

に委託)を行うことで正しいものであることを確認している。

11. HCV フルゲノム pol I 発現系シャトルプラスミドの発現確認

Huh7 細胞を 24-well plate に播種し、培養した。培養 24 時間後、培養液を除き pHM18-HCV2b または pHM18-MCS を tTA 発現プラスミドとともに Fugene HD (Promega 社) を用いてコトランスフェクションした。24 時間後、トリプシン処理により細胞を回収し PBS に懸濁した。細胞懸濁液より High Pure RNA Isolation Kit を用いて RNA を精製した。精製 RNA は SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen 社) を用いて逆転写反応を行うことにより cDNA を作製した。RNA 溶液 (0.1 mg/ml) 2 μ l、5 x VILO Reaction Mix 4 μ l、10 x SuperScript Enzyme Mix 2 μ l、滅菌精製水 12 μ l を混合し 25 $^{\circ}$ C、10 min 処理し、42 $^{\circ}$ C、60 min 反応させた後に、85 $^{\circ}$ C、5 min 加熱した。cDNA は PCR 法により HCV ゲノムおよび GAPDH を増幅し、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い検出した。cDNA 溶液 1 μ l、10 x Ex Taq buffer 2 μ l、25 mM MgCl₂ 1.2 μ l、2.5 mM dNTP mix 1 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 12.7 μ l、5 U/ μ l TaKaRa Ex Taq 0.1 μ l を混合し PCR を行った。各 primer の配列は、HCV genome Forward primer: 5' - CTCCCGGGGCACTCGCAAGC -3'、HCV genome Reverse primer: 5' - GTCTAGCCA TGGCGTTAGTA -3'、GAPDH Forward primer: 5' - TCTTCACCACCATGGAGAAG -3'、GAPDH Reverse primer: 5' - ACCACCTGGTGCTCAGTGTA -3' とした。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考察

1. RNA pol I 発現系 Ad ベクターの開発

RNA pol I 発現系 Ad ベクターを作製し、各種肝細胞株での遺伝子導入効率を解析した。Huh7 細胞、HepG2 細胞、SK HEP-1 細胞に RNA pol I 発現系 Ad

ベクターを 300、1000、3000 VP/cell で導入した結果、いずれの肝細胞株においても Ad ベクター容量依存的な luciferase 活性の上昇がみられた。また、RNA pol I 発現系 Ad ベクターの遺伝子導入効率は Huh7 細胞が最も高く、次に SK HEP-1 細胞、HepG2 細胞の順であった (Figure 1)。以上の結果から、Ad ベクターにおいて RNA pol I 発現系は有効に機能することが明らかとなった。

2. HCV サブゲノム発現プラスミドベクターの作製および抗 HCV 活性評価

HCV ゲノムの複製に必須でない構造タンパク質領域をレポーター遺伝子 luciferase に置き換えた HCV サブゲノムを RNA pol I 発現カセットに搭載した HCV サブゲノム発現プラスミドベクターを作製した (Figure 2A)。作製した HCV サブゲノム発現プラスミドベクターの活性を Huh7 細胞において評価した結果、活性の指標である luciferase 活性の上昇を確認した (Figure 2B)。続いて、作製した HCV サブゲノム発現プラスミドベクターを用いた HCV ゲノム発現系が抗 HCV 活性評価系として利用可能かどうか検討した。Huh7 細胞に HCV サブゲノム発現プラスミドベクターを導入し、抗 HCV 活性が知られているインターフェロンを添加した結果、インターフェロン投与量依存的な luciferase 活性の低下が観察された。その際、インターフェロンによる細胞生存率の低下は認められなかったことから、luciferase 活性の低下が細胞障害性によるものではないこと、およびインターフェロンによる副作用が認められないことが示唆された。以上の結果より、構築した HCV サブゲノム発現プラスミドベクターを用いた抗 HCV 活性評価が可能であることが明らかとなった (Figure 3A, B)。そこで、続いて本コンストラクトを搭載した Ad ベクターの作製を試みたが、作製できなかった (data not shown)。

3. Ad ベクター作製における RNA pol I 発現系の最適化

HCV サブゲノム発現 Ad ベクターが構築できない原因の一つとして、HCV ゲノムにコードされている

プロテアーゼによる Ad ベクタータンパク質分解の可能性が予想された。そのため、テトラサイクリン制御系を利用した 3 種類の転写制御型 RNA pol I 発現系を作成し、その最適化を行った。

Tet *trans*-activator 結合配列 TRE と 3 種類の RNA pol I プロモーターフラグメントを結合した融合プロモーターを作製した (Figure 4)。作製した RNA pol I プロモーターの活性を Tet-on、-off システムにて評価した。その結果、Tet-on システムにおいて、P₂₃₅、P₃₁₁ プロモーターはドキシサイクリン濃度依存的な転写制御が認められたが、P₄₁₂ プロモーターは転写制御が認められなかった。一方、Tet-off システムではすべてのプロモーターでドキシサイクリン濃度依存的な転写制御が観察された。Tet-on と tet-off システムとを比較したところ、tet-on システムに比べ tet-off システムは優れた転写促進作用が観察された (Figure 5A, B)。ここで、HCV プロテアーゼによる Ad ベクタータンパク質の分解を抑えるには、転写非誘導時のプロモーター活性が低いほど適している。そこで、*trans*-activator 非添加時のプロモーター活性を評価したところ、P₂₃₅ プロモーターが最も低い活性を示した。この結果、P₂₃₅ プロモーターが最適なプロモーターであることが明らかとなった (Figure 6)。そこで、新たに構築した転写制御型 RNA pol I 発現系の Ad ベクターにおける有用性を検討した。Huh7 細胞に導入して検討した結果、P₂₃₅ プロモーター搭載 Ad ベクターは tet-off システムにおいて *trans*-activator ベクター (Ad-tTA) の容量依存的な発現上昇が確認された (Figure 7)。従って、転写制御型 RNA pol I 発現系は Ad ベクターにおいても機能することが示された。

4. HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製

転写制御型 RNA pol I 発現系を用いて HCV サブゲノム発現 Ad ベクター (Figure 8) の作製を試みたところ、CPE が観察されたことから、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製に成功した。そこで、肝細胞株 Huh7 細胞に精製した HCV サブゲノム発現 Ad ベクター感染させ、HCV NS5A タンパク質の発現を確認したところ、NS5A タンパク質の発現が確認された (Figure

9)。また、レポーター遺伝子の発現を調べたところドキシサイクリン濃度依存的なルシフェラーゼ活性が観察された (Figure 10)。以上の結果から、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製に成功した。

HCV は NS5B (RNA 依存性 RNA polymerase) により +鎖 HCV RNA から -鎖 HCV RNA を、そして -鎖 HCV RNA から +鎖 HCV RNA を産生することによりゲノムを複製する。特に NS5B 領域には複製に重要な GDD モチーフが存在し、その欠損体 AdP₂₃₅-ΔGDD は複製能を示さないことが知られている。そこで、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターから産生された HCV RNA が複製能を有しているかどうかを AdP₂₃₅-ΔGDD と比較することにより検証した。Huh7 細胞に Ad ベクターを導入し、最初の 24 時間は遺伝子発現を誘導し、その後 48 時間は遺伝子の発現を抑制したところ、AdP₂₃₅-HCV は AdP₂₃₅-ΔGDD に比べ高いルシフェラーゼ活性を示した (Figure 11)。また、複製の際にしか産生されない -鎖 HCV RNA の発現を RT-PCR 法により解析した結果、AdP₂₃₅-HCV でのみ -鎖 HCV RNA の発現が確認された (Figure 12)。以上の結果から、AdP₂₃₅-HCV 感染 Huh7 細胞では HCV サブゲノム RNA を複製していることが明らかとなった。

5. HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた抗 HCV 薬評価

本研究において開発した HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた HCV 複製評価系において、抗 HCV 薬のスクリーニングが可能であるかを既存の抗 HCV 薬である IFN を用いて検証した。HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを Huh7 細胞に導入し、24 時間後まで RNA polymerase I 依存的な転写を誘導した。導入 24 時間後、細胞培養液に IFN を添加し培養した。遺伝子導入 72 時間後、ルシフェラーゼアッセイおよび WST 法によりルシフェラーゼ活性および細胞障害性を測定した。その結果、IFN の濃度依存的なルシフェラーゼ活性の低下が認められ、顕著な細胞障害性は確認されなかった (Figure 13A and 13B)。一方、CMV プロモ-

ター依存的にルシフェラーゼを発現する Ad ベクターを用いて同様の実験を行ったが、ルシフェラーゼ活性の低下は見られなかったことから、今回処理した IFN 濃度では Ad に対する抗ウイルス活性は認められないと考えられる (data not shown)。

以上より、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた HCV 複製評価系において抗 HCV 薬のスクリーニングが可能であることが示唆された。

Tanabe らは本研究で用いたサブゲノム HCV と同一の HCV 株を用いて IFN- α 2b の抗 HCV 活性を評価した。その結果 0.01 U/ml の濃度から抗 HCV 活性が観察され、10 U/ml の濃度では IFN を処理していない群に比べて HCV 複製が数%にまで阻害されている。本研究で用いた IFN- α 8 は 0.0125 - 12.5 U/ml の濃度で細胞を処理しており、0.125 U/ml の濃度でルシフェラーゼ活性は約 60%まで抑制されている。他の報告と比較し、IFN- α 8 の抗 HCV 活性がやや弱く認められているが、この原因として、(1) RNA polymerase I 発現系からのサブゲノム HCV RNA の転写を抑制しきれていない可能性、(2) Ad によって IFN シグナルが阻害されている可能性が考えられる。本実験では、RNA polymerase I-tet system により IFN 添加と同時に RNA polymerase I 発現系を抑制しているが、その条件下でもわずかに RNA polymerase I 発現系から HCV RNA が転写されている。このことが原因で、IFN- α 8 の抗 HCV 活性がやや弱く見られてしまったのではないかと考えられる。また、Ad 感染細胞では Ad から転写される 159 塩基からなる VA-RNA₁ および Ad タンパク質 E1A によって IFN シグナルが阻害されることが報告されている。ISGs の一つである PKR は eIF2 \cdot のリン酸化を阻害することで HCV RNA からタンパク質が翻訳されるのを阻害している。VA-RNA₁ は PKR と結合することで、その機能を阻害している。また、Ad E1A タンパク質は、300 以上もの ISGs の発現に関与する ISGF3 の発現を抑制することで IFN の抗ウイルス活性を抑制する。本研究で用いた Ad ベクターは E1 遺伝子を欠損しているため、E1A タンパク質による IFN 効果の減弱は引き起こされないが、VA-RNA₁ による IFN 効果の減弱は引き起こされている可能性が考え

られる。これらのことから、Ad ベクターの容量および IFN 添加時間を最適化し、Ad による IFN 阻害の影響を最小にすることで、IFN の抗 HCV 作用を適切に評価可能であると考えられる。

6. HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いたヒト iPS 細胞由来肝細胞での複製・抗 HCV 薬評価解析

新たな HCV 治療法の開発には耐性ウイルスの出現しにくい宿主側を標的にした治療薬の開発が望まれている。ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、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り、HCV の侵入、複製、治療に関与する因子を解析可能であると考えられる。また、HCV は組織特異性が高く肝臓以外の組織での感染は限られており、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導の各段階の細胞を解析することで、HCV 感染に関与する組織特異的な宿主因子を解析することが可能であると考えられる。しかし、従来のエレクトロポレーション法による HCV ゲノム導入法では、大量の細胞を必要とすること、高い細胞障害性を示すこと、導入効率が低いことなど多くの課題が存在することから、ヒト iPS 細胞やヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV 複製解析は報告されていない。本研究で用いている Ad ベクターはヒト iPS 細胞を含む多くのヒト由来細胞へ簡便かつ高効率に HCV ゲノムを導入することが可能であり、ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞での HCV 複製解析に最適なゲノム導入法であると考えられる。そこで、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が HCV 感染評価系として利用可能であるかについて、HCV 侵入および HCV 複製に関して検証を行った。HCV は培養細胞において感染性粒子の作製がほとんどできないことから、水泡性口内炎ウイルス (VSV) のエンベロープタンパク質を HCV E1、E2 に置換することで HCV の侵入が模倣される HCV シュードウイルス (HCVpv) が HCV 侵入解析実験に汎用されている。本研究でも HCVpv を用いてヒト iPS 細胞由来肝細胞への HCV 侵入の可否を検証し、続いて HCV ゲノム発現 Ad ベクターを用いたヒト iPS 細胞由来肝細胞での HCV 複製解析を試み、ヒト iPS 細胞由来肝細胞での HCV 侵入および複製

製解析の可否を検証した。

HCV は CD81、SR-BI、claudin-1、occludin を一連の感染受容体として利用し、細胞内に侵入する。ヒト iPS 細胞由来肝細胞においてこれら HCV 感染受容体の発現を RT-PCR 法により確認した。その結果、ヒト iPS 細胞では CD81 および occludin の発現しか見られないのに対して、分化誘導後のヒト iPS 細胞由来肝細胞では4種類の HCV 感染受容体の発現が確認された(Figure 14A)。次に、ヒト iPS 細胞由来肝細胞に HCV が侵入可能であるか HCVpv を用いた感染実験により検証した。ヒト iPS 細胞、ヒト iPS 細胞由来肝細胞、Huh7 細胞に HCVpv を 2 時間感染させ、HCVpv に搭載されているルシフェラーゼ遺伝子の発現を解析することで HCVpv の感染を評価した。その結果、ヒト iPS 細胞では HCVpv の侵入は認められないのに対して、ヒト iPS 細胞由来肝細胞では、HCV 感染可能な細胞である Huh7 細胞と同様に、容量依存的な HCVpv 侵入が認められた(Figure 14B)。この結果は、HCV 感染受容体の発現とも一致する結果であり、ヒト iPS 細胞由来肝細胞に HCV が感染し得る可能性が示唆された。そこで、感染受容体 CD81 に対する抗体を用いて HCVpv 侵入阻害実験を行うことで、感染受容体 CD81 を介して HCVpv が細胞に侵入しているかを検証した。抗 CD81 抗体またはマウス IgG と HCVpv または VSVpv の混合液をヒト iPS 細胞由来肝細胞に 2 時間処理し、ルシフェラーゼ発現により HCVpv の侵入を評価した。その結果、ヒト iPS 細胞由来肝細胞への HCVpv の感染は IgG では阻害されず、抗 CD81 抗体で特異的に阻害された。また、VSVpv の侵入は抗 CD81 抗体および IgG では阻害されなかったことから、ヒト iPS 細胞由来肝細胞への HCVpv の侵入は感染受容体 CD81 を介していることが示された(Figure 14C)。これらの結果は、Huh7 細胞での抗 CD81 抗体による HCVpv 侵入阻害実験の結果と一致することから、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が Huh7 細胞と同様に HCV 侵入解析細胞として利用できる可能性が示唆された(Figure 14C and 14D)。最近、Lupberger らは Ephrin factor A2(EphA2)および Epidermal growth factor receptor(EGF-R)が HCV 侵入に関わる新たな

宿主因子であることを報告した。EphA2 の発現および細胞膜への局在は E-cadherin によって制御されている。ヒト iPS 細胞由来肝細胞への分化段階で分化誘導因子 HNF4 α は E-cadherin の発現を誘導する。このことからヒト iPS 細胞由来肝細胞では EphA2 の発現が誘導されているものと推察される。以上のように、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は HCV が侵入可能であり、HCV 侵入解析系として十分なレベルまで分化できていると考えられる。

次に、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いてヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV 複製解析の可否を検証した。ヒト iPS 細胞、ヒト iPS 細胞由来肝細胞、Huh7 細胞に HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いて遺伝子導入を行い、導入 24 時間後まで転写を誘導した。遺伝子導入 72 時間後に各細胞のルシフェラーゼ活性を測定し、P₂₃₅ プロモーター依存的にルシフェラーゼを発現する Ad ベクター(AdP₂₃₅-fLuc)の活性で補正することにより HCV 複製活性を算出した。AdP₂₃₅-HCV はヒト iPS 細胞由来肝細胞および Huh7 細胞で同等のルシフェラーゼ活性を示したが、AdP₂₃₅-GDD はどちらの細胞においてもルシフェラーゼ活性をほとんど示さなかった。ヒト iPS 細胞では AdP₂₃₅-HCV はヒト iPS 細胞由来肝細胞の 1/30 以下のルシフェラーゼ活性しか示さなかった(Figure 15A)。HCV プラス鎖 RNA および複製産物である HCV マイナス鎖 RNA の発現を real-time PCR 法により検出した。その結果、AdP₂₃₅-HCV を導入したヒト iPS 細胞由来肝細胞では Huh7 細胞と同等の HCV プラス鎖 RNA およびマイナス鎖 RNA が発現しており、AdP₂₃₅-GDD ではほとんど発現していなかった。ヒト iPS 細胞においては AdP₂₃₅-HCV 導入細胞においても HCV プラス鎖 RNA およびマイナス鎖 RNA は発現しておらず、ルシフェラーゼ活性と相関する結果が得られた(Figure 15B and 15C)。これらの結果から、ヒト iPS 細胞由来肝細胞では Huh7 細胞と同程度に HCV ゲノムが複製されるが、ヒト iPS 細胞では HCV ゲノム複製活性が非常に低いことが示唆された。

HCV 複製に関与する宿主因子として、これまでに cyclophilin B、FK506 binding protein 8(FKBP8)、heat

shock protein 90 (Hsp90)、 vesicle-associated membrane protein-associated proteins (VAPs)、 F-box protein 2 (FBL2)、 miR-122 が報告されている。 Cyclophilin B はタンパク質の正常な折りたたみや輸送に関わるタンパク質と考えられているが、 cyclophilin B の阻害剤である cyclosporin A により HCV 複製が阻害されること、および cyclophilin B が HCV NS5B と相互作用することが明らかとなり、 cyclophilin B が HCV NS5B を中心とする複製複合体の一因として HCV ゲノム複製に関与している分子でもあると考えられている。また、FKBP8 は yeast two-hybrid system を用いることで HCV NS5A と相互作用する分子として同定された。さらに、FKBP8 と相互作用する分子として Hsp90 が同定され、これらが co-chaperone として機能し、cyclophilin などと共に HCV タンパク質の正常な折りたたみに関与することで HCV 複製に寄与しているのではないかと考えられている。VAP-A、-B は yeast-two hybrid system により HCV NS5A 結合分子として同定された分子である。Pull-down アッセイおよび免疫沈降法により VAP-A は NS5A だけでなく NS5B とも結合すること、および VAP-A、B がホモダイマーやヘテロダイマーを形成することが明らかとなり、VAPs がホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成することで、NS5A および NS5B を介して HCV 複製複合体を複製の場である小胞体膜上につなぎとめる役割を担っていると考えられている。FBL2 は geranylgeranyl transferase I 阻害剤を用いた解析から HCV 複製関連宿主因子として同定された。Geranylgeranylated FBL2 は NS5A と結合し、VAPs と同様に複製複合体を小胞体膜上につなぎとめている。miR-122 は肝臓に高発現している microRNA で、その標的配列が HCV ゲノムに存在することが明らかとなっている。本来、microRNA は Argonaute (Ago) など miRNA-induced silencing complex (miRISC) を形成し、mRNA の 3' 末端に結合することで、mRNA の不安定化やタンパク質への翻訳を阻害する分子である。しかし HCV では、miR-122 は Ago2 と共に HCV RNA の 5' UTR 領域に結合し、HCV RNA の安定化や翻訳を促進させることで HCV 複製を

促進させることが報告されている。ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV 複製に関連する宿主因子の発現解析は行っていないが、ヒト iPS 細胞ではこれら因子のいくつかが発現していないこと、およびヒト iPS 細胞由来肝細胞ではこれらの宿主因子が Huh7 細胞と同等に発現しているのではないかと考えられる。また、マイクロアレイ解析などを用いてヒト iPS 細胞からヒト iPS 細胞由来肝細胞への分化段階の細胞における遺伝子発現と HCV 複製能を詳細に解析していくことで、新たな HCV 宿主因子の発見につながることも期待される。

次に、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いたヒト iPS 細胞由来肝細胞での HCV 複製解析法が HCV 複製阻害薬のスクリーニング系として応用可能であるか検証した。AdP₂₃₅-HCV 導入ヒト iPS 細胞由来肝細胞に抗 HCV 薬 IFN を添加したところ、濃度依存的なルシフェラーゼ活性の低下が認められた (Figure 15D)。WST 法により細胞障害性を検証したが、IFN による細胞障害性は全く認められなかった (Figure 15E)。これらの結果は、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いることでヒト iPS 細胞由来肝細胞において HCV 複製阻害薬のスクリーニングが可能であることを示唆している。ヒト iPS 細胞由来肝細胞における IFN の抗 HCV 効果は Huh7 細胞と同程度であったことから、ヒト iPS 細胞由来肝細胞においても IFN- α 8 が IFNAR1、R2 に作用し、JAK/STAT シグナル経路を介して ISGs の発現誘導することで抗 HCV 効果を示しているものと考えられる。IFN によって発現する ISGs は 300 以上にもおよび HCV を阻害するメカニズムは複雑であることから、マイクロアレイ解析等による網羅的な ISGs の発現解析により、IFN による新たな抗 HCV 効果のメカニズムが発見される可能性も考えられる。

7. HCV フルゲノム polI 発現系シャトルプラスミドの発現確認

本研究において開発した RNA polymerase I 発現系および Ad ベクターを利用した HCV サブゲノム導入法は、導入効率に優れ、HCV 複製阻害剤の効果や細胞の HCV 複製能を評価可能であり、汎用性に優

れた HCV 複製解析系である。そこで次に、Ad ベクターを利用して HCV フルゲノム発現系の構築を試みた。

HCV フルゲノム (遺伝子型 2b, 約 9 k bp) を polI 発現系シャトルプラスミド (Figure 16) へ搭載し、Huh7 細胞において HCV ゲノムの転写が起こるかを確認した。HCV フルゲノム polI 発現系シャトルプラスミド作製した後、本プラスミドを Huh7 細胞に導入し、24 時間後まで RNA polymerase I 依存的な転写を誘導した。導入 24 時間後、複製の際にしか産生されない一鎖 HCV RNA の発現を RT-PCR 法により解析した結果、HCV フルゲノムを搭載しない polI 発現系シャトルプラスミドを導入した細胞では HCV ゲノムの転写は認められなかったものの、HCV フルゲノム搭載 polI 発現系シャトルプラスミドの導入した細胞では一鎖 HCV RNA の発現が確認された (Figure 17)。以上の結果から、polI プロモーター制御下において HCV フルゲノムの転写が可能であることが示された。

E. 結論

HCV 複製機構の解明および簡便な HCV 感染評価系の開発が遅延する原因の一つとして、HCV ゲノム導入法の汎用性の低さや導入効率の低さがある。そこで、本研究は RNA pol I 発現系を Ad ベクターに搭載することにより、肝臓への効率の良い HCV ゲノムの送達法の開発を目指した。

まず、RNA pol I 発現系 Ad ベクターによる肝細胞への遺伝子導入の可能性を評価したところ、RNA pol I 発現系 Ad ベクターによる効率のよい遺伝子導入が可能であった。次に、RNA pol I プロモーター下に HCV サブゲノムを組込んだ発現プラスミドベクターを作製し、本ベクターの抗 HCV 評価系としての利用可能性を検討した。インターフェロンを用いて検討した結果、RNA pol I 発現系を利用した HCV 発現系は抗 HCV 薬評価系として応用可能であることが明らかとなった。続いて、本系の Ad ベクターでの応用を試みた。HCV 由来のプロテアーゼ活性を抑制するため RNA pol I 発現系の最適化を行い、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを作製可能なプロモーターを開発した。本プロモ

ーターを利用することで HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製に成功し、複製能を有する HCV サブゲノム RNA の発現も確認された。

HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた HCV 複製解析系において HCV 複製阻害剤を用いた解析が可能であれば抗 HCV 薬の開発や HCV 複製機構の解析を行う上で有用なツールとなる。そこで、抗 HCV 薬である IFN をモデル薬物として、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いて HCV 複製阻害薬の評価系としての有用性を評価した。その結果、IFN 濃度依存的な抗 HCV 活性が認められ、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた HCV 複製阻害剤の解析が可能であることが示された。

次に HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いてヒト iPS 細胞由来肝細胞の HCV 複製解析を行った。ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、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り、HCV 侵入、複製、治療に関与する因子を解析可能であると考えられるものの、HCV ゲノム導入法の問題からこれまで HCV 解析には利用されていなかった。HCV サブゲノム発現 Ad ベクターは様々な細胞に効率よく HCV サブゲノムを導入可能であることから、本ベクターを用いてヒト iPS 細胞由来肝細胞での HCV 複製解析を行った。その結果、ヒト iPS 細胞由来肝細胞では Huh7 細胞と同程度に HCV ゲノムが複製されるが、ヒト iPS 細胞では HCV ゲノム複製活性が非常に低いことが示唆された。また、ヒト iPS 細胞由来肝細胞に本ベクターを用いることで抗 HCV 薬の効果を評価可能であることを示した。

以上、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターは簡便に様々な細胞に HCV ゲノムを導入可能であり、HCV 複製阻害剤の効果や細胞の HCV 複製能を評価可能であり、汎用性に優れた HCV 複製解析系であることが示された。

Ad ベクターを利用することにより HCV サブゲノムの発現系開発に成功したことから、最後に HCV フルゲノム発現 Ad ベクターの開発に着手した。HCV サブゲノム発現系と同様に、RNA polI 発現系プラスミドを構築し、HCV フルゲノムの転写誘導が可能であるこ

とを示した。本発現系を Helper-dependent Ad ベクターへと搭載することで、in vivo での HCV フルゲノムの導入が可能となると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

該当なし

G-2 学会発表

1. Yagi K., Yoshida T., Yamane S., Takayama K., Watari A., Kondoh K., Sakurai F., Sakamoto N., Matsuura Y., Mizuguchi H., Evaluation of HCV infection and replication using human iPS cell-derived hepatocytes., HCV2012 19th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses 2012, Oct 5-9, Venice, ITALY.
2. Kondoh M., Yamagishi Y., Yoshida T., Mizuguchi H., Sakamoto N., Watari A., Yagi K., Development of RNA pol-driven adenovirus vector expressing hepatitis C virus replicon. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA
3. Yoshida T., Satoh F., Watari A., Kondoh M., Mizuguchi H., Sakamoto N., Yagi Y., Development of an RNA polymerase I-driven adenoviral vector and its application in an HCV replication assay. 18th International Symposium of hepatitis C virus and related viruses, Sep8-12, 2011, Seattle, WA, USA.
4. Yoshida T., Satoh F., Kondoh M., Mizuguchi H., Yagi K., Development of an adenovirus vector-mediated assay system for Hepatitis C virus replication. 50th annual meeting of the American society for cell biology, Dec 11-15, Philadelphia, USA.
5. 吉田 孟史、佐藤 美美、渡利 彰浩、近藤 昌夫、水口 裕之、八木 清仁、RNAポリメラーゼI発現系を利用した長鎖RNA発現ベクターの開発、第27回日本DDS学会、平成23年6月9-10日、東京
6. 吉田孟史、近藤昌夫、水口裕之、八木清仁：RNA

polymerase I 発現系を利用した HCV 複製評価系の開発、第17回肝細胞研究会、平成22年6月、秋田

7. 山岸喜彰、吉田孟史、近藤昌夫、八木清仁、感染受容体発現バキュロウイルスを用いた HCV 感染機構の解析、日本薬学会第131年会、平成23年3月、静岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

該当なし

H-2 実用新案登録

該当なし

H-3 その他

該当なし

I. 研究協力者

大阪大学大学院薬学研究科：

- ・ 八木清仁(教授)
- ・ 近藤昌夫(准教授)
- ・ 吉田孟史(大学院生)
- ・ 松久幸司(大学院生)
- ・ 山岸喜彰(大学院生)

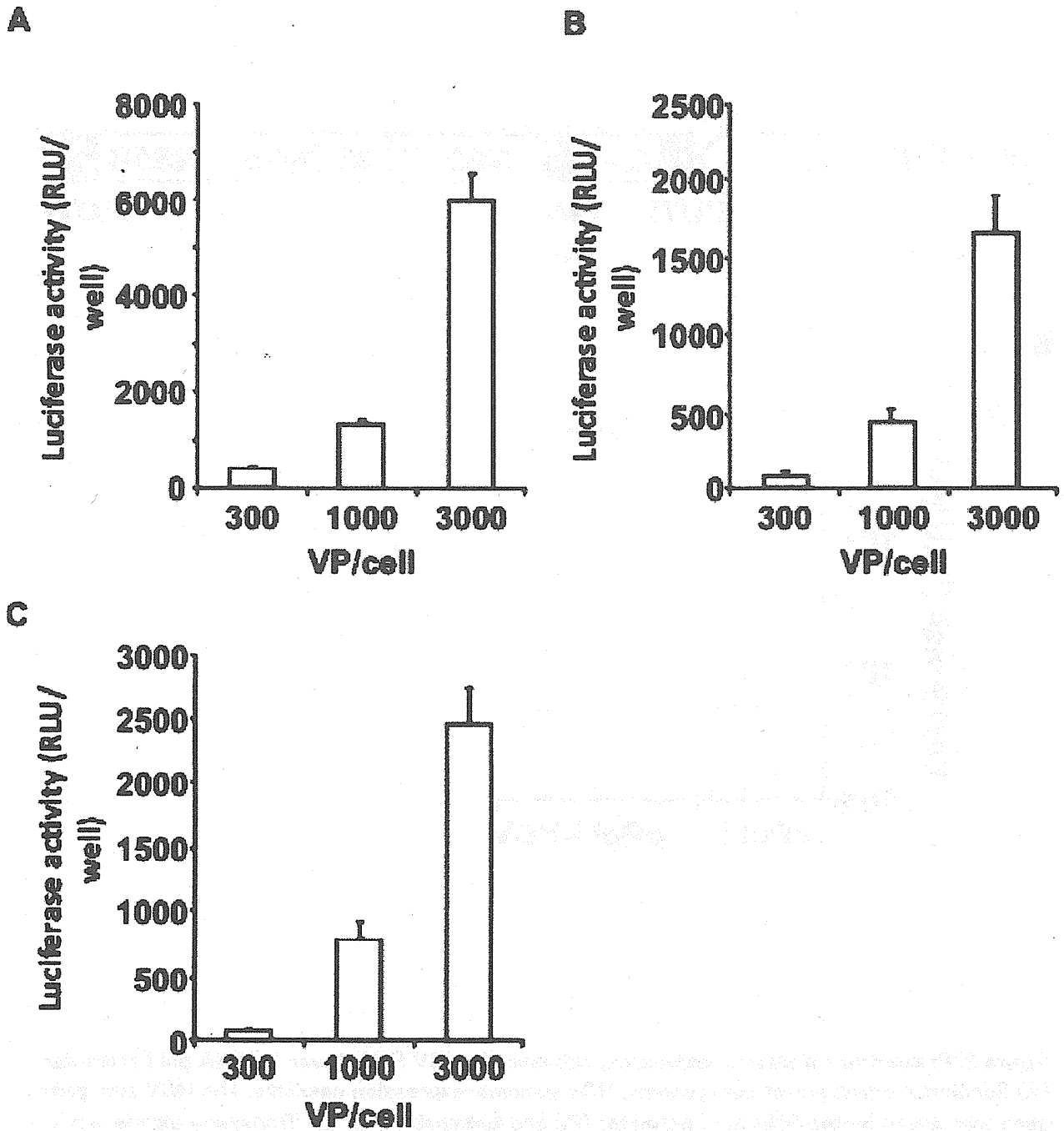
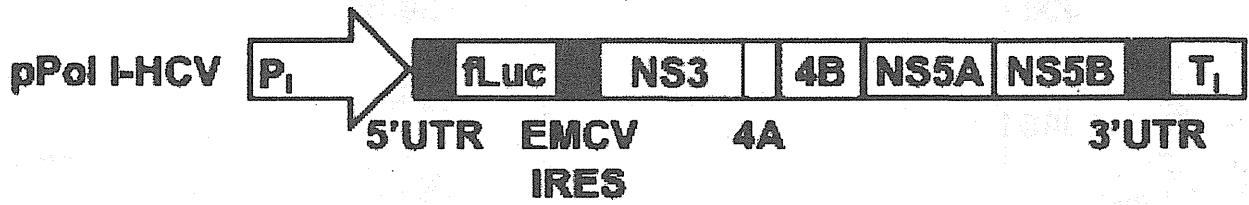


Figure 1. Expression of adenovirus vector coding EGFP-Luciferase gene driven by RNA pol I promoter in various hepatocyte cell lines. Huh7 (A), HepG2 (B), SK HEP-1 (C) cells were infected with Ad-pol I-EGFP-Luo at 300 to 3000 VP/cell. After 24 h of infection, the luciferase activities were measured. Data are mean \pm SD (n=3).

A



B

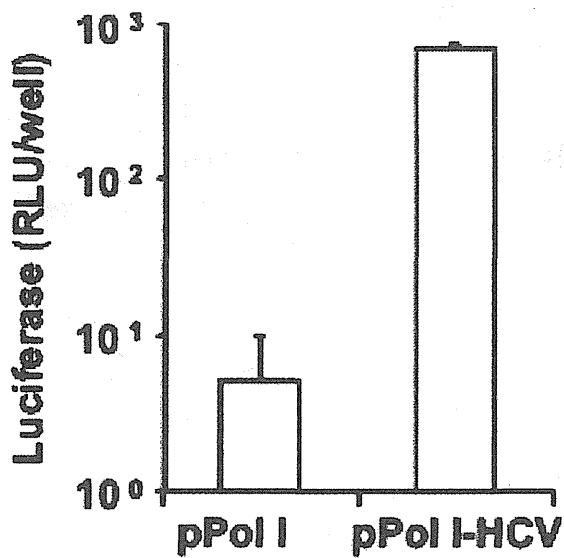


Figure 2. Preparation of plasmid expressing subgenomic HCV RNA driven by RNA pol I promoter. (A) Schematic construct of sub-genomic HCV genome-expression cassette. The HCV sub-genome gene was driven by the RNA pol I promoter (P_i) and terminator (T_i). (B) Transgene expression in Huh7 cells. Cells were transfected with pPol I-HCV. After 24 h of transfection, the luciferase activities were measured. Data are mean \pm SD ($n=3$).

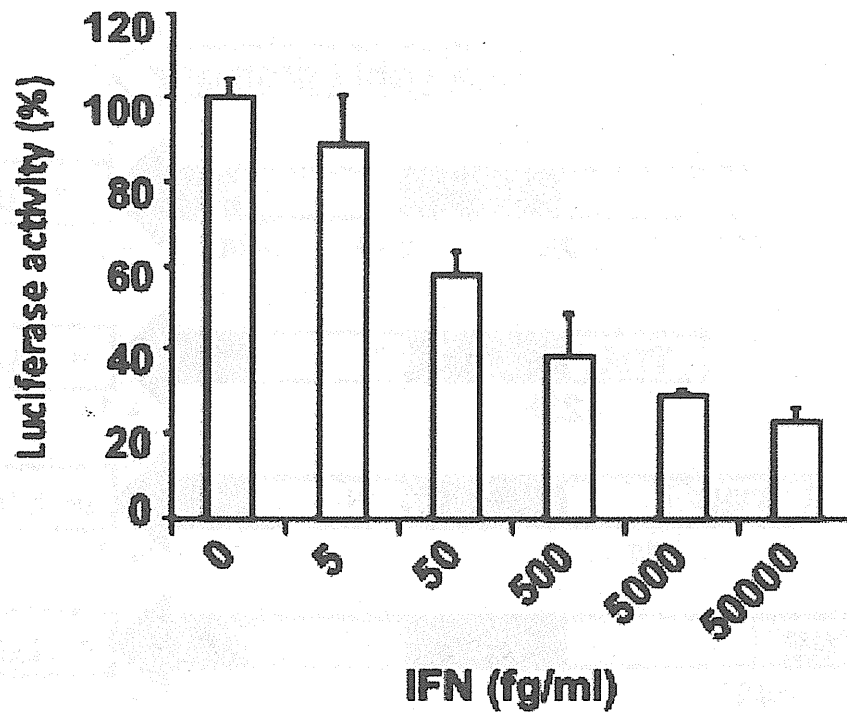
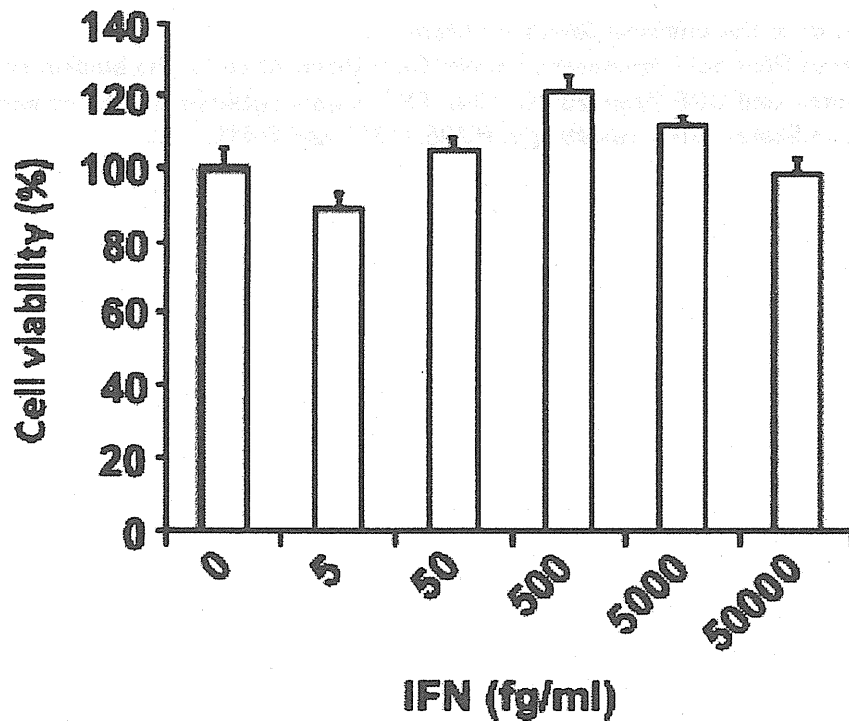
A**B**

Figure 3 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 (A) and the cell viability (B) were measured. The luciferase activity (%) was calculated as a percentage of that in the vehicle-treated cells. Data are mean \pm SD ($n=3$).

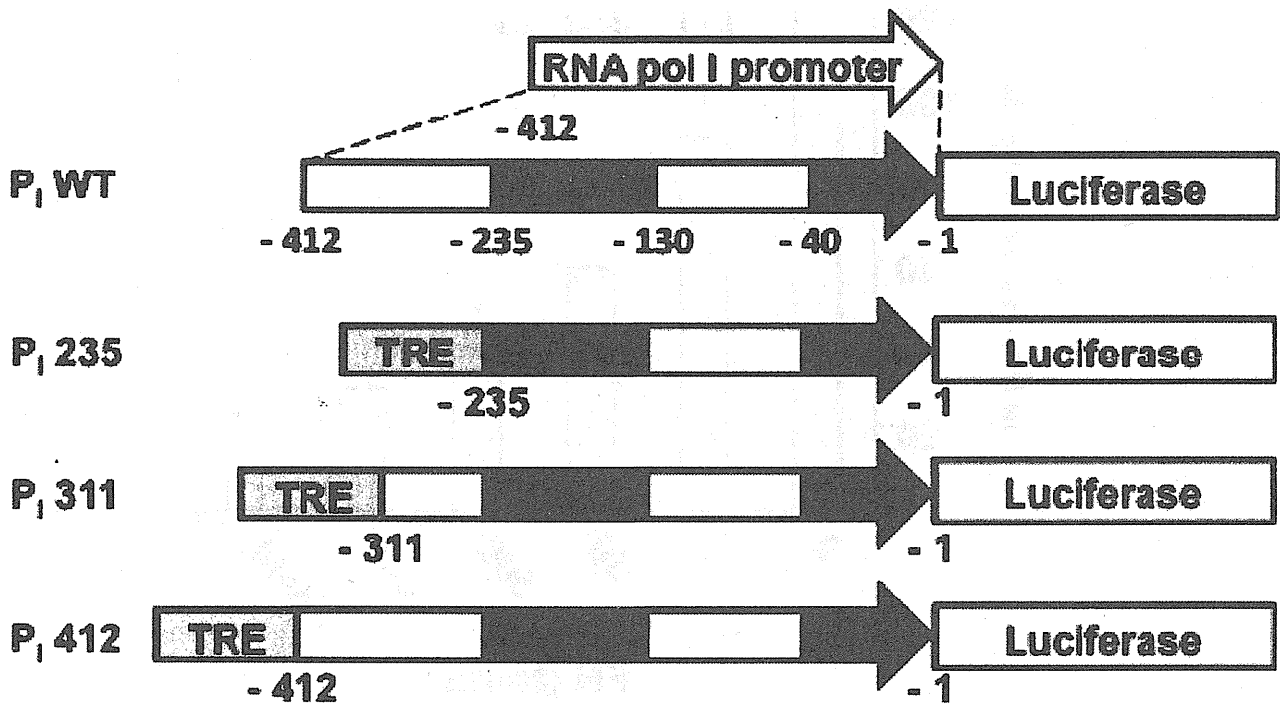


Figure 4 Construct of the chimeric RNA pol I promoter.

The 412-bp human RNA pol I promoter contains Core (from 40 to 1), the binding site of the transcription factor, and UCE (from 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.

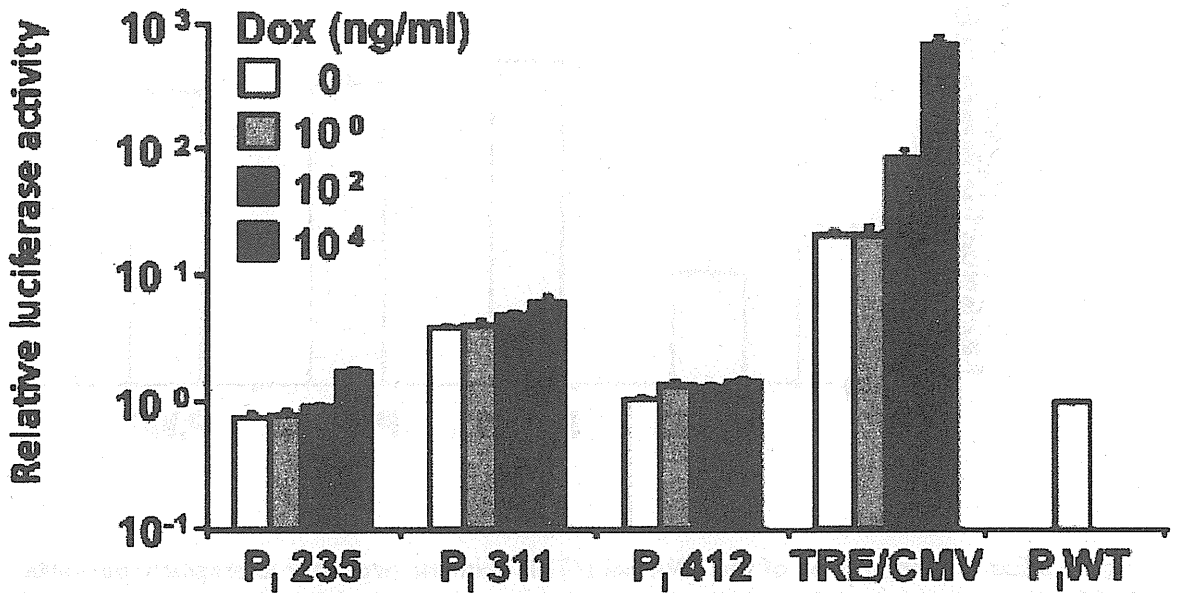
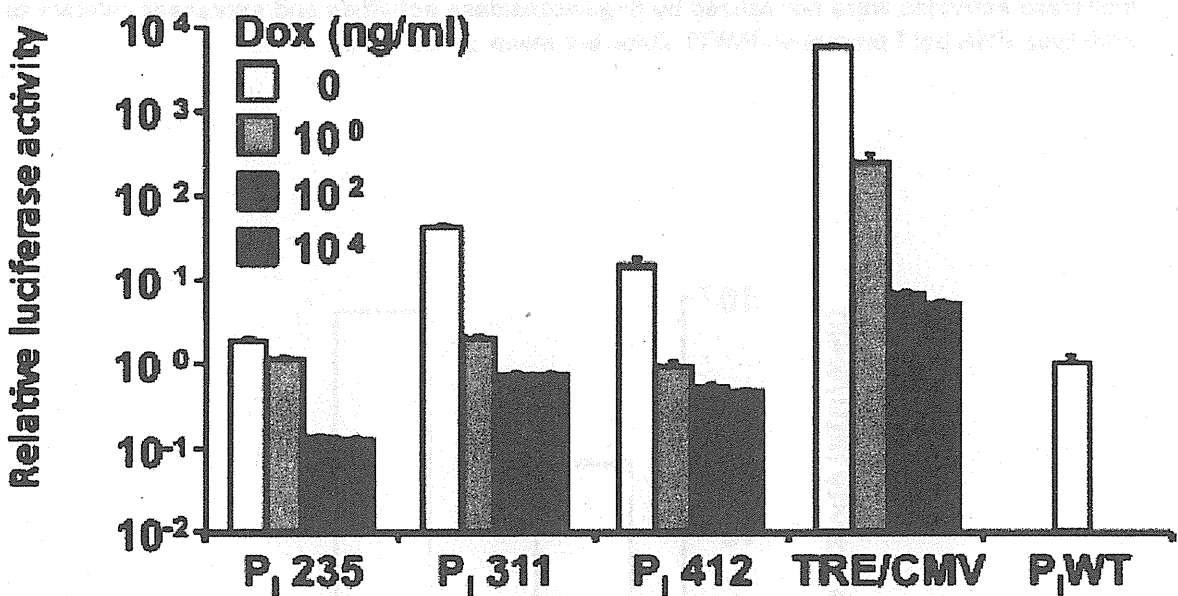
A**B**

Figure 5 Promoter activities of the chimeric promoter in Huh7 cells.

Huh7 cells were co-transfected with the chimeric RNA pol I plasmid coding EGFP_{Luc}, pCMV β and transactivator plasmid [rtTA (A) or tTA (B)]. 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 and β -galactosidase activities were measured. The luciferase activity was normalized by the β -galactosidase activity and expressed relative to that of pP_{WT}-EL-transfected cells. Data are mean \pm SD (n=3).

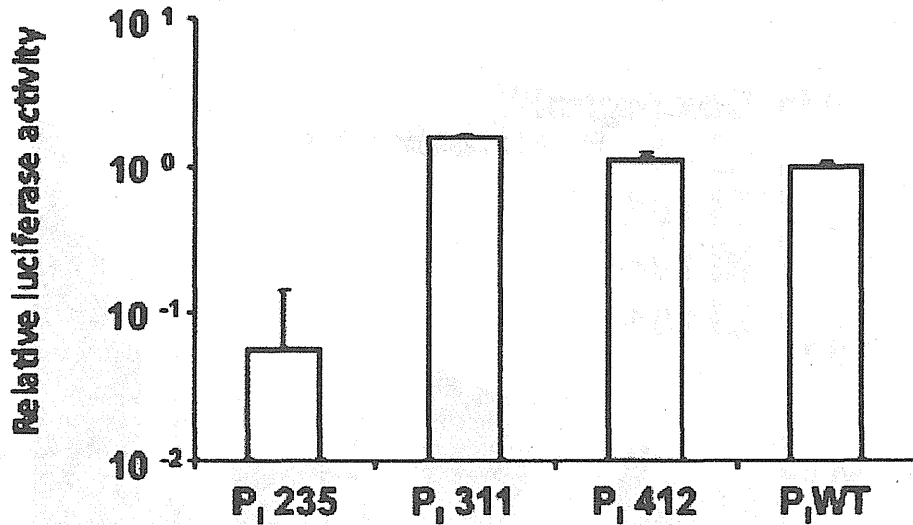


Figure 6 Expression profiles of the RNA pol I/TRE chimeric promoter expression-cassette. Huh7 cells were co-transfected with 0.1 μ g of reporter plasmid (pP_I235-EL, pP_I311-EL, pP_I412-EL or pP_IWT-EL) and 0.1 μ g of pCMV β for 2.5 h. After an additional 48 h of incubation, the cells were lysed in LC β . Luciferase activity and β -galactosidase activity in the lysates were measured. The luciferase activities were normalized by β -galactosidase activities and expressed relative to that of wild-type RNA pol I promoter (P_IWT). Data are mean \pm SD (n=3).

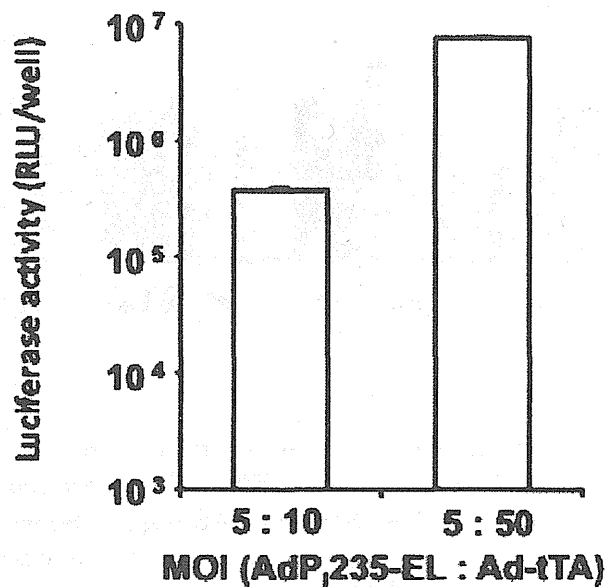


Figure 7 Transgene activity of Ad vector coding the chimeric promoter construct. Huh7 cells were co-infected with AdP_I235-EL and Ad-tTA. The MOI ratio of AdP_I235-EL to Ad-tTA was 5:10 or 5:50. After an additional 48 h of incubation, the luciferase activities were measured. Data are the mean \pm SD (n=3).

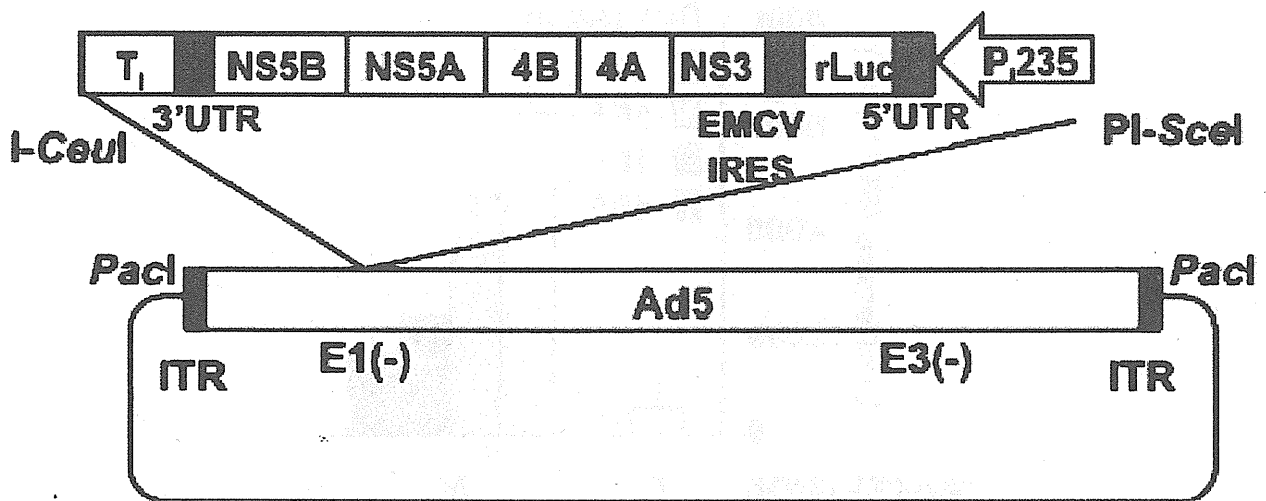


Figure 8. Construction of Ad vector to monitor HCV replication. The Ad vector contained the chimeric RNA pol I promoter (P,235) and the HCV replicon to monitor HCV replication as the luciferase expression.

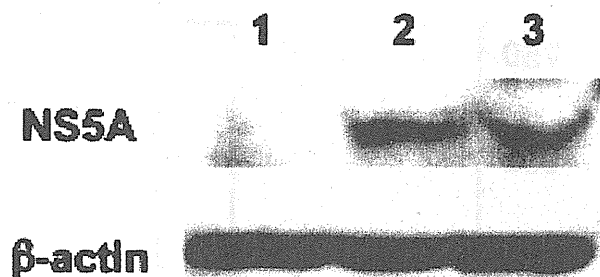


Figure 9 Expression of HCV NS5A protein in Huh7 cells transfected with AdP,235-HCV. The cells were transfected with AdP,235-HCV (10 MOI) and Ad-tTA (50 MOI). After 72 h of incubation, the cells were harvested, and the lysates (30 mg) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with antibody against NS5A. Huh7 cells and Huh7.5.1 1bFeo cells were used as the negative and positive controls, respectively. Lane 1, Huh7 cells; lane 2, Huh7 cells infected with AdP,235-HCV; lane 3, Huh7.5.1 1bFeo cells.

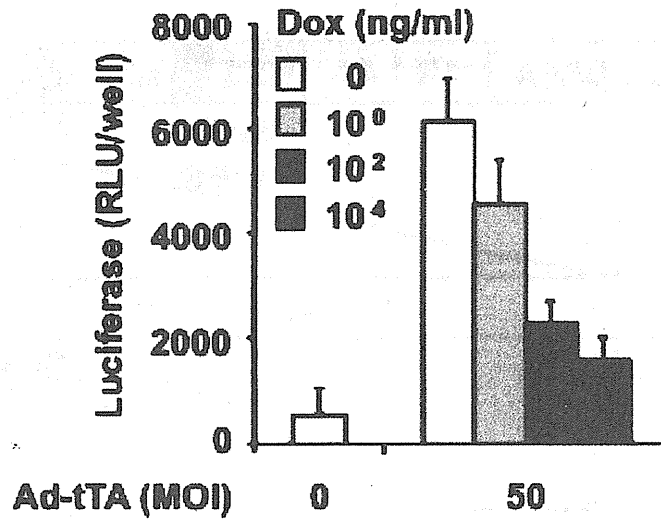


Figure 10 Expression of luciferase in the Ad vector-transfected cells. Huh7 cells were co-infected with AdP₂₃₅-HCV (10 MOI) and 0 or 50 MOI of Ad-tTA. After an additional 48 h of incubation, the luciferase activity was measured. Data represent the mean \pm SD (n=3).

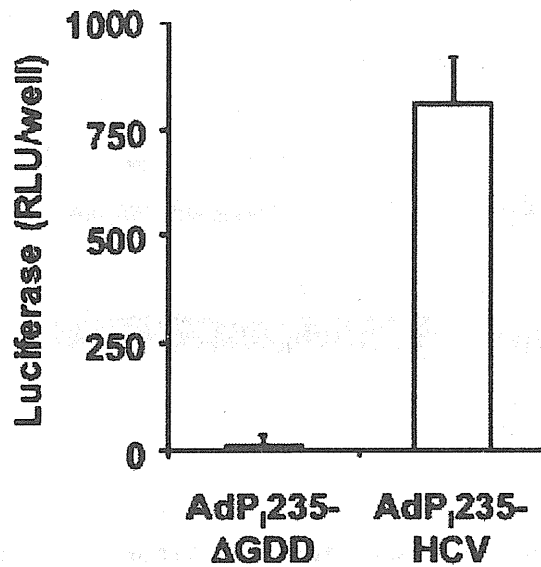


Figure 11 Involvement of NS5B in expression of luciferase in the Ad vector-transfected cells. Huh7 cells were infected with AdP₂₃₅-HCV or AdP₂₃₅-ΔGDD (3 MOI) and Ad-tTA (15 MOI). After 24 h, the cells were treated with 10 mg/ml of Dox for 48 h. Then, the luciferase activity was measured. Data represent the mean \pm SD (n=3).

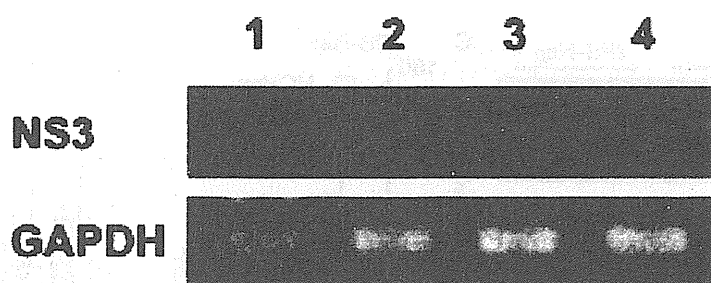


Figure 12 Expression of minus-stranded HCV RNA in the Ad vector-transfected cells. Huh7 cells were co-infected with AdP₂₃₅-HCV or AdP₂₃₅-DGDD at 3 MOI and Ad-rtTA at 15 MOI. After 24 h, the cells were treated with 10 mg/ml of Dox for 48 h. Then RT-PCR analysis was performed for detection of minus-stranded HCV NS3 and GAPDH. The PCR products were separated on 2% agarose gel. Huh7 cells and Huh7.5.1 1bFeo cells were used as the negative and positive controls, respectively. Lane 1, Huh7 cells; lane 2, Huh7.5.1 1bFeo cells; lane 3, Huh7 cells infected with AdP₂₃₅-DGDD; lane 4, Huh7 cells infected with AdP₂₃₅-HCV.

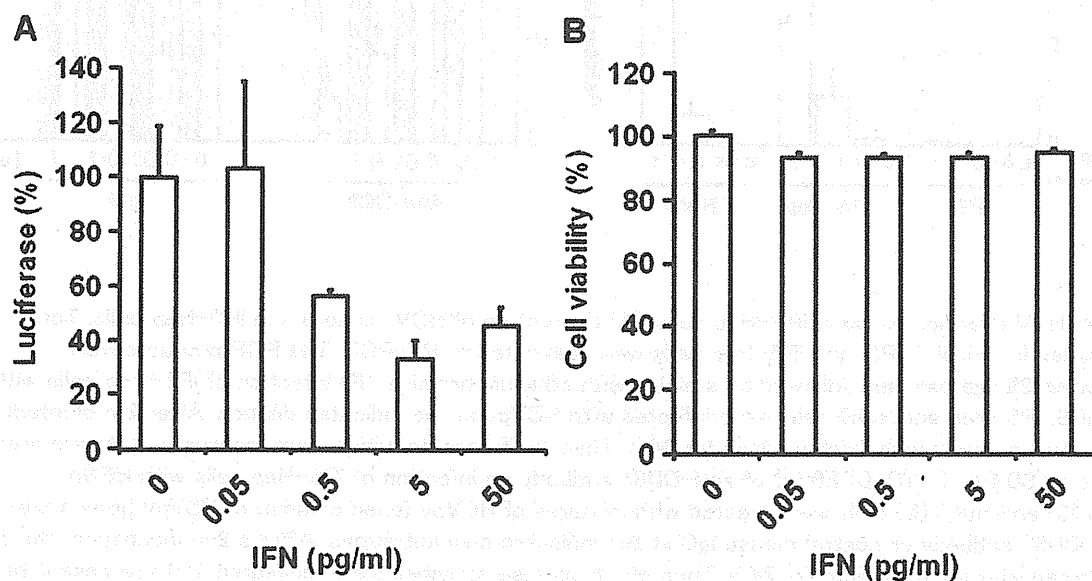


Figure 13 HCV replicative inhibition assay in adenovirus mediated RNA polymerase I dependent HCV reporter assay. Huh7 cells were infected with AdP₂₃₅-HCV and Ad-rtTA. After 1.5 h of infection, the cells were treated with IFN at the indicated concentration for 72 h. Then, the luciferase activity (A) and the cell viability (B) were measured. Data represent the percentage of vehicle-treated cells. Data are the mean \pm SD (n=3).

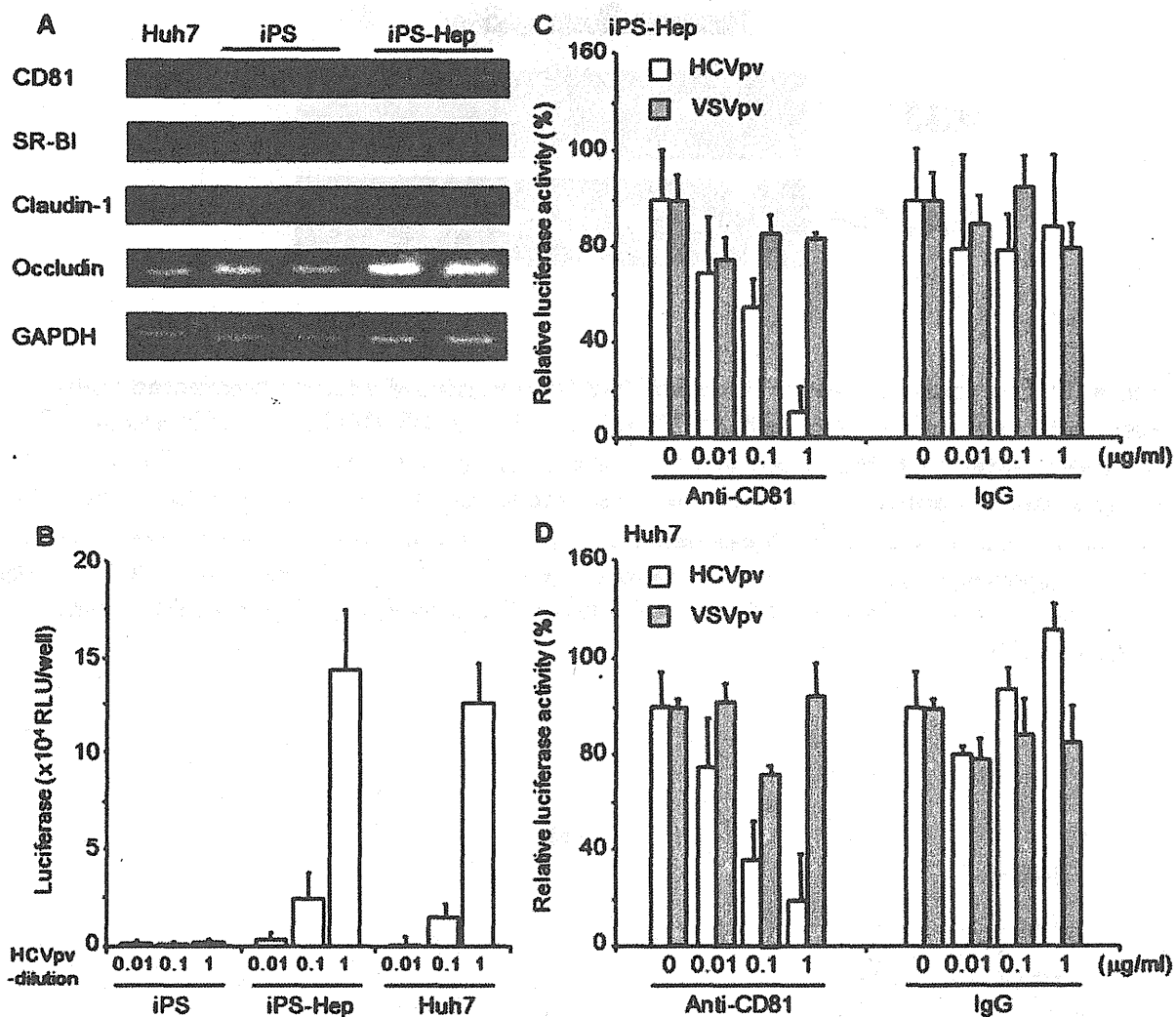


Figure 14 HCV infection assay in iPS-Hep cells. (A) Expression of HCV receptors in iPS-Hep cells. Total RNA samples from Huh7, iPS, and iPS-Hep cells were subjected to RT-PCR. The PCR products were separated on 2% agarose gels, followed by staining with ethidium bromide. (B) Infection of iPS-Hep cells with HCVpv. iPS, iPS-Hep and Huh7 cells were infected with HCVpv at the indicated dilution. After 2 h of infection, the cells were cultured with fresh medium for 24 h. Then, luciferase activities were measured. Data are presented as means \pm SD (n = 3). (C, D) Effect of anti-CD81 antibody on infection of iPS-Hep cells with HCVpv. iPS-Hep (C) and Huh7 (D) cells were treated with mixtures of HCVpv (open column) or VSVpv (gray column) and anti-CD81 antibody or control mouse IgG at the indicated concentrations. After a 2-h incubation, the cells were cultured with fresh medium for 24 h. Then, the luciferase activities were measured. Data represent the percentage of vehicle-treated cells. Data are presented as means \pm SD (n = 3).

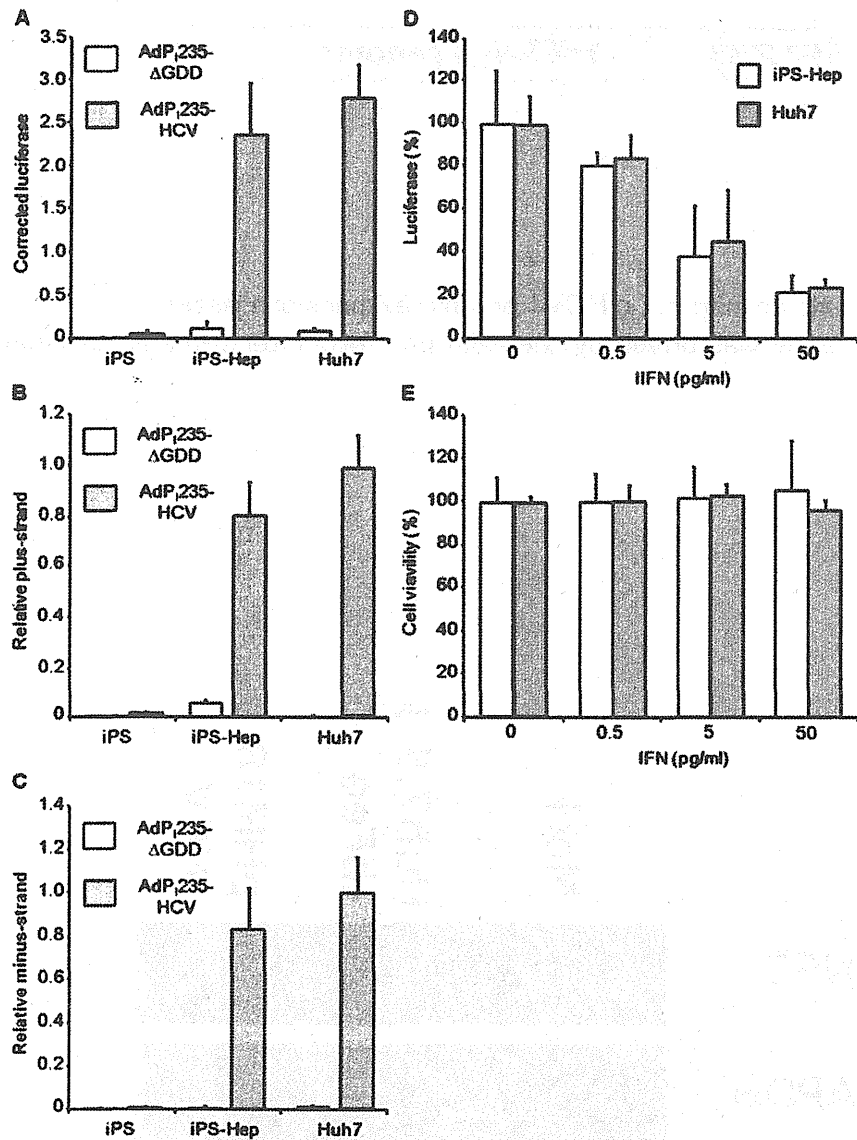


Figure 15 (A-C) HCV replication assay in iPS-Hep cells. (A) Comparison of replication of HCV subgenomic replicons, AdPI235-HCV (gray column) and AdPI235-DGDD (open column), in iPS, iPS-Hep and Huh7 cells. The cells were infected with replicons, treated with Dox, and renilla luciferase activity was measured. To normalize for infectivity of Ad vector, cells were co-infected with AdPI235-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, C) Real-time PCR analysis of HCV plus- (B) and minus- (C) 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 \pm SD (n = 3). (D, E) Effect of interferon on HCV replication in iPS-Hep cells. iPS-Hep (open column) and Huh7 (gray column) cells were infected with AdPI235-HCV and AdtTA. After 24 h, the cells were treated with Dox and the indicated concentration of interferon for 48 h. Luciferase activities (D) and cell viabilities (E) were measured. Data represent the percentage of the value for vehicle-treated cells, and are presented as means \pm SD (n = 3).



Figure 16 Schematic construct of HCV genome-expression cassette. The HCV replicon gene was driven by the RNA pol I promoter (P_I) and terminator (T_I).

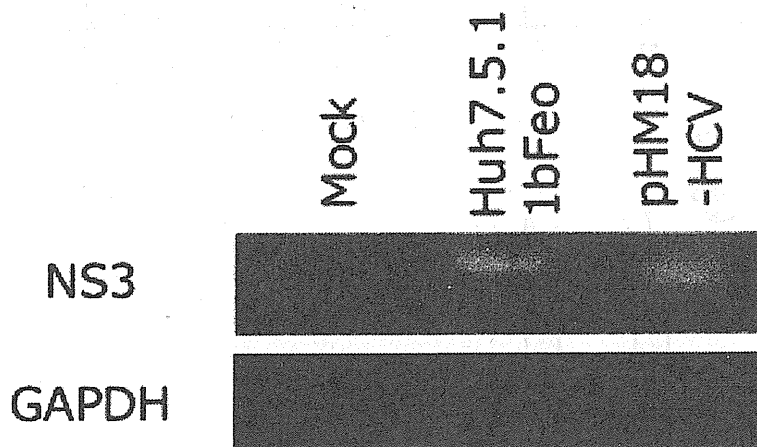


Figure 17 Expression of minus-stranded HCV RNA in the pHM18-HCV-transfected cells. Huh7 cells were transfected with pHM18-HCV. After 24 h, the total RNA was collected. Then RT-PCR analysis was performed for detection of minus-stranded HCV NS3 and GAPDH. The PCR products were separated on 2% agarose gel. Huh7 cells and Huh7.5.1 1bFeo cells were used as the negative and positive controls, respectively. GAPDH was used as a loading control.

