

胞を用いた薬剤評価システム。

第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月。

- 20) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月。
- 21) Ikeda M, Mori K, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Nakazawa T, Kato N. Development of genome-length HCV RNA replication reporter assay systems using various genotype 1b HCV strains. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月。
- 22) Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, and Kato N. ATM, a DNA damage sensor, is required for hepatitis C virus RNA replication. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月。

細胞、ならびにこれらの利用

発明人：加藤 宣之、池田 正徳。

出願人：岡山大学

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

(1) 出願番号：国際出願  
PCT/JP2009/065263

(出願日：2009年9月1日)

出願番号：特願2008-225323号

(出願日：2008年9月2日)

発明の名称：新規HCVレプリコン

複製細胞および全長HCV RNA複製

C型肝炎ウイルスキャリア成立の分子基盤と新規治療薬開発のための基礎的研究

分担研究者 鐘ヶ江 裕美 東京大学医科学研究所・助教

研究要旨 本研究では、肝炎ウイルスに対する治療のために、多目的型 short-hairpin RNA (shRNA) 高度発現型新規アデノウイルスベクターの開発を行う。本ベクターはアデノウイルスベクターで唯一野生型と同程度に発現している2種類のウイルス由来RNAを欠失しているため安全性が高いだけでなく、肝炎ウイルスに対するshRNAと治療用遺伝子を組み合わせることが可能であり、日本発のベクターとなりうる新しいシステムである。

A. 研究目的

肝臓への遺伝子導入効率が極めて高い非増殖型アデノウイルスベクター(AdV)を用いて、C型肝炎ウイルスに対するshRNAと治療用遺伝子を組み合わせた遺伝子治療用ベクターの開発及び有用性の確認を行う。

B. 研究方法

AdV上で唯一野生型と同程度発現している2種類のVirus associate RNAs (VA RNAs)のプロモーター領域を欠失したベクター(VA欠失ベクター)を作製するための細胞として、通常のベクター作製細胞である293細胞、Rasが恒常的に活性化されている293細胞由来の293T細胞に加えて、VA上流41塩基が付加した-41-VA発現293細胞と293T細胞、ヒトU6プロモーター(hU6)から強制的にVAを発現する293細胞(hU6-293)を樹立化した。VA欠失ベクターの作製効率及びRNA干渉効率を比較するために、hU6プロモーターからGFPとCreに対するshRNAを発現す

る発現単位を、AdVのE1あるいはE4領域にゲノムに対して順方向(R)あるいは逆方向(L)に挿入した8種類のAdV作製を行うとともに、標的タンパク質であるGFP及びCreの発現抑制効果をreal-time PCRとWestern法を用いて検討した。本研究ではC型肝炎ウイルスに対するshRNAと治療用遺伝子を搭載した単一型ベクターによる治療効果の検討を行うため、治療用遺伝子としてヒトインターフェロン $\alpha$ 2(IFN- $\alpha$ 2)を選択した。IFN- $\alpha$ 2のcDNAを293細胞の総DNAからPCRにより増幅し、クローニングを行い、塩基配列を確認後ベクター作製用コスミドカセットに挿入した。IRESに対するshRNAは、既にSakamotoらによって報告されていたshRNAと本研究で新たに設計したshRNAの2種類を、22年度に最も高いshRNAの発現を示すことを明らかにしたウイルスゲノム右端のE4領域右側に左向きでコスミドカセットに挿入した。VA欠失ベクター作製は-41-VA発現293細胞あるいは293T細胞を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、遺伝子治療用のベクター作製法の開発であり、現時点では倫理面に抵触する研究は進行していない。

### C. 研究結果

AdVは、通常はE1を恒常的に発現している293細胞で野生型とほぼ同程度の複製が可能であり、高力価のベクター調製が可能である。VA RNAsは、Protein kinase R (PKR)のリン酸化抑制などによりウイルスの増殖に適した環境を作るために役割を果たしていると考えられており、ウイルス増殖に必須ではないものの、VA RNAsを欠失したウイルスの力価は約1/100程度に減少することが知られている。本研究においても、VA欠失ベクターの作製を293細胞で試みたが、ベクターの出現は見られるものの増殖効率が極めて低くベクターとして応用することは不可能であると考えられた。一方Rasを恒常的に発現している293T細胞ではPKRのリン酸化が恒常的に抑制されているためVA欠失ベクターの作製が可能であった。

そこで293T細胞を用いて、CreあるいはGFPに対するshRNA発現単位をAdVの通常挿入領域であるE1と我々独自のクローニングサイトであるE4領域右側にゲノムに対してR及びL向きに挿入した8種類のベクターを用いて、最適の挿入サイトと方向の同定を試みた。これらのベクターには、ベクター作製効率チェック用にshRNA挿入サイトがE1の場合にはE4に、E4の場合にはE1にdsRed発現単位が挿入されている。PolIIIで読まれるcDNAの場合には、E1の方が高い発現量が

得られる傾向があるが、shRNAは意外なことにE4の方が高い目的遺伝子発現抑制効果が得られた。また挿入方向は、L向きが高い目的遺伝子抑制効果を示したため、shRNAの挿入はE4L向きに行うことに決定した。

しかし、293T細胞は長期間の細胞維持には不向きな細胞であり、最低でも2週間の期間を要するAdV作製の際に細胞状態が悪化し、ベクター作製には、ベクター生成マーカーであるdsRedの発現が必須であった。本研究ではE1とE4の領域は目的遺伝子の挿入サイトとして用いるため、もう1つの挿入サイトであるE3領域にdsRed発現単位を挿入したベクター生成を試みたが、ベクター力価が低下したためかベクターの作製は出来なかった。

そこで、VAを発現する293あるいは293T細胞の樹立化を行った。VA RNAsは配列内部のPolIIIプロモーターから発現するが、その発現にはVAコード領域の上流の配列が必要であることは報告されていたが、何塩基必要であるかについて具体的な報告が乏しかった。そこで、上流16、41あるいは75塩基を有するVA発現プラスミドを構築しVAの発現量をreal-time PCRにより定量した所、上流41塩基を挿入すれば十分なVAの発現が認められたため、上流41塩基を有する-41-VAを用いることにした。またhU6プロモーターからVAを発現する発現単位も作製した。これらのVA発現単位とピューロマイシン発現単位を持つプラスミドを293あるいは293T細胞に導入し細胞株の樹立化を行った。各々20クローンを検討した結果、2種類のVA RNAsともに発現する293細胞及び293T細胞が確認されたが、VA RNAsの発現量はウイ

ルス複製時と比べれば非常に少ないものであった。しかし、これらの細胞を用いてshRNA発現VA欠失コントロールベクター（非常に作製効率が高いことが既知のベクター）の作製を行った所、hU6-293では58%、-VA41-293では45%となり、これらの細胞を用いればベクター作製は可能ではないかと考えられた。-VA-293T細胞は、ベクターの作製効率が99%と極めて高く、ベクターの増殖等には有用性が高いと考えられた。

以上の結果からVA欠失ベクターの作製は可能であると考え、次に治療用遺伝子であるIFN- $\alpha$ 2のクローニングを293細胞の総DNAを用いてPCRにより行った。IFN- $\alpha$ には複数のサブタイプがあり塩基配列も酷似しているため、PCR産物をIFN- $\alpha$ 2を切らず他を比較的切断する制限酵素で切断後クローニングした結果、IFN- $\alpha$ 2のクローニングに成功し、塩基配列からも正しい配列であることを確認した。C型肝炎に対するshRNAは、Sakamotoらの報告したHCV-21と加えてIRESのF領域を標的とする独自のshRNAを選定し合成したのち、hU6プロモーターの下流に挿入した。EF1 $\alpha$ プロモーターからIFN- $\alpha$ 2を発現する発現単位をE1領域に、hU6プロモーターからshRNAを発現する発現単位をE4領域左向きに挿入したVA欠失AdV作製用コスミドカセットとIFN- $\alpha$ 2のみを持つVA欠失AdV作製用コスミドカセットを作製し、-41-293細胞へ導入しベクター作製を行い、ベクター作製に成功した。

#### D. 考察

AdVはウイルス複製に必須であるE1領域を欠失し目的遺伝子と置換しているため、通常のベクターではウイルス由来のタンパ

ク質の発現は認められない。しかし、VA RNAsはPolIIIによりE1非依存的に転写されるため、ベクターにおいても野生型と同程度に発現する。これまでは、VA RNAsの発現に関して問題視するよりも、AdV自体の免疫原性が大きな問題であったが、我々はこの免疫原性により引き起こされた炎症反応の原因がウイルスのpIXタンパク質のリーク発現であること、このpIXの発現は目的遺伝子の発現用プロモーターとしてEF1 $\alpha$ を用いることで回避できることを報告した。この結果、AdVを用いた遺伝子治療の可能性が、これまでの致死性高い疾患のみでの応用から全身投与による慢性疾患の治療へと広がる可能性が強く示唆された。その場合VA RNAsがベクターで唯一発現しているウイルス由来の発現物となる。2010年にApalicioらがVA RNAsがmiRNAとして機能すること、その結果細胞周期や癌化などに関わる多くの遺伝子発現が影響を受ける可能性を報告した。我々もVA存在と非存在状態でのマイクロアレー解析から複数の細胞遺伝子の発現が上昇あるいは低下していたことを示してきた。これらの結果を勘案すれば、VA RNAsが残存したままの第1世代ベクターの遺伝子治療への応用に危険性が伴う可能性も捨てきれないと考える。本研究では、まずshRNAの最も効率的な発現領域及び向きを規定し、VA発現293細胞を用いたVA欠失ベクター作製法を確立したことにより、治療用遺伝子とshRNAを併せ持つベクター作製が可能になった。本研究で開発したこれらの技術は、非常に有用性が高いと考える。

#### E. 結論

本研究は、AdVの免疫原性が目的遺伝子発現用プロモーターによりリーク発現したpIXによって誘起されており、EF1 $\alpha$ プロモーターはpIXのリーク発現を引き起こさないという我々の研究成果を受け、AdVの応用範囲が致死性の高い疾患から慢性疾患へと広がりと考え始まった。C型肝炎ウイルスによる肝炎は、癌への移行の可能性が高いものの慢性疾患であるため、本研究では、EF1 $\alpha$ プロモーターから治療用遺伝子を発現することで安全性を担保しながら、ウイルス増殖に対してはRNA干渉を用いて抑制を行う単一型ベクターの作製を試み成功した。更に、shRNA発現効率の最も高い挿入位置及び方向の同定に成功したため、ベクター投与量の最少化も可能になった。また近年細胞の遺伝子発現に影響を与えることが報告されたVA RNAsの発現を抑制するために、VAプロモーターを欠失したベクターの作製法の開発も行った。VA欠失ベクター作製に通常の293細胞を用いた場合にはベクター力価が非常に低いため、VAを発現する複数の293細胞の樹立化や293T細胞の応用などを行い、有用性の高いVA欠失ベクター作製用細胞の作製に成功し、最終的にVA欠失ベクターの作製法を確立した。

本研究の成果は、C型肝炎ウイルスの増殖抑制と治療の両面を単一ベクターで行うことが可能な遺伝子治療用ベクターとして非常に価値があるだけでなく、AdVで唯一発現しているウイルス由来のVA RNAsも発現しないことで更に安全性を担保したベクターの作製に成功しており、有用性の高いものであると考える。

F. 健康危険情報  
特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

• Kondo, S., Takata, Y., Nakano, M., Saito, I. and Kanegae, Y. Activities of various FLP recombinases expressed by adenovirus vectors in mammalian cells., *J. Mol. Biol.*, 390: 221-230, 2009.

• Kanegae, Y., Terashima, M., Kondo, S., Fukuda, H., Maekawa, A., Pei, Z. and Saito, I. High-level expression by tissue/cancer-specific promoter with strict specificity using a single-adenoviral vector., *Nucleic Acids Res.*, 39: e7, 2011.

• Sakamoto, S., Yazawa, T., Baba, Y., Sato, H., Kanegae, Y., Hirai, T., Saito, I., Goto, T. and Kurahashi, K. Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice., *Am J Respir Cell Mol Biol*, in press.

### 2. 学会発表

• Kondo, S., Terashima, M., Zheng, P., Yumi Kanegae, Saito, I. Construction of "Humanized" FLP recombinases aiming for efficient generation of helper-dependent adenovirus vector., 12th American Society Gene Therapy Annual Meeting, San Diego, 2009.

• 裴 崢, 寺島 美保, 近藤 小貴, 齋

藤 泉, 鐘ヶ江 裕美. アデノウイルスベクター迅速定量法の開発., 第57回日本ウイルス学会, 東京, 2009.

・ 鐘ヶ江 裕美, 寺島 美保, 裴 崢, 前川 文, 近藤 小貴, 斎藤 泉. 細胞特異的高度発現機構を搭載した「切り出し発現型」アデノウイルスベクターの開発., 第57回日本ウイルス学会, 東京, 2009.

・ 鐘ヶ江 裕美, 合田 直樹, 寺島 美保, 斎藤 泉. 新規アデノウイルスベクターを用いた癌細胞標的化遺伝子治療法の開発とマウスモデルの確立, 第69回日本癌学会総会, 大阪, 2010.

・ 合田 直樹, 寺島 美保, 鐘ヶ江 裕美, 斎藤 泉. 癌細胞特異的切り出し発現型アデノウイルスベクター発現増強に向けた改良, 第69回日本癌学会総会, 大阪, 2010.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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

C型肝炎ウイルス排除機構の解析

分担研究者 小原 道法 東京都臨床医学総合研究所・感染制御プロジェクト  
プロジェクトリーダー

研究要旨 感染しているC型肝炎ウイルス（HCV）を完全排除する、個体レベルでの免疫応答および細胞内レベルでのウイルス構成因子の認識機構及び分解排除機構を解明し、ウイルス感染に対する新たな防御法および治療法を確立することを目的とする。これまでに、polyICカチオニックリポソーム製剤であるNS9をHCV感染キメラマウスに投与すると強い抗ウイルス活性を示すことを見いだした。また、HCVの解析を通して、ウイルス感染依存に脂肪酸合成経路が活性化すること、及び脂肪酸合成酵素（FASN）の阻害剤がウイルス複製をも阻害することが我々の実験で判明した。さらに、HCV培養細胞系及びヒト肝臓キメラマウスを用いた感染阻害実験で、FASN阻害剤が新たなHCV治療薬となる可能性が示された。脂肪酸はグリセリンをエステル化して油脂（中性脂肪）と成るほか、脂質の構成成分であり、エネルギー源としても代謝される。本研究では、脂肪酸合成がウイルス感染で果たす役割を解明すると共に、発現が誘導された脂肪酸合成酵素経路の因子とHCV感染後の病態との関係も解析した。

A. 研究目的

細胞死を伴わずに細胞内に感染しているウイルスを完全排除する、個体レベルでの免疫応答および細胞内レベルでのウイルス構成因子の認識機構及び分解排除機構を解明し、ウイルス感染に対する新たな防御法および治療法を確立することを目的とする。これまでに、リポソーム製剤であるNS9をHCV感染キメラマウスに投与すると強い抗ウイルス活性を示すことを見いだした。

HCV複製依存に脂肪酸合成酵素（FASN）のプロモーター活性が上がることを培養細胞系で見出した。また、ヒト肝臓キメラマウスを用いた感染実験で、FASN阻害剤が新

たなHCV治療薬となる可能性が示された。パルミチン酸はFASNによって合成される炭素数16の長鎖脂肪酸であり、HCV複製に必要なウイルス或いは宿主因子がパルミチン酸化の標的である可能性を明かにし、新たなHCV治療薬としての研究を進めた。

B. 研究方法

HCV 及び HBV の持続感染が成立しているヒト肝臓キメラマウスに polyIC カチオニックリポソーム製剤である NS 9 を 0.01、0.03、0.1mg/kg で 1 日 1 回投与し、経口的に血清中 HCV 量の変化を定量した。

脂肪酸合成酵素 (FASN) は哺乳類においては七種の酵素活性を有する巨大蛋白質複合体として存在する。我々はその中の三種類の酵素活性に対する低分子化合物の阻害剤を用いて、HCV 複製に FASN が関与しているかどうかを検討した。その際、HCV 複製活性はルシフェラーゼ活性だけでなく、ウイルス RNA と蛋白質を検出することでも判定した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従う。また、東京都臨床医学総合研究所動物実験委員会の承認を得ている。

#### C. 研究結果

polyIC はその作用機序から、ウイルスにかかわらず免疫を誘導して抗ウイルス効果を示すことが考えられた。そこで HCV と同様に肝臓に感染し病原性を示す B 型肝炎ウイルス (HBV) を感染させたヒト肝臓型キメラマウスを使用し、カチオニックリポソーム及び polyIC 複合体の抗 HBV 効果の評価を行った。やはり HBV においても投与後わずか 1 週でウイルス量を約 1/100 まで低下させ、既存の薬剤であるエンテカピルの 10 倍以上の阻害効果を示した。

調べた FASN 阻害剤全てが抗 HCV 作用を有することが判明した。HCV 複製の抑制活性は C75 が一番高く、次いでオルリスタット、トリクロサンの順だった。オルリスタットは図に示した以上の濃度で使用しても HCV 複製を完全に止めることは出来なかつ

た。またトリクロサンは、これ以上の濃度では毒性が強く出た。この結果は、FASN の持つ酵素活性の中で KS 活性が HCV 複製に最も必要である可能性を示している。

#### D. 考察

polyIC リポソーム製剤である NS 9 は PEG-IFN よりも非常に強力な阻害活性を示した。NS 9 の投与期間中に IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  の顕著な発現上昇は認められず、IFN による抗ウイルス活性ではない別の阻害機序が関与している可能性が示された。NS 9 の臨床での使用量は 0.1mg/kg であるのでこのままヒトに使用できるレベルであった。

ヒト等の哺乳動物の細胞の場合、FASN の主な合成物はパルミチン酸である。パルミチン酸は長鎖脂肪酸伸長酵素 ELOV1-6 によりステアリン酸となる。これらの脂肪酸は小胞体やミトコンドリアでアラキジン酸のような更なる長鎖脂肪酸へと変換される。またステアリン酸はステアロイル CoA 不飽和酵素 SCD によりオレイン酸となる。これらの各種脂肪酸が HCV 複製に与える影響については今後解析を進める予定である。

#### E. 結論

以上の結果は、カチオニックリポソーム及び polyIC 複合体の抗ウイルス効果の作用機序は既存の生体防御系とは異なる新規の生体防御システムが存在している可能性を示唆していた。そこで我々は、その作用機序を明らかにするためにマイクロアレイによる検討を行った。すると、III 型インターフェロンである IL28A、IL28B、IL29 の



誘導が認められた。

HCV複製だけを観察できるレプリコン細胞系でFASN阻害剤が抗HCV作用を持つ点を考えて、NS4BのPALMITOYL化が影響を受けている可能性の検討を進めている。さらに、FASN阻害剤のHCV感染動物モデルでの抗HCV効果についても現在解析中であり、FASN阻害剤を新規な抗HCV薬として応用するための臨床研究へ至る道を探索している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sachiko Inubushi, Motoko Nagano-Fujii, Kikumi Kitayama, Motofumi Tanaka, Chunying An, Hiroshi Yokozaki, Hirohei Yamamura, Hideko Nuriya, Michinori Kohara, Kiyano Sada, and Hak Hotta. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J. Gen. Virology* 89: 1231-1242 (2008).

2. T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, K. Tsukiyama-Kohara. Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and picornavirus RNAs. *Compara. Immu. Microbio. Infect. Dis.* 31: 435-448 (2008).

3. Naoya Sakamoto, Yoko Tanabe, Takanori Yokota, Kenichi Satoh, Yuko Sekine-Osajima, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Megumi Tasaka, Yuki Sakurai, Chen Cheng-Hsin, Masahiko Yano, Shogo Ohkoshi, Yutaka Aoyagi, Shinya Maekawa, Nobuyuki Enomoto, Michinori Kohara, and Mamoru Watanabe. Inhibition of hepatitis C virus

infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J. Gastroenterology Hepatology.* 23(9):1437-47 (2008).

4. Fumihiko Yasui, Chieko Kai, Masahiro Kitabatake, Shingo Inoue, Misako Yoneda, Shoji Yokochi, Ryoichi Kase, Satoshi Sekiguchi, Kouichi Morita, Tsunekazu Hishima, Hidenori Suzuki, Katsuo Karamatsu, Yasuhiro Yasutomi, Hisatoshi Shida, Minoru Kidokoro, Kyosuke Mizuno, Kouji Matsushima, Michinori Kohara. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunology* 181(9):6337-48 (2008).

5. Kei Ogata, Takahito Kashiwagi, Jun Iwahashi, Koyu Hara, Haruhito Honda, Tatsuya Ide, Ryukichi Kumashiro, Michinori Kohara, Michio Sata, and Nobuyuki Hamada. A mutational shift from domain III to II in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus after interferon-ribavirin therapy. *Arch Virol.* 153(8):1575-9. (2008).

6. Yoshihito Ueno, Yuuji Watanabe, Aya Shibata, Kayo Yoshikawa, Takashi Takano, Michinori Kohara, Yukio Kitade. Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing universal overhangs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 17(5):1974-81. (2009).

7. Leiyun Weng, Jiamu Du, Jingling Zhou, Jianping Ding, Takaji Wakita, Michinori Kohara, Tetsuya Toyoda. Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of

- the thumb domain. *Arch Virol.* 154(5):765-773. (2009).
8. Keigo Machida, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Satoshi Sekiguchi, Eiji Seike, Shigenobu Tóne, Yukiko Hayashi, Yuri Kasama, Masumi Shimizu, Hidemi Takahashi, Chyoji Taya, Hiromichi Yonekawa, Nobuyuki Tanaka, and Michinori Kohara. Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins. *Gastroenterology* 2009 Jul;137(1):285-96.
  9. Uto H, Stuver SO, Hayashi K, Kumagai K, Sasaki F, Kanmura S, Numata M, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Kohara M, Tsubouchi H. Increased rate of death related to presence of viremia among hepatitis C virus antibody-positive subjects in a community-based cohort study. *Hepatology.* Aug;50(2):393-9. (2009)
  10. Tomohiro Nishimura, Michinori Kohara, Kosuke Izumi, Yuri Kasama, Yuichi Hirata, Ying Huang, Masahiro Shuda, Hideko Nuriya, Yuko Tokunaga, Masaaki Sato, Makoto Saito, Chieko Kai and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus impairs P53 via persistent over-expression of 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$  24-reductase. *J. Biol. Chem.* 284(52):36442 -36452 (2009).
  11. Yutaka Amako, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Yuichi Hirata, Satoshi Sekiguchi, Yoshimi Tobita, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Hiromichi Yonekawa and Michinori Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* *J. Virology* 84(1):303-311 (2010).
  12. Chen Y-Z, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, and Nishimura Y. Identification of SARS-COV spike protein-derived and HLA-A2-restricted human CTL epitopes by using a new muramyl dipeptidederivative adjuvant. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 23(1):165-77 (2010).
  13. Masaaki Satoh, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Sumako Iwanaga, Salem Nagla Elwy Salem Ali, Takahiro Seki, Seiji Okada, Michinori Kohara, Shinji Harada, Chieko Kai, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* Dec;33(6):e81-8 (2010).
  14. Kenichi Satoh, Hiroki Takahashi, Chiho Matsuda, Takuya Umehara, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Mikio Zeniya and Michinori Kohara. Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. *J. Med. Virol.* 82(9):1545-1553 (2010).
  15. Yuri Kasama, Satoshi Sekiguchi, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Masaaki Satoh, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Motohiro Takeya, Yoichi Hiasa, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. *Blood* 116(23):4926-4933 (2010).

16. Hideko Nuriya, Kazuaki Inoue, Takeshi Tanaka, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Kyosuke Kaji, Seishu Hayashi, Shuichi Kaneko and Michinori Kohara. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 48(11):3843-3851 (2010).
17. Leiyun Weng, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Ying He, Jin Zhong, Tetsuya Toyoda. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype specific manner. *J. Virol.* 84(22):11761-70 (2010).
18. Kayo Yoshikawa, Aya Ogata, Chiho Matsuda, Michinori Kohara, Hideo Iba, Yukio Kitade, Yoshihito Ueno. Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance. *Bioconjugate Chemistry* 22:42-49 (2011).
19. Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masahiro Hayashi, Yuichi Hirata, Masaaki Satoh, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Masayuki Sudo, and Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology* (2010) in press.
20. Masaaki Arai, Hidenori Suzuki, Yoshimi Tobita, Asako Takagi, Koichi Okamoto, Atsunori Ohta, Masayuki Sudo, Kunitada Shimotohno, Michinori Kohara. Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. *Arch. Virol.* 156:295-304 (2011).
21. Kiminori Kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* (2011) in press.
22. Takashi Takano, Michinori Kohara, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Makoto Saito, Chieko Kai, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocation of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J. Med. Virol.* (2011) in press.
23. Kiminori Kimura, Michinori Kohara. *Frontiers of Model Animals for Human Diseases. Experimental Animals* (2011) in press.

## 2. 学会発表

- 1) Hirata Y. Umehara T., Sudo M., Yasui F., Kohara M.: Serine Palmitoyltransferase Inhibitor Suppresses HCV Replication in a Mouse Model. 21th International Conference on Antiviral Research 2008. 4.13-17 Montreal
- 2) Nishimura T., Sato M., Saito M., Kasama Y., Kohara M., Tsukiyama-Kohara, K.: Significance of 3 $\beta$ -dehydroxysterol-D24-reductase(DHCR24) in life cycle of Hepatitis C virus. 21th International Conference on Antiviral Research 2008. 4.13 - 17 Montreal
- 3) Yasui F., Kai C., Kohara M.: Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe

pneumonia in mice infected with SARS-CoV. XIV International Congress of Virology 2008. 8. 10-15 Istanbul

4) Hirata Y., Umehara T., Sudoh M. Kohara M.: Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model. XIV International Congress of Virology 2008. 8. 10 - 15 Istanbul

5) Nishimura T., Kasama Y., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K.: Hepatitis C virus abrogates p53 activity by over-expression of 3-beta-hydroxysterol delta -24 - reductase. XIV International Congress of Virology 2008. 8. 10-15 Istanbul

6) Hirata Y., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Tsukuda T., Kohara M.: NA 808 has the strong effect to hepatitis C virus and in vivo. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. 2009. 10. 3-7. Nice, France

7) Munakata T., Inada M., Nomoto A., Kohara M.: Anti-hepatitis C virus activity of cyclin-dependent kinase inhibitors. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses 2009. 10. 3-7. Nice, France

8) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Taguchi R., Kohara M.: Hepatitis C virus altered the sphingolipids metabolism for better environment its replication. Keystone Symposia 2010. 6. 6-11 Kyoto

9) Nakagawa S., Hirata Y., Tokunaga Y., Hirabatashi K., Yano J., Tateno C., Tanaka Y., Mizokami M., Inoue K., Yoshihara M., Kohara M.: Interferon lambda plays a critical role on antiviral effect in human hepatocyte. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2010. 9. 10-14. 横浜

10) Sekiguchi S., Kimura K., Chiyo T., Tobita Y., Yasui F., Kohara M.: Hepatitis C virus mediated pathogenesis is dependent on inflammatory cytokines with irrespective of HCV protein level.

17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2010. 9. 10-14. 横浜

11) 木村公則、小原道法：C型慢性肝炎に対するHCV遺伝子組換えワクチニアウイルスによる新たな治療戦略 第18回日本消化器関連学会 2010. 10. 13-16. 横浜

12) 平田雄一、井上和明、小原道法：IFNλを強力に誘導する核酸/リポソーム製剤の同定とその抗HCV効果 第18回日本消化器関連学会 2010. 10. 13-16. 横浜

13) Hirata Y., Nakagawa S., Tokunaga Y., Tanaka Y., Mizokami M., Inoue K., Kohara M.: Interferon lambda plays a critical role on antiviral response by hepatotropic inducer of innate immunity in human hepatocyte. American Association for the Study of Liver Diseases 2010. 10. 29-11. 2. Boston.

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

1) 発明の名称：(発明の名称) C型肝炎ウイルス遺伝子を有する組換えワクチニアウイルス

①発明者：小原道法、村井深

②出願日：2008年3月7日

出願番号：特願2008-057515

④出願人：東京都医学研究機構、(株)ポストゲノム研究所、財団法人化学及血清療法研究所

⑤発明の内容の概略：感染予防及び治療効果を示すC型肝炎ウイルス遺伝子を有する組換えワクチニアウイルス

2) 発明の名称：(発明の名称) C型肝炎ウイルス阻害剤

①発明者：小原恭子、小原道法、佐藤正明、西村知裕

②出願日：2008年3月14日

③出願番号：特願：2008-66158

④出願人：国立大学法人 熊本大学、(財)東京都医学研究機構、(財)化学及血清療法研究所

⑤発明の内容の概略：C型肝炎ウイルス複製に必須な宿主因子BGT1に対する阻害剤

3) 発明の名称：(発明の名称) 抗C型

肝炎ウイルス効果を有するベンゾフラン誘導体

①発明者：小原道法、安井文彦、須藤正幸

②出願日：2009年4月8日

③出願番号：特願2009-93608

④出願人：中外製薬株式会社、財団法人東京都医学研究機構

⑤発明の内容の概略：C型肝炎ウイルスの複製を阻害する抗酸化剤

4) 発明の名称：(発明の名称) 難治性ウイルス感染症の治療剤

①発明者：小原道法、中川慎一郎

②出願日：2010年9月9日

③出願番号：特願2010-202355

④出願人：(財) 東京都医学研究機構

⑤発明の内容の概略：肝炎ウイルス複製阻害する pIC カチオニックリポソーム剤

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

なし

C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基盤研究

分担研究者 深澤 秀輔 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

研究要旨 HCV JFH1 株を Huh7.5.1 細胞に感染させる系を用いて、HCV の全生活環を標的とした抗 HCV 薬のスクリーニングを行った。ウイルス RNA の定量 RT-PCR、細胞内 core 蛋白質の cell-based ELISA による測定、および HCV による細胞変性効果の解除を指標としたアッセイ系を構築し、各種阻害剤、天然物、天然物誘導体、既存薬など、約 4000 化合物を評価し、抗 HCV 治療薬候補を得た。

A. 研究目的

変異を起こして耐性になりやすいウイルスの治療には多様な標的を持つ抗ウイルス剤が必要とされる。C型肝炎ウイルス (HCV) の侵入過程や粒子の放出過程を標的とする阻害剤のスクリーニングは、レプリコン細胞では不可能であるため、Huh7.5.1 細胞-JFH1 の感染系を用いて、治療薬開発のための探索系を確立し、HCV の全ライフサイクルを標的とするスクリーニングを行い、抗 HCV 活性を示した物質の作用を解析する。

B. 研究方法

Huh7.5.1 細胞-JFH1 の感染系を用いて種々化合物の HCV 阻害活性の評価と作用点解析を行った。阻害活性は JFH1 感染による Huh7.5.1 細胞の細胞変性効果の解除、cell-based ELISA による細胞内の Core 蛋白質の測定、放出されたウイルス RNA の定量 RT-PCR を指標とした。標的分子が基本的にははっきりしていて、阻害剤として定着している種々の化合物、植物、微生物の二次代謝産物およびそれらの誘導体や、既存薬を収集した化合物ライブラリーをスクリーニングした。アッセイの感度を上げるため、

無血清培地を使用した。また、ウイルスの侵入過程を調べるため、レトロウイルスの pseudovirus を用いた。

(倫理面への配慮)

培養細胞を用いた研究であり、倫理面での問題は無い。

C. 研究結果

まず天然物および天然物誘導体約 2,000 化合物の抗 HCV 活性を評価した。そのうちの 7 化合物が 1  $\mu\text{g/ml}$  以下で HCV 阻害作用を示した。これらの物質がレプリコン細胞で作用するかを調べたところ、2 種類は処理した細胞で NS5A レベルを低下させたが、他の 5 物質の処理では NS5A の量は変化せず、細胞内での HCV の RNA 複製、蛋白質合成は標的でない可能性が考えられた。他の解析結果から、2 物質はウイルスの放出過程を、別の 2 物質はウイルスの侵入過程を標的としていると推測された。

種々の標準的な阻害剤を評価したところ、抗エストロゲン剤 tamoxifen が活性を示した。選択的エストロゲン受容体調節物質 (Selective Estrogen Receptor Modulators,

SERMs)が抗 HCV 薬として臨床応用できるのかどうか、様々な構造を持つ SERMs の HCV 阻害活性を調べた。また、HCV 感染阻害の作用機序も解析した。Tamoxifen および triphenylethylene 骨格を持った化合物 clomifene、raloxifene が HCV 阻害作用を示した。異なる骨格をもつエストロゲンレセプター  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) antagonist (ICI182780, ZK164015, MPP)にも阻害活性が見いだされたが、PPT、diethylstilbestrol、 $\beta$ -estradiol 等の agonist は阻害は示さなかった。活性のあった SERMs は replicon cell (1b)の HCV NS5A 量を減少させた。Tamoxifen が HCV 複製を阻害することはすでに報告されているが、HCV 感染の前後で薬剤を添加する実験を行ったところ、侵入過程も阻害することが示唆された。pseudovirus を用いた実験を行ったところ、SERMs は HCV の pseudovirus (HCVpp) の侵入を阻害したが、水泡性口内炎ウイルスの pseudovirus (VSVpp) の侵入は阻害しなかった。またこれら SERMs は、異なる型(1a, 1b, 2b, 4)の HCVpp の侵入も阻害した。

さらに既存薬ライブラリー、試薬ライブラリーの約 2000 化合物を評価した。HMG-CoA 還元酵素阻害剤、SERMs など既に HCV 阻害活性が報告されている薬剤以外に、imatinib、gefitinib などのチロシンキナーゼ阻害剤、orlistat などの脂肪酸合成酵素阻害剤、非ステロイド性抗炎症薬、核内レセプターアゴニストなどに活性が見いだされた。チロシンキナーゼ阻害剤は HCV 感染後に添加すると、HCV 阻害作用が弱くなることから、少なくとも一部は侵入過程を標的としていると考えられた。

#### D. 考察

HCV の全ライフサイクルを標的とする抗 HCV 薬スクリーニングを行った。レプリコン細胞を用いたスクリーニングでは発見困難と思われる、ウイルスの侵入過程や放出過程を標的とする物質が見いだされた。

Tamoxifen、clomifene、raloxifene に加え、 $ER\alpha$  antagonist の SERMs に抗 HCV 活性が観察された。これらは C 型肝炎治療への臨床応用も可能と思われる。また、tamoxifen には複製阻害、侵入阻害の少なくとも二つの異なる HCV 阻害の機序があり、HCV 侵入の阻害活性については HCV に特異的な作用と考えられた。認可された薬のライブラリーを評価した。既に医薬品として使用されている薬剤のいくつかは抗 HCV 作用が確認された。これらは安全性、体内動態が十分に調べられている薬剤であり、HCV 治療薬として、非臨床試験から始める新規開発よりも有利な点が多い。今後さらに多くの既存薬を評価する予定である。imatinib、gefitinib を含むチロシンキナーゼ阻害剤が抗 HCV 作用を示したが、imatinib (ABL、PDGFR、KIT 阻害)と gefitinib (EGFR 阻害)は阻害スペクトラムが異なっている。実際にチロシンキナーゼの阻害が抗 HCV 作用に関与しているかどうかは不明であり、その作用機序の解析は今後の課題である。

#### E. 結論

HCV の全生活環を標的とした抗 HCV 薬の探索系を 3 種類確立し、既知阻害剤、天然物、既存薬ライブラリーのスクリーニングを行い、約 4,000 化合物を評価した。ヒットした化合物の作用点を解析し、新規な標的を持つと思われる抗 HCV 治療薬候補を得た。今まで HCV 阻害作用の報告のない薬剤に活性を見いだした。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

##### 1. 論文発表

Murakami, Y., Noguchi, K., Yamagoe, S., Suzuki, T., Wakita, T., Fukazawa H.

Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Research* 83:112-117 (2009)

## 2. 学会発表

村上裕子、鈴木哲朗、脇田隆字、深澤秀輔：感染細胞系を用いたスクリーニングにより見いだされた新規標的を持つ抗HCV物質の作用機構解析、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月26-28日

村上裕子、赤澤大輔、鈴木哲朗、脇田隆字、深澤秀輔：C型肝炎ウイルス(HCV)に対するSERM (Selective Estrogen Receptor Modifier) の作用、第57回日本ウイルス学会学術集会、

東京、2009年10月25-27日

深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆字、村上裕子：C型肝炎ウイルス(HCV)に阻害作用を示す物質の探索、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月7日-9日

## 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。



抗 C 型肝炎ウイルス(HCV)活性を有する化合物の探索・創製研究

分担研究者 掛谷 秀昭 京都大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 JFH-1 株由来の C 型肝炎ウイルス(HCV)を持続感染させたヒト肝癌細胞株 Huh-7 細胞株を用いた評価系において顕著な抗 HCV 活性を有する化合物（ヒット化合物）を見出し、構造活性相関研究に適した化合物群のデザイン・創製・評価を行った。その結果、構造活性相関に関して、宿主細胞への細胞障害活性と抗 HCV 活性を分離可能であることを示唆する重要な知見が得られた。本研究結果から、今後のさらなる論理的な抗 HCV 剤の設計・創製が期待できる。

#### A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV)は持続感染を引き起こし、慢性肝炎、肝硬変、肝癌といった重篤な疾病をもたらす。現在、臨床ではペグインターフェロン  $\alpha$ (PEG-IFN)とリバビリン(RBV)の併用療法などが用いられているが、奏効率、副作用などの観点から、さらなる新規治療薬の開発が希求されている。

そこで、本研究では JFH-1 株由来の HCV を持続感染させたヒト肝癌細胞株 Huh-7 細胞株を用いた評価系において抗 HCV 活性を有する化合物の探索・同定を行い、ヒット化合物を起点とした創薬化学的研究を行うことを目的とした。本研究結果は、新しいファーマコホアを有する新規 HCV 治療薬の開発に有用な知見をもたらすことが期待される。

#### B. 研究方法

##### (i)抗 HCV 活性評価

JFH-1 株由来の HCV を持続感染させたヒト肝癌細胞株 Huh-7 細胞株へ様々な小分子化合物を種々の濃度で添加し、3 日間培養後、試験化合物の抗 HCV 活性を評価した。HCV

レベルの指標として細胞外の HCV core 蛋白質を ELISA 法により、また、細胞障害性の指標として細胞内の全 RNA 量あるいは細胞内 ATP 含量をそれぞれ測定した。

##### (ii)化学合成

3 成分 one-pot reaction における、反応薬、反応溶媒、反応温度等、さまざまな反応条件検討を行った。反応経過、ならびに反応生成物の追跡は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いて行った。さらに、反応生生物の同定・解析は、核磁気共鳴スペクトル解析(NMR)、質量分析スペクトル(MS)解析等を用いて行った。

#### C. 研究結果

##### (i)ヒット化合物の同定

培養細胞系を用いた抗 HCV 活性を有する化合物スクリーニングの結果、KUSC-M001 を含むキノリン骨格を有する化合物群をヒット化合物と同定した。KUSC-M001 は、10-50mM の濃度域で顕著な抗 HCV 活性を示したが、強い細胞障害性も観察された。

##### (ii)構造活性相関研究

まず、はじめに KUSC-M001 の効率的な合成経路の検討を行った。その結果、多少、収率は劣るけれども(収率:15-25%)、シクロペンタジエン、3-ピリジンカルボアルデヒド、2, 4-ジフルオロアニリンの3成分 one-pot reaction、すなわち、酸で活性化されたアルデヒドとアニリンが縮合して生じるイミンとシクロペンタジエンの逆電子要請型 Diels-Alder 反応で合成可能であった。興味深いことに、生成物 KUSC-M001 の立体化学は単一のジアステレオマーであった。続いて、様々なアルデヒド誘導体およびアニリン誘導体を反応に供することで、KUSC-M001 の各種類縁化合物(KUSC-M002~KUSC-M016)を効率よく合成することができた。

KUSC-M001 は 50mM で HCVcore 蛋白質量を 44%程度抑制したが、強い細胞障害性を示した。各種類縁化合物の抗 HCV 作用を検討した結果、なかでもアニリン由来部分を変換した化合物群に興味深い構造活性相関に関する知見が得られ、特に、KUSC-M016 は細胞障害性を示さない濃度域において抗 HCV 活性を示し、IC50 値は約 3 mM であった。

#### D. 考察

ヒット化合物として見出した KUSC-M001 はジアステレオマー混合物として報告されている goldicide A と平面構造は同一であるが、本研究において3成分 one-pot reaction により合成された KUSC-M001 は単一のジアステレオマーであった。したがって、KUSC-M001 が有する抗 HCV 活性は単一化合物に由来する生物活性であることが示された。しかし、KUSC-M001 が有する抗 HCV 活性は細胞障害性に起因する可能性が示唆された。

そこで、KUSC-M001 の各種類縁化合物 KUSC-M002~KUSC-M016 を3成分 one-pot reaction により合成し、抗 HCV 活性を測定したところ、KUSC-M016 は細胞障害性を示

さない濃度域において顕著な抗 HCV 活性を示した。KUSC-M016 は KUSC-M001 のアニリン由来芳香環上の置換基を変換した化合物であるので、キノリン骨格上の芳香族置換基が活性発現に重要であることが示唆されるとともに、これら化合物群における宿主細胞への細胞障害活性と抗 HCV 活性の2つの生物活性を分離可能であることが示唆された。さらに、これらの結果は、KUSC-M016 の作用点が必ずしも goldicide A と同じであるとは限らず、今後、KUSC-M016 の詳細な薬理活性評価を行うことで、抗 HCV 剤開発のための新しい標的が明らかになる可能性も期待できる。

#### E. 結論

JFH-1 株由来の C 型肝炎ウイルス(HCV)を持続感染させたヒト肝癌細胞株 Huh-7 細胞株を用いた細胞培養系において、抗 HCV 活性を有する化合物を見出し、構造活性相関研究に適した化合物群のデザイン・創製・評価を行った結果、今後の展開が期待される KUSC-M016 を見出した。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Lindqvist, L., Robert, F., Merrick, W., Kakeya, H., Fraser, C., Osada, H., Pelletier, J.: Inhibition of translation by cytrotienin A -a member of the ansamycin family. *RNA*, 16; 2403-2413, 2010.
2. Nishimura, S., Arita, Y., Honda, M., Iwamoto, K., Matsuyama, A., Shirai, A., Kawasaki, H., Kakeya, H., Kobayashi, T., Matsunaga, S., Yoshida, M. Marine antifungal theonellamides target 3b-hydroxysterol to activate Rho1 signaling. *Nat. Chem. Biol.* 6; 519-526, 2010.
3. Kakeya, H., Nishimura, S. Novel natural products open the door of chemical biology and medicinal chemistry. *J. Synth.*

Org. Chem. Jpn. 68; 490-500, 2010.

G. 知的所有権の出願・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。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表