

specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. Hepatology (in press)

3) Sakai Y, Tatsumi I, Higashimoto M, Seki A, Nasti A, Yoshida K, Kawaguchi K, Wada T, Honda M, Komura T, Kaneko S. Association of changes in the gene expression profile of blood cells with the local tumor inflammatory response in a murine tumor model. Biochem Biophys Res Commun 428(1):36-43, 2012.

4) Shugo H, Ooshio T, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Muraguchi T, Tamase A, Uema N, Yamashita T, Nakamoto Y, Suda T, Kaneko S, Hirao A. Nucleostemin in injury-induced liver regeneration. Stem Cells Dev 21(16):3044-54, 2012.

5) Okada H, Honda M, Campbell JS, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, Shirasaki T, Takabatake R, Nakamura M, Sunagozaka H, Tanaka T, Fausto N, Kaneko S. Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. Cancer Res 72(17):4459-71, 2012.

2. 学会発表

1) Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Funaki M, Takabatake R, Lemon S, and Kaneko S. Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Acyclic Retinoid, The 63rd AASLD 2012, U.S.A. 2012年11月

2) Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Okada H, Lemon S, Murakami S, Kaneko S. Gene expression profile of primary hepatocyte and differential innate antiviral response of IFN- α and IL28B, The 63rd AASLD 2012, U.S.A. 2012年11月

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

レプリコンを用いた C 型肝炎ウイルス増殖に関与する宿主分子の網羅的解析、
リバースジェネティックスの構築に関する研究

研究分担者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

研究要旨 前年度までに、トロンボキサン A_2 (TXA₂) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤 Ozagrel ならびに IP アゴニスト ONO1301 が JFH1 感染性粒子産生系において HCV 感染性粒子産生阻害効果を示し、ヒト肝細胞キメラマウスにおいても患者血由来 HCV の感染増殖を阻害することを示してきた。今年度はこれら薬剤による薬効作用の詳細を明らかにし、さらに効率良い薬剤の標的を見出すことを目指した。数種類の IP アゴニストについてその効果を検証したところ、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬効検査では有意に HCV の感染増殖を抑制したのにも関わらず、ペロプラストは JFH1 感染性粒子産生系において全く効果を示さなかった。そこで、JFH1 感染性粒子産生系で用いられている HuH-7 細胞について、これら IP アゴニストによる細胞内シグナル伝達について検討したところ、この細胞では IP アゴニストに対する反応性がないことがわかった。このことからヒト肝細胞キメラマウスにおける IP アゴニストの抗 HCV 効果は Ozagrel のものとは異なる可能性があることがわかった。また以上の結果と ONO1301 が TXAS 阻害活性も併せもつことから、JFH1 感染性粒子産生系においては TXAS 阻害活性によって感染性粒子産生阻害効果を示した可能性が考えられた。そこで Ozagrel 処理の細胞に対する効果を解析するため、この薬剤処理をおこなった細胞の総脂肪酸組成の解析をおこなったが、アラキドン酸をはじめとして、脂肪酸の組成は薬剤処理未処理で大きな変化は認められなかった。また TXAS の関与が COX1 によって産生されるプロスタグランジン H₂ を基質として利用した反応であることがわかり、この反応系による産物である TXA₂ あるいはその誘導体が機能因子である可能性が考えられた。今後は、IP アゴニストの作用機序を明らかにすることと TXAS 阻害剤の抗 HCV 効果の分子機構を明らかにして、新規の抗 HCV 薬剤の開発をおこなう必要があると考えられた。

A. 研究目的

これまでに、患者由来の C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染増殖細胞培養系としてヒト不死化肝細胞の立体培養系を独自に開発している。この系では平面培養では得られなかった効率で感染増殖や感染性粒子産生がおこなわれる。このことをもとに、このウイルスの生活環に関わる細胞側因子の詳細を明らかにして、これを効果的に抑制する薬剤を抗 HCV 薬候補として同定することを目的とした。これまでにこの系をもとにトロンボキサン A_2 (TXA₂) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤 Ozagrel を新規抗 HCV 薬候補として同定している。また TXA₂ と相反する生理活性を有するプロスタグランジン I₂ (PGI₂) 受容体 (IP) アゴニストがキメラマウスを用いた抗 HCV 薬の評価系で同様の効果を示

すことを明らかにしている。そこで今年度はさらに IP アゴニストや Ozagrel による感染性 HCV 粒子産生系阻害機構の詳細を明らかにし、新たな薬剤の標的を見出すことを目指した。

B. 研究方法

1. 前年度までに、トロンボキサン A_2 (TXA₂) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤 Ozagrel ならびに IP アゴニスト ONO1301 が JFH1 感染性粒子産生系において HCV 感染性粒子産生阻害効果を示し、ヒト肝細胞キメラマウスにおいても患者血由来 HCV の感染増殖を阻害することを示してきた。IP アゴニストの作用機序を明らかにするために以下の点について解析

した。

- i. ONO1301 と構造の異なる IP アゴニスト、ベロプラストで組換え体 HCV 産生細胞を処理し、その細胞から産生される HCV 粒子の感染性を検討した。
 - ii. IP から細胞内に伝達されるシグナルの一つであるサイクリック AMP (cAMP) の増加をモニタリングするため、cAMP 応答配列を転写プロモーターに持つレポーター (ルシフェラーゼ) プラスミドを各細胞に導入して、その IP アゴニストに対する反応性を検討した。
2. Ozagrel の作用機序を明らかにするために Ozagrel で処理そして未処理の HuH-7 細胞から総脂肪酸を抽出し、総脂肪酸組成のマス解析をおこなって比較した。
 3. COX1 の産物で TXAS の基質となるプロスタグランジン_{H₂} (PGH₂) を JFH1 感染性粒子産生系に対して過剰に加えて、TXAS 活性による感染性 HCV 産生への関与の分子機構の解析をおこなった。

(倫理面への配慮)

この研究で用いられている不死化肝細胞はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認された研究に基づくものである。不死化肝細胞作製に用いた肝臓提供者へのインフォームドコンセントや個人情報管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

ヒト肝細胞キメラマウスを用いたすべての実験は広島大学大学院分子病態制御内科学教

室において、同学倫理委員会の承認に基づき、規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

1. TXAS によって産生される TXA₂ と相反する生理活性を有する IP アゴニストについて、ONO1301 と構造の異なるベロプラストを用いて、その抗 HCV 活性について感染性 HCV 粒子産生系を用いて解析をおこなった。しかしながら、ベロプラストは既にヒト肝細胞キメラマウスにおいて効果的な抗 HCV 作用を示したのにもかかわらず、細胞内と培地中の HCV RNA および培地中に産生される HCV の感染性については全くベロプラスト処理によって影響を受けなかった。
2. 感染性 HCV 粒子産生系で用いている HuH-7 細胞に cAMP 応答配列を持つレポータープラスミドを導入し、この細胞における IP アゴニストによる IP 依存的な cAMP 量の増加を検討したが、ONO1301 とベロプラストどちらを用いた場合でもレポーターであるルシフェラーゼの発現は上昇しなかった。
3. HuH-7 細胞における IP mRNA の発現を ; RT-PCR により検討したが、少なくとも RT-PCR による検出は可能であった。
4. 不死化ヒト肝細胞 HuS-E/2 細胞について 3. と同様の実験をおこなったところ、二種類の IP アゴニストそれぞれの処理で有意なレポーター活性の上昇が確認された。
5. Ozagrel で処理そして未処理の HuH-7 細胞から抽出された総脂肪酸のマス解析の結果、アラキドン酸を含む、検出されたすべての脂肪酸の組成は Ozagrel の処理によって変化していないことがわかった。
6. JFH1 感染性粒子産生系に PGH₂ を過剰に添

加したところ、細胞中や培地中の HCV RNA は変化がなく、培養上清中に産生される感染性 HCV の量が増加することがわかった。

D. 考察

1. ヒト肝細胞キメラマウスでは抗 HCV 効果を示した IP アゴニスト、ベラプロストが JFH1 感染性粒子産生系では全く効果を示さなかったのは JFH1 感染性粒子産生系で使用されている HuH-7 細胞では IP アゴニストに対する反応性が無いあるいは著しく低いことが原因かもしれない。
2. ヒト肝細胞キメラマウスと JFH1 感染性粒子産生系の双方で抗 HCV 効果を示した ONO1301 は IP アゴニスト活性以外に TXAS inhibitor 活性をもつことが知られているため、その JFH1 感染性粒子産生系における活性は TXAS inhibitor 活性によるものであることが考えられた。
3. Ozagrel 処理した細胞の総脂肪酸組成の解析では未処理細胞との大きな変化は認められなかったことから、少なくとも Ozagrel の効果が、その処理のために細胞内の脂肪酸組成が著しく変化することによるものではないことが考えられた。
4. COX1 の産物で TXAS の基質となるプロスタグランジン H_2 (PGH_2) を JFH1 感染性粒子産生系に対して過剰に加えることで、感染性 HCV の産生量が上昇したことから、感染性 HCV 産生に関わる TXAS の機能はアラキドン酸カスケードの中の PGH_2 を基質とした酵素反応産物、つまり TXA_2 あるいはその誘導体の産生が機能因子として関与している可能性が考えられた。

E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスにおける IP アゴニ

ストの抗 HCV 効果に関する分子機構はまだ不明であるため、今後明らかにする必要がある。TXAS 阻害薬 Ozagrel の感染性 HCV 粒子産生阻害効果は TXA_2 あるいはその誘導体の産生抑制による可能性が考えられた。今後この未だ不明のシグナル経路の中に、特異的にしかも効率良く感染性 HCV 粒子産生を阻害することが可能になる新たな薬剤の標的が存在すると思われ、今後のさらなる研究が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata, Tsukasa Seya: In vitro models for the analysis of HCV life cycle, *Microbiol. and Immunol.*, 2012, 56, 1, 1-9.

2. 学会発表

1) Hijikata M.: Modulation of infectious hepatitis C virus production by prostanoid. 科学技術戦略推進費「アジア・アフリカ科学技術協力の戦略的推進 国際共同研究の推進」事業「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, Challenges to overcome Emerging Infectious Diseases in South-eastern Asia, Kyoto, Japan, January 13, 2012.

2) Yoji Tsugawa and Makoto Hijikata: Hepatocyte-specific innate immune systems in response to RNA virus infection. The 10th International Student Seminar. Kyoto, 5-8 March 2012.

3) Abe Y., Aly H., Imamura M., Wakita T., Shimotohno K. Chayama K., Hijikata M.: Thromboxane A2 synthase plays a key role in

production of infectious HCV particles. The 7th International symposium of institute network. Seoul, Korea, Aug. 22-24th, 2012

4) Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Critical role of Interferon alpha constitutively produced in-human hepatocytes in response to virus infection. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 11-14 September 2012

5) Abe Y., Aly H., Imamura M., Wakita T., Shimotohno K., Chayama K., Hijikata M.: Thromboxane A₂ synthase plays a key role in production of infectious HCV particles. 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Venice, Italy, Oct 5-9, 2012

6) Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Hepatocyte-specific innate immune systems in response to viral infection. 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Venice, Italy, Oct 5-9, 2012

7) Misao Kuroki, Mariko Inoue. Makoto Hijikata, Masanori Ikeda Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Nobuyuki Kato, Yasuo Ariumi: Can P-body associated host factors APOBEC3G and MOV10 restrict HCV infection? 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Venice, Italy, Oct 5-9, 2012

8) 津川 陽司、土方 誠: ヒト肝細胞における抗ウイルス自然免疫応答機構の解析、第8回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島、平成24年7月6日

9) 土方 誠:C型肝炎ウイルス培養系開発過程で最近わかったこと、国立感染症研究所肝炎セミナー、国立感染症研究所、東京平成24年年10月31日

10) 津川陽司、加藤博己、藤田尚志、下遠野邦忠、土方誠: ヒト肝細胞における抗ウイルス自然免疫応答機構の解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪2012年11月13-15日

11) 阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、今村道雄、脇田隆字、下遠野邦忠、茶山一彰、土方誠:C型肝炎ウイルス(HCV)の感染性粒子形成において重要な宿主因子、トロンボキサン A2(TXA2)合成酵素の同定と機能解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪2012年11月13-15日

12) 有海康雄、黒木美沙緒、井上万里子、土方誠、池田正徳、脇田隆字、下遠野邦忠、加藤宣之:P-body因子とHCVのクロストーク、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪2012年11月13-15日

13) Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Constitutively produced Interferon . . . functions in prevention of viral infection in human hepatocytes, 第35回日本分子生物学会年会、福岡2012年12月11~14日

H. 知的取得権の出願・登録状況

1. 特許取得

上皮系体性幹細胞の製造方法、発明者 土方誠、アリ ハッサン フセイン、山口達哉、出願日 2012年3月25日、出願番号 PCT/JP2012/057468

2. 実用新案登録 特になし。

3. その他 特になし

HCV感染モデルマウスに対するインターフェロン- γ 遺伝子治療効果の検討と
インターフェロン- γ 肝臓ターゲティング法の開発
研究分担者 高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 インターフェロン- α (IFN- α)抵抗性HCVを高レベルで感染させたヒト肝細胞キメラマウスを用いて、*in vivo*において持続的にIFN- γ を発現するIFN- γ 発現plasmid DNA (pDNA)をハイドロダイナミクス法を用いて遺伝子導入することで、強力な抗HCV効果が得られることを報告した。そこで、一過性にIFN- γ を発現するpDNAを用いた場合の抗HCV効果を評価することで、持続性の意義を検討した。その結果、一過性発現の場合には、pDNA投与後早期に血清中HCV RNA量が検出限界以下にまで減少した個体も存在したが、リバウンド現象が認められ、高レベルの血清中HCV RNA値を示す個体においては、効果はほとんど観察されなかった。また、green fluorescent protein (GFP)発現pDNAを用いて、肝臓内での発現の分布を調べたところ、マウス、ヒトいずれの肝細胞でも発現は認められたが、ヒト肝細胞での発現が優位であることが示された。さらに、持続的なIFN- γ 発現によるHCVの除去が確認されたマウスの肝臓において、肝細胞の傷害はほとんど認められなかった。以上の結果はIFN- γ 遺伝子の持続的供給による安全かつ有効なHCV治療法の開発の可能性を示すものと考えられる。また、IFN- γ に肝臓指向性を持つことが知られているアポリポタン A-I(ApoA-I)と融合することで効率的なIFN- γ の肝臓デリバリーに関する検討も行った。

A. 研究目的

これまでの検討で、長期のIFN- γ 遺伝子発現を可能とするpDNAをハイドロダイナミクス法を用いて投与し、持続的にIFN- γ を作用させることでHCV感染キメラマウスにおいて高い抗HCV効果が得られることを報告したが、効果発現におけるIFN- γ の遺伝子発現の持続性の意義については不明であった。そこで本研究では、一過性のIFN- γ 発現を示す短期発現型のIFN- γ 発現pDNAをHCV感染キメラマウスに遺伝子導入した。持続発現型IFN- γ 発現pDNAおよび短期発現型IFN- γ 発現pDNAの投与により得ら

れる血清中IFN- γ 濃度のプロファイルと抗HCV効果との相関について解析することで、IFN- γ 遺伝子発現の持続性がC型肝炎に対する治療効果に及ぼす影響について評価した。

また、ハイドロダイナミクス法を用いたキメラマウスへの遺伝子導入において、得られる遺伝子発現がキメラマウス肝臓中のマウス由来肝細胞によるものであるかを検討すると共にHCVの除去が確認された個体の肝臓から切片を作製しHE染色を行うことで、持続的なIFN- γ の遺伝子発現が肝臓

に与える傷害性についても併せて評価した。

肝繊維症、肝硬変等の症状を有する肝臓において、ハイドロダイナミクス法による遺伝子効率が著しく低下しうることが報告されている。そこで本研究では、肝臓以外の部位にIFN- γ を遺伝子導入した後に発現するIFN- γ を肝臓指向性とすることによる、肝臓を標的とするIFN- γ 遺伝子治療法の開発に着手した。IFN- γ を肝臓指向性が高い高比重リポタンパク質(HDL)の主要な構成タンパク質であるApoA-Iとの融合タンパク質とすることで、肝臓指向性IFN- γ をデザインした。ApoA-I融合IFN- γ 発現プラスミドを構築し、筋肉内に遺伝子導入した後の融合タンパク質の肝臓指向性を評価した。

B. 研究方法

持続発現型インターフェロン- γ 発現ベクターの治療効果の検討

pDNA: pCpG-huIFN- γ およびpCMV-huIFN- γ を用いた。別途GFPを発現するpDNA、pEGFP-N1 (Clontech)を用いた。ヒト肝細胞キメラマウス: uPA-SCIDマウスにヒト肝細胞を移植することで作製した高置換キメラマウスを用いた。HCV感染モデル: 高置換キメラマウスにHCV genotype 1bを感染させることで治療抵抗性C型肝炎モデルマウスを作製した。ハイドロダイナミクス法を利用したマウスへの遺伝子導入と遺伝子発現の評価: naked pDNAをマウス体重の約10%に相当する容量の生理食塩水に溶解し、マウス尾静脈内に急速投与した。血中IFN- γ 濃度はELISA法により測定した。pEGFP-N1を投与した個体については肝臓の凍結切片を作製後、抗ヒトアルブミン抗体を用いて

免疫蛍光染色を行い、肝臓中のヒトおよびマウス由来肝細胞の識別を可能にした。抗HCV効果の評価: 経時的に採血し、real-time PCR法にて血中HCV RNA量を測定した。また、遺伝子導入から8週間後に肝臓を回収し、nested PCR法を用いて肝臓中HCV RNAの検出を行った。肝臓の組織学的観察: pCpG-huIFN- γ を遺伝子導入したマウスについて、遺伝子投与8週間後に肝臓の切片を作製後にHE染色、あるいは抗ヒトアルブミン抗体を用いた免疫組織染色を行った。ApoA-I融合インターフェロン- γ の肝臓指向性の検討

pDNA: マウス肝臓cDNAより抽出したApoA-IをマウスIFN- γ のC末端に融合することでApoA-I融合IFN- γ 発現pDNA、pCpG-muIFN- γ -ApoA-Iを構築した。また、同様に生理活性を持たない分泌性のレポータータンパク質、Gaussia luciferase (gLuc)のC末端にApoA-Iを融合したcDNAをコードしたpDNA、pCpG-gLuc-ApoA-Iも構築した。マウス: ICRマウス雄体4週齢を用いた。血清中リポタンパク質画分の分離: ハイドロダイナミクス法を用いてマウスに遺伝子導入した6時間後、下大静脈より採血し、NaBr密度勾配超遠心分離法で各リポタンパク質画分を分離することでHDL画分への移行性を評価した。ApoA-I融合IFN- γ のIFN- γ 活性評価: IFN- γ 依存的にホタルルシフェラーゼを発現するpGAS-Lucを遺伝子導入したマウスメラノーマ細胞株B16-BL6細胞を用いてIFN- γ 活性を評価した。肝臓中IFN- γ 活性の評価: マウス下肢筋肉へ遺伝子導入した後、1日後に肝臓を回収し、IFN- γ の標的遺伝子であるSuppresser of Cytokine

Signaling 1 (SOCS1)のmRNA量を測定することでIFN- γ 活性を評価した。

C. 研究結果

持続発現型インターフェロン- γ 発現ベクターの治療効果の検討

まず、GFP発現pDNAを用いてヒト肝細胞およびマウス肝細胞の遺伝子発現に対する寄与について評価を行った。その結果、キメラマウスの肝臓中のヒト由来肝細胞およびマウス由来肝細胞の両者において遺伝子発現が得られたが、ヒト由来肝細胞においてより多数のGFP発現細胞が観察され、その発現も強かった。

次に、HCV感染キメラマウスに対して短期発現型IFN- γ 発現pDNAを投与し、その抗HCV効果を評価した。その結果、遺伝子導入1日後には高いIFN- γ 発現が得られたが、その発現は遺伝子導入3日後には大きく減少した。遺伝子導入を行った2匹の個体のうち、血中HCVレベルが高かった個体においては遺伝子導入初期に一過性にHCVレベルが減少したものの、遺伝子導入7日後には元のレベルにまで回復した。また、血中HCVレベルがそれほど高くなかった個体においては血中ウイルス価の減少が認められ、20日後以降は検出限界以下になったが、血清中にIFN- γ がほぼ検出されなくなった。投与30日以降は、再び血中HCVが検出されるようになった。また、遺伝子投与から70日後に回収した肝臓中からもHCV RNAが検出された。

最後に、pCpG-huIFN- γ を遺伝子導入したマウス2匹について、遺伝子投与8週間後に肝臓を回収し、切片を作製した後にHE染色

を行い、持続的なIFN- γ 発現が肝臓に対して与える傷害性を判定した。その結果、ヒト由来肝細胞、マウス由来肝細胞いずれにおいても明確な傷害は認められなかった。

ApoA-I融合インターフェロン- γ の肝臓指向性の検討

まず、ApoA-I融合gLuc発現pDNAを用いて構築したApoA-I融合タンパク質のHDL画分への移行性の評価を行った。その結果、pCpG-gLuc投与群の血漿においては、各リポタンパク画分でgLuc活性が認められたが、pCpG-gLuc- ApoA-I投与群血漿ではHDL画分に特異的に高いgLuc活性が検出された。

次に、ApoA-I融合IFN- γ の生物活性を培養細胞を用いたレポーターアッセイによって評価した。その結果、ApoA-I融合IFN- γ は天然型IFN- γ と比べ約31%の生物活性を保持していることが明らかとなった。

最後に、マウス下肢筋肉にApoA-I融合IFN- γ 発現pDNAを遺伝子導入した後、ApoA-I融合IFN- γ の血清中濃度と肝臓中のSOCS1発現を測定することでApoA-I融合IFN- γ の肝臓指向性を評価した。その結果、ApoA-I融合IFN- γ -遺伝子を導入したマウスにおいて血清中IFN- γ 濃度は天然型IFN- γ 遺伝子を導入したマウスより低い、肝臓中でのSOCS1mRNA発現の誘導は同等かそれ以上であることが認められた。

D. 考察

本研究では、I型IFN抵抗性HCV感染キメラマウスに対して、持続的なIFN- γ 発現を示すpDNAを導入することで、優れた治療効

果が得られることを既に報告したが、今回は、短期発現型IFN- γ の遺伝子導入を行い、抗HCV効果との相関関係を評価することで、IFN- γ を持続的に供給する必要性について検証した。また、IFN- γ に肝臓指向性タンパク質であるアポリポタンパク質A-Iを融合することで効率的なIFN- γ の肝臓デリバリーを検証した。

その結果、短期IFN- γ 発現pDNAの投与においても抗HCV効果が得られることが示されたが、IFN- γ 濃度が検出限界以下にまで低下した後に血中、肝臓中においてHCVが検出されたことから、長期的な抗HCV効果を得るにはIFN- γ を持続的に発現させることが望ましいことが明らかとなった。また、高いウイルス価を示す個体においては、効果が得られないことが示された。

GFPを用いた遺伝子導入効率の検討において、ヒト由来肝細胞およびマウス由来肝細胞の両者において遺伝子発現が得られたが、これは本法を用いることでヒト由来肝細胞へも遺伝子導入が可能であることを示す結果である。また、特にヒト由来肝細胞において良好な遺伝子発現が得られたことから、本遺伝子導入法の有用性が示された。また、IFN- γ を持続的に肝臓で発現させることによる、肝臓への傷害性が懸念されたが、組織観察の結果からは明確な肝障害を示す像は得られなかった。これはIFN- γ 遺伝子治療の安全性を示す結果と考えられる。

ApoA-I融合gLucを用いたリポタンパク画分への移行を評価した検討により、ApoA-I融合タンパク質はHDLに取り込まれることが示された。また、ApoA-I融合IFN- γ は天然型IFN- γ と比較して、その生物

活性は若干低下するものの、その血中濃度と比較すると天然型IFN- γ より効率的に肝臓で生物活性を得られる可能性が示された。この結果はIFN- γ とApoA-Iを融合することで効率的なIFN- γ の肝臓デリバリーが達成可能になることを示すものと考えられる。

これらの結果は、I型IFN抵抗性HCVに対するIFN- γ 遺伝子治療の有用性を示すものと考えられる。

E. 結論

IFN- γ を作用させることで高い抗HCV効果が得られるが、特に持続的なIFN- γ の作用が望ましいこと、また持続的なIFN- γ の作用によっても標的組織である肝臓への傷害性は小さいことが明らかとなった。また、IFN- γ とApoA-Iを融合することで効率的なIFN- γ の肝臓デリバリーが可能であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Regulation of immunological balance by sustained interferon- γ gene transfer for acute phase of atopic dermatitis in mice. Watcharanurak K, Nishikawa M, Takahashi Y, Kabashima K, Takahashi R, Takakura Y. Gene Ther. 2012, in press
2. Controlling the kinetics of

- interferon transgene expression for improved gene therapy. Watcharanurak K, Nishikawa M, Takahashi Y, Takakura Y. J Drug Target. 2012; 20: 764-769
3. Gene delivery of albumin binding peptide-interferon γ fusion protein with improved pharmacokinetic properties and sustained biological activity. Miyakawa N, Nishikawa M, Takahashi Y, Ando M, Misaka M, Watanabe Y, Takakura Y. J Pharm Sci. 2013 in press.
 2. 学会発表
 1. 安藤 満、高橋有己、西川元也、高倉喜信. “機能性ペプチド融合による IFN- γ 時空間制御” 日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月
 2. Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura Y. “Long-term elimination of human hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice after single administration of plasmid DNA expressing human interferon- γ ” 15th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (May 16-19, Philadelphia, PA, USA)
 3. 高橋有己、西川元也、高倉喜信. “体内動態と生体応答の制御に基づくインターフェロン癌遺伝子治療法の開発” 日本薬剤学会第 27 年会、神戸、2012 年 5 月
 4. Watcharanurak K, Zang L, Nishikawa M, Yoshinaga K, Ando M, Takahashi Y, Watanabe Y, Yamamoto Y, Sito K, Takakura Y. “Effects of highly upregulated indoleamine 2,3-dioxygenase 1 on anti-tumor activity of interferon gamma gene transfer in tumor-bearing mice” 日本薬剤学会第 27 年会、神戸、2012 年 5 月
 5. 安藤 満、高橋有己、西川元也、渡部好彦、高倉喜信. “ヘパラン硫酸結合ドメインの融合による細胞表面付着型インターフェロン γ の開発と遺伝子デリバリーによる疾患治療” 第 34 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、京都、2012 年 11 月
 6. Ando M, Takahashi Y, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura Y. “Complete elimination of hepatitis C virus by sustained nonviral gene delivery of human interferon- γ in human hepatocyte chimeric mice” Globalization of Pharmaceuticals Education Network Meeting 2012 (28 Nov-01Dec, 2012, Melbourne, Australia)
 - H. 知的所有権の取得状況
特になし

次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV、HBV 遺伝子変異の解析

研究分担者 前川 伸哉 山梨大学大学院医学工学総合研究部
肝疾患地域先端医療システム学講座 講師

研究要旨：C 型肝炎、B 型肝炎は肝発癌のハイリスクであるが、我々はこれまでの検討において、HCV においてはコア領域、HBV に関しては PreS/S 領域に肝病態・発癌と関連する領域の存在することを明らかとしてきた。本研究では、次世代シーケンサーシステムを用いて、HCV のコア領域、HBV の PreS/S 領域に注目して deep sequence 解析を行い、これらのウイルスが単一の宿主内で顕著な quasispecies を形成すること、さらにこの quasispecies が病態の進行や肝発癌と密接に関連することを明らかにしつつある。

共同研究者氏名

榎本信幸

山梨大学医学工学総合研究部 教授

A. 研究背景・目的

C 型肝炎、B 型肝炎は肝発癌のハイリスクとなるが、HCV、HBV 両ウイルスゲノムに対して我々は全長ダイレクトシーケンシング解析システムを構築し、各種病像に対応する両ウイルス全ゲノムの多様性の網羅的解析を行ってきた。

我々の最終的な目的はこれらの結果から得られた重要なウイルス遺伝子配列をリバーシジェネティクを用いてウイルスに導入し、キメラマウスに感染させることにより肝炎の病態を明らかとし、治療法に結び付けることにあるが、これまでの結果から、HCV においてはコア領域、HBV に関しては PreS/S 領域に発癌と関連する領域が存在することが考えられた。そこで昨年度から次世代シーケンサーシステムを導入、さらなる詳細な検討を行ってきた。昨年は特に HCV のコア領域に

注目した解析を行い、hot spot であるコア 70 番アミノ酸の quasispecies が肝発癌と密接に関連することを報告してきた。本年度は、HCV コアのさらなる解析を行うとともに、HBV の PreS/S 領域の quasispecies と肝病態をさらに明らかとすることを目的として検討を行った。

B. 研究方法（2012 年度）

(1) Hot spot である HCV コア 70 番アミノ酸における野生型と変異型が大きく（5%以上）混在する 9 症例において、70 番アミノ酸残基と、コア全域配列がどのように関連するのか、系統樹を用いて検討した。

(2) 病態の大きく異なる HBV 感染患者（inactive carrier 12 症例 vs. HCC 12 症例）において、PreS/S 領域を次世代シーケンサーによって deep sequence を行い、肝病態との関連を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は山梨大学における倫理委員会の

承認を得て行われた。

C. 研究成果

(1) コア 70 番アミノ酸残基を含むコア全体配列の系統樹解析により、一人の患者に多数存在する HCV クローンは 70 番アミノ酸残基(野生型か変異型か)によって大きく 2 群に分別されることが示された。すなわちコア領域全体の配列はコア 70 番の配列に強く関連することが明らかとなった。

(2) Inactive carrier 12 症例と HCC12 症例における PreS/S 領域を次世代シーケンシングによって詳細に検討すると、特に PreS2 の大きな欠失と PreS2 の開始コドンの quasispecies に顕著な違いが認められ、inactive carrier においては、殆ど認められなかったのに比して HCC 症例では多数例においてこれらの変異や欠失の population が有意に多かった。またこれらの HBs 抗原量は PreS/S 領域の変異が多くなるにつれて、低下する傾向を示した。

D. 考察

HCVにおいてHCVコア70番は70番以外のコア領域の遺伝子配列ともリンクしていた。コア70番は肝癌を含む病態と関連するが、本検討からは同一宿主内において70番変異とリンクする全く別のHCVハプロタイプが混在する可能性も否定できず、さらなる検討が必要と考えられた。

HBVにおいてはPreS/S領域における変異・欠失のquasispecies population

と肝病態、HBs抗原量が密接に関連していることが考えられた。

E. 結論

肝発癌・肝病態の進行にはHCVにおいては core aa70、HBVにおいては preS/S 領域が密接に関連していることが次世代シーケンサーによって明らかになった。宿主情報を含むさらなる検討を行うことにより、病態進行と発癌の機序と治療ターゲットが明らかになる可能性が考えられた。

F. 研究発表論文発表 1. 論文発表

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.

The serum RANTES level influences the response to

pegylated-interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C.

Hepatol Res. 2012, in press.

2) Sueki R, Maekawa S, Miura M, Kadokura M, Komase K, Shindo H, Kanayama A, Ohmori T, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N.

Correlation between pretreatment viral sequences and the emergence of

- lamivudine resistance in hepatitis B virus infection.
J Med Virol. 2012 Sep;84(9):1360-8.
- 3) Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K.
Inhibition of Both Protease and Helicase Activities of Hepatitis C Virus NS3 by an Ethyl Acetate Extract of Marine Sponge Amphimedon sp.
PLoS One. 2012;7(11):e48685.
- 4) Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.
IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication.
J Viral Hepatitis. 2012, in press.
- 5) Maekawa S, Sakamoto M, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Komatsu N, Shindo K, Kanayama A, Ohmori T, Amemiya F, Takano S, Yamaguchi T, Nakayama Y, Kitamura T, Inoue T, Okada S, Enomoto N.
Comprehensive analysis for viral elements and IL28B polymorphisms in response to peginterferon plus ribavirin therapy in hcv-1b infection.
Hepatology. 2012 May 10.
- 6) Yamashita A, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K.
Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star Alloeocomatella polycladia.
Mar Drugs. 2012 Apr;10(4):744-61.
- 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。

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス制御に関する研究
分担研究報告書（平成24年度）

HCV 感染における遺伝子多型の意義

研究分担者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨： HCV の慢性感染に伴う末期肝硬変や肝細胞癌に対して肝臓移植が広く行われているが、肝移植後再発肝炎は難治性であり再感染機構の解明が望まれている。本研究は、新しいドナーグラフトへの感染における、HCV の遺伝子多型 (Quasispecies) の役割を解明することを目的とした。HCV の実験室株 (HCVcc) を Huh7.5.1 細胞と Hep3B/miR-122 細胞で継代して作製した HCVcc/Huh7 と HCVcc/Hep3B は、特徴的な遺伝子多型を保持しており、HCVcc/Huh7 は Huh7.5.1 細胞に、また、HCVcc/Hep3B は Hep3B/miR-122 細胞に高い感受性を示した。また、Huh7.5.1 細胞に感染する前後での HCVcc/Hep3B の遺伝子配列を評価したところ、細胞に馴化する過程で特異的な変異が同定された。以上の成績から、HCV の遺伝子多型は細胞親和性に関与しており、ドナーグラフトへの感染にも重要な役割を演じている可能性が示唆された。

A. 研究目的

HCV に感染すると高率に慢性化し、肝硬変を経て肝細胞癌を発症する。ペグ化 IFN とリバビリンの併用により治療効果に改善が認められているが、末期肝硬変や切除不能な肝臓に対する治療法は肝移植のみである。肝移植後再発 C 型肝炎は難治性であり、HCV の再感染機構の解明が急務である。我々はこれまでに、肝臓特異的な miR-122 を発現させた Hep3B 細胞が Huh7 細胞と同程度に、遺伝子型 2 型 (JFH1 株) の実験室株である HCVcc に高い感受性を示すことを明らかにしている。本研究は、Huh7.5.1 細胞と Hep3B/miR-122 細胞を用いて、HCV の細胞特異性における遺伝子多型の意義を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

In vitro 合成した JFH1 株由来の全長 RNA を、Huh7.5.1 細胞と Hep3B/miR-122 細胞に導入して継代することにより、それぞれの細胞に馴化した高力価のウイルス、HCVcc/Huh7 と HCVcc/Hep3B を作製し、それらの遺伝子変異を解析した。また、HCVcc/Huh7 と HCVcc/Hep3B の細胞親和

性を評価した。さらに、HCVcc/Hep3B を Huh7.5.1 細胞に感染させて、HCV ゲノムの変化の様子を次世代シーケンサーで解析した。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報に厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

HCV-RNA を導入後、Huh7.5.1 細胞では 18 日後に、Hep3B/miR-122 細胞では 55 日後に 10^5 FFU/ml を超える力価の感染性粒子が産生された。Huh7.5.1 細胞と Hep3B/miR-122 細胞で継代して作製した HCVcc/Huh7 と HCVcc/Hep3B には、それぞれ独立した獲得変異が同定された。HCVcc/Huh7 は Huh7.5.1 細胞に、HCVcc/Hep3B は Hep3B/miR-122 細胞に高い感染性を示した。また、Huh7.5.1 細胞

に感染する前後での HCVcc/Hep3B の遺伝子配列を評価したところ、細胞に馴化する過程で特異的な変異が同定された。

D. 考察

肝移植時のドナーグラフトへの HCV 感染に関与する遺伝子多型の役割を Huh7.5.1 細胞と Hep3B/miR-122 細胞で検討した。In vitro の系でも、HCV が高い感染性を得るためには遺伝子多型が重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、異なったドナー由来のヒト肝細胞キメラマウスを用いて、in vivo での HCV 感染における遺伝子多型の意義を解析していく予定である。

E. 結論

HCV の遺伝子多型は移植時のドナーグラフトへの感染に重要な役割を演じている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, and Matsuura Y. Expression of miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with HCV. *J. Virol.*, 2012, 86, 7918-7933.
- 2 Abe T, Fukuhara T, Wen X, Ninomiya A, Moriishi K, Maehara Y, Takeuchi O, Kawai T, Akira S, and Matsuura Y. CD44 participates in the IP-10 induction in cells replicating HCV RNA through an interaction with TLR2 and hyaluronan. *J. Virol.*, 2012, 86, 6159-6170.
- 3 Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. *J. Virol.* 2012, 86, 1382-1393.
- 4 Fukuhara T, and Matsuura Y. Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV

infection. *J. Gastroenterol.*, 2012, doi:10.1007/s00535-012-0661-5.

- 5 Moriishi K, and Matsuura Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.*, 2012, 3, 54, doi:10.3389/fmicb.2012.00054.
- 6 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*, 2012, 432, 29-38.
- 7 Kobayashi F, Yamada S, Taguwa S, Kataoka C, Naito S, Hama Y, Tani H, Matsuura Y, and Sugahara K. Specific interaction of the envelope glycoproteins E1 and E2 with liver heparan sulfate involved in the tissue tropism infection by hepatitis C virus. *Glycoconj. J.*, 2012, 29, 211-220.
- 8 Tripathi L.P, Kambara H, Moriishi K, Morita E, Abe T, Mori Y, Chen Y.A, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28 γ Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study. *J. Proteome Res.*, 2012, 11, 3664-3679.
- 9 Kondo M, Moriishi K, Wada H, Noda T, Marubashi S, Wakasa K, Matsuura Y, Doki Y, Mori M, and Nagano H. Upregulation of nuclear PA28 γ expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Exp. Ther. Med.*, 2012, 3, 379-385.
- 10 Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, and Takehara T. Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology*, 2013 (in press).

2. 学会発表

- 1 松浦善治、C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関与する宿主因子第 132 回日本薬学会年会、札幌、3 月 28-30 日、2012

- 2 Yoshiharu Matsuura, Expression of miR122 and lipid metabolism determine the cell tropism of hepatitis C virus, 7th International Virus Assembly Symposium, Menorca, May, 13-17, 2012.
- 3 松浦善治、C型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略～HCVの増殖を制御する宿主側因子について～: 第48回日本肝臓学会総会、金沢、6月7-8日, 2012
- 4 Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Yoshiharu Matsuura, miR122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of hepatitis C virus infection. The American Society for Virology, 31st Annual Meeting, University of Wisconsin-Madison, Madison, July 21-25, 2012.
- 5 Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of mouse liver cell lines susceptible to hepatitis C virus infection, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
- 6 Mai Shiokawa, Takasuke Fukuhara, Chikako Ono, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of human liver-specific factors in a complete propagation of hepatitis C virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
- 7 Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
- 8 Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Masaru Arimoto, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura. miR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of HCV infection. 19th International Meeting on HCV and Related Viruses, Venice, October, 5-9, 2012.
- 9 Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus, The 34th Naito Conference, 札幌, 10月16日-19日, 2012
- 10 Yoshiharu Matsuura: Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, The 34th Naito Conference, 札幌, 10月16日-19日, 2012
- 11 塩川 舞、福原崇介、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生に参与するヒト肝臓特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
- 12 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本 徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臓細胞株の樹立、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
- 13 福原崇介、塩川 舞、小野慎子、山本聡美、寒原裕登、加藤大志、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、C型肝炎ウイルスの細胞親和性はmiR-122の発現と脂質代謝系によって規定される、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
- 14 加藤大志、岡本 徹、福原崇介、寒原裕登、森田英嗣、森 嘉生、神谷 亘、松浦善治、日本脳炎ウイルスコアタンパク質による Stress Granule 抑制機構の解析、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
- 15 松田麻未、鈴木亮介、渡士幸一、相崎英樹、松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの一過性感染性粒子を用いた細胞内侵入機構の解析、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
- 16 Yoshiharu Matsuura, miR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of hepatitis C virus infection: The 10th JSH Single Topic Conference, 東京, 11月21-22日, 2012.

- 17 塩川 舞、福原崇介、小野慎子、岡本 徹、
松浦善治、C 型肝炎ウイルスの粒子産生
に關与するヒト肝臓特異因子の解析と
新規感受性細胞株の樹立、第 35 回日本
分子生物学会年会、福岡、12 月 11 日-14
日, 2012
- 18 福原崇介、本村貴志、塩川 舞、小野慎
子、寒原裕登、岡本 徹、調 憲、前原
喜彦、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの細
胞親和性における Quasispecies の意義、
第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、
12 月 11 日-14 日, 2012
- 19 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本 徹、
松浦善治、C 型肝炎ウイルスに感受性を
示すマウス肝臓細胞株の樹立、第 35 回
日本分子生物学会年会、福岡、12 月 11
日-14 日, 2012
- 20 葛西宏威、河上國洋、平田有佳理、山下
篤哉、池田正徳、加藤宣之、岡本 徹、
松浦善治、楠木正己、森石恆司、HCV 複
製に關わる新規宿主因子 FKBP6 : FKBP6
は NS5A と結合し HCV 複製を制御する、
第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、
12 月 11 日-14 日, 2012

H. 知的所有權の出願・登録状況
特になし。

C型肝炎肝移植におけるIL-28B SNP解析と肝および末梢血NK細胞評価

研究分担者 大段秀樹 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨 C型ウイルス（HCV）性肝硬変は肝移植の最も頻度の高い適応疾患の一つである。我々は、肝臓内Natural killer（NK）細胞がIFN- γ を介して抗HCV抑制に働くことを証明し、ドナー肝NK細胞を活性化させ移入する養子療法を臨床導入して、術後ウイルス量の減少を得た。しかし、NK療法後の抗HCV効果には個人差があることが分かった。そこで、本研究では、肝臓移植におけるHCVウイルス動態とIL28 SNP、肝臓内NK細胞機能の関与を解析し、移植後のHCV再感染抑制には、レシピエントのIL28 SNPとドナーの肝臓内NK細胞フェノタイプが関わることを確認した。

A. 研究目的

C型ウイルス（HCV）性肝硬変は、高率に肝臓癌（HCC）へ移行し、現在のところ肝移植が唯一の適応となる。現在、肝臓移植の原疾患の約50%はHCV性肝硬変が占めている。しかしながら、術後HCVウイルスの再感染は必発であり、高率に肝硬変へ移行することが問題となっている。

我々は、Natural Killer(NK)細胞は、肝臓内に豊富に存在し、腫瘍細胞に対する傷害能やIFN産生能が高いことを確認し、HCV合併HCCでの肝移植症例に対し、NK細胞を活性化させ移入する養子療法を臨床導入し、癌再発の有意な低下とウイルス量の減少を得た。しかし、NK療法後の抗HCV効果には個人差がある。IL-28B SNPは、インターフェロン治療効果に関与している事が知られている。本研究では、肝臓移植レシピエントのNK療法の効果にレシピエントのIL-28B SNPが関与しているか否かを解析した。

また、肝臓内に豊富に存在するNK細胞の存在比率および機能が移植後のHCVウイルス感染抑制に寄与するか否かを確認するため、肝移植のレシピエントおよびドナーの肝内NK細胞の表面マーカーの検索を行い、肝障害度との関連性を検討し、さらに術後のHCVウイルス量の変化との関係を解析した。

B. 研究方法

1. 肝臓移植レシピエントのIL28/SNPと術後血清HCVウイルス量の解析

2006年1月から2012年9月までに広島大学病院で施行したC型肝炎を原疾患とし同意の得られた37例の肝移植症例レシピエントを対象とした。このうち、NK療法施行群は14例、コントロール症例（NK療法非施行群）23例であった。術後の血清中HCV-RNA量の推移とIL28SNP変異の関係を解析した。

2. 肝臓内NK細胞フェノタイプ解析

広島大学病院で施行したC型肝硬変を原疾患とし同意の得られた肝移植症例を対象とした。レシピエント13例、健常人コントロールとしてドナー9例を対象に肝臓内リンパ球として摘出肝の臓器灌流液、および、末梢血中のNK細胞を中心とするリンパ球関連マーカーをフローサイトメトリーで解析し、肝予備能とNK細胞表面分子の関連について検討を行った。肝予備能はChild-Pughを用いて比較的良好なA、B群と予備能が低下したC群の2群に分類した。また、肝移植術後の血清中HCV-RNA量の推移との関連性について解析した。

C. 研究結果

1. 肝臓移植レシピエントのIL28/SNPと術後血清HCVウイルス量の解析

広島大学病院で施行した、肝移植後活性化NK細胞療法を実施し、術後のHCVの抑制効果について報告している。しかし、NK療法後の抗HCV効果には個人差がある。IL-28B SNPは、インターフェロン治療効果に関与している事が知られている。NK細胞療法の抗HCV効果はNK細胞が産生するIFN-gが主体であり、NK療法の効果にレシピエントのIL-28B SNPが関与しているか否かを解析した。その結果、NK療法を行っていない群では、肝移植後の血清HCV-RNA値の推移において、TTグループがTG/GGにくらべやや低い傾向にあった(図1)。NK療法実施群では、TT群で有意に術後のウイルス量が抑制されていることがわかった。さらに、TT症例8例のうち、3例に術後ウイルスの消失を認めしたが、TG/GG群では消失症例は認めなかった(図2)。以上のことから、宿主で

あるレシピエントのIL-28B SNPの違いによってNK細胞療法の効果に違いがある可能性が示唆された。

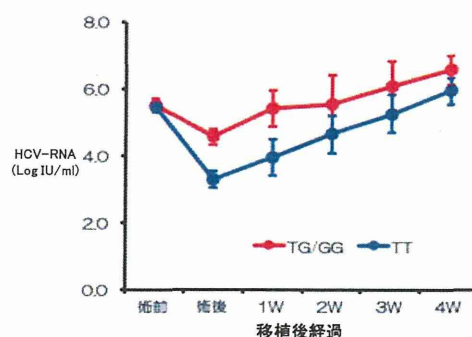


図1. 肝移植術後HCV-RNA値の経時推移 (NK療法非施行群、TG/GG vs TT)

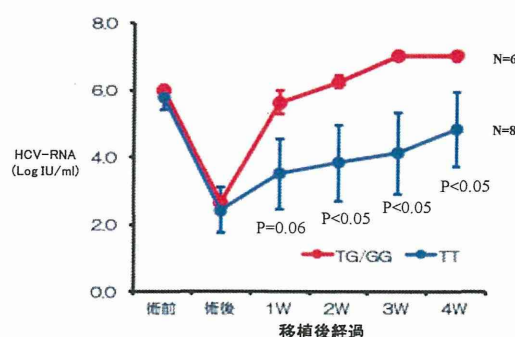


図2. 肝移植術後HCV-RNA値の経時推移 (NK療法施行群、TG/GG vs TT)

2. 肝臓内NK細胞フェノタイプ解析

レシピエントおよびドナーの末梢血と肝灌流液中のリンパ球解析はフローサイトメトリーで実施した。項目は、Natural Killer細胞の表面抗原(CD3, CD56)とともに活性化因子(NKp30, 44, 46, NKG2D)、抑制性因子(CD158a, CD158b)、アポトーシス誘導抗原(Fas L, TRAIL)、IL-2レセプター抗原(CD25, CD122)等の表出について評価した。その結果、末梢血NK細胞では、レシピエントとドナー間で有意な差は認めなかったが、肝内NK細胞において、肝局在NK細胞の活性化因子であるNKp46とNKG2Dの表出が、健常人であるドナーにくらべ低下しており、またレシピエントの肝予備能の低下に伴って減少することを確認した。さら

に、ドナー肝のNKp46の発現強度を強発現と低発現群に分類し、肝移植後のレシピエントの血清中HCV-RNA量との相関を確認すると、NKp46強発現では術後1週間目にHCVウイルス量は抑制されていたのに対し、低発現群では術前値もしくはそれ以上の値であり有意差をみとめた。しかしながら、この差は術後経過とともに消失していることから、ドナー肝のNKp46の強発現は肝移植術後早期（1週間以内）に起こるウイルスのreplicationの抑制能があることを示唆した（図3）。

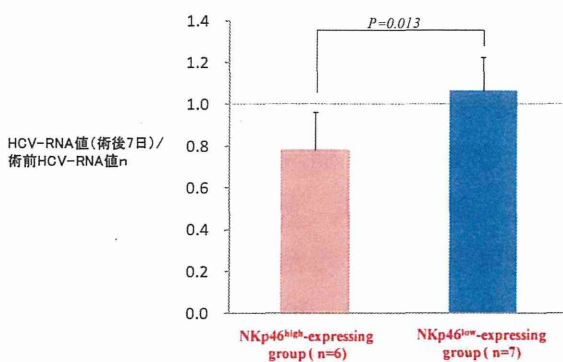


図3. ドナー肝グラフト内のNKp46発現は術後早期のHCVウイルス再感染に影響する可能性がある

D. 考察

肝移植後には免疫抑制療法のため獲得免疫である T/B 細胞応答性が抑制される。自然免疫細胞であるマクロファージ、DC、NK 細胞はウイルス、細菌や腫瘍に対して活性を有しており、免疫抑制剤の影響を受けにくいとされている。とくに NK 細胞は、腫瘍細胞に対する傷害能や IFN 産生能が高い。しかし、肝硬変・肝臓がんの患者では NK 細胞の数・活性ともに低下していることが報告されている。そこで、我々は、活性化 NK 細胞をレシピエントに移入することで、“宿主の免疫能を低下させない制癌、抗ウイルス療法”を確立し、臨床導入している。これまでの NK 療法実施群の中で、C

型肝炎合併症例における術後のウイルス量を解析すると肝移植後活性化リンパ球移入療法の実施によって、非移入群に比べ、術後の HCV-RNA の低下を示すことがわかったが、一方でその効果には個人差があることも判明した。すなわちレシピエントの IL-28B SNP による HCV 再感染抑制効果との関与を見出した。今後は、ドナーの IL-28B SNP の関与についても検討を行う予定である。

また、肝移植術後のウイルス再感染において肝臓内の NK 細胞の関与を解析したが、肝臓移植レシピエントの NK 細胞の活性化は肝障害度に従って低下していることが分かった。またグラフト肝内の NK 細胞の NKp46 の表出強度が移植後の HCV 増幅と深く関わることを判明した。今後 NKp46 を介した抗 HCV 機構を解明したい。

E. 結論

肝臓移植後のレシピエントの HCV 再感染およびその抑制には、レシピエントの IL28 SNP とドナーの肝臓内 NK 細胞の機能が関与している。グラフト肝内の NK 細胞の NKp46 の表出強度が移植後の HCV 増幅と深く関わる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwako H, Tashiro H, Amano H, Tanimoto Y, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Nambu J, Mikuriya Y, Abe T, Ohdan H. Prognostic significance of antithrombin III levels for outcomes in patients with hepatocellular carcinoma after