechanism underlying the liver mass optimization rule. R. Utoh, C. Tateno & K.

Yoshizato. Design&Nature 2008 June 24 - 26,  
Algarve, Portugal

- 2) A mouse experimental model that bears human liver as a tool to study human hepatitis from a holistic medical point of view. Katutoshi Yoshizato, ICHM 2008 August 21-23, Kottayam Kerala India

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

## HCV 及び HBV 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

研究分担者 金子 周一 金沢大学恒常性制御学 教授

研究要旨: HCV 及び HBV 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、HBV 感染に伴うキメラマウスの遺伝子発現は明瞭に異なっており、HBV 感染では *Apoptotic Signaling*、*Ras Signaling Pathway*、*p53 Signaling Pathway* の活性化が認められ、HCV 感染では *Cytokines and Inflammatory Response* の活性化が認められた。これらは以前、C 型慢性肝炎及び B 型慢性肝炎の肝組織で認められた遺伝子発現の違いをより強く反映していた。興味深いことに IFN 投与に伴い HCV 感染では IFN シグナルが抑制されるのに対し、HBV 感染ではむしろ IFN シグナルが更新することが認められ、両肝炎ウイルス感染下での IFN 投与に伴う細胞内シグナルが異なっていることが明らかとなり、治療・病態の理解から有用な知見が得られた。

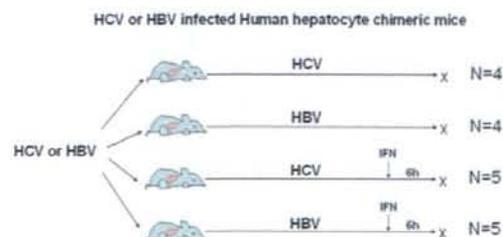
### A. 研究目的

これまでに我々は、C 型慢性肝炎症例及び B 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、肝炎組織内での遺伝子発現の違いを報告してきた (Honda et al 2006)。今回、キメラマウスに HCV 及び HBV 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た。

### B. 研究方法

C 型慢性肝炎 (CH-C) 患者血清 (genotype 1b) を 9 匹、B 型慢性肝炎 (CH-B) 患者血清 (genotype C) を 9 匹のキメラマウスに感染させた。それぞれ 5 匹のキメラマウスには IFN を投与し IFN 投与後 6 時間の肝組織を得た。コントロールとして 5 匹の非感染マウス及び 5 匹の非感染マウスに IFN を投与し 6 時間後の肝組織を用いた。(図 1)。

### 実験-1



### 実験-2

#### Uninfected Human hepatocyte chimeric mice



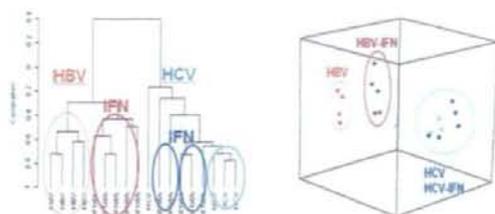
(図1)

解析には SAGE (serial analysis of gene expression) 法により様々な肝疾患で発現する遺伝子より選出された約 1 万クローンを有する In-house cDNA マイクロアレイを用いた。

### C. 研究結果

HCV、HBV 感染に伴うキメラマウスの遺伝子発現は明瞭に異なっており、HBV 感染では *Apoptotic Signaling in Response to DNA Damage*、*Ras Signaling Pathway*、*p53 Signaling Pathway* の活性化が認められ、HCV 感染では *Cytokines and Inflammatory Response* の活性化が認められた。これらは以前、C 型慢性肝炎症例及び B 型慢性肝炎症例の肝組織で認められた遺伝子発現の違いをより強く反映していた。興味深いことに IFN 投与に伴う反応が HCV 感染と HBV 感染では異なる

っており、HCV 感染では IFN シグナルが抑制されるのに対し、HBV 感染ではむしろ IFN シグナルが更新することが認められ、両肝炎ウイルス感染下での IFN 投与に伴う細胞内シグナルが異なっていることが明らかとなった(図 2)。



(図 2)

#### D. 考察

HCV、HBV 感染に伴うキメラマウスの遺伝子発現は明瞭に異なっており、以前、C 型慢性肝炎症例及び B 型慢性肝炎症例の肝組織で認められた遺伝子発現の違いをより強く反映していた。また興味深いことに両肝炎ウイルス感染下での IFN 投与に伴う細胞内シグナルが異なっていることが明らかとなり、両肝炎に対する IFN 治療、病態の理解する上で極めて有用な知見と考えられた。

#### E. 健康危険情報

特記事項なし

#### F. 研究発表

1. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma.

Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. **Hepatology**. 2008 Nov 19.

2. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW. **Gastroenterology**. 2009 Mar;136(3):1012-24.

3. Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients.

Sakai Y, Honda M, Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E,

Nakamoto Y, Kaneko S.

**Cancer Res**. 2008 Dec 15;68(24):10267-79.

4. Comparative analysis of proteome and transcriptome in human hepatocellular carcinoma using 2D-DIGE and SAGE.

Minagawa H, Yamashita T, Honda M, Tabuse Y, Kamijo K, Tsugita A, Kaneko S.

**Protein J**. 2008 Dec;27(7-8):409-19.

5. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma.

Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T, Kaneko S.

**J Hepatol**. 2009 Jan;50(1):100-10. Epub 2008 Oct 12.

6. Application of Serial Analysis of Gene Expression in cancer research.

Yamashita T, Honda M, Kaneko S.

**Curr Pharm Biotechnol**. 2008 Oct;9(5):375-82. Review.

7. Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma.

Mizukoshi E, Honda M, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S.

**J Hepatol**. 2008 Dec;49(6):946-54. Epub 2008 Jun 5.

8. Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma.

Nishino R, Honda M, Yamashita T, Takatori H, Minato H, Zen Y, Sasaki M, Takamura H, Horimoto K, Ohta T, Nakanuma Y, Kaneko S.

**J Hepatol**. 2008 Aug;49(2):207-16. Epub 2008 May 5.

9. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the human hepatocellular carcinoma.

Minagawa H, Honda M, Miyazaki K, Tabuse Y, Teramoto R, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Ueda T, Kamijo K, Kaneko S.

**Biochem Biophys Res Commun**. 2008 Feb 1;366(1):186-92. Epub 2007 Dec 4.

10. Obesity Upregulates Genes Involved in Oxidative Phosphorylation in Livers of Diabetic Patients.

Takamura T, Mitsu H, Matsuzawa-Nagata N, Sakurai M, Ota T, Shimizu A, Kurita S, Takeshita Y, Ando H, Honda M, Kaneko S.

**Obesity** (Silver Spring). 2008 Oct 9.

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（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
（分担）研究報告書（平成20年度）  
ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

HCVの感染性粒子産生機構の解明とこれを標的とした抗HCV戦略の構築

研究分担者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

**研究要旨** これまでに組換え体C型肝炎ウイルス(HCV)であるJFH1株を用いて、HCVの感染性粒子産生が細胞内の脂肪滴周囲でおこなわれることを明らかにしてきたが、そのメカニズムや感染性に必要な細胞因子は不明であり、また多様な患者血液由来のHCVとの相関については全く不明であった。そこで本研究では組換え体HCVであるJFH-1の感染性粒子産生系と我々が独自に開発した新たな培養細胞実験系を用いてHCVの感染性粒子産生機構を明らかにし、新たな抗HCV薬開発の基礎研究をおこないキメラマウスの実験系によってその効果を検証することを目指した。まず組換え体HCV産生系ではJFH-1の感染性粒子を産生している細胞において感染性の粒子が脂肪滴からどのような経路で細胞外に輸送されるかについて種々の阻害剤を用いて検討したところ、ゴルジ体を介するタンパク質輸送を阻害するプレフェルジンAがその輸送に阻害的に働くことがわかった。一方我々は独自に樹立した不死化肝細胞を中空糸によって立体的に培養することで種々の患者血清由来のHCVの生活環を再現する細胞培養系を開発した。この系を用いて感染性組換え体HCV粒子と患者血液由来HCVの感染によって産生される感染性粒子の浮遊密度の比較をおこなった

A. 研究目的

組換え体HCVの感染性粒子産生培養実験系ならびに患者血液由来HCVの生活環を再現する培養細胞系を用いてその粒子産生の分子機構を明らかにしてこれを抑制するための標的を見出し、これを効果的に制御する薬剤の検証をキメラマウスによっておこなうことにより、抗HCV戦略構築を目指した。

B. 研究方法

1. 組み換え体HCVであるJFH1の感染性粒子を産生している細胞から感染性粒子産生に重要な役割を持つことが分かっている脂肪滴画分を単離し、そのプロテオーム解析から感染性に関与する細胞性因子を同定する。対照にはコアタンパク質の脂肪滴局在に変化はないがHCVゲノム複製複合体が脂肪滴に局在しない変異体JFH1複製細胞の脂肪滴画分を用いた。
2. JFH1の感染性粒子産生細胞を種々の薬剤を用いて処理し、感染性ウイルス粒子の細胞外への輸送を阻害する薬剤を検討し、その輸送経路を検討した。
3. 既に独自に樹立している新規ヒト不死化肝細胞

を中空糸立体培養することにより患者血清由来HCVの生活環を再現する培養実験系を構築した。この実験系を用いて患者血清由来HCVに由来する感染性粒子のウイルス学的解析をおこない組換え体HCVとの比較をおこなった。  
(倫理面への配慮)

ヒト初代培養肝細胞は、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作成されたものである。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。肝臓や血液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. 組換え体HCVであるJFH1の感染性粒子を産生している細胞から得た脂肪滴画分にはHCVゲノム複製複合体を検出することができなかった。また対照に用いたコアタンパク質の脂肪滴局在に変化はないがHCVゲノム複製複合体が脂肪滴に局在しない変異体JFH1複製細胞の

脂肪滴画分ではコアの検出が著しく低下していた。

2. JFH1 の感染性粒子産生細胞を小胞体からゴルジ体間の膜輸送を阻害するプレフェルジン A で処理することにより、感染性ウイルス粒子の細胞外への産生が阻害された。この阻害は非感染性粒子の細胞外への産生も阻害した。
3. 既に独自に樹立している新規ヒト不死化肝細胞を中空糸立体培養系によって培養することにより患者血清由来 HCV の生活環を再現する培養実験系を構築した。この実験系では患者血清由来 HCV がこの細胞に感染増殖し、感染性粒子を培地に産生することがわかった。
4. 3. の実験系によって産生された感染性粒子の浮遊密度解析と電子顕微鏡による形態観察をおこなった。に由来する感染性粒子のウイルス学的解析をおこない組換え体 HCV との比較をおこなった。患者血液由来の感染性粒子はこれまでの JFH1 と異なり JFH1 粒子の大部分を占める非感染性粒子は認められず、JFH1 の一部に認められた浮遊密度の軽い感染性粒子と同じの浮遊密度を示し、HCV-RNA およびコアタンパク質のピークも感染性のピークと一致していた。

#### D. 考察

1. 組換え体 HCV である JFH1 の感染性粒子産生細胞の脂肪滴画分にはコアタンパク質が効率良く検出されるが HCV ゲノム複製複合体が脂肪滴に局在化しない変異体 JFH1 ではもともと脂肪滴に局在していたはずのコアタンパク質が分画後には検出されなくなることから、脂肪滴周囲膜の HCV ゲノム複製複合体は脂肪滴上のコアを安定化している可能性が考えられた。
2. 小胞体／ゴルジ体間のタンパク質輸送を阻害するプレフェルジン A が感染性 JFH1 粒子の細胞外産生を阻害することから、脂肪滴周囲で形

成された感染性 JFH1 粒子は小胞体からゴルジ体を経由して細胞外に放出される可能性が考えられた

3. 患者血液由来の HCV が感染増殖した細胞から産生された感染性 HCV 粒子は JFH1 粒子の中で感染性のピークと同じ浮遊密度を示したが、非感染性の粒子と同じピークを示す粒子はなかった。このことは患者血液由来の HCV の感染増殖による感染性ウイルス産生機構は組み換え体 JFH1 のものと多少異なる点がある可能性が考えられた。

#### E. 結論

1. 組換え体 HCV である JFH1 の感染性粒子産生細胞からの脂肪滴画分の中で HCV 感染性粒子産生に関わる複合体を含むと考えられる周囲膜の量は微量であるためプロテオーム解析にはすべての細胞で感染性粒子を産生しているような細胞実験系をもちいる必要があると考えられた。
2. 中空糸を用いてヒト不死化肝細胞を立体培養する新たな培養細胞系を用いた感染実験によって、患者血液の多様な HCV に由来する感染性 HCV 粒子ならびに粒子産生系の解析が可能になった。
3. 今後、組換え体 HCV, JFH1, の感染性粒子産生系と患者血液からの HCV に由来する感染性粒子産生系の双方を比較しながら HCV 粒子産生系を標的とした抗 HCV 薬開発の基礎研究をおこなう必要があると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文

- 1) Hussein H Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379: 330-334, 2009
- 2) 土方 誠: HCV と肝発癌 医学のあゆみ 224 (9), 6 93-698 2008
- 3) 宮成 悠介, 白田 信光, 土方 誠, 下遠野 邦忠 : C型肝炎ウイルスの生活環と発がん 化学と生物 46

(12) 826-831 2008

4) 土方 誠、アリ・ハッサン・フセイン、下遠野邦忠：  
3D細胞培養系を用いた患者血液由来HCV培養、肝・胆・膵 57 (5), 679-687 2008

## 2. 学会発表

1) アリ フセイン、齊月、山口達哉、下遠野邦 忠、土方誠  
不活化肝細胞の中空糸培養によって再現した患者血清  
由来天然HCVの感染増殖」(第56回日本ウイルス学会学  
術集会 2008. 10. 26岡山コンベンションセンター)

2) Hussein H Aly, Yue Qi, Kunitada Shimotohno,  
Makoto Hijikata: A prolonged culture system for the st  
udy of the entire life cycle and the pathogenesis of nat  
ural HCV infection (第67回日本癌学会学術総会 2008.  
10.29名古屋国際会議場)

3) Hussein H Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto  
Hijikata: Serum derived HCV infection, replication and  
particle production in immortalized primary human  
hepatocytes(XIVth International Congress of Virology  
2008.8.12 Istanbul)

4) Hussein H Aly, Tatsuya Yamaguchi, Yue Qi,  
Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Development  
of the novel in vitro system supporting the entire life  
cycle of natural HCV (15th International Symposium  
Hepatitis C Virus & Related Viruses 2008.10.7 San

Antonio.)

## G. 知的所有権取得状況

### 1. 特許取得

1) 感染性C型肝炎ウイルス粒子の製造方法、および  
その利用

発明者/出願者：山口達哉、土方誠、アリ ハッサ  
ン フセイン

2008年6月26日出願 出願番号 特願2008-167942

2) 「C型肝炎ウイルスの感染増殖性の評価方法、お  
よびその利用」

発明者/出願者：山口達哉、土方誠、アリ ハッサ  
ン フセイン

2008年6月26日出願 出願番号 特願2008-167943

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（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
（分担）研究報告書（平成20年度）  
ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

治療最適化を目指した長期持続型インターフェロン発現ベクターの開発

研究分担者 高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科 教授

**研究要旨** 治療抵抗性肝炎に対するインターフェロン（IFN）療法を実現する目的で、CpG配列を全く持たない骨格にマウスおよびヒトIFN- $\gamma$  cDNAを組み込んだプラスミドDNA（pDNA）ベクターを設計し、長期持続型IFN- $\gamma$ 発現ベクターを開発した。発現プロフィールをマウスで評価した結果、いずれのベクターも、低いプラスミドの投与量でIFN- $\gamma$ の血中濃度を治療域に70日以上 of 長期間に渡り維持できることが示された。慢性疾患に対する治療効果を評価するため、アトピー性皮膚炎モデルマウスであるNC/Ngaマウスを用い、持続型IFN- $\gamma$ 発現ベクター投与の効果を調べた。その結果、優れた治療効果が得られることが明らかとなり、本研究で開発した長期持続型IFN- $\gamma$ 発現ベクターの治療上の有用性が証明された。

**A. 研究目的**

治療抵抗性肝炎に対するIFN遺伝子治療を実現するための長期持続型IFN発現ベクターを開発する。In vivoで発現させたIFNの治療効果を病態モデルマウスで評価し、治療上の有効性を証明する。

**B. 研究方法**

**pDNA:** レポーター遺伝子を用いた基礎検討で得られた結果に基づき、CpG配列を全く持たないpDNA骨格（pCpG-mcs: InvivoGen）のhuman EF1プロモータの下流に、マウス及びヒトIFN- $\gamma$  cDNAを組み込むことでIFN発現pDNA（pCpG-Muy、pCpG-Huy）を構築した。比較にはCpGモチーフを多数含む従来型pCMV-Muyを用

いた。マウス：ICR雄性マウス（4週齢）皮膚炎未発症のNC/Nga雄性マウス（6週齢）を用いた。ハイドロダイナミクス法を利用したマウスへの遺伝子導入：naked pDNAをマウス体重の約8%に相当する容量の生理食塩水に溶解し、マウスの尾静脈内に急速投与した。予備検討の結果から、同程度の初期IFN- $\gamma$ 濃度が得られる条件としてpCpG-Muy、pCMV-Muyでそれぞれ0.14  $\mu$ g、20  $\mu$ gを投与量とした。pCMV-Muy投与群では7日後に2回目の投与を行なった。IFN- $\gamma$ 、IL-12、IgE濃度の測定：経時的にマウス尾静脈より採血し、血清中IFN- $\gamma$ 、IL-12、IgE濃度をELISA法により測定した。mRNAの定量：マウス脾臓から採取したtotal RNAを用いて

cDNA を調製し、リアルタイム PCR 法によりサイトカイン(IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17)及びケモカイン(TARC)の mRNA 量を測定し、 $\beta$ -actin に対する相対値で表した。皮膚炎症の評価：皮膚の状態を観察し、6 項目の評価項目（背部湿疹、糜爛、鱗屑、出血/紅斑、顔面の炎症、耳の炎症）に対し 4 段階で評価した。搔破回数の測定：ビデオカメラでマウスの行動を 1 時間撮影し、搔破回数を計数した。経皮水分蒸散量(TEWL)の測定：閉鎖チャンパー方式水分蒸散量測定装置を用いて TEWL を測定した。皮膚病変部の組織学的評価：マウス背部皮膚から炎症部位の薄切切片を作成し、HE 染色により表皮の肥厚及びリンパ球、好酸球の浸潤を、トルイジンブルー染色によりマスト細胞の浸潤を評価した。

### C. 研究結果

IFN- $\gamma$ は、Th1 サイトカインであり、ナイーブ T 細胞の Th1 細胞への分化促進と Th2 細胞への分化抑制、Th2 細胞からのサイトカイン産生を抑制する機能を持つ。従って、IFN- $\gamma$ を用いて Th バランスを Th1 優位な状態にすることによるアレルギー症状の改善が期待される。実際、これまでアトピー性皮膚炎患者に対する IFN- $\gamma$ の投与が試みられてきたが、半減期が短いため十分な治療効果が得られていない。そこで本研究では、長期持続型 IFN- $\gamma$ 発現ベクターの開発を試みた。CpG 配列を全く持たない骨格にマウスおよびヒト

IFN- $\gamma$  cDNA を組み込んだ pDNA ベクターを設計した。治療実験に先立ち、正常マウス (ICR マウス) を用いて発現プロフィールを評価した結果、いずれのベクターも、低投与量 (0.11 $\mu$ g/mouse) で IFN- $\gamma$ の血中濃度を治療域に 70 日以上 of 長期間に渡り維持できることが示された。ヒト IFN- $\gamma$ の血中濃度は、期間中を通じ約 100IU/mL 以上と *in vitro* で HCV 複製抑制効果が得られる濃度を大きく上回った。

そこで、次に IFN- $\gamma$ の長期発現が慢性疾患に対する治療法としてどのような意義があるかを検証するため、アトピー性皮膚炎モデルマウスである NC/Nga マウスを用い、持続型 IFN- $\gamma$ 発現ベクター投与の効果を調べた。NC/Nga マウスに pCpG-Mu $\gamma$ を投与したところ、300 pg/ml 以上の高い血清中 IFN- $\gamma$ 濃度が 80 日以上もの長期にわたり検出された。一方、pCMV-Mu $\gamma$ 投与群では、重量換算で 140 倍もの投与量を用いたが、血清中 IFN- $\gamma$ 濃度は速やかに消失した。

そこで次に、持続的な IFN- $\gamma$ 発現による Th バランスの変化について検討した。代表的 Th1 サイトカインである IL-12 濃度を測定したところ、持続発現型 pCpG-Mu $\gamma$ 投与群において、血清中 IL-12 の有意な上昇が認められた。また、Th2 応答により産生が亢進し、皮膚炎症に深く関与する IgE の血清中濃度は、未処置群では時間経過とともに増加したが、持続発現型 pCpG-Mu $\gamma$ 投与群では増加が有意に抑制された(Fig.2)。これに対し、pCMV-Mu $\gamma$