

系を用いて得られた精製組換えタンパク質 (rGRFT) を用いた (米国 NCI O'Keefe 博士から供与)。

## (2) HCV 感染性中和実験

HCV JFH-1 (感染研脇田博士より供与) の感染性ウイルスのストックと試験物質を 4C で 1 時間作用させた後、超遠心にて未反応の試験物質を除き、HCV 粒子を含む沈渣を懸濁した後、Huh7.5.1 細胞に感染させ、上記処理後の HCV 粒子の感染性を、3 日後の培養上清中の HCV core 量を HCVcore 抗原 ELIZA アッセイを用いて定量することによって評価した。

## (3) ヒト肝細胞移植 uPA/SCID マウス感染実験

HCV (genotype 1) 感染の 1 日前 (d -1) から感染後 16 日にわたって GRFT を、ヒト肝細胞移植 uPA/SCID マウスに 1 日 1 回皮下接種を行った。HCV 感染の 4 日前 (d -4), HCV 感染 3, 10, 17, 24, 31 日後 (d3, 10, 17, 24, 31), にそれぞれ血液を採取し、血中の HCV titer (QT-PCR) および肝臓毒性の指標として alanine aminotransferase (ALT) を定量した (KMT Hepatech)。

(倫理面への配慮) 該当なし。

## C. 研究結果

### (1) rGRFT の HCV 感染性中和効果

GRFT が標的細胞側に作用するのか、あるいはウイルス粒子側に直接作用するのかを明らかにするために、GRFT と感染性 HCV 粒子とを直接 incubate した後、粒子の感染性が失われるかどうかを評価した。実験対照として、抗 CD81 単クローン抗体と、われわれがこれまでに同定している低分子性のエントリー阻害剤 compound A, B を用いた。

その結果、図 1 にみるように、GRFT は、ウイルス粒子との preincubation によって粒子の感染性を失わせさせるが、一方、抗 CD81 単クローン抗体や compound A, B は、ウイルス粒子との preincubation によっては感染性に影響を与えない。この結果は、GRFT がウイルス側に作用して、粒子の感染性を失わせる (中和する) 効果をもつものに対して、後 3 者の標的はウイルス側ではなく細胞側にあることを示唆する。

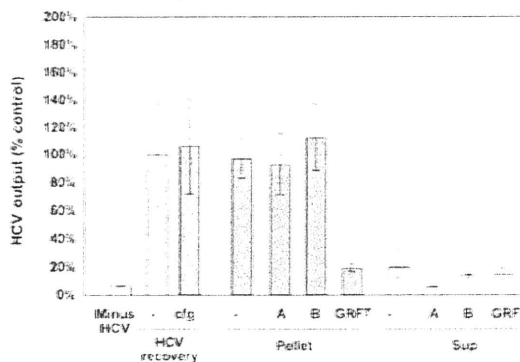


図 1. GRFT はウイルス側に作用する。

### (2) ヒト肝細胞移植 uPA/SCID マウスを用いた GRFT の抗 HCV 活性に関する Proof-of-concept 実験

ヒト肝細胞移植 uPA/SCID マウス (キメラマウス) を用いた感染防御実験の実験デザインは次のようである。キメラマウスを次の 4 群 (各群 n=4):

- 1) 生理的食塩水接種群
- 2) rGRFT (20 mg/Kg) 接種群;
- 3) インターフェロン  $\alpha$  (1,350 IU/Kg) 接種群
- 4) GRFT+インターフェロン  $\alpha$  接種群

に分け、各群のマウスに対して、各試験薬物を、HCV (genotype 1) 感染の 1 日前 (d -1) から感染後 16 日にわたって、1 日 1 回皮下接種を行った。感染の 4 日前 (d-4) に採取した血液を処理前対照として、HCV 感染後 3 日後から 1 週間ごと 31 日目 (d3, d10, d17, d24, d31) までマウスから採血を行い、血中の HCV titer および (肝臓毒性の指標として) alanine aminotransferase (ALT) を定量した。

その結果、図 2 に示すように、GRFT は、陰性対照 (生理的食塩水) に対して、3-4 log に及ぶ抗 HCV 効果を示し、また 30 日後にもウイルス量のリバウンドが見られない。図 2 の縦軸は、各接種群のウイルスタイター (マウス血中 HCV コピー数) の平均値を示す。なお、マウス血中の ALT 値および体重に変化は見られない。また GRFT の抗ウイルス効果には、インターフェロン  $\alpha$  接種群および インターフェロン  $\alpha$  および GRFT の併用接種群との間で統計的な有意差は見い出されなかった。その理由は現時点では明らかではない。

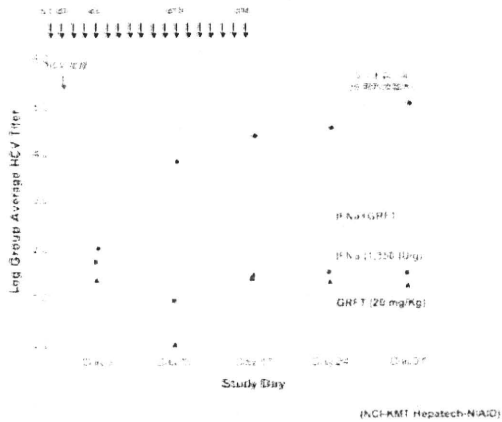


図2. GRFTによるキメラマウスにおける HCV 感染防御効果

#### D. 考察

これまでの解析結果を含め、次のような根拠から、GRFTはHCVエントリー過程を阻害することによって、強力な抗HCV活性を示すことが明らかとなった。

- i) GRFTはHCV pseudoparticle (HCVpp) 感染を阻害する
- ii) Replicon assayでは有意の抗HCV活性を示さない
- iii) Time-of-addition 実験から、GRFTの作用点は感染極初期にあると推定される
- iv) GRFTは組換えHCV E2タンパク質に対して *in vitro* で高い結合活性を示す

またさらに、本研究で明らかにされたように、v) GRFTをHCV粒子とpreincubationすることによって、実際にHCV粒子の感染性が失われること(図1)を実証した。

GRFTの個体レベルでの抗HCV効果を検証するために、ヒト肝細胞移植uPA/SCIDマウスを用いたProof-of-concept (COP)実験を行い、その結果、HCV感染後長期(30日間以上)にわたって、対照群に対して1,000-10,000倍の強い抗HCV効果を示し、少なくとも30日後にも血中のウイルス量のリバウンドは見られず、強いウイルス増殖抑制が長期にわたって観察された。

この長期にわたるウイルス抑制は、GRFT耐性出現へのgenetic barrierが高い可能性を示唆する。図3に示すように、HCVエンベロープE2タンパク質の(CD81)受容体結合領域(ドメインI)は、糖鎖結合サイトのクラスターしている。これらの糖鎖群は、感染個体内での中和抗体からのエスケ

ープ、持続感染状態の成立・維持に関与していると考えられている。GRFTに対する耐性が生まれるには、この領域の複数の糖鎖結合サイトが失われる必要があると考えられる。

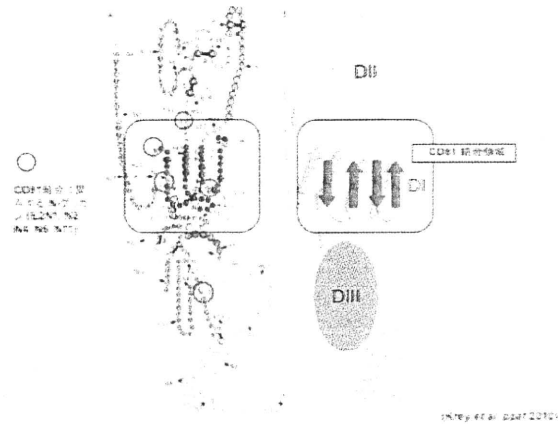


図3. HCVエンベロープE2タンパク質の高次構造モデル。(A) アミノ酸配列と糖鎖付加部位。(B) E2タンパク質のドメイン構造。CD81結合サイトはドメインI(DI)にあり、CD81結合に関与すると考えられている5個の糖鎖サイトのうち4個(E2N1, N2, N4, N6)が見出される。

生体内でのGRFTの抗HCV効果は、*in vitro*(細胞レベル)での実験から示唆されるように、i) GRFTのエンベロープ糖鎖への結合による、HCV粒子の標的細胞への(非特異的な)吸着阻害に加え、ii) それに次ぐHCVエントリー受容体(SR-B1およびCD81)へのエンベロープタンパク質の特異的な結合阻害によると考えられるが、さらに個体レベルでは、iii) 肝内皮細胞および肝臓組織内

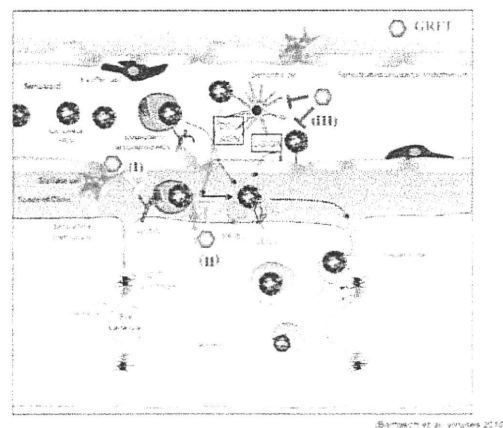


図4. GRFTの *in vivo* における抗HCV活性の分子機構

の樹状細胞表面に発現している C-タイプ・レクチン(それぞれL-SIGN, DC-SIGN) による HCV 吸着およびトランスサイトシスの阻害作用が加わり、強力な抗 HCV 活性を示すものと推測される (図4)。

GRFT は糖鎖タンパク質としての性質から HIV-1 や HCV に留まらず、糖鎖で修飾された様々なエンベロープウイルスに対して、広範且つ強力な抗ウイルス活性をもつことが期待されることから、新たなカテゴリーの抗ウイルス剤として非常に魅力的な性質を備えている。

しかし、一方、分子量が 10,000 を超えるタンパク質であるために、経口吸収性や良好な血中薬理動態を期待できないことや、抗体産生の誘導のために薬理効果が短期間で減弱する可能性、さらに過敏性反応などの重篤な副作用を起因する虞れがあることから、臨床応用に向けては多くのハードルがクリアされる必要があると考えられる。しかし、ここで見たマウスモデルでの良好な結果は、抗 HCV 戦略の新たな道筋としての可能性を期待させるものである。

#### E. 結論

GRFT は、HCV エンベロープタンパク質の高マンノース型糖鎖に結合することによって、標的細胞へのウイルス吸着を阻害するエントリー阻害剤として作用し、*in vitro* で強力な抗 HCV 効果を示す。さらに、ヒト肝細胞移植 uPA/SCID マウスを用いた Proof-of-Concept 実験によっても、GRFT は強力且つ持続性の抗 HCV 活性を示すことから、抗 HCV 戦略の新たな開発の可能性を期待させる。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表 (2006-2008)

[論文発表]

1. Takebe, Y. & O'Keefe, B. R. *et al.* Effective protection of HCV infection by HCV entry inhibitor griffithsin, newly identified carbohydrate binding protein, in mouse infection model. (*manuscript in preparation*).
2. Arita M, Takebe Y, Wakita T, Shimizu H. (2010).

A bifunctional anti-enterovirus compound that inhibits replication and the early stage of enterovirus 71 infection. *J Gen Virol.* **91(Pt 11):** 2734-44.

3. Takebe, Y., Liao, H., Hase, S., Uenishi, R., Li, Y., Li, XJ., Han, X., Shang, H., Kamarulzaman, A., Yamamoto, N., Pybus, OG., and Tee, KK. (2010). Reconstructing the epidemic history of HIV-1 circulating recombinant forms CRF07\_BC and CRF08\_BC in East Asia: the relevance of genetic diversity and phylodynamics for vaccine strategies. *Vaccine* **28 Suppl 2:** B39-44.
4. Li, Y., Uenishi, R., Hase, S., Liao, H., Li, X.-J., Tsuchiura, T., Tee, K.K., Yang, R., Pybus, O. G. and Takebe, Y. (2010). Explosive HIV-1 subtype B' epidemics in Asia driven by geographic and risk group founder events. *Virology.* **402(2):** 223-7.
5. Li, Y., Tee, K.K., Liao, H., Hase, S., Uenishi, R., Li, X.-J., Tsuchiura, T., Yang, R., Govindasamy, S., Yean Kong Yong, Y. K., Hong Yien Tan, H. Y., Pybus, O. G., Kamarulzaman, A. and Takebe, Y. (2010). Identification of a novel second-generation circulating recombinant form (CRF48\_01B) in Malaysia: a descendant of the previously identified CRF33\_01B. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **54(2):** 129-36.
6. Han X, Dai D, Zhao B, Liu J, Ding H, Zhang M, Hu Q, Lu C, Goldin M, Takebe Y, Zhang L, Shang H. (2010). Genetic and epidemiologic characterization of HIV-1 infection In Liaoning Province, China. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **53 Suppl 1:**S27-33.
7. Tee KK, Lam TT, Chan YF, Bible JM, Kamarulzaman A, Tong CY, Takebe Y, Pybus OG. (2010). Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics,

natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene. *J Virol.* **84(7)**: 3339-50. Epub 2010 Jan 20.

[学会発表]

1. Takebe, Y., Uenishi, R., Hase, S., Tsuchiura, T., Liao, H., McMahon, J.B., and O'Keefe, B, R. Effective protection of HCV infection by HCV entry inhibitor griffithsin, newly identified carbohydrate binding protein, in mouse infection model. 7th International symposium on Hepatitis C virus and related viruses. September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(1) 武部豊、内藤雄樹、西郷薫、名取幸和: 「RNA干渉ポリヌクレオチド混合物の設計装置、RNA干渉ポリヌクレオチド混合物の作製方法、及びRNA干渉ポリヌクレオチド混合物の設計プログラム」(特許番号「特許第4641199号」登録日「平成22年12月10日」)(特許権者「国立感染症研究所長、国立大学法人東京大学、株式会社アルファジェン」)

(2) 武部 豊、大川 淳: 「リボザイム発現系」(特許番号「特許第4663142号」登録日「平成23年1月14日」)(特許権者「国立感染症研究所長、武部豊、大川淳」)

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

脂質代謝を標的とする HCV 治療法の開発

分担研究者 池田 正徳 岡山大学 准教授

研究要旨：HCV RNA 複製培養細胞を用いた薬剤のスクリーニングでは、多くが HuH-7 細胞と 1 種類の HCV 株を用いて薬剤の評価が行われている。分担課題である、脂質代謝を標的とする HCV 治療法の開発にあたり、本年度は、2 種類の肝細胞株 (HuH-7, Li23) と 3 種類の HCV 株 (0, 1B-4, KAH5) を用いて 6 種類の全長 HCV RNA レポーターアッセイ系を開発した。また、HCV RNA の複製に必要なゲラニルゲラニル化の基質であるゲラニルゲラニルピロリン酸に化学構造が近いテプレノンが抗 HCV 活性を有することを見出した。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) は、慢性肝炎、肝硬変、肝癌の原因となる最も重要な感染症の 1 つである。1999 年の HCV replicon、2005 年の感染性 HCV 産生系の開発により HCV のライフサイクルの研究が飛躍的に進むこととなった。その成果をもとに抗 HCV 剤候補の報告も蓄積されつつある。

しかしながら、多くの抗 HCV 剤のスクリーニングでは細胞株として HuH-7 が用いられており、また、HCV 株についても 1-2 種類の HCV 株によりアッセイが行われている。本分担研究では、特定の細胞株、HCV 株で起こる現象ではないことの確認、また、HuH-7 細胞や限られた HCV 株では検討できない現象を検討できる HCV 増殖系の開発を目的とする。この目的を達成するために今年度は 2 つの細胞株 (HuH-7、Li23) と 3 つの HCV 株 (0, 1B-4, KAH5)

を用いて全長 HCV RNA レポーターアッセイ系の開発を行った。

HCV のライフサイクルには宿主の脂質が重要な役割を果たしていることが知られている。我々はこれまで、メバロン酸経路の律速酵素である HMG-CoA reductase の阻害剤であるスタチン剤が HCV RNA 複製を阻害することを報告した。今年度は、開発済みの全長 HCV RNA レポーターアッセイ系 (OR6 アッセイシステム) を用いてメバロン酸経路で産生されるゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) に化学構造が似ているテプレノンが抗 HCV 活性を有することを見出した。

現在、メバロン酸経路を標的とした新たな抗 HCV 剤候補の探索を開始している。新しい抗 HCV 剤候補が見出された場合には、今年度が開発した細胞株と HCV 株によるアッセイ系を用いてこれらについて検討してゆきたい。

## B. 研究方法

肝細胞株として、ヒト肝癌細胞株の HuH-7 細胞と、Li23 細胞を用いた。HCV 株として、急性肝炎由来の KAH5 とキャリアー由来の 0 と 1B-4 を用いた。0 株についてはすでに HuH-7 細胞、Li23 細胞で増殖する OR6 細胞、ORL8 細胞を作製し報告している。今回は、新たに 1B-4 株、KAH5 株を HuH-7 細胞に導入した、1B-4R 細胞と KAH5R 細胞を作製した。また、1B-4 株、KAH5 株を Li23 細胞に導入した、1B-4RL 細胞と KAH5RL 細胞を作製した。

HuH-7 細胞および Li23 細胞で複製する HCV RNA には全長 HCV RNA 遺伝子の 5' 上流に、Renilla luciferase、ネオマイシン耐性遺伝子、EMCV IRES の 3 種類の外来性遺伝子を導入した。

6 種類の HCV RNA 複製細胞における HCV 蛋白質の発現についてウエスタンブロット解析を実施した。

これまでに抗 HCV 活性が報告されている薬剤である IFNs、オンコスタチン M (OSM)、サイクロスポリン A (CsA)、ピタバスタチン (PTV) に対する  $EC_{50}$  を求めた。

OR6 細胞を用いてゲラニルゲラニル化の基質となる GGPP に化学構造式の似たテプレノンの抗 HCV 活性について検討した。また、テプレノンと IFN- $\alpha$  あるいは、スタチン剤の併用効果について検討した。

## C. 研究成果

2 種類の細胞株 (HuH-7、Li23) と 3 種類の HCV 株 (0、1B-4、KAH5) を用いて 6 種類の全長 HCV RNA レポーターアッセイ系を作製した。

これらの HCV RNA 複製細胞で HCV 蛋白質 (Core, NS3, NS5B) の発現をウエスタンブロット解析で確認した。これらの、6 種類のアッセイ系を用いて IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\lambda 1$ 、OSM、CsA、PTV に対する感受性 ( $EC_{50}$ ) を検討した。CsA では両細胞間で複製する HCV に対する感受性が同程度であった。しかしながら、HuH-7 細胞と Li23 細胞で複製する HCV に対する各薬剤の感受性は Li23 細胞で高い傾向がみられた。なかでも、IFN- $\lambda 1$  では Li23 細胞の HCV に対する感受性が HuH-7 細胞の HCV に比べて約 100 倍高かった。

メバロン酸経路で産生される GGPP に化学構造が似ているテプレノンの抗 HCV 活性について OR6 細胞を用いて検討した。テプレノンは、毒性のない範囲で濃度依存的に HCV RNA 複製を抑制し、 $EC_{50}$  は  $5.3 \mu\text{g/ml}$  であった。テプレノンは IFN- $\alpha$  と併用すると濃度依存的に IFN- $\alpha$  の抗 HCV 活性を増強した。

テプレノンをスタチン剤と併用すると、テプレノンはスタチン剤の抗 HCV 活性を増強した。この時興味深いことにテプレノンはスタチン剤のゲラニルゲラニル化抑制効果をさらに増強した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後、廃棄した。

#### D. 考察

HCV RNA 複製培養細胞を用いた薬剤のスクリーニングでは、多くが HuH-7 細胞と 1 種類の HCV 株を用いて薬剤の評価が行われている。分担課題である、脂質代謝を標的とする HCV 治療法の開発の実施にあたり、本年度は、2 種類の肝細胞株 (HuH-7, Li23) と 3 種類の HCV 株 (0, 1B-4, KAH5) を用いて 6 種類の全長 HCV RNA レポーターアッセイ系を開発した。

HuH-7, Li23 細胞において CsA のように HCV に対する感受性が同程度の薬剤があったが、Li23 細胞で高い感受性を示す薬剤が多い傾向が認められた。IFN- $\lambda$ 1 では HuH-7 よりも Li23 における感受性が約 100 倍高い薬剤も見出された。両細胞における HCV に対する IFN- $\lambda$ 1 の感受性の違いについて IFN 刺激、ISG の発現等を比較検討することで、IFN- $\alpha$  とは異なる IFN- $\lambda$  の抗 HCV 機構解明の手がかりが得られるかもしれない。

ゲラニルゲラニル化の基質である GGPP に化学構造が類似したテブレノンが抗 HCV 活性を示した。テブレノンは単独ではゲラニルゲラニル化を抑制しなかったが、予想外にスタチン剤と併用するとスタチン剤のゲラニルゲラニル化抑制効果をさらに増強する新規の機能を有することがわかった。スタチン剤は最近抗 HCV 活性のみならず、肝発癌のリスクを低下させる効果についても報告されているため、テブレノンをスタチン剤と併用することで HCV 感染による肝発癌を抑制する可能性についても今後研究を進めてゆきたい。

#### E. 結論

- 1) 2 種類の肝細胞株 (HuH-7, Li23) と 3 種類の HCV 株 (0, 1B-4, KAH5) を用いて 6 種類の全長 HCV RNA レポーターアッセイ系を開発した。
- 2) テブレノンの抗 HCV 活性を見出した。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe KI, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer Agent Teprenone Inhibits Hepatitis C Virus Replication: Potential Treatment for Hepatitis C. *Liver Int.*, in press, 2011.
- (2) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Mechanism of action of Ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. In press, *Virus Res.*, In press, 2011.
- (3) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT System Is Required for Hepatitis C Virus Production. *PLoS ONE*, 6(1): e14517, 2011.
- (4) Oshiumi H, Ikeda M, Matsumoto M, Watanabe A, Takeuchi O, Akira S, Kato N,

- Shimotohno K, Seya T. Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN- $\beta$  induction. *PLoS ONE*, 5(12): e14528, 2010.
- (5) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Kato N. Gene expression profile of Li23, a new human hepatoma cell line enables robust hepatitis C virus replication: Comparison with HuH-7 and other hepatic cell lines. *Hepatology Res.*, 40:1248–1253, 2010.
- (6) Ikeda F, Dansako H, Nishimura G, Mori K, Kawai Y, Ariumi Y, Miyake Y, Takaki A, Nouse K, Iwasaki Y, Ikeda M, Kato N, Yamamoto K. Amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein are not associated with intracellular antiviral response to interferon- $\alpha$  in vitro. *Liver Int.* 9: 1324-1331, 2010.
- (7) Tanaka T, Hasegawa Y, Saito M, Ikeda M, Kato N. Generation of single-chain Fvs against detergent-solubilized recombinant antigens with a simple coating procedure. *J. Biosci. Bioeng.*, 110:374-376, 2010.
- (8) Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito H, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Path. Int.* 60:351-357, 2010.
- (9) Nozaki A, Morimoto M, Kondo M, Oshima T, Numata K, Fujisawa, Kaneko T, Miyajima E, Morita S, Mori K, Ikeda M, Kato N, Tanaka K. Hydroxyurea as an inhibitor of hepatitis C virus RNA replication. *Arch Virol.*, 155:601-605, 2010.
- (10) Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Hokari R, Kato N, Hibi T, Miura S. An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus. *World J. Gastroenterol.*, 16:184-192, 2010.
2. 学会発表
- (1) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N Mechanism of anti-HCV of ribavirin in novel HCV replication cell system 69th annual meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, 2010. Sep.
- (2) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N The PML tumor suppressor protein is required for HCV life cycle 69th annual meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, 2010. Sep.
- (3) 池田 正徳、森 京子、武田 緑、中澤 貴秀、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之 異なる HCV 株、細胞株を用いた HCV RNA 複



- 製培養細胞での薬剤評価 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 10 月
- (4) 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之 リバビリンの抗 HCV 活性を決定する因子の解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 10 月
- (5) 上田 優輝、森 京子、池田 正徳、有海 康雄、加藤 宣之 異なる細胞株を用いて開発した HCV-RNA 複製系による抗 HCV 活性が報告されている薬剤等の再評価 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 10 月
- (6) 黒木 美沙緒、有海 康雄、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之 がん抑制因子 PML は HCV ライフサイクルに必須である 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 10 月
- (7) 有海 康雄、黒木 美沙緒、土方 誠、Qi Yue、池田 正徳、脇田 隆字、下遠野 邦忠、加藤 宣之 癌抑制因子と HCV のクロストーク (シンポジウム)、 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 10 月
- (8) 田中寅彦、黒田和道、槇島誠、池田正徳、加藤宣之 C 型肝炎ウイルス NS4B と lipid droplet の相互作用 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 10 月
- (9) 篠原義康、藤田浩司、米田正人、野崎雄一、今城健人、鈴木香峰理、馬渡弘典、桐越博之、船越健悟、池田正徳、加藤宣之、前田慎、中島淳、斉藤聡 HCV 感染におけるリポ蛋白代謝の解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 10 月
- (10) 藤本雄介、前田信哉、榎本信幸、池田正徳、加藤宣之、伊藤正彦、山下篤哉 抗 HCV NS2 タンパク活性阻害剤 High throughput screening のための HCV subgenomic replicon 細胞の構築 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 10 月
- (11) 山下篤哉、古田篤史、松田泰嘉、谷英典、藤田統、秋光信佳、田中淳一、池田正徳、加藤宣之、前川信哉。榎本信幸、伊藤正彦、常田聡、関口勇地、野田尚宏 沖縄産 ウミシダ (Alloeocomatella polycladia) 抽出物の抗 HCV NS3 helicase 阻害活性による HCV 増殖抑制効果 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 10 月
- (12) 池田正徳、森京子、武田緑、中澤貴秀、有海康雄、団迫浩方、加藤宣之 IL28B 領域の SNP が異なる肝細胞株 (HuH-7、Li23) における抗 HCV 剤の感受性 第 3

- 3 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月
- (13) 田中寅彦、黒田和道、槇島誠、池田正徳、加藤宣之 C 型肝炎ウイルス非構造タンパク質 4B における lipid droplet との相互作用部位の同定 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月
- (14) 飯倉南、降幡知己、池田正徳、加藤宣之、千葉寛 C 型肝炎治療薬リバビリンの薬効発現における細胞内リバビリン取込み機構の重要性 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月
- (15) 篠原義康、藤田浩司、米田正人、野崎雄一、今城健人、鈴木香峰理、馬渡弘典、桐越博之、船越健悟、池田正徳、加藤宣之、前田慎、中島淳、斉藤聡 HCV 感染における ER ストレスを介した細胞死の検討 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月
- (16) Masanori Ikeda, Kyoko Mori, Takahide Nakazawa, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, Nobuyuki Kato. Development of genome-length HCV RNA replication assay systems derived from different HCV strains using HuH-7 and Li23 cells. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.
- (17) Kyoko Mori, Masanori Ikeda, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, Takaji Wakita, Nobuyuki Kato. Anti-HCV mechanism of ribavirin in novel HCV replication cell systems. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.
- (18) Yasuo Ariumi, Masanori Ikeda, Takaji Wakita, Nobuyuki Kato. Role of distinct DDX DEAD-box RNA helicases in HCV RNA replication. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.
- (19) Akito Nozaki, Kazushi Numata, Manabu Morimoto, Masaaki Kondo, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato, Katsuaki Tanaka. Hydroxyurea suppresses hepatitis C virus replication in human: a phase I trial of oral hydroxyurea in chronic hepatitis C patients. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.
- (20) Yoshiyasu Shinohara, Koji Fujita, Hironori Mawatari, Masato Yoneda, Yuichi Nozaki, Hiroyuki Kirikoshi, Kento Imajo, Kaori Suzuki, Kengo Funakoshi, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato, Shin Maeda, Atsushi Nakajima, Satoru Saito. Clearance of the hepatitis C virus replicon by interferon-alpha treatment restored the signal pathway involving JNK. 17th international

symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.

- (21) Yoshiyasu Shinohara, Koji Fujita, Yuichi Nozaki, Kento Imajo, Hironori Mawatari, Masato Yoneda, , Hiroyuki Kirikoshi, Kengo Funakoshi, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato, Shin Maeda, Atsushi Nakajima, Satoru Saito. Hepatitis C Virus infection changes the lipoprotein profiles in the replicon system. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.

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

## HBV pseudotype の作製と HBV 感染受容体同定への応用に関する研究

研究分担者 上田 啓次 大阪大学院医ウイルス学 教授

B型肝炎ウイルス（HBV）はウイルスの発見から半世紀足らず経とうとしているにも関わらず、未だその感染受容体が同定されておらず、*vitro* 及び *vivo* レベルでの有効な感染システムが構築されていない。HBV の生物学的特性を正確に知り、それに基づいた治療法の開発のためには本受容体を同定し有効な感染システムを構築することが不可欠である。本研究ではこれまでに試されていない HBV pseudotype の作製をそれを用いた感染能を指標にして本因子の同定を試み、更に感染系の構築を目指す。

### A. 研究目的

HBV による病態発症機構は不明な点が多く、治療法自体 HBV の性質に基づく根本的治療が展開されているとは言い難い。ウイルス学上の最大の謎で HBV 学に残された最大の難問の一つである HBV 感染受容体を同定し、*vitro*、*vivo* 感染系を構築することで HBV による病態を再現させその機構を解明し、さらに HBV の性質に立脚した治療法の開発をめざす。

### B. 研究方法

これまでの研究で HBV pseudotype (HBVp、HBV の膜粒子を被ったレトロウイルス) の作製が可能であることがわかった。HBVp を活用し感染能による感染受容体の同定実験を進めるとともに、感染性から得られた事実をもとにして新たな戦略を構築する。

### C. 研究結果

HBVp はヒト肝臓 cDNA の哺乳類細胞への導入操作により感染性が上昇することが示唆された。この過程はライブラリーによる HBV 感染受容体遺伝子の発現、活性化等によるものではなく導入操作自体が感染性に影響を出しているものと考えられた。HBV 粒子付着試験でもその存在が示唆された。

### D. 考察

cDNA の導入操作により HBVp の感染能が認められることから、培養肝がん細胞（今回は HepG2 細胞）には本来 HBV 感染能に関与する受容体が存在していることが示唆された。

### E. 結論

HBV の感染を許容しない培養肝がん細胞は内在性の HBV 付着因子を有しており、何らかの方法で活性化することで HBV 感染能を引き出すことが可能であると考えられた。また本付着因子の分離・同定を目指すことで感染受容体の実態に迫ることが可能であることが示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Suzuki, T., Isobe, T., Kitagawa, M., and Ueda, K. "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA positively affects on ubiquitylation of p53. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 403: 194-197, 2010.
- 2) Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., Watanabe, S. "KSHV-infected PEL cell lines exhibit a distinct gene expression profile." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 394: 482-487, 2010.
- 3) 上田啓次. ヘルペスウイルス学のエッセンス 化学療法の領域 26:265-270, 2010.
- 4) 上田啓次. STEALTHING, PERSISTING ウイルスの謎「潜伏感染と再活性化」化学療法の領域. 上田啓次(企画) 26:1178-1179, 2010.
- 5) 上田啓次. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の潜伏感染、再活性化と病態. 化学療法の領域 26:1218-1226, 2010.
- 6) 上田啓次. B型肝炎ウイルスレセプターの謎. *Hepatoday No. 23*, 12, 2010.
- 7) 上田啓次. HHV-8 「病原細菌・ウイルス

図鑑」新居志郎ら編、北海道大学出版会(印刷中)

## 2. 学会発表

1. Ueda, K., “Replication and gen regulation of Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus”.  
(招待講演) International Symposium ‘Infection and-associated Cancers’, March 3-4, 2010, Sapporo.
2. 上田啓次. 「ヘルペスウイルスの潜伏と再活性化」熊本大学ウイルス感染症研究会(招待講演)平成22年11月26日、熊本.
3. 上田啓次、大崎恵理子、中野和司. 培養細胞におけるB型肝炎ウイルスの感染能. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7～9日. あわぎんホール、徳島.
4. 大崎恵理子、中野和司、上田啓次. KSHV LANAの細胞内局在と複製・分配メカニズムとの関連動態解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7～9日. あわぎんホール、徳島.
5. 中野和司、大崎恵理子、上田啓次. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスのvIRF-3/LANA2の発現制御機構の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7～9日. あわぎんホール、徳島.
6. 上田啓次、大崎恵理子、中野和司. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)潜伏感染における潜伏感染特異的遺伝子の発現機構の解析. 第33回日本分子生物学会年会. 2010年12月7～10日. 神戸ポートアイランド、神戸.
7. 中野和司、大崎恵理子、上田啓次. HIF-2 $\alpha$ によるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)がコードするviral interferon regulatory factor 3 (vIRF-3)の発現制御機構の解析. 第33回日本分子生物学会年会. 2010年12月7～10日. 神戸ポートアイランド、神戸.
8. 大崎恵理子、中野和司、上田啓次. KSHVゲノムの複製・分配に関するLANAの細胞内局在動態解析. 第33回日本分子生物学会年会. 2010年12月7～10日. 神戸ポートアイランド、神戸.
- 9.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし

## ビタミンD代謝産物による抗HCV作用の検討

分担研究者 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長 加藤 孝宣

研究要旨 ビタミンDおよびその代謝産物のC型肝炎ウイルス(HCV)に対する抗ウイルス作用を検討した。その結果、ビタミンDの肝臓での代謝産物である25(OH)VD<sub>3</sub>に抗HCV作用を認めた。詳細な検討の結果、この25(OH)VD<sub>3</sub>の抗HCV作用は、HCVの感染過程や複製過程ではなく細胞内での感染性ウイルス粒子の生成過程を阻害していることが明らかとなった。この25(OH)VD<sub>3</sub>は製剤としては用いられていないが、ビタミンDの投与により肝臓での25(OH)VD<sub>3</sub>の濃度が高くなり抗HCV作用を発揮し得ると考えられるため、今後ビタミンDが抗HCV薬として利用できる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染症は成人感染でも高率に慢性化するため、世界中に多くの感染者が存在する。日本でも200万人の感染者が存在し、慢性肝炎から肝硬変の主要な原因ウイルスとなっている。さらに、このウイルスの感染は肝癌発症の危険因子としても知られている。現在、C型肝炎患者に対しては、ペグインターフェロンとリバビリンによる治療が行われているが、その治療効果は十分でなく、副作用等の問題も報告されている。そのため新たな治療薬や現行治療の効果を改善する薬剤の開発が望まれている。

2009年のアメリカ肝臓学会においてペグインターフェロンとリバビリン治療にビタミンDの内服を追加することにより治療反応性が著明に改善することが報告された。またビタミンD代謝産物の血中濃度が慢性C型肝炎の病態や治療反応性と関与しているとの報告もある。さらに、ビタミンDの代謝産物は骨粗鬆症の治療薬としてすでに臨床で使用されており、抗HCV作用が証明され

ば治療薬として使用することが容易である。そこで、JFH-1株を用いた培養細胞での感染増殖系を用い、ビタミンDおよびその代謝産物の抗HCV効果の評価を行った。

### B. 研究方法

#### 1. HCV感染複製系を用いたビタミンDおよびその代謝産物の抗HCV作用の評価

HuH-7細胞をビタミンDおよびその代謝産物である25(OH)VD<sub>3</sub>、1 $\alpha$ (OH)VD<sub>3</sub>、1,25(OH)<sub>2</sub>VD<sub>3</sub>で処理し、その後JFH-1ウイルスをmoi=0.1で感染させた。感染後、1日、2日、3日で培養上清と細胞をハーベストしHCVコア抗原量を測定することで抗ウイルス活性を評価した。

#### 2. HCVシュードパーティクル(HCVpp)を用いたビタミンD代謝産物の抗HCV作用の評価

HCVの感染過程のみを観察できるHCVppシステムを用い、ビタミンD代謝産物で処理したHuH-7

細胞に感染させ細胞内のルシフェラーゼ活性を測定することにより、HCV 感染に与える影響を評価した。

### 3. シングルサイクルウイルス生成系を用いたビタミン D 代謝産物の抗 HCV 作用の評価

HCV のレセプターである CD81 が発現していない Huh7-25 細胞を用い、JFH-1 の全長 RNA をトランスフェクションすることで、シングルサイクルウイルス生成系による評価を行った。全長 RNA のトランスフェクション後、ビタミン D 代謝産物で処理し、3 日後の細胞内コア抗原量と細胞内と上清中の感染力価を測定することにより、ビタミン D 代謝産物が HCV のライフサイクルのどの部分を阻害しているかを評価した。

### 4. WST-8 アッセイを用いたビタミン D 代謝産物の細胞毒性の評価

WST-8 法によりビタミン D 代謝産物の各種濃度での細胞毒性を評価した。

#### (倫理面への配慮)

本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられる。各種組換え DNA を用いた組換えウイルス感染実験は、大臣確認申請し承認を受けた。

## C. 研究結果

### 1. HCV 感染複製系を用いたビタミン D およびその代謝産物の抗 HCV 作用の評価

HCV 感染複製系を用い、ビタミン D およびその代謝産物である 25(OH)VD<sub>3</sub>、1 $\alpha$ (OH)VD<sub>3</sub>、1,25(OH)<sub>2</sub>VD<sub>3</sub> の抗ウイルス活性を評価した。そ

の結果、25(OH)VD<sub>3</sub> でのみ抗 HCV 作用が観察された。ビタミン D は肝臓で代謝され 25(OH)VD<sub>3</sub> となるが、培養細胞へのビタミン D 投与では抗 HCV 作用は観察されなかった。

### 2. HCVpp を用いたビタミン D 代謝産物の抗 HCV 作用の評価

HCVpp による評価の結果、25(OH)VD<sub>3</sub> 各種濃度の処理において、感染後ルシフェラーゼの値に変化を認めず、25(OH)VD<sub>3</sub> は HCV の培養細胞への感染を阻害しないと考えられた。

### 3. シングルサイクルウイルス生成系を用いたビタミン D 代謝産物の抗 HCV 作用の評価

JFH-1 の全長 RNA を Huh7-25 細胞にトランスフェクションし、各種濃度の 25(OH)VD<sub>3</sub> で処理した後、3 日後の細胞内コア抗原量と細胞内と上清中の感染力価を測定した。その結果、25(OH)VD<sub>3</sub> は 1  $\mu$ M の濃度で抗 HCV 作用を示した。さらに詳細な検討の結果、25(OH)VD<sub>3</sub> は HCV の細胞内の複製ではなく、感染性ウイルス粒子の形成を阻害していると考えられた。また、感染性ウイルス粒子の分泌には影響を与えていないと考えられた。

### 4. WST-8 アッセイを用いたビタミン D 代謝産物の細胞毒性の評価

25(OH)VD<sub>3</sub> の血中濃度は、末梢血で 50 ~ 100  $\mu$ g/L 程度と考えられている。WST-8 法で細胞毒性を評価した結果、25(OH)VD<sub>3</sub> はその 10 倍から 100 倍の濃度でも細胞障害を認めなかった。

## D. 考察

今回の我々の検討の結果、ビタミン D には抗

HCV 作用は無く、ビタミン D の肝臓での代謝産物である 25(OH)VD3 が抗 HCV 作用を示すことが明らかとなった。さらに、この 25(OH)VD3 の作用機序は、肝細胞での HCV 複製の阻害ではなく、感染性ウイルス粒子の生成を阻害していると考えられた。今回の検討の結果では、25(OH)VD3 は通常の血中濃度では強い抗 HCV 作用は観察されなかった。しかし、この 25(OH)VD3 は肝臓での代謝産物であるため、局所的にはもっと高い濃度で作用している可能性が考えられ、ビタミン D 投与時の抗 HCV 作用を担っている可能性が示唆された。

#### E. 結論

今回の我々の検討の結果、ビタミン D およびその代謝産物である 25(OH)VD3 が抗 HCV 薬として使用できると考えられた。残念ながら 25(OH)VD3 は市販されている薬剤ではないが、ビタミン D を投与することにより 25(OH)VD3 の肝臓での濃度が上昇し、抗ウイルス作用を発揮すると考えられる。今後さらに詳細な検討を行っていく予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun*, 395, 565-571, 2010.

2. Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T. RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLoS Pathog*, 6, e1000885, 2010.

##### 2. 学会発表

1. 加藤孝宣, 脇田隆宇. C 型肝炎ウイルスの生体内での感染様式と培養細胞での増殖能第 4 5 回日本肝臓学会総会、山形、2010 年 5 月。

2. 加藤孝宣, 岡本有加、村山麻子、政木隆博、脇田隆宇. HCV の増殖適応変異とその意義シンポジウム 6: 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. 第 5 8 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月。

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

なし



## 肝炎ウイルス増殖を抑制する新規治療薬候補物質の探索と 作用機序の解明に関する研究

研究分担者 萩原正敏 京都大学大学院医学研究科 教授

研究要旨 分担研究者萩原らは、mRNA スプライシングを司る SR 蛋白質群のリン酸化・脱リン酸化制御に着目して、SR 蛋白質リン酸化酵素 SRPK に対する特異的阻害作用を指標に化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、イソニコチンアミド系化合物 SRPIN340 を見出し、合成展開の結果 C 型肝炎ウイルス増殖を抑制する SFV785 を見出した。本研究では、この SFV785 の標的酵素を同定してその作用機構を解明し、更に効果的に C 型肝炎ウイルス増殖を抑制する化合物をケミカルライブラリーなどから探索している。また独自に合成し DNA ウイルスのウイルス増殖を抑制することが判明している化合物の中から、B 型肝炎ウイルス増殖を抑制する化合物を探索する準備を進めている。

### A. 研究目的

C 型肝炎患者に対してはインターフェロンとリバビリンが投与されるが、全患者の約 60% はこの治療に反応せず、有効な治療方法がないのが現状である。また薬剤耐性ウイルスの出現により B 型肝炎ウイルスの新たな治療薬も必要とされている。そこで本研究では C 型肝炎を含むフラビウイルスの増殖を抑制する蛋白リン酸化酵素阻害剤（仮称 SFV785: suppressor of flaviviridae 785）の作用機構を解明し、更に効果的に C 型肝炎ウイルス増殖を抑制する化合物をケミカルライブラリーから探索するとともに、独自に合成し DNA ウイルスのウイルス増殖を抑制することが判明している化合物の中から、B 型肝炎ウイルスの増殖を抑制する化合物を探索し、新規肝炎治療薬の開発を目指す。

### B. 研究方法

- 1) C 型肝炎を含むフラビウイルスの増殖を抑制する新規蛋白リン酸化酵素阻害剤 SFV785 の標的蛋白リン酸化酵素を同定し、その作用機序を解明する。
- 2) 同定した標的蛋白リン酸化酵素阻害活性を指標に SFV785 から構造展開した化合物やケミカルライブラリーをスクリーニングし、さらに強力に C 型肝炎ウイルスの増殖を抑制する化合物を探索する。
- 3) 増殖ルシフェラーゼ発現 HCV レプリコン細胞を用いて、各種のケミカル・ライブラリー、生物活性物質ライブラリーのスクリーニングを継続し、新規阻害剤の探索を進める。
- 4) 独自に合成し DNA ウイルスのウイルス増殖を抑制することが判明している化合物の中から、B 型肝炎ウイルスの増殖を抑制する化合物を探索する。

### （倫理面への配慮）

京都大学の倫理規定にしたがって、遺伝子組み換え実験や感染実験などを実施した。

### C. 研究結果

- 1) 我々は C 型肝炎を含むフラビウイルスの増殖を抑制する蛋白リン酸化酵素阻害剤（仮称 SFV785: suppressor of flaviviridae 785）の作用機構を、米国デューク大学 Mariano Garcia-Blanco 教授およびシンガポール国立大学 Azlinda Bte Anwar 博士との共同研究で解明し、標的リン酸化酵素を同定するとともに、この化合物投与により感染性を喪失したフラビウイルス粒子が産生されることを証明した。SFV785 は新しい作用機構の抗ウイルス薬として有望で、従来の薬剤に耐性の C 型肝炎ウイルスにも効果が期待できる。またこの薬剤は広汎なフラビウイルスの増殖を抑制するため、これまで治療薬のなかったデング熱や黄熱病に対しても有効である。
- 2) 同定した標的蛋白リン酸化酵素によるスクリーニングの準備を行った。
- 3) 東京医科歯科大学の坂本先生との共同研究で、C 型肝炎遺伝子発現を抑制する化合物のスクリーニングを進め、新たに 3 系統のヒット化合物を見出した。
- 4) B 型肝炎ウイルスの増殖を抑制する化合物を探索する準備を行った。

### D. 考察

- 1) C 型肝炎の *in vitro* 評価系で著効を示した独自の新規化合物 SFV785 の標的リン酸化酵素とそのウイルス増殖阻害メカニズムが判明したので、標的リン酸化酵素を抑制する化合物の検索を進めてさらに効果的に行く必要がある。

2) FV785投与により感染性のないフラビウイルスを人工的に産生させることが可能となったので、この技術は新たなワクチン産生方法としての応用も可能である。さらなる詳細な検討が必要である。

3) 新たに見つかったC型肝炎遺伝子発現抑制作用を示すヒット化合物の作用メカニズムなどを検討し、その有効性・将来性を検討する必要がある。

#### E. 結論

我々の見出した新規化合物SFV785はこれまでの薬剤とは異なる分子機構でC型肝炎ウイルス増殖阻害活性を有する。それゆえ、従来から使われているインターフェロンとリバビリン投与に抵抗性のC型肝炎患者にも有効である可能性が高い。この新しい分子機構に作用して、さらに強力な抗C型肝炎ウイルス活性を示す化合物を探索するとともに、DNAウイルスの増殖を抑制してB型肝炎に有望であると予想される化合物の作用機構に関しても探索を進める必要がある。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

英文論文

1) Ogawa Y, Nonaka Y, Goto T, Ohnishi E, Hiramatsu T, Kii I, Yoshida M, Ikura T, Onogi H, Shibuya H, Hosoya T, Ito N, and Hagiwara M. Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nature Commun.* 1, Article number: 86, doi:10.1038/ncomms1090, 2010.

2) Karakama Y, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Oooka M, Azuma S, Tsuchiya K, Onogi H, Hagiwara M, and Watanabe M. Inhibition of hepatitis C virus replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase. *Antimicrob Agents Chemother.* 54, 3179-3186, 2010.

3) Kii I, Shiraishi A, Hiramatsu T, Matsushita T, Uekusa H, Yoshida S, Yamamoto M, Kudo A, Hagiwara M, and Hosoya T. Strain-promoted double-click reaction for chemical modification of azido-biomolecules. *Org Biomol Chem.* 8, 4051-4055, 2010.

4) Takeuchi A, Hosokawa M, Nojima T, Hagiwara M. Splicing reporter mice revealed the evolutionally conserved switching mechanism of tissue-specific alternative splicing. *PLOS One* 5, e10946, 2010.

5) Kuroyanagi H, Ohno G, Sakane, H, Maruoka, H, and Hagiwara M. Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation in vivo using fluorescence reporters in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Nature Protoc.* 5, 1495-1517, 2010.

6) Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodoran G, Hagiwara M, Harper SJ, Woolard J, Ladomery MR, and Bates DO. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms - a novel therapeutic strategy for angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 285, 5532-5540, 2010.

和文論文

1) 萩原正敏 スプライシング制御機構の解明とその臨床応用  
メディカル・サイエンス・ダイジェストVol.36, No.13, 2-3, 2010

2) 野島孝之、萩原正敏 RNAスプライシングの可視化による創薬スクリーニング. *細胞工学* Vol.29, No.02, 175-180, 2010.

3) 萩原正敏 RNAプロセッシング異常RNA病を斬る 基礎の基礎  
*細胞工学* Vol.29, No.02, 126-130, 2010

##### 2. 学会発表 (国内 2件、国際 6件)

(国内)

1.. Hagiwara.M. 'How can cells recover form the stress-induced suppression of pre-mRNA splicing?' The 6<sup>th</sup> International Forum on 'Oxidative Stress and Aging' Noyori Conference Hall, Nagoya University, Japan September6, 2010.

2.. 萩原正敏. ヘルペスウイルス蛋白ICP27のRNA認識. ウイルス学会シンポジウム. 2010年11月7日, 徳島

(国際)

1) Hagiwarra.M. Decipherment of splicing code and its manipulation with small chemicals for new therapeutics. DUKE-NUS,. Feb.2th, 2010, Singapore.

2) Hagiwara.M. Decipherment of splicing code and its manipulation for new therapeutics. RNA symposium .National Cheng Kung University, 2010 in 台南.

3) 萩原正敏. 新しい分子イメージング技術による創薬 第5回ケミカルバイオロジー国際シンポジウム 東京医科歯科大学, 2010年2月23日.

4) Hagiwara.M. 'Visualizatio and manipulation of RNA splicing to cure RNA diseases'. Gorodon

Research Conference , July 18-23t 2010 in New port,  
RI.

5) Hagiwara.M. Development of Novel Protein Kinase  
Inhibitors for New Therapeutics of Incurable Diseases.  
ICGEB RNA Processing in Biology and Medicine.  
Octo.22th,2010.in Beijing..

6) Hagiwara.M. 'Splicing resume from stress  
response' Asian Cold Spring Harbor Laboratory 'RNA  
Biology' in Suzhou Dushu Lake Conference Center ,  
Nobember 1-5, 2010. in China..

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 発明の名称 : Transgenic reporter system that reveals  
expression profiles and regulation mechanisms of  
alternative splicing in mammalian organisms.

①発明者 : 萩原 正敏、武内彰英

②米国出願日 : 2010年6月1日 (US .61/350,420)

③出願人 : 萩原 正敏

2) 発明の名称 : 遺伝性疾患の予防・改善剤

①発明者 : 萩原正敏、片岡直行、松尾雅文、西田  
篤史

②日本出願日 : 2010年6月28日 (特願  
2010-146699)

③出願人 : 国立大学法人神戸大学 国立大学法人  
東京医科歯科大学

## HCV 感染モデル動物の開発

研究分担者：三浦 直行 浜松医科大学医学部

研究協力者：彦坂 圭介 浜松医科大学大学院

研究協力者：則武 秀尚 浜松医科大学大学院

### 研究要旨

近年、C 型肝炎ウイルス(HCV)がヒト肝臓には感染するが、マウス等の小動物に感染しないのは、ヒト肝細胞には HCV に対する特有の受容体があるためであると考えられている。HCV 受容体候補として、CD81, Scavenger receptor class B type 1 (SR-BI), Claudin-1 (CLDN1), Occludin (OCDN)が報告されている。そこで、この4つのヒト蛋白をマウス肝細胞に発現させたトランスジェニックマウスを作製した。このマウスに HCV を含む患者血清を注射して、その後の感染を検討した。2週後のマウス血清中の HCV RNA 力価を測定したが、検出限界以下であり、HCV の感染は認められなかった。さらなる工夫が必要であることが判明した。

### A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)は慢性化し易く、肝硬変や肝細胞癌に移行することが多いので、その感染予防や治療法の開発が急務である。HCV がヒト肝細胞に感染するが、マウスなどの小動物に感染しないのは、ヒト肝細胞には HCV に対する受容体があるが、マウス肝細胞にはないからであると考えられている。今までに、ヒト肝細胞に存在する HCV 感染に関わる蛋白として、CD81, Scavenger receptor class B type I (SR-BI), claudin-1 (CLDN1), occluding (OCDN)が報告されている。マウスのような小動物に HCV 感染性を与えることができれば、HCV の感染や慢性化、肝硬変や肝細胞癌への移行などの病態を明らかにできるとともに、感染や病気の進行を阻害できる薬剤の開発に大いに役立つ。そこで、分担者は4つのヒト蛋白をマウス肝細胞に発現するトランスジェニックマウスを作製した。

### B. 研究方法

ヒト肝臓 RNA を RT-PCR 法にて、CD81, SR-BI, CLDN1, OCDN の各 cDNA をクローニングした。各 cDNA をマウスアルブミンエンハンサー/プロモーター2.3kbp に連結し、ベクター部分を除去した DNA をマウス受精卵に微小注射して、トランスジェニックマウスを得た。蛋白の存在はウエスタンブロット法、mRNA の発現は RT-PCR 法、マウスの遺伝子型は PCR 法、ウイルスの力価は IRES 部 RNA の定量的 RT-PCR 法で行った。（倫理面への配慮）

インフォームドコンセントを得た HCV 感染患者からの血清を使用した。また、トランスジェニックマウスの作製は浜松医科大学組換え DNA 委員会の承認を得ている。

### C. 研究成果

クローニングした CD81, SR-BI, CLDN1,