

は、候補化合物の代謝パターンを調べるために充分量の血液サンプルを採取できることが望ましいがキメラマウスはその目的に十分には応えることができない。本研究ではキメラマウスと補完的に使用できるキメララットの作製研究を実施した。本研究課題によってこのラット作成に必要な2系統のファウンダー（肝芽細胞特異的に diphtheria toxinのドメインA (DTA) 遺伝子を発現するラットとCre deleter Tgラット）を作成することができた。今後これら2系統のファウンダーを交配し目的のキメララットのためのホスト作成を目指す予定である。

培養環境下でヒト肝細胞をその分化機能を維持させながら増殖させ、また、長期維持できる方法が開発されれば、医薬品開発のツールとしての価値が高い。本研究によって、ヒト肝細胞をコラーゲンゲル中で3次元的に培養しかつ培養液を常時通液させればヒト肝細胞の増殖を促進させることができる可能性が出てきた。今後、キメラマウス由来のヒト肝細胞を用いてこの可能性を検証し、さらに分化機能なども詳細に調べ、3次元コラーゲンゲルフロー培養法の評価を行う予定である。

E. 結論

ホストとなるヒト肝細胞の遺伝的背景が一緒であっても、HCVの増幅スピードは感染源依存的に大きく異なり得ることを示した。また、HCVは感染の極く初期からヒト肝細胞の酸化ストレス及び脂質代謝関連遺伝子発現変化を誘導することも示した。ヒト肝細胞へのHBV感染にGRP78 (HSPA5)がウイルス受容体の補助因子あるいは細胞内でのウイルス増殖に必要なホスト因子として関与している可能性を示唆する実験結果を得た。キメララット作成に必要な2

系統のファウンダー（肝芽細胞特異的に diphtheria toxinのドメインA (DTA) 遺伝子を発現するラットとCre deleter Tgラット）を作成した。生体内環境に近いヒト肝細胞培養法として3次元コラーゲンゲルフロー培養法の有用性を示唆する結果を得た。本研究は、石田雄二、齋藤夏美、大房健、塩田明、立野知世、及び吉里勝利によって行われた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

平成23年度

1. Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Aug 19; 412(1):74-9.

2. Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- β -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. *J Cell Physiol.* 2011 Oct; 226(10):2535-42.

3. Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama H, Ikeda K, Yoshizato K, Kawada N. Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. *Am J Pathol.* 2011 Aug; 179(2):1050-60.

4. Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo. *Hepatology*. 2011 Sep 2;54(3):781-8.
5. Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host interleukin-28b polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2011 Sep 2;54(3):764-71.
6. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. *J Surg Res*. 2011 May 1;167(1):e29-37.
7. Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T, Miya F, Tsunoda T, Yoshizato K. Growth hormone-dependent pathogenesis of human hepatic steatosis in a novel mouse model bearing a human hepatocyte-repopulated liver. *Endocrinology*. 2011 Apr;152(4):1479-91.
8. Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo. *J Hepatol*. 2011 Jul;55(1):11-8.
9. Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol*. 2011 May; 54(5):872-8.
- 平成 24 年度
1. Fujiwara S, Fujioka H, Tateno C, Taniguchi K, Ito M, Ohishi H, Utoh R, Ishibashi H, Kanematsu T, Yoshizato K. A novel animal model for in vivo study of liver cancer metastasis. *World J Gastroenterol*. 2012 Aug 7;18(29):3875-82.
2. Izuka M, Ogawa T, Enomoto M, Motoyama H, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Induction of microRNA-214-5p in human and rodent liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012 Aug 1;5(1):12.

3. Tatsumi K, Ohashi K, Tateno C, Yoshizato K, Yoshioka A, Shima M, Okano T. Human hepatocyte propagation system in the mouse livers: functional maintenance of the production of coagulation and anticoagulation factors. *Cell Transplant*. 2012;21(2-3):437-45.
 4. Ohashi K, Tatsumi K, Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Yoshizato K, Okano T. Liver tissue engineering utilizing hepatocytes propagated in mouse livers in vivo. *Cell Transplant*. 2012;21(2-3):429-36.
 5. Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology*. 2012 Aug;56(2):555-66.
 6. Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut*. 2012 Nov;61(11):1600-9.
 7. Yoshizato K, Tateno C, Utoh R. Mice with liver composed of human hepatocytes as an animal model for drug testing. *Curr Drug Discov Technol*. 2012 Mar;9(1):63-76. Review.
- 平成25年度
1. Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, Murakami T, Tateno C, Yoshizato K, Kobayashi E. Transplantation of engineered chimeric liver with autologous hepatocytes and xenobiotic scaffold. *Ann Surg*. 2013;257(3):542-7.
 2. Tominaga K, Sasaki E, Sogawa M, Yamagami H, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe K, Watanabe T, Fujiwara Y, Kawada N, Yoshizato K, Arakawa T. Cytoglobin May Be Involved in the Healing Process of Gastric Mucosal Injuries in the Late Phase Without Angiogenesis. Tanaka F, *Dig Dis Sci*. 2013 Jan 10. [Epub ahead of print]
 3. Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Nov 8;441(1):230-5.
 4. Yoshizato K, Tateno C. A mouse with humanized liver as an animal model for predicting drug effects and for studying hepatic viral infection: where to next? *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013 Nov;9(11):1419-35.

5. Tachibana A, Tateno C, Yoshizato K. Repopulation of the immunosuppressed retrorsine-treated infant rat liver with human hepatocytes. Xenotransplantation. 2013 Jul-Aug;20(4):227-38.

6. Shi N, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Zhang Y, Kosaka K, Okazaki A, Murakami E, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Takahashi S, Ochi H, Tateno-Mukaidani C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Gao M, Chayama K. Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. Gut. 2013 Jul;62(7):1055-61.

7. Tateno C, Miya F, Wake K, Kataoka M, Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Kakuni M, Wisse E, Verheyen F, Inoue K, Sato K, Kudo A, Arii S, Itamoto T, Asahara T, Tsunoda T, Yoshizato K. Morphological and microarray analyses of human hepatocytes from xenogeneic host livers. Lab Invest. 2013 Jan;93(1):54-71.

2. 学会発表

齋藤 夏美, 足立 浩章, 田中 浩, 中田 悟, 河田 則文, 吉里 勝利. 常時通液環境下で培養されたヒト線維芽細胞の性質. 平成25年度日本生化学会大会

H. 知的財産権の出願・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肝炎等克服緊急対策研究事業
(分担)総合研究報告書(平成 23~25 年度)
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

NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性 C 型肝炎ウイルスの特性解析と miR-122 による
C 型肝炎ウイルス複製制御機構の解明

研究分担者 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科恒常性制御学 教授

研究要旨:C 型慢性肝炎に対して、複数の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤の使用が開始されたが、薬剤耐性ウイルスによる breakthrough 肝炎の発症が懸念される。Breakthrough 肝炎の病態を考える際、その複製能、感染性粒子産生能を理解することが重要である。我々は、これらを評価するために、分泌型ルチフェラーゼを培養細胞感染クローン遺伝子型 Ia の H77 遺伝子中に挿入し、細胞培養系での簡易的な複製能モニタリングシステムを構築した。さらに NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性変異体ウイルス計 25 種を作成し、複製能を検討した所、大部分の耐性ウイルスの複製能は、野生型より低く、野生型を上回ることはなかった。また培養細胞感染系を用いて、これらの耐性変異体ウイルスの感染性粒子産生能を検討した。その結果大部分の変異体は、複製能と同様に野生型に比べて低い感染性粒子産生能を示し、野生型を上回ることはなかった。耐性ウイルスの複製能・感染性粒子産生能が、野生型を上回らないことを示した今回の結果は、breakthrough 肝炎患者の病態を考慮する際極めて重要と考えられた。また肝特異的マイクロ RNA である miR-122 は、HCV 複製を促進するため、miR-122 に対するアンチセンス鎖を利用した抗 miR-122 療法は、HCV 感染チンパンジーおよび HCV 感染患者において抗ウイルス効果を示すことが報告されている。我々は miR-122 による HCV 複製制御機構の解明を行った。その結果、miR-122 は HCV RNA との結合を介して HCV RNA を安定化し、HCV RNA からの蛋白合成を促進し、結果的に HCV 複製を促進すること、さらに miR-122 による HCV RNA の安定化には Ago2 蛋白が必須であることも明らかとした。抗 miR-122 療法は、耐性ウイルスが出現しづらいことが知られており、今後 NS3/4A プロテアーゼ阻害剤を中心とした DAAs 製剤との併用により、DAAs 製剤耐性ウイルスの出現を抑制できる可能性が考えられ、今後検討を行う。

A. 研究目的

本邦でも C 型慢性肝炎の治療薬として、複数の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤の使用が開始された。ペグインターフェロンとリバビリンとの併用により、高い治療効果が期待される反面、NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスの出現、選択による breakthrough 肝炎の発症が懸念される。breakthrough 肝炎の病態を考える際、耐性ウイルスの RNA 複製能、感染性粒子産生能を理解することが極めて重要である。

今回我々は、複数の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスの特性を明らかにするた

めに、まず、培養細胞感染クローンである遺伝子型 Ia H77 株を用いた、簡易的な薬剤感受性、複製能モニタリングシステムの構築を行った。さらに同系に、NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性に関わることを報告されている変異を挿入し、NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルス 25 種を作成し、これらのウイルスの複数の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤に対する感受性、RNA 複製能を検討した。また同時にこれらの NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスの感染性粒子産生能も検討した。

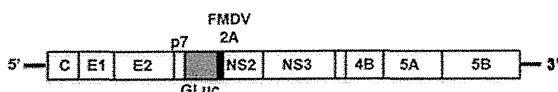
また肝特異的に発現するマイクロ RNA である miR-122 は HCV の複製に促進的に働くこ

とが報告されている。そのため miR-122 に対するアンチセンス鎖を利用した抗 miR-122 療法による抗ウイルス効果は、HCV 感染培養細胞系のみではなく、HCV 感染チンパンジー、さらには HCV 感染患者においても証明されている。そのため miR-122 を標的とした抗 miR-122 療法は、今後の C 型慢性肝炎の有力な新規治療法と考えられるが、miR-122 による HCV 複製制御機構は明らかではなかった。そのため miR-122 による HCV 複製制御機構を明らかにすることを目的とし以下の検討を行った。

B. 研究方法

- 1) 培養細胞感染クローンである H77 株の p7 と非構造蛋白 NS2 の間に分泌型ルチフェラーゼである Gaussia luciferase (以下 GLuc)、さらに GLuc の C 端側での切断のために Foot Mouse Disease Virus 2A (FMDV2A) 蛋白を挿入しその複製を検討した。(H77S.3/GLuc2A、図 1)

図 1



- 2) 既報から、NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性に寄与することが報告されている NS3 プロテアーゼ領域の変異 25 種類を個別に H77S.3/GLuc2A に挿入し、合計 25 個の耐性ウイルスを作成した。これらの耐性ウイルスに関して、4 種類の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤 Boceprevir、Danoprevir、Vaniprevir、Ciluprevir に対する薬剤感受性を、EC50 を算出することで検討した。また耐性ウイルスの複製能を、野生型と比較検討した。
- 3) 培養細胞感染クローンである H77 株に、NS3/4A 阻害剤耐性に関わることが報告されている変異を一つずつ挿入した耐性変異体ウイルス 25 種類を作成した。これら変異体ウイルス RNA をヒト肝癌細胞株

(Huh7.5) 細胞に遺伝子導入し、96 時間後にメディウムを回収し、naïve Huh7.5 に感染させた。さらにその 72 時間後に FFU assay を行い、1ml あたりの感染性粒子産生能を算出した。

- 4) 各々の耐性ウイルスの RNA 複製能と感染性粒子産生能を比較した。
- 5) miR-122 の HCV RNA 複製に対する影響を排除するため、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を有する NS5B の活性を有しない HCV RNA を作成した。また蛋白合成への影響も同時に評価するため HCV 遺伝子中に分泌型ルチフェラーゼを挿入した。この HCV RNA を miR-122 あるいは miR-122 アンチセンス鎖と共に肝癌細胞株 Huh-7.5 細胞に遺伝子導入し、HCV RNA の安定化作用の有無を northern blot 法にて、さらに蛋白に与える影響をルチフェラーゼ活性により評価した。
- 6) HCV 持続感染細胞を作成し、DICER、Ago1 から Ago4 蛋白に対する siRNA を投与して、HCV RNA 複製への影響を検討した。
- 7) Ago2 ノックアウト細胞に非複製 HCV RNA(5) で使用) を miR-122 あるいは miR-122 アンチセンス鎖と共に遺伝子導入して、HCV RNA の安定化作用の有無を northern blot 法にて、さらに蛋白に与える影響をルチフェラーゼ活性により評価した。

(倫理面への配慮)

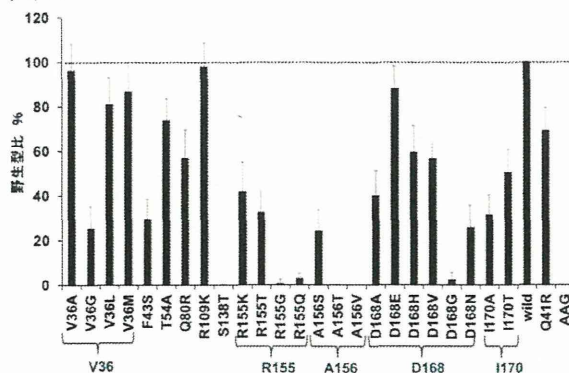
本研究では感染性粒子を産生しうる HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確

認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大6第1316号)。

C. 研究結果

- 1) H77S.3/GLuc2A を肝癌細胞株に遺伝子導入したところ、良好な複製を示した。またGLucの活性は、定量PCR法にて測定したHCV RNA量と良好な相関を示した。
- 2) 次に合計25個のNS3/4Aプロテアーゼ阻害剤耐性変異をこのGLucを含んだウイルスに挿入し、耐性ウイルスを作成した。これらの耐性ウイルスに対して、4種類のNS3/4Aプロテアーゼ阻害剤(Boceprevir、Danoprevir、Vaniprevir、Ciluprevir)に対する感受性を検討した所、ほぼ既報と一致するような薬剤耐性が確認された。))
- 3) さらに、これらの耐性ウイルスの複製能をGLuc assayを用いて測定し、野生型に対して比較検討した(図2)。V36A/L/M、Q41R、R109K、D168E、I170Aの変異体ウイルスに関しては、野生型と同等の複製能を示したが、他のウイルスに関しては、野生型に比べて弱い複製能であった。

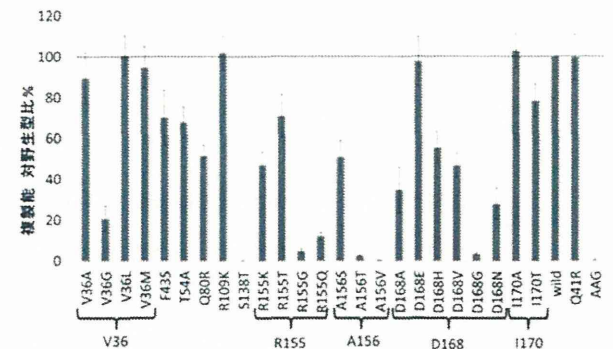
図2



- 4) FFU assayにて測定した各変異体ウイルスの感染性粒子産生能を測定し、野生型との比較を行った。その結果、V36A/L/M、Q41R、R109K、D168E、I170Aに関しては野生型と同等の感染性

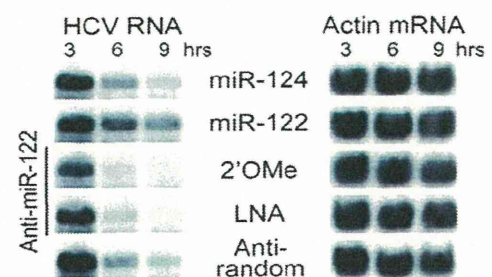
粒子産生能を示したが、他の大部分の変異体ウイルスは、野生型に比べて低い感染性粒子産生能を示した(図3)

図3



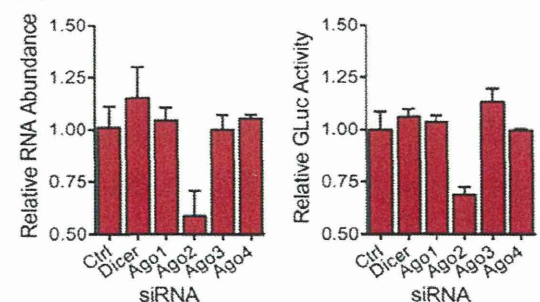
- 5) miR-122の投与により非複製HCV RNAは安定化され、miR-122アンチセンス鎖の投与により、非複製HCV RNAは不安定化された。(図4)またmiR-122の投与により、非複製HCV RNAからの蛋白合成は促成され、逆にmiR-122アンチセンス鎖の投与により、蛋白合成は抑制された。この結果からHCV RNAを安定化することでHCVの蛋白合成を促進し、結果的にHCV複製を促進することが明らかとなった。

図4



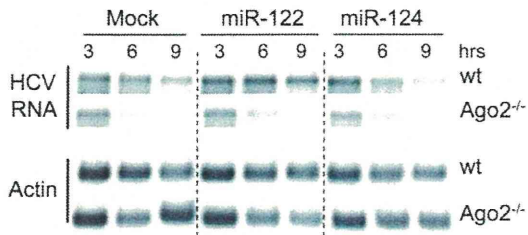
- 6) Ago2蛋白のsiRNAによるノックダウンにおいてのみHCV複製の抑制を認めた。(図5)

図5



- 7) Ago2 ノックアウト細胞では miR-122 による HCV RNA 安定化作用および蛋白合成促進作用は認めなかった。(図6)

図 6



D. 考察

臨床的に breakthrough 肝炎を発症し、NS3/4A 阻害剤耐性ウイルスが出現しても、治療終了後自然消失し、野生型が優位になることが知られている。大部分の NS3/4A 阻害剤耐性ウイルスの RNA 複製能と感染性粒子産生能は野生型より低いという今回の培養細胞系を用いた検討は、この臨床的知見に合致するものであった。

また抗 miR-122 療法は DAA 製剤による抗ウイルス療法で問題となっている薬剤耐性ウイルスが極めて出現しにくいことが知られている。しかしながら miR-122 非発現細胞においても HCV は複製することが知られており、抗 miR-122 療法単独での HCV の排除は困難と考えられる。そのため抗 miR-122 療法と DAA 製剤の併用療法は DAA 製剤による薬剤耐性ウイルスの出現予防の点で極めて有用であり、今後検討を行う予定である。

E. 結論

- 1) 分泌型ルチフェラーゼ GLuc を HCV 遺伝子中に挿入することで、簡易的な HCV 複製モニタリングシステムを構築した。
- 2) NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性変異体ウイルスは、野生型の RNA 複製能や感染性粒子産生能を上回ることはな

く、大部分は、野生型より低い RNA 複製能や感染性粒子産生能を示した。

- 3) miR-122 は HCV RNA を安定化することで HCV 複製を促進することが明らかとなった。また miR-122 による HCV RNA の安定化には Ago2 が必須であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A Seki, S Y akai, T Komura, A Nasti, K Yoshida, M Higashimoto, M Honda, S Usui, M Takamura, T Takamura, T Ochiya, K Furuichi, T Wada, S Kaneko. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. Hepatology 58(3):1133-42, 2013
- 2) T Shirasaki, M Honda, T Shimakami, R Horii, T Yamashita, Y Sakai, A Sakai, H Okada, R Watanabe, S Murakami, M Yi, SM Lemon, S Kaneko. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. J Virol 87(9):5270-86, 2013
- 3) T Yamashita, M Honda, Y Nakamoto, M Baba, K Nio, Y Hara, SS Zeng, TH Kondo, H Takatori, T Yamashita, E Mizukoshi, H Ikeda, Y Zen, H Takamura, XW Wang, S Kaneko. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human

hepatocellular carcinoma.

Hepatology 57(4):1484-97, 2013

- 4) H Okada, M Honda, JS Campbell, Y Sakai, T Yamashita, Y Takebuchi, K Hada, T Shirasaki, R Takabatake, M Nakamura, H Sunakozaka, T Tanaka, N Fausto, S Kaneko. 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
- 5) M Honda, K Takehana, A Sakai, Y Tagata, T Shirasaki, S Nishitani, T Muramatsu, T Yamashita, Y Nakamoto, E Mizukoshi, Y Sakai, T Yamashita, M Nakamura, T Shimakami, M Yi, SM Lemon, T Suzuki, T Wakita, S Kaneko; Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition Impairs Interferon Signaling through mTOR and FoxO pathways in Patients with Chronic Hepatitis C. Gastroenterology 141(1):128-140. 2011

G. 知的所有権の取得状況

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）
（分担）研究報告書（平成 23～25 年度）
創薬と新規治療法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

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：ヒト不死化肝細胞の中空糸による簡便な立体培養法で患者由来の C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染増殖を再現する実験系を独自に開発してきた。立体培養下で発現が変化する遺伝子をマイクロアレイ法によって解析し、アラキドン酸カスケードに関連するいくつかの遺伝子の発現が変動していることを見出した。また、このカスケードの上流酵素であるシクロオキシゲナーゼ 1 の阻害剤とトロンボキサン₂ (TXA₂) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤が 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すことを見出した。また、TXAS 阻害剤や TXA₂ と拮抗的に機能するプロスタグランジン I 受容体アゴニストはヒト肝細胞キメラマウスにおいても患者血由来 HCV の感染増殖を阻害した。TXAS 阻害剤の抗 HCV 効果の分子機構を解析した結果、細胞内における感染性 HCV 粒子産生を阻害していることがわかった。また、TXAS はその産物である TXA₂ によって TXA₂ 受容体を介さない未知のシグナル系によって感染性 HCV 粒子産生に関わっていることが明らかとなった。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が、その原因のひとつは薬剤抵抗性 HCV の出現によるものであることが考えられた。本研究により TXAS 阻害薬および IP アゴニストが感染性 HCV 産生阻害による新規抗 HCV 薬剤となることが明らかとなった。

A. 研究目的

これまで、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。

B. 研究方法

1. 独自に樹立したヒト不死化肝細胞を立体培養することにより種々の患者血清由来 HCV の感染増殖を効率良くおこなうことが可能になることから、この細胞

の立体培養下における遺伝子発現パターンをマイクロアレイ法によって解析した。そして通常培養に比較して立体培養において変化する遺伝子群の解析結果から HCV の感染増殖と関連する細胞内反応系候補としてアラキドン酸カスケード (AAC) を同定した。

2. 組換え体 HCV (JFH1) 感染性粒子産生実験系に AAC に含まれる酵素の阻害剤等で処理し、その細胞内あるいは培地中に放出される HCV RNA 量、そして培地中の HCV 感染性を検証した。
3. トロンボキサン A₂ (TXA₂) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤 Ozagrel の作用機序を明らかにするために Ozagrel、TXAS の既知基質プロスタグランジン H₂ (PGH₂)、TXA₂ 受容体アゴニストやアンタゴニストを

JFH1 感染性粒子産生系に対して加えて、TXAS 活性による感染性 HCV 産生の分子機構の解析をおこなった。

4. ヒト肝臓キメラマウスに患者血由来遺伝子型 1b の HCV を感染させた後、培養細胞系で抗 HCV 効果が認められた薬剤で処理し、その感染増殖に対する効果を検討した。

(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. 不活化肝細胞を中空糸あるいはメビオールゲルによる立体培養法を用いて培養した場合と通常の培養皿による培養法を用いた場合におけるその遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイ法によって解析したところ、プロスタグランジン(PG)D 合成酵素(PGDS)と TXAS の mRNA 量が 2つの方法に共通して立体培養時に上昇し、それとは逆に PGI と PGE 合成酵素の mRNA 量が減少していることがわかった。
2. 上記の結果から立体培養によって AAC の最終産物に変化することが推定されたため、まず AAC が HCV の生活環に関与するか否かを組換え体 HCV (JFH1) 感染性粒子産生実験系を用いて、AAC の律速酵素、シクロオキシゲナーゼ I の阻害剤の効果を検討した。その結果、細胞内に存在する、あるいは培地中に放出された HCV RNA は全く変化せず、複製や培地中への粒子産生には大きな変化は

ないことがわかった。しかしながら培地に存在するウイルス様粒子の感染性がこの阻害剤により濃度依存的に抑制されることがわかった。

3. 立体培養時に上昇する PGDS 遺伝子は組換え体 HCV 産生細胞では発現が認められなかったので同様の挙動を示した TXAS 遺伝子の mRNA に対する siRNA を用いてこの細胞を処理するとやはり 2. の結果と同様に HCV の複製や培地中への粒子産生には大きな変化はなかったが培地中の感染性が著しく低下することがわかった。
4. 3. 同様の実験を TXAS 活性阻害剤である Ozagrel を培地に加えておこなったが siRNA と全く同様の結果が得られた。
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。
7. 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。
8. 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。
9. 組換え体 HCV 産生細胞とヒト肝臓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。

10. ヒト肝臓キメラマウスに患者血由来遺伝子型 1b の HCV を感染させた後、これに Ozagrel ならびに TXA₂ と相反する効果を有する PGI の受容体 (IP) に対するアゴニストを投与し、その感染増殖に対する効果を検討した結果、Ozagrel ならびに IP アゴニストは効率良く HCV の増殖を抑制することがわかった。
11. 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 を新たなキメラマウスに感染させ、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。
12. 11. 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. ヒト不死化肝細胞の立体培養によって変化が認められた AAC の TXAS は感染性粒子産生に重要な細胞因子であり、TXAS 活性阻害によって感染性粒子産生が抑制される事がわかった。
2. 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。
3. 2. で示唆された 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。

4. 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。
5. ヒト肝臓キメラマウスに感染させた患者血由来遺伝子型 1b の HCV の感染伝播を Ozagrel ならびに IP アゴニストは効率良く抑制したことからこれらの薬剤が抗 HCV 薬剤の新たな候補となることが考えられた。
6. 5. の結果からヒトの肝臓においても TXA₂ と PGI は相反する効果を示す事が考えられた。
7. 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

TXAS 阻害薬と IP アゴニストは HCV 粒子産生細胞に働きかけ感染性粒子産生を抑制する働きを有することが示唆された。したがって、これらの薬剤は抗 HCV 薬の候補と考えられ、またこれらの効果によって変化する細胞因子は抗 HCV 薬剤開発の新たな標的となることが期待された。これらの薬剤はすでに他の疾患治療に使用されているものであり、早期に治療への応用が期待できるものであると考えられた。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

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.
- 3) Aly H.H., Shimotohno K., Hijikata M., Seya T.: In vitro models for the analysis of HCV life cycle, *Microbiol. and Immunol.*, 2012, 56, 1, 1-9.
- 4) Wakita T., Suzuki T., Evans M.J., Shimotohno K., Chayama K., Matsuura Y., Hijikata M., Moriishi K., Seya T., Enomoto N., Koike K., Kato N., Kanto T., Hotta H.: Will there be an HCV meeting in 2020? summary of the 17th international meeting in hepatitis C virus and related viruses, *Gastroenterology*, 2011, 141(1), E1-E5.
- 5) Ariumi Y., Kuroki M., Kushima Y., Osugi K., Hijikata M., Maki M., Ikeda M., Kato N.: Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets, *J. Virol.*, 2011, 85(14), 6882-6892.

2. 学会発表

- 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. 20th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, Oct 6-10, 2013

2) Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijikata M.: 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

8) 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.

9) Tsugawa Y. and Hijikata M.: Hepatocyte-specific innate immune systems

in response to RNA virus infection. The 10th International Student Seminar. Kyoto, 5-8 March 2012.

10) 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

11) Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijikata M.: 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

12) 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

13) Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijikata M.: 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

14) Kuroki M., Inoue M., Hijikata M. Ikeda M., Wakita T., Shimotohno K., Kato N., Ariumi Y.: 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

15) 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

16) 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

17) 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

18) 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

19) 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

20) Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijikata M.: 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

21) Kushima Y., Abe Y., Wakita T., Shimotohno K., Hijikata M.: Novel targets for anti HCV drugs preventing infectious virus particle production. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference, The Latest Advances in Liver Cancer Research:□From Basic Science to Therapeutics, Chiba, Japan, March 1-3, 2011.

22) Abe Y., Aly H.H., Wakita T., Shimotohno K., Hijikata M.: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production. The 6th International symposium of institute network. Tokyo, Japan, June 9-10, 2011

23) Abe Y., Wakita T., Shimotohno K., Hijikata M.: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus particle production. 18th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, USA, Sept 8-12, 2011

24) Abe Y., Aly H.H., Wakita T., Hijikata M.: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production. 平成23年12月12-15日、横浜、2011年

25) 阿部雄一、下遠野邦忠、脇田隆字、土方 誠 : HCV粒子の感染性獲得に關与する肝細胞内シグナルの解析、第7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23年7月1日、広島、2011年

26) 土方誠：プロスタノイドによるHCVの感染性粒子産生制御、平成23年度 北海道大学遺伝子病制御研究所 研究集会『感染、免疫、炎症、発癌』、平成23年12月4-5日、札幌 2011

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、膵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

4) 特許出願：発明者 土方誠、アリハサン フセイン、山口達哉、上皮系体性幹細胞の製造方法、出願日 2012/3/25、出願番号 PCT/JP2012/057468

5) 特許出願：発明者 土方誠、アリハサン フセイン、山口達哉、上皮性体性肝細胞の製造方法、出願日2011年3月25日、出願番号 特願2011-67112

6) 特許出願：発明者 土方誠、阿部雄一、脇田隆字、茶山一彰、C型肝炎ウイルスの感染抑制剤、出願日2011年9月30日、出願番号 PCT/JP2011/072682

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

（分担）研究報告書（平成23～25年度）

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と 肝臓特異的インターフェロン- γ 治療法の開発

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を感染させたヒト肝細胞キメラマウスに対して、持続的にIFN- γ を発現するIFN- γ 発現plasmid DNA (pDNA)あるいは一過性にIFN- γ を発現するIFN- γ 発現pDNAをハイドロダイナミクス法を用いて遺伝子導入した。持続性のIFN- γ 発現pDNAの遺伝子導入により血清中HCV RNA量は検出限界以下となりその効果は持続した。一方で、一過性発現の場合には4匹中1匹においてのみ血清中HCV RNA量が減少したが、血中HCVのリバウンドが観察された。持続的なIFN- γ 発現による肝障害の可能性について検討したところ、投与後初期に一過性に血清ALTの上昇が認められたが観察終了時にはもとのレベルに回復していた。また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。

併せて、IFN- γ の肝臓特異的な作用発現を目的として、マウスIFN- γ とヘパラン硫酸結合ドメイン(heparin binding domain; HBD)との融合タンパク質を設計し、これを発現するpDNAを構築し、その動態制御能について評価した。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プロテイン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

これまでに例数は少ないものの、長期のIFN- γ 遺伝子発現を可能とするpDNA、pCpG-IFN- γ を投与し、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効果が得られる可能性があることを報告していた。そこで、本研究では検体数を増やすことで持続的なIFN- γ

遺伝子発現のC型肝炎に対するin vivoにおける治療有効性を検証した。併せて、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するために一過性のIFN- γ 発現を示すIFN- γ 発現pDNA (pCMV-IFN- γ)をHCV感染キメラマウスに遺伝子導入した。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肝傷害性について評価した。

また、肝臓特異的なIFN- γ の作用発現による治療有効性の向上を目的に、以下の2つのアプローチについて検討した。肝臓を遺伝子導入部位とし、遺伝子導入部位近傍のIFN- γ 濃度を選択的に増大し、全身循環中のIFN- γ 濃度を低く抑えることを目指し、細胞外マトリクスであるヘパラン硫酸糖に結合親和性を持つことが知られている

extracellular superoxide dismutase由来C末端ヘパラン硫酸結合ドメイン (HBD)をIFN- γ のC末端に融合することで遺伝子導入された細胞で産生・分泌後、細胞表面に留まる機能を賦与した。また、肝硬変などの併発により肝臓への遺伝子導入が困難な場合を想定して、肝臓以外の部位に肝臓指向性IFN- γ を遺伝子導入することによる、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し、肝臓指向性IFN- γ をデザインした。

B. 研究方法

1. 持続型IFN- γ 発現pDNAを用いた抗HCV効果の検討

pDNA：持続的な遺伝子発現が可能であるpDNA骨格(pCpG-mcs: InvivoGen)にヒトIFN- γ cDNAを挿入したpCpG-huIFN- γ を用いた。pCpG-IFN- γ およびpCMV-IFN- γ を用いた。別途GFPを発現するpDNA

(pEGFP-N1)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。血中ヒト血清アルブミン濃度

を測定することでヒト肝細胞置換率を確認した。HCV感染モデル: 高置換キメラマウスにI型IFN抵抗性を示す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。肝傷害性の評価: 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。別途、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。

2. 細胞表面付着型IFN- γ 発現pDNAの構築

pDNA：HBDをIFN- γ のC末端に融合した。このとき、IFN- γ に融合するHBD数が1から3までの3種類の融合タンパク質

IFN- γ -(HBD)_{1~3}をデザインし、融合タンパク質発現pDNA (pCpG-muIFN- γ -(HBD)_n: n =

1~3)を構築した。IFN- γ 発現量の定量: 構築したpDNAを培養細胞に導入し、上清中および細胞画分の各融合IFN- γ 発現量を

ELISA法により測定した。IFN- γ 生物活性の評価: IFN-gamma activated site (GAS) 駆動性のルシフェラーゼ発現pDNA

(pGAS-Luc)を遺伝子導入したB16-BL6細胞を用いて生物活性を評価した。細胞表面

滞留性の評価: 抗IFN- γ 抗体を用いて免疫蛍光染色法を行うことで、融合IFN- γ の細胞表面滞留性を評価した。マウスへの遺伝子導入と生物活性および体内動態の評価: ハイドロダイナミクス法を用いてマウス肝臓に各pDNAを遺伝子導入した。IFN- γ 血中濃度をELISA法により測定した。HBD融合IFN- γ 発現pDNAを遺伝子導入したマウスに対して、HBDとヘパリン硫酸の相互作用を阻害可能するヘパリンを静脈内投与し、血中に遊離するIFN- γ 量を測定することでHBD融合IFN- γ の細胞外マトリクスとの結合性を評価した。抗腫瘍効果と有害作用の評価: M5076細胞を用いて肝転移モデルマウスを作製し、各IFN- γ 発現pDNAを投与し、肝臓中結節数を評価することで抗腫瘍効果を判定した。別途、体重を指標にIFN- γ が全身で非特異的に作用することによる有害作用を評価した。

3. 肝臓指向性IFN- γ 発現pDNAの構築

pDNA: 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-IFN- γ -ApoA-I)を構築した。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Suppressor 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

HCV感染モデルマウスに対するIFN- γ 遺

伝子治療効果治療効果の検討

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。

HCV感染キメラマウスに対して短期発pCMV-IFN- γ 発現pDNAを投与した。遺伝子導入を行った4匹の個体の内、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たが、投与30日以降に再び血中HCV RNAが検出された。また、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HCV感染キメラマウスに投与した。その結果、遺伝子導入3日後よりウイルス価の減少が認められ、14日後以降は検出限界以下、もしくは、著しくウイルス価が減少することが明らかとなった。また、投与から8週間が経過後に肝臓を回収し、HCV RNA量を定量したところ検出されなかったことから、肝臓からのHCVの除去が示唆された。

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、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、4週間後にはもとのレ

ベルに回復していた。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後にHE染色切片を作製し傷害性の有無を判定したが、明確な傷害は認められなかった。

細胞表面接着型インターフェロン- γ の治療効果の検討

新規デザインしたHBD融合IFN- γ の生物活性と細胞表面付着能を培養細胞の系で評価した。その結果、HBD融合IFN- γ の細胞表面への付着能はHBD数の増加に伴い増加することを確認した。また、HBD融合IFN- γ が天然型IFN- γ と同程度のIFN- γ 生物活性を保持していることも確認した。次に、マイクロダイナミクス法を用いてマウスに遺伝子導入したところ、培養細胞での結果と同様に、HBD数に依存した細胞表面への付着が増加する傾向が認められた。HBD融合IFN- γ 発現pDNA投与マウスに対してヘパリンを静脈内投与したところ、ヘパリン投与により血清中IFN- γ 濃度が30倍程度上昇したことから、HBD融合IFN- γ が細胞外マトリクスと相互作用することで血中濃度が低く抑えられているものと考えられた。肝転移腫瘍モデルマウスにおいて抗腫瘍効果と有害作用の評価を行ったところ、天然型IFN- γ 発現pDNA投与群では抗腫瘍効果が得られたが同時に体重も減少した。一方、HBD融合IFN- γ 発現pDNAを投与した群では、体重減少することなく天然型IFN- γ と同等の抗腫瘍効果が得られた。

ApoA-I融合インターフェロン- γ の肝臓指向性の検討

ApoA-I融合IFN- γ の生物活性を評価した結果、天然型IFN- γ と比較して約31%の生物活

性を保持していることが明らかとなった。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が、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感染キメラマウスを用いてIFN- γ 発現pDNAの治療有効性を検証した。

その結果、持続的にIFN- γ を発現することで著しくウイルス価が減少する、あるいは、検出限界以下に至ることが明らかとなった。また、一度ウイルス価が検出限界まで低下したマウスにおいて、観察終了までの8週に渡り再燃が認められなかった。一方で、短期IFN- γ 発現pDNAの投与による抗HCV効果は非常に弱く、有意な抗HCV効果が得られた固体においてもHCVの再発も観察された。これらの結果は、I型IFN抵抗性HCVに対する持続的なIFN- γ 遺伝子治療の有用性を示すものと考えられる。

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、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、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とから、IFN- γ 遺伝子治療の安全性は高いと考えられる。

IFN- γ をHBDとの融合タンパク質とすることによりその生物活性を保持しつつその体内動態を制御できることが明らかとなった。また、HBD融合IFN- γ はin vivoにおける癌細胞の増殖を天然型IFN- γ と同様に抑制可能である一方で、有害事象が観察されなかったことから、HBD融合IFN- γ の有用性が証明された。

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、

その血中濃度で比較すると天然型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する。

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。以上の結果は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。また、HBD融合IFN- γ およびApoA-I融合IFN- γ の利用により肝臓特異的なIFN- γ 作用が誘導され、これらが肝炎治療のための有用なアプローチになる可能性が示された。