

関をおこなったところ、Tp80 のもつ Tropolone 環の抗 HCV 作用への関与を示唆する結果が得られた。3) DNA ウイルス増殖阻害化合物が、B 型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性について、PXB マウス由来肝細胞 PXB-cells (PhenixBio) に対し、HBV 感染源 (PhenixBio) を 5 Genome equivalent / cell にて感染させた。同時に化合物添加培地を添加し、24 時間後、新しい化合物添加培地に交換した。感染 7 日目に培養上清を回収し HBV DNA コピー数および HBV 抗原について測定を行った。

陽性コントロールである Entecavir および Lamivudine 添加群において濃度依存的な HBV DNA コピー数および HBs 抗原の減少が認められ、本試験系は成立していることが確認できた。その上で、本試験条件では、当該化合物添加による濃度依存的な HBV DNA コピー数および HBs 抗原の減少は認められなかった。

D. 考察

合成レチノイド Tp80 は宿主キナーゼをターゲット候補とする SFV785 とは異なり、酸化ストレス応答に寄与する酵素・グルタチオンペルオキシターゼの一つ、GI-GPx の HCV 感染による発現抑制状態から回復させることが見いだされている。合成レチノイドは疎水性残基とカルボン酸などからなるターゲット因子との水素結合部位からなるが、本年度の構造活性相関解析からは、Tp80 のもつ Tropolone 環の抗 HCV 作用への関与を示唆する結果が得られた。従って、Tropolone 環に類する水素結合部位を保有する残基への改良、または疎水基の改変により抗 HCV 能が向上することが期待される。

また、分担者において同定された抗ヘルペス薬は宿主細胞因子をターゲットとし、広範囲の DNA ウイルスに対する増殖阻害能をもっている。そのため同じく DNA ウイルスである HBV に対する阻害能が期待されたが、今回の結果ではその効果が見られなかった。このことより当該阻害薬のターゲットとする宿主因子が HBV 増殖制御因子とは異なっている、もしくは寄与が少ない可能性が示唆された。

E. 結論

SFV785 はおそらくは宿主キナーゼの活性抑制を介して、細胞内のフラビウイルスゲノム複製には影響が無いが産生粒子の感染能を消失させる、

新規作用機序であることが明らかにされていた。分担者は先行事業に於いて同定された合成レチノイド Tp80 が酸化ストレス応答に寄与する酵素・グルタチオンペルオキシターゼの一つ、GI-GPx の HCV 感染による発現抑制状態から回復させることを見いだしており、この二つは全く異なる作用機序で抗 HCV 能を示している。今回 Tp80 が SFV785 より強い抗 HCV 能を示したことから、構造展開による GI-GPx 発現量回復を作用機序とする化合物創製が抗 HCV 薬創製により有効であることが示唆された。

本年度得られた結果を元に、今後は Tp80 類縁体及び同一作用機序の化合物に焦点を定め、スクリーニング及び構造最適化を実施する。具体的には構造類似体の検索と HCV レプリコンを用いた抗 HCV 効果検討を行う。さらに Tp80 系化合物の詳細作用メカニズムの解明をすすめ、候補を絞った時点で、薬物動態の解析・動物毒性試験、HCV 感染モデルによる薬理評価などの *in vivo* 評価系の検討をすすめる。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表

1. 奥野友紀子、Nguyen Bao Ngoc、飯田慶、出縄政嗣、坂本直哉、影近弘之、萩原正敏
抗 C 型肝炎ウイルス能をもつ低分子化合物の同定
第 8 回日本ケミカルバイオロジー学会 東京 2013 年 6 月

2. Makoto Yamamoto, Hiroshi Onogi, Takamitsu Hosoya, Masatoshi Hagiwara
A Broad Spectrum Antiviral Drug Targeting the Host Cellular Mechanism
2nd Annual conference International Chemical Biology Society, 7-9 October 2013

3. 奥野友紀子、Nguyen Bao Ngoc、飯田慶、出縄政嗣、坂本直哉、影近弘之、萩原正敏
抗 C 型肝炎ウイルス能をもつ低分子化合物の同定
第 61 回日本ウイルス学会 神戸 2013 年 11 月

4. 山本誠、小野木博、吉田優、細谷孝充、
萩原正敏宿主機構を標的とした次世代抗
DNA ウイルス薬の開発第 61 回日本ウイルス
学会 神戸 2013 年 11 月

出願番号：PCT/JP2009/052253

PCT 出願日：2009/2/4

出願人：株式会社キノファーマ

審査状況：日本（特許査定）、米国（OA 中）、
韓国（審査請求済み）

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 発明の名称：抗 RNA ウイルス作用を有
するアニリン誘導体

2. 実用新案登録

3. その他

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 25 年度）

肝炎ウイルスの複製増殖および病原性発現機構と薬剤感受性の解析

分担研究者：土方 誠
研究協力者：津川 陽司、赤堀 祐一

分担研究課題：ヒト肝幹細胞を用いたHCVの高効率感染増殖実験系の開発とこれを用いたHCVによる発癌機構の解明

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の感染が可能な培養細胞を作成するために、初代培養ヒト肝細胞と類似した自然免疫系を有することを認められている不死化ヒト肝細胞HuS-E/2細胞の自然免疫系の解析をおこない、ヒト肝細胞ではウイルス非感染状態においてインターフェロンalphaが低レベルで産生されていて、これがHCVの感染に対する自然免疫応答の速度と強度を上昇させていることを明らかにした。また独自に樹立したヒト肝幹細胞HYM細胞が実際にどの程度の分化能を有するののかについて検討をおこない、HYM細胞が肝細胞と胆管上皮細胞へ分化能を有する典型的な肝幹細胞であること、しかし、まだ完全に成熟した肝細胞には分化されていないことがわかった。組換え体HCV(JFH1)の感染をレポーター遺伝子発現によって検出するシステムのモデル系を開発し、その検出が可能になった。

A. 研究目的

本研究では、これまでのHCV感染系では解析のできなかつた抗HCV薬剤の標的を見出し、またその薬剤抵抗性の解析をおこない、かつ肝発癌など病原性機構の解析を可能にすることを最終的な目的として、独自に開発した凍結ヒト初代培養肝細胞由来のヒト肝幹細胞（仮称HYM細胞）を用いて、効率の良い新規C型肝炎ウイルス(HCV)培養系を開発することにある。今年度はHCVの感染系の構築に必要な肝細胞における抗HCV自然免疫系の解明、新規肝幹細胞の性状の解析とHCV感染細胞を標識し、分取するためのモデルシステムの構築を目指した。

B. 研究方法

I. 我々が樹立した不死化ヒト肝細胞HuS-E/2細胞の自然免疫系に関するこれまでの解析から、初代培養肝細胞と同様にこの細胞では恒常的に低レベルのインターフェロン(IFN)-alphaが産生されていることを明らかにしているが、HCV感染に対する影響は明らかでなかった。そこでこの細胞を予めIFN-alphaに対する中和抗体やその受容体に対する中和抗体で処理して、組換え体HCV(JFH1)を感染させて、この細胞におけるIFN関連遺伝子の誘導およびJFH1の感染増殖に対する効果を検討した。

II. これまでに独自の方法によりクローン化することに成功しているヒト肝幹細胞HYM1細胞は、その遺伝子発現パターンがヒト肝幹細胞様であることと肝細胞培養用培地による培養によってアルブミン遺伝子の発現誘導が観察されたことにより肝幹細

胞であることを推定していた。そこで本年度はさらに確証を得て、1. 成熟肝細胞への分化が可能であるか否か、また、これまでに報告されている肝幹細胞の特徴である 2. 胆管上皮細胞への分化能を有するか否かについて検討をおこなった。

1. 肝細胞への分化の検討

- 1) ヒトアルブミン ELISA システムを用いて分化誘導させた HYM1 細胞の培養上清中に存在するヒトアルブミン濃度を測定した。
- 2) 肝細胞の特徴の一つであるグリコゲンの細胞内への蓄積を PAS 染色により検討した。
- 3) 肝細胞による物質の細胞内輸送能をインドシアニンググリーン(ICG)色素の細胞内への取り込みで検討した。
- 4) 肝細胞による毒物の分解に機能する CYP 遺伝子の発現誘導能の有無をリファンピシン処理による CYP3A4 遺伝子の発現誘導を CYP3A4mRN 量の変化を RT-PCR により検討した。
- 5) 4) 同様に処理した細胞を用いて CYP3A4 酵素活性を検討した。

2. 胆管上皮細胞への分化の検討

- 1) HYM1 細胞をマトリゲルを用いた胆管上皮への分化条件で立体培養し、その細胞塊の構造を観察した。
- 2) 上記細胞塊を Rhodamine123 色素で処理し、細胞塊内部の空洞への移動の有無を観察した。

III. HCV が感染した細胞を標識し、分離するシステムの構築を行った。

まずモデルシステムとして、細胞内膜上に HCV プロテアーゼ標的ペプチドを介して繫留した転写因子を作成し、HCV プロテアーゼセンサーとした。この膜繫留型転写活性化因子が JFH1 の感染により特異的に切断され、膜から分離され、核内に輸送され、特定のリポーター遺伝子の発現を誘導するか否かと検討した。

(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、本研究で用いられているヒト肝幹細胞 HYM 細胞の作成に用いた凍結初代培養ヒト肝細胞は市販されており、販売企業による倫理規定により承認されているものを用いており、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

I. IFN-alpha やその受容体に対する中和抗体の前処理を行った HuS-E/2 細胞に JFH1 を感染させると、この細胞内における IFN 関連遺伝子の誘導は、そのピークが遅延することがわかった。また JFH1 の感染増殖をその細胞内におけるゲノム RNA 量の変化で検証したところ、この前処理により JFH1 RNA 量が著しく増加していることが観察された。

II-1. 肝細胞への分化の検討

- 1) HYM1 細胞は未分化時には全くヒトアルブミンを産生していないが、分化誘導時間に応じてヒトアルブミン量が増加し、ヒト肝癌由来細胞である HuH7 細胞より、その産生量が多くなることがわかった。
- 2) HYM1 細胞は未分化時には全く PAS 染色によって染色されなかったが、分化誘導後には強く染色されることがわかった。
- 3) HYM1 細胞は未分化時には全く ICG を取り込まなかったが、分化誘導後には強い取り込みが観察された。
- 4) HYM1 細胞は未分化な状態では CYP3A4 mRNA の発現はほとんど認められなかったが、分化誘導によりその発現が上昇した。しかしながら、リファンピシンによるその発現上昇はわずかのみ観察されるだけであった。
- 5) 現時点においては検出可能な程度の CYP3A4 酵素活性は認められなかった。

II-2. 胆管上皮細胞への分化の検討

1) マトリゲルを用いた立体培養法で HYM1 細胞は細胞極性を示す中空のシスト様構造をとることが観察された。

2) Rhodamine123 色素でシスト様の構造を処理すると細胞塊内部の空洞へ色素が輸送されることが観察された。

III. 転写活性化因子として HTLV-1 の TAX タンパク質と Gal4-VP16 を用いた HCV プロテアーゼセンサープラスミドを作成し、それぞれの転写活性化因子応答配列を有するプロモーター配列によって駆動されるレポーター遺伝子として G-Luc および GFP を有する標識プラスミドを作成した。これらのプラスミドを一過性に導入した HuH-7.5 細胞に JFH1 を感染させたところ、非感染細胞に比較して非常に高いレポーター遺伝子発現が観察された。

D. 考察

HuS-E/2 細胞で恒常的に産生されている IFN- α の活性を抑制することで JFH1 感染に対する IFN 関連遺伝子群の発現誘導が遅延し、JFH1 遺伝子量の著しい上昇が認められたことから、この恒常的 IFN- α がヒト肝細胞の抗 HCV 自然免疫系に役割を有することが考えられた。したがって、本来の肝細胞に近い性質を有する細胞に HCV を効率良く感染させる方策の一つはこの恒常的 IFN- α の機能を抑制することで有る可能性が考えられた。

独自の方法によりクローン化することに成功しているヒト肝幹細胞 HYM1 細胞は、肝細胞培養用培地による培養によって培地に効率良くアルブミンを産生し、グリコゲンを細胞内に蓄積し、インドシアニングリーンを効率良く取り込んだことから、成熟肝細胞への分化が可能であることがわかった。一方、CYP3A4 遺伝子の発現は低レベルであり、またリファンピシンによる遺伝子発現誘導は有為なものが認められないことから、現時点での培養方法では完全に成熟した肝細胞には分化していないことが考えられた。しかしながら、マトリゲルを用いた胆管誘導立体培養条件では効率良く、これ

までの報告同様の胆管様構造を形成し、内腔への物質輸送能を示したことから、この細胞は胆管上皮への分化能を持つことが認められた。これらのことから、HYM 細胞がこれまで報告されてきたような肝細胞と胆管上皮細胞への二方向性の分化能を有する肝幹細胞であることが強く示唆された。今後は、肝細胞分化条件の至適化により、より成熟度の高い肝細胞への分化が可能になる可能性が考えられた。

今回、用いた HCV 感染細胞標識系は HCV のプロテアーゼ活性の検出を利用したものであり、定性的な実験には利用が可能であることがわかった。しかしながら、ウイルス非感染時におけるレポーター遺伝子の発現がまだ認められることから、これらを抑制することが可能なシステムの構築が必要であることが考えられた。

E. 結論

本研究で用いている HYM 細胞はヒト肝幹細胞であることが強く示唆された。分化誘導の条件では完全に成熟した肝細胞には至っていないが、HCV の感染がどのような細胞で効率が良いかどうか今後解析を進めて行く必要がある。また、感染実験をおこなう時は、恒常的 IFN- α の活性を抑制した条件下で進めることが必要であると考えられた。HCV 感染標識細胞のモデル系作成には成功したが、今後さらに感染特異性を高めるなどの改良をおこなう必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijikata M. Critical role of interferon- α constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection, PLoS ONE 2014, in press.

2) 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, 145, 658-667, 2013

3) 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.* 430, 592-597, 2013

2. 学会発表

1) 土方 誠、基調講演：“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

2) 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

3) 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

4) 阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、平賀伸彦、今村道雄、脇田隆宇、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

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、脇田隆宇、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

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

肝炎ウイルスの複製増殖および病原性発現機構と薬剤感受性の解析

分担研究者：三浦 直行

分担研究課題：HCV 感染性マウスの作製

研究要旨：HCV侵入機構について、マウスCd81、Ocln蛋白質が阻害しているかどうかをHuh7.5.1ヒト肝癌細胞に強制発現させて、HCVppの侵入を阻害するかどうかを測定したところ、軽度の阻害に過ぎなかった。一方、NPC1L1のノックダウンでは50%の阻害が認められたことから、マウスCd81、Ocln蛋白質はウイルス侵入の阻害には余り寄与していないことが示唆された。

一方、ウイルス侵入後の複製およびウイルス粒子形成を研究する目的で、HCV genome transgenic mouseを作製した。このマウスでは、血液中に 10^6 copy/mlの感染性ウイルスが検出できた。蔗糖密度勾配法による分析で、密度が本体のウイルスの密度に一致し、RNase処理にも抵抗性を示した。NS4a阻害剤であるBMS790052投与で、肝細胞内および血液中ウイルスのコピーが3分の1に減少することから、ゲノムRNAの複製は起こっていることが示された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)が侵入、複製、粒子形成がおこるマウスを作製することで、HCV感染症の予防、伸展阻止、治療に役立つモデルとしたい。

B. 研究方法

Huh7.5.1細胞へのマウスCd81発現ベクター、マウスOcln発現ベクター、およびSh NPC1L1ノックダウンベクターをリポソーム法で遺伝子導入し、G418で永久発現時株を樹立した。

HCV genome RNA cDNAの5'にヒトpol I promoterを、3'にマウスpol I terminatorを連結したDNAでトランスジェニックマウスを作製した。

(倫理面への配慮)

動物および細胞実験なので、必要ない。

C. 研究結果

マウスCd81、Ocln蛋白質を強制発現させたHuh7.5.1ヒト肝癌細胞は、HCVppの

侵入を阻害するかどうかを検討したところ、HCVppの侵入は20-25%の低下を示し、一方、NPC1L1のノックダウン細胞株では50%の阻害が認められた。

HCV genome transgenic mouseの血液中に感染性ウイルスが認められ、複製阻害剤のBMS790052投与で、ウイルスRNA copyが3分の1になった。

D. 考察

マウスCd81やマウスOcln蛋白質はウイルス侵入の阻害には余りはたっていない、NPC1L1蛋白質は侵入を助けている、と考えられる。

HCV genome transgenic mouseは感染性粒子が産生されることから、マウス肝細胞で、ウイルスゲノム複製と粒子形成が起こっていると考えられる。

E. 結論

1) マウスCd81、Ocln蛋白質はウイルス侵入阻害には関わっていない。

2) HCV genome transgenic mouse は感染性のウイルスを産生し、マウス肝細胞でウイルスの複製、粒子形成が起こっている事が判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hollier BG, Tinnirello AA, Werden SJ, Evans KW, Taube JH, Sarker TR, Sphyris N, Shariati M, Kumar SV, Battula VL, Herschkowitz JI, Guerra R, Chang JT, Miura N, Rosen JM, Mani SA: FOXC2 expression links epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in breast cancer. **Cancer Res** 73: 1981-1992, (2013).

2. Kimura W, Sharkar MTK, Sultana N, Islam MJ, Uezato T, Miura N: Generation and characterization of Tbx1-AmCyan1 transgenic reporter mouse line that selectively labels developing thymus primordium. **Transgenic Res** 22: 659-666, (2013).

3. Gozo M, Aspuria P-J, Dong-Joo Cheon, Walts AE, Berel D, Miura N, Karlan BY, Orsulic S: Foxc2

induces Wnt4 and Bmp4 expression during muscle regeneration and osteogenesis.. **Cell Death Differ** 20: 1031-1042, (2013).

4.. Ivanov IK, Agalarov y, Valmu L, Samuilova O, Houhou N, Hajjami MH, Normén C, Jaquet M, Miura N, Zangger N, Ylä-Herttuala S, Delorenzi M, Petrova TV: Phosphorylation regulates FOXC2-mediated transcription in lymphatic endothelial cells. **Mol Cell Biol** 33: 3749-3761, (2013).

5. Wu Y-X, Sato E, Kimura W, Miura N: Baicalin and scutellarin are proteasome inhibitors that specifically target chymotrypsin-like catalytic activity. **Phytother Res** 27: 1362-1367, (2013).

2. 学会発表

Mohammad Islam、則武秀尚、三浦直行：C型肝炎ウイルスの感染機構の解析、第65回日本細胞生物学会大会。2013年6月19-21日、名古屋

G. 知的所得権の出願・登録状況なし

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 25 年度）

肝炎ウイルスの複製増殖および病原性発現機構と薬剤感受性の解析

分担研究者：水口 裕之（大阪大学大学院薬学研究科 教授）
研究協力者：櫻井 文教（大阪大学大学院薬学研究科 准教授）
高山 和雄（大阪大学大学院薬学研究科 大学院生）
國戸 偉丸（大阪大学薬学部 学部生）

分担研究課題：IL28B 遺伝子領域に一塩基多型を持つヒト iPS 細胞由来分化肝細胞を用いた抗 HCV 薬評価系の開発

研究要旨：

安全性が高く、高い治療効果を有する革新的C型肝炎治療薬創成に向けては、利便性の高いC型肝炎ウイルス（Hepatitis C virus; HCV）in vitro感染評価系の構築が必要不可欠である。これまでに我々は、ヒトES/iPS細胞より高効率に肝細胞を分化誘導することに成功するとともに、それらにHCVレプリコンを導入したところ、HCVレプリコンが維持・複製されることを報告してきた。本研究課題では、IL28B遺伝子近傍に一塩基多型（SNP）を有するヒトiPS細胞を用いて、HCVの複製・自然免疫応答の違いを検討するとともに、それらを用いて抗HCV薬の薬効評価を行うことを目的とする。本年度は、①各種ヒトESおよびiPS細胞のIL28B遺伝子近傍のrs8099917の解析、②ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞における種々の関連因子の発現レベルの解析と、③実際に分化誘導肝細胞にHCVが感染可能か否かを検討した。

A. 研究目的

高い治療効果を有し、かつ副作用の少ない革新的なC型肝炎治療薬の創成に向けては、利便性の高いC型肝炎ウイルス（Hepatitis C virus; HCV）in vitro感染評価系の構築が必要不可欠である。これまでに、in vitroにおけるHCV感染評価系としては、主にHCVレプリコン発現細胞が使用されてきた。しかしながら、HCVレプリコン発現細胞に用いられるHuh7.5.1細胞などは、HCV感染後の自然免疫応答能が低い（または欠損した）細胞であるため、HCV感染による自然免疫応答が評価できない。また、近年IL28B遺伝子近傍のSNPをはじめとして、種々のSNPがリバビリンおよび1型インターフェロン（IFN）による治療効果に影響を及ぼすことが報告されているが、HCVレプリコン細胞ではSNPによる影響を比較検討できない。

一方で近年、HCVの新たなin vitro感染

評価系として、ヒトES/iPS細胞より分化誘導した肝細胞が注目を集めている。我々は、これまでにヒトES/iPS細胞より高効率に肝細胞を分化誘導することに成功するとともに、それらの細胞にHCVレプリコンを導入したところ、HCVレプリコンが維持・複製されることを報告してきた。ヒトES/iPS細胞より分化誘導した肝細胞は、様々な遺伝的バックグラウンドをもつ細胞より調製可能であることから、HCV感染・複製や抗HCV薬の薬効における遺伝的バックグラウンドの影響について検討可能であると考えられる。さらには、近年のゲノム編集技術の進展により、人工的にSNPを有する細胞を作り出すことが可能になると期待される。

そこで本研究では、既にリバビリンおよび1型IFNによる抗HCV活性に影響を及ぼすことが報告されているIL28B遺伝子近傍のSNPを有するヒトES/iPS細胞から肝細胞を分化誘導し、SNPが上記薬剤の抗HCV活

性に及ぼす影響を評価可能か検討する。さらに、SNP が HCV の感染や自然免疫活性化に及ぼす影響についても検討する。本年度は、①各種ヒト ES および iPS 細胞の IL28B 遺伝子近傍の SNP である rs8099917 の解析、②ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞における種々の関連因子の発現レベルの解析と、③実際に分化誘導肝細胞に HCV が感染可能か検討した。

B. 研究方法

B-1. 各種ヒト ES/iPS 細胞における rs8099917 の解析

各種ヒト ES/iPS 細胞よりゲノム DNA を回収したのち、ABI Taqman allelic discrimination kit (ABI 社)を用いて、IL28B 遺伝子近傍の SNP である rs8099917 について解析した。

B-2. ヒト iPS 細胞から肝細胞の分化誘導

ヒト iPS 細胞株 (Dotcom) から肝細胞への分化誘導は、著者らが過去に報告した Ad ベクターを用いた FOXA2、HNF1 α 遺伝子導入法 (Takayama K., Mizuguchi H., et al. J Hepatol. 2012) を改良した方法で行った。

B-3. ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞における HCV 受容体、IFN 受容体および自然免疫受容体の発現解析

ヒト iPS 細胞株 (Dotcom 株) から肝細胞に分化誘導したのち、Total RNA を回収し、定量的 RT-PCR により HCV 受容体、IFN 受容体ならびに自然免疫受容体について、その発現レベルを解析した。またコントロールとしては、凍結ヒト初代肝細胞を用いた。

B-4. ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞への C 型肝炎ウイルスの感染および Interferon-stimulated gene の発現解析

ヒト iPS 細胞株 (Dotcom) から分化誘導した肝細胞に対し、Cell cultured HCV (JFH-1 株、HCVcc) を MOI0.5 で作用させたのち、経時的に Total RNA を細胞より回収した。回収した RNA を用いて定量的

RT-PCR により、HCV ゲノム量、IFN および ISG mRNA 量を検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト ES 細胞および iPS 細胞における SNP 解析については、(独) 医薬基盤研究所 (研究分担者が招へいプロジェクトリーダーを兼任) および大阪大学における倫理審査を受け、承認されたのちに実施した。

C. 研究結果

C-1. 各種ヒト ES/iPS 細胞における rs8099917 の解析

ヒト ES 細胞 5 株、ヒト iPS 細胞 12 株における rs8099917 の SNP について検討したところ、ヒト ES 細胞 1 株、ヒト iPS 細胞 2 株がマイナーアレル (T/G) であった。その他の株についてはすべてメジャーアレル (T/T) であった。

C-2. ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞における HCV 受容体、IFN 受容体および自然免疫受容体の発現解析

次に、ヒト iPS 細胞より分化誘導した肝細胞における HCV 感染受容体 (CD81, SR-BI, Claudin, Occludin) および自然免疫関連分子 (TLR3, RIG-I, IPS-1) や IFN 受容体の発現を定量的 RT-PCR により解析した。その結果、まず HCV 感染受容体に関して、ヒト未分化 iPS 細胞における発現量はヒト初代培養 (凍結) 肝細胞の 40% 以下であり、特に SR-BI、Claudin はほとんど発現が認められなかった。それに対し、肝細胞に分化することで、4 種の HCV 感染受容体は大きく発現量が上昇した。特に、Occludin、CD81、SR-BI については、ほぼヒト初代培養肝細胞と同程度の発現が検出された。

自然免疫関連分子について検討したところ、RIG-I についてはヒト初代培養肝細胞、未分化 iPS 細胞、分化誘導肝細胞ともに同程度の発現が見られた。一方で、IPS-1、TLR3 については未分化 iPS 細胞ではヒト初代培養肝細胞と比較し、約 30% 以下と低い値しか示さなかったのに対し、分化誘導肝細胞

においてはヒト初代培養肝細胞と同程度の発現が見られた。

IFN 受容体についても、1 型 IFN の受容体である IFNRA1、3 型 IFN の受容体である IL28RA とともに、未分化 iPS 細胞では低い発現しか認められなかったものの、分化誘導幹細胞ではヒト初代培養肝細胞と比較しやや低い、もしくは同程度の発現が認められた。

C-3. ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞への C 型肝炎ウイルスの感染および Interferon-stimulated gene の発現解析

分化誘導肝細胞に HCVcc を作用させ、感染・増殖するか検討したところ、作用 12 時間後と比較し、48 時間後では約 4 倍に HCV ゲノム量が増加していたことから、分化誘導肝細胞において HCVcc が感染・増殖可能であることが示唆された。さらに、I 型 IFN および ISG の発現についても検討したところ、I 型 IFN の発現は検出限界以下であったものの、ISG15 および OAS1 については、それぞれ作用 48 時間後において 2 倍および 3 倍の発現上昇が認められた。以上の結果より、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は、HCV が感染・増殖可能であるとともに、HCV による自然免疫応答が評価可能であることが示唆された。

D. 考察

現在、ペグインターフェロン (PEG-IFN) とリバビリン (RBV) の併用療法により、Sustained viral response (SVR) 率は大きく向上している。近年、IL28B 遺伝子近傍に存在する SNP が PEG-IFN および RBV の併用療法による治療効果に大きな影響を及ぼすことが明らかになり、抗 HCV 薬の薬効解析における SNP の重要性が明らかになりつつある。しかしながら、既存の HCV の *in vitro* 感染評価系はほとんどが Huh7.5.1 細胞を基盤とする HCV レプリコン発現細胞を使用しており、SNP が抗 HCV 効果および HCV の感染・複製に及ぼす影響に関して検討することができない。そこで本研究では、様々

な遺伝的バックグラウンドを有するヒトから樹立可能な iPS 細胞を用いて肝細胞を分化誘導し、IL28B 遺伝子近傍の SNP が抗 HCV 薬の薬効および HCV の感染・増殖に及ぼす影響について検討した。

本研究では IL28B 遺伝子近傍の SNP のなかでも代表的な SNP である rs8099917 について解析した。その結果、ヒト ES 細胞では 5 株中 1 株、ヒト iPS 細胞では 12 株中 2 株でマイナーアレル (TG) の株が存在した。今後さらに他の株についても解析を進めるとともに、他の SNP についても検討する予定である。

最近の研究では、IL28B 遺伝子近傍の SNP が自然免疫関連因子の発現に影響を与える可能性についても報告されている。Asahina らは、rs8099917 がマイナーアレルの患者では、HCV による自然免疫活性化に関与する因子 (RIG-I、MDA5 など) や IFN-stimulated gene (ISG) の発現がメジャーアレルの患者と比較し、高いことを示した。そこで本年度はまず iPS 細胞由来肝細胞 (Doctom 株、メジャーアレル) において、自然免疫活性化に関与する因子が発現しているか否かについて検討した。その結果、自然免疫活性化に関与する因子はヒト初代培養肝細胞とほぼ同レベルの発現を示した。今後は、rs8099917 がマイナーアレルの iPS 細胞より肝細胞を分化誘導し、上記因子の発現レベルを比較検討する予定である。

今回、iPS 細胞由来分化誘導肝細胞に HCVcc を作用させたところ、作用 48 時間後において 12 時間後と比較し、約 4 倍 HCV ゲノム量が上昇していたことから、著者らが分化誘導した肝細胞では HCV が感染増殖可能であるとともに、ISG の発現上昇も見られたことから、HCV の感染により自然免疫の活性化も誘導されていることが示唆された。しかし今回の検討は、HCVcc 作用 48 時間後までの検討であることから、今後培養時間を延長するとともに、免疫染色などにより HCVcc の感染増殖に関して詳細に検討していく必要がある。

E. 結論

- ヒト ES 細胞 5 株、ヒト iPS 細胞 12 株における rs8099917 の SNP について検討したところ、ヒト ES 細胞 1 株、ヒト iPS 細胞 2 株がマイナーアレル (T/G) であった。その他の株についてはすべてメジャーアレル (T/T) であった。
- ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は、ヒト初代肝細胞と同レベルの自然免疫関連因子ならびに IFN 受容体を発現していた。
- ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は、HCVcc が感染可能であり、ISG の発現上昇も観察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higuchi M, Mizuguchi H. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by two- and three-dimensional culture systems in vitro. *Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application (the Springer publishing)*, in press.
- 2) 長基康人、高山和雄、水口裕之 ; 3次元組織化技術を利用したヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法、遺伝子医学 MOOK、印刷中

2. 学会発表

- 1) 高山和雄、水口裕之、創薬研究への応用を目指したヒト ES/iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の作製技術、京都、第 13 回再生医療学会総会、2014 年 3 月
- 2) 國戸偉丸、櫻井文教、高山和雄、脇田隆宇、立花雅史、水口裕之、ヒト iPS 細胞

由来分化誘導肝細胞を用いた C 型肝炎ウイルスによる自然免疫応答の解析. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 27-30 日 (熊本)

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

肝炎ウイルスの複製増殖および病原性発現機構と薬剤感受性の解析

分担研究者：森石恆司 山梨大学医学部 教授

分担課題名：ウイルス及び宿主因子を標的にした抗 HCV 剤の探索と開発

研究要旨：C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する抗ウイルス剤が登場し、高いウイルス排除率で期待できるようになってきているが、副作用の問題、耐性ウイルスの出現、ウイルス排除後の肝発がんなど解決しなければならない課題もあり、新規抗ウイルス剤・治療薬の開発が今後も必要である。本研究では、ミツバチ産物に含まれる Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) が抗 HCV 活性を示すことを明らかにし、その構造活性相関を検討し、より高い活性をもつ CAPE 誘導体 Caffeic acid n-octyl ester を新規抗 HCV 剤候補として同定した。CAPE のフェニール環は特に必要なく、カテコール環およびエステル側鎖の長さが抗 HCV 活性に重要であった。解析した誘導体の中で Caffeic acid n-octyl ester が最も強い抗 HCV 活性を示し、レプリコン細胞に対して 1 から 2.7 μ M の EC50 値であった。インターフェロンと相乗作用を示し、既存の NS5A 阻害剤および NS5B 阻害剤に対しても相乗作用を示した。しかしながら、NS3 プロテアーゼ阻害剤に対して、相乗作用を示さなかった。以上のことから、Caffeic acid n-octyl ester は抗 HCV 活性をもち、この化合物をもとに新規抗 HCV 開発が期待される。

A. 研究目的

世界で二億人、国内で約 200 万人の感染者がいると推定されている C 型肝炎ウイルスは、感染すると高率に持続感染に移行し、慢性肝炎から肝脂肪化、肝硬変を経て、肝細胞癌を高い確率で発症させる。本邦の肝がん死亡者の約 7 から 8 割は、HCV 感染に起因すると考えられている。抗 HCV 剤が登場したものの、ウイルス排除後に肝がんに至る場合や耐性ウイルスの出現、副作用の問題などが解決されておらず、特に先進国に多い高ウイルス量タイプのウイルス遺伝子型 1 の感染者に対しての治療法は完全に確立されたとは言えない。また、高額な抗 HCV 剤治療費も負担となっており、より安価な抗 HCV 剤開発が求められている。

フラビウイルス科に属する HCV はプラス鎖 RNA ゲノムを持つエンベロープウイルスである。そのウイルスゲノムにコードされている単一のポリプロテイン前駆体は、宿主およびウイルスプロテアーゼによって切断を受け、10 個のウイルス蛋白質としてそれぞれが機能する。C 末端側の領域に非構造蛋白質がコードされ、ウイルスゲノム複製に機能する。NS5A はウイルス複製に必須の非構造蛋白質の一つである。それを標的にした化合物 Daclatasvir は pM レベルで抗 HCV 効果を発揮する

ことが知られている。

本研究では、天然物などからウイルス因子および必須宿主因子を標的にした抗 HCV 剤探索と開発を目的としている。本年度は、ミツバチによる天然産物プロポリスに含まれる Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) に抗 HCV 活性を見だし、それから誘導体を作製し、構造活性相関を検討し、より有効な抗 HCV 剤開発を目指した。

B. 研究方法

遺伝子型 1b の N 株、Con1 株、遺伝子型 2a の JFH1 株のサブゲノムレプリコン細胞および遺伝子型 1b の 0 株のフルゲノムレプリコン細胞を用いて、各化合物の抗 HCV 活性を検討した。Bicistronic に発現するルシフェラーゼ活性を測定し、抗 HCV 効果を評価した。また、細胞毒性は、MTS アッセイを用いた。JFH1 による HCVcc に対する抗 HCV 活性は、real time RT-PCR によってウイルスゲノムを定量し、検討した。脂溶性を示す ClogP 値は Chem Bio Office Ultra 2008 によって求めた。各化合物は既報の方法によって合成し、DMSO に溶解し、使用時に培養液に添加した。インターフェロン誘導能を検討するため、ISG に対する RT-PCR を行った。Caffeic acid n-octyl ester

に対する既存抗 HCV 剤との併用効果を isobologram によってプロットし、さらに CalcuSyn によって EC50、EC75、EC90 値から Combination Index を求めた。

(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山梨大学医学部倫理委員会規程に従って承認を得る。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、個人情報等を厳格に管理、保存する。動物実験は、山梨大学動物実験規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行う。遺伝子組み換え実験は、山梨大学遺伝子組み換え実験安全管理規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行う。放射線及び放射性同位元素を扱う実験は、山梨大学総合分析実験センター放射線障害予防規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行う。

C. 研究結果

CAPE について、その抗 HCV 活性を検討した。濃度依存的に、N 株サブゲノムレプリコンに対して抗 HCV 活性を示し、ウイルス蛋白質の減少も認められた。細胞毒性はほとんど示さず、エステル側鎖部分を検討した結果、C8H17 (Caffeic acid n-octyl ester) がもつとも EC50 値が低く (2.7 μ M)、CC50 値が 71.7 μ M で、SI 値が 26.6 と高い値を示した。それより長い C10H21 では逆に抗 HCV 活性が低く毒性も高いことから、ClogP 値が 5 付近が最適であると思われる。また、CAPE の側鎖にあるフェノール環は、抗 HCV 活性に重要でないことが分かった。Caffeic acid n-octyl ester のカテコール環の水酸基を修飾・欠損させたとき、抗 HCV 活性が低下したことからカテコール環が抗 HCV 活性に重要であることが分かった。また、Caffeic acid n-octyl ester の抗 HCV 活性は、細胞株で変動し、EC50 が 1 から 2.7 μ M で、CC50 が 60 から 71 μ M、SI が 26.6 から 63.1 であった。また HCVcc の EC50 は 1.8 μ M でほぼレプリコン細胞の値と同等であることから、主な標的はウイルス複製と考えられた。Caffeic acid n-octyl ester および CAPE の添加によって ISG が誘導されないことから、それらの抗 HCV 活性はインターフェロンを介していないと考えられる。さらに、IFN、Daclatasvir (NS5A 阻害剤)、VX222 (NS5B 阻害剤) に対して相乗作用

を示し、Telaprevir (NS3 阻害剤)、Danoprevir (NS3 阻害剤) に対して相加作用あるいはアンタゴニスト作用を示した。

D. 考察

カテコール環、エステル側鎖の長さが重要であることが分かった。また、エステル側鎖に続くフェノール環にあまり重要な意味はないようである。また、カテコール環の水酸基の位置と数は重要であることが分かった。エステル側鎖の長さも C10 程度が最適で、Caffeic acid n-octyl ester が解析した中では最も高い抗 HCV 効果を示した。ウイルス遺伝子型やレプリコン株間で差が見られたが、1 から 2 μ M とほぼ同等と言える。また、HCVcc 系との EC50 の差が見られないことから、ウイルス複製機構のどこかが標的となっていると考えられる。NS3 阻害剤との併用で、相乗作用が強く見られないことから、NS3 プロテアーゼに間接的あるいは直接的になんらかの作用が想像でき、それら既存薬剤と拮抗しているのかもしれない。

E. 結論

CAPE およびその誘導体の中で、最も抗 HCV 効果が高かったのは Caffeic acid n-octyl ester であった。この化合物から新規抗 HCV 剤開発に繋がることを期待する。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, Matsuura Y, Mizuguchi K: Understanding the Biological Context of NS5A-Host Interactions in HCV Infection: A Network-Based Approach. *J. Proteome Res.*, 12: 2537-2551, 2013
2. Tani J, Shimamoto S, Mori K, Kato N, Moriishi K, Matsuura Y, Tokumitsu H, Tsuchiya M, Fujimoto T, Kato K, Miyoshi H, Masaki T, Kobayashi R: Ca(2+)/S100 proteins regulate HCV virus NS5A-FKBP8/FKBP38 interaction and HCV virus RNA replication. *Liver Int.*, 33: 1008-1018, 2013

3. 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.*, 87: 12541-12551, 2013
 4. 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*, 8: e82299, 2013
2. 学会発表
1. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Moriishi K. 20th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, October 6-10., 2013
 2. Moriishi K. Exploitation of host functions by hepatitis C virus. 2013 Italy-Japan Liver Workshop "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links", Trapani, Italy, October 20-21, 2013
 3. 葛西宏威、吉村健太郎、安本順、山下篤哉、田中智久、竹田扇、森石恆司。Probe electrospray Ionization 質量分析法 (PESI-MS) を用いた HCV 感染細胞内脂質組成の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
 4. 山下篤哉、沈暉、田中智久、葛西宏威、森石恆司。Caffeic acid phenethyl ester とその類縁化合物による HCV ゲノム複製阻害。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
 5. 安本順、葛西宏威、吉村健太郎、山下篤哉、田中智久、竹田扇、森石恆司、B 型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の超微形態変化の解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
 6. 田中智久、葛西宏威、山下篤哉、森石恆司、日本産ウマの血清から分離した non-primate hepacivirus の性状解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
 7. 森石恆司、教育セミナー：HCV に近縁なヘパシウイルスの構造と日本産ウマからの検出、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
 8. 天野稜大、山下篤哉、葛西宏威、田中智久、前川伸哉、榎本信幸、津吹政可、森石恆司、Tyrophostin とその類縁化合物による C 型肝炎ウイルス複製阻害、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日～6 日、神戸
- H. 知的所有権の出願・登録状況
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）
分担研究報告書（平成 25 年度）

肝炎ウイルスの複製増殖および病原性発現機構と薬剤感受性の解析

分担研究者：八木清仁

研究協力者：近藤昌夫、渡利彰浩、松久幸司、長瀬翔太郎、山下真代、
飯田愛実、川東祐美

分担研究課題：ヒト iPS 細胞を利用した HCV 侵入・複製に関わる宿主側因子の探索と治療薬候補物質の評価

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の肝細胞における感染・複製機構の解析はC型肝炎克服に向けた最重要課題であるものの、既存のヒト肝細胞初代培養系は利便性・汎用性に乏しく、依然としてヒト肝がん細胞株を用いた解析が主流となっている。またHCVプロテアーゼ阻害剤などの開発により治療成績の向上が見られているが高額な治療費が問題となっており、より安価な治療薬の開発が求められる。本研究では、ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いてHCVの感染・複製を解析し、本細胞のHCV研究への応用の可否を検証すると同時に新たなHCV創薬ターゲットを同定すること、およびより安価に製造可能な新たなHCV治療薬候補分子を見出すことを目的とする。平成25年度は、大阪大学水口裕之教授グループが確立したヒトiPS細胞由来肝細胞誘導系を用いて肝細胞に至る各分化段階における遺伝子発現をアレイ解析し、HCV侵入および複製に必須な宿主因子の候補遺伝子の絞り込みを行った。また、安価に製造可能なHCV治療薬候補としてシイタケ菌糸体抽出物および低分子化リグニンの肝保護作用および抗HCV作用の解析を行った。

A. 研究目的

我が国には 200 万人余りの HCV 感染者がいると推定されており、肝癌の 80%は HCV 感染者が占めている。現在 HCV 治療法のゴールドスタンダードとしてインターフェロン・リバビリン併用療法が実施されているが、難治性 Ib 型ウイルスの高ウイルス量患者に対する奏成功率は 50%に過ぎないこと、薬剤耐性ウイルスが出現しやすいこと、副作用発現により治療の中断を余儀なくされる患者がいることが临床上大きな問題となっている。また HCV プロテアーゼ阻害剤との 3 剤併用により奏効率の上昇がみられているが高額な医療費を必要とするため安価な治療薬の開発が必要である。2005 年感染研脇田らによりヒト肝がん細胞株を用いた

2a 型 HCV の培養系が樹立され、HCV 複製機構の解析および HCV ワクチン開発の端緒となったものの、依然として難治性 Ib 型 HCV の培養系開発は立ち遅れている。肝細胞は増殖性に乏しい上に培養系では急速に肝細胞としての性質を消失すること、多能性幹細胞からの肝細胞分化誘導系が構築されていないことから、ヒト肝細胞を用いた HCV 感染・複製評価研究はヒト肝がん細胞株やヒト肝臓キメラマウスを利用したアプローチしか無く、ここに HCV 研究の難しさがあると言える。

研究分担者水口裕之博士は、自身が代表を務める先端医療開発特区（スーパー特区）『ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築』において、独自の遺伝子導

入技術を駆使したヒト iPS 細胞の肝細胞分化誘導法開発を推進し、世界最高水準の肝細胞分化誘導法を確立している。また、当研究グループでは、*in vitro*・*in vivo* において高い遺伝子導入効率を有し、汎用性・利便性に優れたアデノウイルスベクターを用いて HCV ゲノム導入ベクターシステムを開発している。

これまでの研究では水口裕之教授グループが確立したヒト iPS 細胞由来肝細胞誘導系を用いて、初発のヒト iPS 細胞から内胚葉細胞、肝幹前駆細胞を経由し肝細胞へ至る分化過程における HCV 侵入能、複製能の変化を明らかとするため、HCV シュードタイプウイルス (HCVpv) による侵入能解析、及び当研究グループで開発した HCV サブゲノム発現アデノウイルスベクターによる HCV 複製能解析を実施した。その結果、HCVpv の侵入はヒト iPS 細胞、内胚葉細胞、肝幹前駆細胞の段階で観察されず、最終段階の iPS 細胞由来肝細胞のみで成立した。一方、HCV サブゲノムの複製は内胚葉細胞の段階から観察され、分化誘導の初期に HCV ゲノム複製能が獲得されることが示唆された。そこで本研究では、新たな抗 HCV 薬創製におけるターゲット分子の創出に向けて、iPS 細胞由来肝細胞の各分化段階における遺伝子発現をアレイ解析することで、HCV 侵入能、複製能に関わる新規宿主因子の同定を試みた。

また、近年、インターフェロン・リバビリンと HCV プロテアーゼ阻害薬の併用療法で優れた治療効果が報告されているが、その薬価は高額であり、HCV 治療における患者の経済的負担および保険適用による国庫への負担は無視できない問題である。従って、より安価な HCV 治療薬の開発もまた、HCV 治療における課題の一つであると考えられる。2008 年、東口らにより、シイタケ

菌糸体およびその培養基から熱水により抽出した成分である *Lentinus edodes* mycelia (LEM) 抽出物の投与により、C 型肝炎患者の病態が改善したとの報告がなされている。そこで本研究では、LEM 抽出物およびその肝保護作用の本体分子である低分子化リグニンの C 型肝炎に対する有効性の解析を行い、安価な HCV 治療薬候補物質としての有用性の検証を試みた。

B. 研究方法

1. ヒト iPS 細胞由来肝細胞

実験に供したヒト iPS 細胞、ヒト iPS 細胞由来内胚葉細胞、ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞、ヒト iPS 細胞由来肝 (ヒト iPS-hep) 細胞は、大阪大学大学院薬学研究科・水口裕之教授グループによって作製されたものを使用した。

2. ヒト iPS 細胞由来細胞における発現遺伝子の解析データマイニング

iPS 細胞、ヒト iPS 細胞由来内胚葉細胞、ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞、ヒト iPS-hep 細胞における遺伝子発現のマイクロアレイ解析データを用いた発現解析データマイニングを、北海道システムサイエンス社に委託し、行った。

3. コンカナバリン A (ConA) 誘導性肝障害モデルマウスを用いた肝保護効果の評価 (1) 肝傷害マーカー (ALT、AST) または肝細胞壊死を指標とした肝保護実験

6 週齢の雄性 BALB/c マウス (清水実験材料) に、PBS (-) に溶解させた 20 mg/kg body weight の LEM 抽出物 (小林製薬より提供) または PBS (-) を腹腔内投与した直後に、PBS (-) に溶解させた 20 mg/kg body weight の ConA (生化学バイオビジネス) を尾静脈

より投与し、急性肝傷害モデルマウスを作製した。ConA 投与より 24 時間後にマウスにペントバルビタールナトリウム (Nacalaitesque 社) による麻酔を処置し、心臓より血液を回収した後、生理食塩水を灌流し脱血し、肝切片を回収し 4 % Paraformaldehyde Solution に浸潤させて固定した。血液は室温で 1 時間静置後、4 °C、6000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を血清として用いた。血清中 AST 濃度および ALT 濃度の測定は、トランスアミナーゼ CII-テストワコー (和光純薬) を用いて、メーカーのプロトコールに従い、行った。固定後の肝臓切片のヘマトキシリン・エオジン染色は大阪血清に委託し、行った。

(2) 血清中サイトカイン濃度の測定を目的とした肝保護実験

6 週齢の雄性 BALB/c マウスに、PBS(-) に溶解させた 10 mg/kg body weight の LEM 抽出物または PBS(-) を腹腔内投与した直後に、PBS(-) に溶解させた 20 mg/kg body weight の ConA (生化学バイオビジネス) を尾静脈より投与した。投与より 3 時間後にマウスにペントバルビタールナトリウム (Nacalaitesque 社) による麻酔を処置し、血液を心臓より採取した。血液は室温で 1 時間静置後、4 °C、6000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を血清として用いた。血清中サイトカイン濃度の測定は、Mouse TNF- α Immunoassay Kit、Mouse IL-6 Immunoassay Kit (以上、BIOSOURCE 社)、Mouse IFN- γ Immunoassay Kit (R&D system 社) を用い、各製品のプロトコールに従って行った。

4. HCV 感染阻害実験

(1) HCV シュードウイルス (HCVpv) を用いた HCV 感染阻害実験

HCV 感染阻害実験には、ルシフェラーゼ遺伝子を有する HCV シュードウイルス (HCVpv: 水泡性口内炎ウイルス (VSV) のエンベロープを HCV エンベロープに置換したウイルス) を使用し、ルシフェラーゼ活性を指標に HCV 感染を評価した。

Huh7.5.1 細胞を、96 well black plate (nunc) に 1.0×10^4 cells 播種し、24 時間後に LEM (小林製薬より提供) またはリグニンアルカリ (Sigma) および HCVpv を混合した培地に置換した。その 24 時間後に細胞より上清を除去し、LT2.0 (東洋紡) を 100 μ l 添加し、各 well の発光をマイクロプレートリーダー (Trister LB941; berthold) により測定した。なお LEM およびリグニンアルカリは、培地により 1 mg/ml の濃度に溶解した後、0.22 mm の PVDF フィルター (Millipore) を用いて濾過した後、使用した。

(2) 細胞培養系により作製した HCV 粒子 (HCVcc) を用いた HCV 感染阻害実験

Huh7.5.1 細胞を 24 well plate (Falcon) に 1.3×10^4 cells 播種し、24 時間培養した。その後上清を除き、LEM 抽出物またはリグニンアルカリを培地により 1 mg/ml に調整したもの、HCVcc および培地を用いてそれぞれの作用濃度に調整した混合液を 37°C、30 分静置したものを 500 μ l 添加した。37°C、5%CO₂、飽和蒸気圧化で 2 時間インキュベートした後上清を除去し、培地で 1 度 wash した後、培地を 500 μ l 添加して 3 日間培養した。その後、RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、HCV RNA 量および GAPDH mRNA 量を TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents kit (Applied Biosystems) および ViiA 7 real time PCR system (Applied Biosystems) を用いて taqman real-time RT PCR を行い、 $\Delta\Delta$ Ct 法により定量した。

用いたプライマーの配列は以下の通り。
GAPDH primer(5' - TGT AGT TGA GGT
CAA TGA AGG G -3' および 5' - ACA TCG
CTC AGA CAC CAT G -3' taqman
probe : 5' -FAM- AAG GTC GGA GTC AAC GGATTT
GGT C -TAMRA -3')。 HCV RNA (5' -
AACTACTGTCT TCACGCAGAAAGC -3' および 5'
-CCCAACTACTCTCGGCTAG -3' taqman probe :
5' -FAM-TGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAG-TAMRA
-3')。

5. HCV 複製阻害実験

(1) HCV レプリコン細胞

本実験では HCV 複製を検討する上で HCV レ
プリコン細胞である Huh7.5.1 1bFeo 細胞
(北海道大学坂本直哉教授より供与) を使用
した。Huh7.5.1 1bFeo 細胞は自律的に複製
可能な HCV RNA を細胞内に有している細胞
である。この HCV RNA は、複製に必須で
ない構造遺伝子のゲノムをルシフェラーゼ
遺伝子、neomycin 耐性遺伝子に置き換えた
HCV RNA であり、HCV 複製をルシフェラーゼ
を指標とすることで解析可能である。

(2) ルシフェラーゼ活性を指標とした HCV 複製実験

Huh7.5.1 1bFeo 細胞を、96 well black
plate (nunc) に 2.0×10^4 cells 播種し、
24 時間後に LEM を混合した培地に置換した。
その 72 時間後に細胞より上清を除去し、
LT2.0 (東洋インク) を 100 μ l 添加し、各
well の発光をマイクロプレートリーダー
(Trister LB941; berthold) により測定し
た。尚、WST-8 試薬 (Nacalai tesque 社)
を用いて細胞生存率も測定した。

(3) HCV RNA 量を指標とした HCV 複製実 験

Huh7.5.1 1bFeo 細胞を、24 well plate

(Falcon) に 8.0×10^4 cells 播種し、24
時間後に LEM (小林製薬より提供) を混合し
た培地に置換した。その 72 時間後に細胞よ
り上清を除去し、trizol (Life Technology)
を用いて、メーカーのプロトコールに従い
RNA を精製した。精製した RNA を注射用水
(大塚製薬) 30 μ l により溶解し、そのう
ち 2 μ l を用いて、6mer random
deoxyoligonucleotides (Invitrogen) を
プライマーとして、AMV reverse
transcriptase (Takara) および S1000
Thermal cycler (BIORAD) を用いて、メー
カーのプロトコールに従い逆転写を行い、
cDNA を作製した。作製した cDNA 2 μ l を用
いて、SYBR premix ExtaqII (Takara) およ
びリアルタイム PCR 装置 (stepone plus ;
Applied biosystems) を用いて、相対定量
法により HCV RNA および GAPDH mRNA 量
を測定した。なお、HCV RNA の量は、
GAPDH の mRNA 量により除することで補
正を行った。なお、リアルタイム PCR
による解析の際に用いた primer の配列は
以下の通りである。HCV RNA forward :
5' - CGTAACACCAACGGGCG
CGCCATG -3' , reverse : 5' - CTCGTCCTG
CAGT TCATTCAGGGC -3' ; GAPDH forward :
5' - GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA -3' ,
reverse : 5' - GTGGTCGTTGAGGGAATG -3'

(倫理面への配慮)

ヒト iPS 細胞の使用に際し大阪大学のヒ
ト組織・ヒト初代培養細胞研究審査を受け、
承認されている。

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞由来細胞の各分化段階に おける発現遺伝子の解析

これまでの解析により、ヒト iPS-hep 細
胞は HCV 感染受容体 (CD81、SR-BI、

claudin-1, occludin) を発現していること、HCVpv の感染は内胚葉細胞、肝幹前駆細胞の段階で観察されず、最終段階の iPS-hep 細胞でのみ成立すること、HCV サブゲノムの複製は内胚葉細胞の段階から発現が見られ、分化誘導の初期に複製能を獲得することが明らかとなった。

そこで、HCV の細胞への侵入および HCV の細胞内での複製に必須の宿主因子を新たに同定するため、ヒト iPS 細胞由来細胞の各分化段階であるヒト iPS 細胞、ヒト iPS 細胞由来内胚葉細胞、ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞、ヒト iPS-hep 細胞(分化直後、および分化より 15 日間培養後)における遺伝子発現のマイクロアレイ解析を行った。

HCV 侵入および複製に関与する候補遺伝子を絞り込むため、遺伝子発現のマイクロアレイ解析により得られたデータを以下のように抽出した。まず、全ての細胞群においてシグナルの低い遺伝子を除外した (STEP1)。次に、ヒト iPS 細胞に比べ他の細胞群において有意差のある遺伝子を抽出した (STEP2)。さらに、STEP2 にて抽出された遺伝子群より、ヒト iPS 細胞に比べ他のいずれかの細胞群において 2 倍以上の変動が見られる遺伝子を抽出した (STEP3)。

次に、STEP3 において抽出された遺伝子群に対してクラスター解析を行った。まず、HCV の侵入に必須な宿主因子の候補遺伝子を抽出するため、以下のようなクラスター解析を行った。最初に、ヒト内胚葉細胞および肝幹前駆細胞では発現の変動が見られず、ヒト iPS-hep 細胞 (分化直後) においてシグナルが 2 倍以上変化する遺伝子群を抽出した。抽出した遺伝子群を、ヒト iPS-hep 細胞へと分化して上昇した遺伝子発現の発現レベルが分化後の培養でも維持されている遺伝子群 (発現レベル上昇の程度によりクラスター1 (軽度)、クラスター3

(中程度)、クラスター5 (高度) に分類)、ヒト iPS-hep 細胞へと分化して遺伝子発現の発現レベルが低下した遺伝子群 (クラスター2)、ヒト iPS-hep 細胞へと分化して上昇した遺伝子発現の発現レベルが分化後の培養により低下している遺伝子群 (クラスター4) の 5 つに分類した (Fig. 1)。これらのクラスターのうち、ヒト iPS-hep 細胞において高い発現レベルを示す遺伝子群であるクラスター3 (88 個)、クラスター5 (11 個) の計 99 個が HCV の侵入に必須な宿主因子の候補遺伝子として有望であると考えられた (Fig. 2 and table 1, 2)。

また、HCV の複製に必須な宿主因子の候補遺伝子を抽出するため、ヒト肝幹前駆細胞より徐々に発現レベルの上昇する遺伝子群をクラスター解析により、上述の STEP3 において抽出した遺伝子群より抽出した。その結果、33 個の遺伝子が HCV の侵入に必須な宿主因子の候補遺伝子として有望であると考えられた (Fig. 3 and table 3)。

2. シイタケ菌糸体抽出物 (LEM) の肝保護効果の検討

ウイルス性肝炎モデルとして汎用される ConA 誘導性肝障害モデルマウスを用いて、LEM の肝保護効果を評価した。その結果、LEM を投与することにより肝障害マーカーである ALT、AST の血清中レベルおよび肝臓における肝細胞壊死が抑制され、LEM が肝保護作用を有することが明らかとなった (Fig. 4)。また、血清中の炎症性サイトカイン (TNF-alpha、IFN-gamma、IL-6) を測定したところ、LEM の投与により ConA 単独群に比べてこれら炎症性サイトカインの血清中レベルが低下していたことから、LEM は免疫細胞からの炎症性サイトカインの産生を抑えることで肝臓での炎症を抑制する