

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

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

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：ヒト不死化肝細胞の中空系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。

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。そして通常培養と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₂ (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. 不死化肝細胞を中空系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 の最終産物が増加することが推定されたため、まず AAC が HCV の生活環に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。
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.
- 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 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

- 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 α 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

作成上の留意事項

1. 「A. 研究目的」について

・厚生労働行政の課題との関連性を含めて記入すること。

2. 「B. 研究方法」について

(1) 実施経過が分かるように具体的に記入すること。

(2) 「(倫理面への配慮)」には、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意(インフォームド・コンセント)に関わる状況、実験に動物に対する動物愛護上の配慮など、当該研究を行った際に実施した倫理面への配慮の内容及び方法について、具体的に記入すること。倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記すること。

なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、疫学研究に関する倫理指針(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、遺伝子治療臨床研究に関する指針(平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成18年厚生労働省告示第425号)、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続を行うこと。

3. 「C. 研究結果」について

・当該年度の研究成果が明らかになるように具体的に記入すること。

4. その他

(1) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。

(2) 文字の大きさは、10～12ポイント程度とする。