

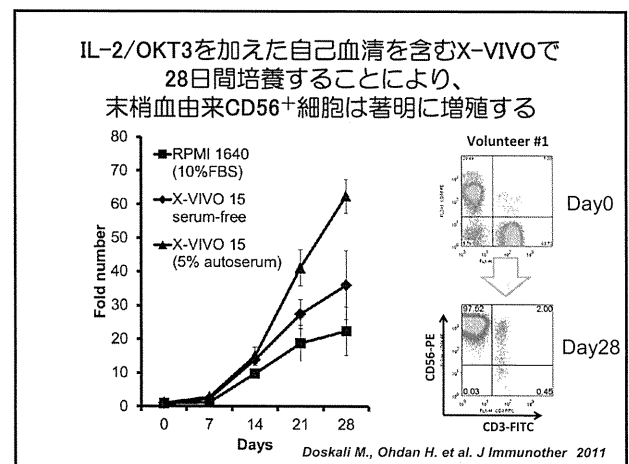
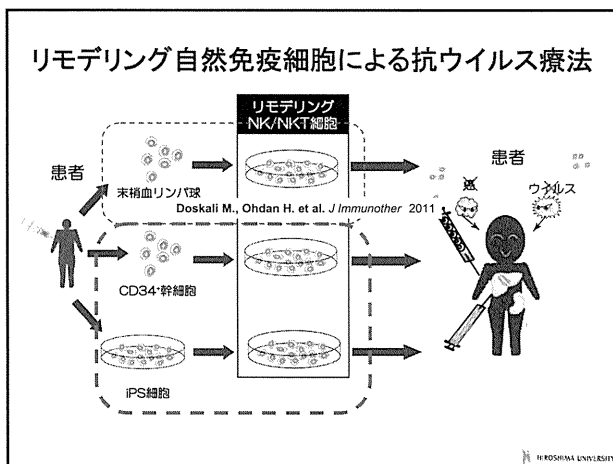
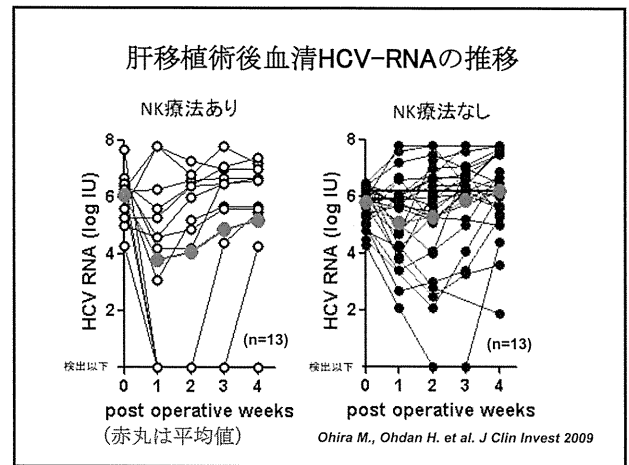
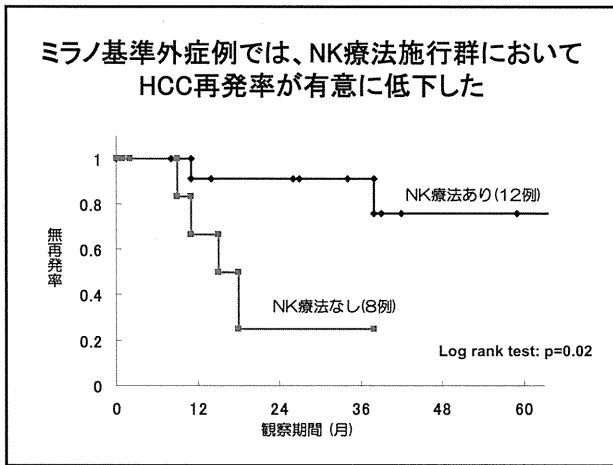
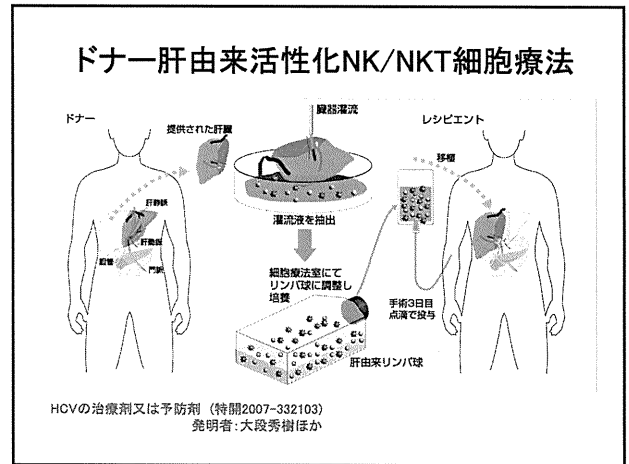
Hiroshima University

厚生労働省 肝炎等克服緊急対策研究事業 (平成22~24年度)
January 26, 2012

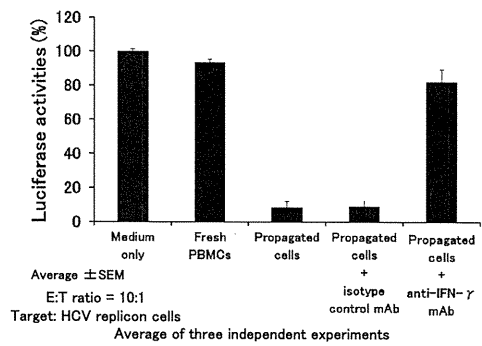
自然免疫細胞リモデリングによる ウイルス性肝炎の新規治療法の開発

広島大学大学院先進医療開発科学講座 外科学
広島大学病院 消化器外科・移植外科

大段 秀樹

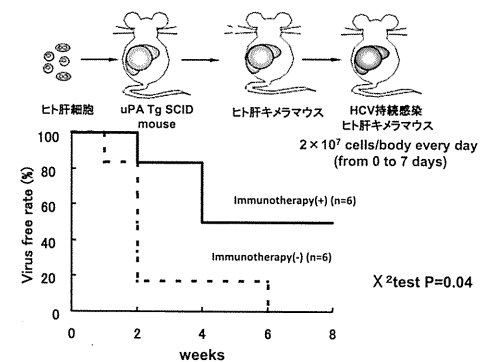


Propagated NK 細胞はIFN- γ 依存性に抗HCV効果を発揮する



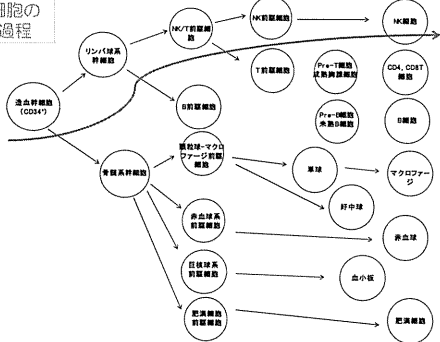
Doskali M., Ohdan H. et al. J Immunother 2011

ヒト肝キメラマウスモデルにおいて Propagated NK 細胞の投与により HCV感染を有意に抑制することができた

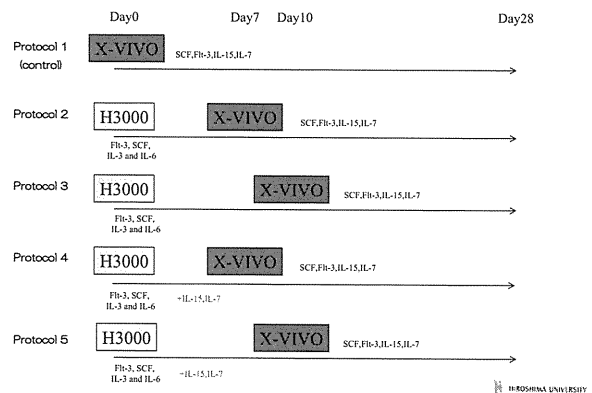


末梢血CD34⁺細胞からのリモデリング

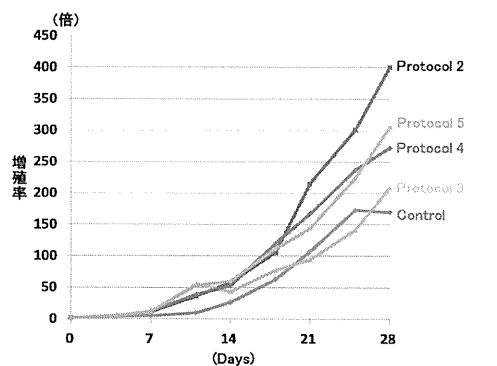
免疫細胞の分化過程



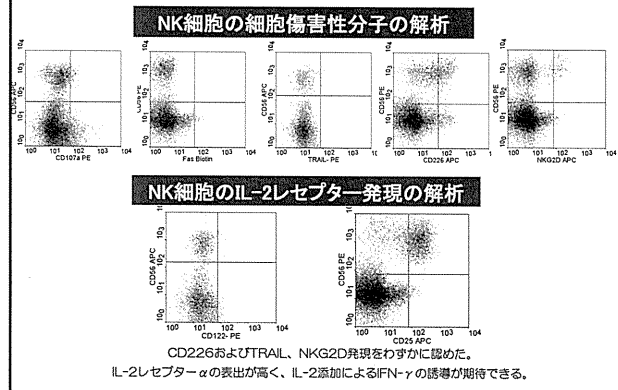
骨髄CD34⁺造血幹細胞からのNK細胞誘導プロトコール



骨髄CD34⁺造血幹細胞由来分化細胞増殖率

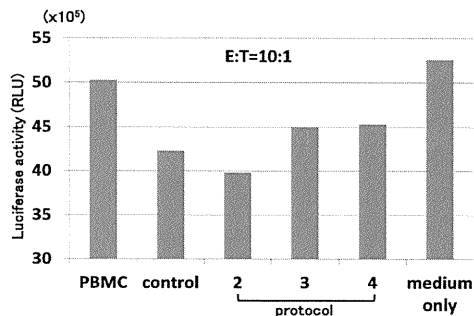


リモデリング細胞のphenotype解析 (Day28) Protocol 2



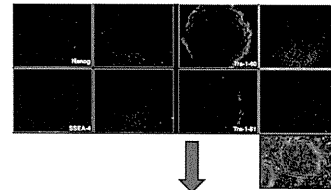
リモデリング細胞のHCV増幅抑制能評価

(Replicon assay using Transwell system) (Day28)



iPS細胞由来NK細胞のリモデリングの確立

ヒト線維芽細胞由来iPS細胞の樹立 (01, Tic)



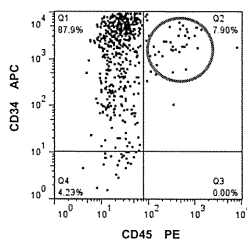
分化した細胞からCD34 MicroBeadsを用い、造血幹細胞を回収



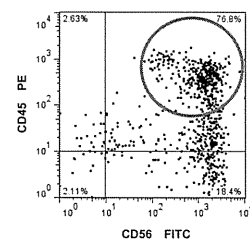
分化したNK細胞を回収し、Phenotype解析

iPS (Tic) 細胞からCD56⁺ NK細胞への分化

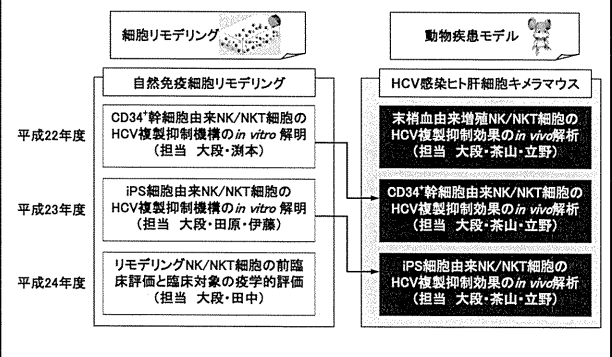
分化① Day14



分化② Day32



研究のステップ



平成23年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題 : 肝炎ウイルス感染における自然免疫応答の解析と新たな治療標的の探索に関する研究
 課題番号 : H22-肝炎-一般-010
 予定期間 : H22年度からH24年度まで
 研究代表者 : 松浦善治
 所属研究機関 : 大阪大学
 所属部局 : 微生物病研究所
 職名 : 教授
 年次別研究費(交付決定額) : 1年目 64,480,000円 2年目 60,611,000円

I. 研究の意義

- (1) 全世界には2億人ものHCV感染者が存在する。
- (2) HCV感染は、慢性肝炎、肝硬変、そして肝細胞癌の主要な原因である。
- (3) 現行の治療法の著効率は50%ほどであり新規治療法の開発が急務である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HCVの宿主免疫回避機構と持続感染機構を解明する。
- (2) 患者血清由来HCVの細胞培養系を確立する。
- (3) 現行の慢性C型肝炎療法を補完する新しい免疫制御療法の開発が期待される。

III. 2年間の研究成果

- ・研究代表者(松浦善治)
慢性C型肝炎患者で誘導されている1P-10の発現に、内在性ヒアルロン酸とCD44の相互作用の関与が示唆された。また、HCVの複製に重要な宿主因子であるmicroRNA122をヒト肝臓由来細胞株に発現させることにより、HCVの実験室株の新規感受性細胞株を樹立した。
- ・研究分担者(竹内 理)
HCV感染認識に重要なRIG-IのHelicase活性の生体内における重要性を明らかにした。また、自然免疫によるウイルス排除に関わるNK細胞の活性化における転写調節因子IκBζの重要性を明らかにした。
- ・研究分担者(考藤達哉)
C型慢性肝炎患者では全身性にトリプトファン代謝酵素/Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)活性が亢進していた。炎症性サイトカイン刺激によって、樹状細胞(DC)にIDOが高発現し、DCで産生されるIDOは制御性T細胞の誘導に関与することが示された。
- ・研究分担者(藤田尚志)
RIG-Iはストレス顆粒を形成してウイルスRNAを感知することが示された。RIG-Iは細胞内で増殖するウイルスを検出し、種々のRNA結合蛋白質を凝集して活性化し、そこにミトコンドリアが引き寄せられてIPS-1の凝集体が形成されると考えられる。IPS-1はミトコンドリア上に係留されているため、RIG-Iと相互作用するためにはミトコンドリアのダイナミックな分裂と融合が必須であることが示唆された。
- ・分担研究者(瀬谷 司)
IPS-1およびIFN受容体遺伝子を欠損させたマウスでHCV実験室株のin vivoモデルを作製した。HCVは肝細胞に持続感染し、ポリオウイルスのようにmRNAの翻訳阻害を起こさないが、

TLR3 を介して IFN 誘導経路を活性化できることが明らかとなった。

・研究分担者(土方 誠)

ヒト肝細胞では恒常的に IRF7 遺伝子の発現が認められ、ウイルス感染初期における IFN α の発現誘導に関与しており、さらに、感染初期から RIG-I 依存的に IFN λ の発現が高く誘導されることを明らかにした。HCV に高い感受性を示す Huh7 細胞ではウイルス感染による自然免疫関連遺伝子群が発現しないことが示された。

・研究分担者(小原道法)

HCV の感染や polyIC の感作によって、キメラマウスの肝臓に IFN λ が IFN β に比べて強く誘導されることを見出した。polyIC を投与した HepG2 細胞では、IFN λ が IFN β に比べて優位であったが、MRC5 や 293T 細胞では IFN β が優位であった。さらに、IFN λ の誘導は TLR3 や RIG-I の欠損により抑制された。

・研究分担者(池田正徳)

IL28B 遺伝子周辺に存在する 1 変異遺伝子多型(SNP)が IFN 治療効果と強く相関することが明らかにされている。そこで、HCV に感受性を示す、ヒト肝臓由来の Huh7 と Li23 細胞は、それぞれ IFN 治療抵抗性と感受性の SNP であった。Li23 細胞で複製する HCV RNA は Huh7 細胞のものに比べて IFN λ の感受性が約 100 倍高かった。また、制限酵素を用いた簡便な IL28B SNP の判定法を開発した。

IV. 24 年度の課題

- (1) HCV 実験室株に感受性を示す新しい細胞株を用いて、HCV 感染によって変動する宿主因子の変動を解析する。(松浦)
- (2) RIG-I の活性化における Helicase の役割とウイルス感染応答調節機構を解析する。(竹内)
- (3) HCV 感染における IDO の誘導機構と、C 型慢性肝炎に対する新規抗 HCV 薬併用治療における IDO の意義を明らかにする。(考藤)
- (4) RIG-I の凝集体/ストレス顆粒の形成を促進して抗 HCV 応答を強化する条件を検討する。また、ストレス顆粒形成のドミナント阻害蛋白質を発現する細胞株を樹立し、HCV 実験室株や患者血清由来 HCV の増殖を検討する。(藤田)
- (5) 非肝実質細胞における HCV の認識応答に関与する宿主因子を解析する。これらの因子の抗 HCV 活性をマウスモデルで検証する。(瀬谷)
- (6) HCV プロテアーゼを発現する不死化ヒト肝細胞を用いて、自然免疫関連因子の検索を進めるとともに、この細胞を三次元培養することで、患者血清由来 HCV の増殖を試みる。(土方)
- (7) polyIC リポソーム製剤による IFN λ 誘導に関与する新規宿主因子を解析し、この作用機序に基づいた新規阻害剤の検索を行う。(小原)
- (8) 新規 IL28B SNP の判定法がヒト検体にも応用できるか否かを検討する。また、IL28B SNP の異なる肝細胞株を用いて IFN 応答の違いを検討する。(池田)

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) HCV の免疫回避機構が解明され、その責任分子を標的とした免疫制御療法は、従来の治療効果を改善することが期待される。
- (2) 保健、医療、福祉の向上に直結するとともに、高齢者医療費の低減に貢献する。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

2011 年度

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**

2011 (in press).

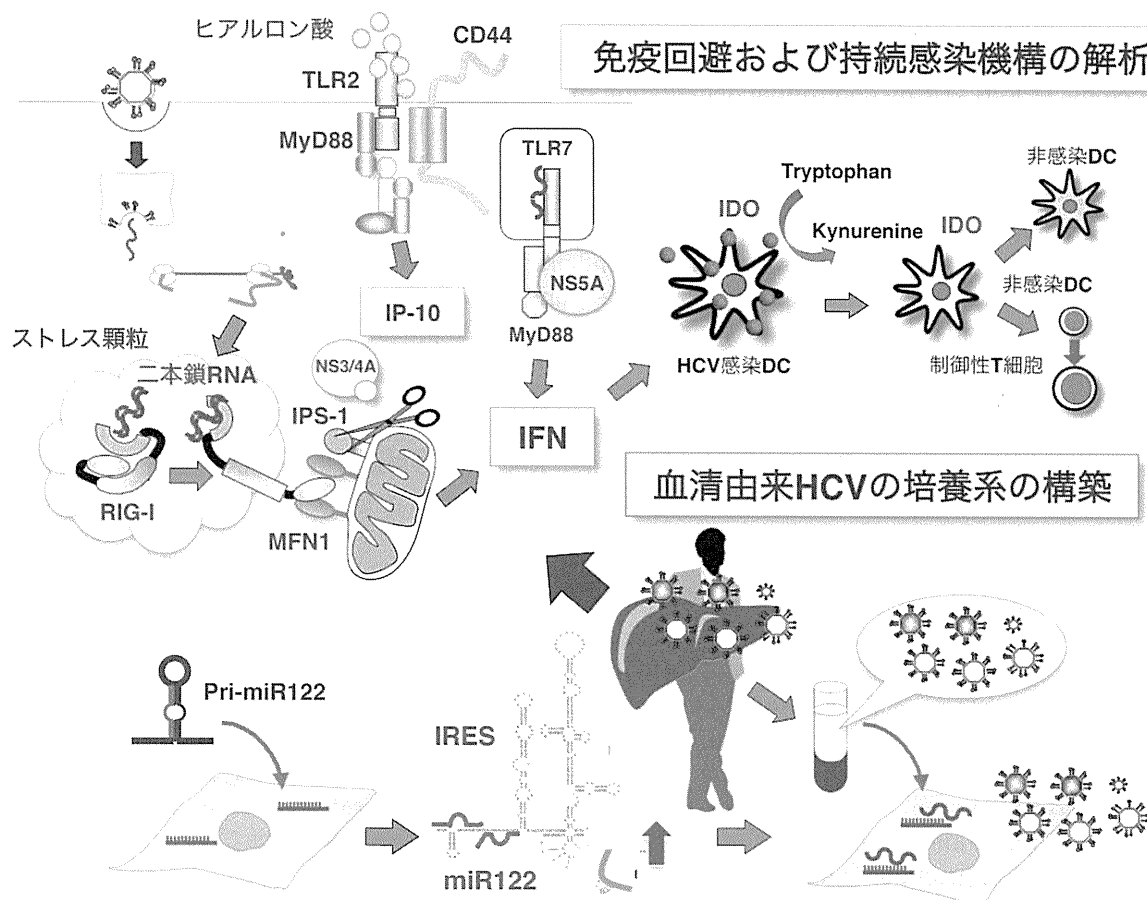
2. Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, and Matsuura Y. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. **J Virol** 2011; 85:13185-13194.
3. Iwasaki H, Takeuchi O, Teraguchi S, Matsushita K, Uehata T, Kuniyoshi K, Satoh T, Saitoh T, Matsushita M, Standley DM, and Akira S. The I κ B kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1. **Nat Immunol** 2011; 12:1167-1175.
4. Saitoh T, Satoh T, Yamamoto N, Uematsu S, Takeuchi O, Kawai T, and Akira S. Antiviral protein Viperin promotes Toll-like receptor 7- and Toll-like receptor 9-mediated type I interferon production in plasmacytoid dendritic cells. **Immunity** 2011; 34:352-363.
5. Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Mochizuki K, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Fukui H, Inui Y, Hijioka T, Inada M, Kaytayama K, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Kato M, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T and Hayashi N. Indications and limitations for aged patients with chronic hepatitis C in pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin combination therapy. **J Hepatol** 2011; 54: 604-611.
6. Ouda R, Onomoto K, Takahashi K, Edwards MR, Kato H, Yoneyama M and Fujita T. Retinoic Acid-inducible Gene I-inducible miR-23b Inhibits Infections by Minor Group Rhinoviruses through Downregulation of the Very Low Density Lipoprotein Receptor. **J Biol Chem** 2011; 286: 26210-219.
7. Aly HH, Oshiumi H, Matsumoto M, Shimotohno K, Wakita T, and Seya T. Establishing mouse hepatoma cell lines permissive to human hepatitis C virus. **PLoS ONE** 2011; 6: e21284.
8. Oshiumi H, Okamoto M, Fujii M, Kawanishi T, Matsumoto M, Koike S, and Seya T. The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. **J Immunol** 2011 (in press).
9. Takano T, Tsukiyama-Kohara K, Hayashi M, Hirata Y, Satoh M, Tateno C, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Sudo M, and Kohara M. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. **J Hepatol** 2011; 55:512-521.
10. Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, and Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. **J Virol** 2011; 85:6882-6892.
11. Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, and Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and hepatitis C virus strains are required for the objective evaluation of anti-hepatitis C virus reagents. **Biochem Biophys Res Commun** 2011; 409:663-668.

2010 年度

12. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, and Matsuura Y. Involvement of PA28g in the propagation of hepatitis C virus. **Hepatology** 2010; 52:411-420.
13. Miyake T, Satoh T, Kato H, Matsushita K, Kumagai Y, Vandebon A, Tani T, Muta T, Akira S, and Takeuchi O. I κ B ζ is essential for natural killer cell activation in response to IL-12 and IL-18. **Proc Natl Acad Sci USA** 2010; 107:17680-17685.
14. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, and Takeuchi O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. **Proc Natl Acad Sci USA** 2010;107:1512-1517.
15. Miyagi T, Takehara T, Nishio K, Shimizu S, Kohga K, Li W, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, and Hayashi N. Altered interferon-alpha-signaling in natural killer cells from patients with chronic hepatitis C virus infection. **J Hepatol** 2010;53:424-430.
16. Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, Yoneyama M and Fujita T.: Virus-Infection or 5'ppp-RNA Activates Antiviral Signal through Redistribution of IPS-1 Mediated by MFN1. **PLoS Pathog** 2010;6:e1001012.
17. Kushima H, Wakita T, and Hijikata M. A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. **J Virol** 2010; 84:9118-9127.
18. Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, and Kohara M. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. **J Virol** 2010; 84:303-311.

VII. III(2年間の研究成果)の概要図等

ウイルス肝炎感染における自然免疫応答の解析と新たな治療標的の探索に関する研究



- ✓慢性C型肝炎患者で誘導されているIP-10の発現に、内在性ヒアルロン酸とCD44の相互作用の関与が示唆された。また、microRNA122をヒト肝臓由来細胞株に発現させることにより、HCVの実験室株の新規感受性細胞株を樹立した。(松浦)
- ✓HCV感染認識に重要なRIG-IのHelicase活性の生体内における重要性を明らかにした。また、自然免疫によるウイルス排除に関わるNK細胞の活性化における転写調節因子IkBzの重要性を明らかにした。(竹内)
- ✓C型慢性肝炎患者では全身性にIDO活性が亢進しており、炎症性サイトカイン刺激によって、樹状細胞で産生されるIDOは制御性T細胞の誘導に関与することが示された。(考藤)
- ✓RIG-Iはストレス顆粒を形成してウイルスRNAを感知することが示された。IPS-1はミトコンドリア上に係留されているため、RIG-Iと相互作用するためにはミトコンドリアのダイナミックな分裂と融合が必須であることが示唆された。(藤田)
- ✓IPS-1およびIFN受容体遺伝子を欠損させたマウスでHCV実験室株のin vivoモデルを作製した。HCVはTLR3を介してIFN誘導経路を活性化できることが明らかとなった。(瀬谷)
- ✓ヒト肝細胞では恒常的にIFNλ誘導遺伝子の発現が認められ感染初期からRIG-I依存的にIFNλの発現が高く誘導されることを明らかにした。Huh7細胞ではウイルス感染による自然免疫関連遺伝子群が発現しないことが示された。(土方)
- ✓HCVの感染やpolyICの感作によって、キメラマウスの肝臓にIFNλがIFNβより優位に誘導されることを見出した。IFNλの誘導はTLR3やRIG-Iの欠損により抑制された。(小原)
- ✓ヒト肝臓由来のHuh7とLi23細胞は、それぞれIFN治療抵抗性と感受性のSNPを保持していた。Li23細胞で複製するHCV RNAはHuh7細胞のものに比べてIFNλの感受性が約100倍高かった。また、簡便なIL28B SNPの判定法を開発した。(池田)

研究代表者の研究歴等

過去に所属した研究機関の履歴

所 属	職 名	在職期間
第一製薬株式会社中央研究所	研究員	昭和 55 年 4 月-昭和 57 年 7 月
国立予防衛生研究所	研究員	昭和 57 年 8 月-平成 4 年 8 月
オックスフォード大ウイルス学研究所	研究員	昭和 59 年 9 月-昭和 61 年 9 月
国立感染症研究所ウイルス第二部	室長	平成 4 年 8 月-平成 12 年 3 月
大阪大学微生物病研究所	教授	平成 12 年 4 月-現在に至る

主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

第一製薬株式会社中央研究所	大谷 剛 主幹研究員
国立予防衛生研究所	森田千春 室長
オックスフォード大ウイルス学研究所	David H. L. Bishop 所長
国立感染症研究所ウイルス第二部	宮村達男 部長 (前所長)
山梨大学医学研究科微生物学教室	森石恒司 教授

主な研究課題

- 1 HCV の感染増殖機構と病原性発現機構の分子生物学的解析。
- 2 慢性C型肝炎の新しい治療法の開発。
- 3 遺伝子治療用新規ウイルスベクターの開発。

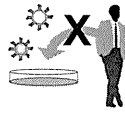
これまでの研究実績

1. Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. Kambara H., Fukuhara T., Shiokawa M., Ono C., Ohara Y., Kamitani W., and Matsuura Y. J. Virol., (in press).
2. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. Taguwa S., Kambara H., Fujita N., Noda T., Yoshimori T., Koike K., Moriishi K., and Matsuura Y. J. Virol., 85, 13185-13194 (2011).
3. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through an interaction with viral proteins and RNA. Katoh H., Mori Y., Kambara H., Abe T., Fukuhara T., Morita E., Moriishi K., and Kamitani W., and Matsuura Y. J. Virol., 85, 10976-10988 (2011).
4. Involvement of PA28g in the propagation of hepatitis C virus. Moriishi K., Shoji I., Mori Y., Suzuki R., Suzuki T., Kataoka C., and Matsuura Y. Hepatology, 52, 411-420 (2010).
5. Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. Tani H., Shiokawa M., Kaname Y., Kambara H., Mori Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. J. Virol., 84, 2798-2807 (2010).
6. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Yamashita T., Mori Y., Miyazaki N., Cheng H.R., Yoshimura M., Unno H., Shima R., Moriishi K., Tsukihara T., Li T.C., Takeda N., Miyamura T., and Matsuura Y. PNAS, 106, 12986-12991 (2009).
7. Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. Kukihara H., Moriishi K., Taguwa S., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Fukuhara T., Taketomi A., Maehara Y., and Matsuura Y. J. Virol., 83, 7959-7969 (2009).
8. Co-chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. Taguwa S., Kambara H., Omori H., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. J. Virol., 83, 10427-10436 (2009).
9. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. J. Virol., 82, 8349-8361 (2008).
10. Processing of capsid protein by cathepsin L plays a crucial role in replication of the Japanese encephalitis

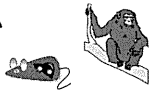
- virus in neural and macrophage cells. Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 8477-8487 (2007).
11. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 8601-8612 (2007).
 12. Involvement of PA28 γ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 1727-1735 (2007).
 13. Oligomerization of Hepatitis C Virus Core Protein Is Crucial for Interaction with Cytoplasmic Domain of E1 Envelope Protein. Nakai K., Okamoto T., Kimura-Someya T., Ishii K., Lim C-K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T., Nunberg J.H., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 80, 11265-11273 (2006).
 14. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. Okamoto T., Nishimura Y., Ichimura T., Suzuki K., Miyamura T., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y., *EMBO J.*, 25, 5015-5025 (2006).

HCV基礎研究の問題点

- ✓ 患者由来HCVの細胞培養系がない
- JFH1株等のHCVの実験室株をヒト肝癌由来のHuh7細胞で培養できるようになったが、未だ患者血清由来のHCVの野生株を分離培養できない



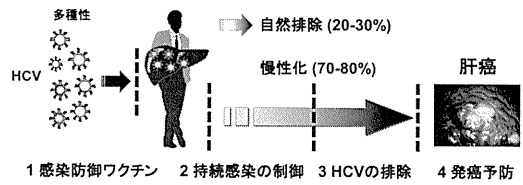
- ✓ 感受性を示す小型動物がない
- テンバジュー…倫理的な障害
- キメラマウス…免疫不全



- ✓ HCVは多様性(Quasispecies)を示す
- 現行のアッセイ系は患者体内に存在する多様なHCVの感染様式を反映しているとは限らない



C型慢性肝炎から肝癌への進展を阻止する



厚生労働科学研究費補助金 肝炎等緊急対策研究事業

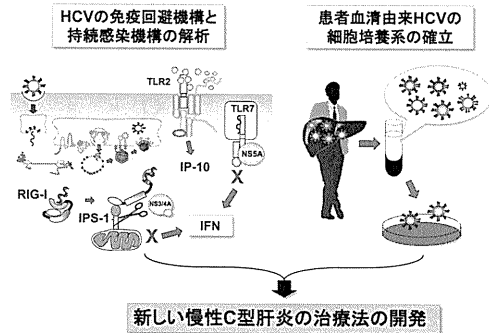
肝炎ウイルス感染における自然免疫応答の解析と新たな治療標的の探索に関する研究

代表研究者 松浦善治
 分組研究者 竹内 理
 考藤達哉
 藤田尚志
 土方 誠
 池田正徳
 小原道法
 瀬谷 司

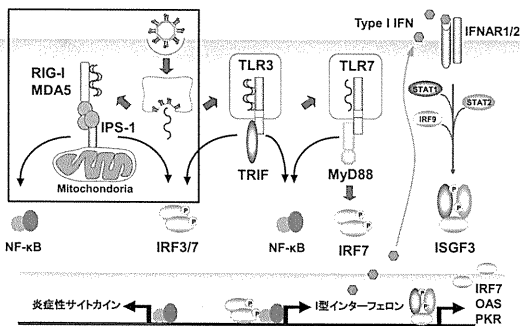
大阪大学微生物病研究所
 大阪大学大学院医学系研究科
 京都大学ウイルス研究所
 京都大学ウイルス研究所
 岡山大学大学院医学系総合研究科
 東京都臨床医学総合研究所
 北海道大学大学院医学系研究科

問題点	研究テーマ
HCVは宿主の免疫系を回避して持続感染する	細胞内RNAセンサーの解析(竹内・藤田・瀬谷) HCVの免疫回避機構の解析(考藤・池田) HCV感染の慢性化機構の解析(小原・松浦)
細胞培養系が限定される	新規 <i>in vitro</i> 培養系の確立(松浦・土方)

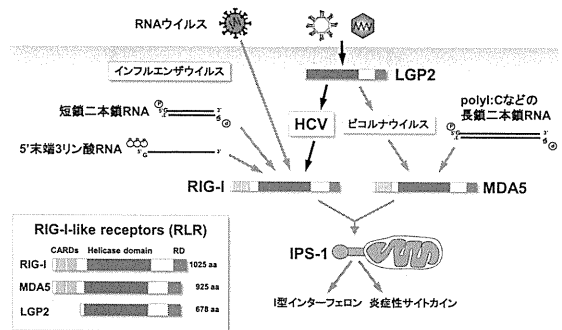
目的

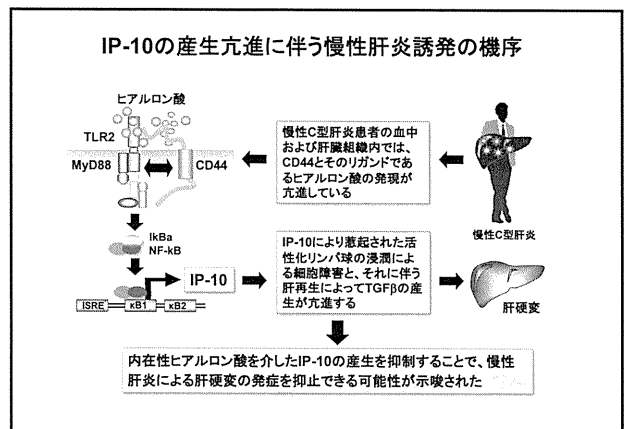
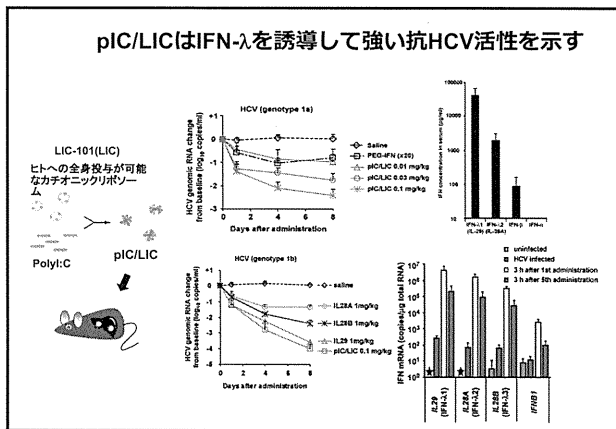
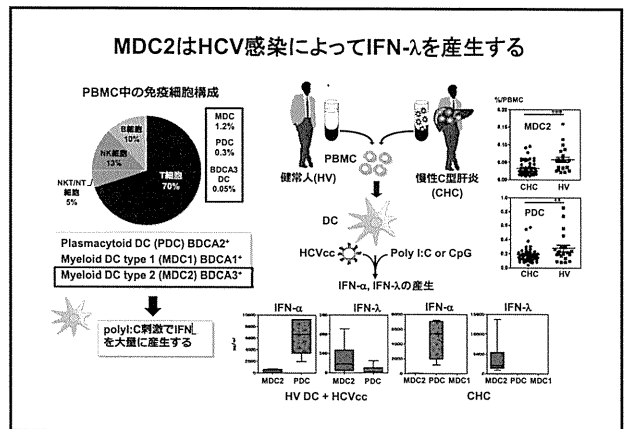
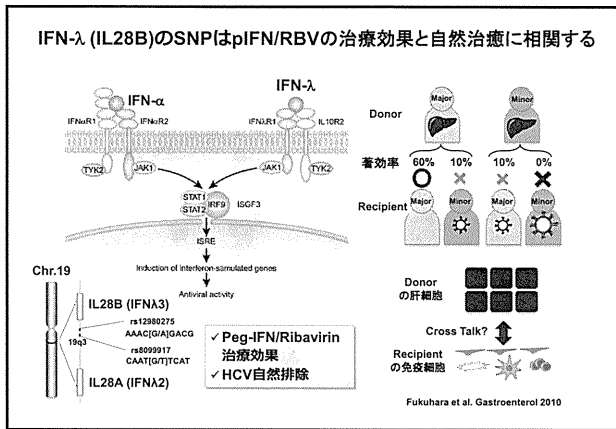
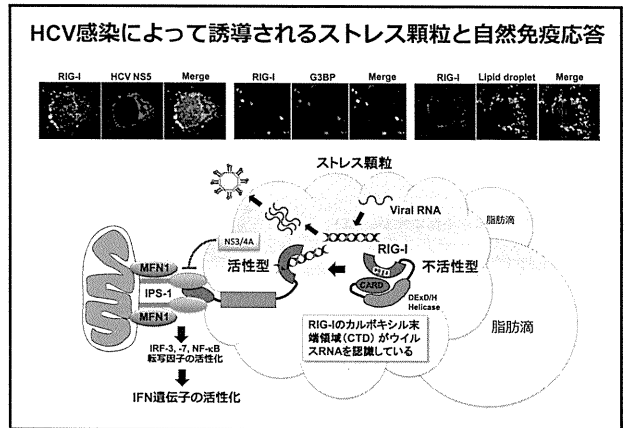
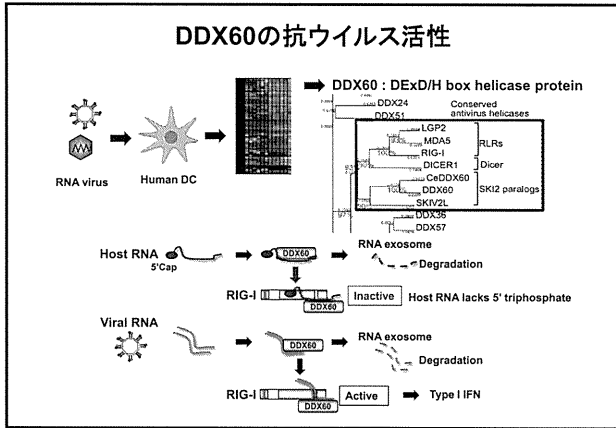


ウイルスRNAによるIFNの誘導経路

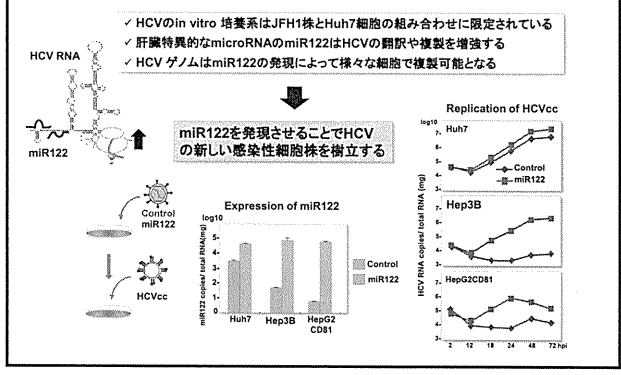


RIG-I-like receptor (RLR) によるウイルスRNAの認識

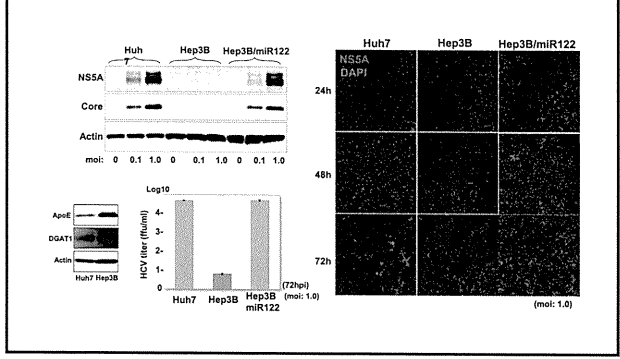




miR122の発現による新規HCV感染性細胞株の樹立



Hep3B/miR122はHCVccの新しい感受性細胞株である

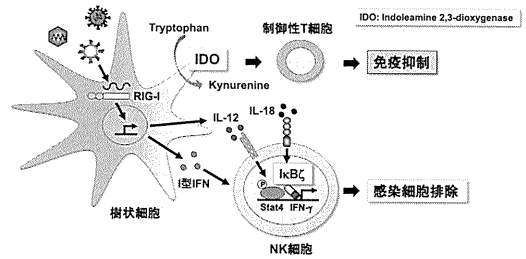


まとめ

- ✓ RNAヘリカーゼ蛋白質 (RIG-I, MDA5, LGP2, DDX60) によるウイルスRNAの認識機構を明らかにした
- ✓ RIG-Iはウイルスが複製するストレス顆粒へ移行し、そこへ脂肪滴やミトコンドリアが引き寄せられて凝集体を形成してシグナルを伝達する
- ✓ 樹状細胞の中では特にMDC2がIFN-Iを産生し、キメラマウスの感染モデルではIFN-IがHCVの排除に関与する
- ✓ 慢性C型肝炎患者における1P-10の高発現にヒアルロン酸とCD44が関与する
- ✓ miR122の強制発現によって新しいHCVの感受性細胞株を樹立した

H24年度の課題

- ✓ 新しい感受性細胞株を用いてHCV感染によって変動する宿主因子を詳細に解析する
- ✓ miR122の発現やストレス顆粒の形成欠損株を用いて、患者血清由来HCVの効率の良い細胞培養系の確立を目指す
- ✓ 自然免疫の賦活化による新しいHCVの排除法を検討する



平成 23 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業『成果概要』

研究課題：ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの開発に関する研究
 課題番号：H22-肝炎一般-011
 予定期間：H22年度からH24年度まで
 研究代表者：小原 道法
 所属研究機関：財団法人東京都医学総合研究所
 所属部局：ゲノム医科学研究分野
 職名：副参事研究員・プロジェクトリーダー
 年次別研究費(交付決定額)：1年目 47,740,000 円 2年目 45,830,000 円

I. 研究の意義

C型肝炎ウイルス(HCV)及びB型肝炎ウイルス(HBV)感染症においては、感染者の肝炎から肝硬変、肝癌への進行をくい止めることが最も重要である。多く用いられているHCV感染者に対するインターフェロン治療は副作用等の問題も大きく、またHBVは現在用いられている核酸アナログ製剤では根治が困難であり、これに変わる根治療法の開発が必要とされている。また、HCV感染に対する免疫反応は感染予防のみならず、感染者における病態ときわめて密接に関連している。このためにHCV特異的免疫反応を誘導もしくは解析することは、HCV感染の進展を阻害するためには極めて重要である。

II. 研究の目的、期待される成果

本研究では、HCV及びHBV特異的免疫賦活化による根治を目指した治療的ワクチンの開発を目指す。

(1) 特異的免疫反応は一度誘導されれば長期にわたり効果が持続することから、少ない投与回数で効果の持続が期待でき、薬剤耐性や重篤な副作用の問題も克服できるものと期待される。

(2) 本研究では細胞性免疫を効果的に誘導できるDNAワクチンを、すでに一定の効果が認められている組換えワクチニアワクチン(HCV-RVV)と組み合わせることで、さらに強力な治療効果が期待できる。また、それをC型肝炎モデルマウスに用いることで、感染者における免疫反応の解析が可能となると考えられる。

(3) HCV感染マウスモデルへのHCV-RVVの治療効果を自然免疫系因子の各種KOマウスを使って免疫応答を解析することにより、持続感染化から肝硬変、肝がんの転機をとる機序が明らかになると期待できる。

(4) HCV粒子構成蛋白質のみから構成される1回感染型HCV粒子(HCVtcp)の効率の良い産生系を確立することにより、ワクチンで誘導される抗体の各種遺伝子型HCVに対する中和抗体応答を明らかにする事ができる。

III. 2年間の研究成果

研究代表者(小原 道法)

(1) 慢性肝炎状態のHCV-Tgマウスに組換えワクチンrVV-N25を単回皮内接種し、接種後1週および4週のマウス肝臓を解析した。接種後1週目で、肝臓において壊死性細胞浸潤、肝細胞索の乱れ、肝細胞の膨化、グリコーゲン変性および脂肪変性といった慢性肝炎の病態の正常化が認められた。

(2) 4週目では形態異常の正常化に加え、肝臓内のHCV蛋白質の減少がみられた。CD4及びCD8T細胞の除去によりこのHCV蛋白質の排除は見られなくなった。また、HCV蛋白質の減少時にALT値の上昇やCTLなどによるHCV発現細胞の排除が認められなかったことから、rVV-N25接種によるHCV蛋白質の制御には細胞死を伴わない蛋白排除機構が働いていることが示唆され、解析を進めている。

(3) 肝臓の形態異常はCD4及びCD8T細胞を除去したにも関わらず正常化していたことから、病態形成とHCV蛋白質排除は別の機序であることが明らかとなった。

(4) 細胞性免疫を効果的に誘導できるDNAワクチンを、組換えワクチニアワクチンrVV-N25と組み合わせることで、さらに強力な治療効果が示された。

研究分担者(保富 康宏)

(1) HCVのすべての遺伝子領域、外殻蛋白領域、非構造蛋白領域の遺伝子を組込んだDNAワクチン(HCV-CN5、HCV-CN2、HCV-N25)を作製した。HCV蛋白質発現腫瘍細胞移植マウスモデルを用い、HCV特異的細胞性免疫誘導能についての評価を行ったところ、emp投与群に比べHCV-DNAワクチン投与群で有意に減少し、マウス体内においてHCV抗原に対して強い細胞性免疫が誘導されていることが認められた。

(2) C型肝炎モデルマウスを用いてHCV-DNAワクチンの治療効果の検討を行った。HCV蛋白質を3ヶ月間持続的に発現させたHCV-TgマウスにHCV-DNAワクチンを投与し、最後の投与から4週間後に肝臓中のHCVコア蛋白量を測定した。emp投与群に比べHCV-N25投与群において、肝臓中コア蛋白発現量が有意に減少していることを確認した。同時に、血清中ALT濃度を測定したが平常時に比べて有意な上昇は認められなかった。肝臓の形態学的検索を行ったところ、HCV-N25投与群において異常が改善されることを確認した。

研究分担者(瀬谷 司)

(1) HCV (JFH1) 株の感染によって Core が DDX3 と結合し、DDX3-IPS-1 複合体を壊し、結果として IFN-beta の誘導活性を阻害することを証明した。HCV による IFN 誘導阻害は、これまで Gale らによって報告された HCV NS3/4A による IPS-1 分解のみではなく、Riplet の関与が示された。

(2) マウス肝細胞に HCV の複製を許容させるために、ヒト CD81 あるいは occludin を導入した IPS-1^{-/-} or IFNAR^{-/-} マウス肝細胞株を樹立した。これらの細胞株は J6-HCV に感受性となり、HCV のマウス感染系が *in vitro* で組めるようになった。

研究分担者(鈴木 亮介)

(1) 複数の遺伝子型/株の遺伝子配列を用い、HCV の core から NS2 領域を発現するプラスミドを作製し、非増殖型 HCV 粒子 (HCVtcp) を得た。遺伝子型 2a の構造蛋白質を用いた場合、JFH-1 株および J6 株のいずれを用いても、HCVtcp の産生が認められた。1b の構造蛋白質を用いた場合、Con1 株および TH 株においては E1 領域に適合変異を導入する事により、HCVtcp の産生が認められた。

(2) 産生させた HCVtcp と、HCVpp および HCVcc について、抗 CD81 抗体および抗 ApoE 抗体による感染中和を Huh7.5.1 細胞を用いて調べるところ、HCVtcp および HCVcc は抗 CD81 抗体により高い感受性を示した。

(3) さらに細胞侵入過程であるエンドサイトーシス経路を解析し、従来知られているクラスリン依存性エンドサイトーシス以外の侵入経路の存在を明らかにした。

IV. 平成 24 年度の課題

(1) HCV 及び HBV 組換えワクチニアウイルスの治療効果及び機序の解析 (小原道法)

慢性肝炎状態の HCV/Cre-Tg に HCVN25-RVV 及び免疫活性化剤を接種し、排除・正常化効果の増強を目指す。さらに、HCV-RVV を接種したヒト HLA2.1 トランスジェニックマウスの脾細胞を HCV が感染しているヒト肝臓キメラマウス (HLA2.1) に移入し、HCV-RVV による賦活化機序を解析する。また、感染性粒子を産生する HBV-Tg に HBV 組換えワクチニアウイルスを接種し、その排除・治療効果を検討する。さらに、その排除・正常化機序について解析する。

(2) HBV, HCV-DNA ワクチンの構築・接種・解析 (保富康宏)

HCV-DNA ワクチンと RVV による prime/boost ワクチンの併用療法による治療効果及び機序を解析する。HBV 遺伝子発現 DNA ワクチンを作製し、HBV-Tg に接種し、HBV 蛋白質の排除及びその免疫応答を解析する。HCV-Tg マウスにおける、HCV-DNA ワクチン投与後の病態の変化 (HCV コア蛋白量の減少、肝形態学的異常の改善) に関わる免疫反応について解析する。

(3) HCV ワクチンの自然免疫系を介した免疫応答の解析 (瀬谷司)

自然免疫系ノックアウトマウスと交配した HCV-Tg にワクチンを投与し、自然免疫系を介した排除機序を解析する。HCV-HCR6-RzTg/Riplet^{-/-} マウスで個体実験を行い、臓器の変化を経時的に追える、ウイルス感染を追跡できる、など多くのメリットを生かした解析を進める。NK 細胞と CTL 誘導のアッセイ系が確立できたので、HCV/Cre-Tg マウスの慢性肝炎誘導系における宿主免疫応答の解析を行う。

(4) HCV-組換えワクチニアウイルスおよび HCV 発現 DNA ワクチン接種による液性免疫誘導能の解析 (鈴木亮介)

HCV の遺伝子型/株によっては十分な感染価の HCVtcp が得られないものも存在する。そこでさらに効率の良い産生系への改良を試みる。また、クラスリン依存性エンドサイトーシス以外の侵入経路について、さらに詳細に解析する。またワクチンを接種した HCV/Cre-Tg や免疫系ヒト化キメラマウスから得られた血清中の中和抗体価を解析し、モデル動物における誘導抗体の治療効果を明らかにする。

V. 行政施策への貢献の可能性

HCV 感染症においては感染者の肝炎から肝硬変、肝癌への進行をくい止めることが我が国では最も重要である。本研究での目的は感染予防のワクチンではなく HCV 病態の制御を目的としたワクチンであり、現状の抗ウイルス薬とは異なり、少ない投与回数で効果の持続が期待できる。また、薬剤耐性や重篤な副作用の問題を克服できるものと期待される。本研究の成果は、学術的貢献のみならず肝炎の新たな治療法開発への端緒を開き、肝炎ウイルス制圧の新たな方法の開発にもつながる事が期待され、国民の健康増進の観点からも社会に貢献する可能性が考えられる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1) 小原 道法 (研究代表者)

1. Masaaki Satoh, Makoto Saito, Takashi Takano, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Yasumasa Nishito, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Masayuki Sudo, Chieko Kai, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1. *J Infect Dis.* 204(8):1172-80 (2011).
2. Tomoko Chiyo, Satoshi Sekiguchi, Masahiro Hayashi, Yoshimi Tobita, Yumi Kanegae, Izumu Saito, and Michinori

- Kohara. Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice. *Virus Res.* 160(1-2):89-97 (2011).
3. Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masahiro Hayashi, Yuichi Hirata, Masaaki Satoh, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Masayuki Sudo, and Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology* 55(3):512-21 (2011)
4. Kiminori kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* 89:433-442 (2011).
5. Hideko Nuriya, Kazuaki Inoue, Takeshi Tanaka, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Kyosuke Kaji, Seishu Hayashi, Shuichi Kaneko and Michinori Kohara. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based *in situ* hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 48(11):3843-3851 (2010).
6. Yuri Kasama, Satoshi Sekiguchi, Makoto Saito, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Motohiro Takeya, Yoichi Hiasa, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas *in vivo*. *Blood* 116(23):4926-4933 (2010).
7. Kenichi Satoh, Hiroki Takahashi, Chiho Matsuda, Takuya Umehara, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Mikio Zeniya and Michinori Kohara. Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. *J. Med. Virol.* 82(9):1545-1553 (2010).
8. Yutaka Amako, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Yuichi Hirata, Satoshi Sekiguchi, Yoshimi Tobita, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Hiromichi Yonekawa and Michinori Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* *J. Virology* 84(1):303-311 (2010).

(2) 保富 康宏 (研究分担者)

1. Iwasaki, Y., Mori, K., Ishii, K., Maki, N., Iijima, S., Yoshida, T., Okabayashi, S., Katakai, Y., Lee, J., Saito, A., Fukai, H., Kimura, N., Ageyama, N., Yasutomi, Y., Miyamura, T., Kannagi, M. and Akari, H. Longe-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. *Frontiers Microbiol.* 2011 in press
2. Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H. and Nakayama, E.E. Geographic, Genetic, and Functional Diversity of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*) *J. Gen. Virol.* 2011 Epub
3. Matsuo, K. and Yasutomi, Y. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin as a vaccine vector for global infectious disease control. *Tuberculosis Res. Treat.* 2011 Epub
4. Chono, H., Saito, N., Tsuda, H., Shibata, H., Ageyama, N., Terao, K., Yasutomi, Y., Mineno, J., and Kato, I. In vivo safety and persistence of endoribonuclease gene-transduced CD4+ T cells in cynomolgus macaques for HIV-1 gene therapy model. *PLoS One* 2011; 6: Epub
5. Xing, Li., Wang, J.C., Li, T.-C., Yasutomi, Y., Lara, J., Khurdyakaov, Y., Schofield D., Emerson, S., Purcell, R., Takeda, N., Miyamura, T. and Holland, R.C. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J. Virol.* 2011; 85:1117-1124.

(3) 瀬谷 司 (研究分担者)

1. Oshiumi, H., M. Okamoto, K. Fujii, T. Kawanishi, M. Matsumoto, S. Koike, and T. Seya. 2011. The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J. Immunol.* (in press).
2. Takaki, H., Y. Watanabe, M. Shingai, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- β -inducing potential. *Molec. Immunol.* 48: 497-504.
3. Watanabe, A., M. Tatematsu, K. Saeki, S. Yoshimura, C. Obuse, T. Seya, and M. Matsumoto. 2011. Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J. Biol. Chem.* 86: 10702-10711.
4. Miyashita, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. The SKI2-related helicase DDX60 is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Molec. Cell. Biol.* 31: 3802-3819.
5. Yamazaki, S., K. Okada, A. Maruyama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides *in vivo*. *PLoS ONE*. 6 (4). e18833.
6. Aly, H. H., H. Oshiumi, M. Matsumoto, K. Shimotohno, T. Wakita, and T. Seya. 2011. Establishing mouse hepatoma cell lines permissive to human hepatitis C virus. *PLoS ONE*. 6 (6): e21284.

(4) 鈴木 亮介 (研究分担者)

1. Winkelmann ER, Widman DG, Suzuki R, Mason PW. Analyses of mutations selected by passaging a chimeric flavivirus identify mutations that alter infectivity and reveal an interaction between the structural proteins and the nonstructural glycoprotein NS1. *Virology.* (in press)
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 ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J. Biol. Chem.* (in press)

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

別添

●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

1. 昭和48年4月 (財)日本ポリオ研究所 研究員 (ポリオウイルスの分子生物学的解析)
2. 昭和57年1月 北里大学薬学部公衆衛生学教室講座研究員 (ポリオウイルス遺伝子機能の解析)
3. 昭和59年5月 東京大学医学部細菌学教室受託研究員 (ポリオウイルス遺伝子機能の解析)
4. 平成元年4月 東燃、総合研究所、基礎研究所、免疫工学グループ・グループヘッド (C型肝炎ウイルスの分子生物学的解析)
5. 平成4年4月 東京都臨床医学総合研究所、微生物研究部門・室長 (C型肝炎ウイルスの分子生物学的解析)
6. 平成16年4月 東京都臨床医学総合研究所、SARS, C型肝炎等感染症プロジェクト (現・感染制御プロジェクト)・プロジェクトリーダー (C型肝炎ウイルスの分子生物学的解析) プロジェクト制の導入に伴い部門名称の変更

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

1. 野本 明男：東京大学名誉教授、微生物科学研究所所長
2. 下遠野 邦忠：京都大学名誉教授、千葉工業大学客員教授
3. 宮村 達男：前国立感染症研究所所長
4. 脇田 隆宇：国立感染症研究所ウイルス二部部長

・主な研究課題

1. ポリオウイルスの神経病原性の研究 (ポリオウイルスの増殖機能と神経病原性が関連していることを示した)
2. ポリオウイルス生ワクチン株の全塩基配列の決定および病原性 発現遺伝子領域の研究 (弱毒及び強毒ポリオウイルス株の各遺伝子領域のキメラクローンを用いて神経毒力を担う領域を明らかにした。)
3. ポリオウイルスの複製と病原性発現に関する研究 (5'非翻訳領域の塩基変異による翻訳効率の変化が病原性の強さに関与していることを明らかにした。)
4. C型肝炎ウイルス遺伝子のクローニング及び遺伝子機能研究 (C型肝炎ウイルスは内部認識機構により翻訳が開始されること、および遺伝子群の解析からグループに分類し、それぞれの病原性が異なることを明らかにした。)
5. C型肝炎ウイルス粒子構造の解析と複製、病原性発現に関する研究 (免疫電顕法によりウイルス粒子を同定した。)
6. C型肝炎ウイルス遺伝子を発現したトランスジェニックマウスが肝炎肝がんを発症することを明らかにした。
7. HCVの複製にスフィンゴミエリンが重要であること、合成酵素阻害剤が治療薬として有望であることを明らかにした。)

・これまでの研究実績

1. Makoto Saito, Michinori Kohara, Yuri Kasama and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus induces overexpression of 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Sp1. J. Med. Virol. (2011) in press.
2. Yuri Kasama, Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Masaaki Satoh, Zhongzhi Wang, Nagla Elwy, Shinji Harada, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. Virus Res. (2011) in press.

3. Masaaki Satoh, Makoto Saito, Takashi Takano, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Yasumasa Nishito, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Masayuki Sudo, Chieko Kai, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1. *J Infect Dis.* 204(8):1172-80 (2011).
4. Tomoko Chiyo, Satoshi Sekiguchi, Masahiro Hayashi, Yoshimi Tobita, Yumi Kanegae, Izumu Saito, and Michinori Kohara. Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice. *Virus Res.* 160(1-2):89-97 (2011).
5. Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masahiro Hayashi, Yuichi Hirata, Masaaki Satoh, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Masayuki Sudo, and Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology* 55(3):512-21 (2011)
6. Kiminori Kimura, Michinori Kohara. *Frontiers of Model Animals for Human Diseases. Experimental Animals* 60(2), 93-100 (2011).
7. Takashi Takano, Michinori Kohara, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Makoto Saito, Chieko Kai, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J. Med. Virol.* 83:801-809 (2011).
8. Kiminori kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* 89:433-442 (2011).
9. Masaaki Arai, Hidenori Suzuki, Yoshimi Tobita, Asako Takagi, Koichi Okamoto, Atsunori Ohta, Masayuki Sudoh, Kunitada Shimotohno, Michinori Kohara. Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. *Arch. Virol.* 156:295-304 (2011).
10. Kayo Yoshikawa, Aya Ogata, Chiho Matsuda, Michinori Kohara, Hideo Iba, Yukio Kitade, Yoshihito Ueno. Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance. *Bioconjugate Chemistry* 22:42-49 (2011).
11. 発明の名称： 抗インフルエンザウイルス活性を有するペプチド
 ①発明者：小原道法、佐々木 亨、パトリック・リード
 ②出願日：2011年9月27日
 ③出願番号：特願2011-211100
 ④出願人：財団法人東京都医学総合研究所、ペプチドリーム株式会社
 ⑤発明の内容の概略：抗インフルエンザウイルス活性を有する特殊環状ペプチド等に関する
12. Yuri Kasama, Satoshi Sekiguchi, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Yoichi Hiasa, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas *in vivo*. *Blood* 116(23):4926-4933 (2010).
13. Hideko Nuriya, Kazuaki Inoue, Takeshi Tanaka, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Kyosuke Kaji, Seishu Hayashi, Shuichi Kaneko and Michinori Kohara. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based *in situ* hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 48(11):3843-3851 (2010).
14. Leiyun Weng, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Ying He, Jin Zhong, Tetsuya Toyoda. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype specific manner. *J. Virol.* 84(22):11761-70 (2010).
15. Chen Y-Z, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, and Nishimura Y. Identification of SARS-COV spike protein-derived and HLA-A2-restricted human CTL epitopes by using a new muramyl dipeptidederivative adjuvant. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 23(1):165-77 (2010).
16. Kenichi Satoh, Hiroki Takahashi, Chiho Matsuda, Takuya Umehara, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Mikio Zeniya and Michinori Kohara. Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. *J. Med. Virol.* 82(9):1545-1553 (2010).
17. Yutaka Amako, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Yuichi Hirata, Satoshi Sekiguchi, Yoshimi Tobita, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Hiromichi Yonekawa and Michinori Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* *J. Virology* 84(1):303-311 (2010).
18. 発明の名称： 新型インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンタンパク質遺伝子を有する組換えワクシニアウイルス
 ①発明者：小原道法、安井文彦、迫田義博、喜田宏、村上利夫
 ②出願日：2010年10月15日

- ③出願番号：特願 2010-233064
 ④出願人：(財) 東京都医学研究機構、国立大学法人 北海道大学、(財) 化学及血清療法研究所
 ⑤発明の内容の概略：感染予防及び治療効果を示すインフルエンザウイルス HA 遺伝子を有する組換えワクシニアウイルス
19. 発明の名称：) 難治性ウイルス感染症の治療剤
 ①発明者：小原道法、中川慎一郎
 ②出願日：2010年9月9日
 ③出願番号：特願 2010-202355④出願人：(財) 東京都医学研究機構
 ⑤発明の内容の概略：インターフェロン λ を誘導して非常に強い抗 HCV, HBV 活性を示す、カチオニックリポソーム製剤
20. 発明の名称： RRM2 のアンタゴニストを有効成分として含有する C 型肝炎治療剤
 ①発明者：小原道法、小原恭子、佐藤正明、須藤正幸
 ②出願日：2010年8月12日
 ③出願番号：特願 2010-180981
 ④出願人：中外製薬株式会社、(財) 東京都医学研究機構、国立大学法人 熊本大学
 ⑤発明の内容の概略：C型肝炎ウイルス複製に必須な宿主因子 RRM2 に対する阻害剤
21. Tomohiro Nishimura, Michinori Kohara, Kosuke Izumi, Yuri Kasama, Yuichi Hirata, Ying Huang, Masahiro Shuda, Hideko Nuriya, Yuko Tokunaga, Masaaki Sato, Makoto Saito, Chieko Kai and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus impairs P53 via persistent over-expression of 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase. *J. Biol. Chem.* 284(52):36442-36452 (2009).
22. Uto H, Stuver SO, Hayashi K, Kumagai K, Sasaki F, Kanmura S, Numata M, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Kohara M, Tsubouchi H. Increased rate of death related to presence of viremia among hepatitis C virus antibody-positive subjects in a community-based cohort study. *Hepatology.* Aug;50(2):393-9. (2009)
23. Keigo Machida, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Eiji Seike, Shigenobu Tóne, Yukiko Hayashi, Yuri Kasama, Masumi Shimizu, Hidemi Takahashi, Chyoji Taya, Hiromichi Yonekawa, Nobuyuki Tanaka, and Michinori Kohara. Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins. *Gastroenterology* 137(1):285-96. (2009).
24. Leiyun Weng, Jiamu Du, Jingling Zhou, Jianping Ding, Takaji Wakita, Michinori Kohara, Tetsuya Toyoda. Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain. *Arch Virol.* 154(5):765-773. (2009).
25. Yoshihito Ueno, Yuuji Watanabe, Aya Shibata, Kayo Yoshikawa, Takashi Takano, Michinori Kohara, Yukio Kitade. Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing universal overhangs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 17(5):1974-81. (2009).
26. 発明の名称： 抗C型肝炎ウイルス効果を有するベンゾフラン誘導体
 ①発明者：小原道法、安井文彦、須藤正幸
 ②出願日：2009年4月8日
 ③出願番号：特願 2009-93608
 ④出願人：中外製薬株式会社、財団法人東京都医学研究機構
 ⑤発明の内容の概略：C型肝炎ウイルスの複製を阻害する抗酸化剤
27. Kei Ogata, Takahito Kashiwagi, Jun Iwahashi, Koyu Hara, Haruhito Honda, Tatsuya Ide, Ryukichi Kumashiro, Michinori Kohara, Michio Sata, and Nobuyuki Hamada. A mutational shift from domain III to II in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus after interferon-ribavirin therapy. *Arch Virol.* 153(8):1575-9. (2008).
28. Fumihiko Yasui, Chieko Kai, Masahiro Kitabatake, Shingo Inoue, Misako Yoneda, Shoji Yokochi, Ryoichi Kase, Satoshi Sekiguchi, Kouichi Morita, Tsunekazu Hishima, Hidenori Suzuki, Katsuo Karamatsu, Yasuhiro Yasutomi, Hisatoshi Shida, Minoru Kidokoro, Kyosuke Mizuno, Kouji Matsushima, Michinori Kohara. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunology* 181(9):6337-48 (2008).
29. T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, K. Tsukiyama-Kohara. Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and picornavirus RNAs. *Compara. Immu. Microbio. Infect. Dis.* 31: 435-448 (2008).

30. Naoya Sakamoto, Yoko Tanabe, Takanori Yokota, Kenichi Satoh, Yuko Sekine-Osajima, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Megumi Tasaka, Yuki Sakurai, Chen Cheng-Hsin, Masahiko Yano, Shogo Ohkoshi, Yutaka Aoyagi, Shinya Maekawa, Nobuyuki Enomoto, Michinori Kohara, and Mamoru Watanabe. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J. Gastroenterology Hepatology*. 23(9):1437-47 (2008).

31. Sachiko Inubushi, Motoko Nagano-Fujii, Kikumi Kitayama, Motofumi Tanaka, Chunying An, Hiroshi Yokozaki, Hirohei Yamamura, Hideko Nuriya, Michinori Kohara, Kiyano Sada, and Hak Hotta. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J. Gen. Virology* 89: 1231-1242 (2008).

32. 発明の名称： ベシクル製剤

①発明者：小原道法、中野善郎、須藤正幸 他2名

②出願日：2008年11月26日

③出願番号：特願2008-301763

④出願人：中外製薬株式会社、財団法人東京都医学研究機構、北海道システム・サイエンス株式会社

⑤発明の内容の概略：ビタミンEリポソームの肝指向型DDSとしての有効性をin vitro, in vivoの試験にて示した。

33. 発明の名称： C型肝炎ウイルスの働きを阻害するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸

①発明者：小原道法、須藤正幸

②出願日：2008年11月26日

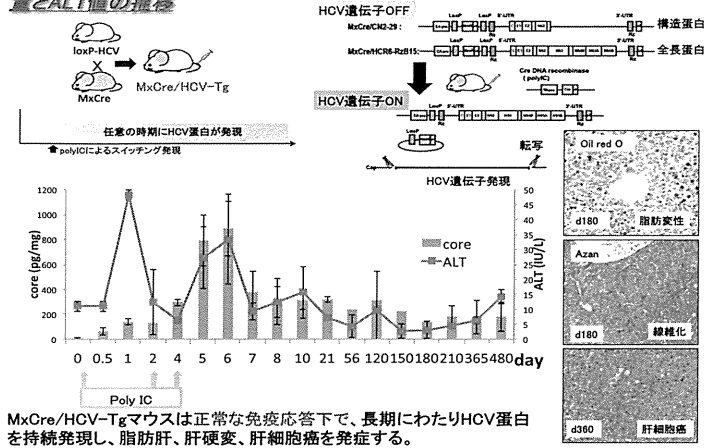
③出願番号：特願2008-301763

④出願人：中外製薬株式会社、財団法人東京都医学研究機構

⑤発明の内容の概略：高活性な siRNA 配列を同定することに成功した。

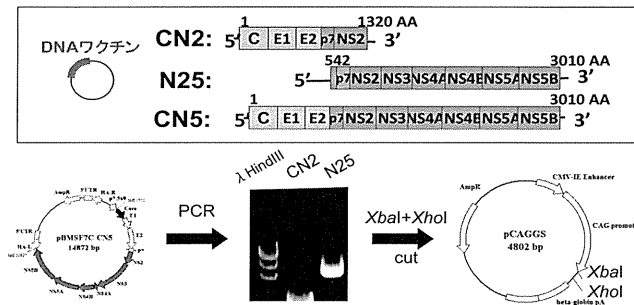
Ⅶ. Ⅲ(2年間の研究成果)の概要図

新規HCV持続感染モデルマウス(MxCre/HCV-Tg)肝臓におけるcore蛋白量とALT値の推移

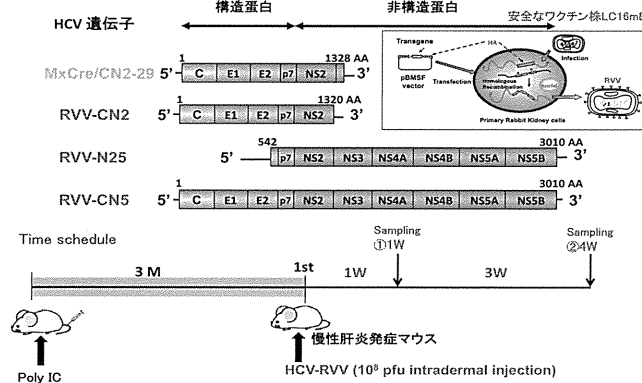


MxCre/HCV-Tgマウスは正常な免疫応答下で、長期にわたりHCV蛋白を持続発現し、脂肪肝、肝硬変、肝細胞癌を発生する。

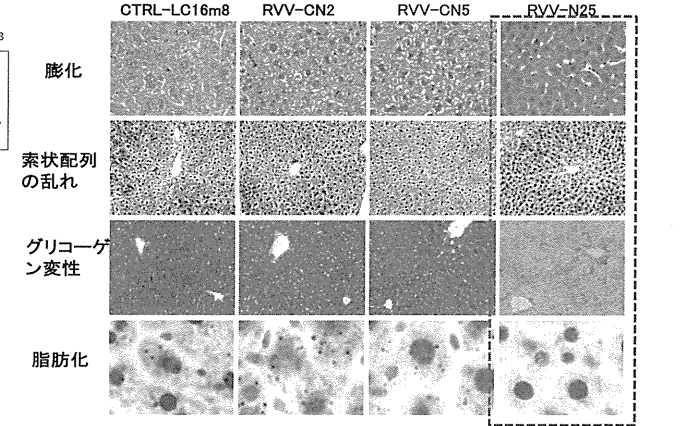
HCV遺伝子発現DNA(HCV-DNA)ワクチンの作製



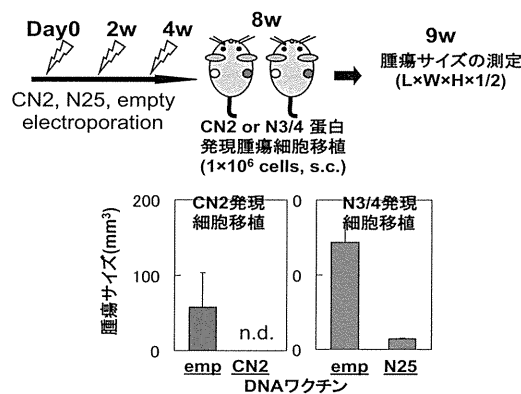
HCV遺伝子組換えワクチニアウイルス(HCV-RVV)の構成とワクチネーション



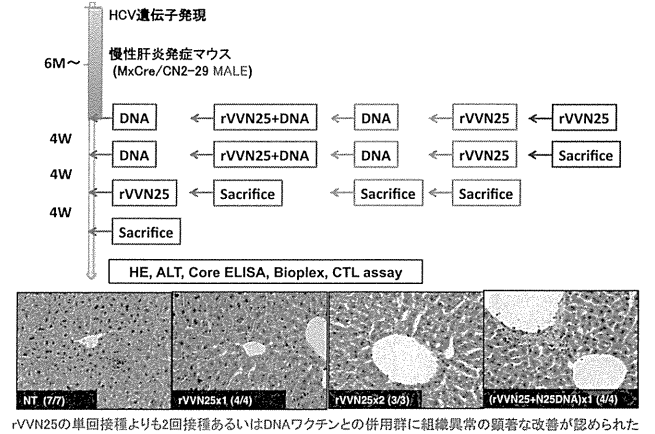
接種後7日後のマウス肝臓



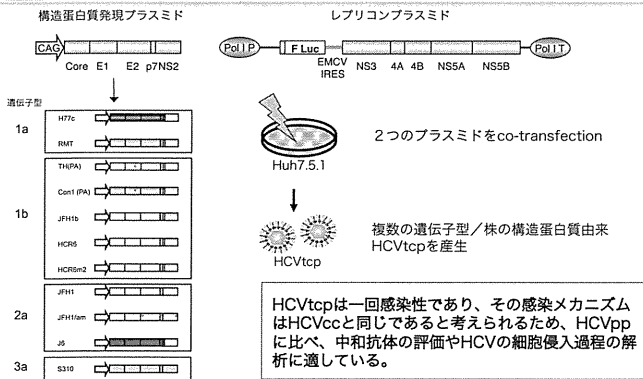
HCV蛋白発現腫瘍細胞移植マウスモデルを用いた細胞性免疫誘導能評価



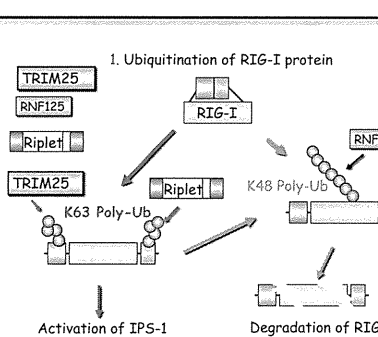
rVV/DNAワクチン併用接種による慢性肝炎の正常化



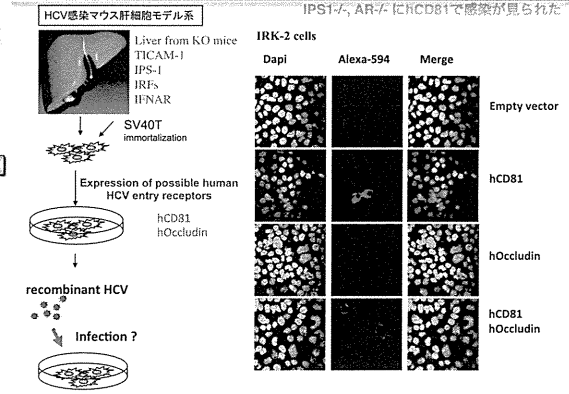
様々な遺伝子型/株由来HCVtcpを用いた感染メカニズムや中和抗体の解析



CoreがDDX3-IPS-1複合体を壊し、IFN-betaの誘導活性を阻害する



HCV (J6-JFH1株)のマウス肝細胞株感染には侵入レセプターhCD81が必須である



- (1)慢性肝炎状態のHCV-Tgマウスに組換えワクチンrVV-N25を接種したところ、肝細胞索の乱れ、肝細胞の膨化、グリコーゲン変性および脂肪変性といった慢性肝炎の病態の正常化が認められた。
- (2)HCV-DNAワクチンを作製し、HCV蛋白発現腫瘍細胞移植マウスモデルを用いて評価したところ、強い細胞性免疫が誘導されていることが認められた。
- (3)CoreがDDX3-IPS-1複合体を壊し、IFN-betaの誘導活性を阻害していることが明らかとなった。