

型	症例数	2回目接種前血清				
		平均値	標準偏差	正規性の検定	最大値	最小値
A	9	1.1	3.3	<0.0001	10	0
B	9	7.4	4.5	0.0250	12	0
E	9	4.9	5.9	0.0035	13	0
F	9	7.0	5.2	0.0305	13	0

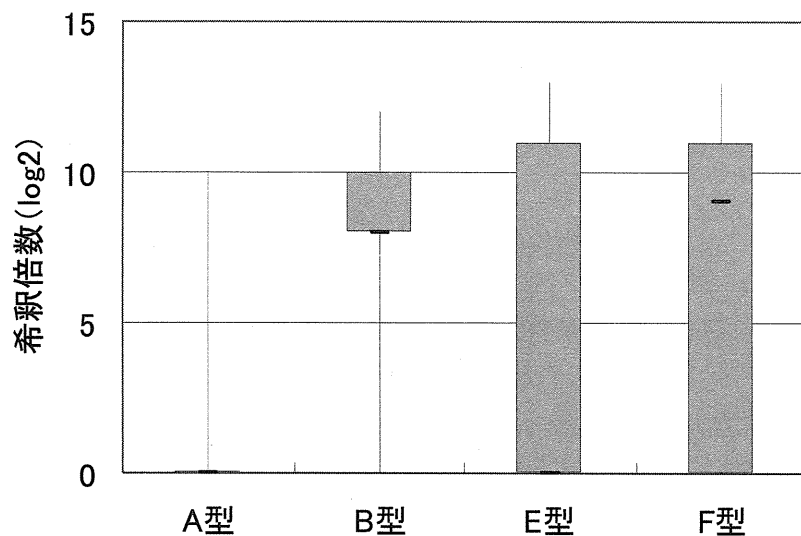


図2. ボツリヌス多価トキソイド2回接種前血清の抗体価の箱ひげ図

## 高分化型三次元細胞培養系を用いたヒト血漿蛋白 及びウイルス粒子の大量産生法の開発

所 属 国立感染症研究

研究代表者 相崎 英樹

研究期間 平成 21 年 4 月-平成 24 年 3 月

研究要旨： 肝細胞を 3 次元培養することで、ヒトアルブミン、C 型肝炎ウイルスの大量産生を確立した。フィブリノーゲン単層培養した際に産生量が最大に達した。LC/MS/MS による微量分泌蛋白の成分モニタリング法を用いて、精製法の検討・評価が可能になるものと期待できた。

### 研究分担者

- |               |      |
|---------------|------|
| (1) 東京慈恵会医科大学 | 大川 清 |
| (2) 東京慈恵会医科大学 | 松浦知和 |
| (3) 東京慈恵会医科大学 | 高田耕司 |
| (4) 早稲田大学     | 加藤尚志 |
| (5) フェニックスバイオ | 立野知世 |

### A. 研究目的

本研究の第一の目的は、安全で安価な組み換え血漿蛋白製剤をヒト細胞で安定的に大量生産する技術を開発することである。ヒトアルブミン(HSA)およびフィブリノーゲン(Fib)をヒト細胞から大量生産するため、ラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)を利用した高密度大量培養法を確立する。そして、培養上清中の目的成分の定量と回収・精製の手法を検討する。さらに、無血清培養の上清に含まれる微量分泌蛋白を網羅的かつ定量的にモニタリングする手法を確立する。

本研究の第二の目的は、肝炎ウイルス粒子の大量生産法の確立である。C型肝炎ウイルス(HCV)およびE型肝炎ウイルス(HEV)に対するワクチンは確立されていない。ウイルス本来の粒子構造を保った抗原が調製できれば、より高い抗原性が期待できるためワクチン候補として極めて有用である。

### B. 研究方法

ヒト血漿蛋白の産生・解析は、松浦班員が

RFBを用いた細胞培養条件の検討を行い、産生したHSAは高田班員が、Fibは大川班員が性状解析を行い、培養上清の微量分泌蛋白のモニタリングを加藤班員が行い、情報交換を密にしながらそれぞれの得意分野で仕事を分担しながら、効率的に研究を進めた。

ウイルス産生・解析については、RFBは相崎班員が、ヒト肝キメラマウスは立野班員が、新規三次元培養系開発は石塚班員が担い、互いに情報交換しながら、効率的に「効率の良いウイルス増殖系の開発」という共通の目的に研究を進めた。下記に具体的な研究方法を示す。

#### 1) HSA、Fib 生産法の確立と解析

(1) HSA 高産生のための FLC-4 細胞の RFB での培養方法の検討

培養細胞は、高機能ヒト肝細胞癌株 FLC-4 と、ヒトアルブミン遺伝子を組み込んで高 HSA 産生細胞 (FLC-4#1) を樹立し、培地には複数の無血清培地を用いて、最も HSA 量が多い培養条件を検討した。

(2) Fib 高産生のための培養細胞の選択と培養方法の検討と産生 Fib 性状解析

FLC-4 細胞および高分化極低悪性度肝細胞癌 FLC-7 を RFB で培養し、培養上清に含まれる Fib 量と性質を検討した。

#### (3) 分泌蛋白の成分モニタリング

細胞培養上清を限外濾過フィルターで濃縮後、還元化バッファーを加えて再度濃縮し、溶液を置換した。LC/MS/MS による微量分泌蛋白

の成分モニタリングを行う。

## 2) 肝炎ウイルスの大量生産法の確立

(1) RFB を用いた肝炎ウイルス粒子の大量生産法、精製法の確立

RFB を用い FLC-4 細胞を培養し、HCV(JFH1 株)の感染実験を試みた。感染後、経時的に培養上清中の HCVRNA 量を測定した。HEV に関しては、アレキサンダー細胞を用いて培養系の構築を試みた。

### (2) 新規三次元培養法の開発

ハイドロキシアパタイトを塗布した不織布およびマイクロパターンプレートで細胞を培養し、スフェロイド形成の有無、肝細胞機能として重要な HSA 産生能および薬物代謝能を指標に、培養条件の検討を行った。さらに、最適な条件のもとウイルス感染実験を行った。

(3) ヒト肝キメラマウス由来細胞を用いたウイルス感受性細胞の開発

ヒト肝キメラマウスから分離した新鮮ヒト肝細胞を使用し培養すると、ウイルス増殖が可能か検討した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は各大学、研究所のバイオリスク管理委員会、組換え DNA 実験委員会等の承認を受けて行った。

## C. 研究結果

### 1) HSA、Fib 産生

(1) HSA 高産生のための FLC-4 細胞の RFB での培養方法の検討

各種培養液で FLC-4 細胞、又は FLC-4M#1 細胞を RFB で高密度三次元培養を行い、細胞が RFB 内にほぼ充満した状態での培養液中の HSA 濃度を定量した。RFB 培養での最高培養密度は  $1 \times 10^8$  cells/ml であり、ヒト肝臓容量を 1000ml と仮定した場合、FLC-4 細胞の RFB での HSA 産生量は 350mg/日となった。体内の HSA の半減期の 20 日をあてはめ、1000ml 容量 RFB での産生 HSA 量をシミュレーションすると、10 日目で約 2g/day となつてプラトーとなり、FLC-4M#1 では約 3 倍の 6g/day となる。ヒト肝臓の HSA 産生量は 10-15g/day といわれており、RFB 培養での HSA 産生量はヒト肝臓に相当する。

また、低 HSA 血症の患者の治療に用いられる HSA 製剤 1 回投与量は 4-12.5g であり、RFB 培養での HSA 産生量は既に臨床応用可能な水準に達していると考えられた。

(2) Fib 高産生のための FLC-4、FLC-7 細胞の RFB での培養方法の検討と FBG の性状解析

Fib に関しては、三次元より二次元培養の方が分泌量が多く、細胞種も FLC-7 細胞が最も高く  $10^9$  細胞 1 日あたり約 0.4 mg の産生量が検出された。低 Fib 血症の患者の治療に用いられる Fib 製剤 1 回投与量は 3 g であり、Fib 産生量は臨床応用可能な水準に近いと考えられた。

(3) 培養上清中の蛋白の性状解析

ASF104N, E-RDF, RPMI のそれぞれの培地で三次元培養して回収された FLC-4 細胞の培養上清中総蛋白質のうち、HSA が占める割合は、それぞれ約 40%, 44%, 47%であった。LC/MS/MS 解析による蛋白同定を行ったところ、3 種の試料で共通して同定された蛋白は 51 種であり、そのうち血漿蛋白は 47 種類であった。アルブミンの他、血液凝固因子や補体、脂質代謝関連蛋白、細胞外マトリックスなどが含まれており、FLC-4 細胞は肝臓の機能を反映する蛋白を産生していると考えられた。どの培養液で培養しても、遊出蛋白の 40-47%が HSA であることから、FLC-4 細胞は HSA 高産生株であることが確認された。

### 2) 肝炎ウイルス粒子の大量生産法の確立

(1) RFB を用いた肝炎ウイルス粒子の大量生産法、精製法の確立

平皿培養で培養上清中に  $10^7$  copies/ml (4 ng/ml) の HCV 産生量を得ており、HAV ワクチンの抗原量 0.5 mg/dose を参考にして、HCV ではウイルス量を  $10^9$  copies/dose を目標に設定した。30ml RFB 内でセルロースビーズを担体とし FLC-4 細胞を培養後、HCVJFH1 を感染させた。培養上清中の HCVRNA は感染後 5 日目に最大  $10^8$  copies/day に達し、以後 7 週間以上にわたり検出され、10 日間の培養で当初目標のウイルス量が確保可能であった。また、これまで HCVJFH1 が Huh7 以外の細胞に感染したという報告はない。今回、RFB によって FLC-4 細胞株を三次元高密度培養することで、JFH1 の感染・増殖が可能となることが示された。

ウイルスの長期培養の場合、ウイルスゲノムの変異が問題となるが、申請者は薬剤耐性遺伝子を含む発現ベクターに、RNAポリメラーゼ I のプロモーター／ターミネーター支配下で HCV 全長の遺伝子を発現させた Pol I システムを用いて、HCV 持続感染細胞よりも遺伝子の変異率が約 1 桁少ない HCV 粒子を安定的に産生する細胞株の樹立に成功した。

HCV 精製法については、限外濾過、ショ糖密度勾配遠心法、ヘパリンカラム等を組み合わせ、培養液中のウイルスの感染性を保ったまま、総蛋白量を 1/100 まで減少させつつ、約 1 万倍までウイルス蛋白を濃縮することが可能になった。

HEV をアレキサンダー細胞で培養したところウイルス量が 2 倍になるのに 10-14 日を要し、大変効率が悪いことがわかった。より効率の良い培養法の検討が必要だと考えられた。

#### (2) 新規三次元培養法の開発

FLC4 細胞をハイドロキシアパタイト塗布不織布およびマイクロパターンプレートで培養すると、いずれもスフェロイドの形成が認められ、培養上清中の HAS の増加、薬物代謝能を示す CYP3A 活性の亢進を認めた。そこで最適な条件で HCV を感染させたところ、ウイルス RNA は検出できたものの、量も少なく、長期の培養も不可能であった。以上のように、新規三次元培養法の開発を試みてきたもののウイルス量、長期培養という面で、RFB が圧倒的に優位ということが明らかになった。

#### (3) ヒト肝キメラマウス由来細胞を用いたウイルス感受性細胞の開発

85%以上がヒト肝細胞で置換された肝臓を持つキメラマウスから、新鮮ヒト肝細胞を分離した。分離したヒト肝細胞に対して、様々な条件で HBV を接種したところ、培養上清から感染後 40 日以上に渡って安定的に HBV DNA が検出された ( $10^{6-7}$  コピー/mL)。HCV に関しては報告するにはいたらなかったが、これまで HBV の効率的な培養系は存在しなかったもので画期的である。

#### D. 考察

HSA 生産については、当初の目標量であった

ヒト肝臓の HSA 産生量 10-15g/day に近い、RFB で FLC-4 細胞を場合した場合で約 2g/day、FLC-4M#1 で約 3 倍の 6g/day の収量に達することができた。一方、Fib に関しては FLC-7 細胞を単層培養した時が最も産生量が多く、 $10^9$  細胞 1 日あたり約 0.4 mg が得られた。今後は精製法の確立が問題となるが、LC/MS/MS による分泌蛋白の成分モニタリングで培養上清中の微量蛋白の検出が可能になったので、目的の蛋白以外の物質の量を低下させる精製方法の開発を試みる。

ウイルス生産については、RFB で培養した FLC-4 細胞に JFH1 を感染させることで、HAV ワクチン 1 回投与量を参考に決めた目標 HCV 量が 10 日間の培養で得られた。今後、JFH1 より 1 桁以上産生量が多いと言われている J6 キメラウイルスを感染材料として用いることで、より大量のウイルス生産が期待できる。また、長期培養に伴うウイルスゲノム変異の問題も Pol I システムを用いることで解決の目処がついた。HCV 精製法については、培養液中のウイルスの感染性を保ったまま、総蛋白量を 1/100 まで減少させつつ、約 1 万倍までウイルス蛋白を濃縮することが可能になった。今後、LC/MS/MS による分泌蛋白の成分モニタリングで含有されている微量蛋白の検出を行い、その精製度について評価を試みる。

日本では世界に先駆けて組み換え酵母で組換えヒトアルブミン (rHSA) 製剤を量産する技術が開発されたが、酵母蛋白の夾雑によるアレルギー反応の可能性が指摘されており、より副作用を軽減した血漿蛋白製剤の開発が期待されている。本研究を通じて、HSA、Fib などをヒト細胞で安定的に大量生産する技術を開発することにより、安全で安価な組み換え血漿蛋白製剤の供給が可能になるものと期待される。血漿蛋白製剤の自給率を高めることは、国民医療にとって重要な課題であり、緊急に実用化することが求められている。

HCV に対しては、医療従事者などハイリスクグループにワクチンが必要とされている。本研究成果が、肝炎ワクチンの開発、実用化に繋がれば、我が国の医療保険のコスト軽減に寄与できると同時に、HCV 持続感染率の高い国々への

国際貢献も期待できる。また、RFB 培養法は閉鎖系であり、コンピューター制御により細胞培養開始後は一切人手を必要としないため、パンデミックワクチン用のインフルエンザウイルス大量培養等危険なウイルスの大量培養も安全に行うことが可能であり、応用範囲が広い技術である。

#### E. 結論

FLC-4 細胞を RFB で培養することで、HSB および HCV の大量産生法を確立した。Fib に関しては、FLC-7 細胞を単層培養した際に産生量が最大に達した。さらに、LC/MS/MS による微量分泌蛋白の成分モニタリング法を確立したので、この方法を用いて、HSA および Fib の精製法の検討、精製 HCV の評価が可能になるものと期待できる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Laurent T, Murase D, Tsukioka S, Matsuura T. A novel human hepatoma cell line, FLC-4, exhibits highly enhanced liver differentiation functions through the 3-dimensional cell shape. *J Cell Physiol* 2012; 227:2898-906.
2. Kuo TF, Tatsukawa H, Matsuura T. Free fatty acids induce transglutaminase 2-dependent apoptosis in hepatocytes via ER stress-stimulated PERK pathways. *J Cell Physiol* 2012; 227: 1130-7.
3. Matsuura T, Aizawa M. Bioceramics for development of bioartificial liver. *Polymeric Biomaterial (Third Eds) Vol. II*, CRC 2011 in press.
4. Marushima H, Shibata S, Asakura T, Matsuura T. Three-dimensional culture promotes reconstitution of the tumor-specific hypoxic microenvironment under TGF  $\beta$  stimulation. *Int J Oncol* 2011;39:1327-36.
5. Gotoh Y, Ishizuka Y, Matsuura T, Niimi S. Spheroid formation and expression of liver-specific functions of human hepatocellular carcinoma-derived FLC-4 cells cultured in lactose-silk fibroin conjugate sponges. *Biomacromolecules* 2011;12:1532-9.
6. Watanabe N, Matsuura T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *BBRC* 2011;407:135-40.
7. Eda H, Aoki K, Kato S, Okawa Y, Takada K, Tanaka T, Marumo K, Ohkawa K. The proteasome inhibitor bortezomib inhibits FGF-2-induced reduction of TAZ levels in osteoblast-like cells. *Eur J Haematol.*, 85, 68-75, 2010
8. Saito R, Ishii Y, Ito R, Nagatsuma K, Tanaka K, Saito M, Maehashi H, Nomoto H, Ohkawa K, Mano H, Aizawa M, Hano H, Yanaga K, Matsuura T. Transplantation of liver organoids in the omentum and kidney. *Artif Organs*, 35, 80-83, 2011
9. Furuichi T, Masuya H, Murakami T, Nishida K, Nishimura G, Suzuki T, Imaizumi K, Kudo T, Ohkawa K, Wakana S, Ikegawa S. ENU-induced missense mutation in the C-propeptide coding region of Col2a1 creates a mouse model of platyspondylic lethal skeletal dysplasia, Torrance type. *Mamm Genome*, 22, 318-28, 2011
10. Marushima H, Shibata S, Asakura T, Matsuura T, Maehashi H, Ishii Y, Eda H, Aoki K, Iida Y, Morikawa T, Ohkawa K. Three-dimensional culture promotes reconstitution of the tumor-specific hypoxic microenvironment under TGF  $\beta$  stimulation. *Int J Oncol.*, 39, 1327-36, 2011
11. Iida Y, Aoki K, Asakura T, Ueda K, Yanaihara N, Takakura S, Yamada K, Okamoto A, Tanaka T, Ohkawa K. Hypoxia promotes glycogen synthesis and accumulation in human ovarian clear

- cell carcinoma. *Int J Oncol.*, 2012, in press
12. Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and Measurement of ATP Levels in Living Cells Replicating Hepatitis C Virus Genome RNA. *PLOS Pathogen* in press.
  13. Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, The structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen. Virol.* 2011;92:2082-7.
  14. Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, Suzuki T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;407:135-40.
  15. Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology.* 2011;410:38-47.
  16. 1. Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol.* 2011, 54:872-878.
  17. 2. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. *J Surg Res.* 167:e29-37, 2011.
  18. 3. Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo. *Hepatology*, 54:781-788, 2011.
  19. 4. Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host interleukin-28b polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology*, 54:764-771, 2011.
  20. 5. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Prediction of In Vivo Hepatic Clearance and Half-life of Drug Candidates in Human using Chimeric Mice with Humanized Liver. *Drug Metab Dispos*, 40:322-328, 2012
  21. 6. Hasegawa M, Tahara H, Inoue R, Kakuni M, Tateno C, Ushiki J. Investigation of Drug-drug Interactions Caused by Human Pregnane X Receptor-mediated Induction of Cytochrome P450 3A4 and 2C Subfamilies in Chimeric Mice with a Humanized Liver. *Drug Metab Dispos*, 40:474-480, 2012.
  22. 7. Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. Severe Necroinflammatory Reaction Caused by Natural Killer and Dendritic Cells in Human Hepatocyte Chimeric Mouse. *Hepatology* (in press).
  23. Eda H, Aoki K, Kato S, Okawa Y, Takada K, Tanaka T, Marumo K, Ohkawa K. The proteasome inhibitor bortezomib inhibits FGF-2-induced reduction of TAZ

- levels in osteoblast-like cells Eur J Haematol. 85,68-75,2010
24. Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T. Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. J Clin Microbiol. 2009;47:4141-3.
  25. Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K. Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. Hepatology 2009;50:378-86.
  26. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. J Virol. 2009;83:5137-47.
  27. Liu HM, Aizaki H, Choi KS, Machida K, Ou JJ, Lai MM. SYNCRIP (synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein) is a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. Virology 2009;386:249-56.
  28. Role of Transglutaminase 2 in Liver Injury via Cross-linking and Silencing of Transcription Factor Sp1. Gastroenterology, 2009; 136: 1783-95
  29. Three-dimensional culture using a radialflow bioreactor induces matrix metalloprotease 7-mediated EMT-like process in tumor cells via TGFβ1/Smad pathway. Int J Oncol 2009;34:1433-48.
  30. バイオリアクターシステム. ラジアルフロー型バイオリアクターを用いたバイオ人工肝臓システム. 細胞治療・再生医療のた  
めの培養システム 東京:シーエムシー出版 編, 木ノ岡正博、酒井康行 監修、p.80-89 2009
2. 学会発表
    1. 安生絵利奈, 藤見峰彦, 安富由美子, 前橋はるか, 松浦知和, 相澤 守. アパタイトファイバースキャフォールドとラジアルフロー型バイオリアクターを用いて構築した再生肝オルガノイドのアンモニア代謝能. 第33回日本バイオマテリアル学会大会 2011年11月21日~22日 京都.
    2. Tanaka K, Matsuura T, Nakada K, Tajiri H, Suzuki M. Noninvasive assessment of NASH/NAFLD by the fasting <sup>13</sup>C-glucose breath test. The 62<sup>nd</sup> annual meeting of the American association for the study of liver diseases. 2011 Nov 4-8 San Francisco, California.
    3. 松浦知和, 田中 賢, 中田浩二, 池脇克則, 鈴木政登. (シンポジウム) 空腹時 <sup>13</sup>C-glucose 呼気試験を用いた非侵襲肝臓糖代謝評価法の検討—コンピュータ解析ソフト SAAMIIを用いた代謝シミュレーション—. 第3回日本安定同位体・生体ガス医学応用学会大会 (JSMASIB2011) 2011年11月4日~5日 東京.
    4. 松浦知和, 田中 賢, 中田浩二. (シンポジウム) NASH/NAFLD における非侵襲肝臓糖代謝評価法の開発—空腹時 <sup>13</sup>C-glucose 呼気試験法. (JDDW2011)第53回日本消化器病学会大会 第42回日本消化吸収学会総会 2011年10月20~23日 福岡.
    5. 松浦知和, 丸島秀樹, 前橋はるか, 大川 清, 松本喜弘, 永妻啓介, 田中 賢, 高木一郎, 石井雄二, 齋藤勝也, 政木隆博, 相崎英樹. (ワークショップ) ヒト肝細胞癌細胞の3次元培養系は“肝癌モデル”なのか?—glucose 代謝からの検討—. 第47回肝臓学会総会 2011年6月2日~3日 東京.
    6. Aizaki H, Matsumoto Y, Goto K, Watashi K, Suzuki R, Fukasawa M, Hanada K, Sato S, Takahashi N, Matsuura Y, Motojima K,

- Miyamura T, Suzuki T, Wakita T. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
7. Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Identification and functional analysis of small molecules inhibiting the late step of hepatitis C virus life cycle. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
  8. Ando T, Aizaki H, Sugiyama M, Mizokami M, Sekizuka T, Kuroda M, Wakita T. Discovery of full-length HCV genome quasispecies by deep sequencing. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
  9. Goto K, Kimura T, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Miyamura T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. Identification of novel NS5A-associated proteins in the host-cell membrane fraction and their role in HCV life cycle. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
  10. Uchida N, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Chiba J, Wakita T. Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus life cycle. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
  11. Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, Aizaki H. Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with NS2. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
  12. Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Screening of small molecules affecting the production of hepatitis B virus. International meeting of molecular biology of hepatitis B virus, Florida, USA 2011.
  13. Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita K, Aizaki H. Identification of host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. 2011.
  14. 坂田幸太郎、原詳子、鈴木哲朗、渡邊則幸、相崎英樹、高谷大輔、松本武久、井本正哉、脇田隆字、小嶋聡一、HCV NS3 Protease Mimics TGF- $\beta$ 2 and Activates TGF- $\beta$  Signals via Type I Receptor. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011.
  15. 坂田幸太郎、原詳子、鈴木哲朗、渡邊則幸、相崎英樹、高谷大輔、松本武久、井本正哉、脇田隆字、小嶋聡一、C型肝炎ウイルス NS3 プロテアーゼによる TGF- $\beta$  I 型受容体を介した TGF- $\beta$  シグナルの活性化. 第25回肝臓洞壁細胞研究会、東京、2011.
  16. 相崎英樹、C型肝炎ウイルス研究の進歩と展望、第58回日本感染症学会総会・学術講演会・教育講演、東京、2011.
  17. 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆字、HCV感染に伴う宿主細胞の脂質代謝の変化と代謝産物のメタボロミクス解析、第47回日本肝臓学会総会・シンポジウム、東京、2011.
  18. 相崎英樹、多田有希、松本善弘、後藤耕司、渡士幸一、鈴木亮介、田中純子、鈴木哲朗、岡部信彦、脇田隆字、1999年から2009年における日本のC型急性肝炎の発生状況、第47回日本肝臓学会総会・シンポジウム、東京、2011.
  19. 加藤考宣、村上麻子、政木隆博、相崎英樹、国内献血検体を用いたC型肝炎ウイルスパネル検体の作製とウイルス量測定法の評価、第47回日本肝臓学会総会・シンポジウム、東京、2011.
  20. 石田雄二、柳愛美、吉実康美、横道博、山崎ちひろ、茶山一彰、立野知世 ヒト肝細



- 胞キメラマウスから分離したヒト肝細胞を用いた HBV *in vitro* 感染モデルの構築 第 47 回日本肝臓学会 東京、2011
21. 柳愛美、山崎ちひろ、吉実康美、大西千元、石田雄二、立野知世 uPA/SCID マウスへの継代移植によるヒト肝細胞の増殖能と性質に関する解析 第 18 回肝細胞研究会 東京、2011
  22. Ishida Y, Yanagi A, Yoshizane Y, Yamasaki C, Yokomichi H, Chayama K, Tateno C, Development of a novel *in vitro* hepatitis B virus-infection model by using fresh human hepatocytes isolated from humanized mouse liver, AASLD, サンフランシスコ、2011
  23. 立野知世 ランチョンセミナー「創薬研究におけるヒト肝細胞キメラマウスの利用」PXB マウスを用いた創薬研究の現状と将来展望 薬物動態学会第 26 回年会 広島、2011
  24. Tateno C, Ohbuchi M, Hamamura S, Ohshita H, Kazuki Y, Oshimura M, Sato K, Nakada N, Kato K, Kawamura K, Kamimura H, Usui T, Development of Cyp3a KO chimeric mice with humanized livers 薬物動態学会第 26 回年会 広島、2011
  25. 福室真仁、田中仁、益森勝志、中嶋圓、林真、石田雄二、加国雅和、立野知世 ヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス®) を利用した小核試験 および コメントアッセイ 第 40 回環境変異原学会 東京、2011
  26. Tateno C, Yanagi A, Yoshizane Y, Yamasaki C, Ishida Y, Telomere shortening of human hepatocytes during mitosis through *in vivo* passages, Liver Down Under パース、2011
  27. 立野知世、工藤 篤、和氣健二郎、加国雅和、井上亮、山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美、石田雄二 ヒト肝細胞キメラマウス肝臓における特徴的な組織構築に関する考察 第 25 回肝類洞壁細胞研究会 東京、2011
  28. 永澤和道、谷崎祐太、前川峻、加藤尚志。ツメガエルにおけるプロテオミクスの試行と展望、第 5 回アフリカツメガエル研究会、2011 年 10 月 6 日、熱海
  29. 谷崎祐太、吉岡祐亮、永澤和道、小坂展慶、落谷孝広、小松則夫、加藤尚志。ヒト白血病細胞株における網羅的遺伝子発現プロファイリング。一般口演 OS-1-179, 第 73 回日本血液学会学術集会、2011 年 10 月 14 日、名古屋国際会議場
  30. 永澤和道、前川峻、谷崎祐太、加藤尚志。低温環境に暴露したアフリカツメガエルの血漿プロテオミクス、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 22 日、旭川
  31. 間舘一憲、上田しのぶ、永澤和道、加藤尚志、小林哲也。成長遅延症マウスにおける顎下腺の機能解析 (Functional analysis of submandibular gland in growth-retarded mice。), 日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 22 日、旭川
  32. 目黒瑞枝、安達基泰、黒木良太、谷崎祐太、田原彩香、別府美穂、永澤和道、加藤尚志。大腸菌組換えタンパク質発現における C 末端配列への変異導入の効果。第 11 回日本蛋白質科学会年会、大阪 (ホテル阪急エキスポパーク、2011 年 6 月 7 日 (月) ~9 日 (水))
  33. Mizue Meguro, Motoyasu Adachi, Kazumichi Nagasawa, Miho Beppu, Nobuo Okazaki, Nami Nogawa-Kosaka, Taro Tamada, Ryota Kuroki, Takashi Kato. Implication of Molecular Diversity and Functional Conservation of Erythropoietin Based on a Comparison of Tertiary Structures of Humans and Frogs.. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego Convention Center, San Ddiego, California, USA. Dec 12, 2011
  34. 相崎英樹、HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の機能解析、第 46 回日本肝臓学会総会、山形、2010。
  35. Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Suzuki T, Real-time visualization of the ATP level in HCV replicating cells, 17<sup>th</sup> International

- meeting on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, 2010.
36. Saito K, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M, Inhibition of cellular squalene synthase impairs hepatitis C virus proliferation in cultured cells, 17<sup>th</sup> International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, 2010.
  37. 相崎英樹, HCV 粒子形成と脂質の役割、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
  38. 渡辺則幸、村山麻子、Saeed Mohsan、伊達朋子、加藤孝宣、相崎英樹、脇田隆字、HCV エンベロープタンパク質に付加される N 型糖鎖の機能解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
  39. 安東友美、今村博臣、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルス複製複合体における ATP 制御の可視化と機能解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
  40. 山本真民、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルス粒子感染における粒子表面のコレステロールの役割、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
  41. Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Suzuki T, Real-time visualization of the ATP level in HCV replicating cells, 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
  42. 鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、分割コピキチン法を利用した HCVNS2 と結合する宿主因子の探索およびウイルス粒子形成への関与、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
  43. 斎藤恭子、鈴木哲朗、相崎英樹、花田賢太郎、脇田隆字、西島正弘、深澤征義、Squalene synthase 阻害剤の C 型肝炎ウイルス増殖阻害機構の解析、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
  44. 松浦知和、田中 賢、松本喜弘。(ワークショップ) 呼気試験の新たな展開 In vitro における <sup>13</sup>C 呼気試験の応用—<sup>13</sup>C-glucose 呼気試験での検討—。(JDDW2010) 第 14 回日本肝臓学会大会 2010 年 10 月 13 日~14 日 横浜
  45. 松浦知和、田中 賢、池脇克則(防衛医大)、中田浩二。空腹時 <sup>13</sup>C-glucose 呼気試験による肝臓糖代謝評価法の開発。第 57 回日本臨床検査医学会学術集会 2010 年 9 月 9 日~12 日 東京
  46. Matsuura T, Nagatsuma K, Hano H. Cellular distribution of lecithin: Retinol acyltransferase (LRAT) and cellular retinol binding protein-1 (CRBP-1) in human livers of chronic viral hepatitis. 2010 FASEB Summer Research Conferences Retinoids. 2010 June 13-18 Arizona.
  47. 松浦知和、石井雄二、相澤 守。(ワークショップ) 肝再生医学 臨床応用を目指した研究の新展開 類洞類似構造を再現した肝臓オルガノイドの作製。第 46 回日本肝臓学会総会 2010 年 5 月 27 日~28 日 山形
  48. Aizaki H, Yamamoto M, Goto K, Fukasawa M, Hanada K, Sato S, Takahashi N, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, 2009.
  49. Yamamoto M, Aizaki H, Goto K, Hamano K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for HCV morphogenesis and infectivity. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, 2009.
  50. Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Wakita T, Suzuki T. HCV subgenomic replicon replication in human hepatic stellate cell lines. 16th International

Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, 2009.

51. 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗、HCV 粒子形成に關与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定と機能解析、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009.
52. 山本真民、相崎英樹、宮村達男、濱野先生、脇田隆字、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルス粒子形成、感染性に重要なコレステロール構造の解析、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009.
53. 渡辺則幸、相崎英樹、松浦知和、脇田隆字、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルス subgenomic replicon RNA を複製するヒト肝星細胞株の樹立、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009.
54. 相崎英樹、脇田隆字、感染性 HCV 粒子形成における宿主生体膜の役割、第 4 5 回日本肝臓学会総会、シンポジウム、神戸、2009.
55. 相崎英樹、生体膜脂質の C 型肝炎ウイルス生活環における役割、第 31 回日本膜学会、シンポジウム、東京、2009.
56.  $^{13}\text{C}$ -glucose 呼気試験開発のための 3 次元還流培養系での基礎的検討、第 56 回日本臨床検査医学会学術集会、東京、2009 年 7 月.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

(1) 発明の名称: ガス混合装置及びガス混合方法

特許権者: 松浦知和、大川 清、エイブル(株)

発明者: 松浦知和、大川 清、エイブル(株)

出願番号: 特願 2006-050548

出願人: 松浦知和

出願日: 平成 18 年 2 月 27 日

登録日: 平成 23 年 11 月 10 日

(2) 発明の名称: バイオリアクター

(特許第 4631049 号)

特許権者: 学校法人明治大学

発明者: 相澤 守、松浦知和

出願番号: 特願 2005-079350

出願人: 学校法人 明治大学

出願日: 平成 17 年 3 月 18 日

登録日: 平成 22 年 11 月 26 日

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 高分化型三次元細胞培養系を用いたヒト血漿蛋白 及びウイルス粒子の大量産生法の開発

所 属 国立感染症研究所  
研究者 相崎 英樹

研究要旨： FLC-4 細胞をラジアル型バイオリアクター(RFB)で培養することで、ヒトアルブミン(HSB)およびC型肝炎ウイルス(HCV)の大量産生法を確立した。ヒトフィブリノーゲン(FBG)に関しては、FLC-7細胞を単層培養した際に産生量が最大に達した。さらに、LC/MS/MS による微量分泌蛋白の成分モニタリング法を確立したので、この方法を用いて、HSA および Fib の精製法の検討、精製 HCV の評価が可能になるものと期待できた。さらに、キメラマウス由来のヒト初代肝細胞を使用することで効果的な肝炎ウイルス増殖系を確立した。

### 研究分担者

- |               |      |
|---------------|------|
| (1) 東京慈恵会医科大学 | 大川 清 |
| (2) 東京慈恵会医科大学 | 松浦知和 |
| (3) 東京慈恵会医科大学 | 高田耕司 |
| (4) 早稲田大学     | 加藤尚志 |
| (5) フェニックスバイオ | 立野知世 |

### A. 研究目的

本研究の第一の目的は、安全で安価な組み換え血漿蛋白製剤をヒト細胞で安定的に大量生産する技術を開発することである。具体的には、HSA および FBG をヒト細胞から大量生産するためのラジアルフロー型バイオリアクターを利用した高密度大量培養法を確立する。そして、培養上清中の目的成分の定量と回収・精製の手法を確立する。さらに、ラジアルフロー型バイオリアクターで無血清培養したヒト肝癌由来細胞の分泌蛋白質を網羅的かつ定量的にモニタリングする手法を確立する。

本研究の第二の目的は、肝炎ウイルス粒子の大量産生法の確立である。HCV および HEV に対するワクチンは確立されていない。ウイルス本来の粒子構造を保った抗原が調製できれば、より高い抗原性が期待できるためワクチン候補として極めて有用である。HCV ワクチンは予防的なワクチンとしてだけでなく、IFN 等の既存の治療法で

効果がない患者の治療用のワクチンとしても期待されている。

### B. 研究方法

(1) HSA の大量生産法の開発 (松浦班員)  
アルブミン産生効率を上げるには、翻訳以降、蛋白分泌までの効率を上げる工夫が必要と考えられ、蛋白分泌には ATP がエネルギーとして必要である。そこで、FLC-4 株の肝細胞としてのエネルギー代謝に関して検討した。FLC-4 細胞と FLC-7 細胞を培養した RFB 内のグルコース代謝を、<sup>13</sup>C-glucose 呼吸試験での <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> 排出量の推移で観察した。さらに、グルコーストランスポーター (GLUT1, 2, 3) および糖代謝酵素 (GK, HKII, PK)mRNA 発現を real-time PCR で測定した。

(2) FBG の大量生産法の開発 (高田、大川班員)

FBG の効率的な生産と回収を実現するため、培養条件の最適化と分取精製手技の検討を行った。細胞は FLC-4 細胞と FLC-7 細胞および FLC7 亜株 (FLC7-CS9) を使い、平板培養 (2D) とスフェロイド簡易 3 次元培養 (3DV) し、培養上清をポリエチレングリコール (PEG) 法と限外濾過法の 2 種類で濃縮した。FBG 精製はバッチ法による不純物の除去および硫酸アンモニウムで塩析後、透析した。

(3) HCV 粒子の大量生産法の開発 (相崎)

感染材料はJFH-1株を使用し、3次元培養したFLC4細胞に感染後、経時的に培養上清中のHCV-RNA量を測定した。3次元培養に伴い増加するHCV感染・増殖に寄与する宿主因子を同定することを目的に、RHCV Con-1からなるダイシストロニックHCV RNAを維持したHuh7細胞を温度感受性ゲルで三次元培養し、比較プロテオーム解析を行った。

(4) 動物を利用したHBV, HCVの増幅法の開発(立野班員)

*in vitro* 肝炎ウイルス感染モデルとしては、ヒト初代培養肝細胞を用いた方法が挙げられるが、再現性が低く、細胞も手に入りにくい。そこで再現性と汎用性の高い新たな *in vitro* 肝炎ウイルス感染モデルの構築を目的として、キメラマウスから分離したヒト肝細胞へのHBV接種実験を行った。

(5) 細胞産生蛋白質の性状解析(加藤班員)

肝臓は100種類にもおよぶ機能を有し、本分析系で検出された肝細胞株から分泌される蛋白質の機能に照らし合わせ、分子相互の関連性を一つ一つ確認していくことは困難である。そこで、パスウェイ解析ツールを用いて、肝機能関連パスウェイを包括的に解析し、産生蛋白質プロファイルを培養条件や正常ヒト肝細胞と比較することで、培養条件の最適化に利用可能な手法として確立する。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は各大学、研究所のバイオリスク管理委員会、組換え DNA 実験委員会等の承認を受けて行った。

## C. 研究結果

(1) HSAの大量生産法の開発(松浦班員)

FLC-4細胞とFLC-7細胞をそれぞれ5ml容量RFBで高密度培養を行った。細胞のグルコースからのエネルギー産生を推定するため、<sup>13</sup>C-glucoseを加え、RFBシステムからの<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>排出量を赤外分光光度計で測定した。FLC-4, FLC-7ともに細胞増殖とともに<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>産生量は増加した。解糖系の律速酵素であるグルコキナーゼ(GK, HKIV)は、FLC-4で発現しており、

mRNA量はむしろ平面培養で高かった。

(2) FBGの大量生産法の開発(高田、大川班員)

最適な培養方法の検討では、FLC7-CSほどの培養条件下でもFGを十分産生するが予想に反して2D培養に比較して3D培養(スフェロイド3DV培養、RFB培養)では有意に産生量が低下した。オールトランスレチノイン酸(ATRA)またはデキサメタゾン(DEX)を添加したところ、FLC-4細胞でのFBGとHSAの放出に関してATRAとDEXの作用は拮抗し、同時に促進する条件を見出せないものの、FLC-7細胞ではATRA存在下でも安定的にHSAが放出され、両成分の効率的回収が期待できた。PEG法を用いた場合、FBGの回収率は4割に留まったが、限外濾過法ではほぼすべてのFBGが濃縮回収された。濃縮液中の夾雑タンパク質をアフィニティー担体で吸着除去する目的で行ったバッチ操作では、軽微なバンド減少程度の精製効果しか得られなかったが、引き続き実施した硫酸アンモニウムによる塩析では、FBGバンドが他のバンドよりも相対的に強く検出されるようになり、有効性が確認された。Western blot解析したところ、FBG製剤では、分子を構成するA $\alpha$ 鎖、B $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖がすべて検出されたものの、FLC-4細胞由来の試料では、ASF104N培地での培養上清ではA $\alpha$ 鎖バンドを、IS-RPMI培地で馴化させた培養上清ではA $\alpha$ 鎖とB $\beta$ 鎖を明確に見出すことができなかった。

(3) HCV粒子の大量生産法の開発(相崎)

FLC-4細胞をRFBを用いて培養後、JFH-1を感染させたところ、培養上清中のHCV-RNAは感染後7日目に10<sup>6-7</sup> copies/mlに達し、その後2ヶ月にわたり10<sup>4-5</sup> copies/mlを維持した。HCV Con-1からなるダイシストロニックHCV RNAを維持したHuh7細胞を温度感受性ゲルで三次元培養し、発現が変化したタンパクをプロテオーム解析したが、HCV粒子産生に寄与する宿主因子の同定は難しかった。

(4) 動物を利用したHBV, HCVの増幅法の開発(立野班員)

播種翌日の培養ヒト肝細胞にHBVを接種したところ、20日目の培養上清中のウイルス量は10<sup>6-7</sup> copies/mlに達し、感染性を有してい

た。

(5) 細胞産生蛋白質の性状解析 (加藤班員)

全検出蛋白質を用いてパスウェイ解析を行ったところ、正常ヒト肝臓やその産生蛋白質の機能に関連する免疫反応 (補体活性化経路)、血液凝固、解糖・糖新生、細胞接着 (ケモカインや細胞外マトリックス) が有意に該当した。また、FLC-4 細胞が肝機能を発揮することを示唆するプロファイルを得た。

#### D. 考察

(1) HSA の大量生産法の開発 (松浦班員)

平成 23 年度は、アルブミン生産に用いる FLC-4 とフィブリノーゲン産生能力の高い FLC-7 に関して、そのエネルギー代謝に関して検討したところ、FLC-4 の産生エネルギーの多くは、細胞増殖ではなく、代謝に利用されることが予測された。一方、FLC-7 ではグルコースはエネルギーよりも癌細胞増殖に利用されると考えられた。そこで、蛋白生産に FLC-7 を利用するには、RFB 以外の培養法も考慮する必要があると思われた。

(2) FBG の大量生産法の開発 (高田、大川班員)

FLC-4 細胞と FLC-7 細胞の FBG 産生能は、レチノイン酸に応答して向上したが、放出量は後者の方が常に高く、アルブミンの場合と同様、生産系構築における FLC-7 細胞の優位性が明確となった。

(3) HCV 粒子の大量生産法の開発 (相崎)

これまで JFH-1 が Huh7 以外の細胞に感染した報告はない。今回、RFB によって FLC-4 細胞株を 3 次元高密度培養することで、JFH-1 の感染・増殖が可能となることが示唆された。

(4) 動物を利用した HBV, HCV の増幅法の開発 (立野班員)

従来のヒト初代培養肝細胞に代えて、キメラマウス由来のヒト初代肝細胞を使用する事の利点として、以下の点が挙げられた: 1) 使用するヒト肝細胞の性質が、遺伝的背景、病歴、健康状態の視点から見て均一である、2) 必要に応じていつでも細胞を準備出来る、3) 臨床サンプル由来のヒト初代肝細胞に比べて、感染効率自体も高い。これらの長所は HCV にも当て

はまる可能性がある。

(5) 細胞産生蛋白質の性状解析 (加藤班員)

オントロジー解析により、有用蛋白質生産における細胞評価だけではなく、ウイルス感染細胞の状態をモニタリングする応用も示唆された。また、各培地で特異的に検出された蛋白質が関連するパスウェイ解析により、細胞のコンディションによって、蛋白質の生産・分泌に関与する代謝系を探索し、細胞培養条件の最適化の手がかりを獲得できる可能も示唆していると考えている。

#### E. 結論

高アルブミン産生細胞 FLC-4 を用いた HSA の工業的生産には、FLC-4 細胞にさらにアルブミン遺伝子を導入して HSA 量を増やすには限界があった。培養液組成などの工夫による転写後制御機構、特に、アルブミン分泌能力の強化が必要であると考えられた。FBG の生産系の構築において、FLC-7 細胞を用いた培養系は有望であり、更なる培養条件の最適化と RFB による高密度培養の導入が望まれる。

細胞を 3 次元高密度培養することで、JFH-1 の感染・増殖が可能となることが示されたが、3次元化による HCV 感染・増殖に寄与する宿主因子の同定を FLC-4 細胞に恒常的に発現させることで効率の良い HCV 産生培養細胞系の確立を目指す。キメラマウスから分離した初代ヒト肝細胞は、培養系において HBV に感染しウイルスゲノム DNA を複製するだけでなく、感染性を有するウイルス粒子を産生して細胞外に放出する能力を持つ事が分かった。今回の検討は、HCV の新たな感染モデルを構築する上で、有用であると考えられる。

細胞生産系の最適化のためには、分泌蛋白質の網羅的解析だけではなく、細胞内蛋白質のモニタリングへ解析対象分子を拡げてやればよい。本研究では、さらにパスウェイ解析を導入し、多数の分子間の相互作用を検出する手法的な基盤は完成した。今後、様々な領域でも同様に展開する先導的な技術摘要事例となる。

#### F. 研究発表

1. 論文発表

1. Laurent T, Murase D, Tsukioka S, Matsuura T. A novel human hepatoma cell line, FLC-4, exhibits highly enhanced liver differentiation functions through the 3-dimensional cell shape. *J Cell Physiol* 2012; 227:2898-906.
2. Kuo TF, Tatsukawa H, Matsuura T. Free fatty acids induce transglutaminase 2-dependent apoptosis in hepatocytes via ER stress-stimulated PERK pathways. *J Cell Physiol* 2012; 227: 1130-7.
3. Matsuura T, Aizawa M. Bioceramics for development of bioartificial liver. *Polymeric Biomaterial (Third Eds) Vol. II*, CRC 2011 in press.
4. Marushima H, Shibata S, Asakura T, Matsuura T. Three-dimensional culture promotes reconstitution of the tumor-specific hypoxic microenvironment under TGF  $\beta$  stimulation. *Int J Oncol* 2011;39:1327-36.
5. Gotoh Y, Ishizuka Y, Matsuura T, Niimi S. Spheroid formation and expression of liver-specific functions of human hepatocellular carcinoma-derived FLC-4 cells cultured in lactose-silk fibroin conjugate sponges. *Biomacromolecules* 2011;12:1532-9.
6. Watanabe N, Matsuura T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *BBRC* 2011;407:135-40.
7. Eda H, Aoki K, Kato S, Okawa Y, Takada K, Tanaka T, Marumo K, Ohkawa K. The proteasome inhibitor bortezomib inhibits FGF-2-induced reduction of TAZ levels in osteoblast-like cells. *Eur J Haematol.*, 85, 68-75, 2010
8. Saito R, Ishii Y, Ito R, Nagatsuma K, Tanaka K, Saito M, Maehashi H, Nomoto H, Ohkawa K, Mano H, Aizawa M, Hano H, Yanaga K, Matsuura T. Transplantation of liver organoids in the omentum and kidney. *Artif Organs*, 35, 80-83, 2011
9. Furuichi T, Masuya H, Murakami T, Nishida K, Nishimura G, Suzuki T, Imaizumi K, Kudo T, Ohkawa K, Wakana S, Ikegawa S. ENU-induced missense mutation in the C-propeptide coding region of Col2a1 creates a mouse model of platyspondylic lethal skeletal dysplasia, Torrance type. *Mamm Genome*, 22, 318-28, 2011
10. Marushima H, Shibata S, Asakura T, Matsuura T, Maehashi H, Ishii Y, Eda H, Aoki K, Iida Y, Morikawa T, Ohkawa K. Three-dimensional culture promotes reconstitution of the tumor-specific hypoxic microenvironment under TGF  $\beta$  stimulation. *Int J Oncol.*, 39, 1327-36, 2011
11. Iida Y, Aoki K, Asakura T, Ueda K, Yanaihara N, Takakura S, Yamada K, Okamoto A, Tanaka T, Ohkawa K. Hypoxia promotes glycogen synthesis and accumulation in human ovarian clear cell carcinoma. *Int J Oncol.*, 2012, in press
12. Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and Measurement of ATP Levels in Living Cells Replicating Hepatitis C Virus Genome RNA. *PLOS Pathogen* in press.
13. Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. The structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen. Virol.* 2011;92:2082-7.
14. Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, Suzuki T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;407:135-40.

15. Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology*. 2011;410:38-47.
  16. 1. Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol*. 2011, 54:872-878.
  17. 2. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. *J Surg Res*. 167:e29-37, 2011.
  18. 3. Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo. *Hepatology*, 54:781-788, 2011.
  19. 4. Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host interleukin-28b polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology*, 54:764-771, 2011.
  20. 5. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Prediction of In Vivo Hepatic Clearance and Half-life of Drug Candidates in Human using Chimeric Mice with Humanized Liver. *Drug Metab Dispos*, 40:322-328, 2012
  21. 6. Hasegawa M, Tahara H, Inoue R, Kakuni M, Tateno C, Ushiki J. Investigation of Drug-drug Interactions Caused by Human Pregnane X Receptor-mediated Induction of Cytochrome P450 3A4 and 2C Subfamilies in Chimeric Mice with a Humanized Liver. *Drug Metab Dispos*, 40:474-480, 2012.
  22. 7. Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. Severe Necroinflammatory Reaction Caused by Natural Killer and Dendritic Cells in Human Hepatocyte Chimeric Mouse. *Hepatology* (in press).
2. 学会発表
1. 安生絵利奈, 藤見峰彦, 安富由美子, 前橋はるか, 松浦知和, 相澤 守. アパタイトファイバースキャフォールドとラジアルフロー型バイオリアクターを用いて構築した再生肝オルガノイドのアンモニア代謝能. 第33回日本バイオマテリアル学会大会 2011年11月21日~22日 京都.
  2. Tanaka K, Matsuura T, Nakada K, Tajiri H, Suzuki M. Noninvasive assessment of NASH/NAFLD by the fasting <sup>13</sup>C-glucose breath test. The 62<sup>nd</sup> annual meeting of the American association for the study of liverd iseases. 2011 Nov 4-8 San Francisco, California.
  3. 松浦知和, 田中 賢, 中田浩二, 池脇克則, 鈴木政登. (シンポジウム) 空腹時<sup>13</sup>C-glucose 呼気試験を用いた非侵襲肝臓糖代謝評価法の検討—コンピュータ解析ソフト SAAM IIを用いた代謝シミュレーション—. 第3回日本安定同位体・生体ガス医学応用学会大会 (JSMASIB2011) 2011年11月4日~5日 東京.



4. 松浦知和, 田中 賢, 中田浩二. (シンポジウム) NASH/NAFLD における非侵襲肝臓糖代謝評価法の開発—空腹時 13C-glucose 呼気試験法. (JDDW2011) 第 53 回日本消化器病学会大会 第 42 回日本消化吸収学会総会 2011 年 10 月 20~23 日 福岡.
5. 松浦知和, 丸島秀樹, 前橋はるか, 大川 清, 松本喜弘, 永妻啓介, 田中 賢, 高木一郎, 石井雄二, 齋藤勝也, 政木隆博, 相崎英樹. (ワークショップ) ヒト肝細胞癌細胞の 3 次元培養系は“肝癌モデル”なのか?—glucose 代謝からの検討—. 第 47 回肝臓学会総会 2011 年 6 月 2 日~3 日 東京.
6. Aizaki H, Matsumoto Y, Goto K, Watashi K, Suzuki R, Fukasawa M, Hanada K, Sato S, Takahashi N, Matsuura Y, Motojima K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
7. Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Identification and functional analysis of small molecules inhibiting the late step of hepatitis C virus life cycle. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
8. Ando T, Aizaki H, Sugiyama M, Mizokami M, Sekizuka T, Kuroda M, Wakita T. Discovery of full-length HCV genome quasispecies by deep sequencing. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
9. Goto K, Kimura T, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Miyamura T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. Identification of novel NS5A-associated proteins in the host-cell membrane fraction and their role in HCV life cycle. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
10. Uchida N, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Chiba J, Wakita T. Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus life cycle. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
11. Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, Aizaki H. Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with NS2. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
12. Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Screening of small molecules affecting the production of hepatitis B virus. International meeting of molecular biology of hepatitis B virus, Florida, USA 2011.
13. Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita K, Aizaki H. Identification of host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. 2011.
14. 坂田幸太郎, 原詳子, 鈴木哲朗, 渡邊則幸, 相崎英樹, 高谷大輔, 松本武久, 井本正哉, 脇田隆字, 小嶋聡一, HCV NS3 Protease Mimics TGF- $\beta$ 2 and Activates TGF- $\beta$  Signals via Type I Receptor. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.
15. 坂田幸太郎, 原詳子, 鈴木哲朗, 渡邊則幸, 相崎英樹, 高谷大輔, 松本武久, 井本正哉, 脇田隆字, 小嶋聡一, C 型肝炎ウイルス NS3 プロテアーゼによる TGF- $\beta$  I 型受容体を介した TGF- $\beta$  シグナルの活性化. 第 25 回肝臓洞壁細胞研究会, 東京, 2011.
16. 相崎英樹, C 型肝炎ウイルス研究の進歩と展望, 第 58 回日本感染症学会総会・学術講演会・教育講演, 東京, 2011.

17. 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆字、HCV 感染に伴う宿主細胞の脂質代謝の変化と代謝産物のメタボロミクス解析、第 47 回日本肝臓学会総会・シンポジウム、東京、2011.
18. 相崎英樹、多田有希、松本善弘、後藤耕司、渡士幸一、鈴木亮介、田中純子、鈴木哲朗、岡部信彦、脇田隆字、1999 年から 2009 年における日本の C 型急性肝炎の発生状況、第 47 回日本肝臓学会総会・シンポジウム、東京、2011.
19. 加藤考宣、村上麻子、政木隆博、相崎英樹、国内献血検体を用いた C 型肝炎ウイルスパネル検体の作製とウイルス量測定法の評価、第 47 回日本肝臓学会総会・シンポジウム、東京、2011.
20. 石田雄二、柳愛美、吉実康美、横道博、山崎ちひろ、茶山一彰、立野知世 ヒト肝細胞キメラマウスから分離したヒト肝細胞を用いた HBV in vitro 感染モデルの構築 第 47 回日本肝臓学会 東京、2011
21. 柳愛美、山崎ちひろ、吉実康美、大西千元、石田雄二、立野知世 uPA/SCID マウスへの継代移植によるヒト肝細胞の増殖能と性質に関する解析 第 18 回肝細胞研究会 東京、2011
22. Ishida Y, Yanagi A, Yoshizane Y, Yamasaki C, Yokomichi H, Chayama K, Tateno C, Development of a novel in vitro hepatitis B virus-infection model by using fresh human hepatocytes isolated from humanized mouse liver, AASLD, サンフランシスコ、2011
23. 立野知世 ランチョンセミナー「創薬研究におけるヒト肝細胞キメラマウスの利用」PXB マウスを用いた創薬研究の現状と将来展望 薬物動態学会第 26 回年会 広島、2011
24. Tateno C, Ohbuchi M, Hamamura S, Ohshita H, Kazuki Y, Oshimura M, Sato K, Nakada N, Kato K, Kawamura K, Kamimura H, Usui T, Development of Cyp3a KO chimeric mice with humanized livers 薬物動態学会第 26 回年会 広島、2011
25. 福室真仁、田中仁、益森勝志、中嶋圓、林真、石田雄二、加国雅和、立野知世 ヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス®) を利用した小核試験 および コメットアッセイ第 40 回環境変異原学会 東京、2011
26. Tateno C, Yanagi A, Yoshizane Y, Yamasaki C, Ishida Y, Telomere shortening of human hepatocytes during mitosis through in vivo passages, Liver Down Under パース、2011
27. 立野知世、工藤 篤、和氣健二郎、加国雅和、井上亮、山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美、石田雄二 ヒト肝細胞キメラマウス肝臓における特徴的な組織構築に関する考察 第 25 回肝類洞壁細胞研究会 東京、2011
28. 永澤和道、谷崎祐太、前川峻、加藤尚志. ツメガエルにおけるプロテオミクスの試行と展望. 第 5 回アフリカツメガエル研究会集會, 2011 年 10 月 6 日, 熱海
29. 谷崎祐太, 吉岡祐亮, 永澤和道, 小坂展慶, 落谷孝広, 小松則夫, 加藤尚志. ヒト白血球細胞株における網羅的遺伝子発現プロファイリング. 一般口演 OS-1-179, 第 73 回日本血液学会学術集會, 2011 年 10 月 14 日, 名古屋国際会議場
30. 永澤和道, 前川峻, 谷崎祐太, 加藤尚志. 低温環境に暴露したアフリカツメガエルの血漿プロテオミクス, 日本動物学会第 82 回大会, 2011 年 9 月 22 日, 旭川
31. 間館一憲, 上田しのぶ, 永澤和道, 加藤尚志, 小林哲也. 成長遅延症マウスにおける顎下腺の機能解析 (Functional analysis of submandibular gland in growth-retarded mice.), 日本動物学会第 82 回大会, 2011 年 9 月 22 日, 旭川
32. 目黒瑞枝, 安達基泰, 黒木良太, 谷崎祐太, 田原彩香, 別府美穂, 永澤和道, 加藤尚志. 大腸菌組換えタンパク質発現における C 末端配列への変異導入の効果. 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 大阪 (ホテル阪急エキスポパーク, 2011 年 6 月 7 日 (月) ~9 日 (水))
33. Mizue Meguro, Motoyasu Adachi, Kazumichi Nagasawa, Miho Beppu, Nobuo

Okazaki, Nami Nogawa-Kosaka, Taro  
Tamada, Ryota Kuroki, Takashi Kato.  
Implication of Molecular Diversity and  
Functional Conservation of  
Erythropoietin Based on a Comparison of  
Tertiary Structures of Humans and  
Frogs.. 53rd Annual Meeting of the  
American Society of Hematology, San  
Diego Convention Center, San Ddiego,  
California, USA. Dec 12, 2011

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(1) 発明の名称：ガス混合装置及びガス混合

方法

特許権者：松浦知和、大川 清、エイブル㈱

発明者：松浦知和、大川 清、エイブル㈱

出願番号：特願 2006-050548

出願人：松浦知和

出願日：平成 18 年 2 月 27 日

登録日：平成 23 年 11 月 10 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 自己免疫疾患、アレルギー疾患の治療を目標としたヘルパーT細胞の分化に関わる因子の探索

所 属 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所  
システム発生・再生医学研究部

研究者 浅原 弘嗣

研究期間 平成 21 年 4 月～平成 24 年 3 月

### 研究要旨

cDNA ライブラリによるハイスループット遺伝子導入スクリーニングを行い、13 の自己免疫疾患・アレルギー疾患の創薬ターゲットを同定した。マイクロアレイによるプロファイリングにより、Th17 細胞分化および軟骨分化に関わる miRNA を同定した。

### 研究分担者

- (1) 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所  
高田 修治、伊藤 義晃
- (2) 東京薬科大学  
高橋 勇二
- (3) 慶応義塾大学  
吉村 昭彦
- (4) 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社  
鈴木 忍、佐藤 弥生、尾崎 修子
- (5) 大塚製薬株式会社  
川染 秀樹

### A.研究目的

喘息、アレルギー鼻炎やアトピー性皮膚炎などに代表されるアレルギー疾患は、現在約 3 人に 1 人が罹患している。この疾患は、外部の様々な抗原（アレルゲン）に対し、生体内で過剰に免疫反応が起こることで発症する。免疫反応は外来の異物を排除するために働く、生体にとって不可欠な生体反応であるが、疾患の原因となるアレルゲンは、多くの場合、通常生活でさらされる量では無害なことが多く、患者にとっては不快な免疫応答で苦しむことになる。同じように過剰な免疫反応により引き起こされる疾患としては、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患があげられる。この疾患は自己を構成する内部の物質を間違っアレルゲンとして認識され引き起こされる。両疾患はアレルゲンが外部か内部かという点で異なるが、発症原因が過剰な免疫反

応という点で同一である。これらの病気はいくつかの治療法が実施／試行されているが、完治させることが困難であり、長期化し、改善どころか悪化の一途をたどる症例が少なくない。

ナイーブT細胞が抗原提示を受けて分化するヘルパーT細胞のサブセットで、IL-12やIFN- $\gamma$ などの刺激により分化誘導されるTh1細胞、IL-4などにより分化誘導されるTh2細胞は獲得性免疫応答に重要な役割を担っている。Th1細胞は主にIFN- $\gamma$ をTh2細胞はIL-4を発現し、それらのサイトカインの作用を通して、相互に分化や機能を抑制し合っている。この両者のバランスが免疫応答を制御する上で重要であり、このバランスが崩れると、自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症につながると考えられてきた。

近年、IL-17を発現する新たなT細胞サブセットであるTh17細胞が同定され、自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症や病態形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。この発見により、Th1とTh2のバランスでは説明できなかった病態や現象に新たな展開を与えるとともに、これまでTh1とTh2のバランスでのみ説明されてきた免疫応答の分子メカニズムに大きな変更点を加えられることになった。

近年の遺伝子改変技術と疾患モデル動物技術による解析で、IL-17遺伝子欠損マウスは、自己免疫疾患、アレルギー疾患を強く抑制されることが示されている（Nakae S *et al.*, 2002, *Immunity*, Nakae S *et al.*, 2003, *J Immunol.*）。このことは、自己免疫疾患、アレルギー疾患の治