



疫応答が惹起される)<sup>3)</sup>。Balb マウスに C2D-B6 マウスの脾細胞を門脈内投与すると、脾細胞を貪食した LSEC は MHC class II, CD80 および FasL の発現を増強する。C2D-B6 の脾細胞を門脈投与した Balb マウスから単離した LSEC の pore membrane 上に naïve な Balb 由来 T 細胞を重層培養すると、トランスマイグレートした T 細胞はドナー特異的に増殖応答が抑制された。しかし、C2D-B6 の脾細胞を門脈投与した FasL-deficient Balb マウスの LSEC の pore membrane をトランスマイグレートした naïve な Balb 由来 T 細胞は、正常の抗ドナー増殖応答を示した。以上の結果から、LSEC がドナー抗原を間接認識経路で提示し、Fas-FasL 経路を介して CD4<sup>+</sup> T 細胞を寛容化することが明らかとなった。また、NKT 細胞の存在しない Balb/c CD1d-deficient マウスをレシピエントにした場合、門脈内投与された C2D-B6 ドナー脾細胞の LSEC への貪食が有意に抑制され、寛容が誘導されないことも確認された<sup>8)</sup>。すなわち、LSEC がアロ抗原を貪食し、間接認識経路で抗原提示する T 細胞を寛容化する過程で、NKT 細胞が重要な関わりをもつ可能性が示された。NKT 細胞から産生される IL-4 が、LSEC 上の貪食を促進するマンノースレセプターの発現を促進している可能性が考えられる。

### 5. 類洞内皮キメラの誘導による他臓器移植の免疫制御

肝 LSEC の免疫制御効果は、*in vivo* モデルにおいても確認できた<sup>9)</sup>。

まず、Balb/c マウスの肝臓から LSEC を分離し、T, B, NK 細胞が存在しない免疫不全の recombination activating gene 2 gamma-chain double-knockout B6 (RAG2/gc-KO) マウスに門脈内投与し、肝類洞内皮に生着させた。細胞の門脈内投与に先立ち、マウスに血管内皮障害作用のあるモノクロータリンを腹腔内投与すると LSEC の生着が促進される。このレシピエントマウスに、同系の

B6 マウスの骨髄を移植し免疫再構築させた。MLR では、ドナー Balb/c LSEC 移入により、Balb/c マウスの脾細胞に対するレシピエントマウスの CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 細胞の応答が、サードパーティー-SJL/jorllco (H-2s) マウスの脾細胞に対する応答に比べて有意に抑制された。この抑制効果は、PDL1 ブロッキング抗体投与により消失した。さらに、同様のレシピエント RAG2/gc-KO マウスの頸部にドナー Balb/c マウスの心臓を移植したが、Balb/c LSEC 移入によりドナー移植心の生着が有意に延長した。本結果は、アロ間で類洞内皮キメラが誘導できれば、ほかの臓器移植においても PD1-PDL1 経路を介した免疫制御が可能であることを証明したものである。

### 6. ヒト LSEC の免疫調節機構は？

ヒト肝 LSEC のフェノタイプを解析すると、MHC class II, CB80, CD86, FasL, PDL1 分子の発現は定常状態では、樹状細胞などプロフェッショナル APC に比べて低い。したがって、ヒト肝移植後では、ドナー由来の骨髄系 APC が時間の経過とともに肝内から消失するまでは、上述のような LSEC によるアロ T 細胞の寛容化機構は相殺されるのではないかと推察される。マウスではアロ移植肝の永久生着に免疫抑制剤を必要としないのに対し、ヒトでは免疫抑制剤の使用が少なくとも導入時期には必須である理由ではないかと考えている。

さらに、肝 LSEC が障害されるような病態では、その抗原提示能が減弱し、アロ免疫応答が亢進することが明らかとなった。生体部分肝移植では、肝移植レシピエントの体格に比しボリュームの小さい肝グラフトを移植することが余儀なくされる場合がある。一般に graft-versus-recipient weight ratio (GRWR) < 0.7 の場合、移植成績が悪化することが知られる<sup>10)</sup>。われわれの検討ではこの場合、拒絶反応の発症率が有意に亢進することが確認された。この病態の対応策として、プロスタグラン

ディン E1 を術後数日間門脈内注入して LSEC を庇護すると、アロ免疫応答は抑制され拒絶反応の発症率も低下し、さらには生存率の改善にもつながることを最近報告した<sup>10)</sup>。

今後、さまざまな病態において、ヒト肝 LSEC に MHC class II, CB80, CD86, FasL, PDL1 分子の発現を維持さらには亢進させる安全な方法が確立できれば、肝移植後のドナー特異的免疫寛容が、臨床肝移植においても安定して誘導できるのではないかと考え研究を継続している。

## 肝内 NK 細胞を用いた免疫細胞療法

### 1. 肝細胞癌(HCC)に対する肝移植の問題点

肝臓癌は非代償性肝硬変に合併する 경우가多く、肝予備能の低下した症例では制癌治療が肝不全を誘発する危険を伴う。この場合、肝臓移植が唯一の根治治療となりえるが、進行肝癌の場合では移植後再発の可能性が懸念される。国際的に認知された移植後肝癌再発を回避しえる適応基準に基づき(通称ミラノ基準：腫瘍系 5 cm 以内かつ単発もしくは腫瘍系 3 cm 以内かつ 3 個以内、脈管浸潤、遠隔転移を認めない)、本邦でも 2004 年より非代償性肝硬変合併肝癌に対する肝臓移植が一般保険診療として行われている。しかし、ミラノ基準を逸脱しても移植後再発を認めない症例も少なからず経験されることや、逆にミラノ基準を満たした症例でも再発が認められることもあることから、移植適応基準の再検討と移植後再発を積極的に予防しえる補助制癌療法の確立が急務であると考えられている。

### 2. HCC と NK 細胞

肝移植後の肝癌再発機構としては、術前画像診断では評価しえない肝内微小脈管浸潤や肝外微量播種、さらには手術操作に起因する腫瘍細胞の物理的播種などが関連すると考えられる。肝臓移植後には拒絶反応の回避を目的として免疫抑制剤の

使用が不可欠であるが、これに伴う非特異的な生体防御機構の減弱ゆえ、遺残する微量な腫瘍細胞は排除されにくくなる。生体防御機構は自然免疫応答と獲得免疫応答からなるが、拒絶反応や免疫抑制療法に大きく影響を受けるのは獲得免疫応答である。そこでわれわれは肝臓移植後に自然免疫応答を選択的に増強する制癌免疫療法の可能性について研究を重ねてきた。自然免疫応答を司る NK 細胞は、腫瘍転移形成の初期段階に腫瘍細胞を自己正常細胞から識別し、選択的に殺傷する能力を有するリンパ球である。自己の正常細胞に表出する MHC class I を認識すると抑制性シグナル伝達により細胞傷害は生じないが、癌細胞上に表出する変異 MHC class I は NK 細胞に抑制性シグナルを伝達できず傷害を受けると考えられている(missing-self theory)。最近われわれは、ヒト肝臓内には大量の NK 細胞が含有され、末梢血由来の NK 細胞と異なり、IL-2 による刺激で強力な抗腫瘍分子(TRAIL：tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand、健全な細胞には影響せず腫瘍細胞のみを選択的に標的にする分子)が誘導しえることを確認した(図 4)<sup>11)</sup>。さらに、術後再発率が高い中～低分化 HCC は TRAIL 受容体(death receptors)を高発現し TRAIL を介した細胞死が誘導されやすいことも確認した。肝移植の際には、ドナーから摘出した肝臓をレシピエントに移植する前に臓器保存液で肝臓内血液を置換するために灌流を行うが、この際に回収される灌流液から無菌操作で NK 細胞を効率よく回収するシステムを開発した。さらに、肝 NK 細胞は、末梢血 NK 細胞と異なり自己 MHC 認識抑制性受容体の表出を保持しつつ肝癌細胞に対し強い抗腫瘍活性を誘導しうることが確認できた。

### 3. 肝移植後肝癌再発抑止を目的とした肝由来 TRAIL 表出 NK 細胞移入療法

以上の結果から、肝移植後にドナー肝由来の NK 細胞を *in vitro* で刺激し、TRAIL の発現を誘

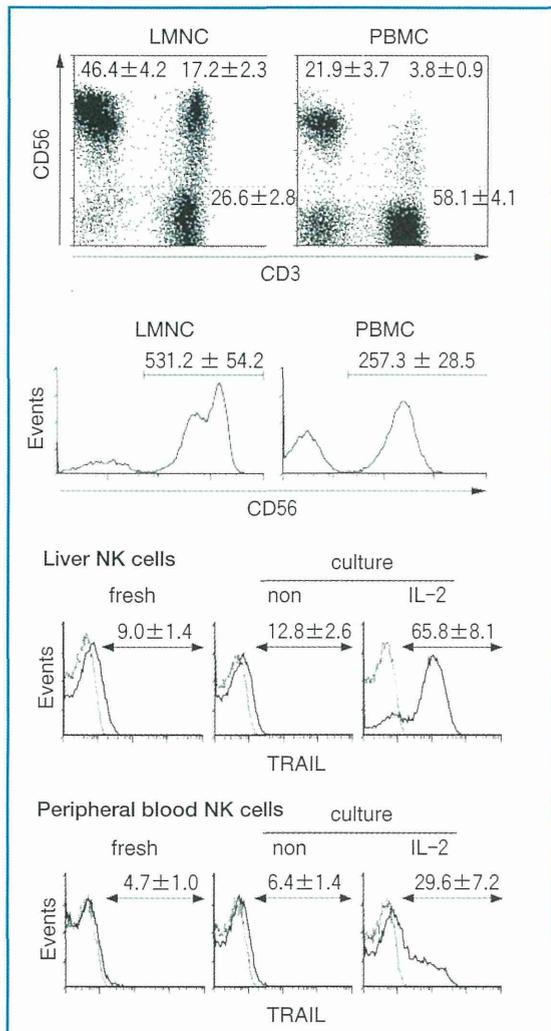


図4 肝NK細胞はIL-2刺激によりTRAIL分子を強く発現する

ヒト末梢血および肝内のCD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>NK細胞上のTRAIL分子の表出をフローサイトメトリーで解析した。

LMNC: liver mononuclear cells, PBMC: peripheral mononuclear cells.

(文献11より引用)

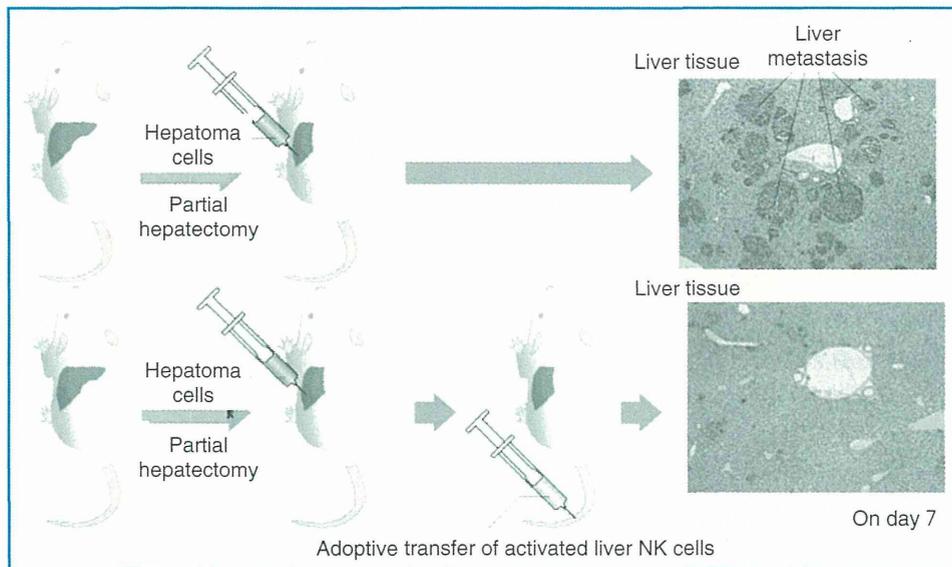
導した後に、レシピエントに移入することで、HCCの再発予防効果が期待できると考えた。マウスでは、肝部分切除後には肝NK細胞のTRAIL表出が有意に低下し、移入した肝癌細胞の肝内生着が促進されることが確認されたが、TRAIL表出NK細胞を外来的に移入することで肝内生着を抑止することが可能であった(図

5)<sup>12) 13)</sup>。この現象を臨床応用して、広島大学病院倫理委員会の承認のもと(第414号)、肝癌症例に対する肝移植後の癌再発予防を目的とした肝NK細胞移入療法を2006年1月より臨床導入した(図6)。現在まで、Stage II以上の肝癌合併肝硬変症例に対し肝移植後の肝由来NK細胞移入療法を施行し、安全性とミラノ基準外症例での有意な無再発生存率の改善が確認された(図7)。本制癌免疫療法は、アメリカ食品医薬品局の承認を得て、米国マイアミ大学と共同で脳死肝移植症例を対象に第I相臨床試験を現在施行中である<sup>14)</sup>。

#### 4. 肝由来NK細胞移入療法のC型肝炎ウイルスに対する効果

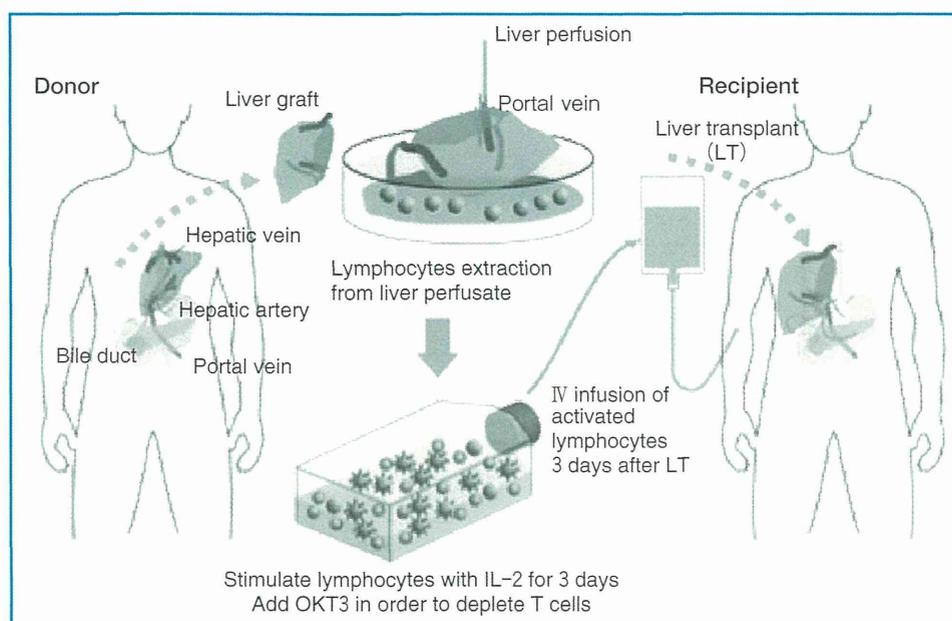
C型肝炎ウイルス(HCV)性肝硬変は肝移植の最も頻度の高い適応疾患の1つであるが、移植後C型肝炎の再発が避けられず、肝炎の進行も移植患者以外と比較すると急速であることがわかっている。HCV陰性患者では術後急性拒絶反応は予後と関連しないのに対し、HCV陽性の移植患者における急性拒絶反応は予後不良因子とされている。HCV肝炎合併例では拒絶反応に対する免疫抑制療法がウイルスの増勢を助長するためと理解されている。したがって、急性拒絶反応とC型肝炎再発、あるいはそのほかの原因とを的確に鑑別し、必要最低限の免疫抑制療法を行うため、個々の患者の免疫状態を把握することが重要となる。信頼性のある免疫監視法の確立が求められるゆえである。われわれは、CFSE細胞質染色とマルチパラメーターフローサイトメトリーを応用したリンパ球混合試験を臨床導入し、T細胞アロ応答の程度をモニターして必要最小限の免疫抑制療法を実践している<sup>15) 16)</sup>。

HCV肝炎の再発治療として、IFN療法が適応となることにはすでにコンセンサスが得られているが、奏効率は決して満足のいくものではない。また、臨床的に肝炎が再発する以前に開始するべきか、あるいは再発後に施行するべきかなど、今



**図5 TRAIL 表出肝 NK 細胞の移入によって肝癌増勢を抑制できる(マウスモデル)**  
 B6 マウスの肝臓を 70 % 切除し Hepa1-6 ヘパトーマ株を門脈内移入すると、肝内に肝癌の転移巣を確認できる (1 週間後)。しかし、TRAIL を表出した同系の肝 NK 細胞を静脈内移入すると (ヘパトーマ移入 3 日後)、肝癌の転移巣は消失する。

(文献 13 より引用)



**図6 癌再発防止を目的とした肝臓癌合併肝移植におけるドナー肝臓内 NK 細胞を用いた術後補助免疫療法の臨床応用 (広島大学倫理委員会 通知番号 414 号)**

肝移植の際に、ドナー肝臓灌流排液から抽出した NK/NKT 細胞を IL-2/抗 CD3 抗体刺激で IFN- $\gamma$  産生能を誘導した後に、肝癌患者あるいは HCV 性肝硬変患者に対する肝移植後に移入する。

(文献 18 より引用)

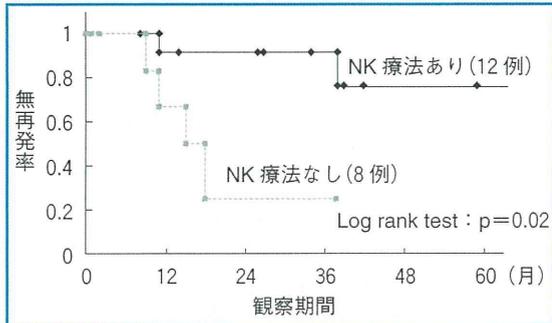


図7 ミラノ基準外症例では、NK 療法施行群において HCC 再発率が有意に低下した

後の検討課題も多く残されている。術前の血小板減少症と脾腫の程度が術後の血小板減少の予測因子となるため、肝移植後早期に IFN 療法を開始する場合には、移植時に脾摘を施行する場合もある<sup>17)</sup>。

最近われわれは、前述の肝由来リンパ球移入療法を施行した HCV 肝炎感染症例では、肝移植後に血中 HCV ウイルス量が有意に減少することを確認した(図 8)<sup>18)</sup>。HCV 感染ヒト肝細胞キメラマ

ウスへのヒト肝由来活性化リンパ球を移入した実験でもこの現象は再現可能であった(図 9)。重度免疫不全マウスと u-PA transgenic マウス(肝臓特異的に u-PA 遺伝子を発現し肝障害を生じる)を掛け合わせた u-PA/SCID マウスに、ヒトの肝細胞を経脾的に移植すると、90%以上ヒト肝細胞に置換される。ヒト肝細胞キメラマウスに HCV RNA 高値患者(genotype 1b)の血清を移入すると、ヒト肝細胞における HCV の感染と複製が確認できる。HCV RNA 患者血清移入 2 週間後に肝由来活性化リンパ球を移入すると、HCV 感染は回避された。しかし、抗 HCV 中和抗体によってこの効果は消失し、肝由来の NK 細胞から産生される IFN- $\gamma$  が、HCV の複製を抑制したためと考えられた。

一般に、ウイルスが感染すると NK 細胞の非特異的応答によりウイルスは排除される。しかし、HCV 感染では HCV の E2 蛋白と NK 細胞上の CD81 分子の結合によって NK 細胞機能が抑制され、高頻度に持続感染に移行する。肝由来の NK

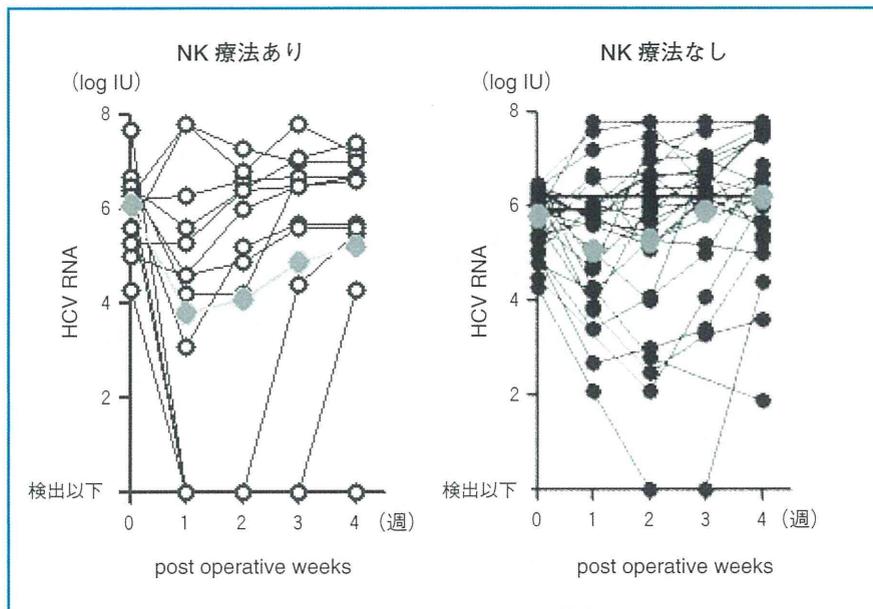


図8 NK 細胞移入療法後には、血清中 HCV RNA 量が低下する  
n=13 each group, グレーの丸は平均値。

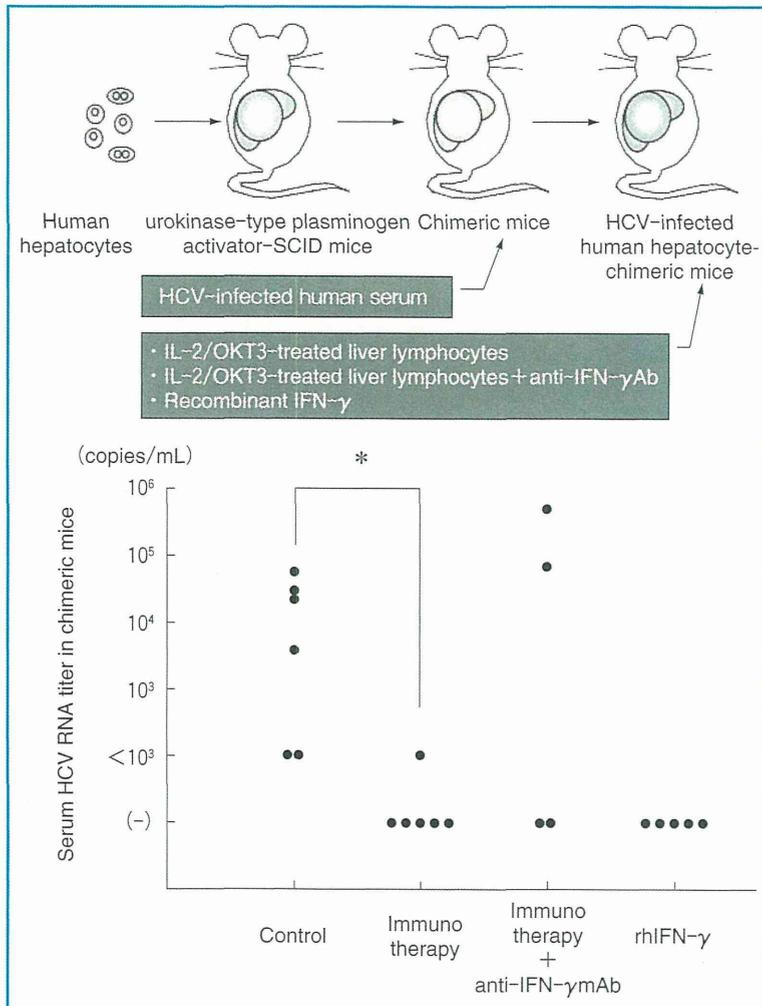


図9 HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスへのヒト肝由来活性化リンパ球移入実験

重度免疫不全マウスと u-PA transgenic マウス(肝臓特異的に u-PA 遺伝子を発現し肝障害を生じる)を掛け合わせた u-PA/SCID マウスに、ヒトの肝細胞を経脾的に移植すると、90%以上ヒト肝細胞に置換される。ヒト肝細胞キメラマウスに HCV RNA 高値患者(genotype 1b)の血清を移入すると、ヒト肝細胞における HCV の感染と複製が確認できる。HCV RNA 患者血清移入 2 週間後に、肝由来活性化リンパ球(±抗 IFN- $\gamma$  中和抗体)あるいはリコンビナント IFN- $\gamma$  を移入した。(文献 18 より引用)

細胞を IL-2/ 抗 CD3 抗体存在下で培養した場合、CD81 を介した抑制機構に抵抗性を示し、IFN- $\gamma$  を介した強い HCV 複製抑制効果を誘導しえることが確認された(特開 2007-332103)<sup>17)</sup>。しかし、術後 1 度きりの NK 細胞移入では、一過性に血中 HCV DNA 量が低下するもののウイルスの排除に

は至ることはない。必要な時期に十分量の NK 細胞を移入することができれば、既存あるいは新規の抗ウイルス療法との併用により、HCV 肝炎を根治できる可能性がある。そこで、末梢血リンパ球、骨髓造血幹細胞あるいは iPS 細胞から、IFN- $\gamma$  産生能の高い NK 細胞を分化誘導するリモデリング法の確立を目指して基礎的研究を継続している。末梢血リンパ球を用いる研究では、至適濃度の IL-2/ 抗 CD3 抗体の存在下で 4 週間培養すると、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK 細胞と CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKT 細胞が 3,000 倍以上に増殖し、80%の純度で回収可能で、IFN- $\gamma$  依存性抗 HCV 効果を誘導することが可能である<sup>19)</sup>。今後、臨床応用の可能性を検討したい。

## 5. 肝由来 NK 細胞移入療法の重傷細菌感染予防効果

肝由来 NK 細胞移入療法は現在まで 1 年以上の観察期間を終えた経験症例は 28 例であるが、1 年生存率は 100%である。NK 細胞療法により、細菌血流感染/菌血症の発症率が有意に低下したことが反映された結果と解釈している<sup>20)</sup>。移植後の免疫抑制剤使用下では、獲得免疫応答は著明に抑制

され、術後の感染防御には自然免疫応答へ比重がかかる。今後、NK 細胞療法を細菌感染予防目的の適応へ拡大することを考慮している。



## まとめ

肝臓外科領域、特に肝臓移植後の周術管理において、免疫学的防御器官として肝臓が示す機能を掌握し、戦略的に制御する可能性について、LSEC, NK細胞, NKT細胞を対象としたわれわれの研究を紹介した。

## References

- 1) Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, et al. Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplantation : immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique. *Transplantation*. 2005 ; 79 : 1262-1267.
- 2) Onoe T, Ohdan H, Tokita D, et al. Liver sinusoidal endothelial cells tolerize T cells across MHC barriers in mice. *J Immunol*. 2005 ; 175 : 139-146.
- 3) Tokita D, Shishida M, Ohdan H, et al. Liver sinusoidal endothelial cells that endocytose allogeneic cells suppress T cells with indirect allospecificity. *J Immunol*. 2006 ; 177 : 3615-3624.
- 4) Calne RY, Sells RA, Pena JR, et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature*. 1969 ; 223 : 472-476.
- 5) Qian S, Demetris AJ, Murase N, et al. Murine liver allograft transplantation : tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology*. 1994 ; 19 : 916-924.
- 6) Onoe T, Ohdan H, Tokita D, et al. Liver sinusoidal endothelial cells have a capacity for inducing nonresponsiveness of T cells across major histocompatibility complex barriers. *Transpl Int*. 2005 ; 18 : 206-214.
- 7) Tokita D, Ohdan H, Onoe T, et al. Liver sinusoidal endothelial cells contribute to alloreactive T-cell tolerance induced by portal venous injection of donor splenocytes. *Transpl Int*. 2005 ; 18 : 237-245.
- 8) Shishida M, Ohdan H, Onoe T, et al. Role of invariant natural killer T cells in liver sinusoidal endothelial cell-induced immunosuppression among T cells with indirect allospecificity. *Transplantation*. 2008 ; 85 : 1060-1064.
- 9) Banshodani M, Onoe T, Shishida M, et al. Adoptive Transfer of Allogeneic Liver Sinusoidal Endothelial Cells Specifically Inhibits T Cell Responses to Cognate Stimuli. *Cell Transplant*. 2012 Oct 8. [Epub ahead of print]
- 10) Onoe T, Tanaka Y, Ide K, et al. Attenuation of Portal Hypertension by Continuous Portal Infusion of PGE1 and Immunologic Impact in Adult-to-Adult Living-Donor Liver Transplantation. *Transplantation*. 2013 Apr 17. [Epub ahead of print]
- 11) Ishiyama K, Ohdan H, Ohira M, et al. Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans. *Hepatology*. 2006 ; 43 : 362-372.
- 12) Ochi M, Ohdan H, Mitsuta H, et al. Liver NK cells expressing TRAIL are toxic against self hepatocytes in mice. *Hepatology*. 2004 ; 39 : 321-331.
- 13) Ohira M, Ohdan H, Ishiyama K, et al. Adoptive transfer of TRAIL-expressing natural killer cells prevents recurrence of hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. *Transplantation*. 2006 ; 82 : 1712-1719.
- 14) Ohira M, Nishida S, Tryphonopoulos P, et al. Clinical-scale isolation of interleukin-2-stimulated liver natural killer cells for treatment of liver transplantation with hepatocellular carcinoma. *Cell Transplant*. 2012 ; 21 : 1397-1406.
- 15) Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, et al. Multiparameter flow cytometric approach for simultaneous evaluation of proliferation and cytokine-secreting activity in T cells responding to allo-stimulation. *Immunol Invest*. 2004 ; 33 : 309-324.
- 16) Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, et al. Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplantation : immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique. *Transplantation*. 2005 ; 79 : 1262-1267.
- 17) Ohira M, Ishifuro M, Ide K, et al. Significant correlation between spleen volume and thrombocytopenia in liver transplant patients : a concept for predicting persistent thrombocytopenia. *Liver Transpl*. 2009 ; 15 : 208-215.
- 18) Ohira M, Ishiyama K, Tanaka T, et al. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes shows anti-HCV activity after liver transplantation. *J Clin Invest*. 2009 ; 119 : 3226-3235.
- 19) Daskali M, Tanaka Y, Ohira M, et al. Possibility of adoptive immunotherapy with peripheral blood-derived CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> cells for inducing antihepatocellular carcinoma and antihepatitis C virus activity. *J Immunother*. 2011 ; 34 : 129-138.
- 20) Tashiro H, Ishiyama K, Ohira M. Impact of adjuvant immunotherapy using liver allograft-derived lymphocytes on bacteremia in living-donor liver transplantation. *Transplantation*. 2011 ; 92 : 575-580.

# BASIC AND TRANSLATIONAL—LIVER

## Thromboxane A<sub>2</sub> Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers

YUICHI ABE,<sup>1,2</sup> HUSSEIN HASSAN ALY,<sup>1</sup> NOBUHIKO HIRAGA,<sup>3</sup> MICHIO IMAMURA,<sup>3</sup> TAKAJI WAKITA,<sup>4</sup> KUNITADA SHIMOTOHNO,<sup>5</sup> KAZUAKI CHAYAMA,<sup>3</sup> and MAKOTO HIJIKATA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Virus Research, <sup>2</sup>Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, Japan; <sup>3</sup>Department of Gastroenterology and Metabolism, Applied Life Sciences, Institute of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan; <sup>4</sup>Department of Virology 2, National Institute of Infectious Disease, Tokyo, Japan; <sup>5</sup>Research Institute, Chiba Institute of Technology, Chiba, Japan

See Covering the Cover synopsis on page 495.

**BACKGROUND & AIMS:** A 3-dimensional (3D) culture system for immortalized human hepatocytes (HuS-E/2 cells) recently was shown to support the lifecycle of blood-borne hepatitis C virus (HCV). We used this system to identify proteins that are active during the HCV lifecycle under 3D culture conditions. **METHODS:** We compared gene expression profiles of HuS-E/2 cells cultured under 2-dimensional and 3D conditions. We identified signaling pathways that were activated differentially in the cells, and analyzed their functions in the HCV lifecycle using a recombinant HCV-producing cell-culture system, with small interfering RNAs and chemical reagents. We investigated the effects of anti-HCV reagents that altered these signaling pathways in mice with humanized livers (carrying human hepatocytes). **RESULTS:** Microarray analysis showed that cells cultured under 2-dimensional vs 3D conditions expressed different levels of messenger RNAs encoding prostaglandin synthases. Small interfering RNA-mediated knockdown of thromboxane A<sub>2</sub> synthase (TXAS) and incubation of hepatocytes with a TXAS inhibitor showed that this enzyme is required for production of infectious HCV, but does not affect replication of the HCV genome or particle release. The TXAS inhibitor and a prostaglandin I<sub>2</sub> receptor agonist, which has effects that are opposite those of thromboxane A<sub>2</sub>, reduced serum levels of HCV and inhibited the infection of human hepatocytes by blood-borne HCV in mice. **CONCLUSIONS:** An inhibitor of the prostaglandin synthase TXAS inhibits production of infectious HCV particles in cultured hepatocytes and HCV infection of hepatocytes in mice with humanized livers. It therefore might be therapeutic for HCV infection.

**Keywords:** Infectious Virus Particle; Lipid Mediator; Antiviral Drug.

Approximately 170 million people worldwide are infected with hepatitis C virus (HCV),<sup>1</sup> with the majority suffering from chronic hepatitis, cirrhosis, and/or hepatocellular carcinoma.<sup>2</sup> HCV currently is treated using a

combination of polyethylene glycol-conjugated interferon and ribavirin, although no more than 60% of individuals adequately respond.<sup>3</sup> Recently, inhibitors of HCV non-structural proteins have been developed as direct-acting antiviral agents to treat HCV effectively.<sup>4-6</sup> However, HCV often acquires resistance against treatment with direct-acting antiviral agents in cases of monotherapy.<sup>7</sup> Current efforts therefore are focused on better understanding the lifecycle of HCV to find the cellular target of novel anti-HCV drugs to use the options for multi-drug therapy.

A cell-culture system that allows the production of recombinant infectious HCV (HCVcc) recently was developed using a cloned HCV genome and the hepatocellular carcinoma-derived Huh-7 cell line.<sup>8-10</sup> Experiments using the culture system have provided novel insights on the HCV lifecycle such as finding the production of infectious HCV particles near lipid droplets (LDs) and endoplasmic reticulum-derived LD-associated membranes.<sup>11</sup> Huh-7 cells, however, only allow the proliferation of recombinant HCV, and not blood-borne HCV (bbHCV).

To study the lifecycle of bbHCV, we cloned immortalized human hepatocyte HuS-E/2 cells, which permitted some degree of bbHCV infection.<sup>12</sup> Integrating hollow fibers into the 3-dimensional (3D) culture system resulted in efficient continuous proliferation of infected HCV production from the cells.<sup>13</sup> By using the improved system, we previously compared the gene expression profiles of HuS-E/2 cells under the 2-dimensional (2D) and 3D culture conditions using microarray analysis. This allowed us to identify signaling pathways that contribute to the proliferation of HCV, for example, peroxisome proliferator-activated

*Abbreviations used in this paper:* 2D, 2-dimensional; 3D, 3-dimensional; AAC, arachidonic acid cascade; bbHCV, blood-borne hepatitis C virus; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; COX, cyclooxygenase; HCV, hepatitis C virus; HCVcc, hepatitis C virus from cell culture; IP, prostaglandin I<sub>2</sub> receptor; LD, lipid droplet; mRNA, messenger RNA; PG, prostaglandin; PGIS, prostaglandin I<sub>2</sub> synthase; RT-PCR, reverse-transcription polymerase chain reaction; qRT-PCR, quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction; siRNA, small interfering RNA; TP, thromboxane A<sub>2</sub> receptor; TXA<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub>; TXAS, thromboxane A<sub>2</sub> synthase; TXB<sub>2</sub>, thromboxane B<sub>2</sub>.

© 2013 by the AGA Institute  
0016-5085/\$36.00

<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.014>

receptor  $\alpha$  signaling, which enhances HCV replication.<sup>14</sup> This result was confirmed by other groups,<sup>15,16</sup> corroborating that our strategy can uncover cellular events that support the proliferation of HCV. We therefore hypothesized that leveraging the in vitro systems described earlier may help elucidate the molecular mechanisms underlying the HCV lifecycle.

Prostanoids are metabolites of the arachidonic acid cascade (AAC) that possess various physiologic activities.<sup>17</sup> These metabolites include prostaglandin (PG) E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, I<sub>2</sub>, and F<sub>2</sub>, and thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>).<sup>17</sup> Although several studies have shown that PG signaling contributes to liver regeneration,<sup>18,19</sup> the physiologic functions of these lipid mediators in human hepatocytes still are unknown. Interestingly, one report showed that PGE<sub>2</sub> might support HCV genome replication in cells bearing self-replicating HCV subgenomic replicon RNA.<sup>20</sup> Whether prostanoids are involved in the HCV lifecycle, however, has not been precisely investigated.

In this study, we provide evidence that TXA<sub>2</sub> synthase (TXAS) is involved in the formation of infectious HCV, by cell culture system, and that a TXAS inhibitor and PGI<sub>2</sub> receptor (IP) agonist that has opposite physiological effects to TXA<sub>2</sub> can be used as a novel anti-HCV drug by using chimeric mice bearing transplanted human hepatocytes.<sup>21</sup> This report shows the contribution of the AAC to HCV infectivity and the potency of a prostanoid as an antiviral agent.

## Materials and Methods

### Cell Culture

The human hepatocellular carcinoma-derived Huh-7 and Huh-7.5 cell lines were cultured as described previously.<sup>22</sup> HuS-E/2 cells are immortalized human hepatocytes transduced with E6 and E7 genes of human papilloma virus 18 and human telomerase reverse-transcription gene as described previously.<sup>12</sup> The 2D and 3D culture conditions for HuS-E/2 cells were as described previously.<sup>12</sup>

### Reagents and Antibodies

FR122047, PGH<sub>2</sub>, ONO1301, daltroban, and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (cAMP) sodium salt were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor 1 and Ozagrel were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). U-46619 was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Beraprost was a generous gift from Toray, Co (Tokyo, Japan). FR122047, PGH<sub>2</sub>, ONO1301, Daltroban, COX-2 inhibitor 1, Ozagrel, Beraprost, and calcium ionophore were dissolved in dimethyl sulfoxide. U-46619 and thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) were dissolved in methyl acetate. Dibutyryl cAMP was dissolved in water. The effect of each reagent on cell viability was analyzed using a Cell Proliferation Kit 2 (Roche, Basel, Switzerland) based on the manufacturer's instructions. An antibody specific for core protein (antibody 32-1) was a gift from Dr Michinori Kohara (Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan). Rabbit polyclonal anti-NS5A protein CL1 antibody and anti-HCV protein antibody in human serum were described previously.<sup>11</sup>

### Microarray Analysis

Total RNA purified from HuS-E/2 cells cultured under 2D or 3D conditions in the absence of HCV infection was analyzed with a 3D-Gene Human Chip 25k (Toray, Co) to compare gene expression profiles as described previously.<sup>14</sup> The accession number of the results is listed as "E-MTAB-1491" in ArrayExpress.

### Production of HCVcc and Sample Preparation

HCVcc was produced from the Huh-7 or Huh-7.5 cells transfected with in vitro synthesized Jikei Fulminant Hepatitis (JFH) 1<sup>E2FL</sup> or J6/JFH1 RNA as described previously.<sup>11</sup> The transfected cells and culture medium were harvested at 4 days post-transfection. For JFH1<sup>E2FL</sup> RNA-transfected Huh-7 cells treated with TXAS-specific small interfering RNA (siRNA), cells and culture medium were harvested 3 days after transfection. Culture medium including HCVcc was concentrated and used for infection experiments as described previously.<sup>11</sup> Concentrated culture medium from JFH1 RNA-transfected Huh-7 cells was fractionated as described previously.<sup>11</sup> The infectivity titer in each fraction was analyzed by focus-formation assay, which was determined by the average number of HCV-positive foci.

### Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction and Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated from the cells and medium using Sepasol I Super and Sepasol II (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), respectively, according to the manufacturer's instructions. By using 200 ng of total RNA as a template, we performed reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative RT-PCR (qRT-PCR) with a 1-step RNA PCR kit and a 1-step SYBR Primescript RT-PCR kit 2 (Takara, Shiga, Japan), respectively, according to the manufacturer's instructions. Information on both experiments is shown in Supplementary Tables 1 and 2.

### Infection of HCVcc

Infection experiments of HCVcc and detection of infected Huh-7.5 cells by indirect immunofluorescence analysis were performed mainly as described previously.<sup>11</sup> The number of infection-positive cells detected in  $4 \times 10^4$  target cells 1 day after infection with HCVcc including  $10^7$  copies of RNase-resistant HCV genome was defined as the specific infectivity in the infection experiments in our protocol.

### Indirect Immunofluorescence Analysis

HCV proteins were examined in cells using a Leica SP2 confocal microscope (Leica, Heidelberg, Germany), and infected cells were counted using a BioZero fluorescence microscope (Keyence, Tokyo, Japan).

### Preparation of Intracellular HCV Particles

Intracellular HCV particles were prepared as described previously.<sup>23</sup>

### Pharmacologic Test in Chimeric Mice Bearing Transplanted Human Hepatocytes

All mouse studies were conducted at Hiroshima University (Hiroshima, Japan) in accordance with the guidelines of the local committee for animal experiments. Chimeric mice

# BASIC AND TRANSLATIONAL—LIVER

## Thromboxane A<sub>2</sub> Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers

YUICHI ABE,<sup>1,2</sup> HUSSEIN HASSAN ALY,<sup>1</sup> NOBUHIKO HIRAGA,<sup>3</sup> MICHIO IMAMURA,<sup>3</sup> TAKAJI WAKITA,<sup>4</sup> KUNITADA SHIMOTOHNO,<sup>5</sup> KAZUAKI CHAYAMA,<sup>3</sup> and MAKOTO HIJIKATA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Virus Research, <sup>2</sup>Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, Japan; <sup>3</sup>Department of Gastroenterology and Metabolism, Applied Life Sciences, Institute of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan; <sup>4</sup>Department of Virology 2, National Institute of Infectious Disease, Tokyo, Japan; <sup>5</sup>Research Institute, Chiba Institute of Technology, Chiba, Japan

See Covering the Cover synopsis on page 495.

**BACKGROUND & AIMS:** A 3-dimensional (3D) culture system for immortalized human hepatocytes (HuS-E/2 cells) recently was shown to support the lifecycle of blood-borne hepatitis C virus (HCV). We used this system to identify proteins that are active during the HCV lifecycle under 3D culture conditions. **METHODS:** We compared gene expression profiles of HuS-E/2 cells cultured under 2-dimensional and 3D conditions. We identified signaling pathways that were activated differentially in the cells, and analyzed their functions in the HCV lifecycle using a recombinant HCV-producing cell-culture system, with small interfering RNAs and chemical reagents. We investigated the effects of anti-HCV reagents that altered these signaling pathways in mice with humanized livers (carrying human hepatocytes). **RESULTS:** Microarray analysis showed that cells cultured under 2-dimensional vs 3D conditions expressed different levels of messenger RNAs encoding prostaglandin synthases. Small interfering RNA-mediated knockdown of thromboxane A<sub>2</sub> synthase (TXAS) and incubation of hepatocytes with a TXAS inhibitor showed that this enzyme is required for production of infectious HCV, but does not affect replication of the HCV genome or particle release. The TXAS inhibitor and a prostaglandin I<sub>2</sub> receptor agonist, which has effects that are opposite those of thromboxane A<sub>2</sub>, reduced serum levels of HCV and inhibited the infection of human hepatocytes by blood-borne HCV in mice. **CONCLUSIONS:** An inhibitor of the prostaglandin synthase TXAS inhibits production of infectious HCV particles in cultured hepatocytes and HCV infection of hepatocytes in mice with humanized livers. It therefore might be therapeutic for HCV infection.

**Keywords:** Infectious Virus Particle; Lipid Mediator; Antiviral Drug.

Approximately 170 million people worldwide are infected with hepatitis C virus (HCV),<sup>1</sup> with the majority suffering from chronic hepatitis, cirrhosis, and/or hepatocellular carcinoma.<sup>2</sup> HCV currently is treated using a

combination of polyethylene glycol-conjugated interferon and ribavirin, although no more than 60% of individuals adequately respond.<sup>3</sup> Recently, inhibitors of HCV non-structural proteins have been developed as direct-acting antiviral agents to treat HCV effectively.<sup>4-6</sup> However, HCV often acquires resistance against treatment with direct-acting antiviral agents in cases of monotherapy.<sup>7</sup> Current efforts therefore are focused on better understanding the lifecycle of HCV to find the cellular target of novel anti-HCV drugs to use the options for multi-drug therapy.

A cell-culture system that allows the production of recombinant infectious HCV (HCVcc) recently was developed using a cloned HCV genome and the hepatocellular carcinoma-derived Huh-7 cell line.<sup>8-10</sup> Experiments using the culture system have provided novel insights on the HCV lifecycle such as finding the production of infectious HCV particles near lipid droplets (LDs) and endoplasmic reticulum-derived LD-associated membranes.<sup>11</sup> Huh-7 cells, however, only allow the proliferation of recombinant HCV, and not blood-borne HCV (bbHCV).

To study the lifecycle of bbHCV, we cloned immortalized human hepatocyte HuS-E/2 cells, which permitted some degree of bbHCV infection.<sup>12</sup> Integrating hollow fibers into the 3-dimensional (3D) culture system resulted in efficient continuous proliferation of infected HCV production from the cells.<sup>13</sup> By using the improved system, we previously compared the gene expression profiles of HuS-E/2 cells under the 2-dimensional (2D) and 3D culture conditions using microarray analysis. This allowed us to identify signaling pathways that contribute to the proliferation of HCV, for example, peroxisome proliferator-activated

*Abbreviations used in this paper:* 2D, 2-dimensional; 3D, 3-dimensional; AAC, arachidonic acid cascade; bbHCV, blood-borne hepatitis C virus; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; COX, cyclooxygenase; HCV, hepatitis C virus; HCVcc, hepatitis C virus from cell culture; IP, prostaglandin I<sub>2</sub> receptor; LD, lipid droplet; mRNA, messenger RNA; PG, prostaglandin; PGIS, prostaglandin I<sub>2</sub> synthase; RT-PCR, reverse-transcription polymerase chain reaction; qRT-PCR, quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction; siRNA, small interfering RNA; TP, thromboxane A<sub>2</sub> receptor; TXA<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub>; TXAS, thromboxane A<sub>2</sub> synthase; TXB<sub>2</sub>, thromboxane B<sub>2</sub>.

© 2013 by the AGA Institute  
0016-5085/\$36.00

<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.014>