

201030029A

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

# ウイルス性肝疾患に対する 分子標的治療創薬に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子周一

平成23 (2011) 年3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

ウィルス性肝疾患に対する分子標的治療創薬  
に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 周一

平成23（2011）年 3月

## ウイルス性肝疾患に対する分子標的治療創薬に関する研究

### 研究組織

<u>研究代表者</u>		
金子 周一	金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学	教授
<u>研究分担者</u>		
小原 道法	(財) 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
菅 裕明	東京大学大学院理学系研究科・化学専攻	教授
深澤 征義	国立感染症研究所細胞化学部	室長
竹原 徹郎	大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学	准教授
宇都 浩文	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 消化器疾患・生活習慣病学	講師
前川 伸哉	山梨大学大学院医学工学総合研究部・肝疾患地域先端医療システム学講座	講師
村上 周子	名古屋市立大学大学院医学研究科	研究員
堀本 勝久	独立行政法人産業技術総合研究所	研究チーム長

# 目 次

## I. 総括研究報告

### ウイルス性肝疾患に対する分子標的治療創薬に関する研究

金子 周一	-----	1
-------	-------	---

## II. 分担研究報告

### 1. ウイルス性肝疾患に対する分子標的治療創薬に関する研究

金子 周一	-----	5
-------	-------	---

### 2. 高活性型siRNAを用いたウイルス性肝炎および肝がんに対する創薬研究

小原 道法	-----	10
-------	-------	----

### 3. 特殊ペプチドを用いたC型肝炎ウイルスに対する創薬研究

菅 裕明	-----	14
------	-------	----

### 4. C型肝炎ウイルス産生に関与する宿主因子の探索と創薬への応用

深澤 征義	-----	17
-------	-------	----

### 5. 肝がんにおけるマイクロRNA発現変化とアポトーシス耐性

竹原 徹郎	-----	22
-------	-------	----

### 6. プロテオミクスによるウイルス性肝疾患のバイオマーカー探索

宇都 浩文	-----	24
-------	-------	----

7. Cytokine Array解析を用いたHCVのPEG-IFN+ribavirin治療効果と関連する宿主因子の同定	
前川 伸哉	29
8. B型肝炎ウイルス感染系を用いた抗線維化薬物の研究	
村上 周子	32
9. 分子標的創薬に向けた細胞内活性化ネットワークの推定研究	
堀本 勝久	34
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	41

# I. 総括研究報告

ウイルス性肝疾患に対する分子標的治療創薬に関する研究

研究代表者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

**研究要旨：** 肝炎では、RANTESがC型肝炎の治療抵抗性の独立した因子として抽出された。プロテオミクスから同定した酸化ストレスマーカー候補MnSODの臨床的意義について解析し、CCケモカインの1種をプロテオミクスから同定した。肝がんでは、AFP、EpCAM陽性肝がんの特徴を明らかにするとともに、EpCAMを標的とする治療法開発の分子基盤を示した。また、micro RNAであるlet-7がBcl-xLの発現を抑制していることを示した。ヒト肝細胞置換キメラマウス（PXBマウス）のHBV感染における肝障害と線維化の関係を検討した。脂質ラフトの研究では脂肪と関連する118種類のタンパク質を同定した。いくつかの分子については免疫化学的にも脂肪滴への局在を確認し、IMP1及びIMP3はウイルスライフサイクルに関与する可能性を示唆した。当該条件下で活性化していると推定される制御ネットワークを抽出するシステムを構築した。創薬研究は、siRNAと特殊環状ペプチドを用いる研究を行っている。HCVの5'非翻訳領域(IRES)にデザインしたsiRNAのうち高い活性を持つものを得た。HCVのE2タンパク、ならびに肝臓癌のマーカーであるEpCAMに結合する特殊環状ペプチドの探索を行って候補ペプチドを得た。

A. 研究目的

B型(HBV)およびC型肝炎ウイルス(HCV)感染から肝硬変に進行、あるいは肝細胞がんを併発して死亡する患者数は我が国だけでも年間5万人に及ぶ。HBVに対して核酸アナログ製剤が使用されているが薬剤抵抗株の出現と長期間にわたる服薬が問題となっている。HCVに対してペグインターフェロン・リバビリン併用療法が行われているがHCVの排除が得られる率は5割に過ぎない。ウイルス性肝炎では肝硬変にいたると発がん率が極めて高く、また治療後の再発率も

高い。国内外でHBVに対する新規核酸アナログ、HCVに対するプロテアーゼおよびポリメラーゼ阻害薬、発がんあるいはがんの再発を抑える薬物の開発が進められている。しかし、患者による治療効果の違い、不十分な治療効果、重篤な副作用、および薬剤抵抗性の出現が問題となっている。

本研究の目的は、新たなウイルス性肝炎、肝がん治療薬の効果を予測する診断法を開発するとともに、ウイルス性肝炎の進展阻止、線維化阻止、発がん抑制を目指したsiRNA製剤および特殊ペプチド製剤などの

創薬研究を行うことである。

## B. 研究方法と研究結果

以下に研究者ごとに記載した。分担研究者の報告は、それぞれに分担研究報告書がつけられているため総括して記載した。

### ・研究代表者(金子周一)

肝がんの幹細胞マーカーを用いて肝がんの分類を行い、臨床像および薬物応答性との関連を明らかにした。肝内転移が多い肝がん、肝外転移が多い肝がんは薬物に対する応答性が異なる可能性を示した。AFP、EpCAM陽性肝がんの特徴を明らかにするとともに、EpCAMを標的とする治療法開発の分子基盤を示した。

### ・研究分担者(小原道法)

HCVの5' 非翻訳領域(IRES)にデザインしたsiRNAのうち、長鎖の2本鎖RNA(dsRNA)をDicerにより切断し、産生されたsiRNAの混合物(Diced-siRNAs)が高いsiRNA活性を持つことを認めた。高次構造を持った遺伝子領域に対して高いRNAi活性をもつsiRNAの作製を可能にした。

### ・研究分担者(菅 裕明)

HCVがヒト細胞に感染する際に重要な役割を果たすE2タンパク、ならびに肝臓癌のマーカーであるEpCAMに結合する特殊環状ペプチドの探索を行った。前者においては4種類の抗E2ペプチドを同定し、解離定数(Kd)の決定とともに細胞レベルでの感染阻害を検討した。後者についても特殊環状

ペプチドの探索が終了し、抗EpCAMペプチドが3種同定された。1種類のペプチドについては、C末端に蛍光ラベルを施し、EpCAMが発現されたヒトがん細胞に結合する事を共焦点顕微鏡をつかって観測した。

### ・研究分担者(深澤征義)

HCV感染培養細胞及び非感染細胞の脂肪滴蛋白質のプロテオーム解析を行い、脂肪と関連する118種類のタンパク質を同定した。PABP1及びPABP4、IMP1及びIMP3、DDX1及びDDX3については免疫化学的にも脂肪滴への局在を確認した。IMP1及びIMP3はウイルスライフサイクルに関与することが強く考えられた。

### ・研究分担者(竹原徹郎)

Bcl-xL mRNAの3' 領域と相互作用し得るマイクロRNAとしてlet-7ファミリーを同定した。トランスフェクションによりlet-7はBcl-xLの発現を抑制し、レポーターアッセイによりこの抑制は配列特異的な現象であることを示した。ヒト肝癌試料の解析により、let-7の発現が低い肝癌ではBcl-xLの発現が亢進していることが示された。

### ・研究分担者(宇都浩文)

酸化ストレスマーカー候補としてプロテオミクスから同定したMnSODの血清濃度と既知の酸化ストレスマーカーである血清チオレドキシンの臨床的意義について解析した。HCV関連肝癌患者血清中に増加するタンパクとしてアポトーシス抑制に関与する因子およびCCケモカインの1種をプロテオミク



スから同定した。

#### ・研究分担者(前川伸哉)

RANTESとIL-8についてビーズアレイ法を用いて精密定量を行ったところ (n=45)、IL-8低値群とRANTES高値群でSVR率が有意に高いことを確認した (それぞれ $p=0.016$ 、 $p=0.049$ )。RANTESは治療抵抗性のウイルス因子を含めた多変量解析でも独立した因子として抽出された。

#### ・研究分担者(村上周子)

HBV感染による肝線維化メカニズムを解析するマウスモデルを準備するための予備実験として、ヒト肝細胞置換キメラマウス (PXBマウス) の HBV 感染における肝障害と線維化の関係を検討した。ALTの高いグループにおいて肝細胞の障害像が観察され、線維化を確認した。

#### ・研究分担者(堀本勝久)

TRANSFACに収納される3096のヒト制御因子-遺伝子二項関係から、Molecular Signatures Database (MSigDB) の生物機能分類された遺伝子セットに基づき1760の制御ネットワーク (reference network) を準備した。このreference networkに対し、特異的条件下で計測した発現データを適用することで、グラフ整合性確率を算出した。当該条件下で活性化していると推定される制御ネットワークを抽出するシステムを構築した。

#### D. 考察

初年度は計画通りに、肝炎、肝がん、脂質ラフト、線維化において活性化している分子を同定し標的とする診断法の開発研究を実施した。創薬に関しては当初の予測よりも早く特殊ペプチドの候補を得ることができている。

以下に、今後の計画を研究者ごとに記載した。

#### ・研究代表者(金子周一)

AFP、EpCAMに対する薬物が有効であるがんの特徴を明らかにする。肝外転移をきたすがん、肝内転移をきたすがんの分子を明らかにする。これらマーカーを用いた診断法を開発する。作製された分子標的薬を評価する。

#### ・研究分担者(小原道法)

肝癌幹細胞で発現するEpCAM等を標的とするsiRNAを肝細胞がん細胞に導入し、抗がん作用について解析する。低分子化合物ライブラリーをスクリーニングしEpCAM阻害活性物質を得る。

#### ・研究分担者(菅 裕明)

同定ができている特殊環状ペプチドの生理活性の検討を引き続き行い、顕著な活性が認められるものについては更なる評価をマウス等の動物を用い検討を進める。

#### ・研究分担者(深澤征義)

HCVライフサイクルにおける脂肪滴局在宿主タンパク質の役割を検討する。脂質ラフト結合因子の性状解析と抗HCV薬としての可能性を検討する。HCV NS4B結合宿主因子の同定とHCVライフサイクルにおける役割を検討する。

#### ・研究分担者(竹原徹郎)

let7マイクロRNAの肝癌における細胞生物学的な意義を解析する。

・研究分担者(宇都浩文)

有用性を、HBV関連肝癌を含めて多数例で検証する。また、タンパクの病態との関連を明らかにする。

・研究分担者(前川伸哉)

RANTES、IL-8と治療効果の関連を、肝生検組織を含めた臨床検体における検討でさらに検証するとともに、HCV培養細胞系を用いて機能解析を行う。血清と肝組織中のサイトカインとの関連を明らかとする。サイトカインの抗ウイルス効果の確認と分子的な作用機序について検討を進める。

・研究分担者(村上周子)

HBVを感染させたPXBマウスにPEG-IFN $\beta$ をヒト型とマウス型でそれぞれ投与し、繊維化やウイルス排除に与える影響や違いについて解析を行うとともに、線維化に寄与する分子種について明らかにする。

・研究分担者(堀本勝久)

現解析システムにおけるネットワーク構造推定手法の導入。肝炎発現データの適用によるウイルス性肝炎特異的活性化ネットワークを同定する。

E. 結論

初年度はEpCAM、AFP、let-7などの分子を標的とすることが明らかにされ、これらの分子を標的とする分子診断の基礎研究とsiRNAおよび特殊環状ペプチドを用いた創薬開発研究が行われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各分担研究報告書を参照。

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

出願日：平成22年9月9日

出願番号：特願2010-202355

発明の名称：難治性ウイルス感染症の治療剤

発明者：小原道法、中川慎一郎

出願人：東京都医学研究機構

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

## II. 分担研究報告

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

ウイルス性肝疾患に対する分子標的治療創薬に関する研究

研究代表者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

**研究要旨：**肝細胞癌は我が国における第3の癌死亡原因であり、多くがB型もしくはC型肝炎ウイルス感染による慢性肝炎、肝硬変を背景に発症する難治性の癌である。近年癌細胞の一部に幹細胞性を有する癌細胞（癌幹細胞）が存在し、癌組織の維持、浸潤転移や抗癌剤抵抗性に深くかかわっているという仮説、癌幹細胞仮説が注目を集めている。我々はこれまでに肝幹細胞マーカーであるEpCAMとAFPを用いた新たな肝細胞癌分類システムを構築し、EpCAM陽性AFP陽性肝癌は若年発症、門脈腫瘍浸潤、予後不良を呈し、EpCAM陽性癌幹細胞が存在することを明らかにした。EpCAM陽性癌幹細胞は高い腫瘍形成浸潤能力や抗癌剤抵抗性を認めるが、その発生維持機構については未だ不明な点が多い。本研究において、我々は癌幹細胞の動態を明らかにする画像診断や血液検査法の開発および癌幹細胞維持機構の解明を目指す研究を行い、ヒト臨床サンプルおよび免疫不全マウスを用いて癌幹細胞の存在診断につながる可能性のある前臨床研究データを得た。今後さらなる検討を行い、癌幹細胞を標的とした診断治療法の開発につなげたい。

A. 研究目的

肝細胞癌は全世界で年間約62万人が罹患する第3の癌死亡原因である。肝細胞癌の殆どはB型もしくはC型慢性肝炎、肝硬変を背景に発症する。肝発癌のメカニズムとしてはウイルス蛋白そのものに加えて、繰り返す壊死、炎症、再生過程を背景に遺伝子異常が蓄積され、前癌病変から高分化型肝癌、進行肝癌へと進行していくと考えられている。この過程において異常をきたす様々な遺伝子・蛋白異常が報告されているが、全体像については未だ不明な点が多い。

近年、血液癌や一部の固形癌において幹

細胞様の特徴を示す細胞群（癌幹細胞）の存在が明らかになり、癌の維持、転移や治療抵抗性のメカニズムに深く関わっている可能性が示唆されている。肝細胞癌においてもいくつかの幹細胞マーカーを用いた癌幹細胞の分離が行われ、免疫不全マウスを用いた検討で強い腫瘍形成能力と自己複製能力、非対称性分裂能力を有していることが報告されている。さらに、癌幹細胞は従来用いられている抗癌剤や放射線療法に対して高い抵抗性を有し、癌治療後の再発への関与が示唆されていることから、癌治療における重要な標的として認識されている。

最近我々は肝幹細胞マーカーであるEpCAMとAFPを用いることで肝細胞癌を幹細胞タイプと肝細胞タイプに分類する方法を確立、発症年齢やWntシグナル活性の違い、肝切除後の予後など腫瘍としての特徴が大きく異なることを見出した。特にEpCAM陽性細胞は幹細胞タイプの肝細胞癌において癌幹細胞の特徴を有し、抗癌剤抵抗性を呈することから、肝細胞癌治療における重要なターゲットと考えられる。

本研究において、我々はEpCAM陽性細胞を非侵襲的に評価することが可能な診断法と治療法の開発を目指し、ヒト末梢血液細胞、肝細胞癌組織、培養細胞、免疫不全マウスおよび特殊ペプチドを用いて解析を行った。

## B. 研究方法

**サンプル** 培養細胞はHuH1, HuH7, HLE, HLF, SK-Hep-1細胞を用い、DMEM-10% FBS培地で培養した。

**マイクロアレイ** 156例の肝細胞がんサンプルをoligo-array(Qiagen, Valencia, CA)で解析、NCBIにデータ登録した(GSE5975)。

**皮下腫瘍移植モデル** 癌幹細胞の腫瘍形成能については希釈系列を用いたNOD/SCIDマウスへの皮下腫瘍形成について経時的に評価を行った。また、腫瘍サイズについてはMRIでも評価を行った。

**蛍光免疫染色** FAMを結合した特殊ペプチドは東京大学大学院理学系研究科生物有機化学教室、菅裕明教授からご供与いただいた。チャンバースライド上に細胞を培養

した後に1  $\mu$ Mの濃度でペプチドを投与し経時的に観察を行った。

### (倫理面への配慮)

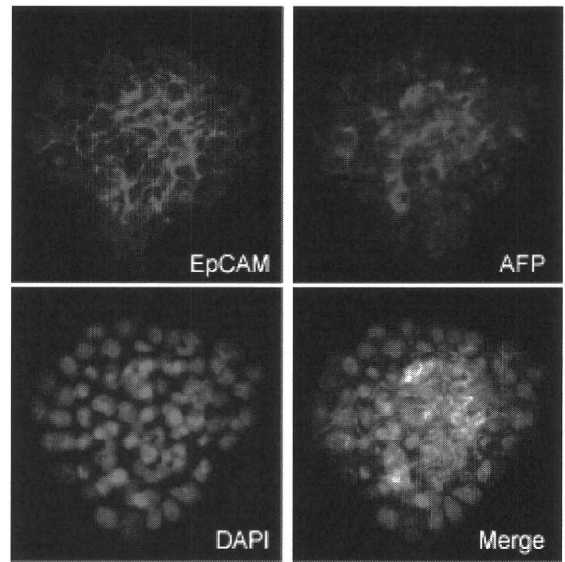
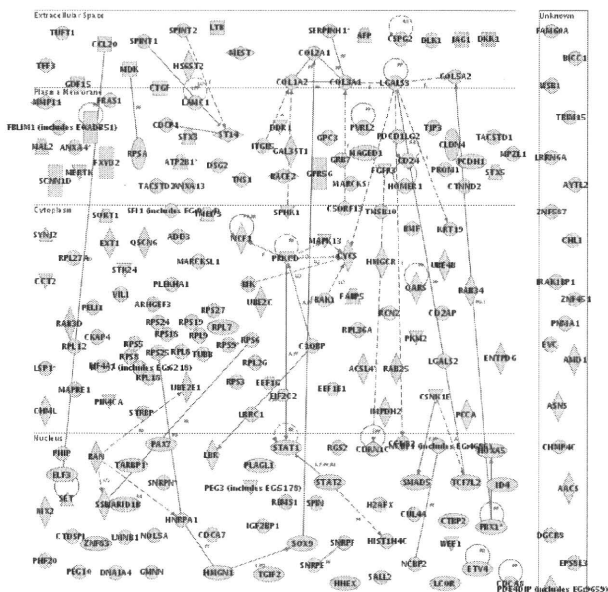
サンプルを提供する患者には、研究内容の説明及び研究協力への依頼につき説明文書を用いて説明し(①遺伝子、転写産物、蛋白発現解析について、②研究の目的・方法、③研究用サンプルを提供することに伴う危険性及び利益、④同意撤回及びサンプルの廃棄、⑤プライバシーの保護及び機密保持、⑥経済的な利益等の項目)、研究協力への同意が得られた患者のサンプルを解析に用いた。

個人に関する情報の保護と管理は、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて行った。連結可能匿名化後、金沢大学大学院医学系研究科環境医科学専攻恒常性制御学講座にて個人情報分担管理者の管理の下保存、データは研究室に設置した専用コンピューターにて一括管理し、データアクセスは研究従事者がパスワードを用いて行った。

## C. 研究結果

背景肝に比べEpCAMとAFPが2倍以上発現亢進している肝細胞癌を幹細胞タイプ(HpSC-HCC)、EpCAMとAFPがともに背景肝に比べ2倍未満の肝細胞がんを肝細胞タイプ(MH-HCC)と定義し、遺伝子発現パターンを解析したところ、HpSC-HCCとMH-HCCで発現が統計的に有意に異なる793遺伝子が判明した。この遺伝子群につき

subcellular localization およびパスウェイ解析を施行したところ、Wnt, JAG1, MDK シグナルなどの複数のシグナル伝達系がEpCAM 陽性肝細胞癌において特異的に活性化している可能性が示唆された (図1)。  
 図1 HpSC-HCC で発現変動が認められる遺伝子群の細胞内局在解析およびパスウェイ解析

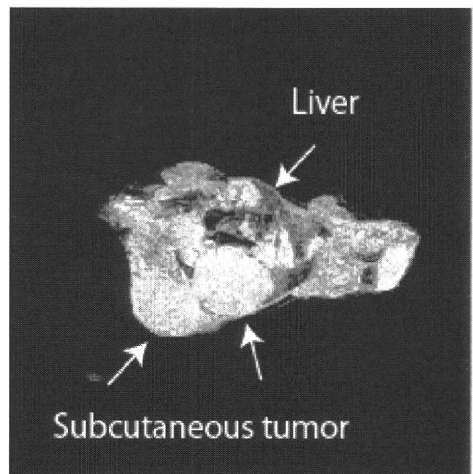


そこで、HuH7細胞を $1 \times 10^5$ 個をマトリゲルと混和後にNOD/SCIDマウスに皮下移植したところ、約40日で腫瘍の形成が認められ、かつmagnet nano-particleを尾静脈から注射することによりマウスの肝臓がflow-voidによりシグナルが得られることを見出した (図3)。

図3 NOD/SCID皮下移植モデルにおけるMRI (T2強調画像)

更に、培養細胞における EpCAM 陽性 AFP 肝癌細胞株を検討したところ、HuH7, HuH1 ともに EpCAM, AFP を発現しており、かつ単一細胞から形成されたコロニー内に EpCAM, AFP を発現している細胞と発現が認められない細胞が混在していることから、非対称性分裂および自己複製を行っていることが示唆され (図2)、HuH7, HuH1 ともに HpSC-HCC に属することが判明した。一方 HLE, HLF, SK-Hep-1 は EpCAM 陰性 AFP 陰性であった。

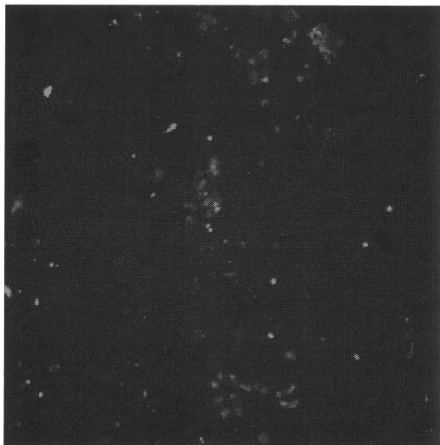
図2 HuH1 由来の単一細胞から得られたコロニーの蛍光免疫染色像



最後に、合成EpCAM蛋白と結合することが可能な特殊環状ペプチドがHpSC-HCCに結合することが可能かについてlive cell imagingを用いて解析したところ、特殊環状ペプチドはEpCAM陽性肝癌細胞株にのみ

特異的に結合が認められ、24時間後にはその結合は消失していた。

図4 特殊環状ペプチド投与5分後の蛍光免疫染色像 (HuH7)



#### D. 考察

現在の肝細胞癌診療は末梢血液を用いた腫瘍マーカー測定と造影剤を用いた主に癌部における血流変化を指標とした画像診断が用いられている。この方法では腫瘍マーカーを産生する癌や血流変化をきたす癌の検出は可能であるが、癌細胞そのものの動態を捉えているわけではなく、かつ悪性度を評価するには限界がある。一方マイクロアレイをはじめとする遺伝子や蛋白発現の網羅的解析は癌そのものを対象とし、かつその生物学的悪性度を評価するには理想的な方法である一方、外科切除などにより直接組織を取り出す必要があり、全ての患者で評価することは困難である。これまでに我々はEpCAMとAFPという2つのマーカーを用いることで肝細胞癌の悪性度評価が可能であることを提唱してきた。本研究においてはさらに、1) 悪性度の高いHpSC-HCCでは特異的なシグナル伝達系の活性化

が起こっていること、2) HpSC-HCCを免疫不全マウスに移植することでMRIにより腫瘍の進展が評価可能であり、磁性体を用いた造影剤の効果をマウスで確認できること、3) 特殊環状ペプチドが生細胞でEpCAM陽性肝癌細胞株に結合可能なこと、を見出した。今後これらの新規技術や診断法を用いることで、肝細胞癌の新たな診断法や治療法の開発につながる可能性が示唆された。

#### E. 結論

癌幹細胞マーカーであるEpCAMとAFPを用いることで、悪性度の高い肝細胞癌におけるシグナル伝達系の特徴、免疫不全マウスにおける皮下腫瘍移植モデルとMRIによる画像評価、EpCAMに結合することが可能な特殊環状ペプチドの動態、などにつき解析を行った。今後これらの技術を進めることにより、肝癌幹細胞を標的とした新たな診断、治療法の開発につながる可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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;70:4687-97.
- 2) 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;30:438-46.

- 3) Hodo Y, Hashimoto S, 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;95:217-23.
- 4) 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* 2010 In press.
- 5) Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Chapter 16. Heterogeneity of Liver Cancer Stem Cells. In: *Molecular Genetics of Liver Neoplasia*. Springer New York 2010.

## 2. 学会発表

- 1) Yamashita T, Honda M, and Kaneko S. Signaling pathways responsible for self-renewal and differentiation in liver cancer stem cells. Japanese Cancer Association Annual Meeting 2010, Osaka, 2010.
- 2) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Yamashita T, Arai K, Takatori H, Nio K, Hara Y, Takamura H, Tani T, Ikeda H, Zen Y, Wang XW, and Kaneko S. Heterogeneity and Hierarchy of Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer. American Association of Study of Liver Diseases Annual Meeting 2010, Boston,

2010.

- 3) Yamashita T, Honda M, Nio K, and Kaneko S. Oncostatin M renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. American Association of Cancer Research 101<sup>st</sup> Annual Meeting 2010, Washington D.C., 2010.
- 4) 山下太郎、本多政夫、金子周一. Oncostatin M を用いた幹細胞様肝癌の分化誘導療法の検討、日本肝臓学会総会、山形、2010年.

## G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
特になし



厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

高活性型siRNAを用いたウイルス性肝炎および肝がんに対する創薬研究

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：**我々は、C型肝炎ウイルス (HCV) の5' 非翻訳領域 (IRES) にデザインした siRNAのうち、長鎖の2本鎖RNA (dsRNA) をDicerにより切断し、産生されたsiRNAの混合物 (Diced-siRNAs) が高いsiRNA活性を持つことを認めた。そこで我々はDiced-siRNAの配列同定法を確立し、IRESのような高次構造を持った領域に対するより高活性のsiRNAの探索と構築を試みた。Diced-siRNAs切断部位から推測して作製したsiRNAのRNAi効果を検討した結果、非常に高いRNAi活性をもつものが同定された。またこれらの同定されたsiRNAは、遺伝子型の異なるレプリコン細胞でも、数種類のsiRNAを共導入することにより、複製阻害活性が維持されることが確認された。これらの結果から、dicerによるdsRNA切断部位を同定することで、非常にRNAi活性の高いsiRNAを作製できることが示された。これにより、高次構造を持った遺伝子領域に対して高いRNAi活性をもつsiRNAの作製を可能にした。

A. 研究目的

我々は、C型肝炎ウイルス (HCV) の5' 非翻訳領域 (IRES) にデザインしたsiRNAのうち、Dループ領域に設定したsiRNA (siE) が高いRNAi活性を示す事を報告してきた。さらに、siE領域を含むIRES領域にデザインした長鎖の2本鎖RNA (dsRNA) を内在性のDicerにより切断し、産生されたsiRNAの混合物 (Diced-siRNAs) が、siEに比べ高いsiRNA活性を持つことを認めた。これらの結果は、産生されたDiced-siRNAsがsiEよりも高活性のsiRNAを含むことを示唆する。そこで我々はDiced-siRNAの配列同定法を確立し、IRESのような高次構造を持った領域に対するより高活性のsiRNAの探索と構

築を試みた。

B. 研究方法

IRES 領域の siE 配列を含む長鎖 dsRNA (50 b p と 197 b p) から、in vitro で Diced-siRNAs を作製し、これら 2 種類の Diced-siRNAs を HCV レプリコン細胞に導入した。細胞から HCV RNA を抽出し、2つの 5' 末端同定法 (RNA oligo ライゲーション法及び c-Tailing 法) を用いて、切断された HCV-RNA の 5' 末端をクローニングにより同定した。同定された 5' 末端のうち、クローン数の多い末端を中心に siRNA をデザインし、HCV レプリコン細胞に対する RNAi 効果を検討した。

#### (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

Diced-siRNAs 切断部位から推測して作製した siRNA の RNAi 効果を検討した結果、siE より 2~3 倍の RNAi 活性をもつものが 3 本同定された。またこれらの同定された siRNA は、遺伝子型の異なるレプリコン細胞でも、3 種類の siRNA を共導入することにより、複製阻害活性が維持されることが確認された。

#### D. 考察

これらの結果から、dicer による dsRNA 切断部位を同定することで、非常に RNAi 活性の高い siRNA を作製できることが示された。これにより、高次構造を持った遺伝子領域に対して高い RNAi 活性をもつ siRNA の作製を可能にした。

#### E. 結論

現在、肝臓特異的に siRNA を導入できる特殊な修飾リポソームを開発中であり、すでに *in vitro* では無修飾のリポソームに比較して、100 倍の siRNA 導入効率を確認している。今後は、上記の高 RNAi 活性を有する siRNA と修飾リポソームを用いて、*in vivo* における抗 HCV 効果を検討していく予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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)
- 5) 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. Virology 84(22):11761-11770 (2010).
- 6) Masaaki Arai, Hidenori Suzuki, Yoshimi Tobita, Asako Takagi, Koichi Okamoto, Atsunori Ohta, Masayuki Sudoh, Kunitada Shimotohno, Michinori Kohara. Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. Arch. Virol. 156:295-304 (2011).
- 7) 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 (2011) in press.
- 8) Takashi Takano, Michinori Kohara, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Makoto Saito, Chieko Kai, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. J. Med. Virol. (2011) in press.
- 9) 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.
2. 学会発表
- 1) 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
- 2) Nakagawa S., Hirata Y., Tokunaga Y., Hirabatashi K., Yano J., Tateno C., Tanaka Y., Mizokami M., Inoue K., Yoshida M., Kohara M. : Interferon lambda plays a critical role on antiviral effect in human hepatocyte. 17<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2010.9.10-14. 横浜
- 3) 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. 17<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2010.9.10-14. 横浜
- 4) 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

- 5) 平田雄一、井上和明、小原道法 : IFN $\lambda$ 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
- 6) 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

出願日：平成 22 年 9 月 9 日

出願番号：特願 2010-202355

発明の名称：難治性ウイルス感染症の治療剤

発明者：小原道法、中川慎一郎

出願人：東京都医学研究機構

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

特になし