

hepatitis C virus life cycle. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society in Japan, 2011. Dec., Yokohama.

- (9) Ikeda M, Takeda M, Ariumi Y, Waikita T, Kato N. Geranylgeranyl transferase II is essential for HCV RNA replication. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep., Seattle, USA.
- (10) Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Waikita T, Kato N. Development of HCV JFH-1 reporter assay systems using different human hepatoma cell lines. Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2011, 2011 Sep., Sapporo, Japan
- (11) Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Identification of a host factor determining the anti-HCV activity of ribavirin. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep., Seattle, USA.
- (12) Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and HCV strains are required for the objective evaluation of anti-HCV reagents. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep., Seattle, USA.
- (13) Sejima S, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles in cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2011, 2011 Sep., Sapporo, Japan
- (14) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV production requires the PML tumor suppressor protein. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep, Seattle, USA.
- (15) Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K,

Hijilata M, Maki M, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-Body and stress granule components around lipid droplets. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep., Seattle, USA.

#### H. 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

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が経過しようとしている。しかし、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 (HBVp) の作製により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。HBVp を用いた感染実験から得られた知見をもとに培養肝癌細胞で HBV 膜蛋白付着因子の分離・同定を試みる。

#### 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、*gfp-hyg<sup>R</sup>* をもつ) 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。HBVp の感染性から、培養肝癌細胞 (HepG2) には付着因子が内在していることが示唆された。そこで HBV 膜蛋白の受容体リガンドとして想定される PreS1 から HBs の N 末に相当する領域 (PS1~SSN) を大腸菌にて発現・精製し、これをプローブとして付着因子の pull-down 実験を行った。

#### 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。この活性をよく示す細胞はヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2 が最も顕著であったが、アフリカミドリザル腎由来とされる Vero 細胞でも確認された。この過程は感染受容体そのものは本来これらの細胞に備わっているものであり、導入操作自体がその活性に影響しているものと考えられた。HepG2 を用いた HBV 粒子付着試験でもその存在が示唆された。

そこで、HBV 膜蛋白の受容体リガンドに相当すると考えられる PS1~SSN をプローブとして、HepG2 細胞から付着因子 (感染受容体) の分離・同定を試み、幾つかの特異的な結合因子の存在を確認した。

#### 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、培養肝癌細胞 (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癌細胞は内在性の 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. Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., and Watanabe, S. "Kaposi's sarcoma-associated Virus governs gene expression profiles toward B cell transformation." In-Tech "Herpesviruses", Magel, D. G. ed., in press.
2. Ueda, K., Ohsaki, E., Nakano, K., and Zheng, X. "Characterization of Kaposi's sarcoma-associated

- virus-associated lymphomas by DNA array analysis.” In “Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD). in press.
3. Ohsaki, E. and Ueda, K. “Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency.” *Frontiers in Virology*. in press.
  4. Nakano, K., Katano, H., Tadagaki, K., Sato, Y., Ohsaki, E., Mori, Y., Yamanishi, K., and Ueda, K. “Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman’s Disease; Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II.” *Virology* in press
  5. 上田啓次. “B型肝炎のウイルス学” 『ウイルス肝炎のすべて』 (小池和彦編)化学療法の領域. (印刷中)
  6. 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 (編集中) .

#### 学会発表

1. 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 (KSHV) のvIRF-3/LANA2が誘導するIFNシグナルをvIRF-1が抑制する. 第26回ヘルペスウイルス研究会. 6月2日~4日. 大阪アカデミア. 大阪
2. 大崎恵理子、中野和司、Xin Zheng、Zunlin Yang、上田啓次. KSHV ゲノム複製におけるLANAの機能的役割と書く内骨格構造の重要性. . 第26回ヘルペスウイルス研究会. 6月2日~4日. 大阪アカデミア. 大阪
3. 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 (KSHV) のvIRF-3が誘導するIFNシグナルをvIRF-1が直接結合し抑制する. 第8回EBV研究会. 7月8日. 大阪大学大学院 銀杏会館.
4. 大崎恵理子、中野和司、Xin Zheng、Zunlin Yang、上田啓次. KSHV LANAと

核マトリックス因子 NuMA のキメラ蛋白によるori-P複製能の検討. 第8回EBV研究会. 7月8日. 大阪大学大学院 銀杏会館.

1.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

分担研究報告書

## HCV JFH-1 キメラウイルスを用いた NS5A 阻害剤の株特異的抗ウイルス作用の検討

分担研究者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨 近年、HCV 蛋白質を標的とした新規薬剤が開発され、特に NS5A 領域をターゲットにした NS5A 阻害剤はその強い抗ウイルス作用から注目されている。我々は、HCV JFH-1 株の NS5A 領域を他の HCV 株に置換したキメラウイルスを用い、NS5A 阻害剤の株特異的な抗ウイルス作用を評価した。その結果、NS5A 阻害剤の抗 HCV 作用は株により異なっており、遺伝子型 1 のキメラウイルスでは高い感受性を示したが、遺伝子型 2 のキメラウイルスでは抵抗性であった。今後、遺伝子型 2 の C 型慢性肝炎患者にこの薬剤を使用する場合、十分な注意が必要であると考えられた。

### A. 研究目的

近年、C 型肝炎ウイルス（HCV）の感染や複製を培養細胞で観察することが可能となったことから、HCV のウイルス蛋白質を標的とした薬剤の開発が進んでいる。これらの薬剤は Direct-Acting Antivirals と呼ばれ、その強い抗ウイルス作用から今後の C 型慢性肝炎治療の主流になると期待されている。しかし、その一方で Genotype や株による抗ウイルス作用の違いや、薬剤耐性変異の誘導が異なる可能性が指摘されている。これらの薬剤の抗ウイルス作用の評価には、HCV のライフサイクルを培養細胞で再現でき、すべてのウイルス蛋白質に対する影響が評価可能な HCV 感染複製系が有用である。しかし、この系で利用できる HCV 株は限られており Genotype や株による違いを検討することは難しい。

NS5A 阻害剤（BMS-790052）は HCV の NS5A 蛋白質を標的とする薬剤であり、培養細胞で HCV の複製

を強力に抑制すること、また内服投与が可能な薬剤であることから注目されている。我々は、培養細胞での感染と複製が可能な HCV JFH-1 株の NS5A 領域を他の HCV 株のものに置換したキメラウイルスを作成し、これらキメラウイルスの増殖に NS5A 阻害剤が与える影響を検討することでこの薬剤の株特異的な抗ウイルス作用を評価した。

### B. 研究方法

#### 1. HCV JFH-1 株 NS5A キメラウイルスの作製とその評価

まず、HCV JFH-1 株の NS5A 領域を、H77 株 (Genotype 1a)、Con1 株 (Genotype 1b)、J6CF 株 (Genotype 2a)、MA 株 (Genotype 2b) の NS5A 領域に入れ換えた HCV 全長の配列を持つプラスミドを作製した。これらのプラスミドから T7 RNA ポリメラーゼを用い全長の HCV RNA を合成した。合

成された RNA を肝癌由来細胞株で HCV の複製が可能な Huh-7.5.1 細胞に導入し、培養上清中と細胞内の HCV コア抗原量を測定することで、これらキメラウイルスの増殖を評価した。

## 2. HCV JFH-1 株 NS5A キメラレプリコンの作製とその評価

同様に H77 株、Con1 株、J6CF 株、MA 株の NS5A 領域を持つ HCV レポーターサブジェノミックレプリコンのプラスミドを作成した。このレポーターレプリコンは、HCV の非構造領域とルシフェラーゼ遺伝子を持ち、培養細胞に導入後細胞内のルシフェラーゼ活性を測定することにより各々の株の複製が評価できる。そこで、これら作成したプラスミドから RNA を合成し、Huh-7.5.1 細胞に導入することでキメラレプリコンの複製を評価した。

## 3. Huh7-25 細胞を用いたシングルサイクル HCV 生成システムによる評価

HuH-7 細胞のサブクローンで、CD81 を発現していない細胞株である Huh7-25 細胞を用い、シングルサイクル HCV 生成システムでキメラウイルスの増殖の評価を行った。この細胞では HCV ゲノムの複製と感染性ウイルス粒子の生成は可能であるが、生成されたウイルス粒子はこの細胞に再感染することができない。従って、この細胞に HCV 全長 RNA を導入すると、複製から粒子形成、分泌への一連の過程が一方通行で起こる。この状態でそれぞれの過程の効率を示すパラメータを比較することにより HCV ライフサイクル各過程の効率の評価が可能である。

## 4. HCV JFH-1 株 NS5A キメラウイルスを用いた NS5A 阻害剤感受性の評価

Huh-7.5.1 細胞に JFH-1 株およびキメラウイルスの全長 RNA を導入した後、0.5 - 5,000 pM の濃度で NS5A 阻害剤を加え、細胞内のコア抗原量を測定することにより、これらキメラウイルスの NS5A 阻害剤に対する感受性を評価した。

### (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。各種組換え DNA を用いた組換えウイルス感染実験は、大臣確認を申請し承認を受けている。

## C. 研究結果

### 1. HCV JFH-1 株 NS5A キメラウイルスの作製とその増殖能の評価

JFH-1 株の NS5A 領域を H77 株、Con1 株、J6CF 株、MA 株それぞれの NS5A 領域に入れ換えたキメラウイルスを導入した細胞では、時間経過とともに培養上清中と細胞内の HCV コア抗原量の上昇が確認された。従って、これらのキメラウイルスはすべて Huh-7.5.1 細胞で増殖可能であると考えられた。三日間の培養後、細胞内のコア抗原量は JFH-1 株とキメラウイルスで大きな差を認めなかったが、培養上清中のコア抗原量は株によって異なっていた。すなわち、H77 株の NS5A に置換したキメラウイルスでは JFH-1 株とほぼ同等、Con1 株の NS5A に置換したキメラウイルスでは JFH-1 株より低く、J6CF 株と MA 株の NS5A に置換したキメラウイルスでは JFH-1 株より高値であった。

## 2. HCV JFH-1 株 NS5A キメラレプリコンの作製とその増殖能の評価

次に、これらキメラウイルスの Huh-7.5.1 細胞での増殖効率の差が、HCV ライフサイクルのどのステップに起因するものであるかを検討した。まずレポーターレプリコンシステムを用い、細胞内での複製効率の検討を行った。H77 株、Con1 株、J6CF 株、MA 株それぞれの NS5A 領域を持ったレポーターキメラレプリコンを導入した細胞内では、JFH-1 株とほぼ同程度のルシフェラーゼ活性を認め、培養細胞内での複製効率に大きな差はないものと考えられた。

## 3. Huh7-25 細胞を用いたシングルサイクル HCV 生成システムによる評価

次に Huh7-25 細胞を用いたシングルサイクル HCV 生成システムでこれらのキメラウイルスの増殖能の評価を行った。その結果、細胞内での複製効率を示す細胞内コア抗原量は JFH-1 株とキメラウイルスで大きな差を認めず、レポーターレプリコンで観察された結果と同様にキメラウイルスの複製は JFH-1 株と差が無いという結果であった。さらに培養細胞内での感染性ウイルス粒子の生成効率を評価するため、培養上清中、細胞内の感染力価を比較した。NS5A-H77 キメラウイルスでは培養上清中と細胞内の感染力価はともに JFH-1 株とほぼ同程度であり、NS5A-Con1 キメラウイルスでは両方とも JFH-1 株と比較して低値であった。NS5A-J6CF、NS5A-MA キメラウイルスでは上清中、細胞内ともに JFH-1 株より高い感染力価を示した。以上のような結果から、NS5A を入れ換えたキメラウイルスの Huh-7.5.1 細胞での増殖効率の差は、細胞内での感染性ウイルス

粒子生成効率に依存していると考えられた。

## 4. HCV JFH-1 株 NS5A キメラウイルスを用いた NS5A 阻害剤感受性の評価

以上のような結果から、HCV JFH-1 株の NS5A 領域を他の株に置換したキメラウイルスは培養細胞で増殖可能であり、培養上清中に放出されるウイルスの量には差があるものの細胞内ではほぼ同程度に複製できると考えられた。そこでこれらのキメラウイルスを用い、NS5A 阻害剤 (BMS-790052) に対する感受性を評価した。その結果、NS5A 領域を Genotype 1 の H77 株、Con1 株に置換したキメラウイルスでは JFH-1 株に比べ低濃度でコア抗原量の低下を認めたが、Genotype 2 の J6CF 株、MA 株に置換したキメラウイルスでは高濃度の NS5A 阻害剤を投与してもコア抗原量の低下は認めなかった。これらのキメラウイルスに対する NS5A 阻害剤の 50% 有効濃度 ( $EC_{50}$ ) は、通常の JFH-1 株 (JFH-1/wt) が 6.4 pM であったのに対し、H77 株、Con1 株に置換したキメラウイルスでは 3.1 pM と 1.4 pM、J6CF 株、MA 株に置換したキメラウイルスではその 1,500 pM と 5,000 pM 以上という結果であった。以上のような結果から、Genotype 1 の NS5A 領域は NS5A 阻害剤に感受性が高く、Genotype 2 の NS5A 領域は感受性が低いと考えられた。

## 5. NS5A 阻害剤耐性変異の検討

NS5A 阻害剤に対する耐性変異については既に多くの報告があり、主に NS5A 領域の N 末端側に存在することが知られている。そこで、この検討で用いた HCV 株の NS5A 領域で、これら耐性変異に関わる座位のアミノ酸配列を確認した。H77 株

と Con1 株ではそれぞれの Genotype で報告されている耐性変異は認めなかった。しかし J6CF 株では NS5A 領域 31 番目のアミノ酸が耐性型であるメチオニンであった。この変異は Genotype 2a 株において薬剤感受性を 170 倍低下させることが報告されており、NS5A 阻害剤に対する J6CF 株の感受性の低さはこの変異が関与していると考えられた。MA 株については、これまで Genotype 2b 株での薬剤耐性変異の報告は無いが、J6CF 株と同様に 31 番目のアミノ酸がメチオニンであり、この変異により MA 株が NS5A 阻害剤に対して耐性となっている可能性が考えられた。

さらにこの耐性変異である NS5A 領域 31 番目のメチオニンが、データベース上に登録されている HCV 株の中でどれくらいの頻度で存在するかを調査した。その結果、データベース上の Genotype 1a と 1b の株では NS5A 領域 31 番目にメチオニンを持つ株がそれぞれ 0.2% と 3.8% と低頻度であったのに対し、Genotype 2a と 2b の株では 84.2%、79.0% と多くの株で認められた。従って、Genotype 2a と 2b の株の多くがこの NS5A 阻害剤に対して耐性であることが予想された。

#### D. 考察

本検討で使用した NS5A 阻害剤 (BMS-790052) は、Genotype 1b 株のレプリコンを用いたスクリーニングにより同定されたリード化合物をもとに開発された。そのため、Genotype 1a 株に比べ 1b 株で高い抗ウイルス作用を示し、薬剤耐性変異の出現頻度も Genotype 1a 株で多いことが知られている。我々の検討により Genotype 2a 株は Genotype 1a 株よりさらに NS5A 阻害剤に対し抵抗性であり、また Genotype 2b 株も 2a 株と同様

に NS5A 阻害剤に感受性が低いことが明らかになった。

#### E. 結論

HCV NS5A 阻害剤は強い抗 HCV 活性を有し、また内服可能であることから、NS3 プロテアーゼ阻害剤と共に、今後 C 型慢性肝炎治療の中心的な薬剤になると考えられている。しかし我々の検討から、日本に多くの患者が存在する Genotype 2 の株はこの薬剤に対し抵抗性であることが明らかになった。今のところ Genotype 2 の C 型慢性肝炎患者にこの NS5A 阻害剤を使用した報告はないが、今後使用する場合には十分な注意が必要と考えられる。

#### F. 健康危険情報

特に無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1. *J Virol.* 86(4): 2143-2152, 2012.

2) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) Pathway in Degradation of Hepatitis C

Virus Envelope Proteins and Production of Virus Particles. *J Biol Chem*, 286: 37264-37273, 2011.

3) Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology*, 54: 425-433, 2011.

4) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*, 410: 404-409, 2011.

5) Yamamoto M, Sakamoto N, Nakamura T, Itsui Y, Nakagawa M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Azuma S, Tsuchiya K, Kato T, Wakita T, Watanabe M. Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatology Res*, 41: 258-269, 2011.

## 2. 学会発表

1) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.

2) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara- Sugano M, Wakita T, Kato T. Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.

3) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Nomoto A, Wakita T, Kato T. Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.

4) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara- Sugano M, Wakita T, Kato T. HuH-7 subclone that supports high HCV production due to high virus assembly. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.

5) Matsumura T, Kato T, Tasaka-Fujita M, Murayama A, Masaki T, Wakita T, Imawari M. 25-hydroxy- vitamin D inhibits hepatitis C virus replication and production of the infectious viruses. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 4-8, 2011. San Francisco, USA.

6) 加藤孝宣、村山麻子、政木隆博、相崎英樹、脇田隆字. 国内献血検体を用いたC型肝炎ウイルス



ス陽性血漿パネル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、2011年6月、東京.

7) 加藤孝宣、政木隆博、脇田隆字. HCV JFH-1キメラ株を用いたNS5A阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価. シンポジウム10: C型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.

8) 松村卓哉、加藤孝宣、井廻道夫. Vitamin D とその代謝産物の抗 HCV 作用の検討. シンポジウム10: C型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.

9) 加藤孝宣、椎名正明、脇田隆字. HCV JFH-1株のチンパンジー感染実験で得られた適応変異株の機能解析. パネルディスカッション4: 肝疾患動物モデルと Translational Research 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.

10) 村山麻子、三代俊治、脇田隆字、加藤孝宣. C型肝炎ウイルス粒子の産生効率の良いHuH-7細胞サブクローンの分離と同定. 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.

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 教授

研究要旨 分担研究者萩原らは、自ら発見したSR蛋白質リン酸化酵素SRPKの特異的阻害剤SRPIN340がC型肝炎ウイルスの増殖を抑制する作用を有することを見出した。さらにSRPIN340の構造をもとに合成展開した化合物の中から、C型肝炎ウイルス、デング熱ウイルスなどフラビウイルスの増殖を抑制する化合物を見出し、SFV785と名付けて、その作用機構を明らかにした。また東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中から、C型肝炎ウイルスの増殖を抑制する新たな化合物を見出し、その作用機序を解析した。独自に合成しヘルペスウイルスなどDNAウイルスの増殖を抑制することが判明している化合物が、B型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性についても検討した。

### 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、宿主細胞のリン酸化酵素阻害剤のC型肝炎治療薬としての可能性を検討するとともに、更に効果的にC型肝炎ウイルス増殖を抑制する新たな化合物をケミカルライブラリーから探索する。またヘルペスウイルスなどDNAウイルスの増殖を抑制することが判明している独自化合物が、B型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性についても検討し、新規肝炎治療薬の開発を目指す。

### B. 研究方法

- 1) SR蛋白質リン酸化酵素SRPKの特異的阻害剤SRPIN340がC型肝炎ウイルスの増殖を抑制する作用機序を解明する。
- 2) C型肝炎ウイルス、デング熱ウイルスなどフラビウイルスの増殖を抑制する化合物SFV785の作用機序をさらに検討し、SFV785から構造展開した化合物のC型肝炎ウイルスの増殖抑制活性を検討する。
- 3) 増殖ルシフェラーゼ発現HCV レプリコン細胞を用いて、東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中から、見つかった新たな化合物の作用機序を解明するとともに、JFH-1C型肝炎ウイルスの増殖抑制活性について検討する。
- 4) 独自に合成しヘルペスウイルスなどDNAウイルスの増殖を抑制することが判明している化合物が、B型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性について検討する。

### (倫理面の配慮)

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) 東京医科歯科大学・坂本直也博士らとの共同研究により、我々の開発したSR蛋白質リン酸化酵素SRPKの特異的阻害剤SRPIN340が、C型肝炎ウイルスの増殖を抑制する作用を有することを見出した。
- 2) C型肝炎ウイルス、デング熱ウイルスなどフラビウイルスの増殖を抑制する化合物SFV785の作用機序を、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さらに詳細に解析した。SFV785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ため、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ので、米国デューク大学Mariano Garcia-Blanco教授と共同で、in vivoでの薬効薬理試験の準備をおこなった。
- 2) 同定した標的蛋白質リン酸化酵素によるスクリーニングの準備を行った。
- 3) 東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中からC型肝炎ウイルスの増殖を抑制する化合物を見出し、その作用機序を解明した。
- 4) DNAウイルス増殖阻害化合物が、B型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性について検討した。

### D. 考察

1) SFV785の作用機序は新規であり、標的キナーゼの同定など更なる解析が必要である。坂本直也博士らと一緒に、新たに見出した化合物の標的も更に追求する必要がある。また、上記化合物の臨床応用に向けて、化合物の代謝安定性や毒性について検討する必要がある。米国デューク大学Mariano Garcia-Blanco教授と共同で、米国NIHのモデル動物などを用いてin vivoでの薬効薬理試験を行う協議を進めている。

2) 東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中から新たに見つかったC型肝炎遺伝子発現抑制作用を示す化合物の作用メカニズムは、前述のSFV785とは異なり全く新規のものである。さらに詳細な作用機序の解析を進めるとともに、化合物の代謝安定性や毒性についてもデータを取得し、その有効性・将来性を検討する必要がある。

#### E. 結論

SFV785の作用機序は新規であり、更なる作用機序の解析を行うとともに、臨床応用に向けて、化合物の代謝安定性や毒性について検討し、in vivoでの薬効薬理試験を行う必要がある。増殖ルシフェラーゼ発現 HCV レプリコン細胞を用いて、ケミカルライブラリーから新たに見つけたC型肝炎遺伝子発現抑制作用を示す化合物の作用メカニズムは、前述の SFV785 とは異なり全く新規のもので、その有効性・将来性を今後詳細に検討してゆく必要がある

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Amin EM, Hua J, Cheung MK, Ni L, Kase S, Ren-nel ES, Gammons M, Nowak DG, Saleem MA, Hagiwara M, Schumacher VA, Harper SJ, Hinton D, Bates DO, Lodomery MR. WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. *Cancer Cell* 20(6):768-780.(2011)
- 2) Kataoka N, Diem MD, Yoshida M, Hatai C, Dobashi I, Dreyfuss G, Hagiwara M, and Ohno

M. Specific Y14 domains mediate its nucleocytoplasmic shuttling and association with spliced mRNA. *Scientific Reports* 1, doi:10.1038/srep00092. (2011)

- 3) Ninomiya K, Kataoka N, and Hagiwara M. Stress-responsive maturation of Clk1/4 pre-mRNAs promotes phosphorylation of SR splicing factor. *J Cell Biol.* 195(1):27-40.(2011)
  - 4) Anwar A, Hosoya T, Leong KM, Onogi H, Okuno Y, Hiramatsu T, Koyama H, Suzuki M, Hagiwara M, Garcia-Blanco MA. The Kinase Inhibitor SFV785 Dislocates Dengue Virus Envelope Protein from the Replication Complex and Blocks Virus Assembly. *PLoS One.* 6(8):e23246.(2011)
  - 5) Debdab M, Carreaux F, Renault S, Soundararajan M, Fedorov O, Filippakopoulos P, Lozach O, Babault L, Tahtouh T, Baratte B, Ogawa Y, Hagiwara M, Eisenreich A, Rauch U, Knapp S, Meijer L, Bazureau JP.(2011)
  - 6) Leucettines, a class of potent inhibitors of cdc2-like kinases and dual specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases derived from the marine sponge leucettamine B: modulation of alternative pre-RNA splicing. *J Med Chem.* 54(12):4172-4186.(2011)
  - 7) Nishida A, Kataoka N, Takeshima Y, Yagi M, Awano, H, Ota, M, Itoh K, Hagiwara M, and Matsuo M. Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the *dystrophin* gene. *Nature Commun* 2, 308.(2011)
- ##### 2. 学会発表
- 1) Masatoshi Hagiwara, Moduration of Pre-mRNA Splicing Patterns with Synthetic Chemicals and Their Clinical Applications, The UEHARA Memorial Foundation Symposium, Chembiomolecular Science: at Frontier of Chemistry and Biology, June 6-8, Tokyo, Japan

- 2) Masatoshi Hagiwara, Visualization of Alternative Splithin with Multi-color Splicing Reporters and Their Application for Screen of Trans-acting Factors and Small Chemicals, The 16th Annual Meeting of the RNA Society/The RNA Society of Japan 13<sup>th</sup> Annual Meeting Kyoto, Japan June 14-18, 2011
- 3) Masatoshi Hagiwara, Moduration of Pre-mRNA Splicing Patterns with Synthetic Chemicals and Their Clinical Applications, The UEHARA Memorial Foundation Symposium, Chembiomolecular Science: at Frontier of Chemistry and Biology, June 6-8, Tokyo, Japan
- 4) Masatoshi Hagiwara, Visualization of alternative splicing and the therapeutic manipulation with chemical compounds, US-Japan Conference at City of Hope, August 4-5, USA
- 5) Masatoshi, Hagiwara New therapeutics by alteration of mRNA expression and processing with small chemicals", *International Chemical Biology Conference, October 11-12, USA, 2011*
- 6) Masatoshi Hagiwara, New RNA-targetting therapeutics with protein kinase inhibitors, Protein kinases regulating RNA splicing, November 12-16, 2011, France
- 7) 萩原正敏. Masatoshi Hagiwara. Development of anti-virus drugs targeting the host factors required for viral proliferation. 鳥インフルエンザ治療薬の国際共同開発研究」国際シンポジウム. 2012. 1月京都

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

特になし

## HCV感染モデル動物の開発に関する研究

研究分担者：三浦直行 浜松医科大学 教授

研究協力者：彦坂圭介 浜松医科大学 大学院生

研究協力者：Islam, Mohammad 浜松医科大学 大学院生

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のヒト肝細胞への侵入に必要なCD81, SR-BI, CLDN1, OCLN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。しかし、ヒト蛋白の発現量が正常ヒト肝細胞のそれぞれと比較して10分の1以下であったため、ウイルスが侵入できない事が明らかになった。また、ウイルス侵入後のウイルスゲノム複製でもマウス肝細胞内では起こらない可能性が示唆された。以上の事実をふまえ、4つのヒト蛋白の発現量をヒト肝細胞以上にするマウスおよびウイルスゲノムRNAが複製できるマウスを作製することでHCV感染性マウスが完成する見通しがついた。すでに、それぞれを解決するマウスの一つは作製済み、他の一つは作製中である。

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）が感染できるマウスを作製する。このマウスは慢性肝炎の病態解明、ワクチン作製、病態の進行を阻止する薬剤の開発に用いることができる。

### B. 研究方法

HCVがヒト肝細胞に侵入する時に重要なCD81, Scavenger receptor class B type I (SR-BI), claudin1 (CLDN1), occluding (OCLN) cDNAをアルブミン・ミニ enhancer/promoter の下流に連結した4種のDNAを受精卵に微小注射し、トランスジェニックマウス Alb-CCS, Alb-0 を得た。この両者を交配し、Alb-CCS0 マウスを完成させた。

また、同じ4つのcDNAをCAGベクターに連結し、マウス線維芽細胞 NIH/3T3 に遺伝子導入し、4つのヒト蛋白を発現している永久株を樹立した。

Alb-CCS0 マウス肝臓から分離した初代肝細胞および4蛋白発現永久株にHCVppを感染させ、ウイルスの侵入を検討した。

（倫理面の配慮）

特になし。

### C. 研究結果

4蛋白を発現したNIH/3T3細胞にHCVppは効率よく侵入した。このことから、用いている4つのヒト蛋白cDNAは機能に問題ないことが証明された。次に、初代肝細胞にHCVppを感染させたが、有為なウイルス侵入は観察されなかった。そこで、Alb-CCS0 マウス肝細胞とHCVppが感染できるヒト肝細胞株 Huh7.5.1 細胞でのCD81, SR-BI, CLDN1, OCLN蛋白量をウェスタンブロッティング法で比較した。結果は、CCS0 マウス肝細胞での発現はHuh7.5.1細胞に比べて、CD81が20%、SR-BIが30%、CLDN1が10%、OCLNが20%とマウスのヒト蛋白発現量がかなり低値であった。

### D. 考察

ヒト4蛋白cDNAが機能をもつことを確認できたのは、出発点が確かであることを意味しており、これを今後用いて不安がないことを示している。

2011年6月発行のNatureで、マウス肝細胞でHCVが侵入するにはHuh7.5.1細胞のCD81, SR-BI, OCLNが10倍、CLDN1は1倍というように過剰発現する必要がある。このことは、マウス肝細胞には侵入阻害因子があり、これに打ち勝つためには過

剰発現が必要であるという可能性、に矛盾しない。  
また、2012年2月のNature Medicineによれば、  
OCLN以外の3蛋白はヒト肝細胞とHuh7.5.1細胞での  
発現量がほぼ同じであり、Huh7.5.1細胞での  
OCLN発現量はヒト肝細胞のその4割との報告が  
ある。また、前述のNatureの報告では、マウスに  
侵入したウイルスRNAゲノムは複製せず分解され  
るのみであり、マウス肝細胞ではHCVゲノムは複  
製されない可能性が示唆されている。この点につ  
いて、次年度ではっきりさせる予定である。

#### E. 結論

4つのヒト蛋白を肝細胞に発現させたトランス  
ジェニックマウスではHCVの侵入がおこらなかつ  
た。これは、このマウス肝細胞における4つのヒ  
ト蛋白の発現レベルが低いことが一つの原因であ  
ることが明らかになった。新しい発想に基づいた  
マウスの作製が必須である。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sabine A, Agalarov Y, Hajjami NME, Jaquet M, Hagerling R, Pollmann C, Bebbler D, Pfenniger A, Miura N, Dormond O, Calmes JM, Adams R, Makinen T, Kiefer F, Kwak BR, Petrova TV: PROX1, FOXC2 and mechanotransduction cooperate to control connexin 37 and calcineurin during lymphatic valve formation. Dev Cell, in press.
- 2) Uezato T, Sato E, Miura N: Screening of natural medicines that efficiently activate neurite outgrowth in PC12 cells in C2C12-cultured medium. Biomed Res, in press.
- 3) Wang B, Hikosaka K, Sultana N, Sharkar MTK, Noritake H, Kimura W, Wu Y-X, Kobayashi Y, Uezato T, Miura N: Liver tumor formation by a mutant retinoblastoma protein in the transgenic mice is caused by an up-regulation of c-Myc target genes. Biochem Biophys Res Commun, 417: 601-608, 2012.
- 4) Tammela T, Zarkada G, Nurmi H, Jakobsson L, Heinolainen K, Tvorogov D, Zheng W, Franco C, Murtomaki A, Aranda E, Miura N, Yla-Herttuala S,

- Fruttiger M, Makinen T, Eichmann A, Pollard J, Gerhardt H, Alitalo K: VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signaling. Nature Cell Biol 13: 1202-1213, 2011.
- 5) Hikosaka K, Noritake H, Kimura W, Sultana N, Sharkar MTK, Tagawa Y, Uezato T, Kobayashi Y, Wakita T, Miura N. Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occludin in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry. Biomed Res, 32: 143-150, 2011.
  - 6) Kimura W, Machii M, Xue X-D, Sultana N, Hikosaka K, Sharkar MTK, Uezato T, Matsuda M, Koseki H, Miura N. Irlx11 mutant mice show reduced tendon differentiation and no patterning defects in musculoskeletal system development. Genesis 49: 2-9, 2011.
- #### 2. 学会発表
- 1) Kimura W, Machii M, Sultana N, Hikosaka K, Sharkar MTK, Uezato T, Koseki H, Miura N. Reduced tendon differentiation in the Irlx11 knockout mice. 70th Annual Meeting, of Society of Developmental Biology, July 21-25 2011, Chicago IL

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他

# 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

### ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の解析

分担研究者 八木 清仁 大阪大学大学院薬学研究科

#### 研究要旨

周知のように C 型肝炎ウイルス（HCV）の肝細胞における感染・複製機構の解析は C 型肝炎克服に向けた最重要課題であるものの、既存のヒト肝細胞初代培養系は利便性・汎用性に乏しく、依然としてヒト肝がん細胞株を用いた解析が主流となっている。本研究では、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いて HCV の感染・複製を解析し、本細胞の HCV 研究への応用の可否を検証すると同時に新たな HCV 創薬ターゲットを同定することを目的とする。

同研究班の大阪大学水口裕之教授グループが確立したヒト iPS 細胞由来肝細胞誘導系を用いて HCV シュードタイプウイルス（HCVpv）による感染能解析、及び当研究グループで開発した HCV サブゲノム発現アデノウイルスベクターによる HCV 複製能解析を実施した。その結果、ヒト iPS 細胞では HCVpv 感染、HCV 複製は検出されなかったが分化誘導肝細胞は両活性を有しており、分化誘導過程で HCV 感染能、複製能を獲得することが示された。また、その感染能は HCV 受容体アンタゴニストである抗 CD81 抗体で、複製能はインターフェロンで阻害されたことから抗 HCV 薬のスクリーニングにヒト iPS 細胞由来肝細胞が適用できる可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

周知のように、我が国には 200 万人余りの HCV 感染者がいると推定されており、肝癌の 80% は HCV 感染者が占めている。現在 HCV 治療法のゴールドスタンダードとしてインターフェロン・リバビリン併用療法が実施されているが、難治性 Ib 型ウイルスの高ウイルス量患者に対する奏功率は 50% に過ぎないこと、薬剤耐性ウイルスが出現しやすいこと、副作用発現により治療の中断を余儀なくされる患者がいることが臨床上大きな問題となっている。2005 年感染研協田らによりヒト肝癌細胞株を用いた 2a 型 HCV の培養系が樹立され、HCV 複製機構の解析および HCV ワクチン開発の端緒となったものの、依然として難治性 Ib 型 HCV の培養系開発は立ち遅れている。肝細胞は増殖性に乏しい上に培養系では急速に肝細胞としての性質を消失すること、多能性幹細胞からの肝細胞分化誘導系が構築されていないことから、ヒト肝細

#### 研究協力者

水口裕之 大阪大学大学院薬学研究科

近藤昌夫 大阪大学大学院薬学研究科

渡利彰浩 大阪大学大学院薬学研究科

吉田孟史 大阪大学大学院薬学研究科

山岸善彰 大阪大学大学院薬学研究科

稲村 充 大阪大学大学院薬学研究科

(独)医薬基盤研究所

高山和雄 大阪大学大学院薬学研究科

(独)医薬基盤研究所

胞を用いた HCV 感染・複製評価研究はヒト肝癌細胞株やヒト肝臓キメラマウスの利用したアプローチしか無く、ここに HCV 研究の難しさがあると言える。

研究協力者水口裕之博士は、自身が代表を務める先端医療開発特区（スーパー特区）『ヒト iPS 細胞を用いた新規 *in vitro* 毒性評価系の構築』において、独自の遺伝子導入技術を駆使したヒト iPS 細胞の肝細胞分化誘導法開発を推進し、世界最高水準の肝細胞分化誘導法を確立している。また、当研究グループでは、*in vitro*・*in vivo* において高い遺伝子導入効率を有し、汎用性・利便性に優れたアデノウイルスベクターを用いて HCV ゲノム導入ベクターシステムを開発している。

本研究では、水口グループが確立したヒト iPS 細胞由来肝細胞創出技術と当グループの HCV ゲノム導入技術などを融合することで、HCV の感染・複製機構を解析し、新規創薬ターゲットの探索を試みることを目的としている。本年度は、パイロットスタディとして、ヒト iPS 細胞、ヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV 感染・複製能の解析を試みた。

## B. 研究方法

### 1. ヒト iPS 細胞由来肝細胞

実験に供したヒト iPS 細胞、ヒト iPS 細胞由来肝（ヒト iPS-hep）細胞は、大阪大学大学院薬学研究科・水口裕之教授グループによって作製されたものを使用した。

### 2. HCV 感染実験

#### (1) HCV 感染実験

HCV 感染実験には、ルシフェラーゼ遺伝子を有する HCV シュードウイルス（HCVpv: 水泡性口内炎ウイルス（VSV）のエンベロープを HCV エンベロープに置換したウイルス）を使用し、ルシフェラーゼ活性を指標に HCV 感染を評価した。

ヒト iPS 細胞、ヒト iPS-hep 細胞および Huh7 細胞を 48-well plate に播種し、HCVpv を 2 時間作用させ、ウイルス作用 24 時間後にルシフェラーゼ活性を

測定した。感染阻害実験として抗 CD81 抗体（JS-81; BD Biosciences 社）またはマウス IgG を HCVpv と 2 時間インキュベートし、ウイルス作用 24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。尚、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo 社) を用いて蛋白定量を行い、感染効率を補正した。

### 3. HCV 複製実験

#### (1) HCV ゲノム発現ベクター

HCV 複製実験にはテトラサイクリン応答性の RNA polymerase I 発現カセットを搭載したアデノウイルスベクター（Ad5/35）を用い、1b 型の HCV ゲノムの構造蛋白質コード領域をルシフェラーゼに置換した HCV サブゲノム発現ベクター（AdP<sub>1235</sub>-HCV）、NS5B（RNA dependent RNA polymerase）のポリメラーゼ活性欠損変異体ベクター（AdP<sub>1235</sub>-ΔGDD）、感染効率補正用の EGFP/Luciferase 発現ベクター（AdP<sub>1235</sub>-EL）を実験に供した（Nucleic Acids Res, 2011;39:e64）。

#### (2) HCV 複製実験

ヒト iPS 細胞、ヒト iPS-hep 細胞および Huh7 細胞を 48-well plate に播種し、テトラサイクリン応答性転写活性化因子をコードした Ad-tTA (5 MOI) 存在下 AdP<sub>1235</sub>-HCV または複製能を欠損させた AdP<sub>1235</sub>-ΔGDD (1 MOI) を感染させた。感染 24 時間後にドキシサイクリン (10 μg/ml) を添加することで RNA polymerase I 発現カセットの転写活性をオフにした。ドキシサイクリン添加 48 時間後に細胞を回収し、Renilla Luciferase Assay System (Promega 社) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。また、Ad ベクターの感染効率を補正するために、AdP<sub>1235</sub>-EL (1 MOI) と Ad-tTA (5 MOI) を共感染させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。HCV 複製能は各細胞の AdP<sub>1235</sub>-HCV、AdP<sub>1235</sub>-ΔGDD のルシフェラーゼ活性を各細胞の AdP<sub>1235</sub>-EL のルシフェラーゼ活性で補正することにより算出した。

また、ヒト iPS-hep 細胞にドキシサイクリンを添加する際 HCV 複製阻害薬である IFN を各濃度含む培養液を添加し、感染 72 時間後にルシフェラーゼ活性お



よび細胞生存率を測定することで HCV 複製阻害効果を検証した。細胞障害性は WST-8 試薬を用いて測定した。ルシフェラーゼ活性および細胞障害性は IFN 非添加群を 100%として算出した。

(倫理面の配慮)

ヒト iPS 細胞の使用に際し大阪大学のヒト組織・ヒト初代培養細胞研究審査を受け、承認されている。

## C. 研究結果

### 1. HCV 感染実験

前年度の解析によりヒト iPS-hep 細胞は HCV 感染受容体 (CD81、SR-BI、claudin-1、occludin) を発現していることが確認されている。今年度、HCVpv を用いて感染能を評価したところ、ヒト iPS 細胞では活性が検出されなかったが、ヒト iPS-hep 細胞では Huh7 細胞と同等の HCVpv 感染能を獲得していることが明らかとなった (Fig. 1A)。

そこで次に、HCV 感染受容体である CD81 に対する抗体を用いた感染阻害実験を行った。その結果、コントロールとしてマウス IgG を用いた場合には感染は阻害されなかったが抗 CD81 抗体を用いた場合に濃度依存的に感染が阻害された (Fig. 1B)。HCVpv のベースとなる VSV の感染能も iPS-hep 細胞は分化誘導過程で獲得するがその感染能は抗 CD81 抗体によって阻害されなかった。

### 2. HCV 複製実験

HCV ゲノムの導入技術は HCV 機能解析における有用なツールとなるものの、長鎖 RNA 発現系である RNA polymerase I 発現カセットを有するベクターシステムの開発が遅延しており、HCV 複製機能の解析は遅れている。前述したように、当研究グループでは転写制御型 RNA polymerase I 発現カセットを搭載したアデノベクターシステムを構築し、世界に先駆けて HCV ゲノム発現アデノウイルスベクターの創出に成功している (Nucleic Acids Res, 2011;39:e64)。そこで、本システムを用いて、ヒト iPS 細胞およびヒト iPS-hep 細胞における HCV 複製を検討した。ヒト iPS-hep 細胞に AdP<sub>1</sub>235-HCV を添加したところ、

Huh7 細胞 (HCV 複製細胞) と同様に HCV 複製 (ルシフェラーゼ活性の上昇、HCV RNA 数の上昇) が観察されていた。このとき、AdP<sub>1</sub>235-ΔGDD 感染細胞では HCV 複製が観察されなかったことから、HCV RNA polymerase 依存的な HCV ゲノム複製がヒト iPS-hep 細胞では生じている可能性が示唆された (Fig. 2A)。一方、ヒト iPS 細胞では、ルシフェラーゼ活性の上昇、HCV RNA の存在が観察されなかったことから、ヒト iPS 細胞では HCV は複製しないものと推察される。さらに、HCV 複製阻害薬であるインターフェロンを用いてヒト iPS-hep 細胞における HCV 複製を阻害できることを明らかとした (Fig. 2B)。

## D. 考察

本研究では、HCVpv および HCV ゲノム導入ベクターを用いて、ヒト iPS 細胞およびヒト iPS-hep 細胞における HCV 感染・複製の可否について検証を試み、ヒト iPS 細胞では HCV の感染・複製が起きないこと、ヒト iPS-hep 細胞では HCV の感染・複製が生じることを見出した。したがってヒト初代肝細胞、ヒト肝がん細胞株、ヒト肝臓キメラマウスに加えヒト iPS-hep 細胞が HCV 感染・複製の評価および解析系として適用できることが示唆された。また HCV 感染受容体である CD81 に対する抗体により HCVpv の感染が阻害され、IFN により HCV サブゲノムの複製が阻害できることを明らかとし、将来ヒト iPS-hep 細胞を用いて HCV 感染阻害薬、複製阻害薬のスクリーニングが可能であることが示唆された。

今後は HCVpv 以外に実際の HCV 粒子 (HCVcc) を用いた感染実験を行い、感染能、複製能の検証を行う必要がある。また内胚葉、肝幹前駆細胞など各分化段階のヒト iPS 細胞を用いて、アレイ解析により HCV 感染・複製に関与する宿主因子の解析を進めて行く予定である。

## E. 結論

大阪大学大学院薬学研究科 水口グループによって確立されたヒト iPS 細胞由来肝細胞分化誘導系を用いて HCV 感染・複製を解析したところ、ヒト iPS 細胞では HCVpv の感染は生じず、HCV レプリコン

の複製も観察されなかった。一方、ヒト iPS 細胞由来肝細胞では HCV<sub>pv</sub> の感染および HCV レプリコンの複製が観察され、さらに HCV 感染受容体拮抗薬、HCV 複製阻害薬を用いることでそれぞれ HCV 感染、HCV 複製が阻害できることを明らかとした。以上の結果より、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が HCV 感染・複製の評価・解析系として適用しうることが示唆された。

## F 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yoshida T, Takayama K, Kondoh M, Sakurai F, Tani H, Sakamoto N, Matsuura Y, Mizuguchi H, Yagi K. Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011, 416(1-2):119-124.
2. Yoshida T, Kondoh M, Ojima M, Mizuguchi H, Yamagishi Y, Sakamoto N, Yagi K. Adenovirus vector-mediated assay system for hepatitis C virus replication. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39(10):e64.
3. Yoshida T, Kondoh M, Yagi K. Promising targets for anti-hepatitis C virus agents. *Curr Med Chem.* 2011, 18(8):1239-1244.
4. Kakutani H, Takahashi A, Kondoh M, Sakihama T, Hamakubo T, Yagi K. A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *PLoS ONE.* 2011 Feb 14;6(2):e16611.

### 2. 学会発表

1. 八木清仁、吉田孟史、近藤昌夫、水口裕之、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を利用した C 型肝炎ウイルスの複製・感染評価、日本薬学会第 132

年会、平成 24 年 3 月、札幌

2. 山根誠司、吉田孟史、高山和雄、近藤昌夫、櫻井文教、谷英樹、坂本直哉、松浦善治、水口裕之、八木清仁、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた HCV 感染モデルの作製。日本薬学会第 132 年会、平成 24 年 3 月、札幌
3. Yoshida, T., Satoh, F., Akihiro, W., Kondoh, M., Mizuguchi, H., Sakamoto, N., Yagi, K. Development of an RNA polymerase I-driven adenoviral vector and its application in an HCV replication assay. HCV 2011. September 8-12. Seattle, USA.
4. 吉田孟史、佐藤英美、渡利彰浩、近藤昌夫、水口裕之、八木清仁、RNA ポリメラーゼ I 発現系を利用した長鎖 RNA 発現ベクターの開発。第 27 回日本 DDS 学会、平成 23 年 6 月、東京

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし

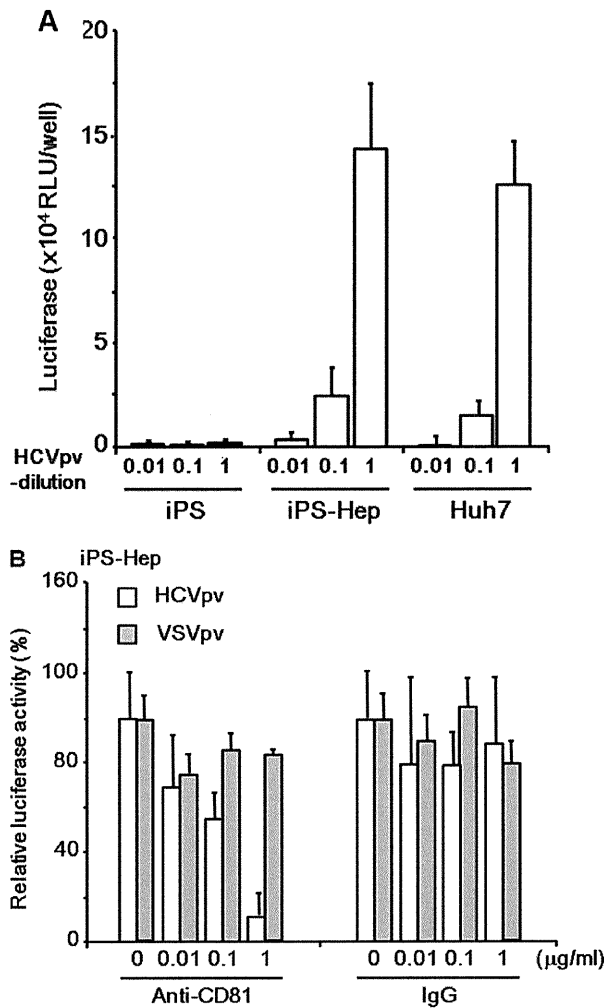


Figure 1. HCV Infection assay in iPS-hep cells. (A) Infection of iPS-Hep cells with HCVpv. iPS, iPS-Hep and Huh7 cells were infected with HCVpv at the indicated dilution. After 2 h of infection, the cells were cultured with fresh medium for 24 h. Then, luciferase activities were measured. Data are presented as means  $\pm$  SD (n = 3). (B) Effect of anti-CD81 antibody on infection of iPS-Hep cells with HCVpv. iPS-Hep (upper panel) and Huh7 (lower panel) cells were treated with mixtures of HCVpv (open column) or VSVpv (gray column) and anti-CD81 antibody or control mouse IgG at the indicated concentrations. After a 2-h incubation, the cells were cultured with fresh medium for 24 h. Then, the luciferase activities were measured. Data represent the percentage of vehicle-treated cells. Data are presented as means  $\pm$  SD (n = 3).

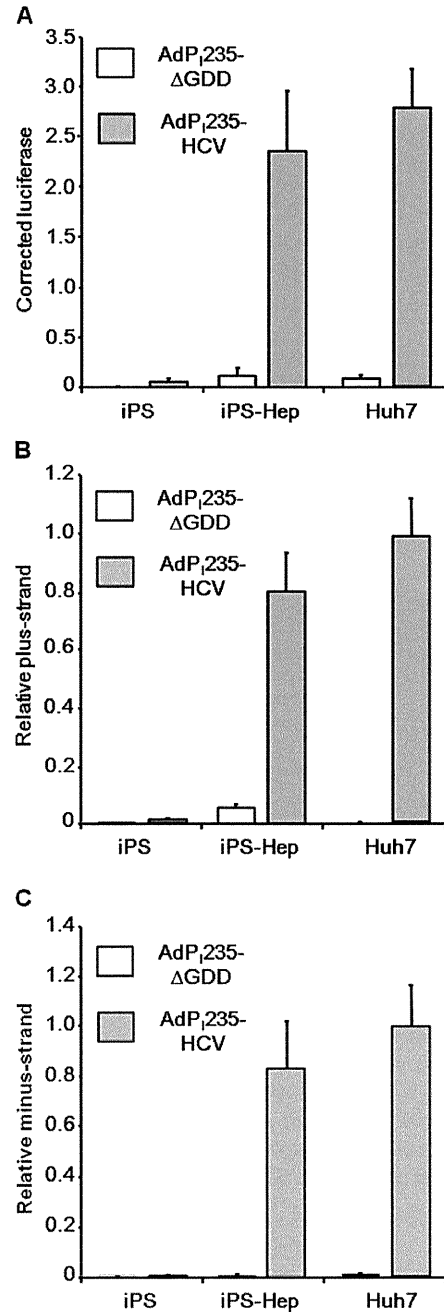


Fig. 2. HCV replication assay in iPS-Hep cells. (A) Comparison of replication of HCV subgenomic replicons, AdP1235-HCV (gray column) and AdP1235-ΔGDD (open column), in iPS, iPS-Hep and Huh7 cells. The cells were infected with replicons, treated with Dox, and renilla luciferase activity was measured, as described in the Section 2. To normalize for infectivity of Ad vector, cells were co-infected with AdP1235-fluc and Ad-tTA. After 72 h, firefly luciferase activity was measured. Corrected luciferase activity was calculated as the ratio of renilla luciferase activity to firefly luciferase activity. (B) (C) Real-time PCR analysis of HCV plus- and minus-strand RNA in iPS-Hep cells. iPS-Hep cells were infected with replicons, and total RNA was subjected to real-time PCR analysis, as described in the Section 2. The copy numbers were shown as ratio of those of Huh7. Data are presented as means  $\pm$  SD (n = 3).

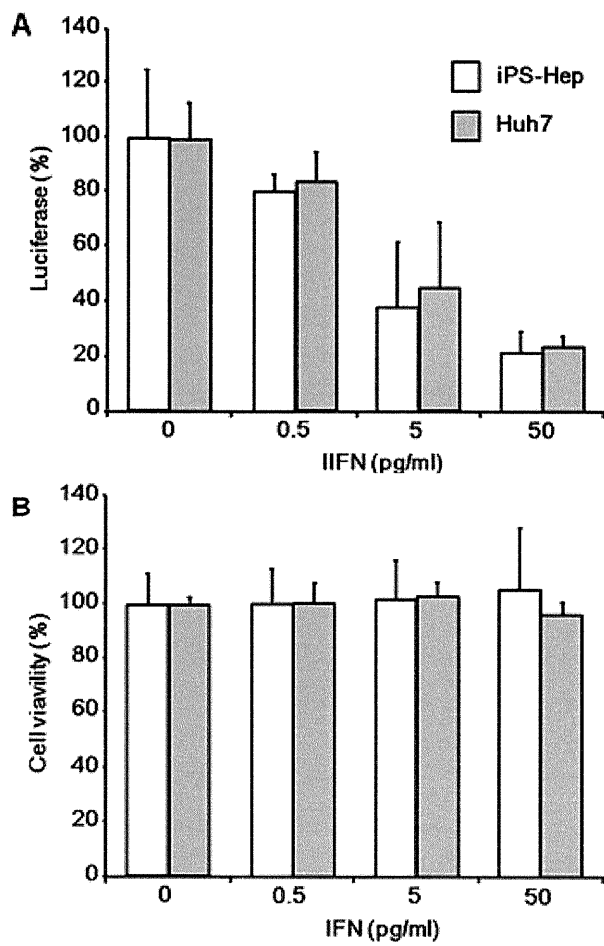


Fig. 3. Effect of interferon on HCV replication in iPS-Hep cells. iPS-Hep (open column) and Huh7 (gray column) cells were infected with AdPI235-HCV and Ad-tTA. After 24 h, the cells were treated with Dox and the indicated concentration of interferon for 48 h. Luciferase activities (A) and cell viabilities (B) were measured as described in the Section 2. Data represent the percentage of the value for vehicle-treated cells, and are presented as means  $\pm$  SD (n = 3).