

- Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 1; 391 (1): 316-321.
9. Kubo S, Kataoka M, Tateno C, Yoshizato K, Kawasaki Y, Kimura T, Faure-Kumarl E, Palmer DJ, Ng P, Okamura H, Kasahara N. In Vivo Stable Transduction of Humanized Liver Tissue in Chimeric Mice via High-capacity Adenovirus-Lentivirus Hybrid Vector. *Hum Gene Ther.* 2010, 21: 40-50.
 10. Yoshizato K, Tateno C. A human hepatocyte-bearing mouse: An animal model to predict drug metabolism and effectiveness in humans. *PPAR Research.* 2009, 2009:1-11
 11. Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Chayama K. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol.* 2009, 51(6):1046-54.
 12. Nishie M, Tateno C, Utoh R, Kohashi T, Masumoto N, Kobayashi N, Itamoto T, Tanaka N, Asahara T, Yoshizato K. Hepatocytes from fibrotic liver possess high growth potential in vivo. *Cell Transplant.* 2009, 18 (5): 665-675.
 13. Yoshizato K, Tateno C. In vivo modeling of human liver for pharmacological study using humanized mouse. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009, 5(11):1435-1446.
 14. 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 (HBV) and clinical course of patients with chronic HBV infection. *J Infect Dis.* 2009, 1;199 (11): 1599-1607.
 15. Uno S, Endo K, Ishida Y, Tateno C, Makishima M, Yoshizato K, Nebert DW. CYP1A1 and CYP1A2 expression: comparing 'humanized' mouse lines and wild-type mice; comparing human and mouse hepatoma-derived cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009, 15; 237 (1): 119-126.
 16. Zion O, Genin O, Kawada N, Yoshizato K, Roffe S, Nagler A, Iovanna JL, Halevy O, Pines M. Inhibition of transforming growth factor beta signaling by halofuginone as a modality for pancreas fibrosis prevention. *Pancreas.* 2009, 38 (4): 427-435.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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
21. 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.
22. 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
23. 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 I X-producing hepatocytes in mice: potential for cell-based therapy in haemophilia B. *Thromb Haemost.* 2008;99:883-91.
24. 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.
25. Katoh M, Tateno C, Yoshizato K, Yokoi T. Chimeric mice with humanized liver. *Toxicology.* 2008;246:9-17.
26. 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.
27. 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. R. Utoh, C. Tateno and K. Yoshizato. The molecular mechanism underlying the liver mass optimization rule. *Design & Nature*, Algarve, Portugal, 2008 June 24-26.
2. Katutoshi Yoshizato A mouse experimental model that bears human liver as a tool to study human hepatitis from a holistic medical point of view. *ICHM, Kottayam Kerala India*, 2008 August 21-23.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働省科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
(分担)総合研究報告書(平成20~22年度)

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性肝炎に関する研究

研究分担者 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科恒常性制御学 教授

研究要旨: HCV 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ところ、IFNシグナルの活性化が顕著であり、ウイルス感染状態を強く反映していた。外来IFN投与に伴うIFN誘導遺伝子の発現誘導は非感染マウスに比し有意に抑制され、HCVによるIFN誘導シグナルの抑制機構の存在が示唆された。ウイルスの直接要因による遺伝子発現変化の有無を探るために、HBV及びHCV感染キメラマウスの肝組織 mRNA と microRNA (miRNA) の遺伝子発現変化を解析した。興味深いことに miRNA の遺伝子発現は mRNA と同様 HBV 及び HCV 感染キメラマウス間で明瞭に異なっていた。miRNA の制御候補遺伝子探索より、HBV 及び HCV 感染に特徴的な遺伝子発現が miRNA の発現変化により制御されている可能性が示唆された。一方キメラマウスに導入されてきた HCV は Patient H strain (H77) であり、我々は宿主細胞に対する HCV 感染能につき詳細に評価した。超可変領域 HVR1 における H77 血清での quasispecies をもとに構造領域におけるウイルスゲノムの多様性の評価を培養細胞系で行った。HVR1 に対する中和能を測定する実験の結果から、HVR1 外部の変異が長期培養および中和アッセイの結果から重要であることが示された。従って、HCV 感染能を評価する際は quasispecies も考慮に入れることが重要であるとされた。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)の in vivo 感染モデルは限られており、唯一チンパンジーを用いた感染実験が行われているのみである。キメラマウスを用いることによってヒト肝組織内での HCV の感染・複製機構の研究が可能になると同時に、感染に伴う宿主側の遺伝子発現変化も検討することが可能である。これまでに我々は、C 型慢性肝炎症例の肝組織における遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイにて解析し、肝炎組織内での情報伝達機構の変化を報告してきた(Honda et al. 2006)。本研究班では患者血清や HCV 感染クローン

を用い、キメラマウスに HCV を感染させ、肝組織における遺伝子発現変化を網羅的に解析し、HCV の複製・慢性化に伴う宿主側の変化とその機構を解明することを目的とした。

B. 研究方法

C 型慢性肝炎(CH-C)患者血清(Genotype 1b 2800 KIU/ml) 100 μ l を 9 匹のキメラマウスに感染させ、3 匹の感染マウスより肝組織を採取し HCV 非感染マウス(5匹)の肝組織と比較した(図1)。6匹の HCV 感染キメラマウスには IFN を投与し、IFN 投与後それぞれ 6 時間(4匹)、24

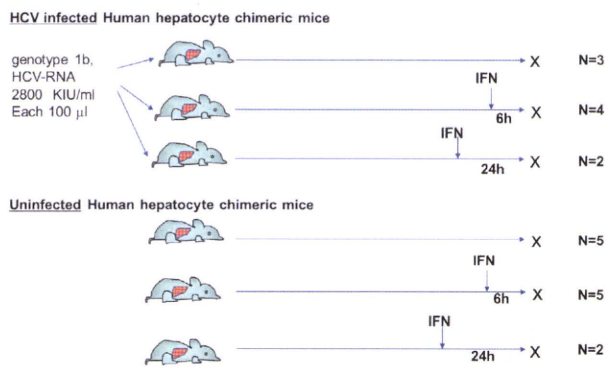


図1 解析マウス

時間後(2匹)に肝組織を採取した。同様にHCV非感染マウスにIFNを投与しIFN投与後それぞれ6時間(5匹)、24時間後(2匹)に肝組織を採取し遺伝子発現を比較した。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。mRNA及びmicroRNA(miRNA)の遺伝子解析に際してはコントロールマウス(5匹)、HCV感染キメラマウス(4匹)、HBV感染キメラマウス(4匹)、HBV感染キメラマウス+インターフェロン(IFN)投与マウス(5匹)及びHCV感染キメラマウス+IFN投与マウス(5匹)を解析対象とした。肝組織からmRNA及びmiRNAを抽出し、マイクロアレイを用いて発現解析を行った。miRNA発現解析には東レ3D-Gene chip(900個)を用いた。H77のquasispeciesの研究に際してはH77の構造領域とJFH-1の非構造領域を組み合わせたキメラクローンの構造領域を取り除いたカセットベクターを作成した。そのクローンにPatient Hの血清(H77)から構造領域(E1及びE2の全領域)のquasispeciesを含む断片を挿入し、得ら

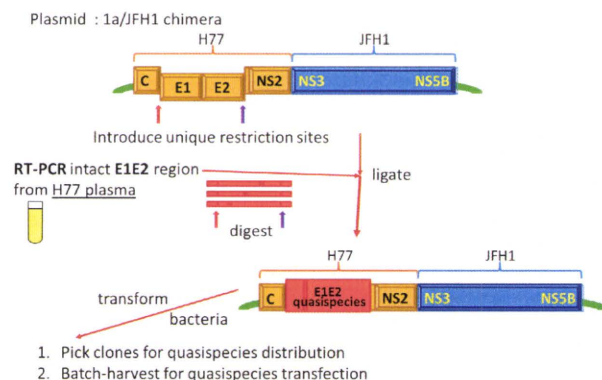


図2. HCV quasispeciesの導入

れたプラスミドのシーケンスを行った(図2)。更に、プラスミドを含む大腸菌は一つにまとめてウイルスRNAを合成し、培養細胞に導入させ、長期培養を行った。また、HVR1に対するポリクローナル抗体を利用し、各speciesのウイルスを中和し、比較を行った。

(倫理面への配慮)

本患者血清サンプルは患者からの承諾を得て研究目的に使用され、倫理上問題なく、ヘルシンキ宣言に沿っている。

C. 研究結果

HCV感染に伴い、非感染マウスと比較し有意($p < 0.05$)に発現誘導を認めた遺伝子群にはIFNシグナルに関わる遺伝子が多く認められ、発現低下遺伝子群には細胞周期に関する遺伝子が多く認められた。IFN投与に伴い、多くのIFN誘導遺伝子の発現が認められ、特に6時間後の肝組織で多く、24時間後では漸減傾向が認められた。興味深いことにIFN誘導遺伝子の発現はHCV感染マウスで有意に抑制されていた(図3)。

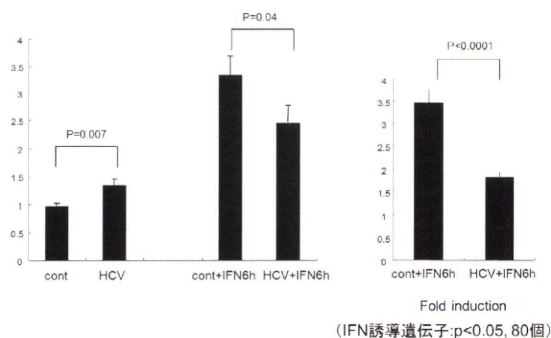


図3. HCV感染マウスでのIFN誘導遺伝子の発現抑制機序

一方HBV及びHCV感染キメラマウス間においては両者で肝組織内の遺伝子発現が明瞭に異なることが示された(図4)。

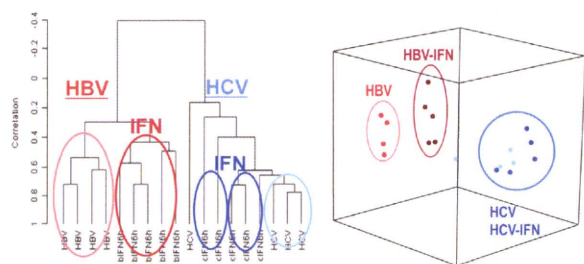


図4. HCV及びHBV感染キメラマウスに対するIFN投与に伴う変化

またIFN投与により、HBV感染キメラマウスでは明瞭な遺伝子発現変化が認められたが、HCV感染キメラマウスではIFNによる遺伝子発現変化が低い傾向が認められた。HBV感染マウスではアポトーシス関連遺伝子、Rasシグナル、p53関連遺伝子の発現上昇が認められ、HCV感染マウスではサイトカイン、炎症シグナル関連遺伝子の発現が認められた。同一サンプルを用いたmiRNA発現解析では、miRNAの発現もHBV感染キメラマウスとHCV感染キメラマウスでは明瞭に異なっていることが明らかとなった。両肝炎ウイルス感染で異なる発現を示すmiRNAを同定し、それらの制御候補遺伝子を探索した結果、HBV感染では細胞死・DNA障害、細胞

周期、癌関連遺伝子、HCV感染ではケモカイン・サイトカイン、線維化、代謝、アポトーシス関連遺伝子が制御候補遺伝子として挙げられ、これらの発現変動はmiRNAの発現により制御されている可能性が示唆された。

H77血清と同様のQuasispeciesを含む状態で長期培養されたウイルスのシーケンスを解析すると、血清中で最も多く含まれるHVR1 speciesよりも2番目のspeciesが優勢に認められた。HVR1に対するポリクローナル中和抗体(LMF87)を反応させると、species間で中和能に差があり、変異のないspeciesの中和能が高い傾向にあった(図5左)。しかしながら、変異のないspecies、変異のあるspecies間でHVR1の変異を交換して中和能を評価すると、変異のあるspeciesの中和能が高くなり、HVR1外部の変異が大きく中和能に影響するためと考えられた(図5右)。

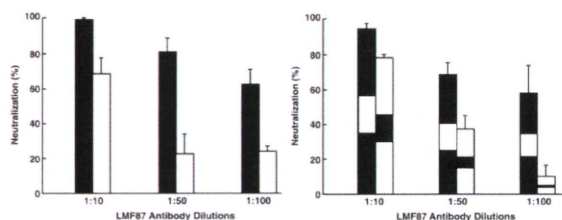


図5 抗HVR1抗体による中和能の測定

左図における黒: species A, 白: species B
右図における内部が白: HVR1がspecies B
右図における内部が黒: HVR1がspecies A

C. 考察

HCV感染キメラマウス、非感染キメラマウスの肝組織遺伝子発現プロファイルを検討した。HCV感染キメラマウスではIFNシグナルの活性化が顕著であり、ウイルス感染状態を強く反映していた。興味深い

ことに外来 IFN 投与に伴う IFN 誘導遺伝子の発現誘導は HCV 感染キメラマウスでは非感染マウスに比し有意に抑制されており、HCV による IFN 誘導シグナルの抑制機構の存在が示唆された。今後、HCV 感染に伴う細胞内シグナルの変化が IFN 誘導シグナルをどのように抑制するかをパスウェイ解析などにより詳細に検討する。

一方 HBV 及び HCV 感染キメラマウス間で遺伝子発現 (mRNA, miRNA) を比較した。両者では明瞭に遺伝子発現が異なっており、これまでにヒト肝組織において我々が報告した結果と一致した。しかしながら、キメラマウスを用いた検討では、よりウイルスの直接要因による遺伝子発現変化を反映していることが示唆された。興味深いことに miRNA の遺伝子発現も HBV 感染キメラマウス、HCV 感染キメラマウスで明瞭に異なっていることが明らかとなり、異なる発現を示す miRNA の制御候補遺伝子探索より、HBV 感染、HCV 感染に特徴的な遺伝子発現が miRNA の発現により制御されている可能性が示唆された。

更にこれまでキメラマウスに用いられてきた HCV 感染クローンの由来である H77 血清内 HCV ゲノムを詳細に検討することにより、HVR1 外部の構造領域内の変異が Quasispecies 間の生存に関わる相互作用及び中和抗体による反応に影響を与えることが明らかとなった。HVR1 をターゲットとした中和反応はその配列が同一であれば効率が高くなるが、その外部の変異が中和能に大きく影響する。これは HCV で問題とされる中和反応からの逃避のメカニズムの一つとされ、ワクチンターゲ

ットを探る上で重要であると考えられた。今後この Quasispecies の系をキメラマウスに導入することにより、感染防御の機構及び感染による新たな細胞内シグナル伝達系の機構を解明することが期待できる。

D. 健康危険情報
特記事項なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sunagozaka H, Honda M, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2011 In press
- 2) Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab*. 2010 Nov 3;12(5):483-95.
- 3) Honda M, Nakamura M, Tateno M, Sakai A, Shimakami T, Shirasaki T, Yamashita T, Arai K, Yamashita T,

- Sakai Y, Kaneko S. Differential interferon signaling in liver lobule and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2010 Nov;53(5):817-26.
- 4) Honda M, Sakai Y, Yamashita T, Yamashita T, Sakai A, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tatsumi I, Miyazaki Y, Tanno H, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system cancers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Sep 10;400(1):7-15.
- 5) Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2010 Aug;139(2):499-509.
- 6) Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. *J Infect Dis*. 2010 Jul 1;202(1):75-85.
- 7) Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y, Kaneko S. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res*. 2010 Jun 1;70(11):4687-97.
- 8) Hodo Y, Hashimoto SI, Honda M, Yamashita T, Suzuki Y, Sugano S, Kaneko S, Matsushima K. Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. *Genomics*. 2010 Apr 95(4):217-23.
- 9) Takatori H, Yamashita T, Honda M, Nishino R, Arai K, Yamashita T, Takamura H, Ohta T, Zen Y, Kaneko S. dUTP pyrophosphatase expression correlates with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2010 Mar 30(3):438-46
- 10) Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Matsushima K, Kaneko S. CD14+monocytes are vulnerable and functionally impaired under ER stress in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2010 Mar 59(3):634-43
- 11) Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. Differential microRNA

expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2009 Apr 49(4):1098-112

なし
3.その他
特になし

12) 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. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. Gastroenterology. 2009 Mar 136(3):1012-24

13) Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T, Kaneko S. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 2009 Jan;50(1):100-10

14) Minagawa H, Honda M, Miyazaki K, Tabuse Y, Teramoto R, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Ueda T, Kamijo K, Kaneko S. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the human hepatocellular carcinoma. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Feb 1;366(1):186-92.

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

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20～22年度）

レプリコンを用いたC型肝炎ウイルス増殖に関与する宿主分子の網羅的解析、
リバースジェネティックスの構築

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 C型肝炎ウイルス(HCV)の感染排除にはPEG化インターフェロン(IFN)とリバビリンの併用療法がおこなわれているが、未だにこの治療に効果を示さない患者が数多く残っており、これら難治性のHCV感染患者には新たな抗ウイルス治療薬の開発が必要である。そこで新たな抗HCV薬開発のための標的を探索し、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的とした。組換え体HCVおよびレプリコン細胞を用いてHCVと宿主細胞との相互作用の網羅的な解析をおこなった結果、HCVの感染性粒子中に存在するコアタンパク質がジスルフィド結合によって二量体を形成していることを新たに見出した。この培地をプロテイナーゼKで処理するとこの二量体コアタンパク質のみが検出されるようになり、非イオン性界面活性剤の共存下でこの二量体が分解されたことから膜で包まれたウイルス様粒子構造にはこの二量体コアタンパク質のみが存在することがわかった。しかしながら非イオン性界面活性剤の共存下においてもトリプシンに対してはこの二量体が抵抗性を示すことから、HCVのウイルス様粒子中のヌクレオキャプシドは二量体コアタンパク質で構成されていて、それぞれの二量体コアタンパク質間は密に接しており、塩基性アミノ酸に富んだコアタンパク質のアミノ末端領域はヌクレオキャプシドの中心部に存在することが考えられた。この二量体はコアタンパク質がプロセッシングによって産生される小胞体画分において既に形成されていることが明らかになった。またアミノ酸変異体を作製して解析したところ、このジスルフィド結合はコアタンパク質の128番目のシステイン残基一つで形成されることがわかった。この128番目のシステインをアラニンに変異させた変異体型組換え体HCVは野性型組換え体HCVと同時に細胞内に導入することによって野性型の感染性粒子の産生を抑制した。またこの128番目のシステイン残基はこれまで報告されているHCVの遺伝子配列のすべてにおいて保存されていることからこのジスルフィド結合そしてそれに関わる細胞因子を制御することでHCVの粒子形成を抑制することが可能になり、その増殖を制御する新たな抗HCV薬開発の標的になることが考えられた。

A. 研究目的

新たな抗HCV薬開発のための標的を探索する目的で、組換え体HCVおよびレプリコン細胞を用いてHCVと宿主細胞との相互作用の網羅的な解析によってこのウイルスの感染増殖に関わるウイルス因子と細胞側因子の詳細を明らかにして、これを効果的に抑制する薬剤を抗HCV薬候補として同定することを目的とした。

B. 研究方法

1. 組換え体HCV感染性ウイルス産生細胞および対照として非産生細胞から感染性ウイルス産生に機能することが知られている脂肪滴および小胞体を分画し、その総タンパク質のプロテオーム解析をおこない。ウイルス産生細胞特異的に存在するタンパク質の同定をおこなっ

た。

2. 組換え体 HCV 感染性粒子産生細胞の培養上清から前年度見出したジスルフィド結合型二量体 HCV コアタンパク質に関して、実際にウイルス粒子に含まれているコアタンパク質の正常を明らかにするため、このウイルス様粒子を含む培養上清を非イオン性界面活性剤の存在、非存在下においてプロテイナーゼ K やトリプシンで処理し、コアタンパク質のプロテアーゼに対する反応性を検討した。
3. 1 において見出した HCV コアタンパク質のジスルフィド結合によって形成された複合体の生化学的解析および組換え体 HCV 感染性ウイルス産生細胞内における動態、ならびに人工的な変異体解析によるコアタンパク質のジスルフィド結合部位の同定をおこなった。
4. 組換え体 HCV 粒子には感染性を有するものと非感染性のものが存在するため、その感染性とジスルフィド結合型二量体 HCV コアタンパク質との関連を明らかにするため、浮遊密度勾配超遠心法を用いて感染性の異なるウイルス様粒子を分画し、ジスルフィド結合型二量体を検出した。
5. 野性型組換え体 HCV と 128 番目のシステム変異型組換え体 HCV のそれぞれの合成 RNA ゲノムを培養細胞に導入することで変異型コアタンパク質の粒子産生に対する阻害効果の検討をおこなった。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒトからのサンプルは用いていないため、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

1. 組換え体 HCV 感染性ウイルス産生細胞から得た脂肪滴および小胞体画分の総タンパク質のプロテオーム解析によって、この細胞に特異的に存在するタンパク質をいくつか見出した。しかしながら、それらは既に報告されているものであった。しかしながら、その解析過程で培養上清中、脂肪滴、そして小胞体画分の HCV コアタンパク質がジスルフィド結合によって複合体を形成しているものが存在することを見出した。
2. 組換え体 HCV 感染性粒子産生細胞の培養上清をプロテイナーゼ K で処理した場合、培養上清に存在した単量体コアタンパク質はすべて消化され、ジスルフィド結合型二量体のみが検出され、プロテイナーゼ K に抵抗性を示すことがわかった。この抵抗性は非イオン性界面活性剤の共存下では失われるため、ジスルフィド結合型二量体コアタンパク質は膜構造に含まれた構造内、つまりウイルス粒子構造に含まれることが示唆された。プロテイナーゼ K の代わりにトリプシンを用いた場合には、非イオン性界面活性剤の共存下においてもコアタンパク質はトリプシンに対して抵抗性を示した。
3. HCV コアタンパク質だけを培養細胞に発現させてもその複合体は観察されたため、野性型のコアタンパク質とエピソード付きのコアタンパク質の双方を同時に培養細胞で発現させたところ野性型とタグ付きのコアタンパク質からなる複合体が観察され、この複合体がジスルフィド結合によって形成された二

量体コアタンパク質であることがわかった。

4. コアタンパク質中の一アミノ酸変異解析によりこのジスルフィド結合は128番目のシステインで形成されることがわかった。またこのシステインをアラニンに置換させた変異体組換え体HCVは感染性粒子の産生が著しく抑制された。
5. 浮遊密度勾配超遠心法を用いて感染性ウイルス様粒子を含む分画と非感染性ウイルスを含む分画を得て、そこに存在するコアタンパク質の性状を解析したが、そのどちらにもジスルフィド結合型二量体コアタンパク質が存在した。
6. 組換え体 HCV ゲノムのコアタンパク質領域の128番目のシステインをアラニンやセリンに変化させた変異体組換え体 HCV ゲノムを作成し、野性型組換え体 HCV ゲノムと同時に HuH-7 細胞に導入して、培地への粒子産生を検討したが、変異体の量依存的に培地への粒子産生量が低下することがわかった。

D. 考察

1. HCV のウイルス様粒子のヌクレオキャプシドを構成しているコアタンパク質はそのほとんどがジスルフィド結合型二量体コアタンパク質であり、このジスルフィド結合型二量体コアタンパク質がヌクレオキャプシドの構成する単位である可能性が考えられた。
2. このジスルフィド結合を阻害する変異により感染性粒子産生が抑制されるため、この二量体形成は粒子産生に重要な役割をもつと考えられる。

3. HCV のウイルス様粒子のヌクレオキャプシドのトリプシンに対する抵抗性からヌクレオキャプシドではジスルフィド結合型二量体コアタンパク質が密接に相互作用し、トリプシンの切断部位が豊富に存在するコアタンパク質のアミノ末端領域がヌクレオキャプシドの内側に隠れた構造をとっていることが推定された。
4. 128 番目のシステインに変異を持つ組換え体 HCV ゲノムは量依存的に野性型組換え体 HCV ゲノムからの粒子産生を抑制したこと、そしてこのジスルフィド結合に関与する 128 番目のシステインはこれまで報告されているすべての HCV 株のコア配列で保存されていることからコアタンパク質のジスルフィド結合を阻害し、二量体化を抑制することで HCV の粒子産生を阻害することが可能になることが示唆された。

E. 結論

1. HCV のウイルス様粒子中のヌクレオキャプシドはジスルフィド結合型二量体コアタンパク質から構成されており、このジスルフィド結合を阻害し、二量体化を阻害する薬剤が得られれば、効率良く HCV の粒子産生を阻害するこれまでに例のない抗 HCV 薬となる可能性が考えられた。
2. ジスルフィド結合はコアが最初に翻訳・プロセッシングによって産生される小胞体において形成されているが、この領域においてこのジスルフィド結合を形成するメカニズムを明らかにすることは新しい抗 HCV 薬開発に重要な情報となりうると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J. Virol.*, 84(18), 9118-9127, 201
- 2) 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.
- 3) Hussein H. Aly, Yue Qi, Kimie Atsuzawa, Nobuteru 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) Takayuki Murata, Yoshitaka Sato, Sanae Nakayama, Ayumi Kudoh, Satoko Iwahori, Hiroki Isomura, Masako Tajima, Takayuki Hishiki, Takayuki Ohshima, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno, and Tatsuya Tsurumi: TORC 2, a coactivator of CREB, promotes Epstein-Barr virus reactivation from latency through interaction with viral BZLF1 protein, *J. Biol. Chem.* 284, 8033-8041, 2009
- 5) Kazuo Sugiyama, Kenji Suzuki, Takahide Nakazawa, , Kenji Funami, Takayuki Hishiki, Kazuya Ogawa, Satoru Saito, Kumiko W. Shimotohno, Takeshi Suzuki, Yuko Shimizu, Seiri Tobita, Makoto Hijikata, Hiroshi Takaku,

Kunitada Shimotohno: Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro. *J. Virol.*, 83(13), 6922-6928, 2009.

6) Kaku Goto, Koichi Watashi, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. *Cancer Science*, 100 (10), 1943-1950, 2009.

7) 土方 誠: HCV と肝発癌 医学のあゆみ 224 (9), 693-698 2008

8) 宮成 悠介、臼田 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

9) 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) Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. 17th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sept 10-14 2010

2) Yue Qi, Hussein H. Aly, Chieko Tsutsui, Takashi Fujita, Makoto Hijikata: IRF7 dependent IFN-alpha response in the early phase of the viral infected hepatocytes. 17th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sept 10-14 2010

- 3) Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. The Association of Pacific Rim University, Research symposium on Interface between Molecular Biology and Nano Biology, Kyoto, Japan, Nov. 24-26 2010
- 4) Yuichi Abe, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: Chemical biological analysis for a mechanism of infectious HCV particle production. The Association of Pacific Rim University, Research symposium on Interface between Molecular Biology and Nano Biology, Kyoto, Japan, Nov. 24-26 2010
- 5) 久島透嘉、脇田隆字、土方誠: Core による S-S 結合型二量体は C 型肝炎ウイルスの粒子形成に必須である、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、平成 22 年 11 月 7-9 日、徳島 2010
- 6) 阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、脇田隆字、下遠野邦忠、土方誠: 感染性 HCV 粒子産生に関わる新規細胞内シグナル経路の探索、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、平成 22 年 11 月 7-9 日、徳島 2010
- 7) 土方誠、阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、齊月、脇田隆字、下遠野邦忠、: シンポジウム 06 ウイルス培養系を用いた C 型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明、臨床分離 HCV 株の培養と性状、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、平成 22 年 11 月 7-9 日、徳島 2010
- 8) Hussein H. Aly, Chieko Tsutsui, Yue Qi, Yukihiro Kushima, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: TLR8 induces RIG-I gene expression and efficient interferon response against HCV infection in human hepatocytes. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Nice, France, Oct 3-7 2009-
- 9) 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-
- 10) 久島透嘉、脇田隆字、土方誠: core の変異体を用いた C 型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析、第 57 回日本ウイルス学会学術総会、平成 21 年 10 月 26 日、東京 2009
- 11) 阿部雄一、脇田隆字、土方誠: ケミカルバイオロジー手法を用いた C 型肝炎ウイルス感染性粒子形成機構解明の試み 第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月 9-12 日、横浜 2009
- 12) 筒井智恵子、アリ・ハッサン・フセイン・久島透嘉、土方誠: C 型肝炎ウイルスを抑制する転写因子 IRF7 の肝特異的発現制御機構の解析 第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月 9-12 日、横浜 2009
- 13) 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
- 14) 1)アリ フセイン,齊月,山口達哉,下遠野邦忠,土方誠
不死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)

15) Hussein H Aly, Yue Qi, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: A prolonged culture system for the study of the entire life cycle and the pathogenesis of natural 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)

16) 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)

17) 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,)

含む、C 型肝炎ウイルスの感染抑制剤」
発明者 土方 誠、阿部雄一、脇田隆宇、
出願日 2010 年 9 月 30 日、出願番号 特願
2010-222045

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

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

2. 実用新案登録 特になし。
3. その他 特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) プロスタグランジン 12 のアゴニストを

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20～22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

インターフェロン- γ 遺伝子治療を基盤とした治療抵抗性C型肝炎治療システムの構築

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 I型インターフェロン(IFN)抵抗性肝炎に対する治療戦略の確立を目的に、まず、IFN- α と同等の抗HCV効果を示しうるIFN- γ を長期持続的に発現することが可能なplasmid DNA (pDNA)を用いて慢性疾患であるアトピー性皮膚炎モデルマウスの系で治療効果を評価した。その結果、皮膚炎発症を顕著に抑制可能であり、長期持続型IFN- γ 発現pDNAの慢性疾患に対する有用性が明らかとなった。そこで、IFN- α 抵抗性HCV感染キメラマウスを用い同様に検討したところ、遺伝子導入後有意にHCVウイルス価の減少が認められ、本研究で開発した長期持続型IFN- γ 発現pDNAの治療抵抗性肝炎治療上の有用性が証明された。さらに、IFN- γ の薬理作用増強を目的に、体内動態制御型IFN- γ 融合タンパク質を複数設計し、これらIFN- γ 融合タンパク質発現pDNAを構築した。その結果、いずれの融合タンパク質も血中における平均滞留時間が有意に延長しIFN- γ の血中滞留性が改善されたことから、IFN- γ 作用時間の持続化が可能であることが明らかとなった。

A. 研究目的

新規治療法の早期開発が課題となっている治療抵抗性肝炎治療を実現するため、IFN- α と同等あるいはそれを上回る抗HCV効果を示しうるIFN- γ を基盤とする遺伝子治療法を確立する。長期持続型IFN- γ 発現pDNAの治療上の有効性を慢性疾患病態モデルマウスで証明する。また、IFN- γ の薬理作用増強を目的として、血中滞留性が大幅に改善可能であることが期待できるmouse serum albumin (MSA)、albumin binding peptide (ABP)を融合した新規IFN- γ 融合タンパク質を設計・構築し、その機能・性質、治療効果の向上を評価する。

B. 研究方法

1. 長期持続型IFN- γ 発現pDNAのアトピー性皮膚炎治療への適用

pDNAの構築: 持続的な遺伝子発現が可能であるpDNA骨格pCpG-mcs (InvivoGen) をもとにマウスIFN- γ cDNAを組み込みpCpG-mulIFN- γ を構築した。**マウス:** ICR雄性マウス(4週齢)および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をマウスの体重の約8%に相当する大容量の生理食塩水溶液として、尾静脈内へ急速投与した。**血中サイトカイン濃度の測定:** 経時的にマウス尾静脈より採血し、血清中サイトカイン濃度をELISA法により測定した。**mRNAの測定:** マウス脾臓から採取したtotal RNAを用いてcDNAを調整し、mRNA量をreal-time PCR法により測定した。**皮膚炎発症抑制効果の評価:** 皮膚の状態に対するスコア評価、搔破回数の測定、経皮水分蒸散量(TEWL)の測定、および、皮膚病変部の組織学的評価を行うことで評価した。

2. 持続IFN- γ 発現pDNAを用いたHCV感染モデルマウスへの適用

pDNA: 持続的な遺伝子発現が可能であるpDNA骨格(pCpG-mcs: InvivoGen)にヒトIFN- γ cDNAを挿入することでpCpG-huIFN- γ を構築した。**培養細胞:** ジシストロニックにホタルルシフェラーゼを発現するHCVサブゲノミックレプリコン

Lucneo#2細胞を用いた。抗HCV効果については処置後のルシフェラーゼ活性を測定することでHCV量の指標とした。ハイドロダイナミクス法を利用した持続的な遺伝子発現の確認：ICR雄性マウス（4週齢）およびCB17/Icr-Prkdcscid/CrlCrlj雌性マウス（6週齢）に構築したpCpG-huIFN- γ をマウス体重の約10%に相当する容量の生理食塩水に溶解し、マウス尾静脈内に急速投与した。得られる遺伝子発現については経時的に採血をおこない、血中IFN- γ 濃度をELISA法を用いて測定することで評価した。ヒト肝細胞キメラマウス：uPA-SCIDマウスにヒト肝細胞を移植することで作製した中置換キメラマウスを用いた。血中ヒト血清アルブミン濃度を測定することでヒト肝細胞数を評価した。HCV感染モデル：中置換キメラマウスにI型IFN抵抗性を示すHCV genotype1bを感染させることで治療抵抗性C型肝炎モデルマウスを作製した。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とIFN- γ 発現量の評価：naked pDNAをマウス体重の約15%に相当する容量の生理食塩水に溶解し、マウス尾静脈内に急速投与した。得られる遺伝子発現については血中IFN- γ 濃度をELISA法を用いて測定することで評価した。抗HCV効果の評価：経時的にマウス尾静脈より採血し、real-time PCR法にて血中HCV RNA量を測定した。

3. 新規血中滞留型IFN- γ 発現pDNAの構築

pDNA：IFN- γ のC末端、あるいはN末端にMSAを連結した融合タンパク質をコードする遺伝子をpcDNA3.1 (Invitrogen) に組み込むことでpCMV-IFN- γ -MSAあるいはpCMV-MSA-IFN- γ を構築した。また、マウスIFN- γ のC末端、あるいはN末端にABPを連結した融合タンパクをコードする遺伝子をpcDNA3.1に組み込みpCMV-IFN- γ -ABPあるいはpCMV-ABP-IFN- γ を構築した。培養細胞：COS7細胞に遺伝子導入後培養上清を回収し下記の解析を行った。IFN- γ 融合タンパクの解析：各種IFN- γ 融合タンパク質の分子量についてはウェスタンブロッティング法を用いて評価した。生物活性についてはIFN- γ 活性依存的にルシフェラーゼを発現するpDNAを利用したレポーターアッセイ

法を用いて評価した。アルブミン親和性の評価にはMSAをコートしたプレートに各種IFN- γ を添加した後、結合したIFN- γ 量をELISA法により評価した。マウスおよび遺伝子導入法：ICR雄性マウス（4週齢）およびbalb/c雄性マウス（7週齢）を用いた。遺伝子導入法としてハイドロダイナミクス法を用いた。血中滞留性および抗腫瘍効果の評価：ICRマウスへ遺伝子導入後に、経時的に血中IFN- γ をELISA法により測定することで血中滞留性の評価を行った。balb/cマウス尾静脈よりマウス結腸癌細胞株CT-26を移植することで肺転移モデルを作製し、癌細胞移植3日後に各種IFN- γ 発現pDNAを投与し、癌細胞移植14日後の肺結節数を計測することで抗腫瘍効果を評価した。

C. 研究結果

1. 長期持続型IFN- γ 発現pDNAのアトピー性皮膚炎への適用

アトピー性皮膚炎モデルマウスにpCpG-muIFN- γ を投与した後の血清中IFN- γ 濃度を経時的に測定したところ、80日以上もの長期にわたり高い血清中IFN- γ 濃度が検出された。このときTh1サイトカインであるIL-12の血清中濃度は有意な上昇が認められた一方、Th2応答により産生が亢進するIgEは有意に抑制されていた。また、脾臓中mRNA発現を測定した結果、未処置群と比較してpCpG-muIFN- γ 投与群ではTh2サイトカインおよびTARC発現の低下が認められ、IFN- γ 発現の持続によるThバランスの正常化が示唆された。皮膚炎発症抑制効果は、pCpG-muIFN- γ 投与群では皮膚炎の発症及び進行が顕著に抑制され、併せて搔破回数の減少およびTEWLも有意に抑制された。また、組織学的評価よりpCpG-muIFN- γ 投与群では表皮組織の肥厚ならびにリンパ球や好中球、マスト細胞の浸潤といった所見が認められなかった。

2. 持続IFN- γ 発現pDNAを用いたHCV感染モデルマウスへの適用

サブゲノミックレプリコン細胞へ遺伝子導入後、抗HCV効果を評価したところ、遺伝子導入24時間後IFN- γ 発現pDNA導入群はmock群の約40%に、36時間後では数%にま

でHCV数を減少させることが可能であった。そこで、正常マウス（ICRマウス）を用いて発現プロファイルを評価した結果、低投与量（0.11 μ g/mouse）でIFN- γ 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- γ 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。また、正常マウスと比較して遺伝子導入効率が低い可能性が示されているSCIDマウスにおいても、正常マウスの場合と同様に持続的なIFN- γ の血中濃度が得られた。そこで、IFN- α 抵抗性HCV感染キメラマウスを用いて持続的なIFN- γ 遺伝子発現のC型肝炎治療における有効性を評価した。その結果、遺伝子導入3日後よりウイルス価の減少が認められ、7日後以降は検出限界以下となることが明らかとなり、持続的にヒトIFN- γ を作用させることがIFN- α 抵抗性C型肝炎の治療に非常に有効であることが示された。また、血清中ヒトIFN- γ 濃度が1000pg/mLと低い濃度で抗HCV効果が得られることが明らかとなった。しかしながら、ヒトIFN- γ 遺伝子導入前後で血中ヒトアルブミン濃度が遺伝子投与前と比較して1/2~1/5まで低下することが観察された。このような現象は、対照群では確認されなかったため、高濃度のヒトIFN- γ を暴露することでヒト肝細胞の機能が低下した、あるいはヒト肝細胞数が減少した可能性を示すものと考えられる。

3. 新規血中滞留型IFN- γ 発現pDNAの構築

構築したpCMV-IFN- γ -MSAおよびpCMV-MSA-IFN- γ をCOS-7細胞に遺伝子導入した後、培養上清を回収しタンパク質の活性を評価した。その結果、MSA融合IFN- γ タンパク質のIFN- γ 生物活性は、天然型IFN- γ の200分の1程度にまで活性が著しく低下した。また、各タンパク質をマウスへ静注した場合の血中プロファイルから、MSAの融合化によりIFN γ タンパク質の血中滞留性が向上することが確認されたが、肺への癌細胞転移を検討した結果、MSA融合IFN- γ 発現pDNA投与群は天然型IFN- γ 発現pDNA投与群とほぼ同程度の抑制効果しか得られなかった。そこで次に、新たに構

築したpCMV-IFN- γ -ABPおよびpCMV-ABP-IFN- γ をCOS-7細胞に遺伝子導入した後、培養上清を回収しタンパクの性状・機能の解析を行った。その結果、ABP融合IFN- γ タンパク質のIFN- γ 生物活性は、天然型IFN- γ の半分程度の活性を有することが明らかとなった。次に、アルブミンとの親和性を評価した結果、天然型IFN- γ はMSAにほとんど親和性を示さないのに対し、ABP融合IFN- γ タンパク質はMSAへの結合能を有することが確認できた。そこで各ABP融合タンパク質発現pDNAを遺伝子導入した場合の血中滞留性を評価したところ、ABP融合タンパク質を遺伝子導入群の血中滞留性は天然型IFN- γ 遺伝子導入群と比較して著しく増大することが明らかとなった。肺への癌細胞転移は、ABP融合IFN- γ 発現pDNA投与群において天然型IFN- γ 発現pDNA投与群と比べより高い抑制効果が得られ、未処置群の約50%まで肺転移を抑制した。

D. 考察

IFN- γ は、HCVサブゲノミックレプリコン細胞やチンパンジーを用いた動物モデルにおいてI型IFNと同等あるいはそれを上回る抗HCV効果を有するために治療抵抗性肝炎への適用が期待されている。また、I型IFNと比べ異なる作用機序で抗HCV作用を示すことが報告だけではなく、そのことに加えI型IFNとの併用により相乗効果をもたらすことが知られている。このような直接的な抗ウイルス作用を有するだけでなく免疫調節も有しているため、間接的な抗ウイルス作用も有すると考えられている。しかしながら、IFN- γ の生体内での消失半減期は非常に短く、持続的な効果が得られ難いため肝炎治療への応用は制限されているのが現状である。そこで本研究では二種類の異なるアプローチに基づき持続作用型IFN- γ 発現pDNAを開発した。まず、長期IFN- γ 発現pDNAを構築することで持続的にIFN- γ を作用させることを試みた。この長期IFN- γ 発現pDNAを慢性疾患であるアトピー性皮膚炎モデルマウスへ投与することで劇的に治療効果の改善が得られることを明らかとした。また、このpDNAをI型IFN抵抗性HCV感染

キメラマウスへ投与することで遺伝子導入7日後には血中HCV RNA量が検出されず、その抗HCV作用が長期にわたり持続することも明らかとなった一方、肝細胞への有害作用も認められた。血清中ヒトIFN- γ 濃度が1000pg/mLと低い濃度でも抗HCV効果が得られたこと、およびこのマウスにおいてはヒトアルブミン濃度の低下の程度が低かったことから、投与量を最適化することでこの有害作用を減弱しつつ抗HCV効果を得ることが可能であると推察される。

次に、血中滞留型IFN- γ の開発によるIFN- γ の薬理作用増強を試みた。IFN- γ とMSAとの融合タンパク質は血中滞留性が大幅に向上したが、IFN- γ 活性が著しく低下した。IFN- γ はホモ二量体の形で生物活性を示すため、高分子であるMSAを融合することで、IFN- γ の二量体形成不全および受容体との親和性の低下がIFN- γ 活性低下に寄与すると推察される。そこで血中滞留性を向上させ、生物活性の保持が期待できる低分子ペプチドを新たに融合することで改善を試みた結果、MSAとの融合タンパク質で確認されたような劇的な生物活性の低下を回避することができ、IFN- γ の血中滞留性を大幅に改善できることが明らかとなった。

E. 結論

慢性疾患およびHCV感染モデルにおいて長期IFN- γ 発現pDNAの有用性を検討した。検討の結果、持続的なIFN- γ 遺伝子発現により慢性疾患およびHCV感染治療に有効であることを明らかにした。また、血清アルブミンと親和性を持つ低分子ペプチドを融合させることでIFN- γ の生物活性を保持しつつ血中滞留性が向上できることを明らかにした。以上の結果より、本研究で開発した持続作用型IFN- γ 発現pDNAの治療抵抗性肝炎治療への応用の可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Zang L, Nishikawa M, Machida K, Ando M, Takahashi Y, Watanabe Y, and Takakura Y. Inhibition of nuclear delivery of plasmid DNA and transcription by interferon γ :

hurdles to be overcome for sustained gene therapy. Gene Ther. 2011, in press.

2. Miyakawa N, Nishikawa M, Takahashi Y, Ando M, Misaka M, Watanabe Y, Takakura Y. Prolonged circulation half-life of interferon γ activity by gene delivery of interferon γ -serum albumin fusion protein in mice. J Pharm Sci. 2011, in press.
3. Takiguchi N, Takahashi Y, Nishikawa M, Matsui Y, Fukuhara Y, Oushiki D, Kiyose K, Hanaoka K, Nagano T, Takakura Y. Positive correlation between the generation of reactive oxygen species and activation/reactivation of transgene expression after hydrodynamic injection into mice. Pharm Res. 2011, in press.
4. Takahashi Y, Vikman E, Nishikawa M, Ando M, Watanabe Y, Takakura Y. Persistent interferon transgene expression by RNA interference-mediated silencing of interferon receptors. J Gene Med; 12(9), 739-746 (2010)
5. Hattori K, Nishikawa M, Watcharanurak K, Ikoma A, Kabashima K, Toyota H, Takahashi Y, Takahashi R, Watanabe Y, Takakura Y. Sustained exogenous expression of therapeutic levels of IFN-gamma ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice via Th1 polarization. J Immunol; 184(5), 2729-2735 (2010)
6. Yamaoka A, Guan X, Takemoto S, Nishikawa M, Takakura Y. Development of a novel Hsp70-based DNA vaccine as a multifunctional antigen delivery system. J Control Release; 142(3), 411-415 (2010).
7. Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Nonviral vector-mediated RNA interference: its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy. Adv Drug Deliv Rev. 2009 Jul 25;61(9):760-6. (2009)
8. Mitsui M, Nishikawa M, Zang L, Ando M, Hattori K, Takahashi Y, Watanabe Y, Takakura Y. Effect of the content of unmethylated CpG dinucleotides in plasmid DNA on the sustainability of transgene expression. J Gene Med., 11(5), 435-443 (2009)
9. Nishikawa M, Nakayama A, Takahashi Y, Fukuhara Y, Takakura Y. Reactivation of silenced transgene expression in mouse liver by rapid, large-volume injection of

- isotonic solution. *Hum Gene Ther.*, 19(10), 1009-1020 (2008)
10. Takahashi Y, Yamaoka K, Nishikawa M, Takakura Y. Quantitative and temporal analysis of gene silencing in tumor cells induced by small interfering RNA or short hairpin RNA expressed from plasmid vectors. *J Pharm Sci.*, 98(1), 74-80 (2009)
 11. Takahashi Y, Kaneda H, Takasuka N, Hattori K, Nishikawa M, Watanabe Y, Takakura Y. Enhancement of antiproliferative activity of interferons by RNA interference-mediated silencing of SOCS gene expression in tumor cells. *Cancer Sci.* 2008 Aug;99(8):1650-5. (2008)
2. 学会発表
1. Makiya Nishikawa, Yuki Takahashi, Ayumi Nakayama, Yasushi Fukuhara, Yoshinobu Takakura. “Reactivation of silenced transgene expression in mouse by rapid, large-volume injection of isotonic solution” American Society of Gene Therapy 11th Annual Meeting, Seattle (Boston, MA), May 28-June 1 (2008)
 2. Yoshinobu Takakura (invited) “Optimization of Design and Delivery of Plasmid Vector for Interferon Gene Therapy” 2008 KCRS Annual Conference: Research Networking for Future Therapy, Jeju Island (Korea), September 4-5 (2008)
 3. Yoshinobu Takakura (invited), Makiya Nishikawa “Interferon Gene Therapy against Metastatic Cancer” Ehrlich II-2nd World Conference on Magic Bullets, Nurnberg, (Germany), October 3-5 (2008)
 4. 福原康史、西川元也、高橋有己、中山あゆみ、高倉喜信 “等張溶液の大容量急速投与によるin vivo遺伝子発現の活性化” 遺伝子・デリバリー研究会第8回シンポジウム、大阪、2008年5月
 5. 服部香代子、西川元也、高橋 玲、高倉喜信. “持続的インターフェロン発現プラスミドベクターの開発とそのアトピー性皮膚炎遺伝子治療への応用” 遺伝子・デリバリー研究会第8回シンポジウム、大阪、2008年5月
 6. 臧蕾、西川元也、町田一哉、高倉喜信 “インターフェロンによる外来性遺伝子発現抑制機構解析とその制御による発現の持続化” 遺伝子・デリバリー研究会第8回シンポジウム、大阪、2008年5月
 7. 服部香代子、西川元也、高橋 玲、高倉喜信. “持続的インターフェロン発現によるアレルギー疾患治療” 第24回日本DDS学会学術集会、東京、2008年6月
 8. 滝口直美、高橋有己、西川元也、末原徹也、高倉喜信 “ハイドロダイナミクス法による高効率遺伝子導入時の非線形遺伝子発現機構の解明” 第24回日本DDS学会学術集会、東京、2008年6月
 9. 服部香代子、西川元也、光井 優、臧蕾、高橋 玲、生駒晃彦、高倉喜信. “持続的インターフェロン発現プラスミドベクターの開発とアトピー性皮膚炎遺伝子治療への応用” 第18回アンチセンスシンポジウム、岐阜、2008年11月
 10. Kanitta Watcharanurak, Kayoko Hattori, Makiya Nishikawa, Akihiko Ikoma, Kenji Kabashima, Rei Takahashi, Yoshihiko Watanabe, Yoshinobu Takakura. “Inhibition of atopic dermatitis by sustained exogenous expression of interferon γ in NC/Nga mice” 日本薬剤学会第24年会、静岡、2009年5月
 11. 安藤 満、西川元也、高倉喜信. “長期持続型ヒトインターフェロン γ 発現プラスミドベクターの開発” 第25回日本DDS学会学術集会、東京、2009年7月
 12. 西川元也、服部香代子、Kanitta Watcharanurak、豊田敬康、椛島健治、生駒晃彦、渡部好彦、高倉喜信. “インターフェロン γ の持続的遺伝子発現による皮膚免疫・バリア機能の改善” 遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム、大阪、2009年7月
 13. 安藤 満、西川元也、高橋有己、渡部好彦、高倉喜信. “ヒトインターフェロン γ 持続発現型プラスミドベクターの開発” 遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム、大阪、2009年7月
 14. 宮川典子、西川元也、安藤 満、高橋有己、渡部好彦、高倉喜信. “体内動態制御型インターフェロン融合タンパク質のデザインとin vivo遺伝子導入後の体内動態解析” 遺伝子・デリバリー

- 研究会第9回シンポジウム、大阪、2009年7月
15. Naomi Takiguchi, Makiya Nishikawa, Yasushi Fukuhara, Lei Zhang, Yuriko Matsui, Yuki Takahashi, Yoshinobu Takakura. “Negative involvement of cytoskeletal reorganization in repeated expression of transgenes from silenced vectors (発現低下した遺伝子ベクターからの繰り返し遺伝子発現における細胞骨格再構成の非関与)” 日本薬物動態学会第24回年会、京都、2009年11月
 16. 安藤 満、高橋有己、西川元也、渡部好彦、高倉喜信. “有効かつ安全なIFN- γ 遺伝子治療システム開発に向けた遺伝子発現プロファイルの制御” 第130年会 日本薬学会、岡山、2010年3月
 17. Kayoko Hattori, Makiya Nishikawa, Kanitta Watcharanurak, Akihiko Ikoma, Kenji Kabashima, Hiroyasu Toyota, Yuki Takahashi, Rei Takahashi, Yoshihiko Watanabe, Yoshinobu Takakura. “Prevention of atopic dermatitis by plasmid-based sustained transgene expression of interferon γ in NC/Nga mice” American Society of Gene & Cell Therapy 13th Annual Meeting (Washington DC, USA), May 19-22 (2010)
 18. 臧蕾、西川元也、町田一哉、高橋有己、高倉喜信 “インターフェロン- γ による外来性遺伝子発現抑制機構の解明” 日本薬剤学会第25年会、徳島、2010年5月
 19. 宮川典子、西川元也、高橋有己、渡部好彦、高倉喜信 “体内動態制御型インターフェロン誘導体の設計およびその遺伝子導入による疾患治療システムの開発” 日本薬剤学会第25年会、徳島、2010年5月
 20. Kanitta Watcharanurak, Kayoko Hattori, Makiya Nishikawa, Akihiko Ikoma, Kenji Kabashima, Hiroyasu Toyota, Yuki Takahashi, Rei Takahashi, Yoshihiko Watanabe, Yoshinobu Takakura “Improvement of atopic dermatitis by sustained exogenous expression of murine interferon γ in NC/Nga mice via Th1 polarization” 第26回日本DDS学会学術集会、大阪、2010年6月
 21. 清田豪志、高橋有己、西川元也、高倉喜信 “インターフェロン γ 癌遺伝子治療効果増強のための腫瘍関連マクロファージの除去” 第26回日本DDS学会学術集会、大阪、2010年6月
 22. 安藤 満、高橋有己、西川元也、渡部好彦、高倉喜信 “IFN- γ 遺伝子治療システム開発に向けた遺伝子発現プロファイルの制御” 第9回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォラム2010、京都、2010年10月
 23. Lei Zang, Makiya Nishikawa, Kazuya Machida, Mitsuru Ando, Yuki Takahashi, Yoshinobu Takakura “Interferon γ -mediated inhibition of nuclear entry of plasmid vector and mRNA transcription from the vector: an obstacle for repeated injections of interferon γ -expressing plasmid vector” Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 (New Orleans, USA), November 14-18 (2010)
 24. Noriko Miyakawa, Makiya Nishikawa, Yuki Takahashi, Yoshihiko Watanabe, Yoshinobu Takakura “Design and gene delivery of mouse interferon γ genetically fused with mouse serum albumin” Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 (New Orleans, USA), November 14-18 (2010)
 25. Mitsuru Ando, Yuki Takahashi, Makiya Nishikawa, Hanae Mukumoto, Yoshihiko Watanabe, Yoshinobu Takakura “Design and gene delivery of ‘sticky’ interferon γ to increase the effect/side-effect ratio for liver-directed interferon- γ gene therapy” Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 (New Orleans, USA), November 14-18 (2010)

G. 知的所有権の取得状況

特になし