

201125029A

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

アデノウイルスベクターを利用した C 型肝炎治療薬創製基盤技術の

開発に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 櫻井 文教

平成 24 年 (2012 年) 5 月

目 次

I. 総括研究報告

アデノウイルスベクターを利用した C 型肝炎治療薬創製基盤技術の開発
(マイクロ RNA をノックダウン可能なアデノウイルス (Ad) ベクターおよび
高効率に RNA 干渉を誘導可能な Ad ベクターの開発)

櫻井 文教1

II. 分担研究報告

アデノウイルスベクターを利用した C 型肝炎治療薬創製基盤技術の開発

渡利 彰浩11

III. 研究成果の刊行に関する一覧表23

IV. 研究成果の刊行物・別刷25

「アデノウイルスベクターを利用した C 型肝炎治療薬創製基盤技術の開発」

総括研究報告書

miR-122a を阻害することで HCV 複製を可能なアデノウイルス (Ad) ベクター の開発

主任研究者 櫻井 文教

大阪大学大学院薬学研究科 准教授

研究要旨

C型肝炎ウイルス (HCV)は、約 9.6kb のプラス鎖 RNA をゲノムに持つ RNA ウイルスである。HCV のキャリアは、全世界で 2 億人、国内では 200 万人にものぼり、HCV 感染患者は高い割合で慢性肝炎を引き起こし、肝硬変、肝癌へと進展する。現在、HCV に対する主な治療法は、ウイルスの複製を阻害するペグインターフェロン・リバビリン(ヌクレオチドアナログ)の併用療法が用いられているが、遺伝子型 1b の高ウイルス量症例では奏効率が 50%にとどまっており、C型肝炎克服に向けて新たな作用点をもつ C型肝炎治療薬の創製が必要不可欠となっている。

現在、C型肝炎治療薬の作用点として、肝臓特異的マイクロ RNA である miR-122a に大きな注目を集めている。miR-122a は、HCV ゲノムの 5' 非翻訳領域に作用することにより、HCV ゲノムの高効率な複製および翻訳を誘導する。そこで我々は、肝細胞における miR-122a を高効率に抑制することを目的に、miR-122a に対するタフデコイ RNA 発現アデノウイルス(Ad)ベクター (Ad-TuD-122aT)を作製した。昨年度は、レポーター遺伝子アッセイの結果、Ad-TuD-122aT は高効率に miR-122a を阻害可能であることを明らかにした。そこで本年度は、Ad-TuD-122aT を HCV レプリコン発現細胞に作用させることにより、HCV レプリコンを高効率に抑制することに成功した。

また miR-122a に加えて、新たな C型肝炎治療薬の作用点として、HCV 感染受容体に注目されている。これまで HCV 感染受容体としては、CD81、Claudin-1、SR-BI、Occludin などが報告されているが、これまで HCV 感染受容体を *in vivo* において高効率に抑制可能な実験ツールが存在しなかったために、これら感染受容体の機能について十分に解析されていない。昨年度は、Short-hairpin RNA (shRNA)発現カセットとともに、Ago2 発現カセットを Ad ベクターに搭載することにより、高効率にノックダウン可能な Ad ベクターを開発した。本年度は、各種 HCV 感染受容体に対する shRNA 発現 Ad ベクターを作成して、そのノックダウン効率について検討した。

分担研究者

渡利 彰浩 大阪大学大学院薬学研究科
助教

協力研究者

水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科
教授

立花 雅史 大阪大学大学院薬学研究科
助教

岡本小百合 大阪大学大学院薬学研究科
実験補助員

古川 智久 独立行政法人医薬基盤研究所
特任研究員

樋口麻衣子 独立行政法人医薬基盤研究所
特任研究員

八木 清仁 大阪大学大学院薬学研究科
教授

近藤 昌夫 大阪大学大学院薬学研究科
准教授

坂本 直哉 東京医科歯科大学大学院
医歯総合研究科
准教授

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は、約 9.6kb のプラス鎖 RNA をゲノムに持つ RNA ウイルスである。現在、世界には約 2 億人、本邦では 200 万人もの HCV 感染患者がおり、世界では年間 200~300 万人ずつ感染者が増加している。インターフェロン療法の進展に伴い C型肝炎の根治率は向上しているものの、依然として難治性 1b 型高ウイルス量患者に対しては奏効率が 50%にすぎず、C型肝炎克服に向けた新たな作用点を有する抗 HCV 薬の創製が急務となっている。

近年、新たな C型肝炎治療薬として、肝臓特異的 miRNA である miR-122a が高い注目を集めている。HCV ゲノムは、5' 非翻訳領域に miR-122a と相補的な配列を有する領域があり、恐らくこの領域に miR-122a が結合することにより、HCV ゲノムの複製および翻訳の促進を誘導しているものと考えられて

いる。これまでに、HCV に感染したチンパンジーに対し、miR-122a に対するアンチセンスオリゴ (Locked Nucleic Acid; LNA)を投与することにより、血中 HCV ゲノム量を劇的に抑制されることが報告されている。しかし、アンチセンスオリゴをそのまま静脈内投与した場合、投与量のほとんどは腎臓に集積し、速やかな尿中排泄を受けてしまい、HCV の感染組織である肝臓に効率良くアンチセンスオリゴを送達可能な技術は未だ十分に確立していない。

一方で、Ad ベクターは従来より肝臓に高い親和性を有し、静脈内投与後投与量の 90%以上は肝臓に集積することが報告されている。従って、Ad ベクターを用いて高効率に miR-122a をノックダウン可能になれば、優れた抗 HCV 薬になるとともに、HCV 感染における miR-122a の機能解析に向けた優れた実験ツールになるものと期待される。Ad ベクターを用いて miRNA をノックダウンする手法としては、miRNA スポンジなどが報告されているが、近年、タフデコイ RNA (TuD-RNA) が開発された。TuD-RNA は、二つの miRNA binding domain (MBS)と二つの stem 構造から構成されている (Fig.1)。miRNA は MBS に強力に結合することにより、miRNA を阻害すると考えられる。これまでの報告より、TuD-RNA はアンチセンスオリゴである LNA や miRNA スポンジよりも強力に miRNA をノックダウンすることが報告されている。そこで本研究では、miR-122a に対する TuD-RNA (TuD-122aT)を発現する Ad ベクター (Ad-TuD-122aT)を開発し (Fig.2)、昨年度は miR-122a のノックダウン効果について検討した。本年度は、作製した Ad-TuD-122aT を HCV レプリコン発現細胞に作用させ、HCV レプリコン発現抑制効果について検討した。

また、抗 HCV 薬の新たな作用点として、HCV 感染受容体が報告されている。HCV 感染受容体としてはこれまでに、CD81、Occludin、Claudin-1、SR-BI が報告されている。しかしながら、これら HCV 感染受容体の中で、どの分子が HCV 感染に重要なのか不明な点は多い。特に in vivo において各受容体の HCV 感染における役割を解析した報告はほとんどない。これは特に in vivo において、高効率な RNA 干渉を誘導可

能な実験ツールが存在しないことが原因と考えられる。これら HCV 感染受容体の HCV 感染における役割が明らかになれば、HCV 感染受容体を作用点とする新規抗 HCV 薬の開発に向けて重要な指針を与えると同時に、高効率に HCV 感染受容体をノックダウン可能なベクターは、C 型肝炎治療薬としても有望であると考えられる。

そこで我々は Ad ベクターに着目した。上述のように、Ad ベクターは肝臓に対し高い親和性を有していることから、HCV 感染受容体に対する shRNA を肝臓特異的に効率良く発現させることに適していると考えられる。しかし、高効率なノックダウンには多量の Ad ベクターが必要であり、Ad ベクターによる障害が誘導される危険性がある。そこで昨年度は、E1 遺伝子欠損領域に、shRNA 発現カセットを、E3 欠損領域に Ago2 発現カセットを挿入した Ad ベクターを開発し、高いノックダウン効率を示すことを報告した。本年度は、各種 HCV 受容体に対する shRNA 発現カセットを搭載した Ad ベクターを作製し、HCV 受容体のノックダウン効率を検討した。

B. 研究方法

1. タフデコイ RNA 発現 Ad ベクター

タフデコイ RNA 発現 Ad ベクタープラスミドは、improved in vitro ligation method により作製した。作製した Ad ベクタープラスミドを PacI 処理したのち、293 細胞に導入し、従来法に従い、Ad ベクターを増幅・精製した。Ad ベクターの物理学的タイターについては Maizel らの方法に従い測定した。生物学的タイターについては、Adeno-X rapid titer kit (Invitrogen 社)を用いて測定した。

2. タフデコイ発現 Ad ベクターによる HCV レプリコンの抑制に関する検討

HCV レプリコン発現細胞 (Huh7.5.1-1bFeo) は、東京医科歯科大学・坂本直哉先生より供与いただいた。Huh7.5.1-1bFeo 細胞を 96 穴プレートに、 1×10^4 cells/well で播種した。24 時間後、タフデコイ発現 Ad ベクターを MOI (multiplicity of infection) 25, 50, 100

で 1.5 時間作用させた。ウイルス作用 48 時間後、LT.2.0 (東洋インキ) を加え、ルシフェラーゼ活性を測定した。

また HCV レプリコン RNA 量の定量に関しては、上記と同様に Ad ベクターを作用させたのち、Total RNA を回収した。Total RNA 2ug に対し、HCV ゲノム特異的なプライマー (RC21; 5'-ctc ccg ggg cac tcg caa gc-3') を用いて、逆転写反応を行った。得られた cDNA ならびにプライマー (RC21 および RC1; 5'-gtc tag cca tgg cgt tag ta-3')、SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio) を用いて、定量的 PCR を行った。また内因性コントロールとして、GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) の発現を従来法に従い定量した。

3. HCV 受容体に対する shRNA 発現 Ad ベクターの作製

過去に HCV 受容体として機能することが報告されている SR-BI、CD81、Claudin-1、Occludin に対する shRNA 発現カセットは、以下のように作製した。shRNA 配列をコードした合成オリゴヌクレオチド (Table 1) をアニーリングしたのち、pHM5-hU6 の ClaI および XbaI サイトにクローニングした。作製した shRNA 発現カセットを、既に E3 欠損領域に Ago2 発現カセットが挿入されている Ad ベクタープラスミド pAdHM23-Ago2 の E1 欠損領域に improved in vitro ligation 法により挿入した。作製した Ad ベクタープラスミドを PacI 処理したのち、293 細胞に導入し、従来法に従い、Ad ベクターを増幅・精製した (Fig.3)。Ad ベクターの物理学的タイターについては Maizel らの方法に従い測定した。生物学的タイターについては、Adeno-X rapid titer kit (Invitrogen 社) を用いて測定した。

4. 上記 Ad ベクターによる各種 HCV 受容体ノックダウンに関する検討

12well プレートに Huh7 細胞 (ヒト肝癌由来細胞株) を 1×10^5 cells/well で播種した。翌日、各種 shRNA 発現 Ad ベクターを 3000 vector particle (VP)/cell で 1.5

時間作用させた。Ad ベクター作用より 48 時間後、Total RNAを回収し、定量的RT-PCRにより各種HCV受容体の発現量を定量した。

C. 研究結果

1. タフデコイ RNA 発現 Ad ベクターによる miR-122a ノックダウンに関する検討

昨年度は、miR-122a に対するタフデコイ RNA 発現 Ad ベクターを開発し、miR-122a を高効率に抑制可能であることを示した。そこで本年は、本 Ad ベクターを HCV レプリコン発現細胞に作用させ、HCV レプリコン抑制効果を検討した。HCV レプリコン発現細胞としては、東京医科歯科大学・坂本直哉先生の作製された Huh7.5.1-1bFeo 細胞を使用した。この HCV レプリコン発現細胞は、HCV の 1b 型 (HCV-N) をベースとして作製されており、HCV ゲノムのうち構造遺伝子領域が ルシフェラーゼ遺伝子で置換されているため、ルシフェラーゼの活性を測定することで HCV レプリコンのレベルを評価することが可能である。miR-122a に対するタフデコイ RNA 発現 Ad ベクター (Ad-TuD-122aT) 作用群では、Ad-TuD-122aT のタイター依存的にルシフェラーゼの値が減少し、MOI100 においてはコントロールのタフデコイ RNA 発現 Ad ベクター (Ad-TuD-NC) 作用群の 29% まで抑制された。一方で、Ad-TuD-NC 作用群では有意なルシフェラーゼ発現の抑制は観察されなかった (Fig.4)。なお、Ad ベクターを作用させることによる有意な細胞毒性は観察されなかった。

次に、実際に HCV レプリコンのコピー数が miR-122a を阻害することにより抑制されているか検討した。Strand-specific RT-PCR により HCV レプリコンのコピー数を定量したところ、Ad-TuD-122aT 作用群では有意なコピー数の低下が観察された。MOI100 で Ad-TuD-122aT を作用させた場合では、Ad-TuD-NC 作用群と比較して 45% まで減少していた。

以上の結果より、miR-122a に対するタフデコイ RNA 発現 Ad ベクターは、HCV の感染・増殖を効率よく抑制可能であることが示唆された。

2. 各種 RNA 干渉関連タンパク質および shRNA 発現 Ad ベクターによる高効率な RNA 干渉誘導に関する検討

siRNA および shRNA は、効率良く標的遺伝子の発現を抑制可能であることから、次世代の分子標的薬として期待されるとともに、現在では遺伝子機能解析のツールとしてなくてはならない存在となっている。昨年度は、少ない Ad ベクター作用量で、より高効率に HCV 受容体の発現をノックダウンすることを目的として、shRNA と同時に Ago2 を過剰発現可能な Ad ベクターを開発し、従来の shRNA 発現 Ad ベクターと比較して高効率にノックダウン可能であることを報告した。そこで今年度は、各種 HCV 受容体に対する shRNA 発現カセットを Ago2 発現 Ad ベクターに搭載することにより、高効率に HCV 受容体をノックダウン可能か検討した。Huh-7 細胞に、各種 shRNA 発現 Ad ベクターを作用させ、Real-time RT-PCR により HCV 受容体 mRNA 量を測定したところ、CD81 に関しては約 50% のノックダウンが観察されたものの、SR-BI、Occludin、Claudin-1 については明らかなノックダウンは観察されなかった (Fig.5)。これについては、現在 Ago2 の発現等をチェックしている。

D. 考察

1. miR-122a に対するタフデコイ RNA 発現 Ad ベクターによる HCV レプリコン抑制に関する検討

miR-122a は肝臓特異的な miRNA で、HCV の複製および翻訳を促進することで、HCV 感染に大きな役割を果たしていることが報告されている。これまでに miR-122a に対するアンチセンスオリゴ (LNA) を投与することにより、血中の HCV ゲノム量が大きく減少することが示されている。しかし、LNA 自体は肝臓に対し親和性を有しないことから、投与した LNA の大部分は肝臓に移行せず、尿中排泄を受けているものと予想される。従って、効率良く肝臓の miR-122a をノックダウンするためには、肝臓に対し miR-122a を抑制可能な薬物を送達・発現させる必要がある。一方で近年、miRNA を効率よく阻害可能な核酸医薬として、

TuD-RNA が開発された。そこで著者らは昨年度、miR-122a に対する TuD-RNA を発現可能な Ad ベクターを開発し、高効率に miR-122a を阻害可能であることを報告した。本年度は、本 Ad ベクターを HCV レプリコン発現細胞に作用させ、HCV レプリコンを抑制可能か検討した。

上述のように、miR-122a の HCV 増殖促進メカニズムとしては、以下の 2 つが報告されている。miR-122a が HCV ゲノムの 5'-UTR および 3'-UTR に存在する部分的相補配列に結合することにより、①HCV ゲノムの安定性が向上する、②HCV ゲノムの翻訳効率が向上する。現在のところ、これに関しては結論が出ていないが、恐らく両方のメカニズムにより HCV の感染・増殖が促進されているものと考えられる。しかし、miR-122a は生体での Cholesterol を含む脂質代謝にも関与することが知られており、miR-122a のアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与した個体では、血中の Cholesterol および Triglyceride 濃度の減少が観察されている。一方で、細胞内の脂質の貯蔵庫である Lipid-droplet は、HCV の感染増殖に極めて重要な働きをしており、HCV の構造タンパク質が非構造タンパク質を Lipid-droplet に recruit し、複製複合体を形成することが知られている。従って、miR-122a は HCV ゲノムの安定化および翻訳の向上だけでなく、細胞内の脂質代謝を制御することにより、HCV の感染増殖を促進している可能性も考えられる。

本研究では、Ad-TuD-122aT 作用群において、ルシフェラーゼ発現量に関しては Ad ベクターのタイター依存的な発現低下が認められたのに対し、HCV レプリコンのコピー数の検討においてはタイター依存的な低下が観察されなかった。この原因については不明であるが、上述のように miR-122a は HCV ゲノムの安定性と翻訳効率の向上の両者に関与している可能性が高いが、HCV ゲノムより発現する RNA polymerase によって HCV ゲノムの複製が起こっていることを考慮すると、HCV ゲノムコピー数の方が miR-122a 阻害の影響を受けやすいのかもしれない。

また HCV ゲノムコピー数の検討においては、有意差はないものの、Ad-TuD-NC 作用群においても抑制

される傾向が強くみられた。これは、Ad ベクターより発現される小分子 RNA である VA-RNA の影響が考察された。VA-RNA は非増殖型 Ad ベクターからも大量に発現し、Ago2 とともに RNA-induced silencing complex (RISC) を形成することが報告されている。従って、Ad ベクターを作用させることにより、VA-RNA が発現し、Ago2 が VA-RNA と RISC を形成することで miR-122a の生成が阻害され、HCV ゲノムコピー数の低下につながった可能性が考えられた。

2. shRNA 発現 Ad ベクターによる高効率な HCV 受容体ノックダウンに関する検討

これまでに HCV の感染受容体としては、CD81, Claudin-1, Occludin, SR-BI などが報告されている。これまでに、上記受容体を標的とした HCV 感染阻害薬は報告されておらず、上記受容体は抗 HCV 薬の作用点として期待されている。そこで我々は、RNA 干渉を用いて上記受容体をノックダウンすることにより、HCV 感染を抑制可能なのではないかと考えた。しかし、恐らく HCV は上記受容体全てを利用して肝細胞に感染しているものと思われる(つまり、複数の感染ルートを介している)。従って、感染受容体をノックダウンして HCV 感染を誘導するには、極めて高効率に肝臓においてノックダウンを誘導しなければならない。上述のように Ad ベクターは肝臓に極めて高い親和性を有すること、またこれまでに shRNA 発現カセットを搭載することにより、RNA 干渉を誘導可能であることが報告されている。しかしながら一方で、Ad ベクターゲノムより転写される非コード RNA である VA-RNA が、Ago2 と結合し RISC を形成することから、shRNA と VA-RNA が競合する可能性が指摘されている。また、上記の感染受容体を全て同時にノックダウンしようとした場合、4 種の shRNA を発現させることにより、細胞内の Ago2 もしくは Exportin-5 が不足し、十分なノックダウン効果が得られない可能性がある。そこで昨年度、本研究において shRNA とともに Ago2 を過剰発現させることで高効率にノックダウン可能な新規 Ad ベクターの開発に成功した。今年度は、本 Ad ベクターに HCV 受容体に対する shRNA 発現カセットを搭載

することにより、HCV 受容体の高効率ノックダウンを試みた。しかし本 Ad ベクターを Huh-7 細胞に作用させたところ、CD81 以外では明らかなノックダウンは観察されなかった。この原因としては、shRNA の配列がよくないのかもしれない。今回使用した shRNA の配列は、既に高効率なノックダウンが報告されている siRNA の配列を参考に作製したが、siRNA と shRNA とでは最適な配列が異なることが知られており、shRNA の配列を最適化する必要があるかもしれない。今後は、shRNA の配列を検討するとともに、Ago2 が過剰発現しているか確認する予定である。

E. 結論

1. Ad ベクターを用いて miR-122a に対する TuD-RNA を発現させることにより、miR-122a を高効率に抑制可能であることが示された。
2. 各種 HCV 受容体に対する shRNA 発現 Ad ベクターを作用させたところ、CD81 の発現を抑制することに成功した。

来年度は、より高効率に HCV 受容体をノックダウンすることを目的に、検討を進める予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Sakurai F, Furukawa N, Higuchi M, Okamoto S, Ono K, Yoshida T, Kondoh M, Yagi K, Sakamoto N, Katayama K, Mizuguchi H. Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a. *Virus Res.* 165: 214-8. (2012)
2. 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.* 416: 119-24. (2011)

G-2 学会発表

1. 櫻井文教、古川智久、樋口麻衣子、岡本小百合、小野かおり、形山和史、立花雅史、近藤昌夫、八木清仁、坂本直哉、水口裕之. Tough Decoy RNA 発現アデノウイルスベクターによる miR-122a 阻害と C 型肝炎ウイルス増殖阻害に関する検討. 遺伝子デリバリー研究会 2011. 2011 年 9 月 1-2 日. 大阪.
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. 2012 年 3 月 28-31 日. 札幌.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

該当なし

H-2 実用新案登録

該当なし

H-3 その他

該当なし

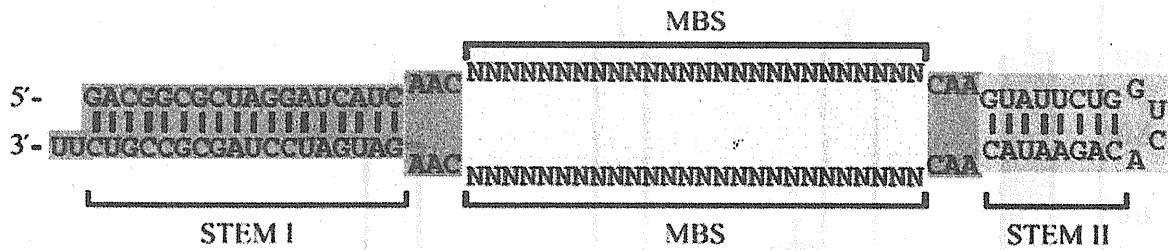


Fig.1 Representative Structure of the TuD-RNA.

MBS; miRNA-binding site.

(Cited from Haraguchi T., et al., Nucleic Acid Res., 37; e43 (2009))

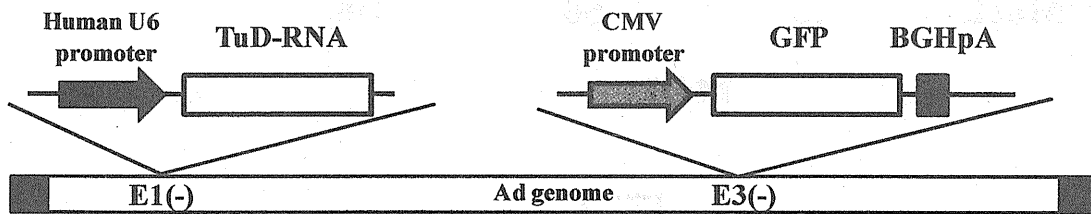


Fig.2 Ad vector genome containing the TuD-RNA expression cassette.

GFP; Green Fluorescence Protein, BGHpA; Bovine Growth Hormone poly A signal.

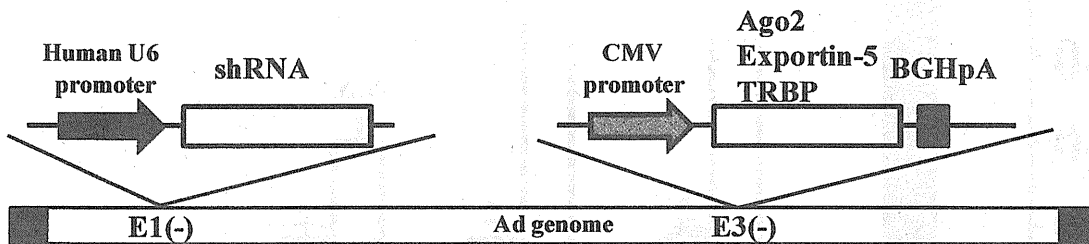


Fig.3 Ad vector genome containing shRNA- and RNAi-related protein Expression cassettes.

Ago; Argonaute.

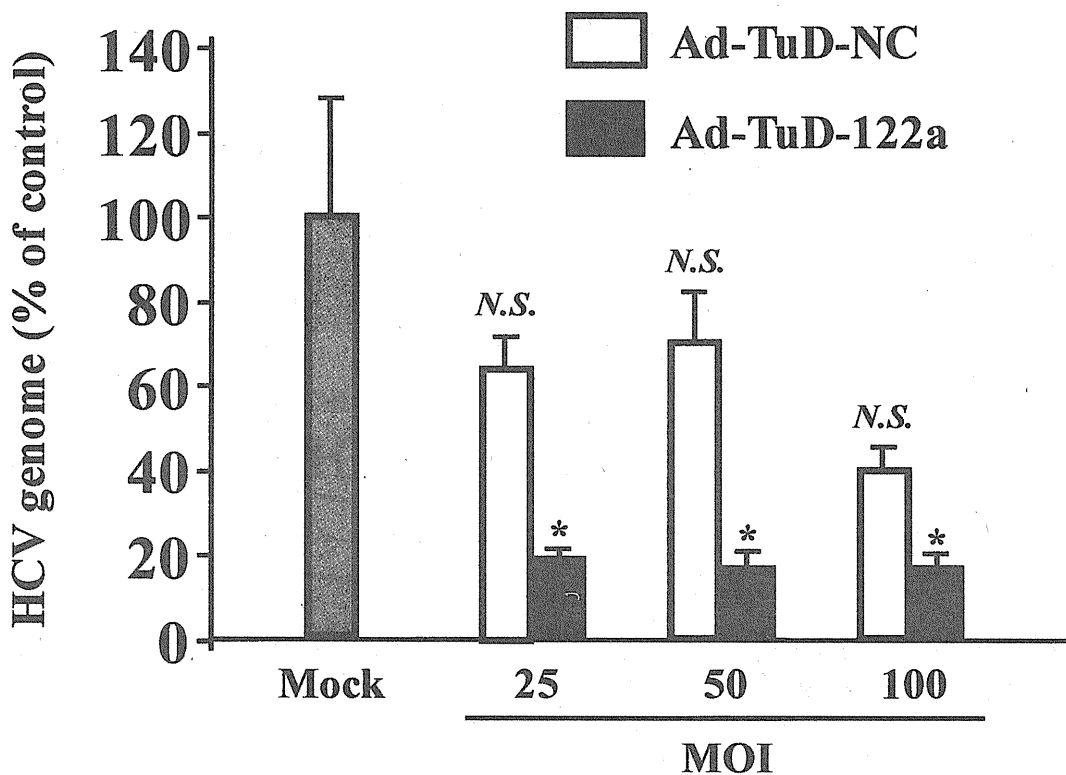
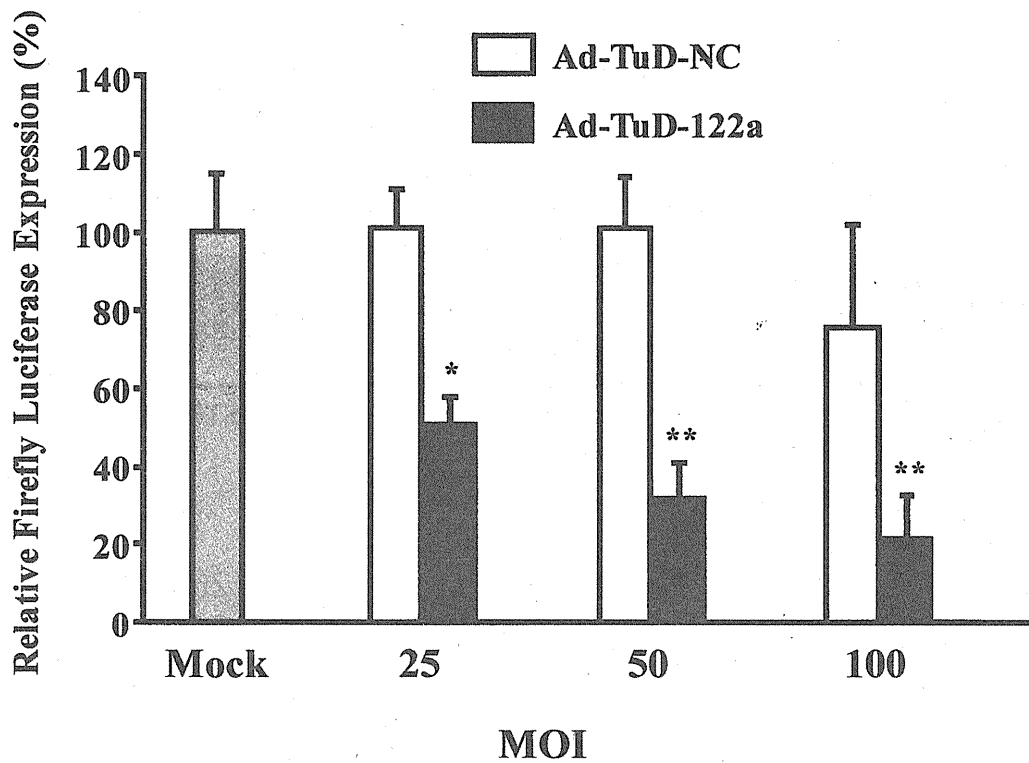
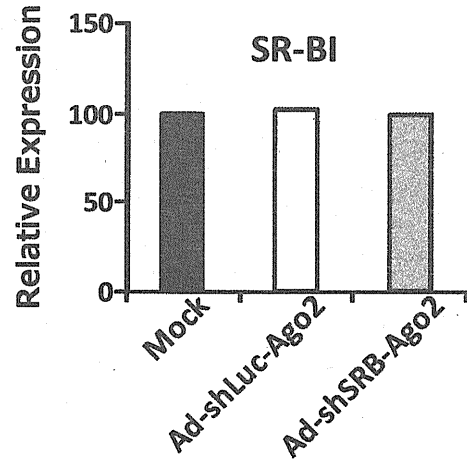
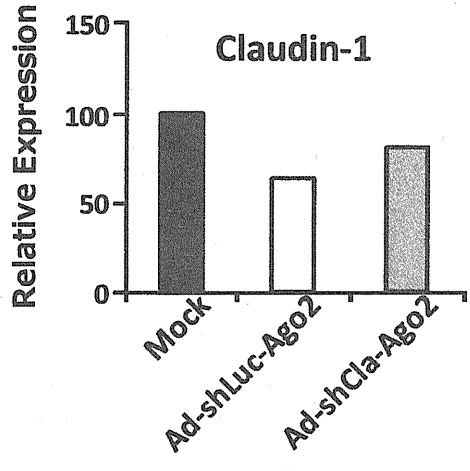
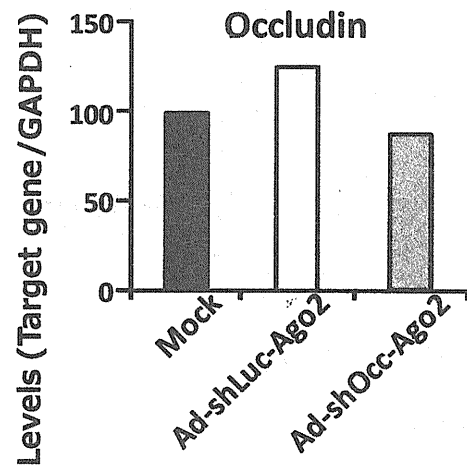
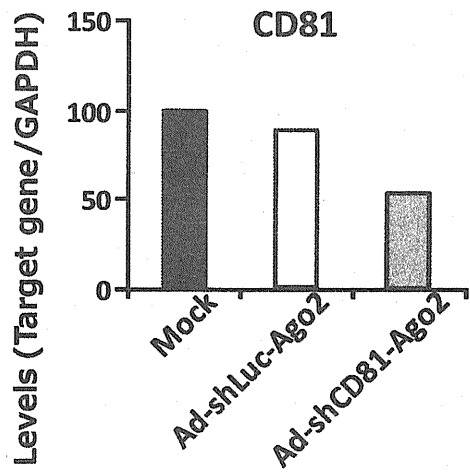


Figure 4. Suppression of the HCV replicon by Ad vector-mediated TuD-122a expression. (Upper Graph) Firefly luciferase expression levels and (Lower Graph) HCV replicon RNA levels in Huh-7.5.1 1bFeo cells following transduction with the Ad vectors. All the data are shown as the means \pm S.D. (n=3). N.S.: not significant. * P<0.05, ** P<0.005 between mock-transduced cells and cells transduced with Ad-TuD-122a.



アデノウイルスベクターを利用した

C 型肝炎治療薬創生基盤技術の開発

分担研究者 渡利彰浩 大阪大学大学院薬学研究科 助教

研究要旨

現在、世界には約 2 億人、本邦では 200 万人もの C 型肝炎ウイルス(HCV)感染患者がおり、世界では年間 200~300 万人ずつ感染者が増加している。インターフェロン(IFN)療法の進展に伴い C 型肝炎の根治率は向上しているものの、依然として難治性 1b 型高ウイルス量患者に対しては奏効率が 50%にすぎず、C 型肝炎克服に向けた新たな作用点を有する抗 HCV 薬の創製が急務となっている。しかしながら、新薬開発のための基盤である HCV 感染評価系の開発は立ち遅れているのが現状である。実際、HCV 長鎖 RNA ゲノム(9.6 kb)を肝臓に効率よく導入する方法が確立されていないため、依然として HCV 感染評価系には患者血清が使用されていることから、簡便な HCV 感染評価系の開発が C 型肝炎治療薬創製における重要課題となっている。

そこで、昨年度は RNA polymerase I 発現系および Ad ベクターを用いることで遺伝子導入効率に優れた HCV ゲノム導入法の開発を試み、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製に成功した。本年度は、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた HCV 複製解析系が、HCV 複製阻害薬の開発や HCV 複製機構の解明に応用可能な解析系であるかを検証した。

抗 HCV 薬である IFN をモデル薬物として、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いて HCV 複製阻害薬の評価系としての有用性を評価した。その結果、IFN 濃度依存的な抗 HCV 活性が認められ、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた HCV 複製阻害剤の解析が可能であることが示された。また、ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いて、細胞の HCV 複製能の差異を評価した。その結果、ヒト iPS 細胞由来肝細胞では Huh7 細胞と同程度に HCV ゲノムが複製されるが、ヒト iPS 細胞では HCV ゲノム複製活性が非常に低いことが示唆された。さらに、ヒト iPS 細胞由来肝細胞に本ベクターを用いることで抗 HCV 薬の効果を評価可能であることが明らかとなった。以上、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターは、簡便に様々な細胞に HCV ゲノムを導入可能であり、HCV 複製阻害剤の効果や細胞の HCV 複製能を評価可能であり、汎用性に優れた HCV 複製解析系であることが示された。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)は日本で 200 万人、世界中では 2 億人もの感染者が存在すると推定されている。HCV の慢性持続感染は 10~30 年かけて慢性肝炎、肝硬変を引き起こし、さらに 5~10 年で肝細胞癌に至る。本邦における肝細胞癌患者の約 8 割は HCV 感染者であり、C 型肝炎は最も深刻な肝疾患である。これまで、C 型肝炎に対する治療法は複製阻害薬で

あるインターフェロン(IFN)およびリバビリンの併用療法が用いられてきたが、奏効率は 50%に過ぎなかった。2011 年、新たにプロテアーゼ阻害剤が認可され、ポリメラーゼ阻害剤についても臨床試験が行われている。しかしながら、これらはいずれもウイルス側の因子を標的としており、薬剤耐性ウイルスの出現が報告されている。そのため、薬剤耐性ウイルスが出現しにくい HCV 複製に関わる宿主因子を標的とした新規

治療法の開発が期待されている。

HCV は約 9.6 kb の一本鎖プラス鎖 RNA をゲノムにもつ RNA ウィルスでフラビウイルス科に分類される。HCV 感染機構は肝細胞内への侵入および複製ステップに大別され、それぞれの感染段階に関与する宿主因子の同定が耐性ウィルスの出現を回避する新たな治療戦略として注目されている。昨今の HCV 侵入機構解析により、HCV 感染受容体として CD81、scavenger receptor class B type I (SR-BI)、claudin-1、occludin が同定され抗 claudin-1 抗体などが HCV 感染阻害薬シーズとして注目されている。一方、HCV 複製機構については、HCV 複製解析系開発の遅延により、cyclophilin や miR-122 などしか明らかとなっていない。

HCV が感染可能な宿主はヒトとチンパンジーに限られる。そのため、*in vivo* HCV 複製解析系にはチンパンジーまたは免疫不全マウスにヒト肝細胞を移植したヒト肝臓キメラマウスが用いられている。*In vitro* ではヒト初代培養細胞やヒト肝臓由来培養細胞株 (Huh7 細胞) が用いられている。また、ヒト induced pluripotent stem cell (iPS) 細胞から肝細胞への分化誘導技術の進展に伴い、様々な患者から樹立されたヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いることで HCV 複製能の違いや抗 HCV 薬に対する効果の違いを解析可能であり、新たな HCV 複製解析系として注目されている。しかしながら、HCV ゲノム導入法の問題から利用には至っていない。HCV ゲノム導入法としては HCV 粒子を感染させる手法と HCV RNA をエレクトロポレーション法により導入させる手法がある。HCV 粒子は培養細胞で産生した HCV あるいは患者血清が用いられている。培養細胞で産生可能な HCV 株は、日本では感染の少ない遺伝子型 2a に属し劇症肝炎という C 型肝炎では特殊な病態を示す JFH-1 株のみである。患者血清は入手が困難であり、遺伝子工学的な解析が不可能であるなどの問題点がある。HCV RNA のエレクトロポレーション導入法は、これらの問題点を解決可能であるが、細胞障害性や導入効率の問題から *in vivo* や初代培養細胞などへは適用できない。以上のことから、汎用性に優れ、導入効率の高い HCV ゲ

ノム導入法の確立が新たな HCV 複製阻害薬開発の課題であると考えられる。

そこで昨年度は、*in vitro*、*in vivo* 遺伝子導入ベクターとして汎用されている Ad ベクターに長鎖 RNA 発現 RNA polymerase I 発現系を搭載することで、利便性の高い HCV ゲノム導入基盤技術を構築した。本年度は、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた HCV 複製解析系が、HCV 複製阻害薬の開発や HCV 複製機構の解明に応用可能な解析系であるかを検証した。

B. 研究方法

B.1 細胞培養

Huh7 細胞、293T 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS) 含有 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) を用いて 37 °C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で培養した。なお、本研究において使用した FBS は全て 56 °C、30 分間の非働化処理を行った後、使用した。ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞は以下の方法にて培養および分化誘導を行った。

ヒト胎児肺線維芽細胞株 MRC5 細胞から樹立された iPS 細胞 (Dotcom, JCRB Number: JCRB1327) はマイトマイシン C 処理マウス線維芽細胞上で 10 ng/ml fibroblast growth factor 2 (FGF2) 添加 iPSellon 培養液 (Cardio 社) を用いて 37 °C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で培養した。分化誘導前日、ヒト iPS 細胞の培養液を hESF9 培養液 [10 μg/ml human recombinant insulin, 5 μg/ml human apotransferrin, 10 μM 2-mercaptoethanol, 10 μM ethanolamine, 10 μM sodium selenite, oleic acid conjugated with fatty-acid-free bovine albumin (BSA), 10 ng/ml FGF2, 100 ng/ml heparin を添加した hESF-GRO 培養液 (Cell Science & Technology Institute 社)] に交換し培養した。シングル細胞にしたヒト iPS 細胞をマトリゲル (BD 社) 上に播種し、10 μg/ml human recombinant insulin, 5 μg/ml human apotransferrin, 10 μM 2-mercaptoethanol, 10 μM ethanolamine, 10 μM sodium selenite, 0.5 mg/ml BSA, 100 ng/ml Activin A を添加した hESF-DIF 培養液 (Cell Science

& Technology Institute 社)で3日間培養した。培養3日後、細胞にAd-SOX17を3,000 VP/cellで1.5時間感染させ、10 μ g/ml human recombinant insulin、5 μ g/ml human apotransferrin、10 μ M 2-mercaptoethanol、10 μ M ethanolamine、10 μ M sodium selenite、0.5 mg/ml BSA、20 ng/ml bone morphogenetic protein 4(BMP4)、20 ng/ml FGF4 添加 hESF-DIF 培養液を用いてマトリゲル上で3日間培養した。3日間培養後、細胞に Ad-HNF4 α を3,000 VP/cellで1.5時間感染させ、8.3% tryptose phosphate broth、8.3% FBS、10 μ M hydrocortisone 21-hemisuccinate、1 μ M insulin、25 mM NaHCO₃、20 ng/ml hepatocyte growth factor、20 ng/ml Oncostatin M、10⁻⁶ M Dexamethasone 添加 L15 培養液(Invitrogen 社)を用いてマトリゲル上で11日間培養し、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を分化誘導させた。

B.2 Ad ベクターの作製

Ad-tTA、AdP₂₃₅-HCV、AdP₂₃₅- Δ GDD は以下の方法で精製した。

組換え Ad ベクタープラスミドを PacI で処理した後、SuperFect(QIAGEN 社)を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。10~14 日間培養した後に CPE (cytopathic effect)を起した 293 細胞を 1,200 rpm、5 分間遠心して回収し、少量の培養液に懸濁した。3 回凍結融解を繰り返すことにより溶液中に遊離した Ad ウイルスを 2,000 rpm、10 分間遠心して cell debris を除去した後に、新たな 293 細胞に感染させた。CPE が観察されると同様の操作を繰り返し、徐々に感染させる 293 細胞を増やすことで高タイトーの CVL (crude virus lysate)を得た。

回収した CVL は CsCl 密度勾配遠心法により精製した。CVL を 5 回凍結融解を繰り返すことにより Ad を溶液中に遊離させ、DNase および RNase 処理を1時間行った。比重 1.25~1.40 の CsCl 密度勾配上に重層し、35,000 rpm、18 $^{\circ}$ C、1 時間遠心した。遠心チューブ内にできた下方のバンドを回収し、さらに比重 1.35 の CsCl 上に重層し、35,000 rpm、18 $^{\circ}$ C で 16 時間遠心した。遠心チューブ内にできた下方のバンドを回収し、

以下のバッファー [10mM Tris-HCl(pH7.4), 1 mM MgCl₂, 10% glycerol]を用いて 4 $^{\circ}$ C で透析を行った。精製した Ad ベクターの生物学的タイトーは Adeno-X rapid titer kit (Clontech)を用いて測定した。Ad の物理学的タイトーは Ad を TE 0.1% SDS 溶液で可溶化し 14,000 rpm、10 分間遠心を行った上清の 260 nm の波長の吸光度を測定し、以下の式を用いて算出した。精製した Ad は -80 $^{\circ}$ C にて保存した。

$$\text{Titer (VP/ml)} = [\text{OD}_{260} - \text{OD}_{260}(\text{blank})] \times 1.1 \times 10^{12}$$

B.3 HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた抗 HCV 薬評価

Huh7 細胞を 24-well plate に播種し培養した。培養 24 時間後、培養液を除き AdPI235-HCV または AdPI235- Δ GDD (3 MOI)を Ad-tTA (15 MOI)と共感染させた。感染 24 時間後、Dox (最終濃度 10 μ g/ml) および各濃度の IFN を含む培養液を添加した。感染 72 時間後、ルシフェラーゼ活性および細胞生存率を測定した。ルシフェラーゼ活性は Renilla Luciferase Assay System を用いて、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。

B.4 ヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV 感染受容体の発現確認

ヒト iPS 細胞、ヒト iPS 細胞由来肝細胞および Huh7 細胞はトリプシン処理により回収し PBS に懸濁した。細胞懸濁液は High Pure RNA Isolation Kit を用いて RNA を精製した。精製 RNA は SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen 社)を用いて逆転写反応を行うことにより cDNA を作製した。RNA 溶液 (0.1 mg/ml) 2 μ l、5 \times VILO Reaction Mix 4 μ l、10 \times SuperScript Enzyme Mix 2 μ l、滅菌精製水 12 μ l を混合し 25 $^{\circ}$ C、10 min 処理し、42 $^{\circ}$ C、60 min 反応させた後に、85 $^{\circ}$ C、5 min 加熱した。cDNA は PCR 法により CD81、SR-BI、claudin-1、occludin および GAPDH を増幅し、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い検出した。cDNA 溶液 1 μ l、10 \times Ex Taq buffer 2 μ l、25 mM MgCl₂ 1.2 μ l、2.5 mM dNTP mix 1 μ l、10 μ M

primers 1 ·l、滅菌精製水 12.7 ·l、5 U/·l TaKaRa Ex Taq 0.1 ·lを混合し PCR を行った。各 primer の配列は CD81 Forward primer: 5' - CGCCAAGGATGTGAAGCAGTTC -3'、CD81 Reverse primer: 5' - TCCCGGAGAAGAGGTCATCGA T -3'、SR-BI Forward primer: 5' - ATTCCGATCAGT GCAACATGA -3'、SR-BI Reverse primer: 5' - CAG TTTTGCTTCCTGCAGCACAG -3'、claudin-1 Forward primer: 5' - TCAGCACTGCCCTGCCCCAGT -3'、claudin-1 Reverse primer: 5' - TGGTGTTGGGT AAGAGGTTGT -3'、occludin Forward primer: 5' - TCAGGGAATATCCACCTATCACTTCAG -3'、occludin Reverse primer: 5' - CATCAGCAGCAGCCA TGACTCTTCAC -3'、GAPDH Forward primer: 5' - TCTTACCACCATGGAGAAG -3'、GAPDH Reverse primer: 5' - ACCACCTGGTGCTCAGTGTA -3'とした。PCR の条件は、CD81: 94 °C 2 min の後、94 °C 45 sec、60 °C 60 sec、72 °C 90 sec を 27 サイクル、SR-BI: 94 °C 2 min の後、94 °C 45 sec、55 °C 60 sec、72 °C 90 sec を 27 サイクル、claudin-1: 94 °C 2 min の後、94 °C 45 sec、55 °C 60 sec、72 °C 90 sec を 27 サイクル、occludin: 94 °C 2 min の後、94 °C 45 sec、55 °C 60 sec、72 °C 90 sec を 27 サイクル、GAPDH: 94 °C 2 min の後、94 °C 45 sec、55 °C 60 sec、72 °C 90 sec を 20 サイクルにて行った。予想される PCR 産物のサイズは、CD81: 245 bp、SR-BI: 788 bp、claudin-1: 521 bp、occludin: 189 bp、GAPDH: 544 bp である。

B. 5 HCVpv の作製

HCV 侵入解析のために用いた VSVpv は以下の方法で増幅した。

293T 細胞を 100 mm dish に播種し 24 時間培養した後に、TransIT-LT1 (Mirus 社) を用いて VSV G タンパク質発現プラスミド pCAGVSVG をトランスフェクションした。プラスミド導入 24 時間後、エンベロープ G タンパク質をルシフェラーゼ遺伝子に置き換えた VSVpv (大阪大学微生物病研究所、松浦博士より御供与頂いた) を感染させた。感染 24-36 時間後、培養液を回

収し、2,000 rpm、5 min 遠心した後の上清を VSVpv として使用した。VSVpv は -80 °C にて保存した。

HCV 侵入解析のために用いた HCVpv は以下の方法で作製した。

293T 細胞を 100 mm dish に播種し 24 時間培養した後に、TransIT-LT1 (Mirus 社) を用いて HCV E1、E2 発現プラスミド pCAG-Con1 をトランスフェクションした。プラスミド導入 24 時間後、VSVpv を 2 時間感染させ、細胞を DMEM 8 ml で 5 回洗浄した後に DMEM 10 ml を添加し培養した。VSVpv 感染 24 時間後、培養液を回収し、2,000 rpm、5 min 遠心した後の上清を HCVpv として使用した。HCVpv は -80 °C にて保存した。

B. 6 ヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV 侵入解析

48-well plate にて分化誘導した iPS 細胞由来肝細胞および 48-well plate に播種した iPS 細胞および Huh7 細胞を用意した。培養 24 時間後、培養液を除き HCVpv を添加し 2 時間感染させた。感染 2 時間後、新しい培養液に交換し、24 時間培養した。その後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

B. 7 ヒト iPS 細胞由来肝細胞における感染受容体依存的な HCV 侵入解析

48-well plate にて分化誘導した iPS 細胞由来肝細胞および 48-well plate に播種した iPS 細胞および Huh7 細胞を用意した。培養 24 時間後、あらかじめ抗 CD81 抗体 (JS-81; BD Biosciences 社) またはコントロールマウス IgG と 2 時間インキュベートした HCVpv または VSVpv を細胞に添加し 2 時間感染させた。感染 2 時間後、新しい培養液に交換し、24 時間培養した。その後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

B. 8 HCV サブゲノム発現 Ad ベクター由来 HCV サブゲノムの複製能の検証

48-well plate にて分化誘導した iPS 細胞由来肝細胞および 48-well plate に播種した iPS 細胞および Huh7 細胞を用意した。培養 24 時間後、培養液を除き AdP₂₃₅-HCV または AdP₂₃₅-GDD (3 MOI) を

Ad-tTA(15 MOI)と共感染させた。感染 24 時間後、最終濃度 10⁻⁶g/ml Dox 含有培養液を添加した。感染 72 時間後、Renilla Luciferase Assay System を用いてルシフェラーゼ活性を測定し、real-time PCR 法によりプラス鎖およびマイナス鎖 HCV RNA を測定した。

Real-time PCR 法によるプラス鎖およびマイナス鎖 HCV RNA の検出は以下の方法で行った。感染 72 時間後、細胞をトリプシン処理により回収しリン酸緩衝溶液に懸濁した。細胞懸濁液は High Pure RNA Isolation Kit を用いて RNA を精製した。精製 RNA はプラス鎖 HCV RNA 特異的 primer(RC21 primer)、マイナス鎖 HCV RNA 特異的 primer(tag-RC1 primer) または random primer(GAPDH 定量のため)を用いて ThermoScript reverse transcriptase kit(Invitrogen 社)により逆転写反応を行うことにより cDNA を作製した。各 primer の配列は RC21 primer: 5'-CTCCCGGGGCACTCGCAAGC -3'、tag-RC1 primer; 5'-ggccgtcatggtggcgaataaGTCTAGCCATGGCGTTAGTA -3' とした。cDNA は SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa 社)および Applied Biosystems StepOne Plus(Applied Biosystems 社)を用いて HCV プラス鎖 RNA、マイナス鎖 RNA および GAPDH を増幅し、定量した。各 primer の配列は、プラス鎖 HCV RNA(RC1 primer; 5'-GTCTAGCCATGGCGTTAGTA -3' および RC21 primer)、マイナス鎖 HCV RNA(tag primer; 5'-ggccgtcatggtggcgaataa -3' および RC21)、GAPDH (5'-ggtggtctcctctgacttcaaca -3' および 5'-gtggtcgttgagggcaatg -3') とした。Real-time PCR の条件は、95 °C 2 min の後、95 °C 2 sec, 60 °C 5 sec、72 °C 15 sec を 45 サイクルにて行った。相対的なプラス鎖 HCV RNA 量およびマイナス鎖 HCV RNA 量はそれぞれの GAPDH mRNA 量で補正することにより算出した。

B. 9 HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた抗 HCV 薬評価

48-well plate にて分化誘導した iPS 細胞由来肝細胞および 48-well plate に播種した Huh7 細胞を用いて、B. 3 の方法に準じて実験を行った。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考察

D. 1 HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた抗 HCV 薬評価

昨年度に開発した HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた HCV 複製評価系において、抗 HCV 薬のスクリーニングが可能であるかを既存の抗 HCV 薬である IFN を用いて検証した。HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを Huh7 細胞に導入し、24 時間後まで RNA polymerase I 依存的な転写を誘導した。導入 24 時間後、細胞培養液に IFN を添加し培養した。遺伝子導入 72 時間後、ルシフェラーゼアッセイおよび WST 法によりルシフェラーゼ活性および細胞障害性を測定した。その結果、IFN の濃度依存的なルシフェラーゼ活性の低下が認められ、顕著な細胞障害性は確認されなかった (Figure 1A and 1B)。一方、CMV プロモーター依存的にルシフェラーゼを発現する Ad ベクターを用いて同様の実験を行ったが、ルシフェラーゼ活性の低下は見られなかったことから、今回処理した IFN 濃度では Ad に対する抗ウイルス活性は認められないと考えられる (data not shown)。以上より、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた HCV 複製評価系において抗 HCV 薬のスクリーニングが可能であることが示唆された。

Tanabe らは本研究で用いたサブゲノム HCV と同一の HCV 株を用いて IFN- α 2b の抗 HCV 活性を評価した。その結果 0.01 U/ml の濃度から抗 HCV 活性が観察され、10 U/ml の濃度では IFN を処理していない群に比べて HCV 複製が数%にまで阻害されている。本研究で用いた IFN- α 8 は 0.0125 - 12.5 U/ml の濃度で細胞を処理しており、0.125 U/ml の濃度でルシフェラーゼ活性は約 60%まで抑制されている。他の報告と比較し、IFN- α 8 の抗 HCV 活性がやや弱く認められているが、この原因として、(1) RNA polymerase I 発現系からのサブゲノム HCV RNA の転写を抑制しきれていない可能性、(2) Ad によって IFN シグナルが阻害さ

れている可能性が考えられる。本実験では、RNA polymerase I-tet system により IFN 添加と同時に RNA polymerase I 発現系を抑制しているが、その条件下でもわずかに RNA polymerase I 発現系から HCV RNA が転写されている。このことが原因で、IFN- α の抗 HCV 活性がやや弱く見られてしまったのではないかと考えられる。また、Ad 感染細胞では Ad から転写される 159 塩基からなる VA-RNA₁ および Ad タンパク質 E1A によって IFN シグナルが阻害されることが報告されている。ISGs の一つである PKR は eIF2 \cdot のリン酸化を阻害することで HCV RNA からタンパク質が翻訳されるのを阻害している。VA-RNA₁ は PKR と結合することで、その機能を阻害している。また、Ad E1A タンパク質は、300 以上もの ISGs の発現に関与する ISGF3 の発現を抑制することで IFN の抗ウイルス活性を抑制する。本研究で用いた Ad ベクターは E1 遺伝子を欠損しているため、E1A タンパク質による IFN 効果の減弱は引き起こされないが、VA-RNA₁ による IFN 効果の減弱は引き起こされている可能性が考えられる。これらのことから、Ad ベクターの容量および IFN 添加時間を最適化し、Ad による IFN 阻害の影響を最小にすることで、IFN の抗 HCV 作用を適切に評価可能であると考えられる。

D. 2 HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いたヒト iPS 細胞由来肝細胞での複製・抗 HCV 薬評価解析

新たな HCV 治療法の開発には耐性ウイルスの出現しにくい宿主側を標的にした治療薬の開発が望まれている。ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、HCV 感受性や治療効果などが異なる患者の細胞から作製可能であり、HCV の侵入、複製、治療に関与する因子を解析可能であると考えられる。また、HCV は組織特異性が高く肝臓以外の組織での感染は限られており、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導の各段階の細胞を解析することで、HCV 感染に関与する組織特異的な宿主因子を解析することが可能であると考えられる。しかし、従来のエレクトロポレーション法による HCV ゲノム導入法では、大量の細胞を必要とすること、高い細胞障害性を示すこと、導入効率が低いこと

など多くの課題が存在することから、ヒト iPS 細胞やヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV 複製解析は報告されていない。本研究で用いている Ad ベクターはヒト iPS 細胞を含む多くのヒト由来細胞へ簡便かつ高効率に HCV ゲノムを導入することが可能であり、ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞での HCV 複製解析に最適なゲノム導入法であると考えられる。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が HCV 感染評価系として利用可能であるかについて、HCV 侵入および HCV 複製に関して検証を行うことにした。HCV は培養細胞において感染性粒子の作製がほとんどできないことから、水泡性口内炎ウイルス (VSV) のエンベロープタンパク質を HCV E1、E2 に置換することで HCV の侵入が模倣される HCV シュードウイルス (HCVpv) が HCV 侵入解析実験に汎用されている。本研究でも HCVpv を用いてヒト iPS 細胞由来肝細胞への HCV 侵入の可否を検証し、続いて HCV ゲノム発現 Ad ベクターを用いたヒト iPS 細胞由来肝細胞での HCV 複製解析を試み、ヒト iPS 細胞由来肝細胞での HCV 侵入および複製解析の可否を検証した。

HCV は CD81、SR-BI、claudin-1、occludin を一連の感染受容体として利用し、細胞内に侵入する。ヒト iPS 細胞由来肝細胞においてこれら HCV 感染受容体の発現を RT-PCR 法により確認した。その結果、ヒト iPS 細胞では CD81 および occludin の発現しか見られないのに対して、分化誘導後のヒト iPS 細胞由来肝細胞では4種類の HCV 感染受容体の発現が確認された (Figure 2A)。次に、ヒト iPS 細胞由来肝細胞に HCV が侵入可能であるか HCVpv を用いた感染実験により検証した。ヒト iPS 細胞、ヒト iPS 細胞由来肝細胞、Huh7 細胞に HCVpv を 2 時間感染させ、HCVpv に搭載されているルシフェラーゼ遺伝子の発現を解析することで HCVpv の感染を評価した。その結果、ヒト iPS 細胞では HCVpv の侵入は認められないのに対して、ヒト iPS 細胞由来肝細胞では、HCV 感染可能な細胞である Huh7 細胞と同様に、容量依存的な HCVpv 侵入が認められた (Figure 2B)。この結果は、HCV 感染受容体の発現とも一致する結果であり、ヒト iPS 細胞由来肝細胞に HCV が感染し得る可能性が

示唆された。そこで、感染受容体 CD81 に対する抗体を用いて HCVpv 侵入阻害実験を行うことで、感染受容体 CD81 を介して HCVpv が細胞に侵入しているかを検証した。抗 CD81 抗体またはマウス IgG と HCVpv または VSVpv の混合液をヒト iPS 細胞由来肝細胞に 2 時間処理し、ルシフェラーゼ発現により HCVpv の侵入を評価した。その結果、ヒト iPS 細胞由来肝細胞への HCVpv の感染は IgG では阻害されず、抗 CD81 抗体で特異的に阻害された。また、VSVpv の侵入は抗 CD81 抗体および IgG では阻害されなかったことから、ヒト iPS 細胞由来肝細胞への HCVpv の侵入は感染受容体 CD81 を介していることが示された (Figure 2C)。これらの結果は、Huh7 細胞での抗 CD81 抗体による HCVpv 侵入阻害実験の結果と一致することから、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が Huh7 細胞と同様に HCV 侵入解析細胞として利用できる可能性が示唆された (Figure 2C and 2D)。最近、Lupberger らは Ephrin factor A2 (EphA2) および Epidermal growth factor receptor (EGF-R) が HCV 侵入に関わる新たな宿主因子であることを報告した。EphA2 の発現および細胞膜への局在は E-cadherin によって制御されている。ヒト iPS 細胞由来肝細胞への分化段階で分化誘導因子 HNF4 α は E-cadherin の発現を誘導する。このことからヒト iPS 細胞由来肝細胞では EphA2 の発現が誘導されているものと推察される。以上のように、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は HCV が侵入可能であり、HCV 侵入解析系として十分なレベルまで分化できていると考えられる。

次に、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いてヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV 複製解析の可否を検証した。ヒト iPS 細胞、ヒト iPS 細胞由来肝細胞、Huh7 細胞に HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いて遺伝子導入を行い、導入 24 時間後まで転写を誘導した。遺伝子導入 72 時間後に各細胞のルシフェラーゼ活性を測定し、P₂₃₅ プロモーター依存的にルシフェラーゼを発現する Ad ベクター (AdP₂₃₅-fLuc) の活性で補正することにより HCV 複製活性を算出した。AdP₂₃₅-HCV はヒト iPS 細胞由来肝細胞および Huh7 細胞で同等のルシフェラーゼ活性を示したが、

AdP₂₃₅-GDD はどちらの細胞においてもルシフェラーゼ活性をほとんど示さなかった。ヒト iPS 細胞では AdP₂₃₅-HCV はヒト iPS 細胞由来肝細胞の 1/30 以下のルシフェラーゼ活性しか示さなかった (Figure 3A)。HCV プラス鎖 RNA および複製産物である HCV マイナス鎖 RNA の発現を real-time PCR 法により検出した。その結果、AdP₂₃₅-HCV を導入したヒト iPS 細胞由来肝細胞では Huh7 細胞と同等の HCV プラス鎖 RNA およびマイナス鎖 RNA が発現しており、AdP₂₃₅-GDD ではほとんど発現していなかった。ヒト iPS 細胞においては AdP₂₃₅-HCV 導入細胞においても HCV プラス鎖 RNA およびマイナス鎖 RNA は発現しておらず、ルシフェラーゼ活性と相関する結果が得られた (Figure 3B and 3C)。これらの結果から、ヒト iPS 細胞由来肝細胞では Huh7 細胞と同程度に HCV ゲノムが複製されるが、ヒト iPS 細胞では HCV ゲノム複製活性が非常に低いことが示唆された。HCV 複製に関与する宿主因子として、これまでに cyclophilin B、FK506 binding protein 8 (FKBP8)、heat shock protein 90 (Hsp90)、vesicle-associated membrane protein-associated proteins (VAPs)、F-box protein 2 (FBL2)、miR-122 が報告されている。Cyclophilin B はタンパク質の正常な折りたたみや輸送に関わるタンパク質と考えられているが、cyclophilin B の阻害剤である cyclosporin A により HCV 複製が阻害されること、および cyclophilin B が HCV NS5B と相互作用することが明らかとなり、cyclophilin B が HCV NS5B を中心とする複製複合体の一因として HCV ゲノム複製に関与している分子でもあると考えられている。また、FKBP8 は yeast two-hybrid system を用いることで HCV NS5A と相互作用する分子として同定された。さらに、FKBP8 と相互作用する分子として Hsp90 が同定され、これらが co-chaperone として機能し、cyclophilin などと共に HCV タンパク質の正常な折りたたみに関与することで HCV 複製に寄与しているのではないかと考えられている。VAP-A、-B は yeast-two hybrid system により HCV NS5A 結合分子として同定された分子である。Pull-down アッセイおよび免疫沈降法により VAP-A は NS5A だけでなく NS5B と結合す

ること、および VAP-A、B がホモダイマーやヘテロダイマーを形成することが明らかとなり、VAPs がホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成することで、NS5A および NS5B を介して HCV 複製複合体を複製の場である小胞体膜上につなぎとめる役割を担っていると考えられている。FBL2 は geranylgeranyl transferase I 阻害剤を用いた解析から HCV 複製関連宿主因子として同定された。Geranylgeranylated FBL2 は NS5A と結合し、VAPs と同様に複製複合体を小胞体膜上につなぎとめている。miR-122 は肝臓に高発現している microRNA で、その標的配列が HCV ゲノムに存在することが明らかとなっている。本来、microRNA は Argonaute (Ago) など miRNA-induced silencing complex (miRISC) を形成し、mRNA の 3' 末端に結合することで、mRNA の不安定化やタンパク質への翻訳を阻害する分子である。しかし HCV では、miR-122 は Ago2 と共に HCV RNA の 5' UTR 領域に結合し、HCV RNA の安定化や翻訳を促進させることで HCV 複製を促進させることが報告されている。ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV 複製に関連する宿主因子の発現解析は行っていないが、ヒト iPS 細胞ではこれら因子のいくつかが発現していないこと、およびヒト iPS 細胞由来肝細胞ではこれらの宿主因子が Huh7 細胞と同等に発現しているのではないかと考えられる。また、マイクロアレイ解析などを用いてヒト iPS 細胞からヒト iPS 細胞由来肝細胞への分化段階の細胞における遺伝子発現と HCV 複製能を詳細に解析していくことで、新たな HCV 宿主因子の発見につながることも期待される。

最後に、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いたヒト iPS 細胞由来肝細胞での HCV 複製解析法が HCV 複製阻害薬のスクリーニング系として応用可能であるか検証した。AdP₂₃₅-HCV 導入ヒト iPS 細胞由来肝細胞に抗 HCV 薬 IFN を添加したところ、濃度依存的なルシフェラーゼ活性の低下が認められた (Figure 3D)。WST 法により細胞障害性を検証したが、IFN による細胞障害性は全く認められなかった (Figure 3E)。これらの結果は、HCV サブゲノム発現

Ad ベクターを用いることでヒト iPS 細胞由来肝細胞において HCV 複製阻害薬のスクリーニングが可能であることを示唆している。ヒト iPS 細胞由来肝細胞における IFN の抗 HCV 効果は Huh7 細胞と同程度であったことから、ヒト iPS 細胞由来肝細胞においても IFN- α 8 が IFNAR1、R2 に作用し、JAK/STAT シグナル経路を介して ISGs の発現誘導することで抗 HCV 効果を示しているものと考えられる。IFN によって発現する ISGs は 300 以上にもおよび HCV を阻害するメカニズムは複雑であることから、マイクロアレイ解析等による網羅的な ISGs の発現解析により、IFN による新たな抗 HCV 効果のメカニズムが発見される可能性も考えられる。

C. 結論

HCV 複製機構の解明が遅延する原因の一つとして、HCV ゲノム導入法の汎用性の低さと導入効率の低さがある。当研究グループが RNA polymerase I 発現系および Ad ベクターを利用して作製した HCV サブゲノム導入法は、導入効率に優れ、新たな HCV 複製解析系としての応用が期待された。そこで本研究では、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた HCV 複製解析系が、HCV 複製阻害薬の開発や HCV 複製機構の解明に応用可能な解析系であるかを検証した。

HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた HCV 複製解析系において HCV 複製阻害剤を用いた解析が可能であれば抗 HCV 薬の開発や HCV 複製機構の解析を行う上で有用なツールとなる。そこで、抗 HCV 薬である IFN をモデル薬物として、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いて HCV 複製阻害薬の評価系としての有用性を評価した。その結果、IFN 濃度依存的な抗 HCV 活性が認められ、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた HCV 複製阻害剤の解析が可能であることが示された。

続いて、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いてヒト iPS 細胞由来肝細胞の HCV 複製解析を行った。ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、HCV 感受性や治療効果などが異なる患者の細胞から作製可能であり、HCV

侵入、複製、治療に関与する因子を解析可能であると考えられるものの、HCV ゲノム導入法の問題からこれまで HCV 解析には利用されていなかった。HCV サブゲノム発現 Ad ベクターは様々な細胞に効率よく HCV サブゲノムを導入可能であることから、本ベクターを用いてヒト iPS 細胞由来肝細胞での HCV 複製解析を行った。その結果、ヒト iPS 細胞由来肝細胞では Huh7 細胞と同程度に HCV ゲノムが複製されるが、ヒト iPS 細胞では HCV ゲノム複製活性が非常に低いことが示唆された。また、ヒト iPS 細胞由来肝細胞に本ベクターを用いることで抗 HCV 薬の効果を評価可能であることを示した。

以上、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターは簡便に様々な細胞に HCV ゲノムを導入可能であり、HCV 複製阻害剤の効果や細胞の HCV 複製能を評価可能であり、汎用性に優れた HCV 複製解析系であることが示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

該当なし

G-2 学会発表

1. 吉田 孟史、佐藤 芙美、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 9-10 日、東京
2. Masuo Kondoh, Yoshiaki Yamagishi, Takeshi Yoshida, Hiroyuki Mizuguchi, Naoya Sakamoto, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Development of RNA pol-driven adenovirus vector expressing hepatitis C virus replicon. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA
3. Takeshi Yoshida, Fumi Satoh, Akihito Watari, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Naoya Sakamoto, Kiyohito Yagi, Development of an RNA polymerase I-driven adenoviral vector and its application in an HCV replication assay. 18th International Symposium of hepatitis C virus and

related viruses, Sep8-12, 2011, Seattle, WA, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

該当なし

H-2 実用新案登録

該当なし

H-3 その他

該当なし

I. 研究協力者

大阪大学大学院薬学研究科

吉田孟史（大学院生）

山岸喜彰（大学院生）