

Funaki M, Takabatake R, Lemon SM, and
Kaneko S. Acyclic Retinoid,
Peretinoin, Inhibits Hepatitis C
Virus Replication in Cell Culture,
The 64rd AASLD2013, ワシントンDC,
2013年11月

- 2) Shirasaki T, Honda M, Shimakami T,
Murai K, Shiimoto T, Okada H,
Takabatake R, Lemon SM, Murakami S,
Kaneko S. Impaired IFN signaling in
chronic hepatitis C with advanced
fibrosis via the TGF- β signaling
pathway. The 64th AASLD 2013, ワシ
ントンDC, 2013年11月

G. 所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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）
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 25 年度）

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、
リバーシ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_{A2} (TXA₂) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤 Ozagrel 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 TXAS 阻害剤の抗 HCV 効果の分子機構の解明、また TXAS 阻害剤を投与したヒト肝細胞キメラマウスにおいて感染した HCV の感染伝播が回復していく現象が認められたのでその原因追及を目指した。JFH1 感染性粒子産生系において TXA₂ 受容体 (TP) アゴニストとアンタゴニストの効果を検証したところ、双方とも全く効果を示さなかった。また、キメラマウスの肝細胞や JFH1 感染性粒子産生系で用いられている HuH-7 細胞における、TP の発現について検討したところ、これらの細胞では TP の発現がないことがわかった。このことから TXAS による感染性 HCV 産生の促進は TP を介さない未知の経路が関与していることがわかった。HCV の感染伝播が観察される Ozagrel 処理キメラマウスの血清を感染源として用いておこなった二次感染実験において、Ozagrel 処理をおこなった場合には、その感染伝播は抑制されなかった。このことから Ozagrel に対する抵抗性 HCV の出現が示唆された。以上の結果から、今後 TXAS による感染性 HCV 産生機構の解明による新規抗 HCV 薬剤標的の同定ならびに Ozagrel の至適投与量や他抗 HCV 薬との併用の検討をおこなう必要があると考えられた。

A. 研究目的

前年度までに、トロンボキサン A₂ (TXA₂) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤 Ozagrel 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。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。今年度は TXAS 阻害剤の抗 HCV 効果の分子機構の解明、また TXAS 阻害剤を投与したヒト肝細胞キメラマウスにおいて感染した HCV の感染伝播が回復していく現象が認められたのでその原因追及を目指した。

B. 研究方法

1. JFH1 感染性粒子産生系を用いて以下の点について解析した。
 - i. TXAS の基質であるプロスタグランジン H 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. TP アンタゴニストで組換え体 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。
 - iii. TXAS 阻害剤存在下において TP アゴニストで組換え体 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。
 - iv. 組換え体 HCV 産生細胞とヒト肝細胞キメラマウスの肝臓における TP 遺伝子の発

現をそれぞれの総 RNA を用いた RT-PCR 法によって解析した。

2. 患者血清を用いて HCV を感染させたヒト肝細胞キメラマウスに、Ozagrel を投与した。その一ヶ月間後に採血し、得た血清を用いて、血清中の HCV を新たに未処理キメラマウスに感染させて、Ozagrel を投与した。Ozagrel を投与、あるいは未投与のマウスから、それぞれ一ヶ月間後に採血し、血清中の HCV ゲノム量を定量 RT-PCR によって測定した。

また、それぞれの血清中の HCVRNA ゲノムをサブクローン化し、その部分核酸配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いられているか不活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。不活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の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。また、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた実験はすべて広島大学において、広島大学の倫理委員会の承認のもとで実施されている。

C. 研究結果

1. 組換え体 HCV 産生細胞を TXAS の基質であるプロスタグランジン H で処理し、TXAS の活性を上昇させ、その細胞から産生される HCV 粒子の感染性を検討したところ、対照実験に比較して有為に感染性粒子の量が上昇していた。

2. 組換え体 HCV 産生細胞において TXAS によって産生されることが想定される TXA₂ の受容体 TP の働きを阻害する TP アンタゴニストで組換え体 HCV 産生細胞を処理したところ、対照実験に比較して、産生された HCV 粒子量は変化しなかった。

3. TXAS 阻害剤によって TXAS からの TXA₂ 産生を抑制し、その代わりに TXA₂ 受容体 TP を活性化することができる TP アゴニストで組換え体 HCV 産生細胞を処

理した。その結果、細胞から産生された HCV 粒子の感染性は低下し、TP アゴニストは TXAS 阻害剤の効果を抑制できないことがわかった。

4. 組換え体 HCV 産生細胞とヒト肝細胞キメラマウスの肝臓では TP mRNA は全く検出することができなかった。

5. ヒト肝細胞キメラマウスに感染し、Ozagrel 投与下で少しずつ感染伝播していた HCV を二次的に新たなキメラマウスに感染させた。このマウスを再び Ozagrel で処理しても、Ozagrel による感染伝播抑制効果は認められなかった。

6. 5. において Ozagrel 抵抗性を示した HCV ゲノム塩基配列の一部について決定し、感受性を持つ HCV のものと比較した結果、複数のアミノ酸配列の変異を伴う塩基変異が認められた。

D. 考察

1. これまでに TXAS 阻害剤によって感染性 HCV 産生が抑制されることがわかってきたが、TXAS がどのようにその現象と関わっているのかは不明であった。前年度の研究から、TXAS の既知基質である PGH を加える事で感染性 HCV 産生が上昇することがわかった。このことは TXAS 活性により産生される TXA₂ が感染性 HCV 産生に関わるメディエーターである可能性を強く示唆した。TXA₂ は通常細胞表面上に存在する受容体分子 TP を介してそのシグナルと細胞内に伝えることが知られている。しかしながら、今年度の研究から、TP アゴニストやアンタゴニストは全く感染性 HCV 産生には影響しない事、そしてキメラマウスや感染性 HCV 産生細胞では TP 分子が産生されていないことがわかり、この感染性 HCV 産生に対する TXAS の機能は TP に依存しないものであることがわかった。また、このことは、ヒト肝細胞において TXA₂ は既知の TP を介したシグナル系以外のメカニズムで細胞にシグナルを伝える可能性が考えられた。

2. 患者血由来 HCV を感染させたヒト肝細胞

胞キメラマウスに TXAS 阻害剤 Ozagrel を投与した時に、マウス血清中に増加してくる HCV には、感染性 HCV が含まれていることがわかり、その HCV には Ozagrel 抵抗性の変異型 HCV が含まれている可能性が考えられた。

E. 結論

感染性 HCV 産生における TXAS の機能はまだ不明であるが、TXAS によって産生される TXA₂ がその機能に重要であり、未知のシグナル系が関与していることがわかった。この未知のシグナル系を明らかにすることで、より特異性の高い抗 HCV 薬の標的分子を見出すことが可能であると考えられた。Ozagrel 投与ヒト肝細胞キメラマウスにおける抵抗性 HCV の出現から、この薬剤の至適投与量を検討する必要性と他の抗 HCV 薬剤との併用を検討する必要性が強く示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Abe Y., Aly H. H., Hiraga N., Imamura M., Wakita T., Shimotohno K., Chayama K., Hijikata M. Thromboxane A₂ Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers, *Gastroenterology*, 2013, 145, 658-667

2) Kuroki M., Ariumi Y., Hijikata M., Ikeda M., Dansako H., Wakita T., Shimotohno K., Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013, 430, 592-597

2. 学会発表

1) Yuichi Abe, Aly H. Hussein, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Takaji Wakita,

Kunitada Shimotohno, Kazuaki Chayama, Makoto Hijikata: Thromboxane A₂ Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus. 20th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, Oct 6-10, 2013

2) Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Type I and type III interferon play anti-viral roles cooperatively in human hepatocytes to prevent early infection spread of viruses. 20th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, Oct 6-10, 2013

3) 阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、平賀伸彦、今村道雄、脇田隆字、下遠野邦忠、茶山一彰、土方 誠：トロンボキサン A₂ 合成酵素は感染性 HCV 粒子形成を制御する、第 9 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、平成 25 年 6 月 29 日、広島、2013 年

4) 土方 誠、”C 型肝炎治療薬の新たな分子標的の探索” 第 13 回肝疾患フォーラム 学術集会、2013 年 11 月 9 日 レルミエール、大阪

5) 津川陽司、加藤博己、藤田尚志、下遠野邦忠、土方誠：ヒト肝細胞の抗ウイルス初期応答において I 型および III 型インターフェロンは協調的に作用する、第 61 回日本ウイルス学会学術集会 平成 25 年 11 月 10-12 日、神戸 2013 年

6) 阿部雄一、長谷川輝、アリ・ハッサン・フセイン、平賀伸彦、今村道雄、脇田隆字、下遠野邦忠、茶山一彰、土方 誠：トロンボキサン A₂ 合成酵素は C 型肝炎ウイルスの

感染性粒子形成を制御する、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸 2013 年 12 月 3-6 日

7) 赤堀祐一、岡村瞳、久島透嘉・土方 誠：
C 型肝炎ウイルス感染検出培養細胞系の開発、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸 2013 年 12 月 3-6 日

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 特許登録：山口達哉、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人、下遠野邦忠、土方 誠、肝炎ウイルスの増殖方法、及びその利用、特許第 5327793 号、登録日：平成 25 年 8 月 2 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

1) 特許出願：山口達哉、土方 誠、臍臓由来体性幹細胞の製造方法、

PCT/JP2013/074026、出願日 2013/09/06

2) 特許出願：山口達哉、土方 誠、腎臓由来体性幹細胞の製造方法、

PCT/JP2013/074028、出願日 2013/09/06

3) 特許出願：山口達哉、土方 誠、腸上皮由来体性幹細胞の製造方法、

PCT/JP2013/074032、出願日 2013/09/06

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）

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

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

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 これまでの検討においてインターフェロン- 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。また、一過性にIFN- γ を発現するpDNAを用いた場合の抗HCV効果を予備的に評価した結果、弱い抗HCV効果が得られる可能性を見出していた。そこで、HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスの個体数を増やし、一過性IFN- γ 発現の意義を検討した。その結果、一過性発現を示すベクターを投与した4匹中1匹において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が、リバウンド現象が認められた。また、残りの3個体においては投与後初期に血清中HCV RNA量が多少は減少する傾向が見られたものの、抗HCV効果はほとんど観察されなかった。持続的なIFN- γ 発現による肝障害の可能性について検討するために、血清中ALTのレベルについて経時的に測定したところ、投与後初期に一過性に上昇する傾向が認められたが観察終了時にはALTはもとのレベルに回復していた。また、投与後初期および観察終了時のマウスの肝臓切片を観察したところ、肝細胞へ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って安全かつ有効なHCV治療が可能となることを示すものと考えられる。

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であるpCpG-IFN- γ をハイドロダイナミクス法により投与することで、持続的なIFN- γ の遺伝子発現が得られるとともに、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。また、その効果発現におけるIFN- γ の遺伝子発現の持続性の意義について検討するために、予備的に一過性のIFN- γ 発現を

示す短期発現型のIFN- γ 発現pDNA、pCMV-IFN- γ をHCV感染キメラマウスに遺伝子導入することで、弱いながらも抗HCV効果が得られる可能性を報告していた。そこで本研究では短期発現型IFN- γ 発現pDNAの投与群、およびネガティブコントロールとして生理活性を持たないレポータータンパク質である *Gaussia luciferase* (gLuc)をコードしたpDNA、pCpG-gLucの投

与群の検体数を増やし、IFN- γ 遺伝子治療の有効性についてより詳細に評価するとともに、その発現の持続性が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、持続的なIFN- γ 遺伝子発現による肝臓への傷害が懸念されたことから、pCpG-IFN- γ を投与された個体において経時的に血中のALT活性を測定することで肝傷害性について評価した。併せて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 遺伝子発現が肝臓に与える障害の有無についてより詳細に評価した。

B. 研究方法

pDNA: IFN- γ 発現pDNAとして、pCpG-IFN- γ およびpCMV-IFN- γ を用いた。別途gLucを発現するpDNA、pCpG-gLuc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。血中のgLuc量は、ルシフェラーゼアッセイにより測定した。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。血清中ALT活性の評価: pCpG-IFN- γ を遺伝子導

入したマウスについて、遺伝子投与後、経時的に採血を行った後、和光純薬社のキットを用いてALT活性を測定した。肝臓の組織学的観察: pCpG-IFN- γ を遺伝子導入したマウスについて、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後、顕微鏡観察を行った。

C. 研究結果

これまでに、持続的なIFN- γ 遺伝子発現が得られるベクターであるpCpG-IFN- γ の投与によって抗HCV効果が得られることを報告している。そこで、比較対象としてpCpG-gLucを計4匹のHCV感染キメラマウスに投与したところ、投与した全個体で投与から8週間後まで持続的に血清中gLuc活性が得られた。また、pCpG-gLucの投与によっては血中HCVレベルは変動しなかった。

HCV感染キメラマウスに対して短期発現型IFN- γ 発現pDNAであるpCMV-IFN- γ を投与することで抗HCV効果が得られる可能性をこれまでに報告していた。そこで本研究では検体数を増やしてIFN- γ 発現の持続性が抗HCV効果に及ぼす影響についてさらに検討した。その結果、pCMV-IFN- γ の遺伝子導入を行った計4匹の個体のうち、治療開始前の血中HCVレベルが最も低かった個体において、血中HCV RNA量の減少が認められ、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 RNAが検出されるようになった。また同個体から治療開始70日後に回収した肝臓中か

らもHCV RNAが検出された。他の3個体においては投与後早期から一過性に血中IFN- γ 濃度が得られたものの、血中HCVレベルの低下はほとんど認められなかった。

pCpG-IFN- γ を遺伝子導入したマウスについて、経時的に血中のALT量を測定することで、肝障害を評価した。その結果、6匹中5匹において遺伝子投与3日後から7日後にかけて、血中ALTレベルが上昇したが、遺伝子導入から4週間後にはもとのレベルに回復していた。また、血中ALTレベルが上昇していた遺伝子導入3日後および経過観察を終了した導入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、肝臓における傷害性の有無を判定した。その結果、両時点においてヒト由来肝細胞、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。

D. 考察

本研究ではこれまでに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ていたが、今回は短期発現型IFN- γ およびレポータータンパク質発現pDNA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 の治療効果についてより厳密に検証した。

その結果、短期IFN- γ 発現pDNAの投与によって、血中HCVウイルス量の少なかった個体においてのみ抗HCV効果が得られたが、IFN- γ 濃度が検出限界以下にまで低下した後にはリバウンド現象が見られたことから、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、生理活性を持たないレポータータンパク質であるgLucをコードしたpDNAの投与ではほとんど効果が得られなかったことから、IFN- γ 遺伝子導入により得られた抗HCV効果は、遺伝子導入の操作によるものではなく発現するIFN- γ によるものであることを確認した。

また、IFN- γ を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、血中のALTレベルの一過性の上昇が認められたが、時間経過とともに回復したことから、その程度は小さいものと考えられる。また、血中ALTレベルが上昇していたIFN- γ 遺伝子導入3日後の組織像を観察しても明確に肝傷害を示す像は得られなかったことから、肝障害の程度は非常に軽微であったものと考えられる。また、持続的にIFN- γ を作用させた、遺伝子導入8週間後の組織観察の結果からも明確な肝障害を示す像は得られなかった。これらの結果は、IFN- γ 遺伝子治療の安全性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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura Y. Long-term elimination of hepatitis C virus from human hepatocyte chimeric mice after interferon- γ gene transfer. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2013 in press
2. Uno S, Nishikawa M, Mohri K, Umeki Y, Matsuzaki N, Takahashi Y, Fujita H, Kadowaki N, Takakura Y. Efficient delivery of immunostimulatory DNA to mouse and human immune cells through the construction of polypod-like structured DNA. *Nanomedicine*. 2013 in press
3. Mukumoto H, Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, Takakura Y. Expression profile-dependent improvement of insulin sensitivity by gene delivery of interleukin-6 in a mouse model of type II diabetes. *Mol Pharm*. 2013. 10(10):3812-3821
4. Miyakawa N, Nishikawa M, Takahashi Y, Ando M, Misaka M, Watanabe Y, Takakura Y. Gene delivery of albumin binding peptide-interferon-gamma fusion protein with improved pharmacokinetic properties and sustained biological activity. *J Pharm Sci*. 2013. 102(9):3110-3118.

2. 学会発表

1. Watcharanurak K, Zang L, Nishikawa M, Yoshinaga K, Takahashi Y, Yamamoto Y, Saito K, Murakami Y, Takakura Y. “Upregulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 by interferon γ gene transfer and its effects on tumor growth in mice” 第29回 日本 DDS 学会、京都、2013年7月
2. 安藤満、高橋有己、西川元也、平賀信彦、今村道雄、茶山一彰、高倉喜信 “ヒト肝細胞キメラマウスを用いたインターフェロン γ 遺伝子導入による治療抵抗性慢性 C 型肝炎治療” 第29回 日本 DDS 学会、京都、2013年7月
3. Ando M, Takahashi Y, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura Y. “Long-term exposure of interferon γ overcame interferon α -resistance of hepatitis C in human hepatocyte chimeric mice” 5th Asian Arden Conference, Nagoya, Japan, August, 2013

H. 知的所有権の取得状況

特になし

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25年度)

次世代シーケンサーを用いた DAA 耐性 HCV の検討

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：近年多数開発されている DAA(Direct acting antiviral agents) は、従来の非特異的抗ウイルス剤であるインターフェロンと比して、C型肝炎ウイルス(HCV)に対する強い抗ウイルス効果が示されている。本検討では、プロテアーゼ阻害薬 telaprevir(TVR)、また NS5A 阻害剤 daclatasvir(DCV) において、DAA 耐性 HCV の臨床的意義を明らかにすることを目的として deep sequence による HCV quasispecies の検討を行った。TVR に関して、IFN に感受性が低い IL28B minor type で変異ウイルス出現率が高い傾向あり、十分な薬剤投与が得られないと治療不成功に終わる可能性があると考えられた。また non-SVR 症例の一部では耐性 HCV の優位な状態が長く持続しており次世代 DAA 治療に対する注意が必要であった。DCV に関しては Y93H の頻度が高いことが確認され、治療導入に際して留意すべきことが考えられた。

A. 研究背景・目的

近年多数開発されている DAA(Direct acting antiviral agents) は、従来の非特異的抗ウイルス剤であるインターフェロンと比して、C型肝炎ウイルス(HCV)に対する強い抗ウイルス効果が示されている。

一方で、一部の症例においては DAA 耐性 HCV が治療前から存在することが明らかになりつつあるが、これらが臨床的耐性にどのように関与するのか明らかとなっていない。さらに DAA 治療 non-SVR 症例において、non-SVR の原因となった DAA 耐性 HCV が宿主内でどのような動態を呈するのか、またこれら

が次々世代の DAA 製剤への臨床的耐性に関与するのか明らかになってはいない。

本検討では、既に上梓されているプロテアーゼ阻害薬 telaprevir(TVR)、また近い将来上梓されることが予想されている NS5A 阻害剤 daclatasvir(DCV) において、DAA 耐性 HCV の臨床的意義を明らかにすることを目的として deep sequence による HCV quasispecies の検討を行った。

B. 研究方法(2013年度)

(1)TVR を含む 3 剤併用療法(PEG-IFN/RBV/TVR)を施行した 21 症

例において、治療前と治療開始後 12 時間後の TVR 耐性 HCV について、NS3 領域における deep sequence を行い臨床因子との関連を検討した。

(2) NS5A 阻害剤 DCV 無治療症例 110 症例において、deep sequence を行い、DCV 耐性 HCV と関連する臨床的因子について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は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) TVR 治療開始前には僅かな耐性変異は殆どの症例に存在した (17/21, 81%) が、PEG-IFN/RBV/TVR 治療における SVR との明らかな関連は認めなかった。しかしながら治療 12 時間後に耐性変異はさらに増加し (20/21, 95%)、IL28TG/GG 症例において、耐性変異の増加をより強く認めた。

一方、non-SVR 症例の 5/8 (62.5%) において、治療終了時に既知の TVR 耐性変異が優位となっていることが観察され、また 5 例中 2 例は治療終了後 1 年経過しても TVR 耐性変異の優位な状態が持続していた。

(2) DCV 未治療の対象 110 症例において、DCV 耐性変異 Y93H は deep sequence にて 30.9% (34/110) の症例に存在した。Y93H 症例はインターフェロン感受性関連因子であるコア変異 ($p=0.03$)、IRRDR 変異数 ($p=0.01$)、IL28B SNP ($p=0.002$) と関連したが、特に IL28B SNP は Y93H 変異と独立して関連

していた。

D. 考察

TVR に関して、IFN に感受性が低い IL28B minor type で変異ウイルス出現率が高い傾向あり、十分な薬剤投与が得られないと治療不成功に終わる可能性があると考えられた。また non-SVR 症例の一部では耐性 HCV の優位な状態が長く持続しており次世代 DAA 治療に対する注意が必要であった。

また DCV に関しては Y93H の頻度が高いことが確認され、治療導入に際して留意すべきことが考えられた。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた Deep Sequence によって、わずかな DAA 耐性変異ウイルスを高感度に検出することが可能となった。今後、さまざまな DAA 製剤の登場が見込まれる状況において、Deep Sequence を用いた解析の重要性は高まっていく可能性が考えられた。

F. 研究発表論文発表

I. 論文発表

1. Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T, Ashihara Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T, Araki T, Enomoto N. Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoxetic acid-enhanced hepatocyte

- phase magnetic resonance imaging. *Hepatol Res.* 2014 Feb 14. [Epub ahead of print]
2. Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Shindo H, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, Moriishi K. Inhibitory effects of caffeic Acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus. *PLoS One.* 2013 Dec 17;8(12):e82299.
 3. Maekawa S, Enomoto N. Once-daily simeprevir in combination with pegylated-interferon and ribavirin: a new horizon in the era of direct-acting antiviral agent therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2014 Jan;49(1):163-4.
 4. Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. Deep-sequencing analysis of the association between the quasispecies nature of the hepatitis C virus core region and disease progression. *J Virol.* 2013 Dec;87(23):12541-51.
 5. 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 Hepat.* 2013 Apr;20(4):281-9.
 6. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N. Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2013 Mar;85(3):449-58.
 7. 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. Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 2013 Aug;43(8):865-75.
- H. 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）
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 25 年度）

HCV 感染の細胞特異性における Quasispecies の意義に関する検討

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： C 型肝炎ウイルス(HCV)の慢性感染に伴う末期肝硬変および肝細胞癌に対する治療と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、再感染機構を解明する必要がある。本研究は、新しいグラフトへの再感染における HCV の遺伝子多型 (Quasispecies)の意義を明らかにすることを目的とした。In vitro の感染系で、Huh7 に馴化した HCV (HCVcc/Huh7)と Hep3B に馴化したウイルス (HCVcc/Hep3B)を作製した。次世代シーケンスの結果、これらのウイルスは異なった Quasispecies を保持しており、異なる宿主細胞株に感染した際に、新たな Quasispecies が出現することが明らかになった。HCVcc/Huh7 は Huh7 細胞に対して、HCVcc/Hep3B は Hep3B/miR-122 細胞に対して高い感染性を示した。これらの成績から、Quasispecies は新しい宿主細胞に馴化するために重要な役割を果たしていることが示された。HCV の Quasispecies は移植時のドナーグラフトや新規感染における感染成立に重要な役割を担う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、プロテアーゼ阻害剤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 の再感染機構を明らかにする必要がある。我々は、miR-122 を強制発現させた Hep3B 細胞 (Hep3B/miR-122 細胞)が Huh7 細胞と同程度に、遺伝子型 2a の JFH1 株由来の HCV 実験室株 (HCVcc)に感受性を示すことを明らかにした。本研究では HCVcc が増幅可能な細胞株である Huh7 細胞と Hep3B/miR-122 細胞、さらに in vivo モデルとしてヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HCV の感染特異性の決定における、Quasispecies 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 で合成した JFH1 株由来の HCV RNA を Huh7.5.1 および Hep3B/miR-122 細

胞に導入し、それぞれの細胞でウイルスを継代し、それぞれの細胞に馴化した HCVcc/Huh7 と HCVcc/Hep3B の遺伝子変化を、次世代シーケンサーで解析するとともに、HCVcc/Huh7 と HCVcc/Hep3B の感染性を評価した。さらに、それらのウイルスを異なる細胞に感染させた際の Quasispecies の変化を解析した。また、HCVcc/Huh7 および HCVcc/Hep3B を 2 種類のドナー由来のヒト肝細胞キメラマウスに接種し、Quasispecies の変化を検討した。

(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、個人情報情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

In vitro で合成した 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 を超える感染性粒子が産生された。Huh7 に馴化したウイルス HCVcc/Huh7 と Hep3B に馴化したウイルス HCVcc/Hep3B にそれぞれ獲得変異が同定され、HCVcc/Huh7 は Huh7.5.1 細胞に、また、HCVcc/Hep3B は Hep3B/miR-122 細胞に高い感染性を示した。さらに、HCVcc/Hep3B と HCVcc/Huh7 を、それぞれ Huh7 細胞と Hep3B 細胞に再度馴化させたところ、新たな Quasispecies が出現した。出現した変異を導入した HCV RNA は細胞特異的な感染性の違いを認めなかったことから、細胞特異的な感染性には単一の変異ではなく、Quasispecies が重要な役割を演じていることが示唆された。また、HCVcc/Huh7 と HCVcc/Hep3B は 2 種類のドナー由来のヒト肝細胞キメラマウスに同等の感染性を示した。現在、Quasispecies の変化を解析中である。

D. 考察

HCV 感染における Quasispecies の役割を、Huh7 細胞と Hep3B/miR-122 細胞で検討した結果、HCV が細胞特異的に高い感染性を獲得するためには、Quasispecies が重要な役割を果たしていることが示された。また、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、in vivo での Quasispecies の変化を検討しており、In vivo における HCV の感染性における Quasispecies の意義をより詳細に明らかにすることができると考えられる。

E. 結論

HCV の Quasispecies は、肝移植時のドナーグラフトや新規の感染に重要な役割を担う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. Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J Virol* 2013;87:489-502
2. Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki T. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog* 2013;(doi: 10.1371/journal.ppat.1003589)
3. Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, Matsuura Y, Saitoh T, and Akira S. Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:12379-12384
4. 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;57:1705-1715
5. Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, Matsuura Y, Yamamoto M, and Takeda K. Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J Virol* 2013;87:9997-10003
6. Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Understanding the biological context of NS5A-host interactions in HCV infection: a network-based approach. *J Proteome Res* 2013;12:2537-2551

2. 学会発表

1. 岡本 徹、岡本貴世子、森 嘉生、福原 崇介、森石恆司、松浦善治、C型肝炎ウイルスコア蛋白質の膜内配列切断の生物学的意義、第86回日本生化学会シンポジウム「非常識なプロテアーゼ反応：膜内部でのタンパク質切断」、横浜、9月11-13日、2013
 2. Toru Okamoto, Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura. Co-chaperones involved in the replication of hepatitis C virus, Protein Homeostasis & Viral Infection: Mechanisms to Therapeutics, Bethesda, USA, September 18-19, 2013.
 3. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in HCV propagation. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop “Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma : molecular basis and clinical links” Marsala, Italy, October 20-21, 2013.
 4. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, Infectious Diseases in Elderly Symposium, Izmir, Turkey, October 25-29, 2013.
 5. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, The 3rd International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction and Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation, Tainan, Taiwan, November 16-17, 2013
 6. 松浦善治、C型肝炎ウイルスの複製と病原性発現に関与する宿主因子の解析と創薬の可能性、第42回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー、東京、12月9日、2013
 7. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Takashi Motomura, Mai Shiokawa, Chikako Ono, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. The American Society for Virology, 32nd Annual Meeting, University of Pennsylvania, University Park, July 20-24, 2013.
 8. Toru Okamoto, Yukari Sugiyama, Chikako Ono, Sayaka Aizawa, Pham Duc Ngoc, Takahisa Kohwaki, Eiji Hirooka, Takasuke Fukuhara, Masahiro Yamamoto, and Yoshiharu Matsuura, Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
 9. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Masami Wada, Chikako Ono, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
 10. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, and Yoshiharu Matsuura, Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
 11. 福原 崇介、塩川 舞、小野 慎子、山本 聡美、和田 真実、岡本 徹、野田 健司、吉森 保、松浦 善治、HCV感染により誘導されるオートファジーの性状、第61回日本ウイルス学会総会、神戸、11月10日-12日、2013
 12. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、山本聡美、和田真実、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、miR-122 ノックアウト Huh7 細胞における HCV 増殖、第61回日本ウイルス学会総会、神戸、11月10日-12日、2013
 13. 和田真実、福原崇介、山本聡美、塩川舞、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おける VLDL 関連タンパク質の役割、第61回日本ウイルス学会総会、神戸、11月10日-12日、2013
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

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25年度)

HCV制御に関わるNK細胞機能分子の解析

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型肝炎ウイルス (HCV) の感染抑制に働く自然免疫細胞Natural killer (NK) 細胞のフェノタイプ解析を肝移植ドナー/レシピエントの肝臓内単核球および末梢血単核球を用いて実施した。その結果、ドナーグラフト肝内在NK細胞のNKp46の発現強度には個体差があり、NKp46^{bright}細胞高含有率が肝移植後早期のHCV感染抑制に影響する可能性を確認した。本研究は、NK細胞のHCV複製抑制にNKp46^{bright}細胞が関与し、そのメカニズムはHCV感染細胞との接触によるIFN- γ 産生を介した増幅抑制であることを*in vitro HCV replicon assay system*を用いて明らかとした。

A. 研究目的

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。一方、自然免疫細胞であるマクロファージ、樹状細胞、Natural Killer(NK)細胞は、免疫抑制剤の影響を受けにくい。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、肝移植術後のHepatitis C virus(HCV)再感染における肝臓内のNK細胞の関与を解析した。その結果、肝移植レシピエントのNK細胞活性は肝障害度に従って低下していることが分かった。すなわち、NKp46とNKG2Dの表出が肝障害度に関連して低下していた。また、NKp46^{bright}細胞の含有率が高いドナーグラフト肝の移植を受けた患者の術後1週間における血中HCV-RNA値の抑制な低下を確認した。

本研究では、NK細胞のNKp46分子がHCV増幅抑制に関与するメカニズムを*in vitro HCV replicon assay system*を用いて解析した。

B. 研究方法

1. HCV replicon 細胞を用いたNK細胞によるHCV複製抑制効果解析

広島大学病院で施行し、同意を得られた肝移植ドナー9例の摘出肝の臓器灌流液に含まれる肝内単核球を用いた。NK細胞はNK cell isolation Kitを用い、磁気ソーティング法で分離した。NK細胞のHCV増幅抑制効果について、HCV replicon 保持肝細胞株(Huh-7)をTargetとして*in vitro replicon assay system*で評価した。E:T ratio=4:1、Recombinant human IL-2 (25IU/ml)の存在下で、肝内NK細胞とHCV replicon 保持肝細胞株を共培養し、48時間後のHCV replicon 細胞のルシフェラーゼ活性をルミ

ノメーターで測定した。また、培養上清中のサイトカインを CBA assay 法で測定した。

2. 肝内 NK 細胞の NKp46 分子の HCV 抑制能評価

昨年度の研究で、肝局在 NK 細胞の活性化因子である NKp46 表出強度は個体差に富むことを突き止めた。また、ドナー肝グラフト内の NKp46^{bright} 細胞高含有率は肝移植術後 1 週間におけるレシピエント血中 HCV-RNA 値の低下と関連していた。そこで、anti-NKp46 ブロッキング抗体によって HCV 増幅抑制能が減弱するか否かを検討した。さらに、NK 細胞の他の活性化分子であり HCV 感染との関連が報告されている NKp30、NKG2D についても同様の検討を行った。

C. 研究結果

1. HCV replicon 細胞を用いた NK 細胞による HCV 複製抑制効果解析

フローサイトメトリー (FCM) による NK 細胞 (CD56⁺CD3⁻) の NKp46 表出と HCV replicon 細胞のルシフェラーゼ活性抑制能との関係を解析した結果、NKp46^{bright} 細胞の存在比率が高いほどルシフェラーゼ活性抑制率も高く、両者には正の相関を認めた (図 1)。

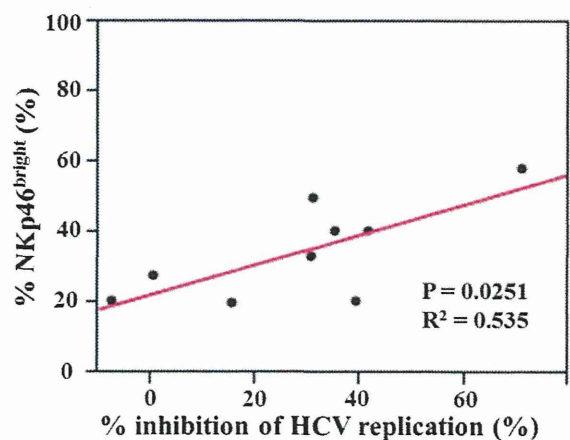


図 1. 肝内 NK 細胞の HCV 増殖抑制能は NKp46^{bright} 分画比率と最もよく相関した

また、48 時間後の培養上清中に存在するサイトカインを CBA アッセイにより評価した。その結果、IFN- γ 産生とルシフェラーゼ活性抑制率には有意差をもって関連していることがわかった (図 2)。

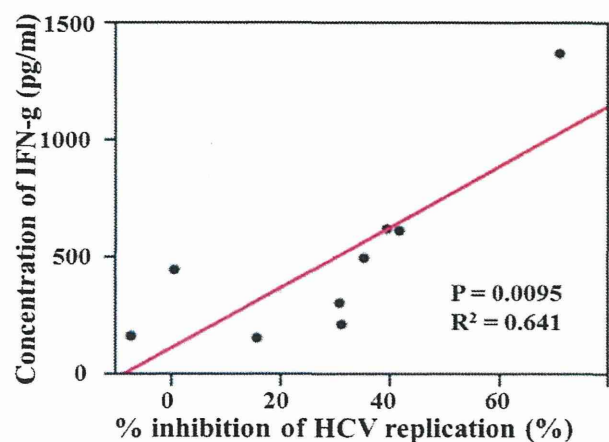


図 2. HCV 増殖抑制能は IFN- γ 産生能と相関を認めた

2. 肝内 NK 細胞の HCV 抑制能に関わる機能分子の解明

HCV の増幅抑制に NK 細胞の NKp46 分子の直接関与を確認するため、*in vitro* HCV replicon assay system に抗ヒト NKp46、NKp30、NKG2D モノクローナル抗体を添加した。その結果、各々のブロッキング抗体の添加により、ルシフェラーゼ活性抑制能の解除を認めた (図 3)。さらに、NKp46 とそ

の他の分子との相乗効果を検討し、NKG2Dとのコンビネーションにおいて有意な抑制の解除を示した（図4）。

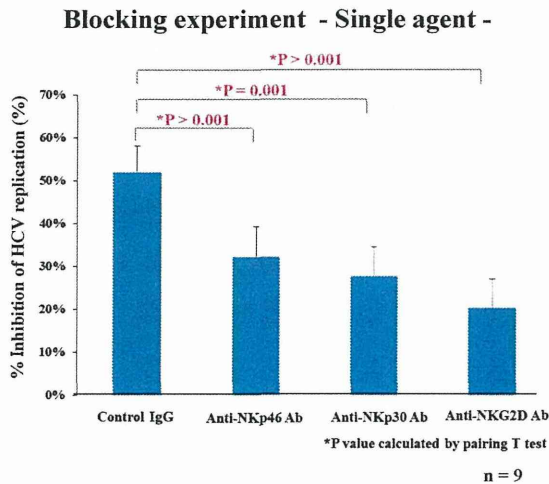


図3. Blocking抗体投与によりHCV増殖抑制能は有意に抑制された

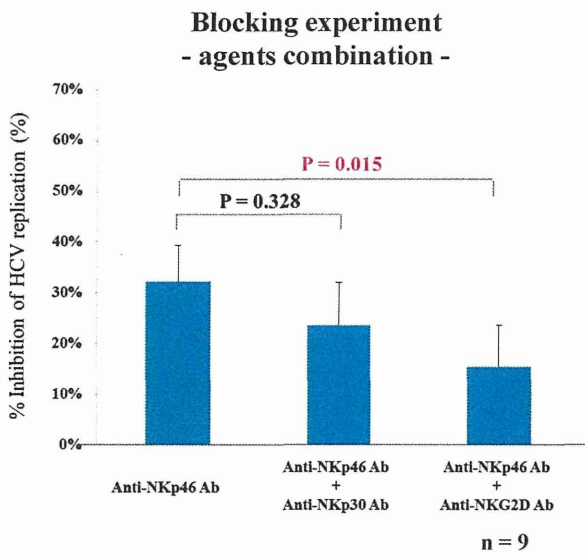


図4. 抗NKp46抗体と抗NKG2D抗体はHCV増殖抑制能に対して相乗的に作用した

D. 考察

NK細胞は、腫瘍細胞に対する傷害能やInterferon(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。我々の検討でも、肝移植術後のHCV再感染防御における肝内のNK細胞の関与を解析したが、肝移植レシピエントのNK細胞の

活性化は自己の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増幅と深く関わるが、NKp46がHCV感染細胞と接触しIFN- γ を介しHCV増幅抑制効果を発揮する事が判明した。しかし、NKp46の発現に個体差が存在する理由は未だ明らかではない。IL-28B SNPは、HCVに対するIFN治療応答性に関与することが知られているが、今後、IL-28B SNPとNKp46の個体差が関連し、HCV感染制御やIFN治療への応答性を予測する指標となりうるか解析を進める予定である。

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、グラフト肝内のNK細胞上のNKp46分子の表出強度が移植後のHCV増幅と深く関わり、HCV抑制機構にはNK細胞のIFN- γ 産生が関わる事が解明された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohira M, Nishida S, Matsuura T, Muraoka I, Tryphonopoulos P, Fan J, Tekin A, Selvaggi G, Levi D, Ruiz P, Ricordi C, Ohdan H, Tzakis AG. Comparative analysis of T-cell depletion method for clinical immunotherapy-anti-hepatitis c effects of natural killer cells via interferon-gamma production. Transplant Proc. 2013. 45(5):2045-2050.

2. Onoe T, Tanaka Y, Ide K, Ishiyama K, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tashiro

H, Ohdan H. Attenuation of Portal Hypertension by Continuous Portal Infusion of PGE1 and Immunologic Impact in Adult-to-Adult Living-Donor Liver Transplantation. Transplantation. 2013. 95(12):1521-1527.

3. 大段秀樹. State of the Art 肝免疫と肝臓外科 Liver Immunity and Surgery. Frontiers in Gastroenterology. 2013. 18(3):203-213.

2. 学会発表

1. 谷峰直樹, 田中友加, 石山宏平, 井手健太郎, 田澤宏文, 寺岡義布史, 堀田龍一, 山下正博, 安部智之, 橋本慎二, 平田文宏, 森本博司, 清水誠一, 佐伯吉弘, 五十嵐友香, 田代裕尊, 大段秀樹. 硬変肝に局在する Natural Killer 細胞の機能抑制機構. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 2013. 4. 11-13. 福岡.

2. Ohdan H. Do Allograft Responses Effect HCV Recurrence? ILTS 19th. 2013. 6. 12-15. Sydney, Australia.

3. 御厨美洋, 田代裕尊, 天野尋暢, 小林剛, 石山宏平, 井手健太郎, 大平真裕, 安部智之, 橋本昌和, 大段秀樹. NAFLD 関連肝細胞癌における臨床病理と外科的治療成績 : C 型関連肝細胞癌との相違. 第 25 回日本肝胆膵外科学会. 2013. 6. 12-14. 宇都宮.

4. 谷峰直樹, 田中友加, 安部智之, 石山宏平, 井手健太郎, 大平真裕, 田澤宏文, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝内在 NKp46 高発現 NK 細胞は移植後 HCV 再感染初期に抑制的機能を有する. 第 31 回日本肝移植研究会. 2013. 7. 4-5. 熊本.

5. 田中友加, 大平真裕, 尾上隆司, 井手健

太郎, 石山宏平, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝移植後抗ドナー T 細胞応答に伴い産生される IFN- γ は術後 HCV-RNA 抑止に関与する. 第 31 回日本肝移植研究会. 2013. 7. 4-5. 熊本.

6. 大平真裕, 石山宏平, 堀田龍一, 清水誠一, 田中友加, 田代裕尊, Andreas Tzakis, 西田正剛, 大段秀樹. 肝臓由来ナチュラルキラー細胞を用いた肝細胞癌肝移植に対する補助免疫療法 : 広島大学・マイアミ大学共同研究の臨床経過報告. 第 49 回日本移植学会総会. 2013. 9. 5-7. 京都.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

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）

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 25 年度）

In vitro, in vivo増殖系を用いたC型肝炎ウイルス増殖のメカニズムの解析と創薬への応用

研究分担者 脇田 隆字 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長

研究要旨 本研究ではC型肝炎ウイルス（HCV）の in vitro および in vivo 増殖系を用いたウイルス増殖メカニズムの解析をおこない、その結果を創薬へ応用することを目的とする。そのために、新たなウイルス培養増殖系の確立を目指す。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）新規感染者は激減したものの、その原因ウイルスであるHCVのキャリアは約100～200万人がいまだに存在すると推定されている。その多くが肝硬変から肝臓癌へ移行する。HCV感染に対する治療法はインターフェロンとリバビリンの併用療法が行われているが、その有効率は40-50%程度である。昨年新たな抗ウイルス薬としてプロテアーゼ阻害薬が承認され、治療の有効率は向上すると考えられるが、さらなる治療薬の開発が必要である。肝炎ウイルスに対する新たな治療法の開発は患者の予後を改善するのみならず、肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らすことにより、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与することが可能である。HCVの in vitro および in vivo増殖系を用いたウイルス増殖メカニズムの解析をおこない、その結果を創薬へ応用することを目的とする

。そのために、新たなウイルス培養増殖系の確立を目指す。

B. 研究方法

1. 遺伝子型 2b の HCV 感染性クローンの樹立

東京医科歯科大学の坂本先生（現北海道大学教授）より遺伝子型 2b のレプリコン及び全長遺伝子を分与していただいた。レプリコン構築に S2208I、A2217S および LSG 変異（F438L、A15S、D559G）をそれぞれ導入した。レプリコン RNA を Huh7 細胞に導入して G418 による選択培養でコロニー形成実験をおこなった。樹立されたレプリコン細胞から適合変異を同定して、LSG 変異とともに全長遺伝子に導入してウイルス産生実験を Huh751 細胞で行った。

（倫理面への配慮）

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受