

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：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RNAi活性を持つことを認めた。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。そこで、肝がん幹細胞マーカーであるEpCAMに対する高活性のsiRNAの探索と構築を試みた。EpCAM mRNAをオーバーラップする4領域(R1, R2, R3, R4)に分割して、それぞれ400塩基長の2本鎖RNAを作成しDicerにより切断した。siRNAを効率よく肝臓に導入するためのDDSとしてpH感受性のエンドソームエスケープリポソームの検討を行った。siRNAとしてはこれまで本研究者がDicer切断siRNA法で同定したHCVに対する高機能siRNAを用いた。標的としてHCV遺伝子発現慢性肝炎発症トランスジェニックマウスを用いた。siRNA投与によりHCV遺伝子発現を効果的に抑制でき、肝炎が正常化した。これにより、高いRNAi活性をもつsiRNAと高効率DDSを組み合わせることにより、臓器レベルでの遺伝子発現抑制を可能にした。

A. 研究目的

本研究はEpCAM陽性がん幹細胞に極めて高い特異性と治療効果を生み出しうる新規医薬品を開発する。そのために、まずDicer切断同定法によって高活性siRNAを作成する。さらに、開発した核酸の導入効率を飛躍的に高めたエンドソームエスケープリポソーム(DDS)を用いてEpCAM陽性肝がん幹細胞を標的とするドラッグデリバリー系(DDS)を構築する。Dicer切断同定法によって高活性のsiRNAの探索と構築を試み、高活性siRNAを上記のDDSに組み込むことで、EpCAM陽性がん幹細胞に選択的かつ高効率

にsiRNAを導入し、薬剤標的分子の発現を抑制することで高い抗腫瘍効果を生み出す新技術を開発する。

B. 研究方法

肝がん幹細胞マーカーであるEpCAMのmRNAをオーバーラップする4領域(R1, R2, R3, R4)に分割して、in vitroでDiced-siRNAsを作製し、これら4種類のDiced-siRNAsをHep3B細胞に導入した。阻害活性はウエスタンブロット法によりHep3B細胞に対するRNAi効果を検討した。さらに、siRNAを効率よく標的

細胞に導入し、RNAi 活性を発現させるために新たなデリバリー系としてエンドソームエスケープ膜融合ペプチドを検討した。

(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

EpCAM の mRNA をオーバーラップする 4 領域 (R1, R2, R3, R4) に分割して作成した Dicer 切断 siRNA の阻害活性をウエスタンブロット法により検討したところ R3 領域に強い RNAi 活性が認められた。この阻害活性は、販売されている EpCAM に対する siRNA よりも 10 倍強いものであった。

siRNA を効率よく肝臓に導入するための DDS として pH 感受性のエンドソームエスケープリポソームの検討を行った。siRNA としてはこれまで本研究者が Dicer 切断 siRNA 法で同定した HCV に対する高機能 siRNA を用いた。標的として HCV 遺伝子発現慢性肝炎発症トランスジェニックマウスを用いた。siRNA 投与により HCV 遺伝子発現を効果的に抑制でき、肝炎が正常化した。

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、高い RNAi 活性をもつ siRNA と高効率 DDS を組み合わせることにより、臓器レベルでの遺伝子発現抑制を可

能にした。

E. 結論

高い RNAi 活性を有する siRNA と高活性修飾リポソームを用いて、in vivo における EpCAM 阻害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) Kayo Yoshikawa, Aya Ogata, Chiho Matsuda, Michinori Kohara, Hideo Iba, Yukio Kitade, Yoshihito Ueno. Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance. *Bioconjugate Chemistry* 22:42-49 (2011).
- 2) 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).
- 3) 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* 89:433-442 (2011).
- 4) 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.* 83:801-809 (2011).
- 5) Kiminori Kimura, Michinori Kohara. Frontiers of Model Animals for Human Diseases. *Experimental Animals* 60(2), 93-100 (2011).
- 6) 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* 55(3):512-521 (2011)
- 7) Tomoko Chiyo, Satoshi Sekiguchi, Masahiro Hayashi, Yoshimi Tobita, Yumi Kanegae, Izumu Saito, and Michinori Kohara. Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice. *Virus Res.* 160(1-2):89-97 (2011).
- 8) Masaaki Satoh, Makoto Saito, Takashi Takano, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Yasumasa Nishito, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Masayuki Sudo, Chieko Kai, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1. *J Infect Dis.* 204(8):1172-80 (2011).
- 9) Yuri Kasama, Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Masaaki Satoh, Zhonzhi Wang, Nagla Elwy, Shinji Harada, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. *Virus Res.* 163:405-409 (2012).
- 10) Makoto Saito, Michinori Kohara, Yuri Kasama and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus induces overexpression of 3β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Sp1. *J. Med. Virol.* (2012) in press.
- 11) Leiyun Weng, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Tetsuya Toyoda. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene* (2012) in press.
- 12) Hideyuki Konishi, Koichi Okamoto, Yusuke Ohmori, Hitoshi Yoshino, Hiroshi Ohmori, Motooki Ashiara, Yuichi Hirata, Atsunori Ohta, Hiroshi Sakamoto, Natsuko Hada, Asao Katsume, Michinori Kohara, Kazumi Morikawa, Takuo Tsukuda, Nobuo Shimma, Graham Foster, William Alazawi, Yuko Aoki, Mikio Arisawa, and Masayuki Sudoh. An orally available, small-molecule interferon inhibits hepatitis C virus replication. *Sci. Comm* (2012) in press.
2. 学会発表
- 1) Yasui F., Munekata K., Sakoda Y., Kida H., Shibata S., Murakami T., Kohara M.: Immunization with recombinant vaccinia virus expressing hemagglutination protein of

- H5N1 HPAIV protect mice from lethal H5N1 HPIV infection via the neutralizing antibody-independent mechanism. Keystone Symposia-Pathogenesis of Influenza 2011.5.23-28 Kowloon (Hong Kong)
- 2) 大槻貴博、関口 敏、飛田良美、木村公則、小原道法：新規C型慢性肝炎モデルマウスを用いたC型慢性肝炎の病態解析 第58回日本実験動物学会総会 2011.5.25-27 東京
- 3) 木村公則、小原道法：HCV感染による慢性肝炎の病態形成と炎症性サイトカインの関与 第47回日本肝臓学会総会 2011.6.2-3 東京
- 4) 井上和明、塗谷秀子、小原道法：PCRとin situ hybridizationを組み合わせたHCVとHBVのウイルスゲノム存在様式可視化の試み 第47回日本肝臓学会総会 2011.6.2-3 東京
- 5) 小原道法：C型肝炎ウイルス研究の最前線 ウイルス学イブニングセミナー 2011.6.21 京都
- 6) 小原道法：HCV持続発現マウスを用いたHCV治療ワクチンの開発 第10回CBSM2011 2011.6.24-26 軽井沢
- 7) Tsukiyama-Kohara K., Kohara M.: Spontaneous development of B-cell lymphomas by persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells in mice. 2011 ASBMB Special Symposia Series 2011.7.24-26 Guangzhou China
- 8) Tokunaga Y., Arai M., Nakaya A., Tobita Y., Tateno C., Kohara M. : Novel infectious clone of HCV 1a strain HCV-RMT efficiently replicate in vitro and in vivo using adaptive mutations. 18th International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses 2011.9.8-12. Seattle
- 9) Munakata T., Nomoto A., Kohara M.: Regulation of HCV replication by fatty acid synthase. 18th International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses 2011.9.8-12. Seattle
- 10) Takano T., Tsukiyama-Kohara K., Hirata Y., Tokunaga Y., Tateno C., Sudo M., Kohara M.: Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. 18th International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses 2011.9.8-12. Seattle
- 11) Kasama Y., Sekiguchi S., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K. : Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in mice. 18th International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses 2011.9.8-12. Seattle
- 12) Fumihiko Y., Kai C., Morita K., Kohara M. : Clearance of SARS-CoV by cooperation of antibodies and phagocytes. International Union of Microbiological Societies(IUMS)2011 2011.9.11-16 Sapporo
- 13) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R., Kohara M. : Suppression of sphingomyelin augmented by hepatitis C virus has robust anti-viral effects in human livers. International Union of Microbiological Societies(IUMS)2011 2011.9.11-16 Sapporo

- 14) Gomi S., Naganawa S., Yasui F., Munekata K., Ishii K., Sakoda Y., Kida H. Kohara M. : A single immunization with highly attenuated vaccinia virus DIs-based vaccines induce protective immunity against H5N1 avian influenza virus in mice. International Union of Microbiological Societies(IUMS)2011 2011.9.11-16 Sapporo
- 15) Munekata K., Yasui F., Sakoda Y., Kida H., Kohara M. : Protection of mice from lethal H5N1 HPAIV infection via the neutralizing antibody-independent mechanism. International Union of Microbiological Societies(IUMS)2011 2011.9.11-16 Sapporo
- 16) 小道道法、木村公則、小原恭子 : C型肝炎発症におけるウイルス蛋白質と炎症性サイトカイン 第70回日本癌学会学術総会 2001.10.3-5. 名古屋
- 17) 高野貴士、小原道法、小原恭子 : C型肝炎ウイルスの複製におけるDHCR24の役割 第70回日本癌学会学術総会 2001.10.3-5. 名古屋
- 18) 平田雄一、小原道法 : ヒト肝細胞での自然免疫応答におけるIFN-λの重要性とその誘導メカニズム 第15回日本肝臓学会大会 2011.10.20-21. 福岡
- 19) 木村公則、小原道法 : HCV持続発現マウスを用いたHCVワクチンの開発 第15回日本肝臓学会大会 2011.10.20-21. 福岡
- 20) Kimura K., Otsuki T., Kohara M. : Recombinant vaccinia virus encoding hepatitis C virus nonstructural protein modulates host immune response and ameliorates chronic hepatitis in mouse model. The American Association for the Study of Liver Diseases 2011.11.4-8. San Francisco
- 21) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R., Kohara M. : Suppression of sphingomyelin augmented by hepatitis C virus has robust anti-viral effects in human livers. The American Association for the Study of Liver Diseases 2011.11.4-8. San Francisco
- 22) Kimura K., Otsuki T., Kohara M. : Recombinant vaccinia virus encoding hepatitis C virus nonstructural protein modulates host immune response and ameliorates chronic hepatitis in mouse model. 第40回日本免疫学会学術集会 2011.11.27-29. 千葉
- 23) Wada T., Kohara M., Yasutomi Y. Evaluation of the therapeutic effect of DNA vaccines in the mouse model of chronic HCV infection. 第40回日本免疫学会学術集会 2011.11.27-29. 千葉
- 24) 宗片圭祐、安井文彦、迫田義博、喜田宏、柴田伸一、村上利夫、小原道法 : H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスHA発現組換えワクシニアウイルスワクチンによる発症防御機序の解析 第15回日本ワクチン学会 2011.12.10-11. 東京
- 25) Hirata Y., Kameyama T., Tokunaga Y., Nakagawa S., Hayashi Y., Takaoka A., Kohara M. : Interferon-lambda plays a critical role in antiviral response in human hepatocytes. 第34回日本分子生物学会 2011.12.13-16. 横浜

26) Nishimura T., Kohara M., Kino Y.
Tsukiyama-Kohara K.,: French marine bark
extract pycnogenol is a new candidate of
Hepatitis C virus therapeutic material. 第34
回日本分子生物学会 2011.12.13-16. 横
浜

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

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 東京大学大学院理学系研究科・化学専攻 教授

研究要旨：本研究分担班は、独自に開発したRaPIDシステムを駆使し、C型肝炎ウイルスあるいは肝癌の新規標的や疾患関連因子に対し、環状特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指している。本年度は、HCVがヒト細胞に感染する際に重要に役割を果たすグライコタンパク質E2の化学合成、ならびに新規標的としてClaudin-4に対する特殊環状ペプチドの探索を行った。

A. 研究目的

本研究分担班は、C型肝炎ウイルスあるいは肝癌の新規標的や疾患関連因子に対し、本分担者が独自に開発したRaPIDシステムを駆使し、環状特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指す。

B. 研究方法

当研究室で独自に開発したRaPID（Random non-standard Peptide Integrated Discovery）システムを駆使し、翻訳系を用いて特殊ペプチドを合成、薬剤探索にあてる。既に獲得している抗E2特殊ペプチドについては、共同研究者である脇田研究室への提供を行うため、化学合成を行った。また、八木・近藤研究室ならびに深澤研究室との共同研究として、ヒト細胞膜上にあるClaudinsを標的とする研究を開始し、RaPIDを適用する下準備と、探索を行った。

（倫理面への配慮）

本研究はヴィトロを中心としており、倫理面への配慮を特に必要ないが、全てP2レベルで実験は行っている。

C. 研究結果

昨年度、HCVがヒト細胞に感染する際に重要に役割を果たすグライコタンパク質E2に結合する特殊環状ペプチドの探索により、計4種の環状特殊ペプチドが発見された。前者においては数種の抗E2ペプチドが同定され、そのうち2種類についてHCVのヒト細胞への感染阻害活性が認められ、残る2種類について結合活性はあるものの感染阻害は起こさないことが明らかとなった。前者については、コントロールペプチドも含めた3種類の環状特殊ペプチドの化学合成をスケールアップし、脇田研究室に提供した。また、後者の環状特殊ペプチドについても、E2の感染機序を検討するプローブとして用いることができる可能性があるため、蛍光標識した環状特殊ペプチド

を合成し、提供した。

一方、抗 Claudins 環状特殊ペプチドの探索するために、八木・近藤研究室から Claudin-4 を提示したバキュロウイルスの提供を受け、RaPID システムを適応するための様々な下準備を行った。その最適条件下、探索を行った結果、環状特殊ペプチドの濃縮が確認された。

D. 考察

抗 Claudins 環状特殊ペプチドについては、現在クローンをディスプレイした系においてはその結合が確認されたので、今後化学合成を行い、阻害活性を確認する予定である。

E. 結論

今回初めて RaPID システムをバキュロウイルスに提示させた膜タンパク質を標的とした探索に応用した。まだ結論は出ていないが、もしこの系での探索に成功を収めることができれば、本技術の応用範囲がさらに広がることを期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Yamagishi, I. Shoji, S. Miyagawa, T. Kawakami, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga. “Natural product-like macrocyclic N-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin ligase uncovered from a ribosome-expressed de novo library” *Chemistry&Biology* 18, 1562-1570 (2011).
- 2) T. Katoh, Y. Goto, S. Raza, H. Suga. “Ribosomal synthesis of backbone

macrocyclic peptides” *Chemical Communication* 47, 9946-9958 (2011).

- 3) J. Morimoto, Y. Hayashi, K. Iwasaki, H. Suga. “Flexizymes: Their evolutionary history and the origin of catalytic function” *Accounts of Chemical Research* 44 (12), pp 1359-1368 (2011).
 - 4) K. Öjemalm, T. Higuchi, Y. Jiang, Ü. Langel, I. Nilsson, S.H. White, H. Suga, and G. von Heijne “Apolar surface area determines the efficiency of translocon-mediated membrane-protein integration into the endoplasmic reticulum” *Pro. Nat. Acad. Sci.* 108(31), E359-64 (2011).
 - 5) J. Chung, E. Goo, S. Yu, O. Choi, J. Lee, J. Kim, H. Kim, J. Igarashi, H. Suga, J.-S Moon, I. Hwang, S. Rhee “Small-molecule inhibitor binding to an N-acyl-homoserine lactone synthase” *Pro. Nat. Acad. Sci.* 108 (29) 12089-12094 (2011).
 - 6) Y. Ohshiro, E. Nakajima, Y. Goto, S. Fuse, T. Takahashi, T. Doi, H. Suga. “Ribosomal synthesis of backbone-macrocyclic peptides containing γ -amino acids”, *ChemBioChem* 12, 1183-1187 (2011)
- ##### 2. 学会発表
- 1) Hiroaki Suga 「 Genetic Code reprogramming」PepTalk Cambridge Health Institute, Boston, USA; 5.9.2011
 - 2) Hiroaki Suga 「 Genetic Code reprogramming」European Protein Society Meeting, Stockholm, Sweden, European Protein Society; 5.25.2011
 - 3) Hiroaki Suga 「 Genetic Code

- reprogramming」 International RNA Society Meeting, Kyoto, Japan, RNA Society; 6.15.2011
- 4) Hiroaki Suga 「 Genetic Code reprogramming 」 The 11th Tetrahedron Symposium "Frontiers in Organic and Bioorganic Chemistry", Sitage-Barcelona, Spain; 6.22.2011
- 5) Hiroaki Suga 「 Genetic Code reprogramming 」 American Peptide Conference, San Diego, USA, American Peptide Society; 6.27.2011
- 6) Hiroaki Suga 「 Genetic Code reprogramming 」 5th International Symposium on Advancing the Chemical Sciences on Challenges in Chemical Biology, Manchester, Royal Chemical Society, UK; 7.27.2011
- 7) Hiroaki Suga 「 Genetic Code reprogramming 」 Aminoacyl-tRNA Synthetase Meeting 2011, Snowbird, Salt Lake City, USA; 9.25.2011
- 8) Hiroaki Suga 「 Genetic Code reprogramming」 The 9th Australian Peptide Conference, Hamilton Island, Australia; 10.16.2011
- 9) Hiroaki Suga 「 Genetic Code reprogramming 」 The 36th International Symposium of Nucleic Acid Chemistry, Sapporo, Japan; 11.9.2011
- 10) Hiroaki Suga 「 Genetic Code reprogramming」 nternational Symposium of Nagoya Global COE on Elucidation and Design of Materials and Molecular Functions, Nagoya, Japan; 11.30.2011
- 11) Hiroaki Suga 「 Genetic Code reprogramming」 The 34th Annual Meeting of Japanese Society of Molecular Biology “Leading Edge Lecture”, Yokohama, Japan; 12.13.2011
- 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

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 国立感染症研究所細胞化学部 室長

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）産生に関与する宿主因子やそのHCV生活環における詳細な分子メカニズムについては依然として不明の点が多い。HCV生活環の特徴として細胞内脂肪滴や脂質ラフトといった脂質と密接に関連した部位が重要な役割を果たしていることがわかってきている。我々はこれまでに宿主細胞内脂肪滴に注目し、HCV感染・非感染培養細胞の脂肪滴画分の比較プロテオーム解析を行ってきた。それらの解析から、今回新たにC14orf166分子がHCV増殖に関与することを見出した。一方、遺伝学的手法を用いたHCV生活環に関与する宿主因子の探索も進めた。これまでに、HCV耐性を指標としてHCV生活環に必須であるCD81やClaudin1等が欠損した宿主細胞変異株の分離に成功している。そこでさらに、CD81及びClaudin1を過剰発現したHuh7.5.1細胞にヒトshRNAレンチウイルスライブラリーを導入した細胞群を樹立し、これを親株としてHCV耐性宿主変異株の分離を行った。その結果、PI4KIII α 、MafB等の欠損株が分離され、これら分子のHCV生活環への関与が明らかとなった。今後、これら同定宿主因子の抗HCV薬標的としての有用性をさらに検討したい。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は本邦における肝がん発症の主要リスク要因であり、その克服が強く求められている。C型肝炎ウイルス産生に関与する宿主因子については抗HCV薬標的としての有用性が考えられるが、未だ不明のものも多い。私たちは2つのアプローチにより創薬標的となり得る宿主因子の同定を目指す。細胞内脂肪滴や脂質ラフト、網状膜構造といった脂質と密接に関連した部位がHCV生活環に重要な役割を果たしていることがわかってきており、1つにはこれら脂質関連部位に特に注目し、

プロテオミクス的手法によりHCV産生に関与する宿主因子を探索する。もう一つは、shRNAライブラリーを導入した宿主細胞を用いて遺伝学的スクリーニングを行い、HCV生活環に関与する宿主因子を同定する。同定因子について、さらにHCV生活環における分子メカニズムを明らかにし、最終的には治療・創薬における標的として提示したい。

B. 研究方法

（1）同定因子のHCV感染・増殖に対する影響の解析

感染実験のための宿主細胞は Huh7.5.1 細胞を用いた。HCV は、HCV-JFH1 株を用いた。感染は Huh7.5.1 細胞に HCV を 37°C、2 時間感染することにより行った。培養器はコラーゲンコート 24 あるいは 48 穴プレートを用いた。同定タンパク質のノックダウンは市販のステルス siRNA を用い、各タンパク質につき複数種のコンストラクトで行った。細胞への処理は lipofectamine RNAiMAX を用い 20nM で感染前後に培地へ 2 回添加することにより行った。ウイルス産生能の測定は、培養液中の HCV コア蛋白質量を ELISA で定量することにより行った。また、細胞中のウイルスタンパク質(コアタンパク質及び NS3)および RNA 量もイムノブロットあるいは qRT-PCR により測定した。

(2) shRNA ライブラリを用いた HCV 生活環に関与する宿主因子の遺伝学的スクリーニング

shRNA ライブラリはヒト 47,400 遺伝子に対する 200,000 ターゲット shRNA を含む Lentiviral shRNA libraries を用いた。宿主細胞はヒト CD81 および Claudin1 を過剰発現した Huh7.5.1 細胞を用いた(自発的欠損株が取れる可能性があり HCV 生活環に必須であることが既知である CD81 および Claudin1 のバックグラウンドを除くため)。本ライブラリを含む lentivirus を宿主細胞に MOI = 0.5 で感染させ、puromycin で選択することで遺伝子ノックダウン細胞ライブラリを構築した。

スクリーニングは、以下のように行った。本細胞ライブラリに HCV を高用量

(MOI=50) で 10 日おきに 2 回感染させた後、生き残る細胞集団(HCV 感染しない細胞)を分離した。本細胞に導入された shRNA 由来配列の同定は、ゲノム PCR 増幅・増幅断片のクローニング・配列決定により行った。

同定因子の HCV 生活環への関与の確認には、各同定 shRNA を導入した宿主細胞を改めて樹立し用いた。HCV 感染による細胞変性効果を XTT アッセイにより観察し、HCV 産生能については、(1)に述べた方法により行った。

(倫理面への配慮)

本研究は現段階ではヒト臨床材料・実験動物等を直接用いていない。そのために倫理面での問題はない。

C. 研究結果

(1) プロテオーム解析で同定されたタンパク質のHCV感染・増殖に対する影響

HCV複製及びウイルス粒子形成が宿主細胞内脂肪滴周辺で起こることが示唆されており、関与する宿主因子が注目されている。昨年度我々はこの脂肪滴画分に注目し、HCV感染・非感染培養細胞の脂肪滴画分の比較プロテオーム解析を行った。100種以上の蛋白質を同定し、特にHCV感染細胞由来の脂肪滴画分にはRNA代謝に関わる分子(PABP1, PABP4, IMP1, IMP3等)が特徴的に見られること、IMP1およびIMP3がHCV産生の負の制御に関わること等を見出した。

今回、上記以外の感染細胞脂肪滴特異的に同定されたタンパク質群について遺伝子ノックダウンを行い、HCV 産生への影響を

検討した。その結果、C14orf166 の遺伝子ノックダウンにより HCV 産生の低下が見られた。このことから、C14orf166 分子が HCV 産生に関与することが考えられた。

(2) HCV生活環に関与する宿主因子の遺伝学的スクリーニング

“研究方法”に従い、shRNAライブラリを導入した宿主細胞を用いて、HCVに耐性を示す(細胞死を起こさない)細胞をスクリーニングした。分離された細胞群から、導入されていたshRNAコンストラクトを10種類以上同定した。同定された個々のshRNAを導入した宿主細胞を樹立し、HCV感染による細胞変性効果を確認すると、約半分(5種)の遺伝子は明らかに陰性であり混入によるものと考えられた。それ以外のものの中で特に有意にHCV耐性を示すことが確認できたものは、PI4KIII α (phosphatidylinositol-4-kinase III α)、MafB (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B)、INSL4 (insulin-like 4 protein)の3つの各shRNAを導入した細胞だった。さらに、これら遺伝子ノックダウン細胞でHCV感染後のHCV産生を検討した結果、上記3種の細胞でHCV産生が有意に低下していることも確認された。以上の結果から、PI4KIII α 、MafB、INSL4が、HCV産生に関与していることが強く示唆された。

D. 考察

HCV感染細胞脂肪滴画分を用いた比較プロテオーム解析から、今回新たにHCV産生へのC14orf166分子の関与が見出された。

C14orf166は、RNA polymerase IIの正の制御因子 (*J. Mol. Biol.* 362, 887, 2006) であると報告されており、RNAウイルスであるHCVの生活環においてRNA代謝関連過程(RNA複製など)に関与しているのかもしれない。また、本分子がインフルエンザウイルスpolymeraseと相互作用し、複製に必要なであるとの興味深い報告もある (*J. Virol.* 85, 12062, 2011)。さらに、ある種のがんで高発現 (*FEBS Lett.* 566, 162, 2004; *Int. J. Cancer* 124, 1614, 2009) しているとの報告もあり病原性との関連もあるかもしれない。ごく最近、C14orf166分子はHCVコア蛋白質と相互作用することが報告された (*J. Proteome Res.* 10, 4522, 2011)。HCV感染細胞脂肪滴にはHCVコア蛋白質が局在することから、C14orf166分子はHCVコア蛋白質との相互作用を介して脂肪滴画分にリクルートされていることが考えられた。ウイルス産生におけるC14orf166とHCVコア蛋白質の相互作用や脂肪滴局在の重要性についてさらに検討を行いたい。

今回用いたHCV耐性を指標としたスクリーニング法により、我々はこれまでにHCV生活環に必須であるCD81やClaudin1等が欠損した宿主細胞変異株の分離に成功している。このことから、本スクリーニング法は簡便かつ非常に有用な方法と考えられ、shRNAライブラリを用いた本研究にも適用した。今回も実際に複数のHCV生活環に関与する因子のノックダウン株が分離され遺伝子を同定することができた。同定された因子のうち、PI4KIII α は、HCV NS5Aと相

相互作用し (JBC 286, 11290, 2011)、その相互作用がHCV複製(複合体形成)に重要 (Cell Host & Microbe, 9, 32, 2011) であることが最近他のグループより報告された。MafBはインターフェロン β の発現を抑制する因子として報告されており (Nature Immunology 11, 2010)、HCV産生に有利に働く可能性が考えられこの観点での解析も今後行いたい。INSL4は、乳がんとの関連の可能性について報告はあるが、機能未知の蛋白質である。今後、これら同定宿主因子の抗HCV薬標的としての有用性をさらに検討したい。

E. 結論

本年度は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結果に基づき、新たにC14orf166分子が感染細胞脂肪滴に局在しHCV産生に関与することを見出した。また、shRNAライブラリを用いた宿主因子の遺伝学的スクリーニングにより、PI4KIII α 、MafB、INSL4がHCV産生に関与することも見出した。これら因子のHCV生活環における役割をさらに詳細に解析し、創薬研究に結びつけていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, Wakita T, and Meurs EF. “Hepatitis C Virus Reveals a Novel Early Control in Acute Immune Response” PLoS Pathogens 7(10), e1002289, 1-17 (2011)

2) Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, and Suzuki T. “The structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus” J.Gen. Virol. 92(8):2082-87 (2011)

2. 学会発表

- 1) Masayoshi Fukasawa, Ryo Anai, Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami, Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Jo Chiba, Kentaro Hanada, Isolation of a hepatitis C virus mutant adapted to mouse CD81 in hepatic cell culture system, The 51th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Denver, USA, 2011
- 2) 齊藤恭子、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、培養細胞およびヒト肝キメラマウスのC型肝炎ウイルス感染モデルを用いたスクリーン合成酵素阻害剤の抗ウイルス効果の解析、第84回日本生化学会大会、京都、2011
- 3) 前濱朝彦、深澤征義、伊達朋子、脇田隆字、花田賢太郎、イノシトールリン脂質によるC型肝炎ウイルス増殖の制御、第84回日本生化学会大会、京都、2011
- 4) Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami, Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Jo Chiba, Masayoshi Fukasawa, Isolation and characterization of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations, IUMS2011, Sapporo, 2011

5) Hideki Aizaki, Yoshihiro Matsumoto, Koji Goto, Kooichi Watashi, Ryosuke Suzuki, Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada Shigeko Sato, Nobuhiro Takahashi, Yoshiharu Matsuura, Kiyoto Motojima, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, The 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011

6) Masayoshi Fukasawa, Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami, Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Ryosuke Suzuki, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Jo Chiba, Isolation of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations, The 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011

7) 齋藤恭子、鈴木 哲朗、相崎英樹、花田賢太郎、脇田 隆宇、西島 正弘、深澤征義、スクワレン合成酵素を標的としたC型肝炎ウイルス産生阻害、第53回日本脂質生化学会、東京、2011

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

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 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 教授

研究要旨：肝がんの40%の症例においてアポトーシス抑制性Bcl-2関連蛋白であるBcl-xLの高発現がみられる。本研究では肝がんにおけるBcl-xLの発現増強にマイクロRNAが関与しているかどうかを検討した。マイクロRNAの網羅的発現解析の結果をin silicoで検討することにより、肝がん細胞株で発現が低下しかつBcl-xLの発現を抑制する可能性のあるマイクロRNAとして*let-7*が抽出された。肝がん細胞株に*let-7*をトランスフェクションするとBcl-xLの発現が低下した。レポーター遺伝子の発現実験により*let-7*が*bcl-xl*の3'非翻訳領域の遺伝子配列を直接標的としていることが示された。*Let-7*のトランスフェクションにより肝がん細胞株のスタウロスポリン誘導性アポトーシスが促進された。また、*let-7*の導入はソラフェニブによる抗腫瘍効果を増強した。ヒト肝がん試料において*let-7*が低発現している肝がん組織ではBcl-xLの発現が亢進していた。肝がんでBcl-xLが高発現するメカニズムとして*let-7*マイクロRNAの低発現が関与していることが示された。

共同研究者

清水 聡 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

がんの細胞生物学的な特徴として“無秩序な増殖”と“アポトーシス耐性”をあげることができる。前者はがん遺伝子の活性化などをその分子基盤としており、ソラフェニブなどのoncogenic kinase阻害剤はこれを標的とした薬剤である。一方、後者を標的とした肝がんの分子標的治療剤はいまだ開発されていない。我々はBcl-xLの高発現が肝がんのアポトーシス耐性の分子基盤のひとつであることを報告したが

(Takehara, et al., Hepatology 2001)、そのメカニズムは明らかにされていない。本研究ではBcl-xLの高発現のメカニズムとしてマイクロRNAによる転写後調節に焦点をあてて、研究を行った。

B. 研究方法

Bcl-xLを標的とする可能性のあるマイクロRNAをmiRandaを用いてin silico解析を行った。Huh7肝がん細胞株とヒト肝細胞のマイクロRNA発現をチップを用いて網羅的に解析した。ルシフェラーゼ発現ベクターの3'非翻訳領域に*bcl-xl mRNA*の3'非翻訳領域を挿入し、マイクロRNA存

在下の遺伝子発現を検討した。肝がん切除時のがん部と非がん部20ペアについてマイクロRNA発現、Bcl-xL発現をそれぞれPCR、ウエスタンブロットで解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト試料は研究目的での使用に関する同意が得られているものを使用した。

C. 研究結果

In silico 解析により Bcl-xL の翻訳を抑制する可能性のあるマイクロRNAとして28種類を抽出した。このなかで正常肝細胞に比し Huh7 で低発現しているマイクロRNAは *let-7*であった。*let-7*を肝がん細胞株にトランスフェクションすることにより Bcl-xL の発現は低下した。ルシフェラーゼを用いたレポーター解析により、*let-7*は *bcl-xl mRNA* の3'非翻訳領域を直接標的としていることが示された。ヒト肝がんの20例中12例においてがん部は非がん部に比し *let-7*が低発現していたが、このような症例では、対照の8例に比し、有意に Bcl-xL の発現が亢進していた。肝がん細胞株に *let-7*を導入することにより、Bcl-xL の発現が低下し、スタウロsporin誘導性アポトーシスが増強した。ソラフェニブは肝がん細胞株の Mcl-1 発現を抑制したが、その治療効果は *let-7*の導入により増強した。

D. 考察

我々は Bcl-xL が肝がんにおいて機能亢進するメカニズムのひとつとして脱アミド化の抑制が関与することを報告したが

(Takehara T, et al., Cancer Res 2003)、発現亢進についてはマイクロRNAが関与することを明らかにした。

E. 結論

肝がんで Bcl-xL が高発現する分子機序として *let-7*マイクロRNAの低発現が関与することを明らかにした。*let-7*の導入はソラフェニブによる抗腫瘍効果を増強した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology* 52: 1310-1321, 2010.
- 2) Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Shimizu S, Tsujimoto Y, Hayashi N. Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. *Hepatology* 54: 240-251, 2011.

2. 学会発表

なし

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

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と臨床的意義の検討

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

研究要旨：プロテオーム解析により、肝細胞癌（HCC）を合併したC型肝炎ウイルス（HCV）関連慢性肝疾患患者の血清中にApoptosis Inhibitor of Macrophage（AIM、別名CD5もしくはSp α ）が高濃度に存在する事を見出した。また、HCC群と非HCC群で比較すると、ELISAで測定したHCC群のAIM値は非HCC群より有意に高値であった。さらに、AIMのHCC判別能（ROC曲線のAUC:0.77）はAFP(0.82)やPIVKA-II（0.73）とほぼ同等であった。一方、HCC群のAIM値はAFPやPIVKA-IIとは相関せず、血小板と有意に逆相関し、非HCC群では肝線維化の進行とともにAIM値は増加した。以上のことから、HCC患者血清中から同定したAIMは背景肝の肝線維化を反映してHCC群で上昇していると考えられた。また、AIMと肝線維化進展、肝発癌との関連はさらなる検討が必要であるが、プロテオーム解析で同定したAIMや関連分子の発現制御が、新しい分子標的治療薬の創出につながる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

病態と関連する新しいバイオマーカーの探索は、慢性肝疾患の病態解明につながり、新しい診断や治療法を創出できる可能性がある。さらに、新しいバイオマーカーを用いた簡便な診断法の確立が早期発見・早期治療に結びつく可能性があり、医療費抑制への貢献も期待できる。

今までの我々の研究で、プロテオーム解析により、肝細胞癌（HCC）患者血清中にAIMが高濃度に存在している事を見出した。しかし、AIMとC型肝炎ウイルス（HCV）関連慢性肝疾患の病態との関連は十分明らかになっていない。本研究では、AIMがHCV関連慢性肝疾患の病態とどのように関連する

かを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

血清をProteoMinor Kitで前処理したのち、2次元電気泳動によりプロテオーム解析した。それぞれ6名のHCCのないHCV関連慢性肝疾患患者、非アルコール性脂肪肝炎患者、および健常者と比較してHCV関連HCC患者血清中に高濃度で存在するタンパクを探索した。次に、74名のHCC患者および71名の非HCC患者血清を用いて、同定したタンパクの一つであるAIM値をELISAで測定し、臨床データと比較解析した。さらに、AIMをヒト培養星細胞LI90に添加し、AIMのLI90に及ぼす作用を検

討した。

(倫理面への配慮)

患者から血液などの試料を得る場合は、「試料提供者用の説明資料」を作製し、研究の内容や方法等を十分説明した後、研究協力依頼をする。個人の自由意志を尊重し、「同意書」に書面で意思を記載してもらい、同意が得られた場合のみ、試料採取等を行う。試料や臨床情報は匿名化し、個人情報保護に努める。解析結果や臨床情報等は厳重に保管し、解析はネットワークから遮断されたコンピュータを用いる。

C. 研究結果

1) HCC 群が他群よりもそれぞれ 1.5 倍以上高値を示したスポットを 27 個検出し、そのうちの一つを AIM と同定した。また、同じ血清を用いて、AIM 値を ELISA で測定し、2 次元電気泳動の結果との相関を確認した。

2) HCC 群と非 HCC 群で比較すると、ELISA で測定した HCC 群の AIM 値 (平均値 $4.1 \mu\text{g/ml}$) は非 HCC 群 ($1.5 \mu\text{g/ml}$) より有意に高値であった。さらに、AIM の HCC 判別能 (ROC 曲線の AUC; 0.77) は AFP (0.82) や PIVKA-II (0.73) とほぼ同等であった。一方、AIM 値は血小板と有意に逆相関し、AFP や PIVKA-II とは関連しなかった。

3) HCC を合併していない C 型慢性肝炎では、肝生検で確認した肝線維化の程度と AIM 値は関連し、肝線維化が進展している群 (F2 もしくは F3) の AIM 値 ($1.7 \mu\text{g/ml}$) は肝線維化が軽度の群 (F0 もしくは F1)

の AIM 値 ($1.1 \mu\text{g/ml}$) より有意に高値であった。

4) LI90 は CD36 を発現し、AIM は LI90 の細胞数を増加させる傾向であったが、その程度はわずかであった。また、LI90 の AIM 遺伝子発現はマクロファージ細胞株と比較して非常に低かった。

D. 考察

本研究では、肝癌のバイオマーカー候補の一つとして、新たに AIM を同定した。AIM は、マクロファージのアポトーシスを抑制するとともに、脂肪酸合成酵素の機能を抑制することにより脂肪細胞の脂肪滴を融解する。また、CD36 を介して、AIM が幼若な脂肪前駆細胞の成熟を妨げ、抗肥満作用を有することが報告されている。しかし、HCV 関連慢性肝疾患と血清 AIM 濃度との関連を詳細に検討した報告は今までにない。

AIM が肝硬変で増加することはすでに報告されている。われわれの検討でも HCC を合併していない C 型慢性肝炎での肝線維化の程度と AIM が関連し、HCC 群では血小板と AIM が逆相関したことは、HCC 群での AIM 上昇は背景肝である肝線維化と関連していると考えられた。肝線維化マーカーとしての有用性はさらに症例数を蓄積して、今後検討予定である。また、AIM は肝星細胞株 LI90 の細胞増殖にはほとんど影響せず、LI90 からの AIM 遺伝子発現はわずかであったが、生体内での肝線維化進展過程における AIM 発現亢進機序や、AIM が肝線維化を促進するかはさらなる解析が必要である。

一方、AIM の HCC 群と非 HCC 群の判別能は AFP や PIVKA-II と同等であり、この 2 つのマーカーとは相関しないことから、AIM は HCC の新しい診断マーカーとしての臨床応用が期待できる。さらに、HCC 群の AIM 濃度は HCC の無い慢性肝疾患における AIM 値と比較して非常に高値となっていたことから、HCC 群における AIM 値の上昇には肝線維化とは関連しない上昇機序も存在する可能性があり、今後のさらなる検討が必要である。

E. 結論

HCC 患者血清中から同定した AIM は背景肝の肝線維化を反映して HCC 群で上昇していると考えられたが、肝線維化によるもの以外の上昇機序も今後検討する必要がある。また、HCV 関連慢性肝疾患で増加した AIM が肝線維化や肝発癌を促進するかはさらなる検討が必要であるが、AIM や AIM 関連分子の制御がウイルス性肝疾患の新しい治療薬の創出に貢献できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tamai T, Uto H, Takami Y, Oda K, Saishoji A, Hashiguchi M, Kumagai K, Kure T, Mawatari S, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Serum manganese superoxide dismutase and thioredoxin are potential prognostic markers for HCV-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4890-8.
- 2) Oda K, Ido A, Tamai T, Matsushita M, Kumagai K, Mawatari S, Saishoji A, Kure T,

Ohno K, Toyokura E, Imanaka D, Moriuchi A, Uto H, Oketani M, Hashiguchi T, Tsubouchi H. Highly sensitive lens culinaris agglutinin-reactive α -fetoprotein is useful for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Oncol Rep.* 2011; 26: 1227-33.

2. 学会発表

- 1) 宇都浩文、米良久美子、坪内博仁. 肝癌患者血清を用いたプロテオミクスで同定した Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM) の病態への関与. 第39回日本肝臓学会西部会、岡山市、2011年12月.
- 2) Hiramane Y, Uto H, Imamura Y, Tabu K, Toyokura E, Hiwaki T, Sho Y, Baba Y, Tahara K, Higashi H, Tamai T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H: Clinical significance of serum MnSOD levels in patients with hepatitis C virus (HCV)-related chronic liver disease. The 62th liver meeting of AASLD、サンフランシスコ、2011年11月.
- 3) Ibusuki R, Uto H, Arima S, Mawatari S, Iwashita Y, Hashimoto S, Maeda T, Tamai T, Moriuchi A, Setoguchi Y, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H: Human neutrophil peptide-1 aggravates hepatic fibrosis in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model. The 62th liver meeting of AASLD、サンフランシスコ、2011年11月.
- 4) 米良久美子、宇都浩文、佐藤悠子、浜辺綾香、馬渡誠一、熊谷公太郎、呉建、玉井努、森内昭博、桶谷眞、井戸章雄、坪内博仁. C型肝炎ウイルス関連肝細胞癌患者における血清CD5Lの臨床的