

図2 コレラトキシンを用いてPspAを経鼻免疫した免疫マウス（右）と非免疫マウス（左）に 2×10^5 CFUのルシフェラーゼ発現肺炎球菌を感染させた。感染後、24, 48, 72時間後に同一マウスにおける肺炎球菌由来発光をIVISを用いて検出した。

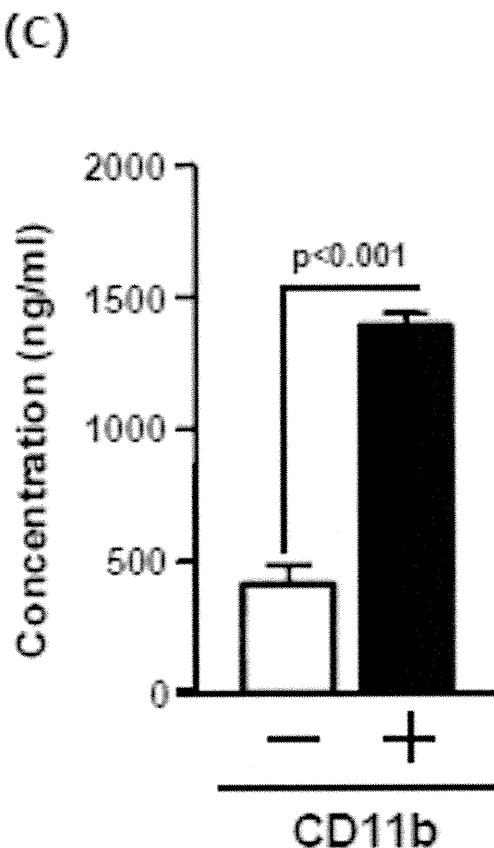
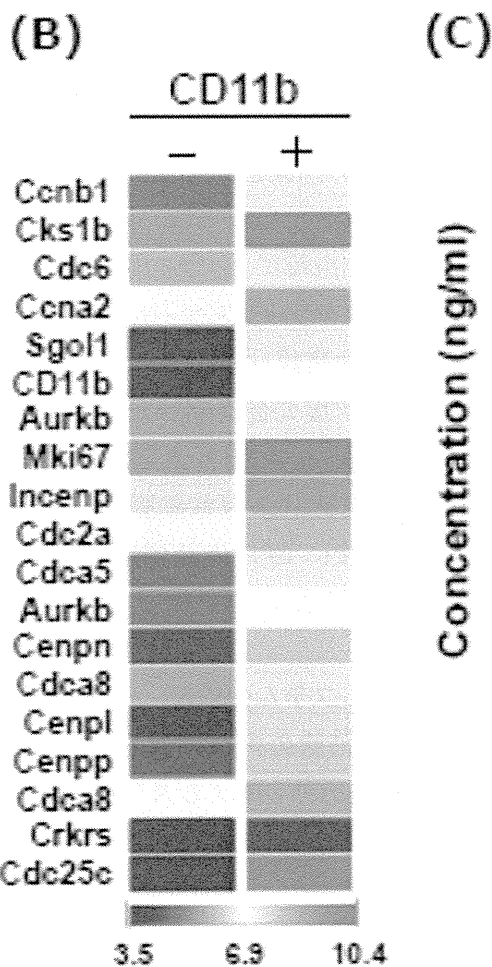
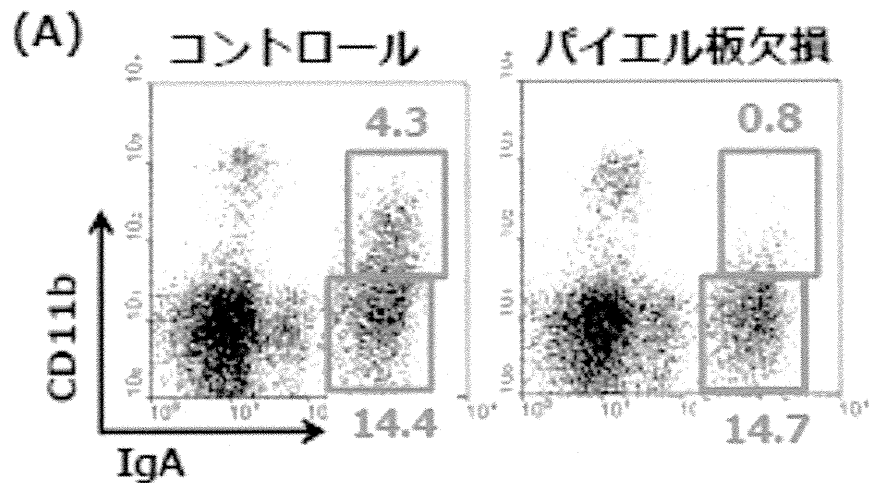


図3 (A) 胎生14.5日目に抗IL-7受容体阻害抗体を投与することでパイエル板を欠損させたマウス(右)とコントロール抗体を投与したマウス(左)の腸管から単核球を回収し、CD11bとIgAでFACS解析したところ、パイエル板欠損マウスでCD11b陽性IgA細胞の減少が認められた。(B) CD11b陽性とCD11b陰性IgA細胞を単離、精製しマイクロアレイ解析を行ったところ、CD11b陽性細胞で細胞周期に関わる分子の高発現が認められた。(C) CD11b陽性とCD11b陰性IgA細胞を単離、精製しin vitroで72時間培養した後の培養上清中のIgA量を測定したところ、CD11b陽性細胞で高いIgA産生が認められた。

DNA メチル化による血管内皮細胞特異的遺伝子発現制御

岡田 欣晃 大阪大学大学院薬学研究科 准教授

研究要旨

本年は、次年度以降に行う Claudin-5 (CL-5) binder の機能解析のための評価系構築に着手した。具体的には、CL-5 binder の in vitro 評価で用いる、血管内皮細胞に CL-5 遺伝子を強制発現、ノックダウンする2つのシステムについての検討を行った。遺伝子強制発現には、アデノウイルスベクターシステムを選択し、ベクターの作製、アデノウイルスの大量調製から感染実験システムをセットアップした。ノックダウンは、siRNA を用いたシステムを選択し、血管内皮細胞への高効率 siRNA 導入法の確立と、リアルタイム RT-PCR による内在性遺伝子発現解析システムの構築を行った。

E. 研究目的

CL-5 binder の解析には、CL-5 を強制発現、もしくはノックダウンした内皮細胞を用いる loss/gain of function の実験が必要となる。そこで、ヒト初代培養内皮細胞に CL-5 を高発現させるためのアデノウイルスベクターシステム、および、血管内皮細胞における効率的な遺伝子発現抑制を実現するための siRNA を用いたノックダウンシステムの構築を行おうと考えた。

F. 研究方法

B-1. アデノウイルスベクターシステムの構築

血管内皮細胞に高頻度に感染し、高効率に遺伝子を発現するアデノウイルスを作製するため、種々の細胞で高い活性を持つ EF-1 α 遺伝子のプロモーターを利用したアデノウイルスベクターを構築しようと考えた。まず、EF-1 α プロモーターを含むシャトルベクターに、発現効率検討用モデル遺伝子として GFP 遺伝子を導入した。得られたシャトルベクターからプロモーターと GFP 遺伝子を含む配列を切り出し、アデノウイルスベクターに導入した。得られたベクター(AdHM4-GFP)を HEK293 細胞に導入し、ウイルス感染による細胞の剥離を

観察後、凍結融解によりウイルスを抽出した。得られたウイルスをラージスケールの細胞に再感染させる作業を数度繰り返し、ウイルスを増幅後、塩化セシウム密度勾配を用いた遠心分離により濃縮、透析することでウイルス溶液を調製した。得られたウイルスを、ヒト冠状動脈内皮細胞に感染させ、48時間後に GFP の発現量、発現効率を蛍光顕微鏡で観察した。

B-2. siRNA システムの構築

血管内皮細胞の内在性遺伝子を効率よくノックダウンするための siRNA システムを構築するため、CL-5 と同様に内皮細胞特異的に発現する Robo4 遺伝子をモデルとし、その発現を siRNA でノックダウンできるかを検証した。ヒト臍帯静脈内皮細胞に Robo4 siRNA を Liporectamine RNAi MAX を用いて導入後、48時間後の Robo4 遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR により解析した。

C. 研究結果

C-1. アデノウイルスベクターシステムの構築

複数回のアデノウイルスの調製を行ったところ、 $10^{11} \sim 10^{12}$ VP/ml オーダーの高濃度アデノウイル

スを1~2mlコンスタントに得られるシステムを構築することができた。また、得られたウイルスを用いた血管内皮細胞への感染実験においては、約100%の極めて高い効率でかつ GFP を高発現させることが明らかになった(Fig. 1)。

C-2. siRNA システムの構築

Robo4 siRNA を導入し、48時間後の Robo4 遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析したところ、Robo4 遺伝子の発現が9割以上抑制されていることが明らかになった(Fig. 2)。

D. 考察

今回アデノウイルスに用いた EF-1 α プロモーターは、血管内皮細胞中で高い活性を持ち、高効率に遺伝子を発現させることが明らかになった。今後、GFP 遺伝子を CL-5 遺伝子に置き換えた CL-5

発現アデノウイルスの調製を行っていく。

また、今回用いた siRNA 導入法で、血管内皮細胞特異的遺伝子の発現を9割以上抑制できることが証明されたため、今後、本導入法を用いて、CL-5 遺伝子に対する siRNA をスクリーニングし、効率よく CL-5 発現を抑制する siRNA 配列を同定する。

E. 結論

CL-5 binder の in vitro 解析の準備として、ヒト内皮細胞に高効率に遺伝子を強制発現、ノックダウンするための、アデノウイルス、siRNA システムの構築に成功した。今後はこれらを用いて CL-5 高発現、低発現内皮細胞を作成し、血液脳関門の in vitro 評価系へと応用していく予定である。

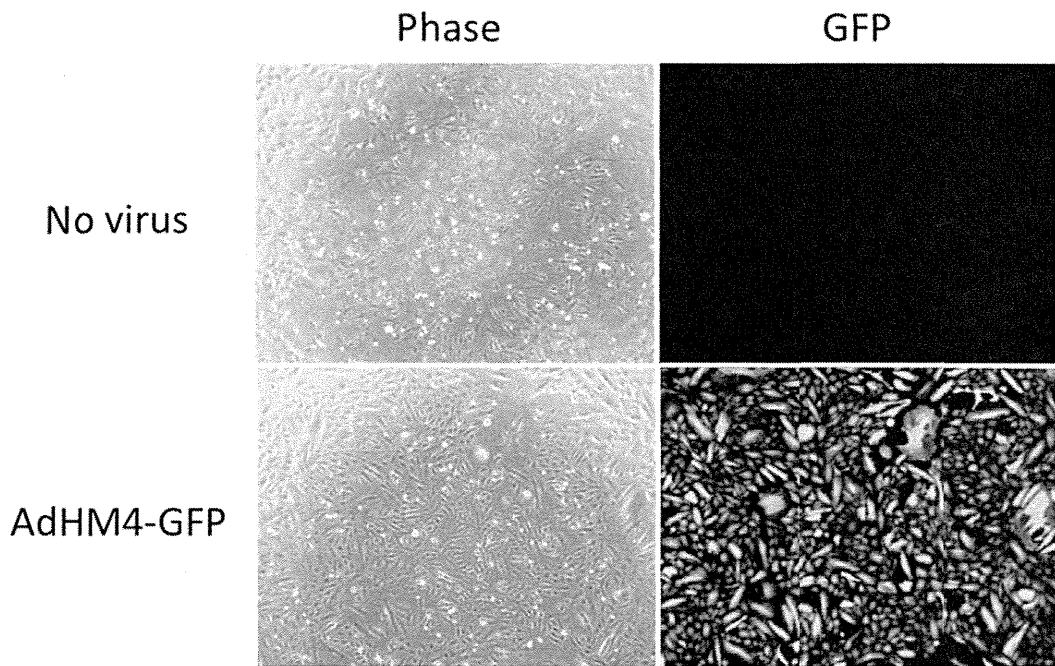


Fig. 1 EF-1 α プロモーター搭載アデノウイルスを用いた血管内皮細胞への遺伝子発現実験
 EF-1 α プロモーター下流に GFP 遺伝子を連結した配列を持つアデノウイルスベクターをヒト冠動脈内皮細胞に感染させ 48 時間後に蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

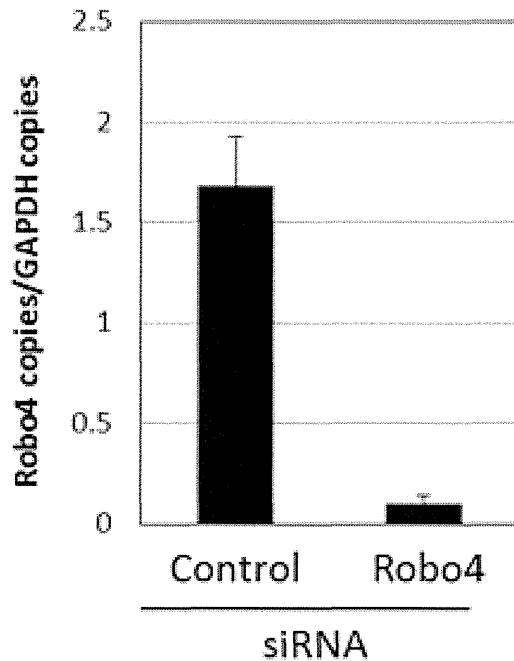


Fig. 2 siRNA を用いた血管内皮細胞特異的遺伝子の ノックダウン実験
 Robo4 遺伝子に対する siRNA およびコントロール siRNA を臍帯静脈内皮細胞に導入し 48 時間培養後、Robo4 遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により解析した。Robo4 遺伝子の発現量は、GAPDH 遺伝子の mRNA 発現量で補正した。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
近藤昌夫、 八木清仁	Claudinを標的とした 非侵襲性投与法の 開発	木曾良明 向井秀仁	ペプチド医薬 の最前線	シーエム シー出版	東京	2012	127-135
近藤昌夫、 八木清仁	Claudin modulatorを 用いた難吸収性薬 物の消化管・経粘膜 デリバリー	山本昌	難吸収性薬物 の吸収性改善 と新規投与製 剤の開発	シーエム シー出版	東京	2012	68-74
Kuniyasu H	Significance of angiotensin in metastasis of colon cancer	Sunitha M	Current research in cancer 6	Research Media	Kerala, India	2012	1-8

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshida, T.; Kondoh, M.; Mizuguchi H.; Yagi, K.	Development of an adenovirus vector containing a hepatitis C virus expression cassette and its application	Yakugaku Zasshi	133	305-311	2013
Yamagishi Y.; Watari A.; Hayata Y.; Li X.; Kondoh M.; Tsutsumi Y.; Yagi K.	Hepatotoxicity of sub-nanosized platinumparticles in mice	Pharmazie	68	178-82	2013
Washiyama, M.; Koizumi, N.; Fujii, M.; Kondoh, M.; Yagi, K.; Watanabe, Y.	Percolation Analysis in Electrical Conductivity of MDCK and Caco-2 Cells by Permeation-Enhancing Agents	Biol Pharm Bull	36	384-389	2013

Watari, A.; Kondoh, M.; Yagi, K.	A simple reporter assay for screening claudin-4 modulators	Biochem Biophys Res Commun	426	454-460	2012
Matsuhisa, K.; Kondoh, M.; Suzuki, H.; Yagi, K.	Comparison of mucosal absorption-enhancing activity between a claudin-3/-4 binder and a broadly specific claudin binder	Biochem. Biophys. Res. Commun.	423	229-233	2012
Suzuki, H.; Kondoh, M.; Takahashi, A.; Yagi, K.	Proof of concept for claudin-targeted drug development	Ann NY Acad Sci	1258	65-70	2012
Takahashi, A.; Saito, Y.; Kondoh, M.; Matsushita, K.; Krug, S. M.; Suzuki, H.; Tsuji no, H.; Li, X.; Aoyama, H.; Matsuhisa, K.; Uno, T.; Fromm, M.; Tamakubo, T.; Yagi, K.	Creation and biochemical analysis of a broad-specific claudin binder	Biomaterials	33	3464-3474	2012
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	214-218	2012
Kondoh, M.; Takahashi, A.; Yagi, K.	Spiral progression in the development of absorption enhancers based on the biology of tight junctions	Adv Drug Deliv Rev	64	515-522	2012
Takahashi, A.; Kondoh, M.; Suzuki, H.; Watari, A.; Yagi, K.	Pathological changes in tight junctions and potential application into therapies	Drug Discov Today	17	727-732	2012

Suzuki, H.; Kondoh, M.; Kakutani, H.; Yamane, S.; Uchida, H.; Hamakubo, T.; Yagi, K.	The application of an alanine-substituted mutant of the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin as a mucosal vaccine in mice.	Biomaterials	33	317-324	2012
Kuniyasu H	Multiple roles of angiotensin in colorectal cancer	<i>World J Clin Oncol</i>	3	150-154	2012
Kawahara I Kuniyasu H Matsuyoshi H Goto K Obata K Misawa H Fujii H Takaki M	The comparison of effects of a selective 5-HT reuptake inhibitor versus a 5-HT-4 receptor agonist on in vivo neurogenesis at the rectal anastomosis in rats.	<i>Am J Physiol Gastroenterol Liver</i>	302	G588-G597	2012
Sasaki T Kuniyasu H Luo Y Kato D Shinya S Fujii K Ohmori H Yamashita Y	Significance of epithelial growth factor in the epithelial-mesenchymal transition of human gallbladder cancer cells	<i>Cancer Sci</i>	103	1165-71	2012
Shimomoto T Luo Y Ohmori H Chihara Y Sasahira T Fujii K Kuniyasu H	Advanced glycation end products (AGE) induce the receptor for AGE in the colonic mucosa of azoxymethane-injected Fischer 344 rats fed with a high-linoleic acid and high-glucose diet.	<i>J Gastroenterol</i>	47	1073-1083	2012
Sasahira T Kurihara M Bhawal UK Ueda N Yamamoto K Kirita T Kuniyasu H	Downregulation of miR-126 induces angiogenesis and lymphangiogenesis and targets VEGF-A in oral cancer	<i>Br J Cancer</i>	107	700-706	2012
Luo Y Ohmori H Fujii K Chihara Y Maruyama S Kuniyasu H	High matrix metalloproteinase-to-E-cadherin ratio measured by bicolor fluorescent in situ hybridization is associated with lymphangiogenesis and lymph node metastasis in prostate cancer	<i>Urol Oncol-Semin Ori</i>	30	306-313	2012

Shimomoto T Ohmori H Luo Y Chihara Y Denda A Sasahira T Tatsumoto N Fujii K Kuniyasu H	Diabetes-associated angiotensin activation enhances liver metastasis of colon cancer.	<i>Clin Exp Metasta</i>	29	915-925	2012
Bhawal UK Sato F Sasahira T Ito Y Kuniyasu H Kajima H Abiko Y	IL-1 β -mediated upregulation of DEC1 in Akt/HIF-1 α -dependent pathway	<i>J Cell Biochem</i>	113	3246-3253	2012
Sasahira T Ueda N Yamamoto K Bhawal UK Kurihara M Kirita T Kuniyasu H	Trks are novel oncogenes involved in the induction of neovascularization, tumor progression, and nodal metastasis in oral squamous cell carcinoma	<i>Clin Exp Metasta</i>	30	165-176	2013
Luo Y Chihara Y Fujimoto K Sasahira T Kuwada M Fujiwara R Fujii K Ohmori H Kuniyasu H	High mobility group box 1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy	<i>Eur J Cancer</i>	49	741-751	2013
Kurihara M Kirita T Sasahira T Ohmori H Matsushima S Yamamoto K Bosserhoff AK Kuniyasu H	Protumoral roles of melanoma inhibitory activity 2 in oral squamous cell carcinoma	<i>Br J Cancer</i>			In press
Goto K Kawahara I Luo Y Obata K Misawa H Ishikawa T Kuniyasu H Nabekura J Takaki M	In vivo imaging of enteric neurogenesis in the deep tissue of mouse small intestine.	<i>Pros One</i>	8	e54814	2013

Sasahira T Ueda N Kurihara M Matsushima S Ohmori H Fujii K Bhawal UK Yamamoto K Kirita T Kuniyasu H	Tropomyosin receptor kinases B and C are tumor progressive and metastatic marker in colorectal carcinoma.	<i>Hum Pathol</i>				In press
Murakami, Y.; Fukasawa, M.; Kaneko, Y.; Suzuki, T.; Wakita, T.; and Fukazawa, H.	Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus lifecycle.	<i>Microbes and Infection</i>	15	45-55		2013
J. Kunisawa, M. Gohda, E. Hashimoto, I. Ishikawa, M. Higuchi, Y. Suzuki, Y. Goto, C. Panea, I. I. Ivanov, R. Sumiya, L. Aayam, T.Wake, S. Tajiri, Y. Kurashima, S. Shikata, S. Akira, K. Takeda, and H. Kiyono	Microbe-dependent CD11b+ IgA+ plasma cells in early-phase robust intestinal IgA responses in mice	<i>Nat Commun</i>				2013 (in press)
Y. Fukuyama, D. Tokuhara, S. Sekine, K. Aso, K. Kataoka, J. Davydova, M. Yamamoto, R.S. Gilbert, Y. Tokuhara, K. Fujihashi, J. Kunisawa, Y. Yuki, H. Kiyono, J.R. McGhee, K. Fujihashi	Potential roles of CCR5+ CCR6+ dendritic cells induced by nasal ovalbumin plus Flt3 ligand expressing adenovirus for mucosal IgA responses	<i>PLoS One</i>				2013 (in press)
A. Lamichhane, H. Kiyono, and J. Kunisawa	Nutritional components regulate the gut immune system and its association with intestinal immune disease development	<i>J Gastroenterol Hepatol</i>				2013 (in press)
M. Kamioka, H. Kiyono, and J. Kunisawa	Herbal medicine-initiated approaches for the elucidation of immunological network in the intestine	<i>J Tradition Med</i>				2013 (in press)

I. Kong, A. Sato, Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, S. Kurokawa, K. Okada, S. Sato, D. Briles, J. Kunisawa, Y. Inoue, M. Yamamoto, K. Akiyoshi, and H. Kiyono	Nanogel-based PspA Intranasal Vaccine Prevents Invasive Disease and Nasal Colonization by Pneumococcus	<i>Infection and Immunity</i>			2013 Mar 4. [Epub ahead of print]
S. Sato, S. Kaneto, N. Shibata, Y. Takahashi, H. Okura, Y. Yuki, J. Kunisawa, and H. Kiyono, Transcription factor	Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells	<i>Mucosal Immunol</i>			2012 Dec 5. [Epub ahead of print]
Y. Kurashima, T. Amiya, T. Nochi, K. Fujisawa, T. Haraguchi, H. Iba, H. Tsutsui, S. Sato, S. Nakajima, H. Iijima, M. Kubo, J. Kunisawa, and H. Kiyono	Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors	<i>Nat Commun</i>	3	1034	2012
J. Kunisawa and H. Kiyono	Immune regulation and surveillance at the epithelial surface of the intestine	<i>Drug Discov Today</i>	18	87-92	2013
J. Kunisawa and H. Kiyono	Alcaligenes is commensal bacteria habituating in the gut-associated lymphoid tissue for the regulation of intestinal IgA responses	<i>Front Immunol</i>	3	1-5	2012
J. Kunisawa and H. Kiyono	Immunological function of sphingosine 1-phosphate in the intestine	<i>Nutrients</i>	4	154-166	2012
J. Kunisawa, Y. Kurashima, and H. Kiyono	Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccine	<i>Adv Drug Deliv Rev</i>	64	523-530	2012
田尻 創、清野 宏、國澤 純	腸管免疫疾患における脂質メディエーター	遺伝子医学MOOK			2013 (印刷中)
柴田納央子、國澤 純、清野 宏	自然リンパ球はリンパ組織内共生細菌の解剖学的な隔離を促進する	細胞工学	31	1256-1257	2012
國澤 純、清野 宏	実用化ステージとなった粘膜ワクチンの今後に向けた新展開	実験医学増刊号「感染・共生・防御の研究最前線」	30	3348-3353	2012
國澤 純、柴田納央子、清野 宏	腸管関連リンパ組織内における共生細菌との免疫学相互作用	医学のあゆみ	241	181-185	2012

Yoshikawa M Mukai Y Okada Y Tsumori Y Tsunoda SI Tsutsumi Y Aird WC Yoshioka Y Okada N Doi T Nakagawa S	Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody–drug conjugates based on the rapid isolation of the anti–Robo4 cell–internalizing antibody.	<i>Blood</i>	in press		2013
Yakura Y Ishihara C Kurosaki H Kazuki Y Komatsu N Okada Y Doi T Takeya H Oshimura M.	An induced pluripotent stem cell–mediated and integration–free factor VIII expression system.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	431(2)	336–41	2013
Okada Y Yonekura M Watanabe M Nakai T Wakimura A Shimizu M Kamikawa Y Kitayama M Kitajima K Aird WC Doi T	Embryonic stem cell differentiation system for evaluating gene functions involved in physiological megakaryocytic differentiation.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	419(3)	477–81	2012

アデノウイルスベクターを利用した C 型肝炎研究の新展開

吉田孟史,^a 近藤昌夫,^{*,a} 水口裕之,^b 八木清仁^a

Development of an Adenovirus Vector Containing a Hepatitis C Virus Expression Cassette and Its Application

Takeshi Yoshida,^a Masuo Kondoh,^{*,a} Hiroyuki Mizuguchi,^b and Kiyohito Yagi^a
^aLaboratory of Bio-Functional Molecular Chemistry; and ^bLaboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University; 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

(Received July 31, 2012)

Hepatitis C virus (HCV) is a hepatotropic member of the *Flaviviridae* family and contains a 9.6 kb positive-sense RNA genome. Approximately 170-million people are infected with HCV worldwide. These people face increased risks of chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma compared with the general population. Transduction of the HCV genome into hepatocytes is essential for understanding the mode of action of HCV infection, and for preparing HCV, evaluating HCV replication, and screening anti-HCV drugs. Although electroporation of *in vitro*-synthesized HCV genome and transduction of plasmid vectors containing the HCV genome are widely used in HCV research, a more convenient system with higher transduction efficiency is needed. Among viral transduction systems, adenovirus (Ad) vector is one of the most efficient and convenient systems; Ad vector has been widely used in clinical gene therapies. Therefore, Ad vector is a promising system for the delivery of the HCV genome; however, an Ad vector expressing the HCV genome has never been developed. We here describe the preparation of an Ad vector expressing the HCV genome, and outline future directions of HCV research using this vector system.

Key words—hepatitis C virus; adenovirus; RNA polymerase I-expression cassette

1. はじめに

現在世界では 1 億 7 千万人余の人々が C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) に感染し、感染者数は毎年 200–300 万人ずつ増加している。HCV に感染すると高率に慢性化し、30 年余りの歳月を経て肝硬変、肝がんへと進行し、患者の命を奪っていく (現在、世界で毎年 35 万人が HCV により命を落としている)。わが国では新規感染者は皆無に等しい状況であるものの、アジア及びアフリカ地域では増加しており、C 型肝炎の克服は世界保健衛生上の重要課題の 1 つとなっている。

1989 年に、それまで A 型肝炎及び B 型肝炎とは異なる肝炎として診断されていた非 A 非 B 肝炎の

80%が C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染によって引き起こされていることが見出された。¹⁾ HCV はフラビウイルス科に属する直径 55–65 nm の球状 RNA ウイルスであり、約 9.6 kb のプラス鎖 RNA ゲノムを有し、1 つの open reading frame から 3000 アミノ酸からなるポリプロテインが翻訳されその後プロセッシングにより構造タンパク質 (Core, E1, E2) 及び非構造タンパク質 (NS2, 3, 4A, 4B, 5A, 5B) が産生される。Core はヌクレオカプシド、E1, E2 はウイルスエンベロープ、NS3/4A はセリンプロテアーゼ・ヘリカーゼ、NS5B は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして機能することが明らかとなっているが、依然として HCV 粒子作製法の開発は立ち遅れており、いまだ HCV の生活環の全容は解明されていない。

C 型肝炎治療は、インターフェロン (interferon; IFN) 療法がゴールドスタンダードとなっており、IFN 単剤療法、リバビリンとの併用療法、ペグ化 IFN の開発へと進化を遂げ、最近 NS3/4A プロテ

The authors declare no conflict of interest.

^a大阪大学大学院薬学研究科生体機能分子化学分野、
^b同分子生物学分野 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

*e-mail: masuo@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 132 年会シンポジウム S41 で発表したものを中心に記述したものである。

アーゼ阻害剤を用いた3剤併用療法も実用化され、70-80%の患者に対して有効性が認められている。しかしながら、genotype 1b型ウイルス感染者に対する奏効率は50-70%にすぎないこと、うつ病や血小板減少などの副作用が生じ治療の中断を余儀なくされるケースがあること、薬剤耐性ウイルスが出現すること、肝移植患者に対する有効性に乏しいこと、高ウイルス量患者及び高齢患者に対する効果に乏しいことから、IFNフリーの新たな治療法や耐性ウイルス出現を回避可能な新たな治療戦略の開発が焦眉の急となっている。

拙稿では、現在のC型肝炎研究の現状及び課題を概説した後に当研究グループで進めているアデノウイルスベクターを利用したC型肝炎研究についてご紹介したい。

2. C型肝炎研究の現状及び課題

エイズウイルス感染者が約3000万人であることを踏まえると、HCV（約1億7千万人の感染者）は非常に高いpublic impactを持っていると言える。しかしながら、1989年のHCV同定以降、HCV培養法の確立は困難を極め、「なぜ、HCVがヒトやチンパンジーの肝細胞に特異的に感染するのか？」といったbig questionを始めとしてHCVの生活環の理解は遅々として進まず、HCV治療法の開発も立ち遅れていた。

1999年に、ウイルスゲノム上の構造領域遺伝子を取り除き、その部分に薬剤耐性遺伝子を挿入したサブジェノミックレプリコンを用いることで、HCV RNAゲノムの複製を培養細胞で解析する*in vitro* HCV複製評価系が確立された。²⁾ さらに、2005年に劇症肝炎患者から分離したウイルス株（genotype 2a）を用いた*in vitro* HCV培養法が開発され、³⁾ HCVの生活環に関する理解が急速に進んだ。

HCVは主として肝細胞に感染し、細胞表面に吸着したHCVは受容体を介して細胞内に侵入し、脱殻後ウイルスRNAが翻訳されることで複製が開始する。HCVと受容体との相互作用解析系としてHCVエンベロープを被覆したシュードウイルスが確立され、HCV感染受容体の同定は多方面から進められ、これまでにCD81, scavenger receptor B1, claudin-1, occludinがHCV受容体であること、受容体に対する抗体などを使用することで感染阻害作

用が観察されることなどが報告されている。^{4,5)}

一方、HCV RNAゲノム複製機構については、cyclophilinやmicroRNA (miR122)がHCV複製に関与する宿主因子として同定され、両分子を標的にしたC型肝炎治療法の開発が進められているものの、HCVゲノムを*in vitro*及び*in vivo*において高効率に導入するシステムは開発されておらず、依然としてHCV複製に関与する宿主因子の全容解明には至っていない。⁶⁻⁸⁾

哺乳類細胞におけるRNA発現系は、rRNAを発現するRNA polymerase (pol) I発現系、mRNAを発現するRNA pol II発現系、tRNAなどの短鎖RNAを発現するRNA pol III発現系に大別され、遺伝子発現ではRNA pol II発現系、siRNAなどの発現ではRNA pol III発現系が利用されており、pol II系及びpol III系の発現ベクターは非ウイルスベクター、ウイルスベクターを問わず、多種多様なベクターが開発され、基礎研究及び臨床研究において広く用いられている。一方、pol I発現系は13 kb以上のpre-rRNA (18S, 5.8S, 28S rRNAの前駆体)の発現に関与し、転写されたRNAには5'-Cap構造や3'-polyAテールが付加されないためRNAウイルスのゲノム発現系として適しているものの、応用範囲が限定されるためにpol I発現ベクターの開発は遅々として進展していない。⁹⁻¹²⁾

アデノウイルス (adenovirus; Ad) ベクターは、肝臓に対して高い集積性を有すること、基礎研究のみならず臨床的にも広く用いられていること、様々な感染域を有するベクターが開発されていることから、C型肝炎研究にふさわしい特徴を具備している。しかしながら、Adベクターを利用したHCVゲノム発現ベクターの開発は皆無に等しい。

以上の背景を踏まえ、当研究グループでは、Adベクターを利用したHCVゲノム発現システムの開発を試みた。

3. C型肝炎ウイルスゲノム発現ベクターの開発

前述したように、RNA pol I発現系はHCVゲノム発現系に適しているものの、pol I系ベクターの開発は立ち遅れている。そこでまず、RNA pol I発現カセットを有するルシフェラーゼ発現Adベクターを作製し、肝炎研究で汎用されているHuh7細胞に感染させたところ、ルシフェラーゼ発現が観察され、AdベクターにおいてRNA pol I発現カセッ

トが機能していた。

さて、HCV ゲノムには 5'末端から順に Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B がコードされている。Core-NS2 の領域はウイルスゲノムの複製に関与しないことから、この領域をレポーター遺伝子や薬剤耐性遺伝子に置換することで HCV 複製を迅速かつ簡便にモニターするシステム (HCV サブゲノムレプリコン) が開発され、C 型肝炎研究では広く用いられている。そこで、ルシフェラーゼ遺伝子を有する HCV レプリコン発現ベクターの創製を試みることにした。

まず、HCV レプリコンを RNA pol I カセットに挿入したプラスミドベクターを作製し、レポーター遺伝子の発現を検討したところ、ルシフェラーゼの発現が観察され、インターフェロン (IFN) 添加濃度依存的にルシフェラーゼ活性が低下しており、本レプリコン発現プラスミドが HCV 複製評価系として機能することを確認した (Fig. 1)。そこで次に、本プラスミドベクターを用いて HCV レプリコン発現 Ad ベクターの作製を試みたものの、Ad ベクター粒子は産生されなかった。RNA pol I 発現カセットでドライブされたルシフェラーゼを搭載した Ad ベクター粒子は 293 細胞を用いた従来の方法で作製できたことから、HCV レプリコンから産生される因子が Ad パッケージング細胞 (293 細胞) 中での Ad ベクター増幅を阻害している可能性が示唆された。そこで NS3/4A プロテアーゼの認識配列を調べたところ、本プロテアーゼの認識配列 (D/E) XXXX (C/T) (A/S) が複数の Ad ベクター構成タンパク質 (E1A, pIIIa, pol, V) に存在していた。¹³⁻¹⁶⁾ このことは、293 細胞中で Ad ベクターが増幅する際にリードスルーした NS3/4A プロテアーゼによってベクター粒子作製が阻害されている可能性を示唆している。そこで、HCV ゲノム発現 Ad ベクター作製の基本戦略は、293 細胞中で Ad ベクター増幅中に HCV ゲノム発現を抑制することにあると考え、転写制御型 RNA pol I 発現系の開発を試みた。

転写制御システムとして、RNA pol II 発現系及び RNA pol III 発現系に広く使用されているテトラサイクリン (tetracycline; tet) 制御系を用い、tet 応答性の RNA pol I プロモーターの作製を試みた。RNA polymerase I プロモーター (412 bp) には、

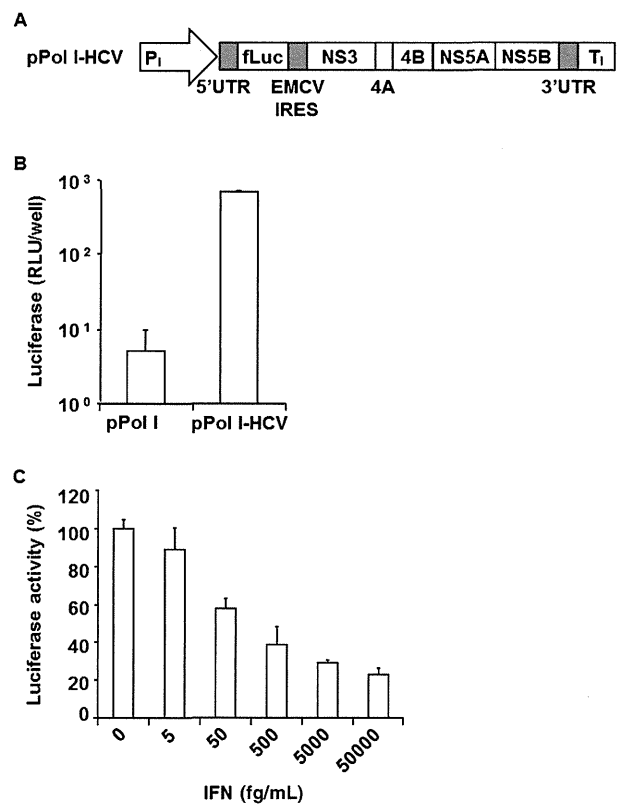


Fig. 1. Preparation of Plasmid Expressing Subgenomic HCV RNA Driven by RNA Pol I Promoter

A) Schematic construct of sub-genomic HCV genome-expression cassette. The HCV sub-genome gene was driven by the RNA pol I promoter (P₁) and terminator (T₁). B) Transgene expression in Huh7 cells. Cells were transfected with pPol I-HCV. After 24 h of transfection, the luciferase activities were measured. Data are mean \pm S.D. ($n=3$). C) Effect of IFN on HCV replication in RNA pol I vector-transfected cells. Huh7 cells were transfected with pPol I-HCV. After 2.5 h of transfection, the cells were treated with IFN at the indicated concentration. After an additional 72 h of incubation, the luciferase activity was measured. The luciferase activity (%) was calculated as a percentage of that in the vehicle-treated cells. Data are mean \pm S.D. ($n=3$).

コアプロモーター配列 (-1~-40 bp), upstream control element (UCE) 結合配列 (-130~-235 bp) が含まれている。そこで、UCE の上流に tet 応答配列 (tet responsive element; TRE) を挿入したハイブリッドプロモーター P₁235, P₁311, P₁412 を作製し、ルシフェラーゼ発現を指標にプロモーター活性を解析した [Fig. 2(A)]. まず、tet 制御性 transactivator (tTA) 非存在下での発現を解析したところ、P₁235 プロモーターが最も低い値を示していた。さらに、tTA 発現プラスミドを用いて tet 応答性を確認したところ、いずれのハイブリッドプロモーターも tet 添加濃度依存的に転写抑制が観察された [Fig. 2(B)]. 以上の結果を踏まえ、293 細胞で Ad ベクター作製時にリードスルーが少なく、tet

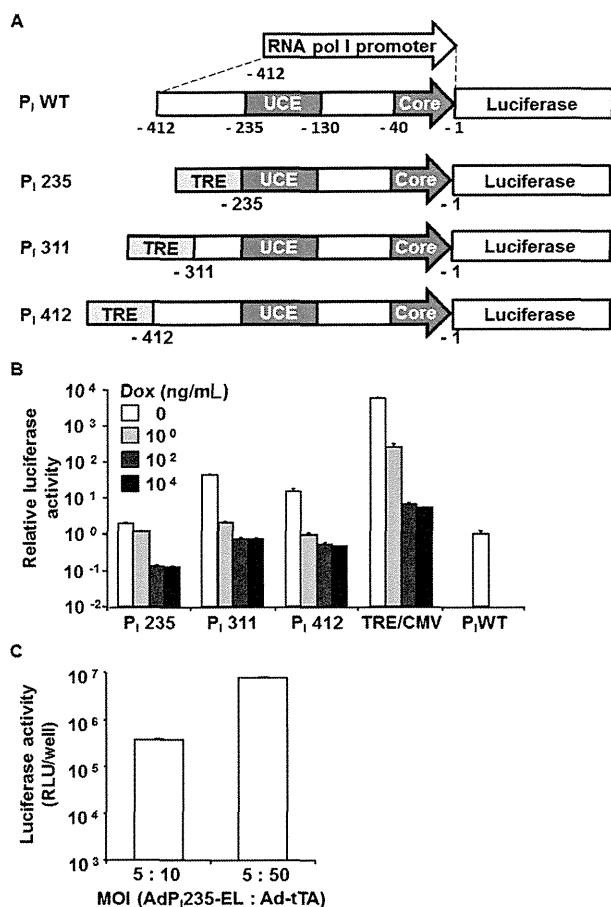


Fig. 2. Development of Tet-controllable RNA Pol I Promoter

A) Construct of the chimeric RNA pol I promoter. The 412-bp human RNA pol I promoter contains Core (-40 to -1), the binding site of the transcription factor, and UCE (-235 to -130). TRE is connected to the full or partial RNA pol I promoter at the indicated sites, resulting in P₁235, P₁311 and P₁412. B) Promoter activities of the chimeric promoter in Huh7 cells. Huh7 cells were co-transfected with the chimeric RNA pol I plasmid coding EGFP_{Luc}, β -galactosidase, and transactivator plasmid (tTA). After 2.5 h of transfection, the cells were treated with Dox at the indicated dose. After an additional 48 h of incubation, the luciferase activities and β -galactosidase activities were measured. The luciferase activity was normalized by the β -galactosidase activity and expressed relative to that of pP₁WT-EL-transfected cells. Data are mean \pm S.D. ($n=3$). C) Transgene activity of Ad vector coding the chimeric promoter construct. Huh7 cells were co-infected with AdP₂₃₅-EL and Ad-tTA. The MOI ratio of AdP₂₃₅-EL to Ad-tTA was 5 : 10 or 5 : 50. After an additional 48 h of incubation, the luciferase activity was measured. Data are the mean \pm S.D. ($n=3$).

応答性を有した P₂₃₅ を用いて Ad ベクターを作製、P₁235 が Ad ベクター上でも機能することを確認し、tet 制御性 RNA pol I 発現 Ad ベクターの開発に成功した [Fig. 2(C)].

次に、当該ハイブリッドベクターを用いて、HCV レプリコン発現 Ad ベクターの作製を試みたところ、通常の 293 細胞を用いた作製法によりベクター粒子が産生された。本ベクターを感染させた Huh7 細胞において、HCV レプリコン由来の NS5A の発

現が認められ、ルシフェラーゼも発現していた [Figs. 3(A)-(C)]. 本発現における HCV 由来 RNA polymerase NS5B の関与を検証するために、複製能欠損体 Δ GDD タイプの NS5B をコードする HCV レプリコンを作製した。 Δ GDD ベクター感染細胞ではルシフェラーゼ活性及び NS3 発現が観察されなかったことから、本ベクターシステムによって HCV ゲノム複製がモニターできるものと推察された [Figs. 3(D) and (E)].

4. C 型肝炎ウイルスゲノム発現ベクターの応用

現在 HCV 治療薬として、NS5A や NS5B polymerase の阻害剤が臨床試験されているものの、いずれも HCV 因子を標的としていることから臨床応用では耐性ウイルスの出現が危惧されている。⁷⁾ HCV 複製に寄与する宿主因子の同定は耐性ウイルスの出現を回避した治療法開発の鍵を握るものの HCV ゲノム導入法の開発遅延により研究は遅れていた。

ヒト iPS 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ることから、iPS 由来肝細胞が C 型肝炎研究に新たなブレークスルーを引き起こすものと期待されている。^{17,18)} そこで、HCV レプリコン発現 Ad ベクターを用いて iPS 由来肝細胞における HCV 複製能解析を試みた。

未分化 iPS 細胞ではルシフェラーゼ発現が観察されていなかったが、iPS 由来肝細胞では Huh7 細胞と同程度の発現が認められた [Fig. 4(A)]. HCV RNA ゲノムの発現解析でも同様の傾向を示し、未分化 iPS 細胞では HCV RNA ゲノムは発現せず、iPS 由来肝細胞でのみ複製が観察された [Fig. 4(B)]. また、NS5B 不活性型ベクターでは、ルシフェラーゼ及び HCV ゲノムがいずれも発現していなかったことから、iPS 由来肝細胞は HCV 複製評価系として機能するものと推察される。

HCV は未分化 iPS 細胞では複製せず、iPS 由来肝細胞でのみ複製していたことから、未分化 iPS 細胞から肝細胞への各分化段階の細胞を sequential に解析することで HCV 複製に寄与する新たな宿主因子の同定につながる可能性がある。また、C 型肝炎感染患者間で IFN 療法の感受性が違うことが知られており、治療背景の異なる患者由来の iPS 細胞を用いた解析を行うことで C 型肝炎治療法の最適化に資する情報を集積できると期待される。

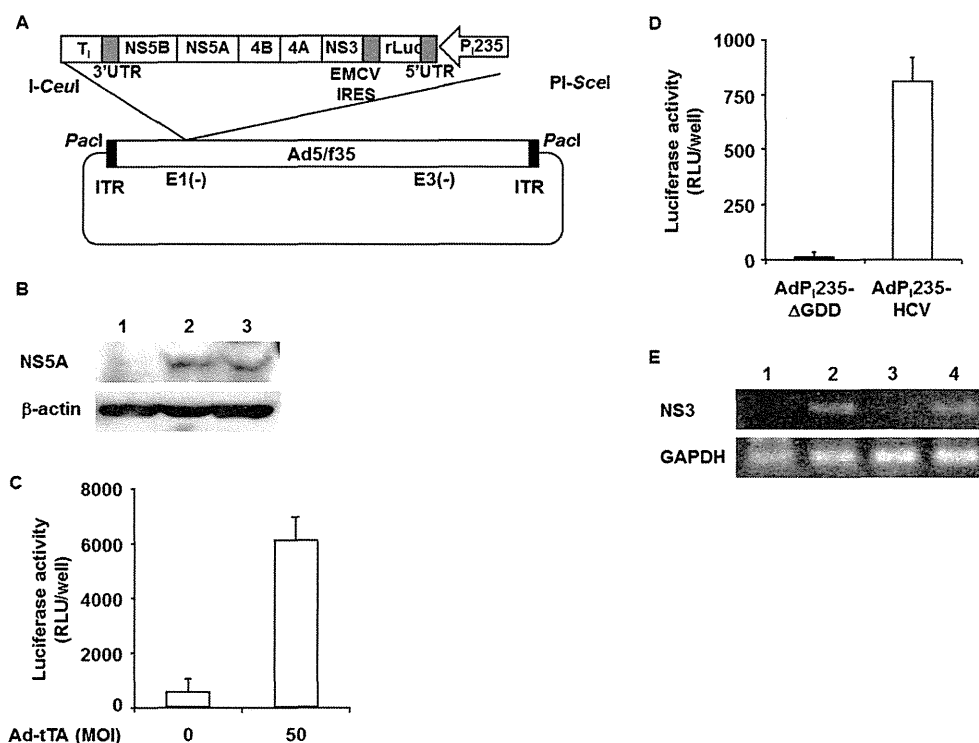


Fig. 3. Preparation of Ad Vector to Monitor HCV Replication

A) Construct of Ad vector. The Ad vector contained the chimeric RNA pol I promoter (P₂₃₅) and the HCV replicon to monitor HCV replication as the luciferase expression. B) Expression of HCV NS5A protein in Huh7 cells transfected with AdP₂₃₅-HCV. The cells were transfected with AdP₂₃₅-HCV (10 MOI) and Ad-tTA (50 MOI). After 72 h of incubation, the cells were harvested, and the lysates (30 μg) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with antibody against NS5A. Huh7 cells and Huh7.5.1 1b Feo cells were used as the negative and positive controls, respectively. Lane 1, Huh7 cells; lane 2, Huh7 cells infected with AdP₂₃₅-HCV; lane 3, Huh7.5.1 1b Feo cells. C) Expression of luciferase in the Ad vector-transfected cells. Huh7 cells were co-infected with Ad-P₂₃₅-HCV (10 MOI) and 0 or 50 MOI of Ad-tTA. After an additional 48 h of incubation, the luciferase activity was measured. Data represent the mean ± S.D. (n = 3). D) Involvement of NS5B in expression of luciferase in the Ad vector-transfected cells. Huh7 cells were infected with AdP₂₃₅-HCV or AdP₂₃₅-ΔGDD (3 MOI) and Ad-tTA (15 MOI). After 24 h, the cells were treated with 10 μg/mL of Dox for 48 h. Then, the luciferase activity was measured. Data represent the mean ± S.D. (n = 3). E) Expression of minus-stranded HCV RNA in the Ad vector-transfected cells. Huh7 cells were co-infected with AdP₂₃₅-HCV or AdP₂₃₅-ΔGDD at 3 MOI and Ad-tTA at 15 MOI. After 24 h, the cells were treated with 10 μg/mL of Dox for 48 h. Then RT-PCR analysis was performed for detection of minus-stranded HCV NS3 and GAPDH. The PCR products were separated on 2% agarose gel. Huh7 cells and Huh7.5.1 1b Feo cells were used as the negative and positive controls, respectively. Lane 1, Huh7 cells; lane 2, Huh7.5.1 1b Feo cells; lane 3, Huh7 cells infected with AdP₂₃₅-ΔGDD; lane 4, Huh7 cells infected with AdP₂₃₅-HCV.

5. おわりに

ようやく最近、わが国でも NS3/4A プロテアーゼ阻害剤が認可され、C 型肝炎治療の奏効率が向上しつつある。しかしながら、HCV が同定されて 20 年以上経つものの、依然として患者血清中の HCV を増幅する方法は確立されておらず、感染モデル動物の開発も立ち遅れており、HCV の変異に対応した治療戦略の構築は皆無に等しい。世界では 1 億 7 千万人の感染者があり、その数は増加傾向にあることから、感染予防ワクチンが待望されているが、いまだワクチンは開発されていない。

本稿で紹介した HCV ゲノム発現系は、既存の多種多様な Ad ベクター技術を用いることで、迅速かつ簡便に HCV ゲノム発現ベクターを作製可能であること、多種多様な感染域を持つベクターが開発で

きること、複製能欠損 HCV 粒子産生ベクターをワクチンとして応用できることから、基礎・臨床両面において C 型肝炎研究を推進する強力なツールになると期待される。

謝辞 HCV レプリコンシステムの開発では坂本直哉先生（東京医科歯科大（現北大医））、HCV 感染阻害実験では松浦善治先生（阪大微研）及び谷英樹先生（阪大微研（現感染研））との共同研究による成果です。当ラボ室員及びご高配を頂戴した研究者の方々に衷心よりお礼申し上げます。なお、本稿で紹介したデータの一部は、文部科学省科学研究費補助金（課題番号：23659039）、厚生労働科学研究費補助金のサポートにより実施されたものである。

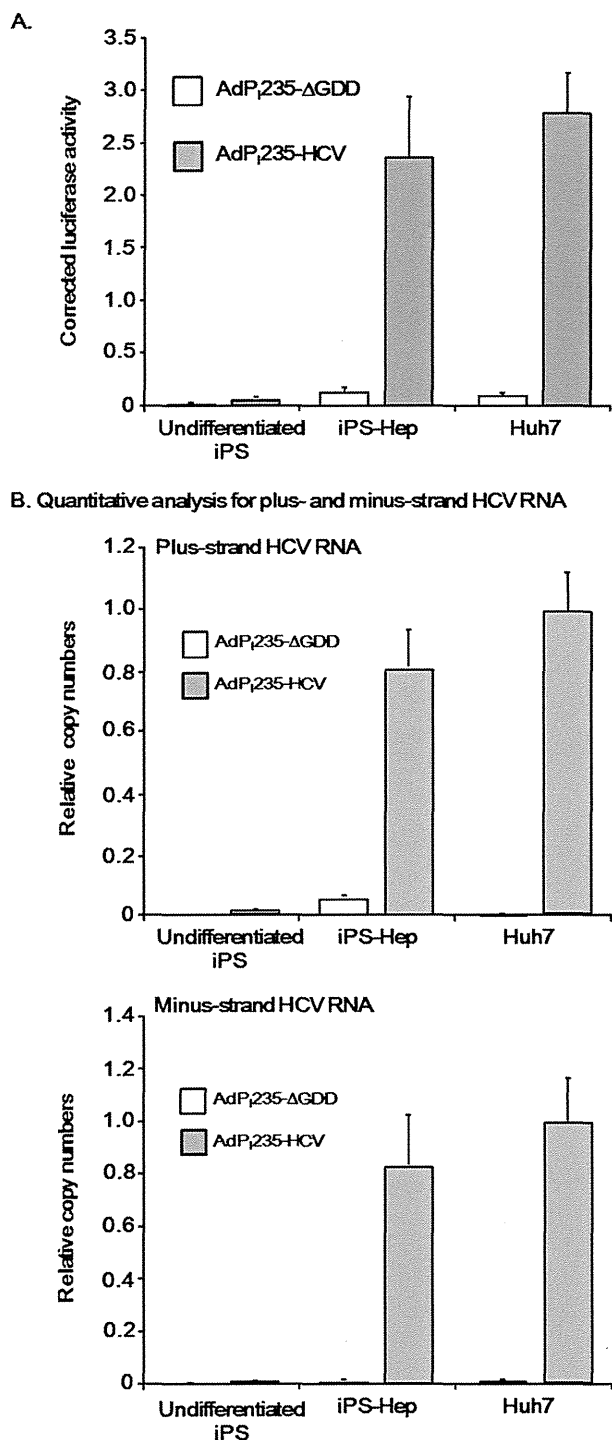


Fig. 4. HCV Replication Assay in iPS-Hep Cells

A) Comparison of replication of HCV subgenomic replicons, AdP₂₃₅-HCV (gray column) and AdP₂₃₅-ΔGDD (open column), in undifferentiated iPS, iPS-Hep and Huh7 cells. The cells were infected with replicons, treated with Dox, and *Renilla* luciferase activity was measured. To normalize for infectivity of Ad vector, cells were co-infected with AdP₂₃₅-fluc and Ad-tTA. After 72 h, firefly luciferase activity was measured. Corrected luciferase activity was calculated as the ratio of *Renilla* luciferase activity to firefly luciferase activity. B) Real-time PCR analysis of HCV plus- and minus-strand RNA in iPS-Hep cells. iPS-Hep cells were infected with replicons, and total RNA was subjected to real-time PCR analysis. The copy numbers were shown as ratio of those of Huh7. Data are presented as means ± S.D. (*n*=3).

REFERENCES

- 1) Choo Q. L., Kuo G., Weiner A. J., Overby L. R., Bradley D. W., Houghton M., *Science*, **244**, 359–362 (1989).
- 2) Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R., *Science*, **285**, 110–113 (1999).
- 3) Wakita T., Pietschmann T., Kato T., Date T., Miyamoto M., Zhao Z., Murthy K., Habermann A., Krausslich H. G., Mizokami M., Bartenschlager R., Liang T. J., *Nat. Med.*, **11**, 791–796 (2005).
- 4) Meredith L. W., Wilson G. K., Fletcher N. F., McKeating J. A., *Rev. Med. Virol.*, **22**, 182–193 (2012).
- 5) Sabahi A., *Virol. J.*, **6**, 117 (2009).
- 6) Jopling C. L., Yi M., Lancaster A. M., Lemon S. M., Sarnow P., *Science*, **309**, 1577–1581 (2005).
- 7) Schlutter J., *Nature*, **474**, S5–S7 (2011).
- 8) Watashi K., Ishii N., Hijikata M., Inoue D., Murata T., Miyanari Y., Shimotohno K., *Mol. Cell*, **19**, 111–122 (2005).
- 9) Flatz L., Bergthaler A., de la Torre J. C., Pinschewer D. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4663–4668 (2006).
- 10) Flick R., Pettersson R. F., *J. Virol.*, **75**, 1643–1655 (2001).
- 11) Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6108–6113 (2000).
- 12) Neumann G., Watanabe T., Ito H., Watanabe S., Goto H., Gao P., Hughes M., Perez D. R., Donis R., Hoffmann E., Hobom G., Kawaoka Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9345–9350 (1999).
- 13) Clarke B., *J. Gen. Virol.*, **78**, 2397–2410 (1997).
- 14) Kolykhalov A. A., Agapov E. V., Rice C. M., *J. Virol.*, **68**, 7525–7533 (1994).
- 15) Komoda Y., Hijikata M., Sato S., Asabe S., Kimura K., Shimotohno K., *J. Virol.*, **68**, 7351–7357 (1994).
- 16) Urbani A., Bianchi E., Narjes F., Tramontano A., De Francesco R., Steinkuhler C., Pessi A., *J. Biol. Chem.*, **272**, 9204–9209 (1997).
- 17) Moriguchi H., Chung R. T., Sato C., *Hepatol-*

-
- ogy*, **51**, 344–345 (2010).
- 18) Schwartz R. E., Trehan K., Andrus L., Sheahan T. P., Ploss A., Duncan S. A., Rice C. M., Bhatia S. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 2544–2548 (2012).

Percolation Analysis in Electrical Conductivity of Madin-Darby Canine Kidney and Caco-2 Cells by Permeation-Enhancing Agents

Makiko Washiyama,^a Naoya Koizumi,^a Makiko Fujii,^a Masuo Kondoh,^b Kiyohito Yagi,^b and Yoshiteru Watanabe^{*,a}

^aDepartment of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Showa Pharmaceutical University; 3–3165 Higashitamagawagakuen, Machida, Tokyo 194–8543, Japan; and ^bGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University; 1–6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565–0871, Japan.

Received September 7, 2012; accepted November 28, 2012

The control of permeability through the paracellular route has been paid great attention to for enhanced bioavailability of macromolecular and hydrophilic drugs. The paracellular permeability is controlled by tight junctions (TJ), and claudins are the major constituents of TJ. Despite numerous studies on TJ modulation, the dynamics is not well understood, although it could be crucial for clinical applications. Here, we studied the time (t) course of electrical conductivity (Σ) in a monolayer of Madin-Darby canine kidney (MDCK) and Caco-2 cells upon treatment with modulators, the C-terminus fragments of *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE) and sodium caprate (C10). For C-CPE treatment, Σ remains approximately constant, then starts increasing at $t=t_c$ (percolation threshold). For C10, on the other hand, Σ increases to 1.6–2.0 fold of the initial value, stays constant, and then starts increasing again for both MDCK and Caco-2 cells at $t=t_c$. We find that this behavior can be explained within a framework of percolation, where Σ shows a logarithmic dependence on $t-t_c$ with the power of μ ; μ denotes the critical exponent. We obtain $\mu=1.1$ – 1.2 regardless of cell type or modulator. Notably, μ depends only on the dimensionality (d) of the system, and these values correspond to those for $d=2$. Percolation is thus the operative mechanism for the increase in Σ through TJ modulation. The findings provide fundamental knowledge, not only on controlled drug delivery, but also on bio-nanotechnologies including the fabrication of biological devices.

Key words percolation analysis; tight junction; transepithelial electrical resistance; critical exponent; claudin; permeation-enhancing agent

Drug delivery routes include transcellular and paracellular pathways. The permeability through the former for macromolecular and hydrophilic drugs is quite low. The control of permeability through the paracellular route has thus received a great deal of attention for enhanced bioavailability.^{1,2)} The paracellular permeability across epithelial cells is controlled principally by tight junctions (TJ), which are located at the most apical portion of cell–cell contact points.³⁾ Claudins are the major constituents of TJ and form a strand network.⁴⁾ A single TJ strand consists of a continuous array of small particles having a diameter of 5–10 nm,⁴⁾ and claudins between adjacent cells form the strand through *trans*-interaction. The barrier property of these strands depends strongly on the combination of claudin types between adjacent cells,⁵⁾ and hence, on cell types. In addition, TJ strands dynamically change their topology within <30 s.⁶⁾ For modulating TJ barrier functions, including permeability of molecules and transepithelial electrical resistance (TER), the C-terminus fragments of *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE)^{4,7)} and sodium caprate (C10)⁸⁾ have been extensively studied as absorption enhancers. Comprehensive reviews on the molecular basis of the structures,⁹⁾ as well as physiology and function¹⁰⁾ of TJs have been made.

A number of models correlating TJ structures with their barrier function have been proposed. A strand-count model¹¹⁾ and a binary sieving model¹²⁾ are typical examples. In the former model, the TJ strand number correlates with TER under the assumption of an equal barrier function of TJ strands over a wide range of cell types and a fixed topology of the structure. The latter model consists of restrictive and

non-restrictive pores in parallel, and explains solute size dependency of permeability. The random connection of permeable and less- (or non-)permeable paths is a common feature of these models. This physical view corresponds to what is called percolation on a random resistor network (RRN).

Many systems including electrical conductivity (Σ) in composites, forest fire spreading and ferromagnetism exhibit percolation.¹³⁾ Percolation, for instance, Σ in a conductor/insulator binary system with the fraction of a conductor p , is characterized by its scaling relation.¹³⁾ At a certain value of p ($=p_c$), termed percolation threshold in p , the interconnected resistors percolate throughout the system, and Σ thus starts increasing in a logarithmic manner, where $\Sigma \propto (p-p_c)^\mu$. Note that p_c depends both on the dimensionality (d) and the details of the system, while μ , the critical exponent, depends only on d .¹³⁾ Theoretical and experimental works as well as computer simulations have been performed and report p_c and μ for d and many types of lattice.¹³⁾ In biological systems, the percolation network model for trafficking and signaling through the cytoskeleton has been described.¹⁴⁾

Despite accumulating works on TJ modulators, the dynamics or time-dependent behavior is not well understood, although it could be crucial from the viewpoint of controlled drug delivery. Treatment with C-CPE, for instance, alters the strand structure from a continuous to discontinuous array of small particles.⁴⁾ This structure change is accompanied by a change in TER. In the current study, we adopt the time course of TER after treatment with C10 or C-CPE to evaluate the dynamics of TJ barrier function. Note that the time resolution of the TER experiment was better than that for permeability, enabling analysis of the dynamics of TJ modulation. The

The authors declare no conflict of interest.

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: watanabe@ac.shoyaku.ac.jp