

て検討した。

(倫理面への配慮)

本研究において、特に該当するものはないと思われる。

C. 研究結果

1) HBV pseudotype (HBVp; HBVの膜粒子を被ったレトロウイルス、*gfp-hyg^r*をもつ) の作製が可能であることを、研究方法2) ①、②、③により確認した。比重はHBV Dane粒子よりやや軽い1.20~1.25g/mlであった。

2) HBVpを活用し感染能による感染受容体の同定実験を進め、ある処理により培養肝癌細胞 (HepG2) のHBVpに対する感染性が上昇した。

D. 考察

HBVpの生成は可能であった。また、ある処理により、培養肝癌細胞株 (HepG2 など) のHBVpに対する感染性が上昇することから、培養肝癌細胞株には付着因子が内在していることが示唆された。そこでHBV膜蛋白の受容体リガンドとして想定されるPreS1からHBsのN末に相当する領域 (PS1~SSN) を大腸菌にて発現・精製し、これをプローブとして付着因子のpull-down実験を行った。

E. 結論

HBVpの作製は可能であるが、その感染性を指標にしたHBV受容体のスクリーニングには工夫が必要である。培養肝癌細胞株に内在する付着因子の同定を目指して、処理/未処理細胞の遺伝子発現変化 (RNAレベル及び蛋白レベル) に着目した差分解析が有効と思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., Watanabe, S. "KSHV-infected PEL cell lines exhibit a distinct gene expression profile." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 394: 482-487, 2010.
- 2) Suzuki, T., Isobe, T., Kitagawa, M., and Ueda, K. "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA positively affects on

ubiquitylation of p53." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 403: 194-197, 2010.

- 3) Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., and Watanabe, S. "Kaposi's sarcoma-associated Virus governs gene expression profiles toward B cell transformation." In "Herpesviruses", Magel, D. G. and Tyring, S., ed., In-Tech ISBN 978-953-51-0186-4. pp93-104, 2012.
- 4) Ueda, K., Ohsaki, E., Nakano, K., and Zheng, X. "Characterization of Kaposi's sarcoma-associated virus-associated lymphomas by DNA array analysis." In "Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD). *Leukemia Research and Treatment.* doi:10.4061/2011/7269642.
- 5) Ohsaki, E. and Ueda, K. "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency." *Frontiers in Virology.* 3:7-19, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00007.
- 6) Nakano, K., Katano, H., Tadagaki, K., Sato, Y., Ohsaki, E., Mori, Y., Yamanishi, K., and Ueda, K. "Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman's Disease; Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II." *Virology* 425:95-102, 2012. doi.org/10.1016/j.virol.2012.01.008
- 7) Noma, S., Ohya-Shimada, W., Kanai, M., Ueda, K., Nakamura, T., Funakoshi, H. "Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7." *Neuroscience Res.* 73(2):115-21. 10.1016/j.neures.2012.03.001.
- 8) Ueda, K. "For the future studies of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus". An Editorial. *Frontiers in Virology* 3: 1-2, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00237.
- 9) Ueda, K. "Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic insults are Evaded." *J. Blood and Lymph*

- 2:3, 2012. doi.org/10.4172/2165-7831.1000e109.
- 10) Ueda, K., Ohsaki, E., and Omori, H.
“Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype; a versatile tool for Identification of the HBV Receptor and Investigation of HBV infectivity.” *Biophys. Res. Comm.* under revision
 - 11) 上田啓次. ヘルペスウイルス学のエッセンス 化学療法の領域 26:265-270, 2010.
 - 12) 上田啓次. STEALTHING, PERSISTINGウイルスの謎「潜伏感染と再活性化」化学療法の領域. 上田啓次 (企画) 26:1178-1179, 2010.
 - 13) 上田啓次. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の潜伏感染、再活性化と病態. 化学療法の領域 26:1218-1226, 2010.
 - 14) 上田啓次. B型肝炎ウイルスレセプターの謎. *Hepatoday* No. 23, 12, 2010.
 - 15) 上田啓次. B型肝炎のウイルス学. 化学療法の領域 48:125-133, 2012.
 - 16) 上田啓次. 遺伝子挿入HBVを用いた感染リセプターの探索. *肝胆膵* 65 : 601-609, 2012.
 - 17) 上田啓次. HHV-8 「病原細菌・ウイルス図鑑」新居志郎ら編、北海道大学出版会 (編集集中)
2. 学会発表
1. Ueda, K. “Replication and gen regulation of Kaposi’ s sarcoma-associated herpesvirus” . (招待講演) International Symposium ‘Infection and-associated Cancers’ , March 3-4, 2010, Sapporo.
 2. 上田啓次. 「ヘルペスウイルスの潜伏と再活性化」熊本大学ウイルス感染症研究会 (招待講演) 平成 22 年 11 月 26 日、熊本.
 3. 上田啓次、大崎恵理子、中野和司. 培養細胞におけるB型肝炎ウイルスの感染能. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7〜9日. あわぎんホール、徳島.
 4. 大崎恵理子、中野和司、上田啓次. KSHV LANAの細胞内局在と複製・分配メカニズムとの関連動態解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7〜9日. あわぎんホール、徳島.
 5. 中野和司、大崎恵理子、上田啓次. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスのvIRF-3/LANA2の発現制御機構の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7〜9日. あわぎんホール、徳島.
 6. 上田啓次、大崎恵理子、中野和司. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) 潜伏感染における潜伏感染特異的遺伝子の発現機構の解析. 第33回日本分子生物学会年会. 2010年12月7〜10日. 神戸ポートアイランド、神戸.
 7. 中野和司、大崎恵理子、上田啓次. HIF-2 α によるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) がコードするviral interferon regulatory factor 3 (vIRF-3)の発現制御機構の解析. 第33回日本分子生物学会年会. 2010年12月7〜10日. 神戸ポートアイランド、神戸.
 8. 大崎恵理子、中野和司、上田啓次. KSHVゲノムの複製・分配に關与するLANAの細胞内局在動態解析. 第33回日本分子生物学会年会. 2010年12月7〜10日. 神戸ポートアイランド、神戸.
 9. 中野和司、大崎恵理子、上田啓次. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の vIRF-3/LANA2 が誘導する IFN シグナルを vIRF-1 が抑制する. 第 26 回ヘルペスウイルス研究会. 6 月 2 日〜4 日. 大阪アカデミア. 大阪
 10. 大崎恵理子、中野和司、Xin Zheng、Zunlin Yang、上田啓次. KSHV ゲノム複製における LANA の機能的役割と書く内骨格構造の重要性.. 第 26 回ヘルペスウイルス研究会. 6 月 2 日〜4 日. 大阪アカデミア. 大阪.
 11. 中野和司、大崎恵理子、上田啓次. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の vIRF-3 が誘導する IFN シグナルを vIRF-1 が直接結合し抑制する. 第 8 回 EBV 研究会. 7 月 8 日. 大阪大学大学院 銀杏会館.
 12. 大崎恵理子、中野和司、Xin Zheng、Zunlin Yang、上田啓次. KSHV LANA と核マトリックス因子 NuMA のキメラ蛋白による ori-P 複製能の検討. 第 8 回 EBV 研究会. 7 月 8 日. 大阪大学大学院 銀杏会館.

G 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

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

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：加藤孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

分担研究課題：ビタミンDによる抗HCV作用の検討

研究要旨：近年、ビタミンDの併用がC型慢性肝炎の標準治療の治療効果を向上する事が報告されている。そこで、培養細胞を用いたHCV感染増殖モデルを用いてC型肝炎ウイルス(HCV)に対するビタミンDの抗ウイルス作用の検討を行った。まず、ビタミンDおよびその代謝産物による直接的な抗HCV作用を検討した。その結果、ビタミンDの肝臓での代謝産物である25(OH)Dに抗HCV作用を認め、この25(OH)DがHCVの感染性ウイルス粒子の生成を阻害することを明らかにした。さらにビタミンDが免疫細胞で誘導する抗菌ペプチドにも抗HCV作用が有る事を見だし、この抗菌ペプチドがウイルス粒子を破壊する事で抗HCV作用を発揮する事を明らかにした。これらの総合的なビタミンDの作用が、ビタミンD併用によるC型肝炎の治療効果向上に寄与していると考えられた。

A. 研究目的

現在、C型慢性肝炎患者に対しては、ペグインターフェロン (Peg-IFN)とリバビリンによる治療が行われているが、その治療効果は十分でなく、副作用等の問題も報告されている。そのため新たな治療薬や、現行治療の効果を向上させる薬剤の開発が望まれている。近年、標準治療にビタミンDの内服を追加投与することにより治療反応性が向上することが報告されている。またビタミンD代謝産物の血中濃度が慢性C型肝炎の病態や治療反応性と関与しているとの報告もある。

そこで我々は、培養細胞を用いたHCV感染増殖モデルを用いて、ビタミンDによる抗HCV活性の評価を行った。まずビタミンDおよびその代謝産物による直接的な抗HCV活性の評価を行い、さらにHCVが免疫細胞で誘導する抗菌ペプチドが関与する抗HCV活性についても検討した。

B. 研究方法

1. HCV感染複製系を用いた抗HCV作用の評価

HuH-7細胞とJFH-1ウイルスによるHCV感染複製系を用い評価を行った。ビタミンDおよびその

代謝産物である25(OH)D、 1α (OH)VD₃、1,25(OH)₂VD₃を用い、これらの薬剤でHuH-7細胞を処理した後にJFH-1ウイルスを感染させ、感染後3日で培養上清と細胞をハーベストしHCVコア抗原量を測定した。ビタミンDで誘導される抗菌ペプチドの評価は、同様にHuH-7細胞を抗菌ペプチドで処理し、JFH-1ウイルスの感染を行った。

2. HCVシュードパーティクル(HCVpp)および培養細胞由来HCV(HCVcc)を用いた抗HCV作用の評価

HCVの感染過程は、HCVの複製や粒子形成の影響を受けないHCVppシステムを用い評価を行った。ビタミンDおよびその代謝産物でHuH-7細胞を処理し、その後にHCVppを感染させた。感染2日後に細胞をハーベストし、細胞内ルシフェラーゼ活性を測定することによりHCV感染に与える影響を評価した。

抗菌ペプチドの評価は、抗菌ペプチドとHCVppを混合し、37度で1時間処理した後にHuH-7細胞に感染させ、感染2日後に細胞内ルシフェラーゼ活性を測定した。さらに、抗菌ペプチドの評価は

HCVcc でも行った。HCVpp と同様に抗菌ペプチドと混合し、37 度で 1 時間処理した後に HuH-7 細胞に感染させた。感染 3 日後に細胞をハーベストし、細胞内、上清中のコア抗原量を測定した。

3. シングルサイクルウイルス生成系を用いたビタミン D 代謝産物の抗 HCV 作用の評価

HCV のレセプターである CD81 が発現していない Huh7-25 細胞を用い、JFH-1 の全長 RNA をトランスフェクションすることで、シングルサイクルウイルス生成系による評価を行った。全長 RNA のトランスフェクション後、ビタミン D 代謝産物で処理し、3 日後の細胞内コア抗原量、さらに細胞内と上清中の感染力価を測定することにより、ビタミン D 代謝産物が HCV のライフサイクルのどの部分を阻害しているかを評価した。

4. WST-8 アッセイを用いた細胞毒性の評価

WST-8 法によりビタミン D およびその代謝産物、抗菌ペプチドの各種濃度での細胞毒性を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はない。各種組換え DNA を用いた組換えウイルス感染実験は、大臣確認申請を行い承認を受けた。

C. 研究結果

1. ビタミン D およびその代謝産物の抗 HCV 作用の評価

HuH-7 細胞をビタミン D とその代謝物 (25(OH)D、1, 25(OH)₂D、24, 25(OH)₂D) で処理し、JFH-1 ウイルスを感染させた。その後、培養上清中と細胞内の HCV コア蛋白質の濃度を測定することにより HCV の増殖を評価した。その結果、ビタミン D の肝臓での代謝物である 25(OH)D に抗 HCV 活性を認め、天然型のビタミン D および活性型ビタミン D である 1, 25(OH)₂D にはその効果を認めなかった。この 25(OH)D による抗 HCV 活性は 0.125・M から

1.0・M まで濃度依存的であった。

そこで、次にこの 25(OH)D が HCV のライフサイクルのどの部分に影響を与えているかを検討した。まず、HCV の感染過程に与える影響を HCV シュードタイプウイルス (HCVpp) を用いて評価した。HCVpp を各種濃度の 25(OH)D で処理した細胞に感染させ、2 日後に細胞をハーベストし評価を行った。しかし 25(OH)D の処理により感染後の細胞内ルシフェラーゼの値に変化を認めず、25(OH)D は HCV の感染過程を阻害しないと考えられた。

さらにシングルサイクル HCV 生成システムにより詳細な検討を行った。その結果、この 25(OH)D は HCV の細胞内での複製やウイルス粒子の分泌には影響を与えず、感染性ウイルス粒子の形成を阻害していることが明らかとなった。

25(OH)D と IFN の同時投与の効果についても検討を行った。25(OH)D と IFN を同時に処理した細胞に JFH-1 ウイルスを感染させると、IFN のみで処理した時よりもコア抗原量が低下し、さらに IFN の用量を変えても 25(OH)D を加えた時にコア抗原量が低下する比率が保たれることから、25(OH)D は IFN に対し相加的な効果を持つと考えられた。

25(OH)D の細胞毒性の評価のために WST-8 アッセイを行った。25(OH)D の血中濃度は、末梢血で 50 ~ 100 µg/L 程度と考えられているが、25(OH)D はその 10 倍から 100 倍の濃度でも細胞障害を認めなかった。

2. ビタミン D が誘導する抗菌ペプチドの抗 HCV 作用の評価

HCV 感染複製系を用い、抗菌ペプチドの抗ウイルス活性を評価した。HuH-7 細胞を抗菌ペプチド (10 µg/mL) で 1 時間処理し、その後 JFH-1 ウイルスを感染させた。3 日後に培養上清と細胞をハーベストしコア抗原量を測定したところ、抗菌ペプチドで処理した細胞ではコア抗原量が 1/3 程度まで低下しており、この抗菌ペプチドには抗 HCV 作用が有ると考えられた。

抗菌ペプチドの HCV 感染に与える影響を見るため、HCVpp を用い評価を行った。抗菌ペプチドと混合した HCVpp は、通常の HCVpp と比較し約 30～60%程度感染力価が低下していた。しかし、この感染力価の低下は VSV G 蛋白質をエンベロープに持つシュードパーティクルでも認め、この抗菌ペプチドの HCV 特異的な抗ウイルス作用は評価できなかつた。

そこで、同様の検討を培養細胞由来の JFH-1 ウイルスを用いて行った。10 µg/mL の濃度の抗菌ペプチドと混合した HCVpp は、通常の HCVpp と比較し約 10%程度まで感染力価が低下していた。この抗菌ペプチドの抗 HCV 作用は他の HCV 株のエンベロープを持つキメラウイルスでも同様に観察され、JFH-1 株に特異的ではないと考えられた。

さらに詳細な解析を行うため、HCV 粒子を含む培養上清をイオディキサノールの密度勾配で分離し検討を行った。その結果、抗菌ペプチド処理により感染性粒子のピークが消失し、この抗菌ペプチドは HCV 粒子を直接破壊している可能性が考えられた。

WST-8 アッセイの結果、抗菌ペプチドは 10 µg/mL の濃度では細胞障害を認めないが、20 µg/mL の濃度では細胞生存率が約 60%程度まで低下し、抗菌ペプチドは 20 µg/mL で細胞障害を示すと考えられた。

D. 考察

我々の検討の結果、天然型のビタミン D や活性型ビタミン D である 1,25(OH)₂D には直接的な抗 HCV 作用は無く、ビタミン D の代謝産物である 25(OH)D が抗 HCV 作用を示すことが明らかになった。さらに、ビタミン D が免疫細胞で誘導する抗菌ペプチドにも抗 HCV 作用を認めた。25(OH)D は、肝細胞での感染性ウイルス粒子の生成を阻害することで抗 HCV 作用を発揮していたが、抗菌ペプチドは直接ウイルス粒子を破壊する作用があると考えられた。以上のような結果からは、ビタミン D 併用による標準治療の効果向上はビタミン D の代謝産物である 25(OH)D の直接的な抗 HCV 作用

と、ビタミン D が誘導する抗菌ペプチドの両方の効果に関与していると考えられた。

E. 結論

我々の検討結果から、ビタミン D 併用治療ではその肝臓での代謝産物が HCV 感染性ウイルス粒子の形成を阻害する事で、さらにビタミン D で誘導される抗菌ペプチドが HCV 粒子を破壊することで C 型慢性肝炎の治療効果に影響を与えていると考えられた。今後はより *in vivo* に近い系でこれらのビタミン D による総合的な抗 HCV 活性の評価を行いたい。

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.
- 8) Saeed, M., Suzuki, R., Watanabe, N., Masaki, T., Tomonaga, M., Muhammad, A., Kato, T., Matsuura, Y., Watanabe, H., Wakita, T., and Suzuki, T. Role of the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) Pathway in Degradation of Hepatitis C Virus Envelope Proteins and Production of Virus Particles. *J Biol Chem* 286(43), 37264-37273, 2011.
- 9) Saeed, M., Shiina, M., Date, T., Akazawa, D., Watanabe, N., Murayama, A., Suzuki, T., Watanabe, H., Hiraga, N., Imamura, M., Chayama, K., Choi, Y., Krawczynski, K., Liang, T. J., Wakita, T., and Kato, T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology* 54(2), 425-433, 2011.
- 10) Okamoto, Y., Masaki, T., Murayama, A., Munakata, T., Nomoto, A., Nakamoto, S., Yokosuka, O., Watanabe, H., Wakita, T., and Kato, T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 410(3), 404-409, 2011.
- 11) Yamamoto, M., Sakamoto, N., Nakamura, T., Itsui, Y., Nakagawa, M., Nishimura-Sakurai, Y., Kakinuma, S., Azuma, S., Tsuchiya, K., Kato, T., Wakita, T., and Watanabe, M. Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatol Res* 41(3), 258-269, 2011.
- 12) Takahashi, H., Akazawa, D., Kato, T., Date, T., Shirakura, M., Nakamura, N., Mochizuki, H., Tanaka-Kaneko, K., Sata, T., Tanaka, Y., Mizokami, M., Suzuki, T., and Wakita, T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun* 395(4), 565-571, 2010.
- 13) Murayama, A., Weng, L., Date, T., Akazawa, D., Tian, X., Suzuki, T., Kato, T., Tanaka, Y., Mizokami, M., Wakita, T., and Toyoda, T. RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLoS Pathog* 6(4), e1000885, 2010.

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 D₃ 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) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.

5) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Wakita T, Kato T. Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.

6) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Nomoto A, Wakita T, Kato T. Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.

7) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Wakita T, Kato T. HuH-7 subclone that supports high HCV production due to high virus assembly. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.

8) Matsumura T, Kato T, Tasaka-Fujita M, Murayama A, Masaki T, Wakita T, Imawari M.

25-hydroxy- vitamin D inhibits hepatitis C virus replication and production of the infectious viruses. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 4-8, 2011. San Francisco, USA.

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) 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.

13) 加藤孝宣、村山麻子、政木隆博、相崎英樹、脇田隆字. 国内献血検体を用いたC型肝炎ウイルス陽性血漿パネルの作製とウイルス量測定法の評価. 第47回日本肝臓学会総会、2011年6月、東京.

14) 加藤孝宣、政木隆博、脇田隆字. HCV JFH-1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. シンポジウム10: C型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.

15) 松村卓哉、加藤孝宣、井廻道夫. Vitamin Dとその代謝産物の抗HCV作用の検討. シンポジウム10: C型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.

16) 加藤孝宣、椎名正明、脇田隆字. HCV JFH-1

株のチンパンジー感染実験で得られた適応変異株の機能解析. パネルディスカッション 4: 肝疾患動物モデルと Translational Research 第 15 回日本肝臓学会大会、2010 年 10 月, 福岡.

17) 村山麻子、三代俊治、脇田隆字、加藤孝宣. C 型肝炎ウイルス粒子の産生効率の良い HuH-7 細胞サブクローンの分離と同定. 第 15 回日本肝臓学会大会、2010 年 10 月, 福岡.

18) 加藤孝宣、脇田隆字. C 型肝炎ウイルスの生体内での感染様式と培養細胞での増殖能. 第 45 回日本肝臓学会総会、山形、2010 年 5 月.

19) 加藤孝宣、岡本有加、村山麻子、政木隆博、脇田隆字. HCV の増殖適応変異とその意義. シンポジウム 6: ウイルス培養系を用いた C 型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月.

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

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、自ら発見した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を見出した。さらにSRPIN340の構造をもとに合成展開した化合物の中から、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化合物を見出し、SFV785と名付けて、その作用機序を明らかにした。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。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も検討した。

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。そこで本研究では、宿主細胞のリン酸化酵素阻害剤のC型肝炎治療薬としての可能性を検討するとともに、更に効果的に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し、新規肝炎治療薬の開発を目指す。

B. 研究方法

- 1) 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機序を解明する。
- 2) 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化合物SFV785の作用機序をさらに検討し、SFV785から構造展開した化合物のC型肝炎ウイルスの増殖抑制活性を検討する。
- 3) 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する。

- 4) 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も検討する。

(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・坂本直也博士らとの共同研究により、我々の開発した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を見出した。
- 2) C型肝炎ウイルスに対しより効果の高い、SRPIN340類縁化合物SFV785の作用機序を、米国デューク大学Mariano Garcia-Blanco教授およびシンガポール国立大学Azlinda Bte Anwar博士との共同研究でさらに詳細に解析した。SFV785は宿主キナーゼをターゲットとし、これまで治療薬のなかったデング熱や黄熱病を含む広汎なフラビウイルスに対しても有効であった。また、SFV785投与により、細胞内でのウイルスゲノム及びウイルス由来タンパクの合成は阻害しないが、

感染性を喪失したフラビウイルス粒子が産生されることを見いだした。

3) 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。これ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)。

4) 萩原研究室で創製された 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

1) 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ていた。本事業において 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 Dengue 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、新規作用機序であることが見いだされた。

2) 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

1. SFV785 の作用機序は新規であり、更なる作用機序の解析を行うとともに、臨床応用に向けて、化合物の代謝安定性や毒性について検討する必要がある。米国デューク大学 Mariano Garcia-Blanco 教授と共同で、米国 NIH のモデル動物などを用いて in vivo での薬効薬理試験を行う協議を進めている。

2. 増殖ルシフェラーゼ発現 HCV レプリコン細胞を用いて、ケミカルライブラリーから新たに見つけた C 型肝炎遺伝子発現抑制作用を示す化合物の作用メカニズムは、前述の SFV785 とは異なる。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。従って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の回避が期待される。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。

3. 萩原研究室で創製された DNA ウイルス増殖阻害化合物は、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

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.
2. Amin EM, Hua J, Cheung MK, Ni L, Kase S, Ren-nel ES, Gammons M, Nowak DG, Saleem MA, Hagiwara M, Schumacher VA, Harper SJ, Hinton D, Bates DO,

- Ladomery MR (2011) WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. *Cancer Cell* 20(6):768-780.
3. Ninomiya K, Kataoka N, and Hagiwara M. (2011) Stress-responsive maturation of Clk1/4 pre-mRNAs promotes phosphorylation of SR splicing factor. *J Cell Biol.* 195(1):27-40.
 4. Anwar A, Hosoya T, Leong KM, Onogi H, Okuno Y, Hiramatsu T, Koyama H, Suzuki M, Hagiwara M, Garcia-Blanco MA. (2011) The Kinase Inhibitor SFV785 Dislocates Dengue Virus Envelope Protein from the Replication Complex and Blocks Virus Assembly. *PLoS One.* 6(8):e23246.
 5. Debdab M, Carreaux F, Renault S, Soundararajan M, Fedorov O, Filippakopoulos P, Lozach O, Babault L, Tahtouh T, Baratte B, Ogawa Y, Hagiwara M, Eisenreich A, Rauch U, Knapp S, Meijer L, Bazureau JP (2011) Leucettines, a class of potent inhibitors of cdc2-like kinases and dual specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases derived from the marine sponge leucettamine B: modulation of alternative pre-RNA splicing. *J Med Chem.* 54(12):4172-4186.
 6. Nishida A, Kataoka N, Takeshima Y, Yagi M, Awano, H, Ota, M, Itoh K, Hagiwara M, and Matsuo M (2011) Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene. *Nature Commun* 2, 308.
 7. Ogawa Y, Nonaka Y, Goto T, Ohnishi E, Hiramatsu T, Kii I, Yoshida M, Ikura T, Onogi H, Shibuya H, Hosoya T, Ito N, and Hagiwara M (2010) Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nature Commun.* 1, 86.
 8. Karakama Y, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Oooka M, Azuma S, Tsuchiya K, Onogi H, Hagiwara M, and Watanabe M.(2010) Inhibition of hepatitis C virus replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase. *Antimicrob Agents Chemother.* 54, 3179-3186.
 9. Kii I, Shiraishi A, Hiramatsu T, Matsushita T, Uekusa H, Yoshida S, Yamamoto M, Kudo A, Hagiwara M, and Hosoya T. (2010) Strain-promoted double-click reaction for chemical modification of azido-biomolecules. *Org Biomol Chem.* 8, 4051-4055.
 10. Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodoran G, Hagiwara M, Harper SJ, Woolard J, Ladomery MR, and Bates DO.(2010) Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms - a novel therapeutic strategy for angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 285, 5532-5540.
2. 主な学会発表
1. Masatoshi Hagiwara, “Moduration of Pre-mRNA Splicing Patterns with Synthetic Chemicals and Their Clinical Applications”. The UEHARA Memorial Foundation Symposium, Chembiomolecular Science : at Frontier of Chemistry and Biology, June6-8, 2011, Tokyo, Japan
 2. Masatoshi Hagiwara, “Visualization of Alternative Splithin with Multi-color Splicing Reporters and Their Application for Screen of Trans-acting Factors and Small Chemicals”. The16th Annual Meeting of the RNA Society / The RNA Society of Japan 13th Annual Meeting Kyoto, Japan June14-18, 2011
 3. Masatoshi Hagiwara, “Visualization of alternative splicing and the therapeutic manipulation with chemical compounds”. US-Japan Conference at City of Hope, August4-5, 2011 USA
 4. Masatoshi,Hagiwara, “New therapeutics by alteration of mRNA expression and processing with small chemicals”. International Chemical Biology Conference,October 11-12, USA, 2011
 5. Masatoshi Hagiwara, “New RNA-targetting therapeutics with protein kinase inhibitors”. Protein kinases regulating RNA splicing, November 12-16, 2011, France
 6. Masatoshi Hagiwara. “Development of anti-virus drugs targeting the host factors required for viral proliferation”. 鳥インフルエンザ治療薬の国際共同開発研究」国際シンポジウム. 2012. 1月京都
 7. 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

8. Masatoshi Hagiwara, “Chemical targeting of RNA processing for new therapeutics of congenital diseases. The 1st Official Conference of the International Chemical Biology Society, October 4-5, 2012 USA

9. 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 1st 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

1) 発明の名称: Transgenic reporter system that reveals expression profiles and regulation mechanisms of alternative splicing in mammalian organisms.

①発明者: 萩原 正敏、武内彰英

②米国出願日: 2010 年 6 月 1 日 (US .61/350, 420)

PCT 出願日: 2011 年 5 月 31 日 (PCT/JP2011/003059)

③出願人: 萩原 正敏

④発明の内容の概略: 哺乳類の細胞および個体で選択的スプライシングを可視化し、制御因子や制御化合物を同定する方法に関する特許。

2) 発明の名称: 遺伝性疾患の予防・改善剤

①発明者: 萩原正敏、片岡直行、松尾雅文、西田篤史

②日本出願日: 2010 年 6 月 28 日 (特願 2010-146699)

PCT 出願日: 2011 年 6 月 27 日 (PCT/JP2011/003655)

③出願人: 国立大学法人神戸大学 国立大学法人東京医科歯科大学

④発明の内容の概略: Clk 阻害剤 TG003 によるデュシェンネ型筋ジストロフィー治療に関する特許。

3) 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。

4) 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

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：彦坂 圭介

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：HCVのヒト肝細胞への侵入に関わるCD81, Claudin1 (CLDN1), Scavenger receptor class B, type I (SRBI), Occludin (OCLN)を肝細胞特異的に発現するトランスジェニックマウス（CCS0マウスと呼ぶ）を作成した。このヒト4因子の発現および機能を確認後、患者血清からのHCVをCCS0マウスに静脈注射した。しかし、マウス血清中にウイルスは検出されなかった。原因を探索した結果、CCS0マウスではヒト4因子の発現量が低値であり、マウスCd81とマウスOc1nはHCVの侵入を阻害することが判明した。これらの事実に基づき、ヒト4因子をノックイン法でマウス肝細胞に大量発現し、阻害効果のあるCd81とOc1nのノックアウトマウスと交配して得られるマウスはHCVの侵入がおこることが強く期待できるので、現在作成中である。

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

HCVのヒト肝細胞への侵入に関わる因子として、CD81, CLDN1, SRBI, OCLNが同定されている。そこで、アルブミンエンハンサー/プロモーター2.3kbpの下流にこの4因子のcDNAを連結した4つのDNAを受精卵に微小注射して、トランスジェニックマウス（CCS0マウスと命名）を作成した。このマウスに患者血清中のHCVを注射して血清中のウイルスを定量した。また、CCS0マウスより単離した初代肝細胞にHCVppを感染させた。Hep3B細胞と野生型マウスから単離した初代肝細胞を細胞融合させ、融合し

た細胞を選別し、HCVppを感染させた。

（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

CCS0マウスにHCVを静脈注射して2週後の血清にウイルス粒子は検出されなかった。CCS0マウスから分離した初代肝細胞にHCVppは感染しなかった。野生型初代肝細胞とHepB2細胞の融合細胞はHCVppの感染が20分の1になった。CCS0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。

D. 考察

ヒト4因子は発現しているが、低値であった。またマウス Cd81 と Oc1n 蛋白質は HCV の侵入を阻害する。これらの事実は、CCSO マウスではウイルスの肝細胞への侵入が起こらないことを説明している。

E. 結論

HCV が侵入するためには、ヒト4因子の発現を高レベルにできるノックイン法が最適であると結論できる。さらに、このノックインマウスを Cd81 KO マウス、Oc1n KO マウスと交配したマウスを作成することで細胞レベルの実験結果が個体レベルでも正しいかどうかを判定する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hikosaka K, Noritake H, Kimura W, Sultana N, Skarkar MTK, Tagawa Y, Uezato T, Kobayashi Y, Wakita T, Miura N: Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occludin in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry. **Biomed Res** 32: 143-150 (2011).

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

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、稲村充、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：周知のように 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が開発した 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。また、その感染能は HCV 受容体アンタゴニストである抗 CD81 抗体で、複製能はインターフェロンで阻害されたことから抗 HCV 薬のスクリーニングにヒト iPS 細胞由来肝細胞が適用できる可能性が示唆された。

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、複製能に必須な宿主因子の探索を開始した。

A. 研究目的

周知のように、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 型肝炎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 年感染研脇田らによりヒト肝がん細胞株を用いた 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 型肝炎 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がん細胞株やヒト肝臓キメラマウスを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。本研究では、水口グループが確立したヒト iPS 細胞由来肝細胞創出技術と当グループの HCV ゲノム導入技術などを融合することで、HCV の感染・複製機構を解析し、新規創薬ターゲットの探索を試みることを目的としている。

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. 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. 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 (AdP₂₃₅-HCV)、NS5B (RNA dependent RNA polymerase) のポリメラーゼ活性欠損変異体ベクター (AdP₂₃₅-△GDD)、感染効率補正用の EGFP_{Luciferase} 発現ベクター (AdP₂₃₅-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 AdP₂₃₅-HCV または複製能を欠損させた AdP₂₃₅-△GDD (1 MOI) を感染させた。感染 24 時間後にドキシサイクリン (10 µg/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、AdP₂₃₅-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 AdP₂₃₅-HCV、AdP₂₃₅-△GDD のルシフェラーゼ活性を各細胞の AdP₂₃₅-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、複製に必須でない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' - TCAGTGCTGATGCAAGTTCC -3' ; AHNAK forward : 5' - GCCCAAAGTCAAAGGAGA -3' , reverse : 5' - CATCTCAGGTGCCAGTCAG -3' ; S100A10 forward : 5' - AAATTCGCTGGGGATAAAGG -3' , reverse : 5' - AGCCCACTTTGCCATCTCTA -3' ; PI4KA forward : 5' - GCAGGCCCTCAGGTACGACAAG -3' , reverse : 5' - TGATCCAGGAGGTCGCCGATGTGAG -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' - CGTAACACCAACGGGCGCCATG -3' , reverse : 5' - CTCGTCCTGCAGTTCATTCAGGGC -3' ; GAPDH forward : 5' - GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA -3' , reverse : 5' - GTGGTCGTTGAGGAATG -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

1. HCV 感染受容体発現解析と感染実験

現在のところ、HCV 感染受容体として、CD81、SR-BI、claudin-1、occludin が同定されている。そこでまず、iPS 細胞および iPS-hep 細胞における HCV 感染受容体発現を RT-PCR により解析したところ、iPS 細胞では CD81 や occludin は発現していたものの、SR-BI や claudin-1 の発現は確認されなかった。一方、iPS-hep 細胞では CD81、SR-BI、claudin-1、occludin の発現が認められた (Fig.1A)。このことは、HCV は iPS-hep 細胞に感染する可能性を示唆している。

そこで次に、HCV シュードウイルス (HCVpv) を用いて iPS 細胞、iPS-hep 細胞における HCV 感染を解析した。HCV 感染細胞である Huh7 細胞では、HCVpv の添加濃度依存的な感染が認められていたも

の、iPS 細胞では全く感染は観察されなかった。一方、iPS-hep 細胞では、Huh7 細胞と同様の傾向を示し、添加濃度依存的に HCVpv が感染していた (Fig. 1B)。そこで次に、HCV 感染受容体である CD81 に対する抗体を用いた感染阻害実験を行った。その結果、コントロールとしてマウス IgG を用いた場合は感染は阻害されなかったが抗 CD81 抗体を用いた場合に濃度依存的に感染が阻害された (Fig. 2)。HCVpv のベースとなる VSV の感染能も iPS-hep 細胞は分化誘導過程で獲得するがその感染能は抗 CD81 抗体によって阻害されなかった。

2. iPS-hep 細胞の HCV 複製能解析

HCV ゲノムの導入技術は HCV 機能解析における有用なツールとなるものの、長鎖 RNA 発現系である RNA polymerase I 発現カセットを有するベクターシステムの開発が遅延しており、HCV 複製機能の解析は遅れている。前述したように、当研究グループでは転写制御型 RNA polymerase I 発現カセットを搭載したアデノベクターシステムを構築し、世界に先駆けて HCV ゲノム発現アデノウイルスベクターの創出に成功している (Nucleic Acids Res, 2011;39:e64)。そこで、本システムを用いて、ヒト iPS 細胞およびヒト iPS-hep 細胞における HCV 複製を検討した。ヒト iPS-hep 細胞に AdP₂₃₅-HCV を添加したところ、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) が観察されていた (Fig. 3)。このとき、AdP₂₃₅-ΔGDD 感染細胞では HCV 複製が観察されなかったことから、HCV RNA polymerase 依存的な HCV ゲノム複製がヒト iPS-hep 細胞では生じている可能性が示唆された。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 は複製しないものと推察される。さらに、HCV 複製阻害薬であるインターフェロンを用いてヒト iPS-hep 細胞における HCV 複製を阻害できることを明らかとした (Fig. 4)。

3. ヒト iPS 細胞由来細胞の各分化段階における感染実験

平成 23 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. 5 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。

4. ヒト iPS 細胞由来細胞の各分化段階における複製実験

平成 23 年度までの解析でヒト iPS-hep 細胞に AdP₂₃₅-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. 6 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。

5. HCV 感染・複製に必要な宿主因子の探索

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・複製に必要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. 7、Fig. 8 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

本研究では、HCVpv および HCV ゲノム導入ベクターを用いて、iPS 細胞および iPS-hepa 細胞における HCV 感染・複製の可否について検証を試み、iPS 細胞では HCV の感染・複製が起きないこと、iPS-hepa 細胞では HCV の感染・複製が生じることを見出した。RT-PCR 解析では iPS 細胞に CD81 および occludin が発現し、iPS-hepa 細胞では CD81、occludin、SR-BI、claudin-1 が発現していたことから、iPS-hepa 細胞の HCV 感染能獲得には肝細胞分化に伴う claudin-1 や SR-BI の発現が関与している可能性がある。

本結果よりヒト初代肝細胞、ヒト肝がん細胞株、ヒト肝臓キメラマウスに加えヒト iPS-hep 細胞が HCV 感染・複製の評価および解析系として適用できることが示唆された。また HCV 感染受容体である CD81 に対する抗体により HCVpv の感染が阻害され、IFN により HCV サブゲノムの複製が阻害できることを明らかとし、将来ヒト iPS-hep 細胞を用いて HCV 感染阻害薬、複製阻害薬のスクリーニングが可能であることが示唆された。

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 感染に必要な因子が 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・複製能獲得に必要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・複製を解析したところ、ヒト iPS 細胞では HCVpv の感染は生じず、HCV レプリコンの複製も観察されなかった。一方、ヒト iPS 細胞由来肝細胞では HCVpv の感染および HCV レプリコンの複製が観察され、さらに HCV 感染受容体拮抗薬、HCV 複製阻害薬を用いることでそれぞれ HCV 感染、HCV 複製が阻害できることを明らかとした。以上の結果より、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が HCV 感染・複製の評価・解析系として適用しうることが示唆された。

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