

の作用もビタミンD併用によるC型慢性肝炎の治療効果向上に関与していると考えられた。今後、免疫細胞をビタミンDにより刺激し、誘導される抗菌ペプチドによる抗HCV活性を確認したい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Saeed, M., Gondeau, C., Hmwe, S., Yokokawa, H., Date, T., Suzuki, T., Kato, T., Maurel, P., and Wakita, T. Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. *Gastroenterology* 144 (1), 56-e7, 2013.
- 2) Matsumura, T., Kato, T., Sugiyama, N., Tasaka-Fujita, M., Murayama, A., Masaki, T., Wakita, T., and Imawari, M. 25-hydroxyvitamin D(3) suppresses hepatitis C virus production. *Hepatology* 56 (4), 1231-1239, 2012.
- 3) Murayama, A., Sugiyama, N., Yoshimura, S., Ishihara-Sugano, M., Masaki, T., Kim, S., Wakita, T., Mishiro, S., and Kato, T. A Subclone of HuH-7 with Enhanced Intracellular Hepatitis C Virus Production and Evasion of Virus Related-Cell Cycle Arrest. *PLoS One* 7 (12), e52697, 2012.
- 4) Suzuki, R., Saito, K., Kato, T., Shirakura, M., Akazawa, D., Ishii, K., Aizaki, H., Kanegae, Y., Matsuura, Y., Saito, I., Wakita, T., and Suzuki, T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology* 432 (1), 29-38, 2012.
- 5) Date, T., Kato, T., Kato, J., Takahashi, H., Morikawa, K., Akazawa, D., Murayama, A., Tanaka-Kaneko, K., Sata, T., Tanaka, Y., Mizokami, M., and Wakita, T. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol* 86 (19), 10805-10820, 2012.
- 6) Murayama, A., Sugiyama, N., Watashi, K., Masaki, T., Suzuki, R., Aizaki, H., Mizuochi, T.,

Wakita, T., and Kato, T. Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays. *J Clin Microbiol* 50 (6), 1943-1949, 2012.

- 7) Murayama, A., Kato, T., Akazawa, D., Sugiyama, N., Date, T., Masaki, T., Nakamoto, S., Tanaka, Y., Mizokami, M., Yokosuka, O., Nomoto, A., and Wakita, T. Production of infectious chimeric hepatitis C virus genotype 2b harboring minimal regions of JFH-1. *J Virol* 86 (4), 2143-2152, 2012.

### 2. 学会発表

- 1) Kato T., Matsumura T, Sugiyama N, Murayama A, Wakita T, Imawari M. Anti-Hepatitis C Virus Effect of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> Targeting Infectious Virus Production. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
- 2) Murayama A, Kato T., Sugiyama N, Wakita T. Infectious Virus Production with Hepatitis C Virus Genotype 2b Genome Harboring Minimal Regions of JFH-1. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
- 3) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara- Sugano M, Wakita T, Mishiro S, Kato T. Efficient hepatitis C virus production associated with enhanced virus assembly and evasion of cell cycle arrest. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 9-13, 2012. Boston, MA, USA.
- 4) 村山麻子、三代俊治、脇田隆字、加藤孝宣. C型肝炎ウイルス産生効率の良いHuH-7細胞サブクローンの同定と解析. 第19回肝細胞研究会、2012年6月、札幌.
- 5) 藤田めぐみ、脇田隆字、加藤孝宣. HCV genotype

1b 株キメラウイルスを用いた HCV core 領域アミノ酸 70/91 変異株の解析. ワークショップ 18:C 型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略 第 48 回日本肝臓学会総会、2012 年 6 月、金沢.

6) 村山麻子、加藤孝宣、杉山奈央、脇田隆字. C 型肝炎ウイルス遺伝子型 2b 株と JFH-1 株のキメラウイルスを用いた抗ウイルス薬評価系の樹立. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪.

7) 村山麻子、杉山奈央、岡本有加、政木隆博、脇田隆字、加藤孝宣. NS5A 領域置換 HCV キメラ株を用いた NS5A 阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月、福岡.

G. 知的所有権の出願・登録状況

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）  
分担研究報告書（平成24年度）

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究

分担研究者：萩原 正敏 京都大学 教授

分担研究課題：肝炎ウイルス増殖を抑制する新規治療薬候補物質の探索と作用機序の解明に関する研究

研究要旨：分担研究者萩原らは、SR蛋白質リン酸化酵素SRPKの特異的阻害剤SRPIN340がC型肝炎ウイルスの増殖を抑制する作用を有すること、さらに合成展開した化合物SFV785が、C型肝炎ウイルス、デング熱ウイルスなどフラビウイルスの増殖を抑制することを見出した。SFV785の作用点はおそらく宿主キナーゼをターゲットとして、ウイルスゲノム合成タンパク合成を阻害しないが、感染性ウイルス粒子形成阻害であることを見いだした。また東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中から、C型肝炎ウイルスの増殖を抑制する新たな化合物を見出し、その作用機序を解析した。

A. 研究目的

C型肝炎患者に対してはインターフェロンとリビリンが投与されるが、全患者の約60%はこの治療に反応せず、有効な治療方法がないのが現状である。また薬剤耐性ウイルスの出現によりB型肝炎ウイルスの新たな治療薬も必要とされている。

萩原研究室では以前からRNAプロセッシングキナーゼ阻害剤の開発を進め、SR蛋白質リン酸化酵素SRPKの特異的阻害剤SRPIN340がC型肝炎ウイルスの増殖を抑制することを見だし、また、SRPIN340より抗HCV能の高い類縁体SFV785を創製した。SFV785はこれまで治療薬のなかったデング熱や黄熱病に対しても有効であり、おそらくは宿主キナーゼの活性抑制を介して、細胞内のゲノム複製には影響が無いが産生粒子の感染能を消失させる、新規作用機序を見いだした。

本年度は新規肝炎治療薬の開発を目指し、効果的にC型肝炎ウイルス増殖を抑制する新たな化合物をケミカルライブラリーから探索する。また萩原研究室で同定されたヘルペスウイルスなどDNAウイルスの増殖を抑制することが判明している独自化合物が、B型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性についても検討する。

B. 研究方法

1) 増殖ルシフェラーゼ発現HCVレプリコン細胞を

用いて、東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中から、見つかった新たな化合物の作用機序を解明するとともに、JFH-1C型肝炎ウイルスの増殖抑制活性について検討した。  
2) 独自に合成しヘルペスウイルスなどDNAウイルスの増殖を抑制することが判明している化合物が、B型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性について検討した。

（倫理面の配慮）

京都大学の倫理規定にしたがって、遺伝子組み換え実験や感染実験などを実施した。

C. 研究結果

1) 東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中からC型肝炎ウイルスの増殖を抑制する化合物を見出した。そのうちの一つはレチノイド関連化合物であったが、今までレチノイン酸で報告されている抗HCV能を凌いでいた。マイクロアレイ、RT-PCRを用いた遺伝子発現変動解析などから、酸化ストレス応答に関する酵素発現の回復がこの化合物の作用点であることを見いだした（論文投稿準備中）。  
2) DNAウイルス増殖阻害化合物が、B型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性について、解析系の検討を行った。

D. 考察

東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中から新たに見つかったC型肝炎遺伝子発現抑制作用を

示すレチノイド化合物の作用機序は、先に同定された SRPIN340 類縁体 SFV785 の作用点と異なる。また、この化合物の作用機序が、レチノイン酸受容体 (RAR) アゴニストであるレチノイン酸の抗 HCV 能の原因として考えられている、抗酸化ストレス酵素の発現誘導によるものであることは一致したが、その効果はレチノイン酸を凌駕した。複数の RAR アゴニスト/アンタゴニスト及び RXR アゴニスト/アンタゴニストとの抗 HCV 能の比較、及び転写レポーターを用いた解析から、今まで考えられて来た、当該遺伝子の核内受容体を介した転写・発現誘導でない新規パスウェイでの作用であることが示唆された。

#### E. 結論

本年度実施した化合物スクリーニングで同定された化合物は、現在 HCV 治療薬として臨床研究に進んでいるレチノイン酸と最終作用機序は同一であるが、細胞での抗 HCV 能は本化合物がレチノイン酸を凌駕している。実際の治療に用いる際の低容量化と作用機序の違いから、レチノイド過剰摂取による副作用を回避する可能性が考えられる。今後さらに詳細な作用機序の解析を進め、同作用機序でのより効果の高い候補化合物の創製が望まれる。

また、萩原研究室で同定された DNA ウイルス増殖阻害化合物が、現在抗ヘルペスウイルス薬として剤形検討及び臨床研究の準備を進めている(愛知医科大学との共同研究)。本化合物も宿主キナーゼを抗ウイルス作用のターゲットとしていることが判っており、もし同じく DNA ウイルスである B 型肝炎ウイルス増殖を抑制するのであれば、医薬承認までのステップが大幅に短縮される。今後他の解析系を用いることで、B 型肝炎ウイルス適用拡大が見込めるかを検討する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 原著論文

1. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyohashi

K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M. (2012) Identification of novel N-(morpholine-4- carbonyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(3):1315-23.

##### 英文総説

1. Ogawa Y, Hagiwara M (2012) Challenges to congenital genetic disorders with "RNA-targeting" chemical compounds. *Pharmacol Ther*. 134(3):298-305.

2. Kuroyanagi H., Takeuchi A., Nojima T., and Hagiwara H. (2012) Single-Cell Detection of Splicing Events with Fluorescent splicing Reporters in Alternative pre-mRNA Splicing: Theory and Protocols Stamm S., and Smith C., and Luhrmann R. Wiley-Blackwell, Weinheim. 298-310.

##### 和文総説

1. 萩原正敏 cAMP シグナル(2012) シグナル伝達キーワード事典 p53-54 (羊土社)

2. 片岡直行, 萩原正敏 RNA を標的とした新しい創薬戦略(2012) 実験医学 Vol.30, No.7,1064-1070

##### 2. 主な学会発表

1. Masatoshi Hagiwara, "New chemical therapeutics of congenital genetic disorders targeting pre-mRNA."

文部科学省最先端基盤事業「化合物ライブラリーを活用した創薬等先端研究・教育基盤の整備」国際シンポジウム. 2012. 6 月京都

2. Masatoshi Hagiwara, "Chemical targeting of RNA processing for new therapeutics of congenital diseases. The 1<sup>st</sup> Official Conference of the International Chemical Biology Society, October 4-5, 2012 USA

3. Yukiko Okuno, Nguyen Bao Ngoc, Masatsugu Denawa, Hiroyuki Kagechika, Naoya Sakamoto and Masatoshi Hagiwara. "Identification of novel compound with the anti-Hepatitis C activity, which promotes the expression of Gastrointestinal glutathione peroxidase". The 1<sup>st</sup> Official Conference of the International Chemical Biology Society, October 4-5, 2012 USA

## G 知的所得権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

発明の名称：抗ウイルス組成物

①発明者：萩原正敏、奥野友紀子、細谷孝充、小野木博、吉田優

②日本出願日：2012年3月15日(特願2012-58340)

③出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学、株式会社キノファーマ

④発明の内容の概略：宿主細胞の蛋白質リン酸化酵素を阻害し抗ウイルス活性を示す新規化合物に関する特許

発明の名称：スクリーニング方法、タンパク質の不安定性及び/又は安定性を誘導する物質、及び、タンパク質の活性評価

①発明者：萩原正敏、喜井勲、細谷孝充、隅田有人、吉田優

②日本出願日：2012年6月6日(特願2012-129094)

③出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書（平成24年度）

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究

分担研究者：三浦 直行

研究協力者：則武 秀尚

Mohammad Johirul Islam

分担研究課題：HCV 感染モデル動物の開発

研究要旨：H23年度にHCV（C型肝炎ウイルス）の侵入過程に関わるヒト4因子をマウス肝細胞に発現したトランスジェニックマウス（CCSOマウスと呼ぶ）を完成させた。HCVのE2蛋白がCCSOマウス切片には結合するが、野生型マウスの肝臓切片には結合しなかった。このデータは、発現させたヒトCD81蛋白質が機能をもっていることを示していた。そこで、患者血清からのHCVをマウスに静脈注射したが、マウス血清中にはウイルスが出現しなかった。そこで、このマウスに感染がおこらない原因を探索したところ、(1) ヒト4因子の発現量が低い、(2) マウスCd81とOc1n蛋白質はHCVの肝細胞への侵入を阻害する、ことを見出した。得られた事実に基づき、HCV侵入がおこるマウスの作成実現へのヒントが得られた。

A. 研究目的

ヒト肝細胞にしか感染しないHCVが感染できる遺伝子操作マウスを作成し、ウイルスを大量生産し、ワクチン等への応用を行う。

B. 研究方法

CCSOマウス肝細胞の抽出液を作り、4因子の発現量をHuh7.5.1細胞のそれとウエスタンブロット法で解析する。また、マウスCd81、Oc1nやアンチセンスNPC1L1をHuh7.5.1細胞に過剰発現をさせて、HCVの細胞内侵入への効果を検討する。

（倫理面への配慮）

動物愛護の精神に基づき、麻酔薬投与後、動物を死亡させている。

C. 研究結果

CCSOマウスのCD81、CLDN1、SRBI、OCLN発現量は、Huh7.5.1細胞の20%、10%、20%、10%と低値を示した。また、マウスCd81、Oc1nの過剰発現は、HCVの肝細胞への侵入を25%、20%阻害した。アンチセンスでNPC1L1をノックダウンすると、HCVの侵入は50%阻害された。

D. 考察

CCSOマウス肝細胞での4因子の発現が低値であることから、CCSOマウスへのHCV侵入が起こらなかったと考えられる。また、マウスCd81とマウスOc1nの存在がHCV侵入に阻害的に働くことも、CCSOマウスでのHCV侵入が起こらなかった2番目の原因と考えられる。NPC1L1はHCVの侵入にプラスに働くと判定できる。

E. 結論

トランスジェニックマウスでは十分な4因子の発現が得られなかったので、大量の4因子を発現させるにはノックインマウスを作成させる必要があることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし」

3. その他 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）  
分担研究報告書（平成 24 年度）

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究

研究分担者：八木清仁

研究協力者：水口裕之、近藤昌夫、櫻井文教、渡利彰浩、吉田孟史、山根誠司、  
松久幸司、山岸喜彰、高山和雄

分担研究課題：ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の解析

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

同研究班の大阪大学水口裕之教授グループが確立したヒト iPS 細胞由来肝細胞誘導系を用いて HCV シュードタイプウイルス（HCVpv）による感染能解析、及び当研究グループで開発した HCV サブゲノム発現アデノウイルスベクターによる HCV 複製能解析を実施した。平成23年度の結果より、ヒト iPS 細胞では HCVpv 感染、HCV 複製は検出されなかったが分化誘導肝細胞は両活性を有しており、分化誘導過程で HCV 感染能、複製能を獲得することが示された。平成24年度は初発の iPS 細胞から肝細胞へ至る分化過程における HCV 感染能、複製能の変化を解析した。

また、水口グループが実施した各分化段階におけるアレイ解析の結果をもとに HCV 感染能、複製能に必要な宿主因子の探索を開始した。

A. 研究目的

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

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

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

前年度までの研究では水口裕之教授グループが確立したヒト iPS 細胞由来肝細胞誘導系を用いて HCV シュードタイプウイルス（HCVpv）による感染能解析、及び当研究グループで開発した HCV サブゲノム発現アデノ

ウイルスベクターによる HCV 複製能解析を実施した。その結果、ヒト iPS 細胞では HCVpv 感染、HCV 複製は検出されなかったが分化誘導肝細胞は両活性を有しており、分化誘導過程で HCV 感染能、複製能を獲得することが示された。平成 24 年度は初発の iPS 細胞から肝細胞へ至る分化過程における HCV 感染能、複製能の変化を解析し、また、各分化段階におけるアレイ解析の結果をもとに HCV 感染能、複製能に必要な宿主因子の探索を開始した。

## B. 研究方法

### 1. ヒト iPS 細胞由来肝細胞

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

### 2. ヒト iPS 細胞由来細胞を用いた HCV 感染実験

#### (1) HCV 感染実験

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

ヒト iPS 細胞、ヒト iPS-hep 細胞および Huh7 細胞を 48-well plate に播種し、HCVpv を 2 時間作用させ、ウイルス作用 24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。感染阻害実験として抗 CD81 抗体 (JS-81; BD Biosciences 社) またはマウス IgG を HCVpv と 2 時間インキュベートし、ウイルス作用 24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。尚、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo 社) を用いて蛋白定量を行い、感染効率を補正した。

### 3. ヒト iPS 細胞由来細胞を用いた HCV 複製実験

#### (1) HCV ゲノム発現ベクター

HCV 複製実験にはテトラサイクリン応答性の RNA polymerase I 発現カセットを搭載したアデノウイルスベクター (Ad5/35) を用い、1b 型の HCV ゲノムの構造

蛋白質コード領域をルシフェラーゼに置換した HCV サブゲノム発現ベクター (AdP<sub>1</sub>235-HCV)、NS5B (RNA dependent RNA polymerase) のポリメラーゼ活性欠損変異体ベクター (AdP<sub>1</sub>235-ΔGDD)、感染効率補正用の EGFP-Luciferase 発現ベクター (AdP<sub>1</sub>235-EL) を実験に供した (Nucleic Acids Res, 2011;39:e64)。

#### (2) HCV 複製実験

ヒト iPS 細胞、ヒト iPS-hep 細胞および Huh7 細胞を 48-well plate に播種し、テトラサイクリン応答性転写活性化因子をコードした Ad-tTA (5 MOI) 存在下 AdP<sub>1</sub>235-HCV または複製能を欠損させた AdP<sub>1</sub>235-DGDD (1 MOI) を感染させた。感染 24 時間後にドキシサイクリン (10 mg/ml) を添加することで RNA polymerase I 発現カセットの転写活性をオフにした。ドキシサイクリン添加 48 時間後に細胞を回収し、Renilla Luciferase Assay System (Promega 社) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。また、Ad ベクターの感染効率を補正するために、AdP<sub>1</sub>235-EL (1 MOI) と Ad-tTA (5 MOI) を共感染させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。HCV 複製能は各細胞の AdP<sub>1</sub>235-HCV、AdP<sub>1</sub>235-DGDD のルシフェラーゼ活性を各細胞の AdP<sub>1</sub>235-EL のルシフェラーゼ活性で補正することにより算出した。

また、ヒト iPS-hep 細胞にドキシサイクリンを添加する際 HCV 複製阻害薬である IFN を各濃度含む培養液を添加し、感染 72 時間後にルシフェラーゼ活性および細胞生存率を測定することで HCV 複製阻害効果を検証した。細胞障害性は WST-8 試薬を用いて測定した。ルシフェラーゼ活性および細胞障害性は IFN 非添加群を 100%として算出した。

#### 4. Huh7.5.1 を用いた遺伝子ノックダウン実験

##### (1) HCV レプリコン細胞

本実験では HCV 複製を検討する上で HCV レプリコン細胞である Huh7.5.1 1bFeo 細胞を使用した。Huh7.5.1 1bFeo 細胞は自律的に複製可能な HCV RNA を細胞内に有している細胞である。この HCV RNA は、複製に必要な構造遺伝子のゲノムをルシフェラーゼ遺伝子、neomycin 耐性遺伝子に置き換えた HCV RNA であり、HCV 複製をルシフェラーゼを指標とすることで解析可能である。

## (2) siRNA

標的とした遺伝子は AnnexinA2 (ANXA2)、S100 calcium binding protein A10 (S100A10)、AHNAK、phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha (PI4KA) である。本研究で使用した siRNA は、全て Dharmacon 社で購入した。用いた siRNA は、D-001810-01-05, ON-TARGETplus Non-targeting siRNA、J-010741-07-0005, ON-TARGETplus siRNA, Human ANXA2、J-014285-12-0005, ON-TARGETplus siRNA, Human AHNAK、J-011766-08-0005, ON-TARGETplus siRNA, Human S100A10、J-006776-13-0005, ON-TARGETplus siRNA, Human PI4KA である。

## (3) 遺伝子ノックダウン実験

Huh7.5.1 細胞を 24-well plate に播種し、siRNA を Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用いて transfection した。Transfection の 72 時間後、High Pure RNA Isolation Kit (Roche 社) を用いて細胞から RNA を抽出し、Reverse Transcriptase (タカラバイオ社) を用いて抽出 RNA から cDNA を作製した。作製後、各種プライマー (ANXA2 forward : 5' - CTCTACACCCCAAGTGCAT -3' , reverse : 5' - TCAGTGCTGATGCAAGTCC -3' ; AHNAK forward : 5' - GCCCAAAGTCAAAGGAGA -3' , reverse : 5' - CATCTTCAGGTGCCAGTCAG -3' ; S100A10 forward : 5' - AAATTCGCTGGGATAAAGG -3' , reverse : 5' - AGCCCACTTTGCCATCTCTA -3' ; PI4KA forward : 5' - GCAGGCCCTCAGGTACGACAAG -3' , reverse : 5' - TGATCCAGGAGGTGCCGATGTCAG -3' ) を用いて Real time-PCR を行い、各遺伝子の RNA 量の変化を検討した。尚、相対的な各遺伝子の RNA 量はそれぞれの GAPDH mRNA 量で補正することにより算出した。

## (4) ルシフェラーゼ活性を指標とした HCV 複製実験

Huh7.5.1 1bFeo 細胞を 24-well plate に播種し、siRNA を Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用いて transfection した。Transfection の 72 時間後、PicaGene LT2.0 (Toyo Ink 社) を用いてルシフェラー

ゼ活性を測定した。尚、WST-8 試薬 (Nacalai tesque 社) を用いて細胞生存率も測定した。

## (5) HCV RNA 量を指標とした HCV 複製実験

Huh7.5.1 1bFeo 細胞を 24-well plate に播種し、siRNA を Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用いて transfection した。Transfection の 72 時間後、High Pure RNA Isolation Kit (Roche 社) を用いて細胞から RNA を抽出し、Reverse Transcriptase (タカラバイオ社) を用いて抽出 RNA から cDNA を作製した。作製後、各種プライマー (HCV RNA forward : 5' - CGTAACACCAACGGGCGGCCATG -3' , reverse : 5' - CTCGTCCTGCAGTTCATTGAGGC -3' ; GAPDH forward : 5' - GGTGGTCTCCTGACTTCAACA -3' , reverse : 5' - GTGGTCGTTGAGGGAATG -3' ) を用いて Real time-PCR を行い、HCV RNA 量の変化を検討した。尚、相対的な HCV RNA 量はそれぞれの GAPDH mRNA 量で補正することにより算出した。

## (倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### ヒト iPS 細胞由来細胞の各分化段階における感染実験

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

水口グループは 3 種のアデノウイルスベクターを用いてそれぞれ内胚葉細胞、肝幹前駆細胞、成熟肝細胞への分化効率を高めることに成功している。そこで、3 段階の分化過程である内胚葉細胞、肝幹前駆細胞、iPS-hep 細胞のそれぞれを用いて感染実験を行い、どの段階でヒト iPS 細胞由来細胞が HCV 感染能を獲得するかを調べた。その結果を Fig. 1 に示す。HCVpv を 2 時間作用させ、ウイルス作用 24 時間後にルシフェラーゼ

活性を測定した結果、内胚葉細胞および肝幹前駆細胞においてはルシフェラーゼ活性がみられず、最終ステップの iPS-hep 細胞でのみ活性が確認された、したがって HCV 感染能は分化の最終段階まで獲得されないことが明らかとなった。

## 2. ヒト iPS 細胞由来細胞の各分化段階における複製実験

前年度までの解析でヒト iPS-hep 細胞に AdP<sub>235</sub>-HCV を添加すると、Huh7 細胞 (HCV 複製細胞) と同様に HCV 複製 (ルシフェラーゼ活性の上昇、HCV RNA 数の上昇) が観察された。一方、ヒト iPS 細胞では、ルシフェラーゼ活性の上昇、HCV RNA の存在が観察されなかったことから、ヒト iPS 細胞では HCV は複製しないことが明らかとなった。そこで、3 段階の分化過程である内胚葉細胞、肝幹前駆細胞、iPS-hep 細胞のそれぞれを用いて複製実験を行い、どの段階でヒト iPS 細胞由来細胞が HCV 複製能を獲得するかを調べた。その結果を Fig. 2 に示す。感染実験においては最終分化段階で活性が現れたが、複製活性は内胚葉細胞の段階から発現し肝幹前駆細胞、iPS-hep 細胞へと分化が進むにつれて活性が上昇することが示された。

## 3. HCV 感染・複製に必須な宿主因子の探索

水口グループがヒト iPS 細胞、内胚葉細胞、肝幹前駆細胞、iPS-hep 細胞の各分化段階の細胞ごとにアレイ解析を行った。ポジティブコントロールとしてヒト初代肝細胞との比較も行っている。そこでヒト初代肝細胞で高く発現し、初発の iPS 細胞では発現が低く、分化誘導過程で上昇する遺伝子から感染・複製に必須な候補遺伝子を絞り込むことを試みている。平成 24 年度は既に HCV 複製に関与することが報告されている PI4KA 遺伝子をポジティブコントロールとし、試験的に分化誘導と共に発現上昇がみられた ANXA2、S100A10、AHNAK 遺伝子を候補遺伝子として評価を行った。特異的 siRNA 添加でそれぞれの遺伝子発現が低下することを確認後 (data not shown)、複製に及ぼすノックダウンの効果を検討した。複製評価は HCV レプリコン細胞である Huh7.5.1 1bFeo 細胞を用いて行った。ルシフェラーゼ活性、HCV RNA 量で評価した結果をそれぞれ Fig. 3、Fig.

4 に示した。ポジティブコントロールの PI4KA のみ特異的 siRNA 添加で複製活性が有意に低下したが他の 3 遺伝子に変化は見られなかった。

## D. 考察

iPS 細胞、内胚葉細胞、肝幹前駆細胞、iPS-hep 細胞の 4 段階に分けた解析により、感染能獲得、複製能獲得のパターンが異なることが明らかとなった。HCV 感染に必須の因子が CD81 をはじめとして多数報告されており、その発現が肝幹前駆細胞以降の過程で整うという結果と考えられる。一方、HCV サブゲノムをアデノウイルスベクターによって導入する複製評価系では分化の初期段階から活性が発現していることが示された。上記 4 種の細胞に関してアレイ解析がなされ、分化誘導過程で変動する遺伝子を詳細に解析することにより新規の HCV 感染・複製能獲得に必須な宿主側因子の探索に活用できると期待している。試験的に選択した 3 遺伝子は今回行った複製評価ではネガティブな結果であったが、HCV のライフサイクルを再現でき、粒子の産生まで評価しうる HCVcc を用いて検討した場合、何らかの抗 HCV 効果が検出できるかもしれない。いずれにしてもアレイ解析の膨大なデータから効率良く候補遺伝子を選択する方法が重要となろう。今後、評価系を検討し HCV 複製に重要な脂質代謝系などに焦点をあてた解析を進めていく予定である。

## E. 結論

大阪大学大学院薬学研究科 水口グループによって確立されたヒト iPS 細胞由来肝細胞分化誘導系を用いて HCV 感染・複製を解析した。HCVpv の感染は内胚葉細胞、肝幹前駆細胞の段階で観察されず、最終段階の iPS-hep 細胞でのみ成立した。一方、HCV レプリコンの複製は内胚葉細胞の段階から発現が見られ、分化誘導の初期に複製能は獲得されることが示唆された。各分化段階の細胞のアレイ解析を基にして、分化段階の進行と共に発現上昇する遺伝子の中から HCV 感染・複製に必須な遺伝子を探索できれば宿主因子をターゲットとした創薬につながることを期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakurai, F., Furukawa, N., Higuchi, M., Okamoto, S., Ono, K., Yoshida, T., Kondoh, M., Yagi, K., Sakamoto, N., Katayama, K., and Mizuguchi, H. Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a Virus Res. 2012, 165(2):214-218.

2. 学会発表

1. Yamane, S. Yoshida, T., Takayama, K., Kondoh, M., Sakurai, F., Mizuguchi, H., Yagi, K. Human iPS-derived hepatocyte-like cells as a model for hepatitis C virus infection. Experimental Biology 2012. April 21-25. San Diego. USA
2. Yagi, K., Yoshida, T., Yamane, S., Takayama, K., Watari, H., Kondoh, M., Sakurai, F., Sakamoto, N., Matsuura, Y., Mizuguchi, H., Yagi, K. Evaluation of HCV infection and replication using human iPS cell-derived hepatocytes. HCV 2012. October 5-9. Venice, Italy.

G. 知的所得権の出願・登録状況

特になし

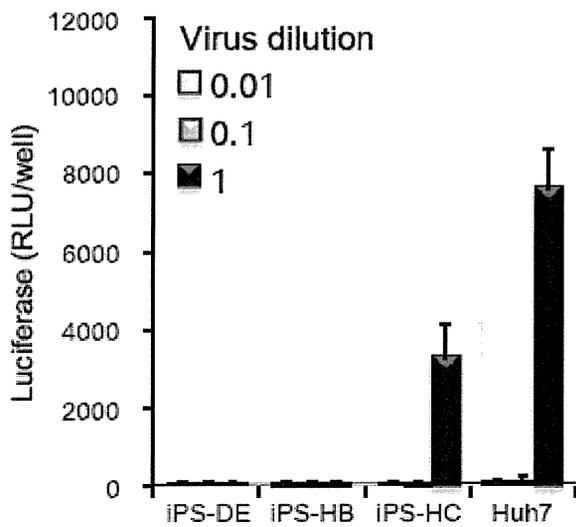


Figure 1. HCV infection assay in iPS-derived cells. iPS-derived definitive endoderm (iPS-DE), hepatoplast (iPS-HB), and hepatocytes (iPS-HC) were infected with HCVpv at the indicated dilution. After 2h of infection, the cells were cultured with fresh medium for 24h. Then luciferase activities were measured. Data are presented as means  $\pm$  SD (n=3).

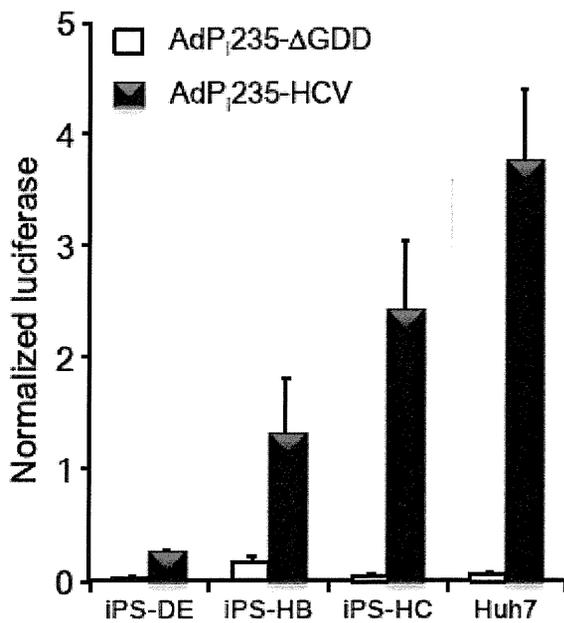


Figure 2. HCV replication assay in iPS-derived cells. HCV subgenomic replicon, AdP<sub>I</sub>235-DGDD(open) and AdP<sub>I</sub>235-HCV(closed), was introduced into iPS-derived definitive endoderm (iPS-DE), hepatoplast

(iPS-HB), and hepatocytes (iPS-HC). Cells were treated with doxycycline, and renilla luciferase activities were measured.

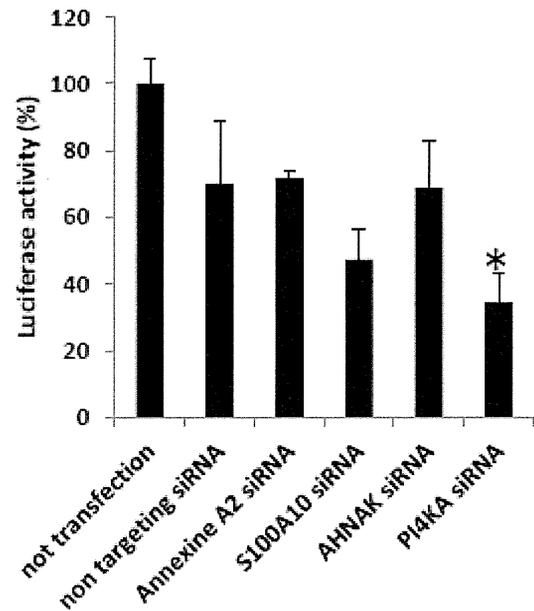


Figure 3. Huh7.5.1bFeo cells were treated with each siRNA for 72h. Luciferase activities were then measured. \* $p$ <0.05 not transfection vs non targeting siRNA

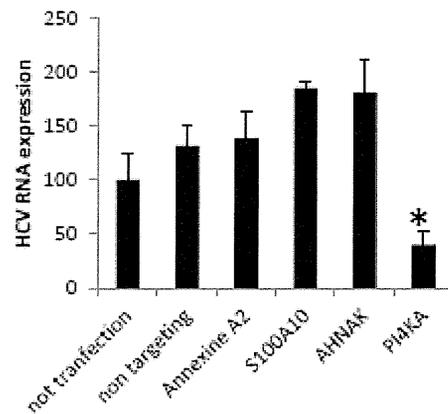


Figure 4. Huh7.5.1bFeo cells were treated with each siRNA for 72h. RNA was then extracted to prepare the cDNA, and real-time PCR was carried out to analyse the specific RNA content. The value was normalized by GAPDH mRNA content. \* $p$ <0.05 not transfection vs non targeting siRNA

# 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

分担研究者 水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科

分担研究課題：ヒト iPS 細胞由来肝細胞の C 型肝炎ウイルス研究への応用

研究要旨：本研究では、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の新規解析法開発を行うことを目的とする。昨年度までに、遺伝子導入技術を活用して、ヒト iPS 細胞から肝細胞への効率の良い分化誘導法を開発した。本年度は、ヒト iPS 細胞由来肝細胞をさらに成熟化させるために、肝幹前駆細胞から肝細胞への分化過程において、ナノピラープレート（日立ハイテック（株）から供与）を用いた三次元培養を行った。また、ヒト iPS 細胞から肝細胞への各分化段階の細胞における性質を詳細に評価するため、未分化ヒト iPS 細胞、内胚葉、肝幹前駆細胞、肝細胞で DNA マイクロアレイ解析を実施した。大阪大学大学院薬学研究科・八木清仁教授グループとの連携の元、ヒト iPS 細胞由来肝細胞における C 型肝炎ウイルス（HCV）感染・複製に関する遺伝子の発現の解析を実施した。

## 研究協力者

八木清仁 大阪大学大学院薬学研究科  
近藤昌夫 大阪大学大学院薬学研究科  
川端健二 (独)医薬基盤研究所  
大阪大学大学院薬学研究科  
櫻井文教 大阪大学大学院薬学研究科  
田代克久 (独)医薬基盤研究所  
高山和雄 大阪大学大学院薬学研究科  
(独)医薬基盤研究所

## A. 研究目的

現在世界には約 2 億人、日本には約 150～200 万人の C 型肝炎患者およびキャリア(持続感染者)がおり、慢性肝炎、肝硬変、肝がんなどの患者の 70%以上が HCV 感染患者であり、年間 3 万人が肝がんにより亡くなっている。現在、HCV 感染患者に対する治療法として、インターフェロン (IFN) 療法が汎用されている。しかしながら、日本での HCV 感染患者の約 70%を占める HCV 遺伝子型 1 型感染患者に対しては、IFN 療法の効果が弱いことが問題となっている。保有 HCV ウイルス量の多い難治性 1b 型患者に対しては既存薬剤療法 (ペグインターフェロン/リバビリン併用療法) の奏効率が約 45%であること、インターフェロン投与による副作用発現により投与の中断を余儀なくされる場合があること、各種薬剤耐性ウイルスが出現することから、C 型肝炎の克服には宿主因子とウイルス感

染・複製の関連性を詳細に解析し、肝炎ウイルス治療薬創出に資する新規創薬ターゲットを同定することが急務となっている。

そこで本研究では、iPS 細胞技術の創薬応用を目的に、まず(1)ヒト iPS 細胞から肝細胞を効率よく分化誘導させる技術を、我々が独自開発した次世代アデノウイルス (Ad) ベクター技術を駆使して開発し、分化誘導した肝細胞の応用として、(2) 大阪大学大学院薬学研究科・八木清仁教授グループとの連携の元、C 型肝炎をはじめとする肝炎克服研究のための *in vitro* 基盤技術 (評価系) 開発を行う。分化誘導状態の異なるヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いて肝炎ウイルス感染能および複製能を解析することで、肝炎ウイルス感染・複製に関与する宿主因子の同定や宿主因子とウイルス感染・複製の関連性を詳細に解析でき、肝炎ウイルス治療薬創出に資する新規創薬ターゲットの同定につながることを期待される。

我々はこれまでに、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化途中の細胞に対して FOXA2 および HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することによって、肝分化を促進できることを報告した (K. Takayama et al. J Hepatol. 2012 Sep;57(3):628-36.)。今年度は、上記の分化誘導方法で作製した細胞をナノピラープレートを用いて三次元培養することによって、さらに肝機能の高いヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製を試みた。また、ヒト iPS 細胞から肝細胞への各分化段階の細胞を詳細に解析するた

めに、未分化ヒト iPS 細胞、内胚葉、肝幹前駆細胞、肝細胞において DNA マイクロアレイ解析を実施した。さらに、大阪大学大学院薬学研究科・八木清仁教授グループにおいて、ヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV のレセプター発現や感染・複製に関する検討を実施した。

## B. 研究方法

### B-1. Ad ベクターの作製

Ad ベクターの作製は improved *in vitro* ライゲーション法により行った。シャトルプラスミドは pHMEF5 を使用した。そのマルチクローニング部位に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ(LacZ)遺伝子を挿入し、LacZ 発現シャトルプラスミド pHMEF5-LacZ を作製した。さらに、EF プロモーター制御下でヒト forkhead box protein A2 (FOXA2) および hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A (HNF1 $\alpha$ ) を発現するシャトルプラスミド pHMEF5-FOXA2、pHMEF5-HNF1 $\alpha$  を作製した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化した K7 型ベクタープラスミド (pAdHM41K7) に挿入することにより、pAdHM41K7-EF-LacZ、pAdHM41K7-EF-FOXA2、pAdHM41K7-EF-HNF1 $\alpha$ 、を作製した。作製した Ad ベクタープラスミドを PacI で消化し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社)を用いてヒト胎児腎細胞由来細胞である HEK293細胞にトランスフェクションすることにより、AdK7-EF-LacZ、AdK7-EF-FOXA2、AdK7-EF-HNF1 $\alpha$  を作製した。定法により Ad ベクターの増殖・精製を行った。各 Ad ベクターの物理学的 (particle) タイターは Maizel らの方法により測定した。

### B-2. ヒト ES/iPS 細胞の培養

ヒト ES 細胞株 H9 (WA09) (WISC Bank, WiCell Research Institute) は 5 ng/mL の basic fibroblast growth factor (bFGF、片山化学工業社)を含む霊長類 ES 細胞用培地である ReproStem (リプロセル社)を用いて、マイトマイシン C 処理済みのマウス胚性繊維芽細胞(MEF、ミリポア社)上で培養した。ヒト iPS 細胞株 Dotcom は 10 ng/mL の bFGF を含む iPS 細胞用培地である iPSellon (カルディオ社)を用いて、マイトマ

イシン C 処理済みの MEF 上で培養した。5-7 日ごとに 0.1 mg/mL ディスパーゼ (Roche 社)を用いてヒト ES/iPS 細胞のコロニーを回収後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。

### B-3. ヒト ES/iPS 細胞から内胚葉への分化誘導

ヒト ES/iPS 細胞から内胚葉への分化誘導は以下の方法で行った。分化誘導開始の 24 時間前に無血清培地 hESF9 (MK. Furue et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105, 13409-13414) で培地交換した。次に、細胞剥離液である Accutase cell detachment solution (日本ベクトン・ディッキンソン社)を用いてヒト ES/iPS 細胞を回収後、100 ng/ml Activin A (R&D systems 社)および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地(6 因子 (10  $\mu$ g/mL human recombinant insulin、5  $\mu$ g/mL human apotransferrin、10  $\mu$ M 2-mercaptoethanol、10  $\mu$ M ethanolamine、10  $\mu$ M sodium selenite、0.5 mg/mL fatty acid free bovine albumin (すべて Sigma 社より購入))を含む 霊長類 ES 細胞用分化誘導基礎培養液である hESF-DIF (株式会社細胞科学研究所)に懸濁後、50  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> Matrigel (日本ベクトン・ディッキンソン社)でコーティングした細胞培養用マルチプレート (12 プレート) (住友ベークライト社)の各ウェルに 6.25 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種したのち、2 日間培養した。

Ad ベクター用いた遺伝子導入によりヒト ES/iPS 細胞由来中内胚葉 (培養 2 日目) から内胚葉への分化誘導を行う場合は、ヒト ES/iPS 細胞を上記の方法で中内胚葉まで培養し、各 Ad ベクター(AdK7-EF-FOXA2)を 3,000 vector particles (VP) /cell の濃度で 90 分間作用させた。培地は 100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地を用いた。その後、100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地を用いて毎日培地交換を行い、5 日目まで培養した。

### B-4 肝幹前駆細胞への分化誘導

ヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-3.に記載された方

法に準じて分化誘導した内胚葉(培養 5 日目)を、0.05% trypsin-0.053 mM EDTA で細胞を剥離したのち回収し、100 ng/ml Activin A および 10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地に懸濁後、50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Matrigel でコーティングした細胞培養用マルチプレート (12 プレート) の各ウェルに  $1.25 \times 10^5$  cells/ $\text{cm}^2$  の細胞密度で播種した。継代した翌日に Ad ベクター (AdK7-EF-FOXA2、AdK7-EF-HNF1 $\alpha$ ) をそれぞれ 1,500 VP/cell の濃度で作用させたのち、20 ng/ml FGF4 (R&D systems 社)、30 ng/ml bone morphogenetic protein 4 (BMP4) (R&D systems 社) を含む HCM Hepatocyte Culture Medium (Lonza 社) に交換した。その後、上記培地を用いて毎日培地交換を行い、9 日目まで培養した。

#### B-5. ナノピラープレートを用いた肝幹前駆細胞から肝細胞への分化誘導

ヒト ES/iPS 細胞由来の肝幹前駆細胞から肝細胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-3. および B-4. に記載された方法に準じて 9 日間培養して分化誘導した肝幹前駆細胞に各 Ad ベクター (AdK7-EF-FOXA2 および AdK7-EF-HNF1 $\alpha$ ) をそれぞれ 1,500 VP/cell の濃度で 90 分間作用させた後、10 ng/ml FGF1 (R&D systems 社)、10 ng/ml FGF4、10 ng/ml FGF10 (R&D systems 社)、10 ng/ml hepatocyte growth factor (HGF) (R&D systems 社) を含む HCM に交換した。その後、上記培地を用いて毎日培地交換を行い、11 日目まで培養した。培養 11 日目に 0.05% trypsin-0.053 mM EDTA を用いて細胞を剥離したのち回収し、FGF1、FGF4、FGF10、HGF (すべて 10 ng/ml の濃度で使用) を含む HCM に懸濁後、20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Matrigel でコーティングした日立ナノピラー細胞培養 12 well プレート (日立ハイテクノロジーズ社) の各ウェルに  $2.5 \times 10^5$  cells/ $\text{cm}^2$  の細胞密度で播種した。1 日後に Ad ベクター (AdK7-EF-FOXA2 および AdK7-EF-HNF1 $\alpha$ ) をそれぞれ 1,500 VP/cell の濃度で作用させた後、20 ng/mL HGF、20 ng/mL Oncostatin M (OsM、R&D systems 社)、10 ng/mL FGF4、 $10^{-6}$  M Dexamethazone (DEX、Sigma 社) を含む HCM を用いて 1 日おきに培地交換を行い、13 日間 (培養 12

日目から培養 25 日目まで) 培養した。分化誘導肝細胞をさらに成熟化させるため、Matrigel を分化誘導肝細胞の上に重層化させた。0.25 mg/mL Matrigel、4 mM L-Glutamine、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamycin sulfate、 $1 \times \text{ITS}$  (BD Biosciences 社)、20 ng/mL OsM、 $10^{-6}$  M DEX を含む William's E Medium (Invitrogen 社) (以下、Matrigel Working Solution とする) を  $4^\circ\text{C}$  で作製した。培養 25 日目の各 well に対して、1 mL の Matrigel Working Solution を添加し、24 時間培養した。培養 26 日目に余分な Working Solution を除去したのち、20 ng/mL Oncostatin M (OsM、R&D systems 社)、 $10^{-6}$  M Dexamethazone (DEX、Sigma 社) を含む HCM を用いて 1 日おきに培地交換を行い、9 日間 (培養 26 日目から培養 35 日目まで) 培養した。なお、単層培養で分化誘導肝細胞を作製する場合は、我々の過去の報告 (K. Takayama et al. J Hepatol. 2012 Sep;57(3):628-36.) にしたがって作製した。

#### B-6. 定量的リアルタイム PCR

各細胞集団から ISOGEN (Nippon gene 社) を用いて Total RNA を抽出した。ヒト初代培養肝細胞 (CellzDirect 社 (ロット: Hu8072)) もしくは Xenotech 社 (ロット: HC2-14 および HC10-101)) は 15  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  type I-A collagen (新田ゼラチン社) をコートした細胞培養用 12 プレートの各ウェルに  $1.2 \times 10^5$  cells/ $\text{cm}^2$  の細胞密度で 10% FCS (GIBCO-BRL 社) を含む HCM で播種したのち、6 時間後に一度上記培地で培地交換し、合計 48 時間培養した。各 Total RNA を RNase-free DNase I で処理した後、Superscript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen 社) を用いて逆転写反応を行い、complementary DNA (cDNA) を合成した。定量的リアルタイム PCR による解析は Taqman gene expression assays (Applied Biosystems 社) を使用し、ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems 社) により定量した。

#### B-7. アルブミン・尿素産生能の評価

分化誘導肝細胞および 48 時間培養したヒト初代培養肝細胞について、培地交換したのち 24 時間後に培地を回収し、産生されたアルブミン量を Human

Albumin ELISA Kit (Bethyl Laboratories 社)、産生された尿素量を QuantiChrom Urea Assay Kit (BioAssay Systems 社) を用いて測定した。アルブミンおよび尿素産生量は総タンパク量で補正した。なお、総タンパク量の測定には Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific 社) を用いた。

### C. 研究結果

我々は、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化過程において、FOXA2 および HNF1 $\alpha$  遺伝子を導入することによって、肝分化効率を向上できることを報告した (K. Takayama et al. *J Hepatol.* 2012 Sep;57(3):628-36.)。しかしながら、作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞における一部の肝機能 (cytochrome P450 酵素の活性など) がヒト初代培養肝細胞よりも劣っていた。ヒト iPS 細胞由来肝細胞を創薬スクリーニング (新規 HCV 治療薬探索を含む) に応用するためには、ヒト iPS 細胞由来肝細胞のさらなる成熟化が必要である。そこで、本年度は、ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞をナノピラープレート (Figure 1A) 上に播種し、三次元培養を行うことで、さらなる肝成熟化を試みた。培養プロトコールは Figure 1B のとおり行った。これまでの単層培養系で作製した分化誘導肝細胞と本研究における三次元培養系で作製した分化誘導肝細胞を比較するために、継時的に両培養系の分化誘導肝細胞における肝マーカー遺伝子 (アルブミン) の発現量を調べた (Figure 2A)。その結果、単層培養系の分化誘導肝細胞では培養 20 日目にアルブミン遺伝子発現量がピークに達するのに対して、ナノピラープレートを用いた三次元培養系の分化誘導肝細胞では培養 20 日目以降もその遺伝子発現量は上昇し続け、培養 35 日目に最高値を示した。また、培養 20 日目の単層培養の分化誘導肝細胞と培養 35 日目の三次元培養の分化誘導肝細胞のアルブミン産生量 (Figure 2B) および尿素産生能を調べた (Figure 2C)。その結果、培養 35 日目の三次元培養の分化誘導肝細胞の方がいずれも高かった。以上の結果から、ナノピラープレートを用いた三次元培養を用いることで、従来の単層培養よりも各種肝機能の高い分化誘導肝細胞をヒト iPS 細胞から作製できることが示された。

また、本年度はヒト iPS 細胞から肝細胞への分化途

中の細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞の性質を詳細に評価するため、未分化 iPS 細胞、内胚葉、肝幹前駆細胞、単層培養で作製した分化誘導肝細胞、三次元培養で作製した分化誘導肝細胞において DNA マイクロアレイを実施した (Figure 3)。今後は、DNA マイクロアレイの結果のさらなる解析を行うことで、分化誘導肝細胞の性能確認を行う。

### D. 考察

本年度は、ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞をナノピラープレートを用いて三次元培養条件下で肝成熟化させることで、肝機能の高いヒト iPS 細胞由来肝細胞を作製できることを明らかにした。これまでに、マウスおよびヒト初代培養肝細胞を用いた検討から、三次元培養することによって、各種肝機能が向上することが報告されている。本研究においても、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は三次元培養条件下で成熟化させることで、単層培養条件下よりも生体に近い環境になるため、肝成熟化が亢進したものだと考えられる。ヒト iPS 細胞由来肝細胞がより肝成熟化することによって、ヒト初代培養肝細胞にその遺伝子発現などが近づいたことから、HCV 感染受容体や複製に関連した遺伝子の発現量もよりヒト初代培養肝細胞に類似したものになったことが予想される。

来年度以降は、本研究において作製した新しいプロトコールで分化誘導したヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いて HCV 感染能等を評価するとともに、分化状態の異なる細胞群 (内胚葉細胞や肝幹前駆細胞等) での HCV 感染能等の検討を行う。また、得られた DNA マイクロアレイの結果のさらなる解析を行うことで、分化誘導肝細胞の性能確認を行うとともに、宿主因子とウイルス感染・複製の関連性を詳細解析し、肝炎ウイルス治療薬創出に資する新規創薬ターゲットの同定を目指した研究を施行する予定である。

### E. 結論

Ad ベクターを用いた機能遺伝子の導入およびナノピラープレートを用いた三次元培養技術の導入によりヒト ES/iPS 細胞から分化誘導した肝細胞は、HCV 研究に使用可能であることが示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 $\alpha$  transduction. *J. Hepatol.*, 57, 628-636 (2012)
- 2) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials*, 33, 4526-4534 (2012)
- 3) 水口裕之、高山和雄、長基康人、川端健二：ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導の現状と創薬応用、医薬品レギュラトリーサイエンス、43、982-987(2012)
- 4) 早川堯夫、水口裕之：ヒト iPS 細胞の再生医療及び創薬研究への応用の現状と展望、*Brain and Nerve*, 64, 47-57 (2012)
- 5) 水口裕之：iPS 細胞研究の道しるべ 遺伝子治療研究の貢献と教訓、*ファルマシア*、日本薬学会、48、827 (2012)
- 6) Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Kishimoto K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kanda K., Hayakawae T., Furue MK., Mizuguchi H. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*, 34, 1781-1789 (2013)
- 7) Kawabata K., Takayama K., Nagamoto Y., Saldon M.S., Higuchi M., Mizuguchi H. Endodermal and hepatic differentiation from human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *J. Stem Cell Res. Ther.*, in press.

- 8) 高山和雄、川端健二、水口裕之：ヒト多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価系への応用、組織培養研究、印刷中
- 9) 高山和雄、川端健二、水口裕之：ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導法の開発とその創薬応用、*最新医学*、68、141-144 (2013)
- 10) 川端健二、高山和雄、水口裕之：ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた薬物毒性評価系の開発、*BIO INDUSTRY*、30、19-24 (2013)

### 2. 学会発表

- 1) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H.、Generation of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by transduction of FOXA2 and HNF1 $\alpha$ 、International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting、神奈川、2012年6月
- 2) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Tachibana M., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H.、Type I collagen promotes hepatic maturation from human pluripotent stem cells in 3D co-culture with Swiss 3T3 cell sheet. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting、神奈川、2012年6月
- 3) 高山和雄、稲村 充、川端健二、形山和史、櫻井文教、古江-楠田美保、水口裕之、SOX17、HEX、HNF4 $\alpha$  遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から成熟肝細胞の効率良い分化誘導、第85回大会日本組織培養学会、京都、2012年5月
- 4) 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、古江(楠田)美保、川端健二、水口裕之、Swiss 3T3 細胞との積層3次元共培養下におけるヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の肝細胞成熟化・促進機構の解析、第85回大会日本組織培養学会、京都、2012年5月

- 5) 高山和雄、川端健二、稲村 充、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、c/EBPα および c/EBPβ 遺伝子による TGFBR2 遺伝子発現制御を介した肝幹前駆細胞の運命決定、第 19 回大会肝細胞研究会、北海道、2012 年 6 月
- 6) 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、岡野光夫、櫻井文教、立花雅史、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の Swiss 3T3 細胞との積層 3 次元共培養下における成熟化・促進機構の解析、第 19 回肝細胞研究会、北海道、2012 年 6 月
- 7) 高山和雄、稲村 充、川端健二、菅原道子、菊池きよ美、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、FOXA2 および HNF1α 遺伝子導入によるヒト ES/iPS 細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞への分化誘導、第 39 回日本毒性学会学術年会、宮城、2012 年 7 月
- 8) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之、ヒト ES/iPS 細胞から肝幹前駆細胞への分化における転写因子 HEX の機能解明、第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会、兵庫、2012 年 10 月
- 9) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Tashiro K., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H., Generation of mature hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1α transduction、第 27 回日本薬物動態学会年会、千葉、2012 年 11 月
- 10) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之、ヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化過程における転写因子 HEX の機能解明、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11-14 日
- 11) 高山和雄、川端健二、田代克久、神田勝弘、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、Nanopillar プレートを用いたヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価への応用、第 12 回日本再生医療学会総会、神奈川、2013 年 3 月
- 12) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之、転写因子 HEX によるヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化機構の解明、第 12 回日本再生医療学会総会、神奈川、2013 年 3 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当事項なし

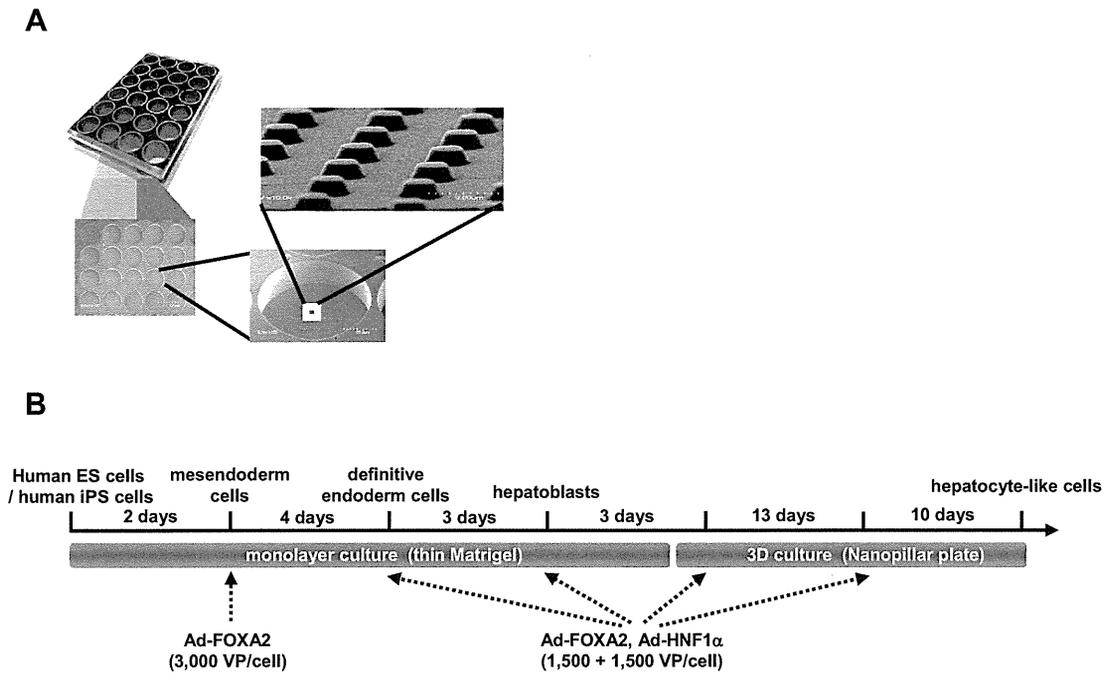
##### 2. 実用新案登録

該当事項なし

##### 3. その他

該当事項なし

Figure 1



**Figure 1 Hepatocyte-like cells were differentiated from human ES/iPS cells by using Nanopillar Plate.** (A) Photograph display of a 24-well format Nanopillar Plate and its microstructural appearances of the hole and pillar structure. (B) The procedure for differentiation of human ES/iPS cells into 3D-cultured human ES/iPS cell-derived hepatocyte-like cells (3D ES/iPS-hepa) via mesendoderm cells, definitive endoderm cells, and hepatoblasts is presented schematically. In the differentiation, not only the addition of growth factors but also stage-specific transient transduction of both FOXA2- and HNF1  $\alpha$ -expressing Ad vector (Ad-FOXA2 and Ad-HNF1  $\alpha$ , respectively) was performed.