

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

レプリコンを用いた C 型肝炎ウイルス増殖に関与する宿主分子の網羅的解析、
リバーシジェネティックスの構築

研究分担者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

研究要旨 これまで開発してきたヒト不死化肝細胞の中空系による簡便な立体培養法で患者由来の C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染増殖を再現することができた。この細胞は平面培養した場合と比較して立体培養することで HCV の生活環を再現することが可能になるため、このことを利用して立体培養下で発現が変化する遺伝子をマイクロアレイ法によって解析した。その結果、これまでにアラキドン酸カスケードに関連するいくつかの遺伝子の発現が明らかに変動していることを見出し、このカスケードの上流酵素であるシクロオキシゲナーゼ 1 の阻害剤が感染性 HCV 粒子産生に抑制的な効果を示すことをこれまでに見出している。このカスケードによって産生される各種プロスタグランジン (PG) は種々の生理活性を有するため、各種 PG の受容体に対するアゴニストならびにアンタゴニストで組換え体 HCV 産生細胞を処理した結果、2 種類の PGI 受容体 (IP) アゴニストによる処理で感染性粒子産生が抑制されることがわかった。以上の結果から、これら IP アゴニストが HCV の感染性粒子産生の抑制する効果を有することが明らかとなり、抗 HCV 薬の候補となりうるということがわかった。また IP アゴニストによって変化する細胞因子は新たな抗 HCV 薬開発の標的になることが示唆された。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名
土方 誠・京都大学・准教授

A. 研究目的

独自に樹立したヒト不死化肝細胞の立体細胞培養系を用いて、患者血液由来の C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染増殖が再現された。そこでこの HCV 培養系での立体培養不死化肝細胞において HCV の感染増殖に機能する細胞内生理機構を解明し、この情報をもとに HCV の感染増殖を効果的に抑制する薬剤を抗 HCV 薬候補として同定することを目的とした。

B. 研究方法

1. 独自に樹立したヒト不死化肝細胞を立体培養することにより種々の患者血清由来 HCV の感染増殖を効率良くおこなうことが可能になることから、この細胞の立体培養下における遺伝子発現パターンをマイクロアレイ法によって解析した。そして通常培養と比較して立体培養において変化する遺伝子群の

解析結果から HCV の感染増殖と関連する細胞内反応系候補としてアラキドン酸カスケードを同定した。

2. 組換え体 HCV (JFH1) 感染性粒子産生実験系にアラキドン酸カスケードに含まれる酵素の阻害剤等で処理し、その細胞内あるいは培地中に放出される HCV RNA 量、そして培地中の HCV 感染性を検証した。
3. ヒト肝臓キメラマウスに患者血由来遺伝子型 1b の HCV を感染させた後、これに上記酵素阻害剤等を投与し、その感染増殖に対する効果を検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト初代培養肝細胞は、京都大学附属病院移植外科においておこなわれた先天性代謝異常症患者への生体肝臓移植において切除された患者肝臓組織を用いて作成されたものである。この研究はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認されたものである。肝臓や血液提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

1. 不死化肝細胞を中空糸あるいはメビオールゲルによる立体培養法を用いて培養した場合と通常の培養皿による培養法を用いた場合におけるその遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイ法によって解析したところ、プロスタグランジン(PG)D合成酵素(PGDS)とトロンボキササン A(TXA)合成酵素(TXAS)の mRNA 量が2つの方法に共通して立体培養時に上昇し、それとは逆に PGI と PGE 合成酵素の mRNA 量が減少していることがわかった。
2. 上記の結果から立体培養によってアラキドン酸カスケード(AAC)の最終産物に変化することが推定されたため、まず AAC が HCV の生活環に関与するか否かを組換え体 HCV (JFH1) 感染性粒子産生実験系を用いてここにアラキドン酸カスケードの律速酵素、シクロオキシゲナーゼ I の阻害剤の効果を検討した。その結果、細胞内に存在する、あるいは培地中に放出された HCV RNA は全く変化せず、複製や培地中への粒子産生には大きな変化はないことがわかった。しかしながら培地に存在するウイルス様粒子の感染性がこの阻害剤により濃度依存的に抑制されることがわかった。
3. 立体培養時に上昇する PGDS 遺伝子は組換え体 HCV 産生細胞では発現が認められなかったので同様の挙動を示した TXAS 遺伝子の mRNA に対する siRNA を用いてこの細胞を処理するとやはり 2. の結果と同様に HCV の複製や培地中への粒子産生には大きな変化はなかったが培地中の感染性が著しく低下することがわかった。
4. 3. 同様の実験を TXAS 活性阻害剤である Ozagrel を培地に加えておこなったが siRNA と全く同様の結果が得られた。
5. 組換え体 HCV 産生細胞から得られた感染性 HCV 粒子を含む培養液に組換え体 HCV RNA を導入していない細胞を Ozagrel で処理して得られた培養上清を混ぜても感染性には何ら影響はなかった。

6. ヒト肝臓キメラマウスに患者血由来遺伝子型 1b の HCV を感染させた後、これに Ozagrel ならびに TXA と相反する効果を有する PGI の受容体(IP)に対するアゴニストを投与し、その感染増殖に対する効果を検討した結果、Ozagrel ならびに IP アゴニストは効率良く HCV の増殖を抑制することがわかった。

D. 考察

1. ヒト不死化肝細胞の立体培養によって変化が認められたアラキドン酸カスケードによって産生される TXA は感染性粒子産生に重要なシグナルであることが考えられた。
2. 組換え体 HCV 産生細胞では TXA の産生阻害によって感染性粒子産生が抑制される事がわかった。
3. 組換え体 HCV 産生細胞から得られた感染性 HCV 粒子を含む培養液に組換え体 HCV RNA を導入していない細胞を Ozagrel で処理して得られた培養上清を混ぜても感染性には何ら影響はなかったことから Ozagrel の効果は組換え体 HCV 産生細胞に働きかけて感染性ウイルスの産生を抑制することにあると考えられた。
4. ヒト肝臓キメラマウスに感染させた患者血由来遺伝子型 1b の HCV の感染伝播を Ozagrel ならびに IP アゴニストは効率良く抑制したことからこれらの薬剤が抗 HCV 薬剤の新たな候補となることが考えられた。
5. ヒトの肝臓においても TXA と PGI は相反する効果を示す事が考えられた。

E. 結論

TXAS 阻害薬と IP アゴニストは HCV 粒子産生細胞に働きかけ感染性粒子産生を制御する働きを有することが示唆された。したがって、これらの薬剤は抗 HCV 薬の候補と考えられ、またこれらの効果によって変化する細胞因子は抗 HCV 薬剤開発の新たな標的となることが期待された。これらの薬剤はすでに他の疾患治療に使用されているものであり、早期に治療への応用が期待できるものと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文

1) Yasuo Ariumi, Misao Kuroki, Yukihiro Kushima, Kanae Osugi, Makoto Hijikata, Masatoshi Maki, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato: Hepatitis C Virus Hijacks P-body and Stress Granule Components Around Lipid Droplets. *J. Virol.*, 85(14), 6882-6892, 2011

2) Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki, Matthew J. Evans, Kunitada Shimotohno, Kazuaki Chayama, Yoshiharu Matsuura, Makoto Hijikata, Kohji Moriishi, Tsukasa Seya, Nobuyuki Enomoto, Kazuhiko Koike, Nobuyuki Kato, Tatsuya Kanto, Hak Hotta: Will there be an HCV meeting in 2020? Summary of the 17th International Meeting in Hepatitis C Virus and Related Viruses, *Gastroenterology*, 141(1), E1-E5, 2011

2. 学会発表

1) Yukihiro Kushima, Yuichi Abe, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Novel targets for anti HCV drugs preventing infectious virus particle production. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference, The Latest Advances in Liver Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics, Chiba, Japan, March 1-3, 2011.

2) Yuichi Abe, Hussein H. Aly, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production. The 6th International symposium of institute network. Tokyo, Japan, June 9-10, 2011

3) Yuichi Abe, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Makoto

Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus particle production. 18th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, USA, Sept 8-12, 2011

4) Yuichi Abe, Hussein Aly, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production.

平成23年12月12-15日、横浜、2011年

5) 阿部雄一、下遠野邦忠、脇田隆字、土方 誠: HCV 粒子の感染性獲得に関与する肝細胞内シグナルの解析、第7回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、平成23年7月1日、広島、2011年6) 土方誠: プロスタノイドによるHCVの感染性粒子産生制御、平成23年度 北海道大学遺伝子病制御研究所 研究集会『感染、免疫、炎症、発癌』、平成23年12月4-5日、札幌 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 上皮性体性肝細胞の製造方法、発明者 土方 誠、アリ ハサン フセイン、山口達哉、出願日 2011年3月25日、出願番号 特願2011-67112

2) C型肝炎ウイルスの感染抑制剤、発明者 土方 誠、阿部雄一、脇田隆字、茶山一彰、出願日2011年9月30日、出願番号 PCT/JP2011/072682

2. 実用新案登録 特になし。

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）

創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた

肝炎ウイルス制御に関する研究

分担研究報告書

細胞表面付着型インターフェロン- γ 発現ベクターの開発

研究分担者 高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 インターフェロン- α (IFN- α)抵抗性HCVを感染させたヒト肝細胞キメラマウスにおいて、持続的にIFN- γ を作用させることでIFN- α と同等以上の抗HCV効果が得られる可能性を報告している。そこで、IFN- α 抵抗性HCVを感染させたヒト肝細胞キメラマウスの検体数を増やし、*in vivo*において持続的にIFN- γ を発現させることが可能なIFN- γ 発現plasmid DNA (pDNA)を遺伝子導入することによる抗HCV効果の有用性を検証した。その結果、IFN- γ 発現pDNAを投与したすべてのマウスにおいて、ヒトIFN- γ の産生が認められ、遺伝子導入一週間後には血清中HCV RNA量は検出限界以下となり、その後も検出されなかった。併せて、IFN- γ の標的部位特異的な作用発現を目的として、マウスIFN- γ とヘパリン硫酸結合ドメイン(heparin binding domain; HBD)との融合タンパク質を設計し、これを発現するpDNAを構築し、その動態制御能について評価した。その結果、HBD融合IFN- γ はその生物活性を保持しつつ、細胞表面に付着可能であり、HBD融合IFN- γ 発現pDNAを遺伝子導入することで遺伝子導入組織特異的な生物活性を得ることが可能であった。以上の結果から、本アプローチによってIFN- γ の遺伝子導入細胞表面への滞留化と生物活性の両立が可能であることが示された。

A. 研究目的

これまでに例数は少ないものの、長期のIFN- γ 遺伝子発現を可能とするpDNAを投与し、持続的にIFN- γ を作用させることでHCV感染キメラマウスにおいて高い抗HCV効果が得られる可能性があることを報告した。そこで、本研究では検体数を増やすことで持続的なIFN- γ 遺伝子発現のC型肝炎に対する*in vivo*における治療有効性を検証した。

また、IFN- γ 遺伝子治療に基づく治療抵抗性肝炎治療の有効性を向上することを目的に、細胞表面付着型IFN- γ 発現pDNAの開発を行った。IFN- γ による治療効果は、治療標

的細胞に対してIFN- γ が生物活性を示すことによって発揮される。すなわち、ウイルス性肝炎治療においては、肝臓を遺伝子導入部位とし、遺伝子導入部位近傍のIFN- γ 濃度を選択的に増大し、全身循環中のIFN- γ 濃度を低く抑えることができれば、副作用の軽減および治療効果の増強が実現可能であると考えられる。そこで、細胞外マトリクスであるヘパリン硫酸糖に結合親和性を持つことが知られているextracellular superoxide dismutase由来C末端ヘパリン硫酸結合ドメイン(HBD)をIFN- γ のC末端に融合することで遺伝子導入された細胞で産

生・分泌後、細胞表面に留まる機能を賦与できるのではないかと考えた。このIFN- γ 融合タンパク質の生物活性などの機能・性質を評価した後、肝転移モデルマウスを用いることで治療上の有効性、および有害作用の軽減を評価した。

B. 研究方法

1. 持続型IFN- γ 発現pDNAを用いた抗HCV効果の検討

pDNA：持続的な遺伝子発現が可能であるpDNA骨格(pCpG-mcs: InvivoGen)にヒトIFN- γ cDNAを挿入したpCpG-huIFN- γ を用いた。ヒト肝細胞キメラマウス：uPA-SCIDマウスにヒト肝細胞を移植することで作製した高置換キメラマウスを用いた。血中ヒト血清アルブミン濃度を測定することでヒト肝細胞数を評価した。HCV感染モデル：高置換キメラマウスにI型IFN抵抗性を示すHCV genotype 1bを感染させることで治療抵抗性C型肝炎モデルマウスを作製した。ハイドロダイナミクス法を利用したマウスへの遺伝子導入とIFN- γ 発現量の評価：

naked pDNAをマウス体重の約10%に相当する容量の生理食塩水に溶解し、マウス尾静脈内に急速投与した。遺伝子導入後の血中IFN- γ 濃度はELISA法を用いて測定した。抗HCV効果の評価：経時的に採血し、real-time PCR法にて血中HCV RNA量を測定した。

2. 細胞表面付着型IFN- γ 発現pDNAの構築

pDNAの構築：細胞外マトリクスへの親和性ペプチドとして、6個のアミノ酸RKKRRRからなるextracellular superoxide dismutase由来C末端ヘパラン硫酸結合ドメ

イン (HBD) を選択し、IFN- γ のC末端に融合した。このとき、IFN- γ に融合するHBD数が1から3までの3種類の融合タンパク質IFN- γ -(HBD)_{1~3}をデザインした。それぞれをコードするcDNAを持続発現型ベクターに組み込むことで、各融合タンパク質発現pDNA (pCpG-muIFN- γ -(HBD)_n : n = 1~3)を構築した。IFN- γ 発現量の定量：構築したpDNAを培養細胞に導入し、上清中および細胞画分の各融合IFN- γ 発現量をELISA法により測定した。生物活性の評価：

IFN-gamma activated site (GAS) 駆動性のルシフェラーゼ発現pDNA (pGAS-Luc) を遺伝子導入したB16-BL6細胞に対し、各HBD融合IFN- γ を種々の濃度で添加した。一定時間経過後に細胞画分のルシフェラーゼ活性を測定することで融合IFN- γ の生物活性を評価した。細胞表面滞留性の評価：抗IFN- γ 抗体を用いて免疫蛍光染色法を行うことで、融合IFN- γ の細胞表面滞留性を評価した。マウスへの遺伝子導入と生物活性および体内動態の評価：ハイドロダイナミクス法を用いてマウス肝臓に各pDNAを遺伝子導入した。IFN- γ 血中濃度をELISA法により測定した。肝臓でのIFN- γ 生物活性は、IFN- γ の標的遺伝子であるSOCS1などの肝臓におけるmRNA量を測定することで評価した。また、HBD融合IFN- γ 発現pDNAを遺伝子導入したマウスに対して、HBDとヘパラン硫酸の相互作用を阻害可能するヘパリンを静脈内投与し、血中に遊離するIFN- γ 量を測定することでHBD融合IFN- γ の細胞外マトリクスとの結合性を評価した。抗腫瘍効果と有害作用の評価：静脈内に移植することで肝転移巣を形成するM5076を用い、肝転移モ

デルマウスを作製した。肝転移モデルマウスに各種IFN- γ 発現pDNAを投与、一定期間経過後の肝臓中結節数を評価することで抗腫瘍効果を判定した。別途、体重を指標にIFN- γ が全身で非特異的に作用することによる有害作用を評価した。

C. 研究結果

これまでにIFN- α 抵抗性HCV感染キメラマウスを用いて持続的にIFN- γ を遺伝子発現することで高い抗HCV効果が得られることを報告してきた。そこで本研究では、検体数を増やすことでその有用性を検証した。その結果、遺伝子導入3日後よりウイルス価の減少が認められ、14日後以降は検出限界以下、もしくは、著しくウイルス価が減少することが明らかとなり、持続的にヒトIFN- γ を作用させることがIFN- α 抵抗性C型肝炎の治療に非常に有効であることが示された。

次に、新規デザインしたHBD融合IFN- γ の生物活性と細胞表面付着能を培養細胞の系で評価した。その結果、HBD融合IFN- γ の細胞表面への付着能はHBD数の増加に伴い増加することを確認した。また、HBD融合IFN- γ が天然型IFN- γ と同程度のIFN- γ 生物活性を保持していることも確認した。次に、ハイドロダイナミクス法を用いてマウスに遺伝子導入したところ、培養細胞での結果と同様に、HBD数に依存した細胞表面への付着が増加する傾向が認められた。また、0.4 μ g(0.18pmol)のIFN- γ -(HBD)₂発現pDNAを投与することで、0.4 μ g(0.18pmol)の天然型IFN- γ 発現pDNA投与の約40%のIFN- γ 生物活性が肝臓において認められた。

この時、IFN- γ -(HBD)₂発現pDNA投与群の血清中IFN- γ 濃度は天然型IFN- γ 発現pDNA投与群の100分の1以下であった。加えて、IFN- γ -(HBD)₂発現pDNA投与マウスに対してヘパリンを静脈内投与したところ、ヘパリン投与により血清中IFN- γ 濃度が30倍程度上昇したことから、HBD融合IFN- γ が細胞外マトリクスと相互作用することで血中濃度が低く抑えられているものと考えられた。一方で、天然型IFN- γ 発現pDNA投与マウスにおいてはヘパリン投与による血清中IFN- γ 濃度の変動は認められなかった。肝転移腫瘍モデルマウスにおいて抗腫瘍効果と有害作用の評価を行ったところ、0.3 μ g(0.13mol)の天然型IFN- γ 発現pDNA投与群では抗腫瘍効果が得られたが同時に体重も減少した。一方、10 μ g(4.2pmol)のHBD融合IFN- γ 発現pDNAを投与した群では、体重減少することなく天然型IFN- γ と同等の抗腫瘍効果が得られた。

D. 考察

HCVはチンパンジー以外に感受性を示す実験動物がないため、他のヒト感染ウイルスと比べin vivoでの基礎情報は依然として乏しく治療法の確立が困難であるのが現状である。IFN- γ は、HCVサブゲノミックレプリコンを用いた培養細胞の系、チンパンジーを用いた動物モデルでI型IFNと同等あるいはそれを上回る抗HCV効果を示すことが報告されており、有効なC型肝炎治療法となりえることが期待されている。本研究では、検体数を増やしI型IFN抵抗性HCV感染キメラマウスで高い抗HCV効果が示唆された持続作用型IFN- γ 発現pDNA

の治療有効性を検証した。

その結果、持続的にIFN- γ を発現することで著しくウイルス価が減少する、あるいは、検出限界以下に至ることが明らかとなった。また、血清中ヒトIFN- γ 濃度が1000pg/mLと低い濃度で発現が持続したマウスにおいて、一度ウイルス価が検出限界まで低下した後、観察終了までの8週に渡り再燃が認められなかった。これらの結果は、I型IFN抵抗性HCVに対するIFN- γ 遺伝子治療の有用性を示すものと考えられる。また、IFN- γ をHBDとの融合タンパク質とすることによりその生物活性を保持しつつその体内動態を制御できることが明らかとなった。また、HBD融合IFN- γ はin vivoにおける癌細胞の増殖を天然型IFN- γ と同様に抑制可能である一方で、有害事象が観察されなかったことから、HBD融合IFN- γ の有用性が証明された。

E. 結論

持続的にIFN- γ を作用させることで高い抗HCV効果が得られること、また、HBD融合IFN- γ とすることで有害事象を回避しつつ、標的組織である肝臓局所でIFN- γ 濃度を増加できることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Constant and steady transgene expression of interferon- γ by optimization of plasmid construct for safe and effective interferon- γ gene therapy. Ando M, Takahashi Y, Nishikawa M, Watanabe Y, Takakura Y. J Gene Med; in press
2. Saturation of transgene protein synthesis from mRNA in cells producing a large number of transgene mRNA. Takahashi Y, Nishikawa M, Takiguchi N, Suehara T, Takakura Y. Biotechnol Bioeng., in press

2. 学会発表

1. Mitsuru Ando, Yuki Takahashi, Hanae Mukumoto, Makiya Nishikawa, Yoshihiko Watanabe and Yoshinobu Takakura. “Design and hydrodynamic gene transfer of ‘sticky’ IFN γ for liver-directed gene therapy.” 14th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy (May 18-21, Seattle, WA, USA)
2. 三坂真之、宮川典子、西川元也、高橋有己、安藤 満、渡部好彦、高倉喜信. “血中滞留化と活性保持を両立するインターフェロン誘導体の開発” 日本薬剤学会第 26 年会、東京、2011 年 5 月
3. Kanitta Watcharanurak, Makiya Nishikawa, Yuki Takahashi, Kenji Kabashima, Rei Takahashi and Yoshinobu Takakura. “Regulation of immunological balance by sustained interferon- γ

gene transfer for atopic dermatitis in mice.” 第 27 回日本 DDS 学会学術集会、東京、2011 年 6 月

4. 高倉喜信、安藤 満、高橋有己、西川元也 “各種肝疾患治療を目指したインターフェロン体内動態の時空制御の試み” 第 7 回広島肝炎プロジェクト研究センターシンポジウム、広島、2011 年 7 月
5. Yoshinobu Takakura. “Optimization of interferon- γ cancer gene therapy by regulating transgene expression profile or controlling the tissue distribution of transgene product” 38th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society(National Harbor, Maryland USA), July 30 - August 3 (2011)
6. 戒浦規文、高橋有己、西川元也、高倉喜信 “抗原タンパク質の発現プロファイル依存的な抗原特異的免疫応答の解析” 第 21 アンチセンスシンポジウム+第 11 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム 合同シンポジウム、大阪、2011 年 9 月
7. Yuki Takahashi, Yuriko Matsui, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura. “Kinetic comparison of gene silencing profile of siRNA and shRNA-expressing plasmid DNA in vivo.” 7th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (September 8-10, Copenhagen, Denmark)
8. Yuki Takahashi, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura. “Depletion of tumor-associated macrophages can enhance the anticancer effect of interferon- γ gene therapy (腫瘍関連マクロファージの除去によるインターフェロン γ 遺伝子治療の抗腫瘍効果の増強)” 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月

9. 高橋有己、安藤 満、西川元也、渡部好彦、
高倉喜信 “細胞表面接着型インターフェロン
を利用した標的特異的作用型遺伝子治療シ
ステムの開発” 第 61 回日本薬学会近畿支部
総会・大会、神戸、2011 年 10 月

H. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生労働省科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
分担研究報告書(平成 23 年度)

次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV 遺伝子変異の解析
研究分担者： 前川 伸哉
山梨大学大学院医学工学総合研究部・肝疾患地域先端医療システム学講座 講師

研究要旨：肝発癌のハイリスクである HCV 感染においては、core aa70Q/H が病態進行と肝発癌に関与を示すこと、さらにコア aa70 の経時変化と HCC 発症には密接な関連があることを昨年度までに報告した。本年度は、従来の検討に加えて次世代シーケンサーを用いた deep sequencing を用いた解析を行うことにより、コア aa70 の肝発癌における関与をさらに詳細に検討した。その結果として deep sequencing は宿主体内における quasispecies を正確にかつ短時間で解析する優れた方法であること、一方、コア aa70 の混在状態と経時的変化は G-GTP 等の臨床背景因子とともに肝発癌と密接に関連していることが deep sequencing における検討によってさらに詳細に明らかとなった。

共同研究者氏名
榎本信幸
山梨大学医学工学総合研究部 教授

A. 研究背景・目的

我々は HCV シークエンス解析システムを構築し、各種病像に対応する HCV 全ゲノムの多様性の網羅的解析を行いつつある。本研究では、この成果とヒト肝細胞キメラマウス系による肝炎実験動物モデルでの C 型肝炎ウイルスの病原性解析を統合することを目的とする。本年度は特に次世代シーケンサーを用いた deep sequencing を導入し、肝病態と HCV 遺伝子変異との関連を検討した。

昨年度の検討において、肝発癌のハイリスクである HCV 感染において、core aa70Q/H が病態進行と肝発癌に関

与を示すこと、さらにコア aa70 の経時変化と病態進行とには密接な関連があることを我々は明らかとしていた。本研究では、これに加えて次世代シーケンサーを用いた deep sequencing を用いた解析を加えることにより、コア aa70 の肝発癌における関与を詳細に検討した。

B. 研究方法 (2011 年度)

(1) 次世代シーケンサー Roche GS Junior を用いた deep sequence におけるバックグラウンドエラーを確認するため HCV のクローニングされたプラスミドを用い、deep sequence を行った。
(2) 長期経過観察が可能であった genotype1b 82 例(HCC 群 27 例、LC 群 30 例、CH 群 25 例)を対象とし、コア aa70 の配列をダイレクトシーケン

スと Roche GS Junior Sequencer を用いた Deep sequencing により比較検討した。

(3) 長期経過観察が可能であった発癌 9 例についてコア aa70 の経時変化を Deep sequencing により検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は梨大学における倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究成果

(1) HCV-J4 のクローニングされたプラスミドにおけるコア 530 塩基長領域をターゲット領域とする deep sequence によって、81388 リードの塩基配列が得られた。530 塩基長において変異は 19 箇所のみ認め、また各箇所における変異率は 0.5%以下であった。すなわち全塩基配列に対してバックグラウンドエラーは 0.018%と非常に低かった。

(2) HCV-1b 持続感染 82 例における検討において、コア aa 70 はダイレクトシーケンスでは R または Q あるいは H として判定された。一方、deep sequence によって、コア aa 70 のアミノ酸に混在を 5%以上に認めるものは、13.4%(11/82)であった (HCC: 3/25、LC: 5/30、HCC: 3/27)。しかしバックグラウンド以上に有意な混在を示すものは 80/82 (97.5%) に上り、コア aa 70 は、大部分の症例において混在状態であった。

(3) HCC 症例 9 例においてコア aa 70 の HCC 発症前後における経時変化を

deep sequence により解析し、臨床背景との比較を特に G-GTP の変化に注目して検討した。すると発症前後の経過を通じて、コア aa70 のドミナントな配列が Q である 3 例は G-GTP が HCC 発症前に高く、しかしながら経過とともに低下して HCC が発症していた。経過を通じてコア aa70 のドミナント配列が R である 3 例は G-GTP が HCC 発症前後で低い状態のまま低下 HCC が発症した。一方、経過に伴いコア aa70 のドミナントな配列が R から Q に変化した 3 例において 1 例が G-GTP が HCC 発症前に高く経過とともに低下したが、残りの 2 例においては経過を通じて低値のまま HCC を発症し、G-GTP は中間的な挙動を示した。

D. 考察

本検討により、次世代シーケンサーを用いた HCV 遺伝子をターゲットとした deep sequence 解析においては、手技にともなうバックグラウンド変異は非常に低く、僅かに混在する変異を高感度に検出出来ることが明らかとなり、宿主体内における quasispecies を正確にかつ短時間で解析する優れた方法であることが示された。一方、C 型慢性肝疾患において、コア aa70 の混在状態と経時的変化は G-GTP 等の臨床背景因子とともに肝発癌と密接に関連していることが明らかとなった。今後さらに数多くの症例における deep sequence の解析結果と臨床パラメータの関連を十分に検討することにより、肝病態進展

におけるウイルス因子の役割を解明し得ることが考えられた

E. 結論

肝発癌にはHCV core aa70 の経時変化が関与しているが、次世代シーケンサーを用いることで、肝発癌に関連するHCV 遺伝子変異の詳細な解析が可能となるもの考えられる。

F. 研究発表論文発表 1. 論文発表

1. Miura M, Maekawa S, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Ohmori T, Kanayama A, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Kitamura T, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N. Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis. *Hepatol Int.* 2011 August 17.
2. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Kadokura M, Sueki R, Miura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Enomoto N. Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. *Hepatol Int.* 2011 August 17.
3. Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of genotype 2b hepatitis C virus in association with the response to peginterferon and ribavirin therapy. *PLoS One.* 2011;6(9):e24514. Epub 2011 Sep 15.
4. Takaya D, Yamashita A, Kamiyo K, Gomi J, Ito M, Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Watanabe Y, Arai R, Umeyama H, Honma T, Matsumoto T, Yokoyama S. A new method for induced fit docking (genius) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2011 Nov 15;19(22):6892-905. Epub 2011 Sep 16.
5. Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatol Int.* 2011 Mar 20.

6. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. J Hepatol. 2011 Mar;54(3):439-48.
- 特許権等知的財産権の取得及び申請状況：
なし。

1. 学会発表

1. 三浦美香、前川伸哉、末木良太、門倉信、小馬瀬一樹、進藤浩子、進藤邦明、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸. ワークショップ：次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV 遺伝子変異の解析 第 47 回 日本肝臓学会大会. 東京. 平成 23 年 6 月 2 日 - 6 月 3 日
2. 三浦美香、前川伸哉、末木良太、門倉信、小馬瀬一樹、進藤浩子、進藤邦明、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸. ポスター：次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV 遺伝子変異の解析 第 15 回 日本肝臓学会大会. 福岡. 平成 23 年 10 月 20 日 - 10 月 21 日.

IL28B 遺伝子の Allele 特異的ノックアウト技術の確立

研究分担者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨： HCV の実験室株が感染可能な Huh7 細胞の IL28B 遺伝子は Major allele と Minor allele が両方存在する Heterogenotype であった。そこで、この細胞の IL28B 遺伝子のうち、各 Allele を特異的にノックアウトする技術を構築することを目的とした。近年、新しい遺伝子のノックアウト技術として、Zinc-finger nuclease (ZFN) が知られている。IL28B のエクソンを標的とした ZFN の mRNA を *in vitro* で合成し、Huh7 細胞に発現させることで、部分的に IL28B 遺伝子内の標的ゲノムに遺伝子変異を導入した。その細胞をクローニングした上で、シーケンスにより遺伝子配列を決定することで、IL28B 遺伝子の Allele 特異的な変異導入技術を構築し、Major か Minor allele のいずれか一つを保持した Huh7 細胞株を樹立した。

A. 研究目的

HCV に感染すると高率に慢性化し、肝硬変を経て肝細胞癌を発症する。ペグ化 IFN とリビリンの併用により治療効果に改善が認められているが、遺伝子型 1b 型の高ウイルス価の難治性 C 型肝炎患者に対する著効率は 50%程度である。近年、C 型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療の効果予測因子として IL28B 遺伝子周辺の多型が報告され、徐々に臨床応用されつつある。しかしながら、IL28B の遺伝子多型が IFN 感受性と相関するメカニズムは不明である。このメカニズムを解明することで抗ウイルス治療の抵抗性規定因子を明らかにできる可能性がある。*In vitro* で HCV が感染可能な細胞である Huh7 細胞の IL28B 遺伝子は Hetero-genotype である。本研究では近年注目されている Zinc-finger nuclease (ZFN) を用いた遺伝子ノックアウト手法を応用して、Huh7 細胞の IL28B 遺伝子を Allele 特異的にノックアウトすることで、IL28B 遺伝子多型と IFN 感受性が相関するメカニズムを解明することを目的とする。

B. 研究方法

Huh7 細胞の IL28B 遺伝子多型の Genotyping として rs8099917 の SNP を解析した。細胞のクローン間の差を減らすために、Huh7 細胞を Single isolation によっ

てクローニングし、HCV の感染性が Parental な細胞と同等のクローン

(Huh7-7) を以下の実験に用いた。IL28B を標的とした ZFN の mRNA は *In vitro* で合成し、Lipofection により Huh7-7 に導入し、Single cell isolation によって 228 クローンの細胞を単離した。遺伝子変異が挿入されているかどうかを Cel-I assay により解析した。今回設計された ZFN は遺伝子の相同性によって IL28A も切断されるため、IL28A が切断されたクローンは除外した。IL28B 遺伝子に変異が挿入されているクローンについて詳細に遺伝子解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報に厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

Rs8099917 の SNP を指標にして、Huh7 細胞において IL28B 遺伝子の存在する 19 番染色

体の本数を検討したところ、Major allele が 1 本と Minor allele が 2 本の合計 3 本からなることが分かった。ZFN の mRNA を導入してクローニングした 228 種類の細胞から、ゲノムを抽出した。Cel-I assay によってゲノムへの変異の導入の有無を検討したところ、IL28A または IL28B のいずれかに変異が導入されているクローンが 104 クローンであった。そのうち、59 クローンには IL28A に変異が挿入されていたため除外し、45 クローンに対して詳細な遺伝子変異解析を行った。現在までに 18 クローンに対する遺伝子変異解析を行い、12 クローンには何らかの変異が確認された。しかし、エクソンにフレームシフトを起こさない変異が 8 クローン存在したため、最終的に Major allele のノックアウトが 1 クローン、Minor allele の 1 本の Allele のみのノックアウトが 3 クローン樹立できた。Major allele のノックアウト細胞においては、IL28B の mRNA の発現を誘導させたところ、Major allele 由来の mRNA が誘導されないことが確認された。

D. 考察

Hetero-genotype である Huh7 細胞において、IL28B 遺伝子の Major allele のみがノックアウトされたクローンが樹立された。引き続き Minor allele のノックアウト細胞も樹立し、IL28B 遺伝子多型と IFN 感受性の相関メカニズムを明らかにしたい。

E. 結論

ZFN によって、Allele 特異的なノックアウト細胞を樹立することが可能である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. *J. Virol.*, (in press).
- 2 Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, and Matsuura Y. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J. Virol.*, 2011; 85, 13185-13194.
- 3 Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, and Suzuki T. Role of the ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J Biol Chem.*, 2011; 286, 37264-37273.
- 4 Katoh H, Mori Y, Kambara H, Abe T, Fukuhara T, Morita E, Moriishi K, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through an interaction with viral proteins and RNA. *J. Virol.*, 2011; 85, 10976-10988.
- 5 Mori Y, and Matsuura Y. Structure of hepatitis E viral particle. *Virus Res.*, 2011; 61, 59-64.
- 6 Kambara H, Tani H, Mori Y, Abe T, Katoh H, Fukuhara T, Taguwa S, Moriishi K, and Matsuura Y. Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. *Virology*, 2011; 412, 211-219.
- 7 Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi M, and Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One*, 2011; 6, e15967.
- 8 Fukuhara T, Tani H, Shiokawa M, Goto Y, Abe T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, and Matsuura Y. Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus. *Microbes Infect.*, 2011; 13, 405-412.
- 9 Motomura T, Taketomi A, Fukuhara T, Mano Y, Takeishi K, Toshima T, Harada N, Uchiyama H, Yoshizumi T, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, and Maehara Y. The Impact of IL28B Genetic

- Variants on Recurrent Hepatitis C in Liver Transplantation : Significant Lessons from a Dual Graft Case. *Am. J. Transplant.*, 2011; 11, 1325-1329.
- 10 Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J. Hepatol.*, 2011; 54, 432-438.
 - 11 Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T., and Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology*, 2011; 410, 38-47.
 - 12 Yamamoto M, Ma J.S, Mueller C, Kamiyama N, Saiga H, Kubo E, Kimura T, Okamoto T, Okuyama M, Kayama H, Nagamune K, Takashima S, Matsuura Y, Soldati-Favre D, and Takeda K. ATF6 β is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18. *J. Exp. Med.*, 2011; 208, 1533-1546.
2. 学会発表
- 1 松浦善治: 基調講演: C型肝炎・肝癌制圧の分子基盤: 第47回日本肝臓学会総会、東京、6月2日-3日, 2011.
 - 2 松浦善治: 特別講演: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関与する宿主因子: 第48回日本ウイルス学会九州支部総会、門司、8月26日-27日, 2011.
 - 3 松浦善治: 特別講演: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に関与する宿主因子 ~細胞内蛋白質分解システムの関与について~: 第10回Hepatitis Expert Meeting、東京、8月27日, 2011.
 - 4 Fukuhara T, Shiokawa M, Ninomiya A, Kambara H, Katoh H, Morita E, Wataru Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells.: 第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日, 2011.
 - 5 Ninomiya A, Abe T, and Matsuura Y. Induction of IFN by inoculation of recombinant baculovirus in mouse embryonic fibroblasts suppresses transgene expression. 同上
 - 6 Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki, Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. 同上
 - 7 Katoh H, Mori Y, Kambara H, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through the interaction with viral proteins and RNA. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日-16日, 2011.
 - 8 Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ohara Y, Ono C, and Matsuura Y. miR122 participates in the determination of cell tropism of hepatitis C virus. 同上
 - 9 Tanaka T, Matsuura Y, and Kamitani W. Circumvention of the translational shut-off in cells infected with SARS coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA. 同上
 - 10 Tanaka T, Matsuura Y, and Kamitani W. Circumvention of the translational shut-off in cells infected with SARS coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA. The American Society for Virology, 30th Annual Meeting, University of Minnesota, Minnesota, July 16-20, 2011.
 - 11 Katoh H, Mori Y, Kambara H, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through the interaction with viral proteins and RNA. 同上
 - 12 Fukuhara T, Shiokawa M, Ninomiya A, Kambara H, Katoh H, Morita E, Wataru Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. 同上
 - 13 Abe T, Fukuhara T, Morita E, and

- Matsuura Y. Annexins negatively regulate HCV RNA replication. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, September, 8-12, 2011.
- 14 Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Morita E, Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. 同上
- 15 Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of HCV through an interaction with NS2. Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y. Wakita T, and Aizaki H. 同上
- 16 Kawakami K, Kasai H, Yamashita A, Kato I, Matsuura Y. Kusunoki M, and Moriishi K. Regulation of HCV replication by Hsp90 through FKBP8-dependent and -independent pathways. 同上

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働省科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
分担研究報告書(平成23年度)

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

C型肝炎感染肝癌に対する抗腫瘍免疫細胞療法の開発

研究分担者 大段秀樹 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨 当地域においては、C型肝炎合併肝硬変は肝移植の最も頻度の高い適応疾患の一つである。しかし、移植後生体防御能の抑制により肝癌再発の危険性が助長される。我々は、正常肝臓に内在する未成熟natural killer (NK)細胞に抗癌分子(TRAIL)が誘導可能で、移植後の養子抗腫瘍免疫療法として臨床導入し得ることを証明した。C型肝炎感染肝細胞癌から、NK細胞が如何に活性化の促進及び抑制シグナルを伝達されるのかを*in vivo*で解析する目的で、肝癌合併C型肝炎ウイルス感染ヒト肝細胞キメラマウスモデルを確立する。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)性肝硬変は、高率に肝臓癌(HCC)へ移行し、現在のところ肝移植が唯一の適応となる。我々は、HCV合併HCCでの肝移植症例に対し、未成熟natural killer(NK)細胞を活性化させ移入する養子療法を臨床導入し、癌再発の有意な低下とウイルス量の減少を得た。HCV感染HCCから、NK細胞が如何に活性化の促進及び抑制シグナルを伝達されるのかを解明できれば、より効果的な治療法の開発に有用である。しかし、HCV感染HCC合併動物モデルはこれまでに存在しない。本研究では、ヒト肝臓癌生着マウスモデルとしてのヒト肝細胞キメラマウスの有用性について検討した。

B. 研究方法

フェニックスバイオ社のヒト肝細胞キメラマウス(14~16週齢)を用い、ヒト肝細胞癌株(Huh7)を 0.25×10^6 、 0.5×10^6 、

1.0×10^6 cells/マウスの割合で、経門脈的に注入した。また、マウスのNK細胞による細胞傷害性の可能性を考慮し、癌細胞の移入前日に抗アジアロGM1投与群も合わせて検討した。判定は、血清中のヒトアルファフェトプロテイン(hAFP)値、アルブミン量をELISAで解析した。また、癌移入後14日における肝臓内の腫瘍の生着を組織学的に検索した。

C. 研究結果

Huh7はAFP産生のヒト肝臓癌株である。そこで、Huh7移入前と、移入後7、14日目における血清中のhAFP値をHOPE LABORATORIES社のMICROWELL ELISAキットを用いて測定した。その結果、正常ヒト肝細胞で置換したヒト肝細胞キメラマウスは、hAFPの産生を認めなかったが、 1.0×10^6 cellsのHuh7を移入した群では、全例において14日目のhAFPの増加を認めた。そのうち、14日目におい

て高値 (300ng/ml) を呈したマウスは、組織学的にも肝臓内への腫瘍の生着を認めた (図 1)。

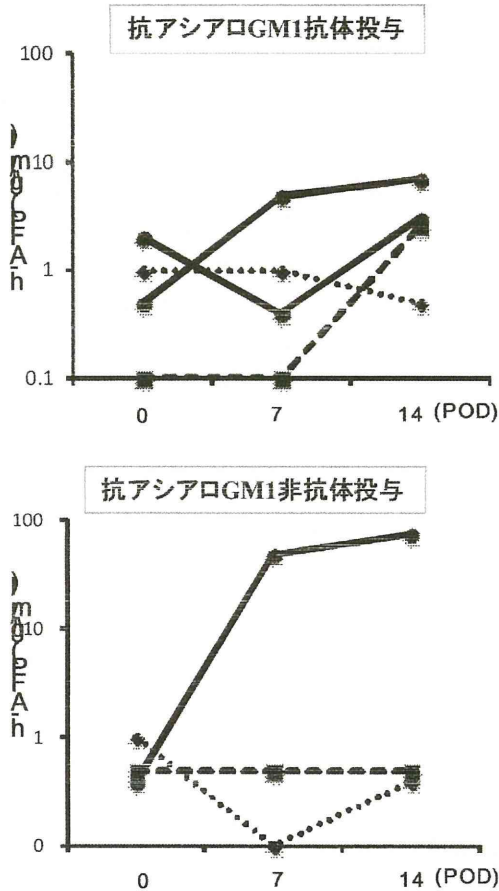


図1. Huh-7移入前後における血清AFP値の推移 (— : 1 × 10⁶ cells, - - : 0.5 × 10⁶ cells, : 0.25 × 10⁶ cells)

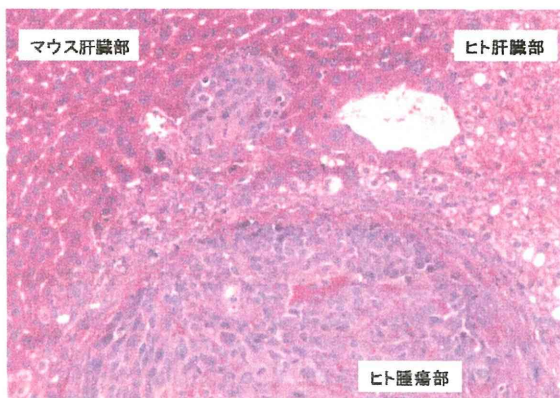


図1. Huh-7移入1日における肝組織 (HE染色 x10倍)

D. 考察

我々は、異種移植において、マクロファージ、NK細胞、B細胞に表出する阻害受容体シグナル制御蛋白 α (SIRP α) が、ブタ細胞上に表出するインテグリン関連蛋白質 (CD47分子) を認識できず免疫カスケードが促進され、異種細胞が激しい拒絶応答を被ることを明らかにしてきた。一方、肝癌細胞は異好性抗原として異種細胞と共通の糖脂質 (N-グリコリル型シアル酸) を表出しているにも関わらず、CD47-SIRP α シグナル伝達による抑制機構によって免疫回避している可能性を最近我々は確認した。そこで、肝癌細胞が生体防御機構を掻い潜り免疫抑制環境を構築する機構として、CD47-SIRP α シグナル伝達の有意性を解明し、その制御により分子標的治療や細胞療法効果を著明に増強する新規抗腫瘍治療戦略を開発することを目指して研究を進めている。

シアル酸含有糖脂質であるガングリオシドは、広く動物細胞膜に局在する。ブタなどの動物細胞の糖鎖においてはN-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) と NeuGc が共存しているが、通常健常人の細胞の糖鎖には NeuGc は存在しない。最近我々は、NeuGc 抗原がヒト自然抗体やB細胞の標的となり拒絶応答が誘導されることを報告した。一方、ヒトの細胞であってもシアル酸トランスポーター遺伝子の発現が上昇した癌細胞では、NeuGc ガングリオシド GM2 (NeuGc-GM2) が増加することが知られている。したがって、NeuGc は癌抗原としてヒト免疫監視機構に認識されるが、前述した CD47-SIRP α シグナルを介した自己細胞の免疫回避・寛容環境下では、NeuGc を標的分子とした治療

効果に制限があることが予測される。

本研究では、NeuGc 表出肝癌腫瘍株が生着したヒト肝細胞キメラマウスモデルが確立した。今後、HCV 感染によって NeuGc の発現が以下に影響するかを解析し、NeuGc を標的とし NK 細胞を effector とする治療戦略が成り立つか否かを検討する。

E. 結論

ヒト肝癌細胞が生着したヒト肝細胞キメラマウスモデルを確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Wang C, Wang H, Ide K, Wang Y, Van Rooijen N, Ohdan H, Yang YG. Human CD47 expression permits survival of porcine cells in immunodeficient mice that express SIRP α capable of binding to human CD47. *Cell Transplant*. 2011. 4[Epub ahead of print].
2. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. *J Surg Res*. 2011. 167(1): e29-37.
3. Tashiro H, Ishiyama K, Ohira M, Igarashi Y, Tahara H, Ide K, Onoe T, Tanaka Y, Ohdan H. Impact of adjuvant immunotherapy using liver allograft-derived lymphocytes on bacteremia in living-donor liver transplantation. *Transplantation*. 2011. 92(5):575-80.

4. Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Takahashi S, Itamoto T, Chayama K, Ohdan H. Impact of pegylated interferon therapy on outcomes of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma after curative hepatic resection. *Ann Surg Oncol*. 2012. 19(2):418-425.

5. Ide K, Tanaka Y, Onoe T, Banshodani M, Tazawa H, Igarashi Y, Basnet NB, Daskali M, Tashiro H, Ohdan H. Evidence for the immunosuppressive potential of calcineurin inhibitor-sparing regimens in liver transplant recipients with impaired renal function. *J Transplant*. 2011. Epub 2011 Jul 6.

6. Kuroda S, Tashiro H, Igarashi Y, Tanimoto Y, Nambu J, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tanaka Y, Ohdan H. Rho inhibitor prevents ischemia-reperfusion injury in rat steatotic liver. *J Hepatol*. 2011. 56(1):146-152.