

Infection of B Cells with Hepatitis C Virus for the Development of Lymphoproliferative Disorders in Patients with Chronic Hepatitis C. J Med Virol.81:619-627,2009

25. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Suda G, Mishima K, Onuki Y, Yamamoto M, Maekawa S, Enomoto N, Kanai T, Tsuchiya K, Watanabe M: Two flavonoids extracts from a herb, Glycyrrhizae radix, inhibit in-vitro hepatitis C virus replication. Hepatology Res 2009; 39(1):60-69.

26. Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, 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 Gastro Hepatol 2008; 23 (9) :1437-1447.

27. Nanmoku K, Imaizumi R, Tojimbara T, Nakajima I, Fuchinoue S, Sakamoto N, Watanabe M, Teraoka S: Effects of immunosuppressants on the progression of hepatitis C in hepatitis C virus-positive renal transplantation and the usefulness of interferon therapy. Transplant Proc 2008; 40

28. Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. Antiviral Res. 2010 85(3):520-524.

29. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. J Virol. 2009 83(10):5137-47.

30. Hussein H. Aly, Yue Qi, Kimie Atsuzawa, Noobuteru Usuda, Yasutsugu Takada, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizogami. Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Strain-dependent viral dynamics and virus cell interactions observed in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood borne HCV. Hepatology, 50(3), 689-696, 2009

31. Hiroishi K, Eguchi J, Baba T, Shimazaki T, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Uozumi S, Omori R, Matsumura T, Yanagawa T, Ito T, Imawari M. Strong CD8(+) T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol. 2009 Nov 20. [Epub ahead of print]

32. Inokuchi M, Ito T, Uchikoshi M, Shimoizuma Y,

Morikawa K, Nozawa H, Shimazaki T, et al. Infection of B Cells with Hepatitis C Virus for the Development of Lymphoproliferative Disorders in Patients with Chronic Hepatitis C. J Med Virol.81:619-627,2009

G. 知的所有権の出願・登録状況

1) 発明の名称: C型肝炎ウイルス由来のキメラ遺伝子を含む核酸(1bキメラの高産生変異体)
出願番号(PCT出願): 2008-116193(公開前)

出願日: 2008. 4. 25

発明者: 脇田隆字、赤澤大輔

2) 発明の名称: C型肝炎ウイルス由来の核酸並びにそれを用いた発現ベクター、形質転換細胞及びC型肝炎ウイルス粒子

出願番号: 2008-335016(公開前)

出願日: 2008. 12. 26

発明者: 脇田隆字、伊達朋子、高橋仁

3) 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

4) 「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

5) 発明の名称: C型肝炎ウイルス由来の核酸並びにそれを用いた発現ベクター、形質転換細胞及びC型肝炎ウイルス粒子

出願日: 2009. 12. 25(PCT出願)

発明者: 脇田隆字、伊達朋子、高橋仁

感染性C型肝炎ウイルス株および感受性培養細胞ライブラリーの構築

所属 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究者 脇田 隆宇

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）HCV感染症に対する治療法は不十分であり、新たな抗ウイルス療法の開発が望まれてきた。我々はHCVのウイルス培養系を開発したが、さらに多くのウイルス株の培養を可能にして研究を進める必要がある。本研究では新たなウイルス株の分離、感染感受性のある培養細胞株を開発、およびそのライブラリーを構築した。本研究により、抗ウイルス薬の開発が進行させ、我が国における肝炎対策に大きく寄与することが期待できる。

分担研究者

- (1) 東レ株式会社医薬研究所
望月 英典
- (2) 京都大学ウイルス研究所
土方 誠
- (3) 昭和大学医学部第二内科
伊藤 敬義
- (4) 東京医科歯科大学医歯学総合研究科
坂本 直哉

A. 研究目的

HCVは日本では200万人、世界中で17000万人にのぼる感染者が存在する。感染すると高率に持続感染化し、多くの症例で慢性肝炎から肝細胞癌を発症する重大な感染症の一つである。このため、HCV感染者のスクリーニングなどの事業が開始されている。しかし、その治療はインターフェロンおよびリバビリン以外に無く、その効果はいまだ不十分である。多数のキャリアーがウイルス排除できなければ、長期間の療養による医療保険へのコストは莫大になる。HCVの良いウイルス培養系が無いことが新たな治療法の開発の

妨げになってきたが、主任研究者の研究によりHCVのウイルス培養が可能となった（平成16-18年度HS研究 課題番号:KH51041、Wakita T et al. Nat Med 2005）。しかし、このウイルス培養系は未だ十分ではなく、さらなる開発が望まれてきた。本研究では、培養可能なHCV株と感染感受性のある培養細胞のライブラリーを構築した。HCVの新たな治療法が開発が進めば、多くの患者の社会復帰を可能にし、医療保険のコスト軽減に寄与できると考えられる。

B. 研究方法

1. 新規HCV株によるレプリコンの解析

劇症肝炎患者および重症肝炎患者血清から分離した新規HCV株の配列により作製したサブジェノミックレプリコン細胞のレプリコンゲノムの遺伝子配列を解析する。同定した変異をレプリコンゲノムに組換えて、変異導入レプリコンを作製して適合変位を同定する。

2. 新規HCVの全長コンストラクト作製

劇症肝炎患者および重症肝炎患者血清から分離した新規HCV株の配列をもとにして、新規HCV株の全長cDNAを構築する。さらに全長ウイルスRNAを合成して培養細胞に導入することによりそのウイルス複製および粒子分泌効率を解析する。

3. ホローファイバー立体培養系で培養した不死化肝細胞HuS-E/2細胞に感染したHCVの性状解析

最近、我々はホローファイバーを用いてHuS-E/2細胞を立体培養することにより患者血液由来HCVが比較的効率良く感染し増殖して感染性粒子を産生することを明らかにした。この細胞培養系に種々の患者血清を用いてHCVを感染させてその感染増殖を長期観察した。細胞内のウイルスRNAおよび培養液中のHCV RNAの量的な変化に加えて、培養液中のウイルス様粒子の感染性の解析並びに細胞で増殖しているHCV RNAの超可変領域における塩基配列の決定による長期継続感染におけるHCVゲノムの変異性について解析した。

4. 自然免疫系を抑制したHuS-E/2細胞の作製

我々が独自に樹立したHuS-E/2細胞は初代培養肝細胞と高い類似性を示す細胞であるため、天然

型HCVが感染することで自然免疫系が誘導され、ウイルスの増殖を抑制する働きをもつことが考えられた。そこでこのIRF7ドミナントネガティブ体(DN)分子を恒常的に発現させたHuS-E/2細胞を作成しこれを上記方法によって立体培養することにより、さらに高い感染増殖性をもつ培養細胞系の構築を試みた。

5. B細胞中HCV RNA量とIFN治療効果との関連
インフォームドコンセントを得たC型慢性肝炎患者の全血30mlから末梢血単核球(PBMC)を分離した。Affinity beadsを用いてCD4、CD8、CD19陽性細胞にそれぞれ分離し、CD19陽性細胞分画をB細胞分画とした。またC型慢性肝炎患者で瀉血療法を行っている患者から100-400mlの全血からPBMCを分離し、市販のB細胞アイソレーションキットを用いてB細胞を分離した。得られたB細胞中、またCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞中のHCV RNA量をreal time RT-PCR法で定量した。

B細胞中免疫グロブリン重鎖遺伝子 CDR3 の mRNA を RT-PCR で増幅し、finger-printing 法で単一クローン増殖(clonality)の有無を解析した。B細胞異常であるリンパ増殖性疾患(LPD)関連マーカーとしてクリオグロブリン血症(Cg)、リウマチ因子(RF)、C4、CH50を測定した。

C型慢性肝炎患者でPEG化IFN、リバビリン併用療法を行った患者87例を対象に性差、年齢、血小板数、ALT値、HCV serogroup、血清HCV RNA量、リンパ増殖性疾患(LPD)関連マーカー[クリオグロブリン(Cg)、リウマチ因子(RF)、血清補体価(C4、CH50)]を治療開始前に測定した。更にB細胞 clonality、B細胞中HCV RNAを測定し、各パラメーターよりIFN治療効果(RVR、SVR、NVR)に関連する因子を多変量解析で抽出した。統計学的手法として2変量の関係はカイ二乗検定を、多変量解析はステップワイズ法で独立変数を選択し、多重ロジスティック回帰分析を JMPver7.0(SAS institute)を用いて解析した。

6. B細胞中HCV RNA量とIFN感受性に関連する既知のウイルス側因子との関連

検討したC型慢性肝炎患者を対象に既知のIFN感受性に関連するウイルス側因子とB細胞中HCV RNA量の関連を検討した。HCV遺伝子型別に層別化しての解析を行い、更に遺伝子型1型で、血清あるいは血漿からHCVのIFN療法抵抗性遺伝子領域とされるコア領域70、91番のアミノ酸、NS5A領域ISDRのアミノ酸を決定し得た41例を対象にB細胞中HCV RNAとの関連を検討した。

7. HCV感染者におけるEBV再活性化

HCV関連LPDの発症機序の一つとしてEBV再活性化が惹起されている可能性を検討した。C型慢性肝炎患者(52例)、B型慢性肝炎患者(17例)その他の肝疾患患者(19例)、非肝疾患患者(43例)について末梢血単核球中もしくはB細胞中のEBV再活性化マーカー(BZLF1、LMP1)のmRNA発現、並びに持続感染マーカーであるEBER遺伝子の発現の有無をRT-PCRで解析した。

8. 感染性HCVの大量培養。

Huh7細胞を10 cmディッシュに播種し、翌日に感染性HCV(J6/JFH-1)濃縮液をmultiplicity of infection(MOI)が0.2となるように500 μ Lの溶体量で接種した。2時間後、ウイルス液を除去し、PBSで洗浄してDMEM-10%FCSを8 mL添加、培養した。サブコンフルエントに達した時に、225 cm²フラスコに継代培養し、さらにセルスタック(5段、3,180cm²)に継代培養した。セルスタック培養は650 mLの培養液で行い、DMEM-10%FCSで播種した翌日に2% FBS含有DMEMに培養液交換した。その3日後に培養上清を回収し、650 mLの培養液を添加してさらに培養した。その後、この操作を2回行い、計650 mL \times 3の培養液を回収した。得られた培養液は0.45 μ mフィルター濾過を行い、使用まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

9. HCV粒子大量精製

上記に示したように調製した感染性HCVを含む培養上清をホローファイバーUFP-500-C-8A(GE Healthcare)で40倍濃縮した。その後、等量のPBSを添加してダイアフィльтраーションにてバッファー置換した。ダイアフィльтраーション後、限外濾過膜を200 mLのPBSを循環させることで洗浄し、濃縮液と混合して最終濃縮液とした。次に、10-60% (w/v) ショ糖含有20 mM Tris-HCl (pH7.4) -150 mM NaCl-0.05 mM EDTA (TNE バッファー) を調製し、Ultra-ClearTM Centrifuge Tubes (Beckman) に60%、50%、40%、30%、20%および10%ショ糖/TNEの順に2 mLずつ重層した後、上記の濃縮培養上清23 mLをさらに重層し、SW28ローターにて28,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、4時間遠心分離した。遠心後、1.5 mLチューブに約1 mLずつ14分画を抽出した。予め重量を測定しておいた1.5 mLチューブに100 μ Lの各分画を分注し、分注後のチューブ重量を測定して比重を算出した。各分画液からQIAampTM Viral RNA Mini Kit (Qiagen)を用いてRNAを抽出し、定量的RT-PCRによりHCV-RNAを定量した。また、HCVコア定量キット(オーソ)によりHCV-coreタンパク質を定量した。感染力価は、各分画液をDMEM-10%FCS

で希釈して測定した。

シヨ糖密度勾配遠心によって分離された分画のうち、最も core タンパク質および HCV-RNA 含量の多い分画 6 (Frac 6) と、最も感染力価の高い分画 8 (Frac 8) を回収し、Amicon Ultra-15 (100,000 MWC0) を用いて濃縮し PBS への溶液交換を行った。各々の調製された HCV 粒子は HCV-core タンパク質、HCV-RNA、感染力価および総タンパク質濃度を測定し、使用まで -80°C で保存した。

1 0. 感染力価の測定

Naïve細胞に対する感染力価は、マウス抗HCV Core抗体2H9を用いた免疫蛍光染色にて確認された感染フォーカス数より算出した。1希釈液あたり3または6ウェル調製し、フォーカス数はその平均値を適用した。

1 1. HCV シュード粒子 (HCVpp) の作製

HCVのエンベロップタンパク質を有するHCVppはBartoschらの方法に従って作製した。293T細胞を10 cm コラーゲンコートディッシュ (IWAKI) に播種し、一昼夜培養後、FuGENE 6 (Roche) を用いて $3 \mu\text{g}$ の MMLV Gag-Pol 発現ベクター (Gag-Pol)、 $3 \mu\text{g}$ のLTRカセット挿入luciferase 発現ベクター (Luc126) および $1 \mu\text{g}$ のHCV E1E2 発現ベクター (pcDNAdeltaC-E1-E2) をトランスフェクションし、6時間後に培養液をDMEM-10%FCS に交換した。48時間培養後の培養上清を回収し、 $0.45 \mu\text{m}$ フィルターで濾過して使用まで -80°C で保存した。

1 2. 精製 HCV 粒子のマウスへの免疫

4 週齢雌性 BALB/c マウスは日本クレアより購入し、国立感染症研究所動物管理区 SPF 感染実験区に搬入した。投与する精製 HCV 粒子は5分間のUV照射によって不活化させた。マウスを1週間馴化の後、下記投与群に0、2、4および6週にMPL+TDM (Sigma Adjuvant System, Sigma) をアジュバントとして抗原を腹腔内投与し、投与後1、3、5および7週に眼窩より採血した。採血後すぐに血清分離剤入りの1.5 mL チューブに添加し、転倒混和して30分間以上室温で静置した後、 $1,200 \times g$ 、10分間室温で遠心分離し、血清を分離した。血清は使用まで -80°C で保存した。陰性コントロールには生理食塩水を投与した。投与群は①生理食塩水 (n=5)、② $0.02 \mu\text{g}$ J6E2/FLAG (n=5)、③ $0.2 \mu\text{g}$ J6E2/FLAG (n=5)、④ $2 \mu\text{g}$ J6E2/FLAG (n=5)、⑤ $0.02 \mu\text{g}$ J6E1/FLAG + $0.02 \mu\text{g}$ J6E2/FLAG (n=5)、⑥ $0.2 \mu\text{g}$ J6E1/FLAG + $0.2 \mu\text{g}$ J6E2/FLAG (n=5)、⑦シヨ

糖密度勾配精製 HCV (Frac 6) 2 pmol HCV-core/head (n=5) および⑧シヨ糖密度勾配精製 HCV (Frac 8) 2 pmol HCV-core/head (n=5) とした。

1 3. マウス血清の感染阻害活性の測定

感染阻害実験はHCVppを用いて行った。 2×10^4 個のHuh7.5.1細胞を48-wellプレート (IWAKI) に播種し、一昼夜培養した。前項で得られたマウス血清は 56°C 、30分間インキュベーションすることで非働化した。HCVppと終濃度1% (v/v) マウス血清を混合し、室温で30分間インキュベーションした後、上記細胞に接種して 37°C で3時間培養した。その後、感染材料を除き、PBSで洗浄、 0.5 mL のDMEM-10%FCSを添加して72時間培養した。細胞のライセートは、PBSでウェルを洗浄後、 $40 \mu\text{L}/\text{well}$ の $1 \times \text{Cell Culture Lysis Reagent}$ (Promega) を添加して調製した。HCVppの感染は上記ライセートの $20 \mu\text{L}$ をLuciferase Assay System (Promega) $50 \mu\text{L}$ と反応させ、攪拌後直ちにLumat LB9507 (Berthold) を用いて10秒間の発光値を測定することで評価した。

1 4. HCV-JFH1 感染細胞に対するプラークアッセイ法の確立

HCV-JFH1 感染 Huh-7.5.1 細胞の培養上清から希釈系列を作り Huh-7.5.1 細胞に感染後、アガロース寒天包埋培地を用いて培養後、テトラゾリウム塩にて染色し、プラーク形成能 (PFU: plaque forming unit) の定量を行う。また、HCV-JFH1 感染細胞をメチルセルロース含有培地にて培養後、HCV コア蛋白による免疫蛍光染色を行い感染性 (RFU: focus forming unit) を観察する。

1 5. HCV の細胞傷害機構の解析

HCV-JFH1 感染増殖による細胞障害効果へのアポトーシスによる細胞死の関与を解析するため、JFH1 感染細胞に対するプラークアッセイ後、プラーク形成部位アネキシン V-FITC 及びヨウ化プロピジウムによる二重染色を施行する。さらに、HCV-JFH1 感染増殖と ER ストレスの関与を解析するため、HCV-JFH1 感染細胞内から経時的に蛋白を抽出し、Western Blotting により、GRP78、eIF2 α 、リン酸化 eIF2 α 抗体を用いて ER ストレス関連蛋白の検出を行う。また、プラーク形成部位での、HCV コア蛋白及び ER ストレス関連蛋白である GRP78 による二重免疫蛍光染色を行い、HCV-JFH1 感染増殖による細胞障害効果と ER ストレスの関与の解析を試みる。

1 6. 高増殖性 HCV-JFH1 株の構築

ブランク形成 HCV-JFH1 感染細胞を回収後、非感染 Huh-7.5.1 細胞に再感染し、その RNA を回収しブランク形成クローンの単離を試みる。単離されたクローンより RT-PCR を行い、遺伝子解析を行う。アミノ酸変異を伴う遺伝子変異を検索し、遺伝子レベルでのウイルスゲノムのクローニングを試みる。さらに、非感染 Huh-7.5.1 細胞に導入し、その増殖性及び細胞障害性を比較し、それらを規定するドメインの特定や機能解析を進める。

17. 急性肝炎血清からの新たな HCV 株の単離

ゲノタイプ 1b, 2a および 2b 急性重症型 C 型肝炎血清より HCV-RNA を抽出、自律増殖する subgenomic replicon 及び全長ウイルス cDNA を構築し、培養細胞での増殖性を確認する。樹立された HCV 培養・増殖系の機能解析、及びウイルス遺伝子改変により高効率増殖系を作成する。

(倫理面への配慮)

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべての DNA に関して組み換え DNA 実験計画を提出し承認を得ている。取り扱うすべての病原微生物（感染性のウイルスを含む）に関しても取り扱い届けを提出し承認を得ている。ウイルスの遺伝子をクローニングした患者血清は、すべてその感染ウイルスの解析についてインフォームドコンセントを得て採取されている。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

C. 研究結果

1. 新規 HCV 株によるレプリコンの解析

遺伝子型 2a の劇症肝炎由来の JFH-2 株によるレプリコンで同定した変異を野生株のレプリコンに組換えて変異導入レプリコンを作製した。その合成 RNA を Huh7 細胞に導入してコロニー形成効率を検討したところ、AS 変異が最も強力な適合変異であることを確認した。さらに遺伝子型 1b の重症肝炎患者から分離した AHC1b 株によるレプリコンを作成した。レプリコン遺伝子が複製するコロニーを分離して適合変異を同定し、SY および SG が強い適合変異であることを確認した。

2. 新規 HCV 株による全長ウイルス構築の作製

JFH-2 株の全長 cDNA 構築を作製した。これらの全長構築から試験管内で全長ウイルス RNA を合成した。合成 RNA を Huh7 細胞に導入してそのウイルスゲノム複製とウイルス粒子産生を細胞

および培養液中のウイルス RNA およびコア蛋白質の定量により解析したが、ゲノム複製およびウイルス粒子産生ともに検出できなかった。今年度は適合変異を導入した全長ウイルスゲノムを構築することによりウイルスゲノム複製能を向上させることができた。全長ウイルスゲノムを導入した細胞からはウイルスはほとんど分泌されず徐々にウイルス蛋白陽性細胞が減少した。しかし、トランスフェクション後 30 日以上細胞を経代すると培養液中に急激な感染性ウイルス分泌を観察した。ウイルスゲノムを導入した AS 変異に加えて、複数の適合変異が入ることによりウイルス粒子形成能、感染性が向上した。培養上清中に分泌されたウイルス粒子は感染性が高く、ウイルスの経代が可能であった。

また、重症肝炎患者から分離された遺伝子型 1b の AHC1b 株はそのままの配列では培養細胞中で複製増殖することができないが、レプリコンを作成すると、G418 耐性細胞コロニーが分離できる。このレプリコン細胞中ではレプリコンゲノム中に適合変異が入っていた。それらの中で最も複製能向上に関わる SY および SG 変異を同定した。さらにこの SY および SG 変異を導入した全長ウイルスゲノムを作成して、培養細胞に導入するとウイルス複製が増強されて、感染性ウイルス粒子の分泌を観察できた。この結果は遺伝子型 1b の感染性ウイルス産生であり、非常に重要な所見である。しかし、感染性は遺伝子型 2 の JFH-1 および JFH-2 株に比較するとかなり低く、ウイルスの経代培養はできなかった。さらに感染性を向上させてウイルス培養を可能とすることが必要である。

3. ホローファイバー立体培養 HuS-E/2 細胞における患者由来 HCV の長期感染増殖の観察

ホローファイバーを用いた新しい立体培養系を用いて HuS-E/2 細胞を培養し、種々の患者血清中の天然 HCV の感染増殖を検討したところ、以下の結果を得た。患者血液由来の遺伝子型 1b の HCV は立体培養された HuS-E/2 細胞において一ヶ月間以上の長期にわたり感染し増殖を維持した。感染増殖のパターンは血液の種類によって多様であったが、細胞内の HCV RNA のコピー数が高い時期と低い時期が交互に出現する傾向が認められた。感染実験に用いた患者血清中、また感染後初めの増殖ピーク時の細胞内、そして二番目の増殖ピーク時における HCV ゲノム RNA を回収して、そのそれぞれについて超可変領域の塩基配列を解析した。その結果、用いた血清中には大きく分けて二種類の塩基配列が存在し、このことは大別して 2 種類の HCV が存在したことがわかったが、最初の増幅ピークにはその一方に由来すると考え

られた配列のみが検出された。また二番目の増殖ピーク時の細胞には残る一方に由来すると考えられた配列のみが検出されたことから、この実験系を用いる事により血清中の様々な HCV の感染増殖の動態を解析することが可能であることがわかった。

4. 自然免疫系を抑制した HuS-E/2 細胞の作製

IRF7DN 分子の発現プラスミドを作製し、これを HuS-E/2 細胞に導入し、この分子を恒常的に発現している HuS-E/2 細胞を多クローン作成した。センダイウイルスの感染による IFN- α 遺伝子の発現を指標として IRF7DN 分子の発現によってこれが効率良く抑制されている細胞を選択した。まず平面培養における患者血清由来 HCV の感染増殖性を検討したところ、優位に感染増殖性が上昇していることが確認できた。またこれを立体培養することにより、さらに感染増殖の効率が上昇する事がわかった。

5. B 細胞中 HCV RNA 量と IFN 治療効果との関連。

単変量解析の結果で、治療開始時の B 細胞中 HCV RNA 量は治療効果 RVR (治療開始 4 週時点の HCV RNA 陰性化)、SVR (ウイルス学的持続陰性化)、NVR (ウイルス学的無効) といずれも有意な相関を示した。しかし、多変量解析では RVR の独立予測因子は遺伝子型 2 型と血清中 HCV RNA 量低値であり、SVR の独立予測因子は遺伝子型 2 型と血小板数高値だった。一方、NVR の独立予測因子は B 細胞中 HCV RNA 量高値が独立して抽出された。今回の検討では LPD 関連マーカー異常はすべて IFN 治療効果と関連しなかった。

6. B 細胞中 HCV RNA 量と IFN 感受性に関連する既知のウイルス側因子との関連。

HCV 遺伝子型 2 型では B 細胞中 HCV RNA 陽性者は 22.7% にとどまった。IFN 療法の治療効果は NVR 0 例、SVR 18 例 (81.8%)、再燃例 4 例 (18.2%) だった。再燃例 4 例中 2 例は B 細胞中 HCV 陽性だった。一方、遺伝子型 1 型では 68.5% が B 細胞中 HCV RNA 陽性で、遺伝子型 1 型で HCV の B 細胞感染・吸着が高率に起こっていることが示された。41 例の遺伝子型 1 型患者でコア領域 70、91 番それぞれのアミノ酸変異の有無、ダブル野生型、NS5A 領域 ISDR のアミノ酸変異数を決定し、B 細胞中 HCV RNA 量との関連を解析した。結果はコア領域のアミノ酸変異に相関はみられなかったが、ISDR の変異 0-1 個の低もしくは無変異群と 2 個以上のアミノ酸変異群と比較すると、低~無変異 (0-1) 群で B 細胞中 HCV RNA 量が低値であることが示された (ISDR 変異 0-1 群, ISDR 変異 2 以上群 : 0.92

± 0.48 , 2.36 ± 0.25 log copies/100ng : $p=0.0016$)。

7. HCV 感染者における EBV 再活性化

B 細胞の活性化、生存期間の延長、腫瘍化を来すウイルスとしては Epstein-Bar ウイルス (EBV) が知られている。EBV は多くの健常人に感染し、不顕性感染が成立する。感染後は自己複製を抑制し、持続感染を維持する。HHV6 等の重感染で EBV が再活性化する第 1 段階として BZLF1 mRNA 発現が確認されている。本研究での HCV 感染者 52 例の PBMC 中 12 例 (23%) から BZLF1 mRNA が検出された。非肝疾患群では 43 例中 3 例 (9%) で有意差を認めた ($p=0.0179$)。B 細胞分画を用いた解析でも HCV 群で 42 例中 10 例 (23.8%) が BZLF1 陽性と PBMC での解析とほぼ同様の結果で、リンパ球サブセット別の解析を BZLF1 陽性だった 10 例で行っても T 細胞など B 細胞以外の分画での再活性化は 1 例のみだった。IFN 療法後 SVR が得られた患者 3 例での検討で、治療中、治療後の HCV RNA 消失に伴い、持続感染状態を示す EBER は残存するものの、再活性化マーカー BZLF1 は速やかに消失することが示された。しかし、EBV 再活性化と LPD 関連マーカー異常との直接の関連はなかった。

8. HCV 粒子大量精製

感染性 HCV を含む培養上清を限外濾過およびシヨ糖密度勾配遠心で精製を行った。分画分子量 500 kDa の限外濾過膜 (ホローファイバー) を用いて、24 L の培養上清を約 400 mL まで 60 倍濃縮した。さらにダイアフィルトレーションを行い、バッファーを PBS に置換した。得られたサンプルのうち 276 mL を 10-60% シヨ糖密度勾配による超遠心分離に使用し、分離後の分画中の HCV-core、HCV-RNA、および naïve Huh7 細胞における感染力価を測定した。その結果、ウイルス成分の浮遊密度は約 1.15 g/mL にピークが認められるのに対し、特異的感染力価の浮遊密度は約 1.10 g/mL がピークとなり、異なる性状のウイルス粒子を分離した。浮遊密度が高く、感染力価の低い HCV 粒子 (Frac 6) および浮遊密度が低く、感染力価の高い HCV 粒子 (Frac 8) を濃縮して調製し、得られた各々の精製 HCV 粒子プロファイルと比較した。その結果、HCV-core タンパク質と HCV-RNA の比は同等 (Frac 6 : Frac 8 = 1 : 0.82) であったが、特異的感染力価について、感染力価/HCV-core の比では Frac 6 : Frac 8 = 1 : 7.61、感染力価/HCV-RNA の比では Frac 6 : Frac 8 = 1 : 6.26 となり、Frac 8 の HCV 粒子は約 6~7 倍感染力を持っていた。一方、夾雑タンパク質については、HCV-core/総

タンパク質の比が Frac 6 : Frac 8 = 1 : 0.17 であることから、Frac 6 の HCV 粒子が約 6 倍、純度が高いと考えられた。

9. 精製 HCV 粒子に含まれるエンベロープタンパク質量の概算

組換えタンパク質と HCV 粒子の免疫原性の比較を行う目的で、まず、精製 HCV 粒子に含まれるエンベロープタンパク質量を概算した。精製 HCV 粒子の E1 および E2 量を調べるために、組換え J6E1/FLAG および J6E2/FLAG タンパク質を指標として、抗 E1 および E2 抗体を用いたウェスタンブロットングを行った。また、HCV 粒子のアプライ量の確認のために抗 core 抗体を用いた検出も行った。その結果、HCV 粒子は Frac 6 および Frac 8 とともに同等のバンド強度を示した (Frac 6:Frac 8 = 1:0.96)。組換え E1 および E2 の各々について 1~30 ng のアプライ量に対する検量線を作成し、HCV core タンパク質量 0.5 pmol の HCV 粒子における E1 および E2 タンパク質量を概算したところ、Frac 6 の E1 および E2 は 3.3 および 4.0 ng、Frac 8 の E1 および E2 は 4.7 および 6.5 ng と算出された。この結果から、HCV 粒子の core、E1 および E2 タンパク質の構成比はモル換算 (E1 分子量 : 37,000、E2 分子量 : 70,000) で概ね core:E1:E2 = 1:0.2:0.2 となり、粒子に含まれるエンベロープタンパク質量は少ないと考えられた。また、感染力価の異なる Frac 6 および Frac 8 の HCV 粒子間での比較においては、Frac 8 の HCV で Frac 6 よりも E1、E2 含量が約 1.5 倍高かった。

10. 組換えタンパク質と精製 HCV 粒子の抗体誘導能の比較

精製 HCV 粒子を UV で不活化し、MPL+TDM (Sigma Adjuvant System) をアジュバントとして BALB/c マウスに免疫を行った。5 週齢雌性 BALB/c マウスに各種 HCV 粒子を隔週で 4 回腹腔内投与し、投与後 1 週毎に採血を行って血清を分離した。投与量は、2 pmol HCV-core/head で実施した。比較対象となる組換えタンパク質には J6E1/FLAG および J6E2/FLAG を用いた。前項の検討から、2 pmol HCV-core/head に相当する E1、E2 タンパク質量は約 20 ng (0.02 μ g) であることが想定されるため、投与群として、①生理食塩水のみ、②0.02 μ g J6E2/FLAG、③0.2 μ g J6E2/FLAG、④2 μ g J6E2/FLAG の E2 単独投与群、および、⑤0.02 μ g J6E1/FLAG + 0.02 μ g J6E2/FLAG、⑥0.2 μ g J6E1/FLAG + 0.2 μ g J6E2/FLAG の E1E2 混合投与群を設定し免疫 (n=5) を行った。次に、得られた各々のマウス血清において、

J6E2/Fc タンパク質を抗原とした EIA を行った。免疫開始後 1、3、5 および 7 週の各マウス血清は 3,000 倍および 1,000 倍希釈して測定した。組換えタンパク質を免疫した場合、E1 および E2 を混合して投与しても、E2 単独で投与したマウスと比較して E2 抗体価が上昇することはなかった。また、0.02、0.2 および 2 μ g/head と投与量の増加に応じて E2 抗体価は高値を示した。前項の検討より、2 pmol HCV-core の HCV 粒子は約 0.02 μ g に相当する。2 pmol HCV-core/head の HCV 粒子を投与したマウス血清では E2 抗体が誘導され、その抗体価は 0.02 μ g/head で組換えタンパク質を投与されたマウス血清の抗体価よりも高値を示した。また、HCV 粒子投与群では抗体価の誘導が組換えタンパク質投与群よりも速やかであった。一方、性状の異なる 2 種類の HCV 粒子 (Frac 6 および Frac 8) 間で抗体価の差異は認められなかった。

11. 組換えタンパク質と精製 HCV 粒子のワクチン効果の比較

非働化したマウス血清を J6CF の E1E2 を有する HCVpp と混合した後、naïve Huh7 細胞に感染させその感染阻害活性を調べた。HCVpp と混合する血清は 1/100 量とした。その結果、本条件において HCV 粒子を免疫したマウス血清では約 50%の感染阻害活性を示し、性状の異なる 2 種類の HCV 粒子 (Frac 6 および Frac 8) 間で有意な差は認められなかった。また、組換えタンパク質投与群においては、0.02 および 0.2 μ g/head の投与群では有意な感染阻害活性は認められず、2 μ g/head の投与群においてもその活性は HCV 粒子投与群と比較して同等以下であった。このことから、精製 HCV 粒子は組換えタンパク質を免疫原として用いた場合よりも抗体誘導、特に、中和抗体誘導能が高いことが示唆された。

12. HCV-プラークアッセイ法を用いた高増殖性 HCV 株の単離 :

HCV-JFH1 株を Huh-7.5.1 細胞 (Zhong, PNAS 2005) に感染後に観察される細胞傷害性プラークの形成を応用して、感染増殖能の高い HCV サブクローンの単離を試みた。プラークアッセイ法により 6 箇所のプラークより感染細胞を回収し上清を再感染させたところ、1 箇のクローン (#1) で高レベルの増殖と著明な細胞死が観察された。このクローンの遺伝子解析を行ったところ、9 箇のアミノ酸変異を認め、そのうち 5 箇が NS5B C 末端側に集中していた。同定された 5 箇の変異を HCV-JFH1 plasmid に個々に導入し、合成 RNA を細胞にトランスフェクションしウイルス増殖粒

子形成能を解析したところ、3箇所の変位クローンで親株 JFH1 より著明に高レベルの粒子産生が観察され、3箇所の変異をすべて導入したクローンはもっとも増殖レベルが高かった。3箇所の変異を導入した HCV をヒト肝臓移植キメラマウスに感染したところ、感染早期(5-7日)には高レベルの血中ウイルス産生が起こるが以後変異が野生型に戻り増殖レベルが親株と同等になった。以上より、HCV の NS5A、NS5B の特定の遺伝子構造がウイルスの増殖・粒子系性能に直接関連していることが示された。

1.3. 急性肝炎血清からの新たな HCV 株の単離

我々は、HCV genotype 2b 急性肝炎血清からウイルスゲノムを再構築し、JFH-1 株の非構造領域と genotype 2b ウイルスの構造領域を用いたキメラウイルスによる感染培養系により genotype 2b 株の kinetics の検討を試みた。

散発性急性 C 型肝炎 genotype 2b 型の血中ウイルス遺伝子配列は標準配列 (HCV-J4, J8) に比べ約 20-40 箇所のアミノ酸変異が存在することを確認した。さらにこれらの配列から全長 HCV-2b 型全長 HCV-cDNA を構築した。全長 2b ウイルスは細胞内での増殖は検出されなかったがキメラマウスでの持続感染が確認された。JFH-1 とのキメラウイルスは electroporation 後 JFH-1 株に比してコア蛋白、ウイルス粒子分泌が著明に高く、再感染力価も有意に高値であった。IFN による増殖抑制試験では用量依存性にウイルス増殖抑制が確認され、CD81 抗体を使用した侵入阻害試験においても用量依存性にウイルス増殖抑制が確認された。

D. 考察

主任研究者は劇症肝炎患者から分離した JFH-1 株を用いて、HCV のウイルス培養系を世界に先駆けて報告し、さらに HCV レプリコン、全長ウイルス遺伝子、キメラウイルス遺伝子など HCV のウイルス感染増殖複製実験に必要な材料の開発と、それらを用いた HCV に関する研究を推進してきた。初めてウイルス培養が可能となった JFH-1 株が劇症肝炎から分離されたことから、HCV による劇症肝炎からは複製効率の高いウイルス株が分離できる可能性を考慮して、さらに劇症肝炎および重症急性肝炎患者からウイルス遺伝子をクローニングして解析を行った。遺伝子型 2a および 1b のレプリコンおよび全長遺伝子を構築して解析した。JFH-1 株以外の培養細胞で複製増殖可能なウイルス株を樹立したことで HCV 研究はさらに進行することが期待できる。

ホローファイバーを用いた新しい立体培養系

を用いて HuS-E/2 細胞を培養し、種々の患者血清中の天然 HCV の長期にわたる感染増殖の検討したところ、この培養細胞系は HCV の感染増殖の動態を長期にわたり観察、解析することが可能であるため、今後様々な血清から感染増殖効率が著しく高い HCV 株の検出や感染増殖が可能なウイルスライブラリーの開発にも応用できる可能性が考えられた。また IRF7 の活性を抑制することが可能なドミナントネガティブ体 IRF7 を恒常的に発現するように改変した HuS-E/2 細胞 (HuS-E/2-7DN 細胞) は、血清由来 HCV の感染増殖の効率が高く、この細胞の立体培養系をさらに至適化することにより感染性組換え体 HCV ライブラリーを構築するのに有用であることが考えられた。

C 型肝炎患者において、リンパ球系細胞の中で B 細胞に高頻度の高ウイルス量の HCV が検出された。B 細胞への HCV 感染・吸着が惹起する免疫異常として、IFN 抵抗性と EBV 再活性化について検討した。IFN 抵抗性については既知の IFN 治療効果に対するパラメーター、LPD 関連マーカーなどと多変量解析し、IFN 療法の NVR と B 細胞中 HCV RNA 量が関連することが示された。更に B 細胞に感染・吸着する HCV は遺伝子型 1 型、また NS5A 領域 ISDR 変異が 0-1 個に多かった。この点が NVR に関連すると推察される。しかし、コア領域の変異と B 細胞中 HCV 量には関連がなく、IFN 感受性とされるダブル野生型での NVR 例は 4 例存在し、4 例とも B 細胞中 HCV 陽性だった。B 細胞中の HCV が宿主細胞の自然免疫力を示すのか、ウイルス側の IFN 抵抗性を反映しているのかが今後の課題である。

宿主免疫の破綻とも関連する EBV 再活性化について、本研究で検討した。C 型肝炎患者で他の肝疾患、健常人と比較し有意に高頻度であることが示された。この EBV 再活性化は B 細胞特異的に観察され、IFN 療法による HCV RNA 排除後は消失する。しかし、EBV 再活性化マーカーである BZLF1 mRNA レベルは低く、おそらく minor population の B 細胞でのみ EBV が再活性化されていると推察される。EBV が再活性化した B 細胞は transform、clonal expansion し、LPD の原因となることが予想されるが、HCV 感染者における B 細胞 clonality や LPD 関連マーカー異常とは直接関連しなかった。HCV 感染が B 細胞異常を直接惹起し、それに伴う液性免疫を初めとする宿主免疫力の低下、また HCV 抗原自体が刺激となって EBV 再活性化に関連していると推察された。精製 HCV 粒子はエンベロープタンパク質より高いワクチン効果を持つことが示唆されたが、今後は in vivo でのワクチン効果を示していく必要が

ある。その手段として、HCV が感染可能な動物モデルを用いた感染阻害実験がある。チンパンジーは HCV が感染する唯一の動物として知られているが、実験動物としての規制があり実施が困難である。近年、免疫不全マウスにヒトの肝臓を生着させたヒト肝臓キメラマウスが作製され、ウイルス肝炎のモデル動物として用いられるようになった。本マウスは免疫不全マウスであるためワクチン投与や感染に応じた免疫反応は望めないが、例えば、HCV の感染を中和する IgG を本マウス血中に導入、あるいは、ワクチン投与後の正常マウスの脾臓細胞をヒト肝臓キメラマウスに移植した後に HCV を感染させ、感染中和されるか否かを調べることで、感染防御としての *in vivo* ワクチン効果を示すことができると考えている。

J6/JFH-1 ウイルス粒子を投与して得た血清は、他の遺伝子型の HCV 感染も阻害することから、遺伝子型に依らない汎用性ワクチンとしての可能性がある。一方で、解決すべき問題点も残されており、①ワクチン作製に使用する培養細胞の選定、②生産性・精製度の向上、がある。作製に用いた培養細胞はヒト肝癌細胞である Huh7 細胞であるため、ワクチンに癌原性物質の混入の危険性もある。現在のところ、感染性 HCV 粒子を効率良く産生するには、HCV JFH-1 株と Huh7 細胞の組み合わせを逸脱することはできない。先述のように、作製された HCV 粒子に含まれるエンベロープタンパク質量は比較的 low、抗原としてはさらにエンベロープ量を増加させた粒子を用いることでワクチン効果を増強させることができるかもしれない。ひとつは、エンベロープタンパク質をトランスで発現させた細胞で HCV 粒子を作製することでエンベロープ量の多い粒子を作製する方法を試みる事が挙げられる。もうひとつは、ウイルスベクターと Huh7 以外の培養細胞を用いた HCV 様粒子の作製を試みることも手段として考えられる。後者であれば、上記問題点を克服できる可能性がある。

HCV を含むフラビウイルス属のウイルスゲノム増殖・蛋白合成の場は小胞体 (ER) であり、日本脳炎ウイルス (JEV) や Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 及び DEN ウイルスではウイルスの誘導する ER ストレスによりアポトーシスを生じることが報告されている。今回我々は HCV-JFH1 培養細胞系を用い、HCV 感染増殖も同様に宿主細胞に対し細胞障害効果を示し、ER ストレス誘導性アポトーシスがその機構の一部であることを明らかにした。

急性肝炎患者より単離した genotype 2b ウイルス株が *in-vivo* で感染増殖能を有することを示した。ウイルス構造遺伝子の差異によりインター

フェロン感受性に違いが生じ、その機構が細胞内インターフェロン誘導遺伝子などを介したインターフェロン応答性にあることが明らかとなった。

E. 結論

1. C 型肝炎患者血清由来 HCV 株のレプリコンおよび全長 HCV 構築を解析した。
2. ホローファイバーによる立体細胞培養により患者由来 HCV の感染増殖に成功した。
3. B 細胞指向性 HCV 株を解析した。
4. HCV の培養系を応用して HCV 粒子の免疫原性を解析した。
5. 細胞障害性の強い HCV 株を確立し解析した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res.* 2010 85(3):520-524.
2. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol.* 2009 83(10):5137-47.
3. Hussein H. Aly, Yue Qi, Kimie Atsuzawa, Noobuteru Usuda, Yasutsugu Takada, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizogami, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Strain-dependent viral dynamics and virus cell interactions observed in a novel *in vitro* system supporting the life cycle of blood borne HCV. *Hepatology*, 50(3), 689-696, 2009
4. Hiroishi K, Eguchi J, Baba T, Shimazaki T, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Uozumi S, Omori R, Matsumura T, Yanagawa T, Ito T, Imawari M. Strong CD8(+) T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2009 Nov 20. [Epub ahead of print]
5. Inokuchi M, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Morikawa K, Nozawa H, Shimazaki T, et al. Infection of B Cells with Hepatitis C Virus for the Development of Lymphoproliferative Disorders in Patients with Chronic Hepatitis C. *J Med Virol.* 81:619-627, 2009
6. 伊藤敬義、黒木亜紀、井廻道夫。ウイルス肝炎-日常診療のポイント: ウイルス肝炎の周辺知

識 ウイルス肝炎の肝外合併症。Medicina 47: 452-457, 2010.

7. Y Nishimura-Sakurai, N Sakamoto, K Mogushi, S Nagaie, M Nakagawa, Y Itsui, Y S-Osajima, M Tasaka-Fujita, Y Onuki-Karakama, G Suda, K Mishima, M Yamamoto, M Ueyama, Y Funaoka, T Watanabe, C-H Chen, S Kakinuma, K Tsuchiya, H Tanaka, N Enomoto, M Watanabe: Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells. **J Gastroenterol EPub ahead of print.**

8. Y Itsui, N Sakamoto, S Kakinuma, M Nakagawa, Y Sekine-Osajima, M Tasaka-Fujita, Y Nishimura-Sakurai, G Suda, Y Karakama, K Mishima, M Yamamoto, T Watanabe, M Ueyama, Y Funaoka, C-H Azuma, M Watanabe: Antiviral effects of the interferon-induced protein GBP-1 and its interaction with the hepatitis C virus NS5B protein. **Hepatology** 2009; 50:1727-1737.

9. Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N, Ito M: Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses HCV replication in vitro. **Hepatology Res** 2008; 38:909-918.

10. Sakamoto N, Wu GY: Prospects for future therapy of hepatitis C virus infection. **Future Virology** 2009; 4(5):453-462

11. Sakamoto N, Watanabe M: New therapeutic approaches to HCV. **J Gastroenterol** 2009; 44(7):643-649.

2. 学会発表および講演など

1) 村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、加藤孝宣、鈴木哲朗、豊田哲也、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの複製増殖に関するウイルス遺伝子変異および遺伝子構造の解析、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2008, 10.25-27)

2) 村山麻子、加藤孝宣、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの複製増殖に関するウイルス遺伝子領域の検討、第45回日本肝臓学会総会、神戸

3) Mohsan Saeed、加藤孝宣、脇田隆宇、In vitro behavior of hepatitis C virus JFH-1 strain with mutations emerged after passage in chimpanzees、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)

4) スムエー、伊達朋子、朝長充則、脇田隆宇、鈴木哲朗、Generation of Hepatitis C virus NS3 mutations conferring resistance to the viral protease inhibitor by serial virus passage、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)

5) 招待講演) 土方 誠: 血液由来 HCV の感染増

殖を再現する新しい培養細胞系の構築
第18回広島肝臓研究会 平成21年11月6日、広島 2009

6) 伊藤敬義、井口桃子、打越学、下間祐、井廻道夫 C型慢性肝炎に対するインターフェロン(IFN)療法効果予測因子としてのB細胞中HCV RNA、第44回日本肝臓学会総会(神戸、2009.6)

7) 打越学、伊藤敬義、井口桃子、下間祐、森川賢一、井廻道夫 インターフェロン療法中のC型慢性肝炎患者におけるB細胞活性化因子BAFF及びAPRILの異常変動、第44回日本肝臓学会総会(神戸、2009.6)

8) 下間祐、井口桃子、伊藤敬義、打越学、井廻道夫 C型慢性肝炎患者におけるEpstein-Barウイルス再活性化、第44回日本肝臓学会総会(神戸、2009.6)

9) 赤澤大輔、森山正樹、尾見法昭、渋谷悠子、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆宇、培養細胞由来C型肝炎ウイルス粒子を利用したワクチンの免疫による感染阻害活性の誘導、第13回日本ワクチン学会、2009年9月、札幌。

10) 森山正樹、赤澤大輔、尾見法昭、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆宇、培養細胞由来HCV粒子を用いたワクチンの免疫誘導能および最適アジュバントの検討、第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月、東京。

10) M SAEED, T KATO, Y CHOI, K KRAWCZYNSKI, J LIANG, T WAKITA, IN VITRO BEHAVIOR OF HEPATITIS C VIRUS JFH-1 STRAINS WITH MUTATIONS EMERGED AFTER PASSAGE IN CHIMPANZEES, Nice,

11) A MURAYAMA, L WENG, T DATE, D AKAZAWA, T SUZUKI, T KATO, T TOYODA, T WAKITA, SPECIFIC RNA STRUCTURES AND MUTATIONS IMPLICATED FOR HCV RNA REPLICATION AND VIRUS PARTICLE FORMATION IN CULTURED CELLS, Nice, France (2009, 10.3-7)

12) Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Drug screening of blood-borne HCV using 3D cultured immortalized human hepatocytes. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Nice, France, Oct 3-7 2009-

13) Ito T, Inokuchi M, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Hiroishi K and Imawari M. Evaluation of Hepatitis C Virus RNA in B Cells as a Predictive Factor for Response of Antiviral therapy in Patients with Chronic Hepatitis C. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (Boston 2009.11)

14) Uchikoshi M, Ito T, Shimozuma Y, Inokuchi M and Imawari M. Department of gastroenterology Evaluation of a proliferation-inducing ligand (APRIL) as an immunological marker of

lymphoproliferative disorders in patients with chronic hepatitis C. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (Boston 2009.11)

15) Shimozuma Y, Ito T, Uchikoshi M, Inokuchi M, Nozawa H and Imawari M. Reactivation of Epstein-barr virus in patients with chronic hepatitis C. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (Boston 2009.11)

16) Masaki Moriyama, Daisuke Akazawa, Noriaki Omi, Noriko Nakamura, Tetsuro Suzuki, Koji Ishii, Takaji Wakita, Immunogenicity of recombinant hepatitis C virus particles in mice with several adjuvants, 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses NICE, France (October 3-7, 2009)

G. 知的所有権の出願・登録状況

1) 発明の名称：C型肝炎ウイルス由来の核酸並びにそれを用いた発現ベクター、形質転換細胞及びC型肝炎ウイルス粒子

出願日：2009.12.25 (PCT 出願)

発明者：脇田隆宇、伊達朋子、高橋仁

脱細胞化組織を用いた再生医療用生物由来素材の開発 と各種組織移植への展開

所 属 ニプロ株式会社総合研究所
研究者 藤里 俊哉
研究期間 平成19年4月～平成22年3月

研究要旨 絶対的なドナー不足である脳死臓器移植、再生医療に用いる足場材料、そして既存の人工臓器・医用材料の欠点を克服するため、新しい生体材料の必要性が高まっている。本研究では、生物由来素材の再生医療への応用を実現するため、同種あるいは異種由来組織から細胞成分を除去した脱細胞化組織の利用について検討している。これまでの心臓弁や大血管で得られた基盤技術を、小口径血管、角膜、神経、脳、肝臓、および骨格筋などへと展開することを目的とした。また、脱細胞化処理法におけるバリデーションへの応用を目指し、電気インピーダンス測定法についても検討した。

分担研究者

- | | |
|-----------------|------|
| (1) 東京医科歯科大学 | 岸田晶夫 |
| (2) 国立循環器病センター | 山岡哲二 |
| (3) 物質材料研究機構 | 小林尚俊 |
| (4) ニプロ(株)総合研究所 | 白数昭雄 |
| (5) 大阪工業大学工学部 | 橋本成広 |

A. 研究目的

絶対的なドナー不足である脳死臓器移植、再生医療に用いる足場材料、あるいは既存の人工臓器・医用材料の欠点を克服するため、新しい生体材料の必要性が高まっている。このうち、現在でも必要性の高い血管、気管、食道などの比較的単純な組織構成の組織再生のための足場材料は、主として生体内分解吸収性の合成材料が用いた研究が進められている。しかし、ポリ乳酸やポリグリコール酸などの既存の材料は加工が困難で、物性が生体のものとは大きく異なる。また、その他の新規材料は、安全性に関する試験等に要する期間・費用や、臨床応用後の問題発生時の訴訟リスク等から、大企業でさえも容易に開発できるものではない。我々は、生物組織を脱細胞化処理することによって得られた生物由来素材の応用を進めている。これまでに、肺動脈弁及び大血管において研究を進め、臨床応用の手前まで到達している。本研究では、この基礎技術を、小口径血管や角膜、神経、骨格筋などの他の組織へと応用する。また、同時に、生物由来組織特有の問題である生物学的安全性の確保ならびにその安全性評価法についても検討を行う。

人工血管は、中大口径のものに限れば既に完成された技術であり、我が国では年間約5万本が使用され、約100億円の市場規模にある。しかし、移植後も異物のままであり、自己細胞の浸潤による自己組織化が達成されないため、移植後の成長性がなく、感染に対しても非常に弱い。冠動脈や末梢血管等で小口径の場合では、自己血管を用いたバイパス術や同種血管の使用が第一選択肢となっている。欧米では組織バンクが商業ベースで行われており、年間数千件以上の提供組織が臨床使用されている。しかし、我が国では年間数十件に留まっており、圧倒的に提供数が不足している。

また、我が国では年間2万人以上の患者が、角膜移植の対象疾患で移植治療を待っている。世界的には、角膜の障害による失明は少なくとも10万人以上は存在すると推定されている。移植用角膜の不足が主要因であり、失明患者の救済、失明患者のために費やす社会保障費用削減などの観点から角膜実質代替材料の開発が強く望まれている。前述の循環器組織と同様に、我が国では提供数が不足しているため、年間約千もの角膜組織が輸入されている現状にある。同様に、代用皮膚組織は熱傷や褥瘡の他、がん切除後の組織再建、さらには美容目的に使用され、輸入ヒト組織も使用されている。

本研究では、このような同種組織の不足を補うべく、生物由来素材を改変した再生型組織移植技術を開発し、最終的に商品化を目指す。

B. 研究方法

B-1. 大血管

脱細胞化処理：クラウン系ミニブタ（(株) ジャパンファーム）あるいは食用ブタから清潔下にて各種組織を採取した。化学処理による脱細胞化法として、トリプシン処理、TritonX-100(TX)処理、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)処理、デオキシコール酸ナトリウム(SD)処理を行った。高圧処理による脱細胞化として、冷間等方加圧装置Dr. CHEF（(株)神戸製鋼所）を用いて、980MPa（1万気圧）下10分間の超高压処理を行った。また、血管組織からエラスチン線維を除去するため、凍結乾燥後、熱架橋処理を施し、続けてエラスターゼ溶液中でエラスチンを分解除去した。

組織評価：組織内のDNA量は、フェノール/クロロホルム法によりゲノムDNAの抽出し、エタノール沈殿後、紫外-可視分光光度計を用いて算出した。GAG量は、アルシアンブルー結合アッセイにてマイクロプレートリーダーを用いて600 nmの吸光度を測定することにより算出した。

力学特性評価：ダンベル型に調製した大動脈サンプルを用いて、力学試験機にて単軸引張試験を行った。破断するまで1mm/秒の速度で引張を行った後、応力-歪曲線を作成し、初期、後期の微分係数をそれぞれエラスチン、コラーゲンの弾性率として算出した。

石灰化評価：脱細胞化組織を石灰化加速試験にて検討した。疑似体液(SBF)および血清(FBS)を調製し、3、10、15日間浸漬した後、Kossa染色にて石灰化を評価した。

保存法の検討：食用ブタ大動脈組織を、徐冷あるいは急冷した後、凍結乾燥を行った。乾燥後、肉眼にて亀裂などの損傷の有無と変形の程度を観察した。また、組織学的評価および力学的評価を行った。

B-2. 脳・肝臓

脱細胞化処理：冷間等方加圧装置にて30°Cで980MPa（1万気圧）の超高压印加処理を10分間行った。DNase Iなどを含むEGM2培地で14日間洗浄した後、80%エタノールで3日間洗浄した。

構造破壊群の作製：上記の方法で脱細胞化処理した組織に、試験管内で1組織あたり200 μ lの生理食塩水を加え、ホモジナイザーを用いて構造を破壊した。その後5000気圧の超高压印加処理を5分間行い、構造を破壊した組織を滅菌

ラットへの皮下移植：ラットの背部右側の3箇所、左側の3箇所に構造維持群を移植し、構造破壊群を移植した。構造維持群では、深さ3 cm程のポケットを作成し、組織片を挿入した。

構造破壊群では、構造破壊した組織を20Gの注射針で吸引し、構造維持群の移植位置と対称になるように3 cmほど腹部側の皮下組織に、皮下注射した。

B-3. 小口径血管

脱細胞化処理：成体ブタ頸動脈を購入し、冷間等方加圧装置にて30°Cで980MPa（1万気圧）の超高压印加処理を10分間行った。DNase Iなどを含むEGM2培地で14日間洗浄した後、80%エタノールで3日間洗浄した。

残存DNA定量：凍結乾燥した脱細胞化血管に組織溶解液を加え、組織を分解した。フェノール/クロロホルム法によりゲノムDNAの抽出を行い、エタノール沈殿後、分光光度計を用いて残存DNA量を算出した。

切片コラーゲン定量：色素結合法によるコラーゲン定量を行った。厚さ20 μ mの組織切片を作製し、コラーゲン定量キットを使用して切片中のコラーゲン量を測定した。連続切片を作製し、HE染色後画像解析により組織面積を測定し、単位面積当たりのコラーゲン量を求めた。

力学特性評価：破裂圧試験は、血管末端を結紮し、もう一方の末端から水圧をかけ、血管破裂時の圧力を測定した。suture retention testは、血管断端を固定し、もう一方の断端から縫合糸を通し、引っ張り試験で血管が破断するまでの最大値を測定した。

血管内皮細胞播種：脱細胞化頸動脈を切開後、内腔を上方に向け、血管内皮細胞懸濁液を添加した。10日間培養して組織学的に評価した。

動物実験：ラット頸動脈を採取して脱細胞化した移植用脱細胞化血管を、レシピエントラットの頸動脈を置換移植した。所定期間後に移植試料を採取し、組織学的に評価した。

B-4. 角膜

脱細胞化処理：購入した成体ブタ眼球から角膜を採取し、冷間等方加圧装置にて10°Cで980MPa（1万気圧）の超高压印加処理を10分間行った。DNase Iなどを含むEGM2培地で3日間洗浄した。比較としての化学処理による脱細胞化法として、トリプシン処理、TritonX-100(TX)処理、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)処理、デオキシコール酸ナトリウム(SD)処理を行った。

動物実験：日本白色家兎の角膜内に脱細胞化角膜を移植した。所定期間経過後に移植試料を採取し、組織学的に評価した。

B-5. 神経

脱細胞化処理：ラットの坐骨神経を採取し、冷間等方加圧装置にて10℃で980MPa(1万気圧)の超高压印加処理を10分間行った。DNase Iなどを含む洗浄液で14日間洗浄した後、80%エタノールで3日間洗浄した。

動物実験：SDラットの坐骨神経を長さ10mm切除した。この切除部位に、脱細胞化処理したLewisラット坐骨神経を、近位と遠位部の向きを合わせて縫合した。コントロールは、SDラットの正常坐骨神経を、近位部と遠位部を反転させて縫合した。所定期間経過後、組織学的に評価するとともに、神経刺激-筋電図測定を行った。

B-6. 骨格筋

脱細胞化組織による腱：人工腱として食用ブタの脱細胞化胸部大動脈を使用した。24時間凍結乾燥させた後、真空熱架橋し、エラスターゼ溶液で72時間処理した。処理後、エラスポールでエラスターゼを失活化させ、80%エタノールで3日間洗浄した。

培養骨格筋：直径3mmに成型した脱細胞化組織を人工腱とした。2個の人工腱をステンレスピンで固定した。人工腱の間に、C2C12細胞を包埋したコラーゲンゲル溶液を滴下し、ゲル化させた。当初2日間は増殖培地を使用し、その後、分化培地に変更して培養を続けた。

収縮力測定：収縮力測定装置に培養骨格筋を設置した。培養骨格筋の長さを初期長に調整した後に、印加電圧、パルス幅、および周波数をそれぞれ変化させたパルス電圧を与え、等尺性収縮力を測定した。電極には白金平板電極を使用し、収縮力は荷重センサで測定した。

生化学・組織学的評価：タンパク質の発現をウエスタンブロッティング法により検出した。一次抗体にはanti- α sarcomeric Actin、anti-Fast Myosin Skeletal Heavy Chain、anti-Slow Myosin Skeletal Heavy Chain、および β -Actinを使用した。また、形態学的に評価するため、HE染色および透過型電子顕微鏡による観察を行った。

光造形構造物の駆動：マイクロ光造形装置を用いて造形物を製作した。培養筋と一体化させ、電気パルス信号を培養液に印加して造形物の駆動の様子を観察した。

B-5. 安全性評価

脱細胞化処理：食用ブタの脱細胞化胸部大動脈を使用した。24時間凍結乾燥させた後、真空熱架橋し、エラスターゼ溶液で72時間処理した。処理後、エラスポールでエラスターゼを失活化

させ、80%エタノールで3日間洗浄した。マイクロトーム刃で15×25mmに成形したものを試験片とした。

電気インピーダンス測定：四電極法を採用し、電極には2×5mm、厚さ0.5mmのステンレス板電極を用いた。内腔面が上向きになる様に試験片を設置し、全ての電極を試験片に十分接触させた後、電圧検出電極10mVrms一定のもと交流電流を流し、電気インピーダンスを測定した。

組織学的評価：動脈組織内の単位面積辺りの核数を細胞密度として算出した。画像解析ソフトを用いて観察視野内の核数を算出し、総核数を総面積で除して細胞密度を算出した。また、組織内のDNAを抽出し、分光光度計を用いてDNA量を算出した。

(倫理面への配慮)

動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号)及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第6号)に基づき、各省庁および当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。当該実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤及び鎮痛剤を用いて動物の苦痛の軽減に努めるとともに、実験計画を綿密に練ることにより、不要な動物実験を避け必要最低限の頭数で目的を達成するよう努めた。

C. 研究結果

C-1. 大血管

組織学的評価：化学処理による脱細胞化を行った大動脈について検討したところ、トリプシン処理およびSDS処理では、光学顕微鏡観察において脱細胞化が確認された。しかし、トリプシン処理ではECMの損傷が激しく、線維の断裂が確認された。また、SDS処理では線維間が有意に拡大していた(図1)。

生化学的評価：残存DNAについて検討したところ、組織学評価において脱細胞化が確認された洗浄処理組織においても、DNA定量の結果ではDNA残渣の存在が示された。一方、超高压処理大動脈は、検出限界の残存DNA量であった(図2)。

力学的評価：いずれの処理でもエラスチンの弾性率が大幅に高くなり、エラスチンは化学処理により硬化が生じることが示唆された。特に、SD処理において、コラーゲンの弾性率、最大破断応力が大きく上昇した。最大応力・最大歪率については、洗浄処理・超高压処理組織どちらも、未処理組織と大きな差がなかった。

石灰化評価：未処理の組織では石灰化は観察

されなかったが、コントロールとして用いたグルタルアルデヒド固定化組織では、端部において石灰化が確認された。超高压処理を用いた脱細胞化組織では、組織中心部に石灰化が観察されたが、洗浄溶液の成分を変えて行ったところ、は観察されなくなった(図3)。

保存法の検討：初期弾性率と破断歪率に関しては、コントロールに対して処理による有意な差はみられなかった。しかし、後期弾性率に関しては、-80℃まで徐冷凍結後真空乾燥させた群以外の群でコントロールに対して有意な低下が見られた(図4)。

C-2. 脳・肝臓

各組織の脱細胞化処理の評価：各組織とも細胞は破壊され、ECMは三次元的な組織構造を保ちながら残存していることが観察された(図5)。

構造維持組織移植片の評価：ECM主体の組織では、移植前の脱細胞化組織のECMが残存することが大きな特徴だった。組織周囲から組織中央に向かって、残存するECMの線維の間隙に入り込むようにして、細胞浸潤および血管新生が観察された。細胞はECM線維間への浸潤は少なく、組織周囲に多くの細胞が集積していた。また、大動脈特有の線維組織の層構造が各所で分断され、このことよりECM線維の破壊が生じていると考えられ、破壊された部位から細胞が内部に浸潤していた。血管新生は組織の周囲に多く生じ、組織内部ではあまり観察されなかった。

細胞主体の組織では、レシピエント側の細胞浸潤、血管新生、及び線維化が顕著であった。脳では、放射状に線維化し、内部にまで細胞が浸潤していた。また、高密度に血管新生が観察された。肝臓では組織全体に広範な繊維化が確認された。高密度に細胞が浸潤している部位も存在したが、大部分は細胞が疎な組織であった。血管新生が多数生じていた(図6)。

構造破壊組織移植片の評価：長さ1mm未満の大動脈組織片は癒痕も観察されず、移植組織は消失していた。脳は構造維持群に比べ、全体が線維化していた。細胞浸潤および血管新生は構造維持に比べ少なかった。また、構造維持群と同様に脂肪細胞様細胞が全体に散在性に観察された。肝臓は線維化が顕著であった。脂肪細胞様の細胞が多く観察され、肝臓特有の構造等は全く観察されなかった(図7)。

C-3. 小口径血管

血管の脱細胞化と組織学的評価：界面活性剤であるTritonX-100/SDCによる脱細胞化血管に

おいては、管腔構造が維持されず、エラスチン線維の断裂とコラーゲン脱落が観察された。一方、超高压法による脱細胞化血管においては、37℃処理ではコラーゲン脱落とエラスチン線維配向の乱れが認められ、血管の管腔構造維持は見られなかったのに対し、4℃処理では管腔構造を維持し、コラーゲンとエラスチン配向の乱れが最も軽微だった(図8)。

残存DNA・コラーゲン定量：全ての脱細胞化手法で残存DNA量が減少した。37℃超高压処理のみ、未処理血管との間に有意差が見られた。また、界面活性剤および37℃超高压処理では、未処理血管と比較してコラーゲン量が50%以下に減少した。一方、4℃超高压処理では、約65%のコラーゲンが残存した。

力学特性評価：破裂圧試験では、未処理、37℃超高压処理、および4℃超高压処理とも測定限界の1750mmHgでも破裂しなかった。suture retention testでは、全ての試料で有意差は見られなかった。

血管内皮細胞播種：超高压処理では、内皮細胞が単層で血管内腔表面を覆っており、増殖も確認された。

ラット頸動脈移植実験：37℃超高压処理においては、移植3日および1週間後では開存が確認されたが、2週間後では、3例全例で血栓形成により閉塞していた。一方、4℃超高压処理においては、移植2週間後でも3例全例の開存が確認された。グラフト内にはほとんど血栓形成は認められなかった。移植血管の中膜と外膜への少量の細胞浸潤と単層の内皮化が示された(図9)。

C-4. 角膜

脱細胞化処理：TX処理およびSD処理では、ほとんどの細胞が除去されていなかった。SDS処理では、上皮層部は除去されていたが、実質層では細胞の残存し、コラーゲン繊維の配向も乱れていた。高圧処理法は、細胞核の完全な除去が示され、コラーゲン繊維配向の大きな乱れは観察されなかった。また、処理後の透明性の回復について検討したところ、ほぼ透明になったことから、移植時における透明性回復が示唆された(図10)。

移植実験：術後6ヶ月では、材料上には角膜上皮細胞様細胞が、材料内には線維芽細胞様細胞が浸潤しており、正常角膜類似構造の再構築がなされていた。材料上への細胞浸潤については、術後早期より活発に行われ、上皮2mm欠損では9週、上皮4mm欠損では13週後に浸潤した上皮細胞様細胞に覆われた。術後6ヵ月では、

欠損部に浸潤した細胞は材料上で上皮組織様構造を形成し、ダウングロスや材料内部への浸潤は認められなかった。上皮細胞様細胞は正常な角膜上皮組織類似の構造であった(図11)。

材料内への細胞浸潤については、術後6カ月では、上皮2mm欠損および4mm欠損とも欠損部直下の材料内には線維芽細胞様細胞の浸潤が認められた(図12)。材料内での著しい線維芽細胞様細胞の増殖は認められず、きわめて正常角膜実質組織に類似した構造が認められた。

C-5. 神経

脱細胞化処理：超高压処理直後(洗浄無)は正常組織と同様の組織像で、細胞核の除去は認められなかったが、洗浄後は効率よく細胞成分が取り除けていた。また、GFAP免疫染色の結果、シュワン細胞も効率よく除去できることが判った。残存しているECMは、その構造を保持していた(図13)。

動物実験：移植1か月後では、コントロール群および脱細胞神経移植群とも多くの細胞が浸潤していた。しかしながら、その細胞腫は両者で大きく異なっており、脱細胞神経移植群では多くのマクロファージが浸潤していた一方、コントロール群では、マクロファージはわずしか確認できなかった。移植110日後には、両群ともに多くの細胞が浸潤していた。神経が長軸方向に並んでいる様子が見られたが、神経束様の構造はほとんど認められなかった。一方、158日後には、多くの繊維状構造が見られ、特にコントロール群で顕著であった(図14)。

次に、電気生理学的に神経機能の再生を評価するために、筋電位を測定した。コントロール群では移植初期でも筋電位が観測されたが、脱細胞神経移植群では全く筋電位は認められなかった。しかし、さらに長期間(6か月)の観察の結果、3例中2例で筋電位が認められるようになった(図15)。

C-6. 骨格筋

培養骨格筋の収縮力：培養に伴って、コラーゲンゲルが無細胞生体由来組織を覆うように収縮した。また培養4日目以降では、鑷子で再生骨格筋を把持することが可能であった(図16)。入力電圧およびパルス幅が大きくなるにつれて等尺性収縮力が大きくなった(図17)。3Hz以上の周波数では10Vと50Vで波形が大きく異なった。10Hzでは刺激の間、高い収縮力を維持しており、この値は0.5Hzよりも大きかった。また、培養に伴って等尺性収縮力は高くなった(図18)。

培養骨格筋組織：培養7日目において、コラーゲンゲル内部の多くのC2C12細胞は筋管細胞へと分化し、スキヤフォールドの長軸と平行に配向していた。培養に伴い、 α -actinやslow、fast MHCの発現を認めた。培養7日目においては多核の筋管細胞が観察されるが、筋原線維は見られなかった。培養14日目には核の近傍に筋原線維が見られるが、核は細胞の中心部に存在していた。培養21日目においては筋原線維の一部で生体筋に見られるサルコメア構造が確認され、Z線、A帯、およびI帯の区別がつく部分も見られた(図19)。

造形物の駆動：培養筋の収縮に伴い造形物が駆動することを確認できた。弛緩する際に元の状態には戻らず、造形物は次第にほとんど動かなくなった。刺激により構造物は約10°回転したことがわかった(図20)。

C-7. 安全性評価

電気インピーダンス測定：自作した測定システムを図21に示した。酵素処理時間に伴い血管組織の電気インピーダンスは低下し、24時間以上から平衡状態に達する傾向が見られた(図22)。Cole-Cole plotから生体組織の等価回路パラメータを算出したところ、酵素処理時間に伴い細胞内抵抗および細胞外抵抗共に低下し、24時間以上から平衡状態に達する傾向が見られた。酵素処理時間に伴う細胞膜容量の顕著な変化は見られなかった。

組織評価：酵素処理時間に伴い血管組織のDNA含有量は低下し、36時間以上から平衡状態に達する傾向が見られた。また、電気インピーダンスとDNA量との間に強い正の相関が見られた(図23)。

D. 考察

D-1. 大血管

血管組織の脱細胞化について、高压処理法と従来の化学処理法とで比較したところ、高压処理法は、化学処理法に比べて高い脱細胞化効率および組織構造の維持が示された。また、物理特性も生体組織特有の特性の維持が示された。再生医療用生物由来素材の臨床応用では、移植後の石灰化の検討が重要であるが、長期の動物実験は犠牲死を必要とする上、非効率である。疑似体液への浸漬によって石灰化を検討したところ、動物実験の結果を模擬できることが示された。これら素材の広範な応用および臨床使用のためには、安全な保存法の確保が必要である。種々の行程による凍結乾燥法について組織学および力学的に検討したところ、徐冷凍結法に

て生体組織の組織学的・力学的特性が維持されることが明らかとなった。

D-2. 脳・肝臓

マウスあるいはラットへの異種皮下埋植による炎症、血管新生、および細胞浸潤等の組織反応については、細胞外マトリックス (ECM) が主体の血管では、細胞浸潤や血管新生は残存する脱細胞化組織の周囲より間隙方向に起こり、脱細胞化組織の深部への細胞浸潤等は困難であった。一方、細胞が主体の肝臓や脳では、細胞浸潤、血管新生、繊維化が早期に生じ、埋入した脱細胞化組織の深部にても確認されたことから、ECMの存在による組織再生の相違が明らかとなった。

D-3. 小口径血管

まず、界面活性剤法と大動脈用洗浄操作を用いた超高压法により、ブタ頸動脈脱細胞化を試みた。両処理とも細胞除去が可能であったが、血管組織構造の破壊が観察された。界面活性剤法では、エラスチン線維の損傷が著しく、脱細胞化血管の力学的強度が低下した。小口径人工血管は移植時のサイズ調整などの必要性から、10cm以上の長さが理想とされ、残存界面活性剤除去が困難であると考えられる。

一方、超高压印加後に4℃静置洗浄した脱細胞化頸動脈では、界面活性剤と同等の細胞除去がなされ、細胞外マトリックスの損傷抑制が可能であった。動脈の主たる構成物のコラーゲンとエラスチンは超高压後の洗浄過程を4℃静置条件にすることで構造維持されることが示された。構造変化を最小にすることが可能であり、生体血管に近い構造、力学的特性を有した脱細胞化血管を得ることが可能であった。

脱細胞化ラット頸動脈の移植実験において、4℃脱細胞化血管は、移植2週間後の開存が認められた。中膜と外膜の一部に細胞浸潤が認められ、血管内腔に細胞が単層接着していた。基底膜、細胞外マトリックス構造が維持され、生体に類似した力学的強度と早期内皮化による血栓形成回避が可能になったと考えられる。

以上より、超高压処理による脱細胞化頸動脈の小口径血管としての応用可能性が示された。

D-4. 角膜

角膜の脱細胞化でも、高压処理法は非常に有効であった。ウサギ角膜内に本材料を移植した後、6カ月後には材料上へ角膜上皮細胞様細胞、材料内部へ線維芽細胞様細胞が浸潤し、組織を

構築していた。材料上へ浸潤した角膜上皮細胞様細胞からなる上皮組織様構造物は、過形成を呈していた。しかしながら、材料内部への角膜上皮細胞様細胞の浸潤は認められなかった。材料上に構築された上皮細胞様構造物は、正常角膜上皮と同様に抗ケラチン抗体に対して陽性反応を示す重層上皮様構造をとっていたことから、角膜上皮組織として機能していたことがうかがえる。

材料内へ浸潤した線維芽細胞様細胞は、材料内での細胞密度や局在が、正常の角膜実質層と比べて類似していた。材料内に浸潤した線維芽細胞様細胞はレシピエントの角膜実質細胞由来の細胞が含まれている可能性が高く、角膜実質として機能しているように思われた。

本材料は処理後の力学強度および超微細レベルでも組織構造が維持されており、角膜実質組織としてレシピエントが認識した結果、それぞれの細胞の浸潤による角膜類似組織の再生につながったものと考えられる。本材料上への角膜上皮細胞の浸潤や、内部への角膜実質細胞の浸潤は、高静水压印加処理による脱細胞化角膜の利点が存分に活かされた結果だと考えられる。

D-5. 神経

移植110日後には、コントロールならびに脱細胞化組織移植群ともに多くの細胞が浸潤していることがHE染色より判った。この時点では神経束様の構造はほとんど認められなかったが、158日後には多くの繊維状構造が見られ、特にコントロール群で顕著であった。コントロール群においても110日後にこのような構造が認められなかったことから、この期間に構造の組織再構築が起こっていることを示唆する。また、脱細胞神経には全くなかったGFAP陽性細胞が多く認められたことから、脱細胞組織はシュワン細胞の浸潤に適していることが示唆される。

電気生理学的に神経機能の再生を評価したところ、長期間の観察の結果、3例中2例で筋電位が認められるようになったことは、今回作成した脱細胞神経が、周囲細胞の活発な浸潤を通して神経組織を再生させる優れたポテンシャルを有していることを示唆している。

D-6. 骨格筋

脱細胞化組織の腱および筋芽細胞を組み込んだコラーゲングルからなる培養骨格筋組織では、筋管細胞に分化させることによって電気刺激での弛緩収縮が肉眼で確認できる筋組織を作成することができた。培養筋の長さを2倍にしても、収縮力にあまり変化がなかった一方、2

本を束ねた場合、1本に比べておよそ2倍の収縮力を得ることができた。これは束ねる本数が増えると、それにもなって収縮力が大きくなることを示している。束ねるといふ点においては、生体筋における筋繊維束に類似した構造といえる。生体筋も筋繊維が密になることで強い収縮力を発揮しており、強い収縮力を持つ培養筋作製には、培養筋を束ねることが効果的であると考えられた。得られた培養骨格筋により、小規模ながら物体を駆動することができた。これは、アクチュエータとしての応用の可能性も示唆している。

D-7. 安全性評価

血管組織の大部分は中膜であり、平滑筋細胞と細胞外基質であるコラーゲン線維およびエラスチン線維が占める。酵素処理時間に伴い動脈組織の電気インピーダンスは低下し、24時間以上で平衡状態に達したのは弾性線維の分解に伴う動脈組織の膨潤によるものと考えられる。一般的に、生体組織においては組織内の水分量が高くなるにつれて電気インピーダンスが低くなると報告されている。構造の変化に伴う含水率の上昇によって、キャリアイオンの総数の増加が電気インピーダンスの低下に寄与していると推察される。組織染色の結果より、酵素処理により動脈組織中のエラスチン線維は分解され、それに伴うコラーゲン線維間の間隙が広がった事が確認された。本研究で得られた動脈組織の電気インピーダンスの変化は組織構造の過疎化とそれに伴う水分状態の変化によるものと考えられる。

循環器系における電気インピーダンス法の利用例としてはインピーダンス・プレチモグラフィがある。この技術は血流に伴う体肢体積の微小変化を検出する事で、心拍出量、体肢血流量、体肢体液量の無襲侵計測が可能である。また、降矢らは電気インピーダンス法を用いて非襲侵的に血管内の栓子検出を試みている。これらの研究は体外からの測定であり、直接血管組織の情報を推定する報告はほとんどない。本研究において電気インピーダンスとDNA含有量との間に強い正の相関が示された。これは組織構造の変化に伴う細胞数の変化を電気インピーダンスが間接的に示していると考えられる。従って、電気インピーダンス法を用いて動脈組織の脱細胞度を推定可能である事が示された。脱細胞化組織の広範な応用および臨床使用のためには、脱細胞化処理工程の非破壊的確認検査が必要である。インピーダンス測定によって脱細胞化過程が追跡できることが示唆され、非破壊的検査に有用であると考えられた。

E. まとめ

既に欧米ではいくつかのグループが化学法によってヒト組織を脱細胞化し、再生型血管や心臓弁、皮膚として臨床応用を行っている。一部では、動物由来脱細胞化組織を用いた臨床応用も開始している。本研究において開発された超高压法による脱細胞化組織は、化学法よりも優れた細胞浸潤性や安全性を有しており、先行技術に対しても高い競争力をもっていると考えられる。本研究終了後の早い時点での臨床研究への移行および商品化を目指したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujisato T, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Reduction of Antigenicity and Risk of Infection in Regenerative Tissue Transplantation by Cold Isostatic Pressing. *High Press Biosci Biotech* 2007; 1(1): 161-5.
- 2) Kimura T, Iwai S, Moritan T, Nam KW, Mutsuo S, Yoshizawa H, Okada M, Furuzono T, Fujisato T, Kishida A. Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds by ultra high pressure treatment and controlled release of DNA from hydrogels for gene delivery. *J Artif Organs* 2007; 10: 104-8.
- 3) 澤田和也, 寺田堂彦, 藤里俊哉. 繊維と線維 (生体繊維の洗浄と再生医療への展開). *繊維と工業*, 2007; 63(5): 120-4.
- 4) 藤里俊哉, 北村惣一郎. 心臓弁. 笹 義人監修, 再生医療工学の技術. シーエムシー出版, 2007; 142-7.
- 5) Nam KW, Kimura T, Kishida A. Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels. *Biomaterials* 2007; 28: 3153-62.
- 6) Kimura T, Funamoto S, Kishida A. Gene transfection on the tissue engineered bone decellularized by ultra high hydrostatic pressurization. *Cont Rel Soc Newsletter*, 2007; 24(2): 10-1.
- 7) Nam KW, Kimura T, Kishida A. Controlling Coupling Reaction of EDC and NHS for Preparation of Collagen Gels Using Ethanol/Water Co-Solvents. *Macromol Biosci* 2008; 8: 32-7.
- 8) 木村 剛, 船本誠一, 橋本良秀, 佐々木秀次, 望月 學, 岸田晶夫, 小林尚俊. 脱細胞化角膜の特性とin vivo生体適合性評価. *東京医科歯科大学生体材料工学研究所年報* 2008; 41: 15-7.
- 9) 澤田和也, 寺田堂彦, 藤里俊哉. 超臨界流体抽出

- を応用したバイオスキャフォールド調製. *Jasco Report 超臨界特集9*, 111-6. ジャスコレポート社、東京、2007.
- 10) 山岡哲二、木村良晴、藤里俊哉. 医療用バイオベースマテリアル. 木村良晴、小原仁実監修. *バイオベースマテリアルの新展開*. シーエムシー出版、東京、2007.
 - 11) 岸田晶夫、藤里俊哉. バイオ材料としての脱細胞化生体組織. 秋吉一成、岸田晶夫監修. *次世代医療のための高分子材料工学*, 55-65. シーエムシー出版、東京、2008.
 - 12) 岸田晶夫. 第4章 生体用高分子材料. 田中順三、角田方衛、立石哲也編. *材料学シリーズNo. 33 バイオマテリアル 材料と生体の相互作用*, 131-72. 内田老鶴圃、東京、2008.
 - 13) 大西優貴、川北悠介、山崎健一、藤里俊哉、宇戸禎仁. 筋芽細胞の分化と細胞膜電位の変化. *生体医工学* 2008; 46 (1) : 64-8.
 - 14) 大西優貴、川北悠介、山崎健一、藤里俊哉、宇戸禎仁. C2C12細胞膜電位による分化判定と活性の評価. *電気材料技術雑誌* 2008; 17 (1) : 38-43.
 - 15) 寺田堂彦、木村 剛、岸田晶夫、藤里俊哉. バイオスキャフォールド. *バイオマテリアル* 2008; 26 (4) : 309-19.
 - 16) Sawada K, Terada D, Yamaoka T, Kitamura S, Fujisato T. Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue. *J Chem Technol Biotechnol* 2008; 83: 943-9.
 - 17) 山崎健一、赤土和也、林 宏行、寺田堂彦、近藤英雄、筒井博司、藤里俊哉. 無細胞生体由来組織とコラーゲンを足場とした培養骨格筋を用いたバイオアクチュエータの開発. *生体医工学* 2008; 46 (6) : 690-7.
 - 18) 船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、服部晋也、本田貴子、南 祐広、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 超高压処理技術を応用した人工角膜の作製と評価. *高压バイオサイエンスとバイオエンジニアリング* 2008; 2: 138-44.
 - 19) 近藤英雄、寺田堂彦、山崎健一、橋本成広、藤里俊哉. 電気インピーダンス法を用いたゼラチンハイドロゲルの力学特性の評価. *日本機械学会誌* 2009; 75 (751-A) : 360-5.
 - 20) Nam K, Murakoshi A, Kimura T, Fujisato T, Kitamura S, Kishida A. Study on the physical properties of tissue-engineered blood vessels made by chemical cross-linking and polymer-tissue cross-linking. *J Artif Organs* 2009; 12: 47-54.
 - 21) Mutsuo S, Yamamoto K, Furuzono T, Kimura T, Ono T, Kishida A. Pressure-induced molecular assembly of hydrogen-bonded polymers. *J Polym Sci Part B: Polym Phys* 2008; 46 (7) : 743-50.
 - 22) Nam K, Kimura T, Kishida A. Controlling coupling reaction of EDC and NHS for preparation of collagen gels using ethanol/water co-solvents. *Macromol Biosci* 2008; 8: 32-7.
 - 23) Miskon A, Ehashi T, Mahara A, Uyama H, Yamaoka T. Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19CL6 cells on different extramatrix components. *J Artif Organs*. 2009; 12: 111-7.
 - 24) Yamasaki K, Hayashi H, Nishiyama K, Kobayashi H, Uto S, Kondo H, Hashimoto S, Fujisato T. Control of myotube contraction by electrical pulse stimulation for bio-actuator. *J Artif Organs*. 2009; 12 (2) : 131-7.
 - 25) 藤里俊哉. *Tissue Engineeringによる心臓弁*. *Circulation Up-to-Date*. 2009; 4 (4) : 470-8.
 - 26) 藤里俊哉. *バイオメカニクス*. *人工臓器*. 2009; 38 (3) : 162-4.
 - 27) 赤土和也、山崎健一、中尾 誠、寺田堂彦、藤里俊哉、吉浦昌彦、筒井博司. 骨格筋培養のための機械刺激負荷に関する研究. *生体医工学*. 2009; 47 (2) : 231-6.
 - 28) 中尾 誠、赤土和也、山崎健一、寺田堂彦、藤里俊哉、吉浦昌彦、筒井博司. 培養骨格筋のバイオアクチュエータへの応用. *生体医工学*. 2009; 47 (6) : 560-5.
 - 29) Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, Kitamura S, Fujisato T, Kishida A. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials*. 2010; 31: 3590-5.
 - 30) Hashimoto Y, Funamoto S, Sasaki S, Honda T, Hattori S, Nam K, Kimura T, Mochizuki M, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. *Biomaterials*. 2010; 31: 3941-8.
 - 31) Sasaki S, Funamoto S, Hashimoto Y, Kimura T, Honda T, Hattori S, Kobayashi H, Kishida A, Mochizuki M. In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. *Mol Vision*. 2009; 15: 2022-8.
 - 32) Nam K, Kimura T, Funamoto S, Kishida A. Preparation of a collagen/polymer hybrid gel designed for tissue membranes. Part I: Controlling the polymer-collagen cross-linking process using an ethanol/water

- co-solvent. *Acta Biomater.* 2010; 6: 403-8.
- 33) Nam K, Kimura T, Funamoto S, Kishida A. Preparation of a collagen/polymer hybrid gel for tissue membranes. Part II: In vitro and in vivo biological properties of the collagen gels. *Acta Biomater.* 2010; 6: 409-17.
 - 34) Ishii D, Hui-Ying T, Mahara A, Murakami S, Yamaoka T, Lee W, Iwata T. In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers. *Biomacromol.* 2009; 10 (2): 237-42.
 - 35) Kakinoki S, Uchida S, Ehashi T, Murakami A, Yamaoka T. Modification of PLA Scaffolds Using Bioactive Peptide-Oligo (Lactic Acid) Conjugates. *Jpn Peptide Soc.* 2009; 449-50.
 - 36) Miskon A, Mahara A, Uyama H, Yamaoka T. A suspension induction for myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells on various ECM proteins. *Tissue Engineering.* in press.
 - 37) Ehashi T, Nishigaito A, Fujisato T, Moritan T, Yamaoka T. Peripheral nerve regeneration and electrophysiological recovery with CIP-treated allogeneic acellular nerve. *J Biomater Sci Polym Ed.* in press.
 - 38) Kakinoki S, Yamaoka T. Stable modification of poly(lactic acid) surface with neurite outgrowth-promoting peptides via hydrophobic collagen-like sequence. *Acta Biomater.* in press.
- ## 2. 学会発表
- 1) Nam KW, Murakoshi A, Kimura T, Fujisato T, Kishida A. Cross-linking and polymer immobilization of decellularized blood vessel for bioscaffold application. The 2007 Annual meeting of The Society for Biomaterials, Chicago, USA, April 18-21, 2007.
 - 2) Fujisato T, Funamoto S, Yoshida K, Yamaoka T, Kimura T, Kikuchi M, Kobayashi Y, Kishida A, Nakatani T. Regenerative Tissue Scaffolds Prepared by Gamma Ray Irradiation. The 2007 Annual meeting of The Society for Biomaterials, Chicago, USA, April 18-21, 2007.
 - 3) 江橋 具、永谷憲歳、橋本成広、藤里俊哉. 脱細胞化筋スキャフォールドを用いた骨髄由来間葉系幹細胞の筋分化誘導. 第46回日本生体医工学会、仙台、2007年4月25~27日.
 - 4) 寺田堂彦、澤田和也、緒方裕之、江橋 具、平工香織、鎌田和加子、吉田謙一、船本誠一、永谷憲歳、岸田晶夫、藤里俊哉、中谷武嗣. 生体内で自己組織化するバイオ人工血管の開発. 第46回日本生体医工学会、仙台、2007年4月25~27日.
 - 5) 寺田堂彦、澤田和也、江橋 具、平工香織、鎌田和加子、永谷憲歳、藤里俊哉、中谷武嗣、吉田謙一、船本誠一、岸田晶夫. 生体内で再細胞化する無細胞バイオ人工血管の開発. 第56回高分子学会年次大会、京都、2007年5月29-31日.
 - 6) Kobayashi H, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki Y, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Kishida A. Preparation of decellularized cornea by chemical and physical methods. TERMIS-NA 2007 Annual Conference & Exposition, Toronto, Canada, Jun 13-16, 2007.
 - 7) Terada D, Sawada K, Ogata H, Ehashi T, Hiraku K, Kamata W, Yoshida K, Funamoto S, Nagaya N, Kishida A, Fujisato T, Nakatani T. Development of the vascular graft having an in situ repopulationality. TERMIS-NA 2007 Annual Conference & Exposition, Toronto, Canada, Jun 13-16, 2007.
 - 8) Ehashi T, Nagaya N, Hashimoto S, Fujisato T. Effect of stretch culture of mesenchymal stem cells on their differentiation into skeletal muscle cells. TERMIS-NA 2007 Annual Conference & Exposition, Toronto, Canada, Jun 13-16, 2007.
 - 9) Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Regenerative vascular graft for aortic root reconstruction in porcine model. The Society for Heart Valve Disease 4th Biennial Meeting, New York, USA, June 15-18, 2007.
 - 10) 寺田堂彦、藤里俊哉. 移植用生体弁の力学評価. 平成19年度繊維学会年次大会 第9回生命工学科料とバイオテクノロジーに関するシンポジウム、東京、2007年6月20~22日.
 - 11) 藤里俊哉、菊地正博、坂下哲哉、舟山知夫、小林泰彦、船本誠一、木村 剛、岸田晶夫、山岡哲二. 放射線照射による脱細胞バイオスキャフォールドの調製. 第2回高崎量子応用研究シンポジウム、高崎、2007年6月21~22日.
 - 12) Ito Y, Kimura T, Higami T, Fujisato T, Kato A, Masuzawa T, Kishida A. Cell Culture on Nano-Vibrating Surface for Controlling Cell Function. TERMIS-EU 2007 Annual Meeting, London, UK, Sep 4-7, 2007.
 - 13) Kimura T, Okada M, Furuzono T, Yoshizawa H, Fujisato T, Kishida A. Cellular Delivery of DNA-Polymer Complex Encapsulating Inorganic Nanoparticles Prepared by Ultra High Pressurization. TERMIS-EU 2007 Annual Meeting, London, UK, Sep 4-7, 2007.
 - 14) Terada D, Sawada K, Ogata H, Ehashi T, Hiraku K, Kamata W, Yoshida K, Funamoto S, Nagaya N, Kishida A, Fujisato T, Nakatani T. Development