

を AdP<sub>235</sub>-ΔGDD と比較することにより検証した。Huh7 細胞に Ad ベクターを導入し、最初の 24 時間は遺伝子発現を誘導し、その後 48 時間は遺伝子の発現を抑制したところ、AdP<sub>235</sub>-HCV は AdP<sub>235</sub>-ΔGDD に比べ高いルシフェラーゼ活性を示した (Figure 11)。また、複製の際にしか産生されない一鎖 HCV RNA の発現を RT-PCR 法により解析した結果、AdP<sub>235</sub>-HCV でのみ一鎖 HCV RNA の発現が確認された (Figure 12)。以上の結果から、AdP<sub>235</sub>-HCV 感染 Huh7 細胞では HCV サブゲノム RNA を複製していることが明らかとなった。

#### D. 考察

##### 1. RNA pol I 発現系 Ad ベクターの開発

各種肝細胞株において RNA pol I 発現系 Ad ベクターを用いた遺伝子導入活性を評価した。その結果、HepG2 細胞、SK HEP-1 細胞、Huh7 細胞の順に高い遺伝子導入効率を示した。いずれの肝細胞株でも高い遺伝子導入効率が観察されたことから、Ad ベクターにおいて RNA pol I 発現系は有効に機能することが明らかとなった。また、RNA pol I 発現系 Ad ベクターを用いることにより *in vivo* の肝臓においても効率の良い遺伝子導入が可能であると期待された。

##### 2. HCV サブゲノム発現プラスミドベクターの作製および抗 HCV 活性評価

HCV サブゲノム発現プラスミドベクターを作製し、それを用いた抗 HCV 活性評価系の構築を試みた。インターフェロンをモデル薬物としてその抗 HCV 活性を評価したところ、インターフェロン投与量依存的な luciferase 活性の低下が観察されたことから、本評価系はインターフェロンの抗 HCV 活性を評価可能であることが示された。その際、顕著な細胞障害性が観察されなかったことから、luciferase 活性の低下が細胞障害性によるものでないこと、およびインターフェロンによる副作用が認められないことが示唆された。以上のことから、HCV サブゲノム発現プラスミドベクターを用いた抗 HCV 薬の評価が可能であることが明らかとなった。

##### 3. RNA pol I 発現系の最適化

HCV サブゲノム発現プラスミドのコンストラクトを搭載した Ad ベクターの開発を試みたが、作製に失敗した。この原因の一つとして、アデノウイルスの構成タンパク質に HCV プロテアーゼが認識する配列が存在しているため、Ad タンパク質を切断している可能性が予想された。この問題は転写制御型 RNA pol I 発現系の最適化により解決可能であると考えられた。つまり、Ad ベクター作製時には転写を抑制し、HCV 発現時には転写を誘導可能なベクターが必要と考えられた。そこで、3 種類の転写制御型 RNA pol I 発現系を開発し、評価した結果、転写抑制時には P<sub>235</sub> プロモーターが最も転写活性が低く、P<sub>235</sub> プロモーターは転写誘導時には従来の P<sub>WT</sub> プロモーターと同等の活性を示すことが明らかとなり、P<sub>235</sub> プロモーターが非常に有用なプロモーターであることが分かった。本プロモーターを利用することで HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製に成功し、複製能を有する HCV サブゲノム RNA の発現を確認した。今後、HCV サブゲノムの発現レベルおよび発現期間等の詳細な解析を進め、HCV 複製評価系としての最適化を進めて行く予定である。

##### 4. HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製

転写制御型 RNA pol I 発現系を用いることにより作製した HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを Huh7 細胞に感染させたところ、レポータータンパク質および HCV NS5A タンパク質の発現が確認されたことから、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製に成功したことが明らかとなった。次に、HCV サブゲノム発現 Ad ベクター由来の HCV サブゲノム RNA が HCV NS5B 依存的に HCV RNA を複製しているかどうかを複製能欠損体と比較することで調べた。その結果、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターにおいて顕著に高いレポータータンパク質の発現および一鎖 HCV RNA の発現が認められた。これらの結果は、HCV サブゲノム発現 Ad ベクター由来の HCV サブゲノム RNA が NS5B 依存的にゲノムの複製を行っていることを示唆している。

## E. 結論

本研究では RNA pol I 発現系を Ad ベクターに搭載することにより、肝臓への効率の良い HCV ゲノムの送達を目指した。まず、RNA pol I 発現系 Ad ベクターによる肝細胞への遺伝子導入の可能性を評価したところ、RNA pol I 発現系 Ad ベクターによる効率のよい遺伝子導入が可能であった。次に、RNA pol I プロモーター下に HCV サブゲノムを組み込んだ発現プラスミドベクターを作製し、本ベクターの抗 HCV 評価系としての利用可能性を検討した。インターフェロンを用いて検討した結果、RNA pol I 発現系を利用した HCV 発現系は抗 HCV 薬評価系として応用可能であることが明らかとなった。続いて、本系の Ad ベクターでの応用を試みたが HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製は困難であり、RNA pol I 発現系の最適化が必要であると考えられた。そこで、転写制御型による RNA pol I 発現系の最適化を試みた結果、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを作製可能なプロモーターを開発した。本プロモーターを利用することで HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製に成功し、複製能を有する HCV サブゲノム RNA の発現も確認された。今後、HCV サブゲノムの発現レベルおよび発現期間等の詳細な解析を進め、HCV 複製評価系としての最適化を進めて行く予定である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

該当なし

### G-2 学会発表

吉田孟史、近藤昌夫、水口裕之、八木清仁：RNA polymerase I 発現系を利用した HCV 複製評価系の開発、第 17 回肝細胞研究会、平成 22 年 6 月、秋田

山岸喜彰、吉田孟史、近藤昌夫、八木清仁、感染受容体発現バキュロウイルスを用いた HCV 感染機構の解析、日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

Takeshi Yoshida, Fumi Satoh, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, Development of an adenovirus vector-mediated assay system for Hepatitis C virus replication. 50th annual meeting of the American society for cell biology, Dec 11-15, Philadelphia, USA.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H-1 特許取得

該当なし

### H-2 実用新案登録

該当なし

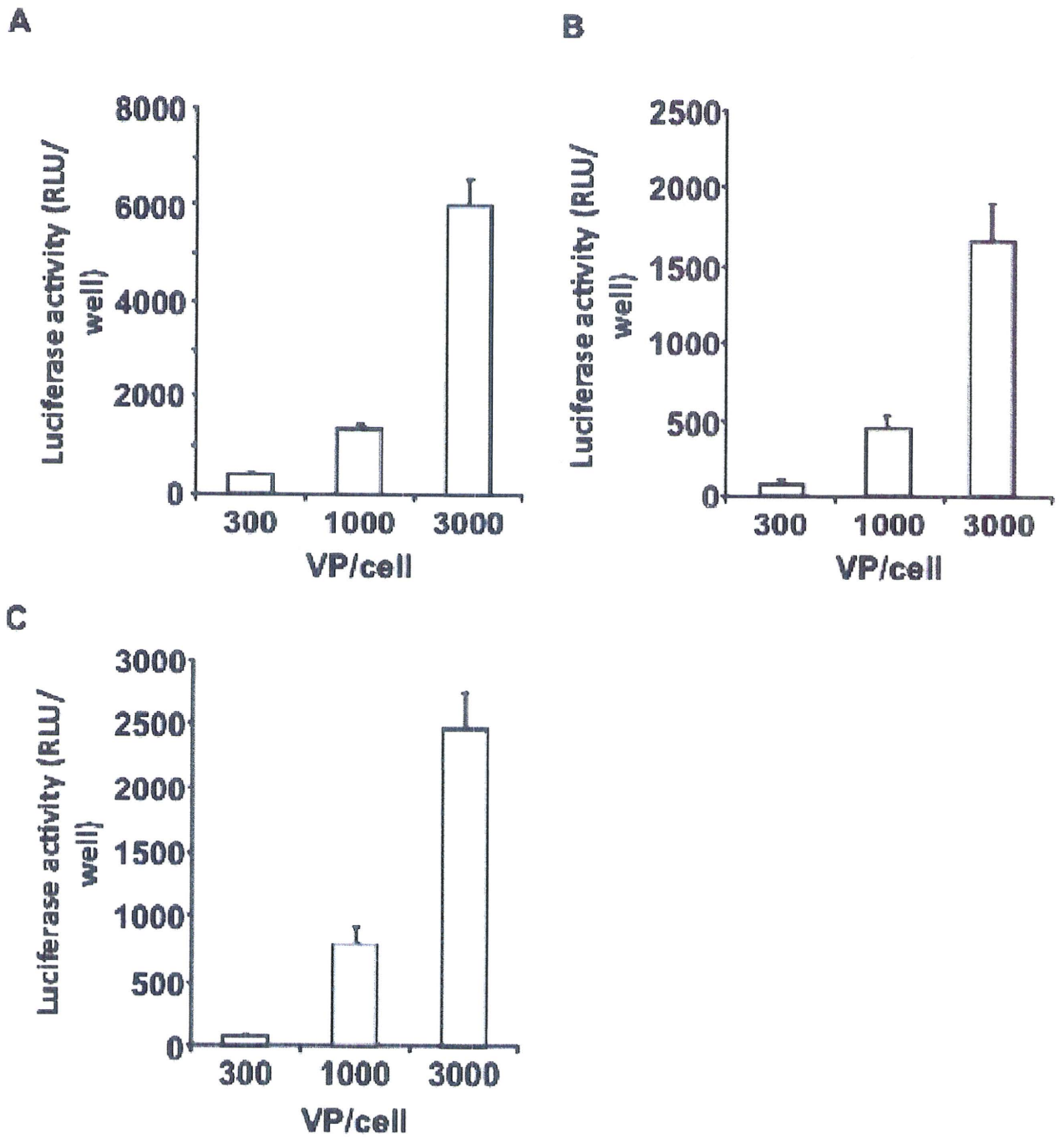
### H-3 その他

該当なし

## I. 研究協力者

吉田孟史（薬学研究科 大学院生）

山岸喜彰（薬学研究科 大学院生）



**Figure 1.** Expression of adenovirus vector coding EGFP-Luciferase gene driven by RNA pol I promoter in various hepatocyte cell lines. Huh7 (A), HepG2 (B), SK HEP-1 (C) cells were infected with Ad-pol I-EGFPLuc at 300 to 3000 VP/cell. After 24 h of infection, the luciferase activities were measured. Data are mean  $\pm$  SD (n=3).

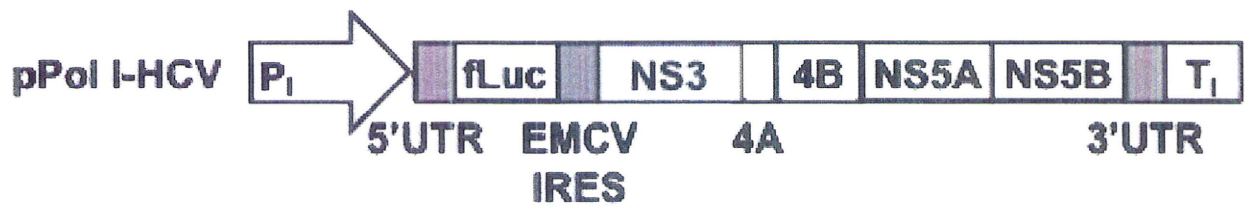
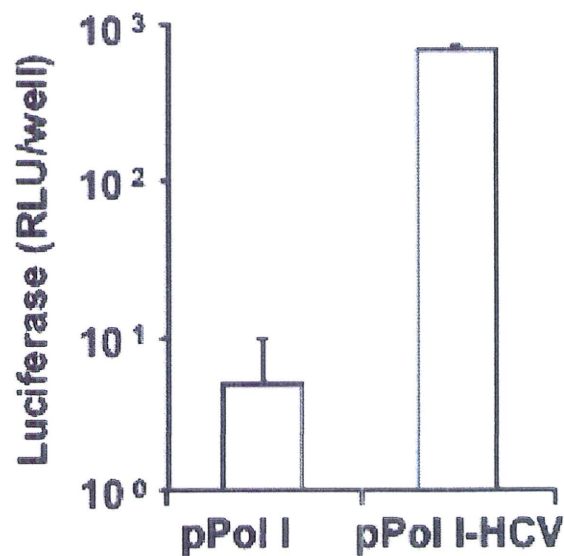
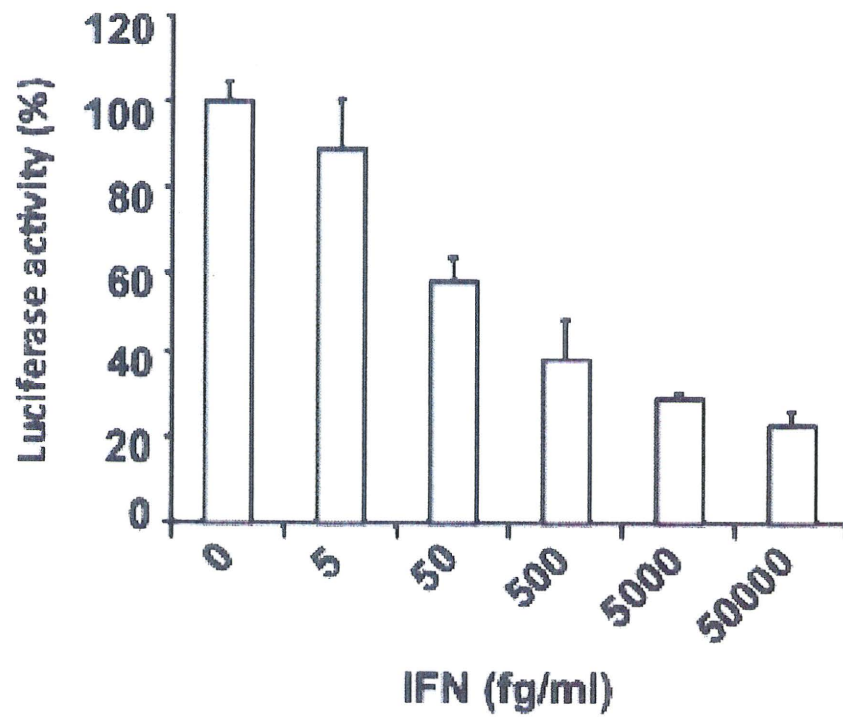
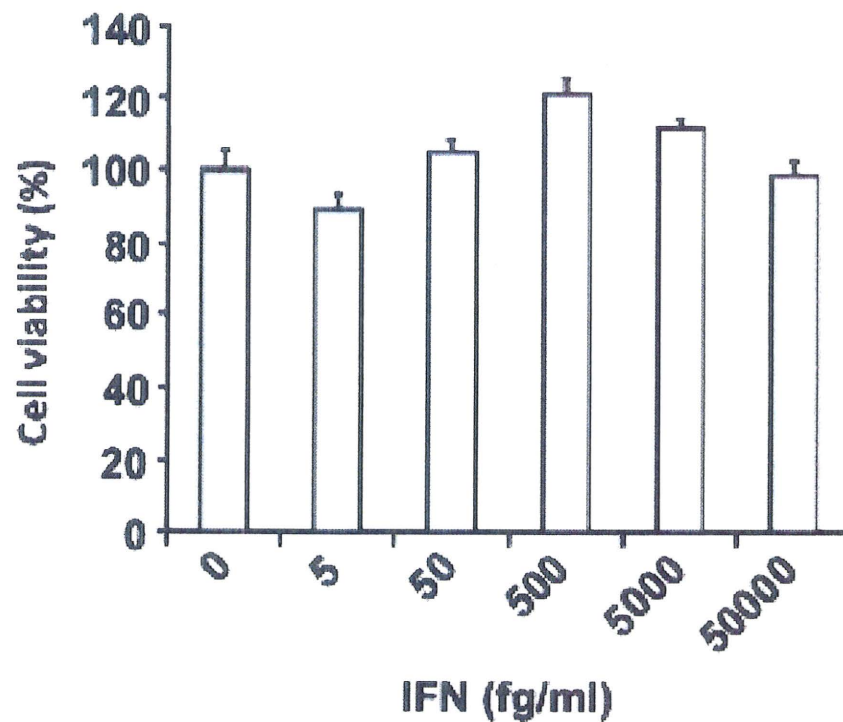
**A****B**

Figure 2. Preparation of plasmid expressing subgenomic HCV RNA driven by RNA pol I promoter. (A) Schematic construct of sub-genomic HCV genome-expression cassette. The HCV sub-genome gene was driven by the RNA pol I promoter (P<sub>I</sub>) and terminator (T<sub>I</sub>). (B) Transgene expression in Huh7 cells. Cells were transfected with pPol I-HCV. After 24 h of transfection, the luciferase activities were measured. Data are mean ± SD (n=3).

**A****B**

**Figure 3** Effect of IFN on HCV replication in RNA pol I vector-transfected cells. Huh7 cells were transfected with pPol I-HCV. After 2.5 h of transfection, the cells were treated with IFN at the indicated concentration. After an additional 72 h of incubation, the luciferase activity (A) and the cell viability (B) were measured. The luciferase activity (%) was calculated as a percentage of that in the vehicle-treated cells. Data are mean  $\pm$  SD (n=3).

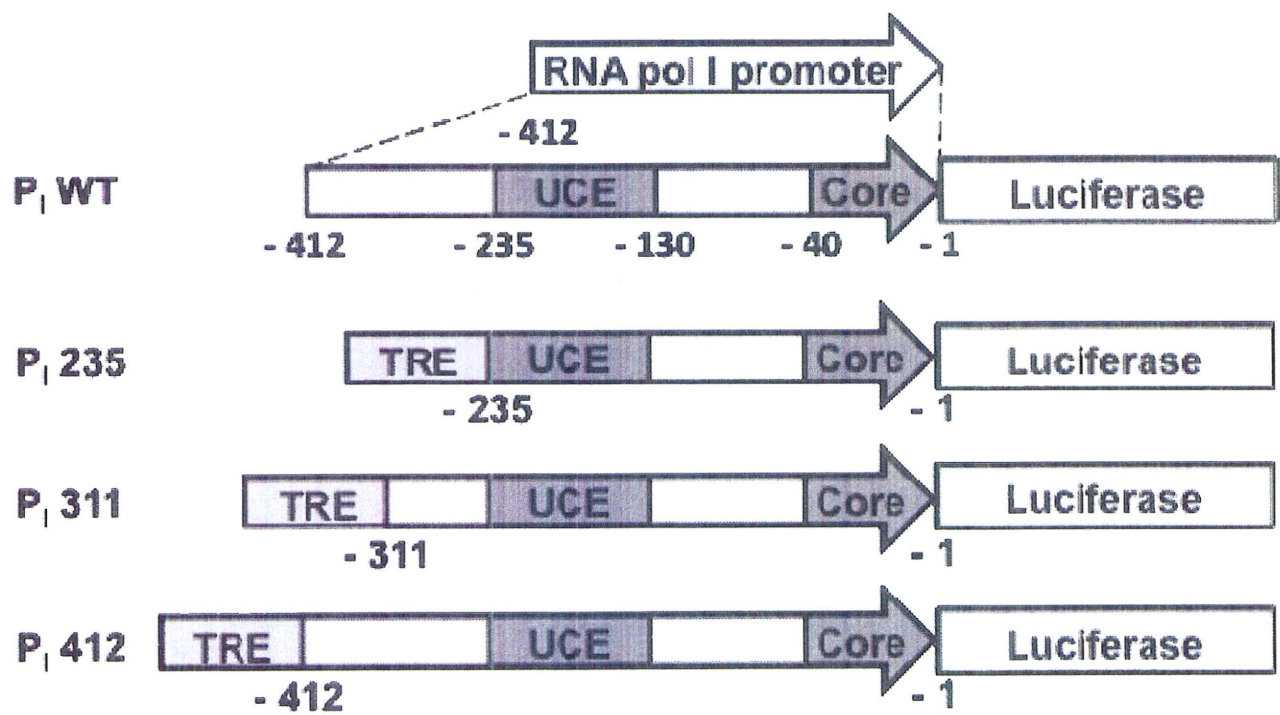


Figure 4 Construct of the chimeric RNA pol I promoter.

The 412-bp human RNA pol I promoter contains Core (from 40 to 1), the binding site of the transcription factor, and UCE (from 235 to 130). TRE is connected to the full or partial RNA pol I promoter at the indicated sites, resulting in P<sub>1</sub>235, P<sub>1</sub>311 and P<sub>1</sub>412.

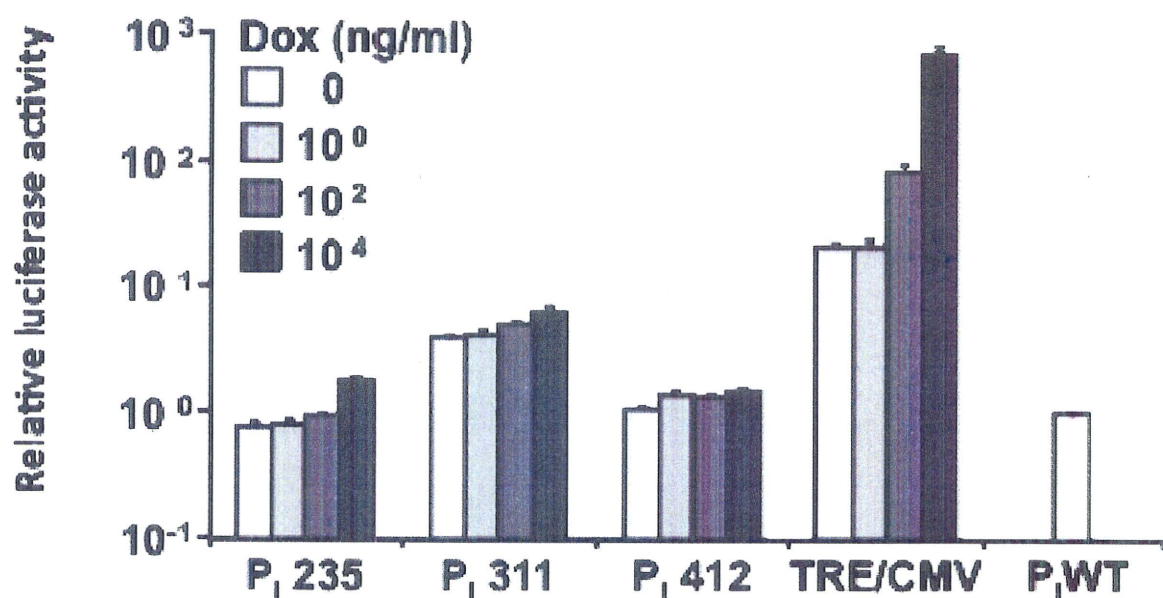
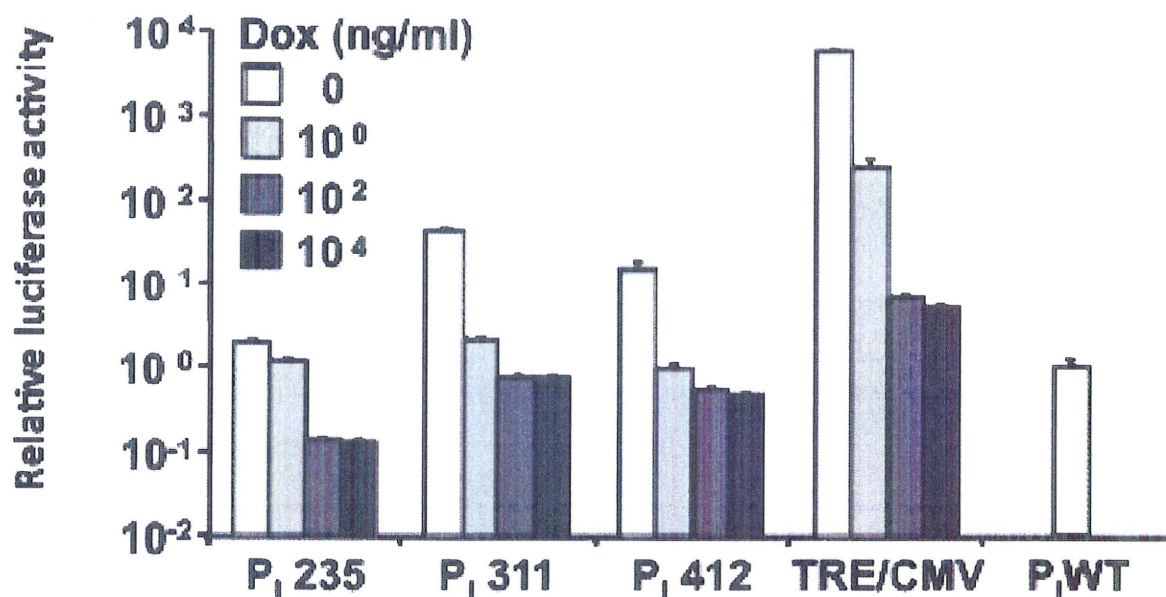
**A****B**

Figure 5 Promoter activities of the chimeric promoter in Huh7 cells.

Huh7 cells were co-transfected with the chimeric RNA pol I plasmid coding EGFP<sub>Luc</sub>, pCMV $\beta$  and transactivator plasmid [rtTA (A) or tTA (B)]. After 2.5 h of transfection, the cells were treated with Dox at the indicated dose. After an additional 48 h of incubation, the luciferase and  $\beta$ -galactosidase activities were measured. The luciferase activity was normalized by the  $\beta$ -galactosidase activity and expressed relative to that of pP<sub>1,WT</sub>-EL-transfected cells. Data are mean  $\pm$  SD (n=3).

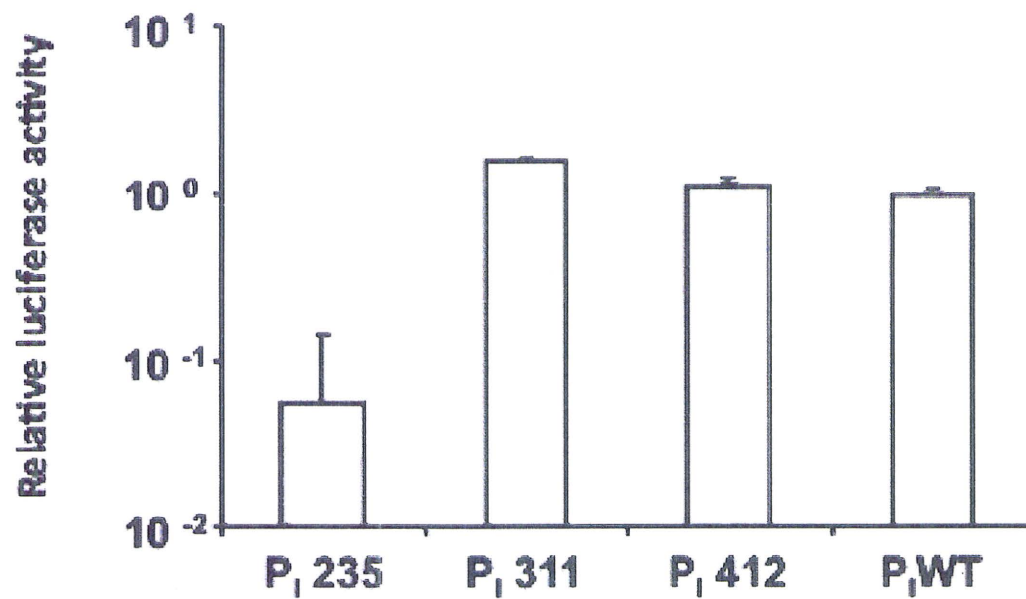


Figure 8 Expression profiles of the RNA pol I/TRE chimeric promoter expression-cassette. Huh7 cells were co-transfected with 0.1  $\mu$ g of reporter plasmid (pP<sub>I</sub>235-EL, pP<sub>I</sub>311-EL, pP<sub>I</sub>412-EL or pP<sub>I</sub>WT-EL) and 0.1  $\mu$ g of pCMV $\beta$  for 2.5 h. After an additional 48 h of incubation, the cells were lysed in LC $\beta$ . Luciferase activity and  $\beta$ -galactosidase activity in the lysates were measured. The luciferase activities were normalized by  $\beta$ -galactosidase activities and expressed relative to that of wild-type RNA pol I promoter (P<sub>I</sub>WT). Data are mean  $\pm$  SD (n=3).



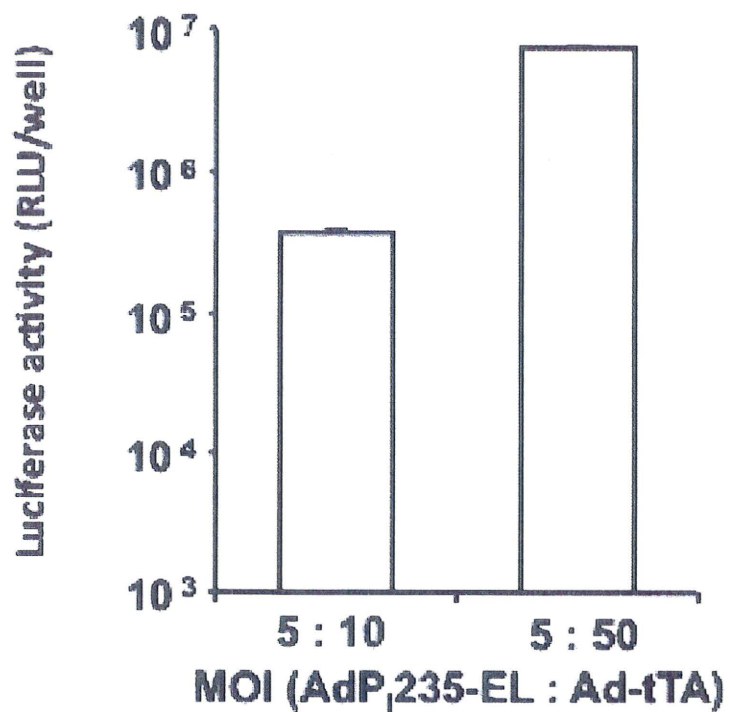


Figure 7 Transgene activity of Ad vector coding the chimeric promoter construct. Huh7 cells were co-infected with AdP<sub>1235</sub>-EL and Ad-tTA. The MOI ratio of AdP<sub>1235</sub>-EL to Ad-tTA was 5:10 or 5:50. After an additional 48 h of incubation, the luciferase activities were measured. Data are the mean $\pm$ SD (n=3).

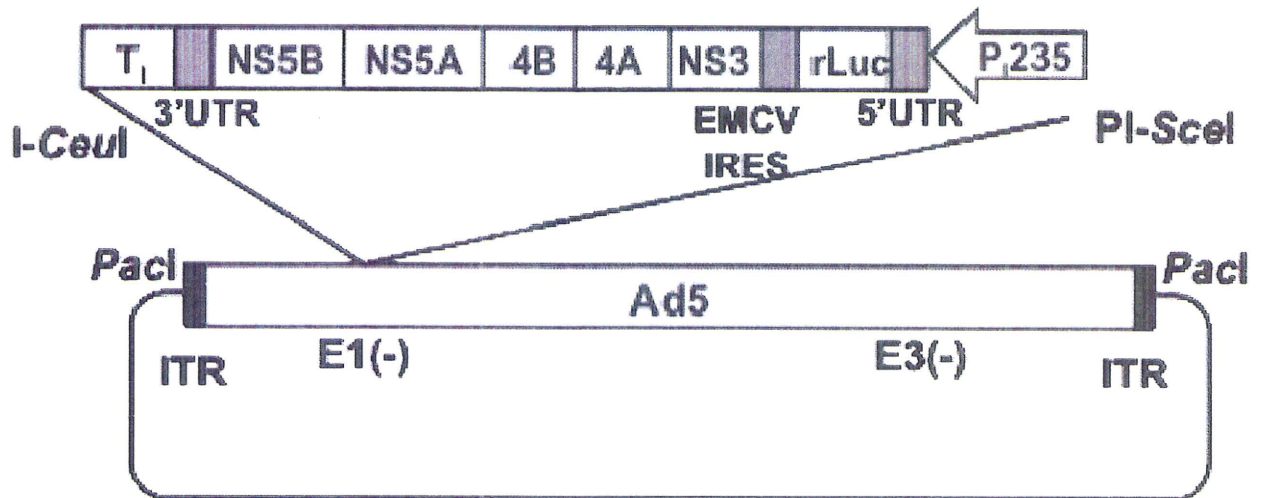


Figure 8. Construction of Ad vector to monitor HCV replication. The Ad vector contained the chimeric RNA pol I promoter (P<sub>235</sub>) and the HCV replicon to monitor HCV replication as the luciferase expression.

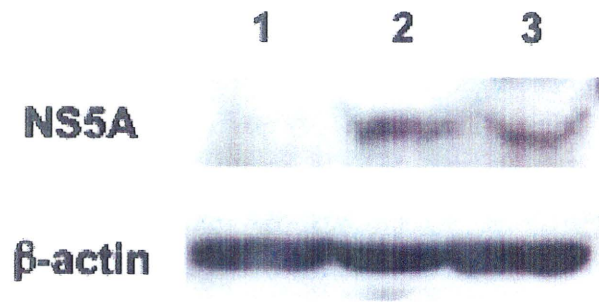


Figure 9 Expression of HCV NS5A protein in Huh7 cells transfected with AdP<sub>235</sub>-HCV. The cells were transfected with AdP<sub>235</sub>-HCV (10 MOI) and Ad-tTA (50 MOI). After 72 h of incubation, the cells were harvested, and the lysates (30 mg) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with antibody against NS5A. Huh7 cells and Huh7.5.1 1bFeo cells were used as the negative and positive controls, respectively. Lane 1, Huh7 cells; lane 2, Huh7 cells infected with AdP<sub>235</sub>-HCV; lane 3, Huh7.5.1 1bFeo cells.

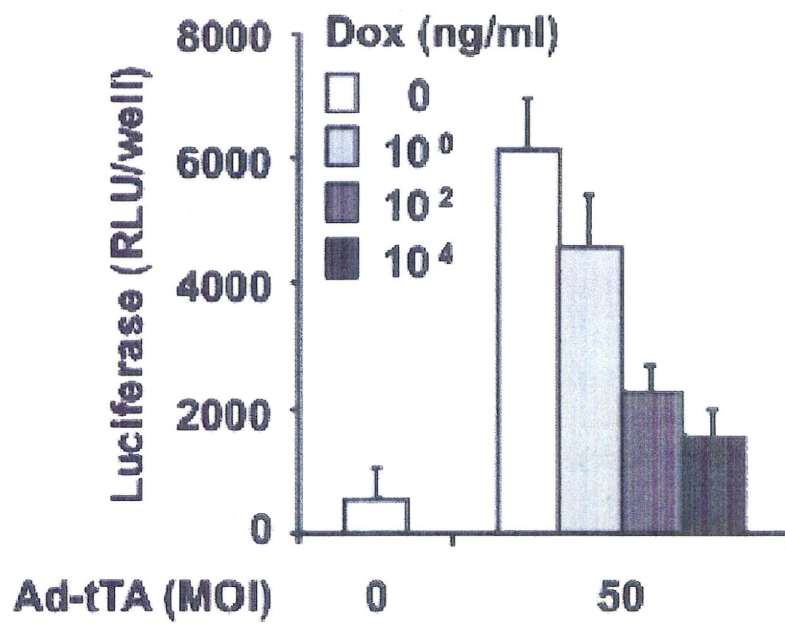


Figure 10 Expression of luciferase in the Ad vector-transfected cells. Huh7 cells were co-infected with AdP<sub>235</sub>-HCV (10 MOI) and 0 or 50 MOI of Ad-tTA. After an additional 48 h of incubation, the luciferase activity was measured. Data represent the mean  $\pm$  SD (n=3).

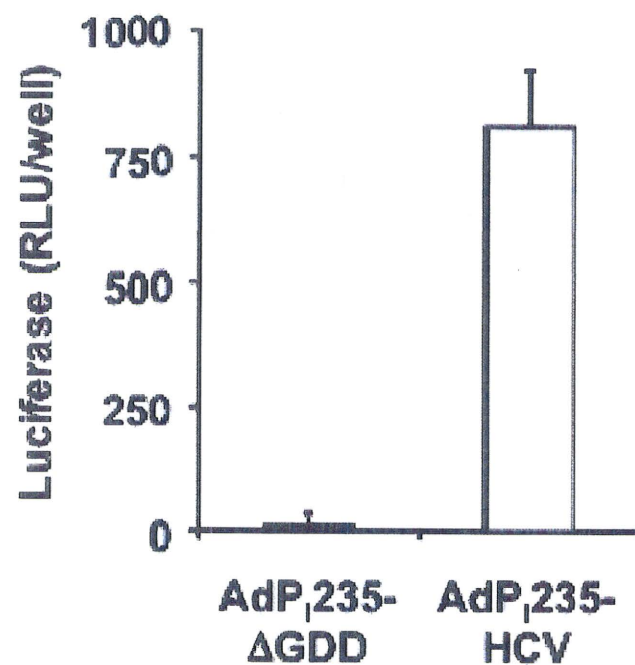


Figure 11 Involvement of NS5B in expression of luciferase in the Ad vector-transfected cells. Huh7 cells were infected with AdP<sub>235</sub>-HCV or AdP<sub>235</sub>-DGDD (3 MOI) and Ad-tTA (15 MOI). After 24 h, the cells were treated with 10 mg/ml of Dox for 48 h. Then, the luciferase activity was measured. Data represent the mean  $\pm$  SD (n=3).

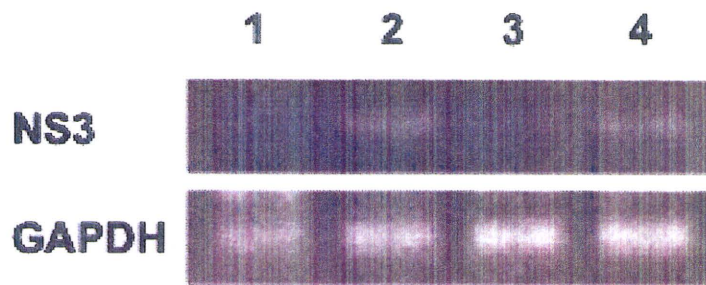


Figure 12 Expression of minus-stranded HCV RNA in the Ad vector-transfected cells. Huh7 cells were co-infected with AdP<sub>235</sub>-HCV or AdP<sub>235</sub>-DGDD at 3 MOI and Ad-tTA at 15 MOI. After 24 h, the cells were treated with 10 mg/ml of Dox for 48 h. Then RT-PCR analysis was performed for detection of minus-stranded HCV NS3 and GAPDH. The PCR products were separated on 2% agarose gel. Huh7 cells and Huh7.5.1 1bFeo cells were used as the negative and positive controls, respectively. Lane 1, Huh7 cells; lane 2, Huh7.5.1 1bFeo cells; lane 3, Huh7 cells infected with AdP<sub>235</sub>-DGDD; lane 4, Huh7 cells infected with AdP<sub>235</sub>-HCV.