

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、
リバースジェネティックスの構築に関する研究

分担研究者 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 Consent 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 型および 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