

- 1) Iijima S, Matsuura K, Watanabe T, Onomoto K, Fujita T, Ito K, Iio E, Miyaki T, Fujiwara K, Shinkai N, Kusakabe A, Endo M, Nojiri S, Joh T, Tanaka Y. Influence of Genes Suppressing Interferon Effects in Peripheral Blood Mononuclear Cells during Triple Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C. PLoS One. 2015; 10 (2) :e0118000.
 - 2) Hamada-Tsutsumi S, Iio E, Watanabe T, Murakami S, Isogawa M, Iijima S, Inoue T, Matsunami K, Tajiri K, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A, Joh T, Tanaka Y. Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection. PLoS One. 2015 ;10(2):e0118062.
2. 学会発表
- 1) Takaoka A, Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Rice C, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y. Host sensing mechanism for the activation of antiviral innate responses to HBV infection. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6, 2014. Los Angeles.
 - 2) Hayashi S, Khan A, Simons B, Jones C, Homan C, McMahon B, Murakami S, Iijima S, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y. Carcinogenic potential of hepatitis B virus genotype F is associated with accumulation of novel core mutations. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6, 2014. Los Angeles.
 - 3) Tsutsumi S, Watanabe T, Murakami S, Iijima S, Hayashi S, Omagari K, Isogawa M, Tanaka Y. Evaluating hepatitis B virus lifecycle and screening anti-viral drugs using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6, 2014. Los Angeles.
 - 4) Inoue T, Ohne K, Ochi N, Shinkai N, Murakami S, Iijima S, Ogawa S, Watanabe T, Tanaka Y. A Newly Developed High-Sensitive HBsAg Chemiluminescent Enzyme Immunoassay is a Precise Application as a pre-Transfusion Screening Test to Detect Occult HBV. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.7-11, 2014. Boston.
 - 5) Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Shinkai N, Iio E, Matsunami K, Iijima S, Murakami S, Omagari K, Isogawa M, Sugiura W, Tanaka Y. Pre- and Post-Exposure Prophylaxis against Hepatitis B Virus Infection by HBV-active Antiretroviral Therapy. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.7-11, 2014. Boston.
 - 6) Hamada-Tsutsumi S, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Matsunami K, Iijima S, Omagari K, Shinkai N, Sugiura W, Tanaka Y. Post-exposure prophylactic effect of nucleot(s)ide analogues demonstrated using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21, 2014. Hiroshima.
 - 7) Hayashi S, Khan A, Simons BC, Jones CL,

- Homan C, McMahon BJ, Murakami S, Iijima S, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y. Association between Hepatocellular Carcinoma and Accumulation of Novel Core Mutations in Hepatitis B Virus Genotype F. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21, 2014. Hiroshima.
- 8) Hamada-Tsutsumi S, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Matsunami K, Iijima S, Omagari K, Shinkai N, Sugiura W, Tanaka Y. Post-exposure prophylactic effect of nucleot(s)ide analogues demonstrated using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21, 2014. Hiroshima.
- 9) Hayashi S, Khan A, Simons BC, Jones CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami S, Iijima S, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y. Association between Hepatocellular Carcinoma and Accumulation of Novel Core Mutations in Hepatitis B Virus Genotype F. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21, 2014. Hiroshima.
- 10) 飯島沙幸, 松浦健太郎, 渡邊綱正, 飯尾悦子, 村上周子, 林佐奈衣, 五十川正記, 田中靖人. C型慢性肝炎に対する3剤併用療法における薬剤投与直後のPBMC内ISG発現動態. 第24回抗ウイルス療法研究会総会. 平成26年5月7日～9日. 山梨.
- 11) 堤進, 渡邊綱正, 村上周子, 飯島沙幸, 飯尾悦子, 松波加代子, 新海登, 松浦健太郎, 五十川正記, 田中靖人. 大量調整可能なヒト肝細胞を用いたHBV in vitro 感染培養系を利用した創薬探索の可能性. 第50回日本肝臓学会総会. 平成26年5月29日～30日. 東京.
- 12) 渡邊綱正, 堤進, 飯島沙幸, 村上周子, 尾曲克己, 五十川正記, 田中靖人. C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン応答を規定するIL28B遺伝子多型の解析. 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 平成26年6月19日～20日. 札幌.
- 13) 松浦健太郎, 飯島沙幸, 田中靖人. 3剤併用療法における末梢血単核球中のインターフェロン誘導遺伝子群の応答性とIL28B遺伝子多型・治療反応性との関連. 第18回日本肝臓学会大会. 平成26年10月23日～24日. 神戸.
- 14) 林佐奈衣, 五十川正記, 村上周子, 飯島沙幸, 堤進, 尾曲克己, 渡邊綱正, 田中靖人. B型肝炎ウイルスGenotype Fにおける肝細胞癌関連因子の検討. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 平成26年11月10日～12日. 横浜.
- 15) 堤進, 渡邊綱正, 村上周子, 飯島沙幸, 林佐奈衣, 尾曲克己, 五十川正記, 田中靖人. 初代ヒト肝細胞を用いたB型肝炎ウイルス感染初期の宿主免疫応答とウイルス生活環の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 平成26年11月10日～12日. 横浜.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し

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：池田 正徳 鹿児島大学大学院 教授
研究協力者：

分担研究課題：HCV ライフサイクルにおける脂質代謝の役割の解明

研究要旨：脂質代謝経路の中で、コレステロールやゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) の生合成に関わるメバロン酸経路とHCVライフサイクルに着目して研究を実施した。小胞輸送蛋白質RabはHCVのライフサイクルにおける各ステップに重要な役割を果たすことが報告されている。Rab蛋白質の活性化にはゲラニルゲラニル転移酵素II (GGTaseII)によるGGPPの修飾が必要である。GGTaseIIを構成するRab Escort Protein (REP)は抗HCV剤の新規の標的となるが、Rabの修飾を標的とした抗HCV剤の探索はこれまでなされていない。本年度は、RabとREPの相互作用を評価できるスプリットルシフェラーゼアッセイ系を開発した。スプリットルシフェラーゼアッセイ系を用いるとRabとREPの結合を阻害する薬剤のスクリーニングが可能となる。

A. 研究目的

申請者らはこれまでメバロン酸経路のHCV ライフサイクルにおける役割についての研究を実施してきた。メバロン酸経路ではコレステロールの生合成以外に、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) の生合成がなされ、GGPPはHCVの増殖に必要な宿主因子の修飾 (ゲラニルゲラニル化)に必要となる。本研究では、ゲラニルゲラニル化の修飾を受けるRab蛋白質に着目し、Rab蛋白質のHCV ライフサイクルへの関与について検討する。Rab蛋白質は細胞内の小胞輸送に関わる宿主因子でありこれまでにHCVのライフサイクルに関連することが報告されている。申請者らはこれまでにRab13が感染のステップに、Rab18がアッセンブリーのステップで重要な役割を果たすことを見出した。また、Rabのゲラニルゲラニル化はゲラニルゲラニルトランスフェラーゼII (GGTaseII)によるが、修飾にはRab Escort Protein (REP)が必要となる。REPにはREP-1およびREP-2存在し、感染のステップにはREP-1ではなくREP-2が必須であることを明らかにした。これまでの基礎

研究でHCVのライフサイクルで、RabおよびREPを選択することでHCVのライフサイクルの各ステップ特異的な制御が可能となることが示唆された。RabはHCVのライフサイクルの各ステップにおいて重要な役割を果たすが、Rabのゲラニルゲラニル化を標的とした抗HCV剤開発の研究はこれまで実施されていない。

B. 研究方法

Rabの修飾に関わるGGTaseIIにはREPが必要である。REPにはREP-1およびREP-2が存在することが知られているが、両者の役割についての違いは明らかにされていない。HCVの増殖が可能なHuH-7細胞由来のRSc細胞とLi23細胞由来のD7細胞におけるREPの発現は、REP-2は両細胞で発現していたが、REP-1はD7細胞でのみ発現していることがわかった。また、D7細胞でREP-2をノックダウンするとHCVの感染が阻害されることを明らかにした。これらの結果はREP-2がHCVのライフサイクルに重要な役割を果たしていることを示唆している。REP-1およびREP-2とRabの相互作

用を検討するために Renilla luciferase (RL)を用いたスプリットルシフェラーゼアッセイ系の開発を行った。pCX4bsr ベクターに RL の N 末端側 1-299 アミノ酸領域の遺伝子を導入し、下流に Rab の ORF を組み込んだ。一方 pCX4pur ベクターに REP-1 あるいは REP-2 の ORF を導入しその下流に RL の C 末端側 233-311 アミノ酸領域の遺伝子を組み込んだ。Rab としては Rab8、Rab11、Rab18、Rab34 の ORF をベクターに組み込んだ。REP-1 あるいは REP-2 を組み込んだベクターと各 Rab を組み込んだベクターを同時に HEK293 細胞に導入し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。

C. 研究結果

RL の N 末端側ドメイン (aa1-229)と Rab の融合蛋白質を発現させるベクターと REP-1 あるいは REP-2 と RL の C 末端側ドメイン (aa233-311)を発現させるベクターを HEK293 細胞に導入した。48 時間後のルシフェラーゼ活性を測定するといずれの遺伝子導入細胞においてもルシフェラーゼ活性が認められた。しかしながら、REP-1 を導入した方が REP-2 を導入した場合に比べて高いルシフェラーゼ活性を認めた。なかでも、REP-1 と Rab8a の組み合わせでは REP-2 と Rab8a の組み合わせに比べて 100 倍以上の活性が認められた。これらの結果より、開発したスプリットルシフェラーゼアッセイ系は Rab と REP の相互作用の検討に有用であると思われた。

Rab を導入したベクターはブラストサイジン耐性遺伝子が、また、REP を導入したベクターにはピューロマイシン耐性遺伝子がそれぞれ含まれており薬剤による選択が可能である。現在、ブラストサイジンおよびピューロマイシンで細胞を処理すること

でルシフェラーゼ活性の高い安定したクローン化細胞株の樹立を目指した実験を実施している。

D. 考察

これまでに、メバロン酸経路における GGPP の Rab の修飾が HCV のライフサイクルに重要であることを明らかにしてきた。本年度は Rab および REP の相互作用を阻害する薬剤のスクリーニング系の開発を目指して RL を利用したスプリットルシフェラーゼアッセイ系の開発を行った。開発したスプリットルシフェラーゼアッセイ系を用いて今後は薬剤ライブラリーのスクリーニングを実施する。候補薬剤が見つかった場合には RL を含む全長 HCV RNA が複製する OR6 細胞を用いて薬剤の抗 HCV 活性を評価する予定である。本研究の特徴として、Renilla luciferase のアッセイキットがあれば蛋白質の相互作用と抗 HCV 活性を合わせて評価できる簡便性があげられる。また、REP あるいは Rab のベクターへの導入部は制限酵素サイトを導入したカセットとなっているため、HCV 蛋白質間、あるいは HCV 蛋白質と宿主因子の相互作用の評価にも応用が可能である。

E. 結論

HCV のライフサイクルに関わる Rab と REP の相互作用を評価するためのスプリットルシフェラーゼアッセイ系の開発を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kato N, Sejima H, Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M. Genetic Characterization of Hepatitis C Virus in Long-Term RNA Replication Using Li23 Cell Culture Systems. *PLoS One*, 9(3):e91156 (2014)

(2) Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H,

Ikeda M, Kato N. Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 447(2):341-5 (2014)

(3) Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets. *Virology*, 462-463:166-74 (2014)

(4) Matsuno K, Ueda Y, Fukuda M, Onoda K, Waki M, Ikeda M, Kato N, Miyachi H. Synthesis and inhibitory activity on hepatitis C virus RNA replication of 4-(1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-hydroxy-2-propyl) aniline analogs. *Bioorg Med Chem Lett.*, 24(17):4276-80 (2014)

(5) Hara Y, Yanatori I, Ikeda M, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Kishi F, Kato N, Imamura M, Chayama K, Hino K. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin in the context of mitochondrial depolarization. *Amer J Pathol.*, 184(11):3026-39 (2014)

2. 学会発表

(1) 佐藤 伸哉、森 京子、上田 優輝、瀬島 寛恵、團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之 リバビリン耐性全長 HCV-RNA 複製細胞株の樹立と特性解析 第 29 回中国四国ウイルス研究会、山口、2014 年 6 月

(2) 奥村 暢章、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、溝上 雅史、加藤 宣之 FOXA メン

バーによる HBV 複製の抑制 第 29 回中国四国ウイルス研究会、山口、2014 年 6 月

(3) 上田 優輝、團迫 浩方、佐藤 伸哉、池田 正徳、加藤 宣之 抗マラリア薬候補 N-251 の抗 HCV 活性作用機序の解析と臨床応用に向けた研究 第 29 回中国四国ウイルス研究会、山口、2014 年 6 月

(4) 瀬島 寛恵、佐藤 伸哉、團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之 HCV-RNA の長期複製によって発現低下した BASP1 と CPB2 遺伝子の発現制御機構の解析 第 29 回中国四国ウイルス研究会、山口、2014 年 6 月

(5) 平本 洸貴、團迫 浩方、武田 緑、佐藤 伸哉、池田 正徳、脇田 隆字、加藤 宣之 C 型肝炎ウイルスの生活環における宿主因子 Annexin A1 の役割 第 29 回中国四国ウイルス研究会、山口、2014 年 6 月

(6) Sejima H, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Analysis on regulation mechanism of genes whose expressions were reduced in long-term intracellular HCV-RNA replication. 73th annual meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, 2014 Sep.

(7) 奥村 暢章、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、溝上 雅史、加藤 宣之 FOXA による HBV 複製制御機構の解明 第 18 回日本肝臓学会大会、神戸、2014 年 10 月

(8) 上田 優輝、團迫 浩方、佐藤 伸哉、池田 正徳、加藤 宣之 臨床応用に向けた抗マラリア薬候補 N-251 の抗 HCV 活性作用機序の解析 第 18 回日本肝臓学会大会、神戸、2014 年 10 月

(9) 瀬島 寛恵、佐藤 伸哉、團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之 HCV-RNA の長期複製に

よって発現低下したBASP1とCPB2遺伝子の発現制御機構の解析 第18回日本肝臓学会大会、神戸、2014年10月

(10) 武田 緑、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之 小胞輸送蛋白質 Rab13 は HCV 感染に必要な宿主因子である 第18回日本肝臓学会大会、神戸、2014年10月

(11) Negative regulation of hepatitis B virus replication by FOXA members in human hepatoma cells.

Okumura N, Ikeda M, Satoh S, Dansako H, Mizokami M, Kato N.

2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Las Angeles, USA, 2014, Sep.

(12) Ueda Y, Kim HS, Dansako H, Satoh S, Ikeda M, Doi H, Wataya Y, Kato N. Characterization of anti-HCV activity of N-251, a preclinical antimalarial drug, and its combination effect with DAA. 21st international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Banff, Canada, 2014 Sep.

(13) Sejima H, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Analysis on Transcriptional

Regulatory Mechanisms of Genes whose Expressions were Reduced during Long-term Intracellular HCV-RNA Replication. 21st international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Banff, Canada, 2014 Sep.

(14) Hiramoto H, Dansako H, Takeda M, Satoh S, Wakita T, Ikeda M, Kato N. Annexin A1 Negatively Regulates HCV RNA Replication. 21st international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Banff, Canada, 2014 Sep.

(15) Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Human Hepatoma HuH-7 Cell Line-derived RSc cells Show Higher Viral Productivity in Response to Infection with HCV-JFH-1 than Huh7.5 Cells. 21st international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Banff, Canada, 2014 Sep.

G. 知的所得権の出願・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

E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築と 阻害剤スクリーニングへの応用

分担研究者 国立感染症研究所ウイルス第2部 室長 石井 孝司
共同研究者 国立感染症研究所ウイルス第2部 主任研究官 李 天成

研究要旨 E型肝炎ウイルス(HEV)株 83-2の感染性クローンを構築し、HEVの構造蛋白領域をレポーター遺伝子に置き換えたレプリコンを作成した。化合物ライブラリを用いたHEV増殖阻害剤のスクリーニングを実施し、現在までに複数の阻害活性を有する化合物を同定した。HEVの増殖阻害活性を有する化合物が得られたことから、これらの化合物の作用機序を調べ、HEV複製メカニズムを解析する。また、阻害剤のin vivoでの効果の検討を行い、E型肝炎治療薬としての可能性を検討する。

A. 研究目的

E型肝炎は、通常HEVが糞口感染することによって引き起こされる急性肝炎である。E型肝炎はこれまでわが国ではあまり馴染みのない疾患であり、稀に散発的に見つかった症例はそのほとんどが海外旅行中に感染し帰国後に発症したケースであったため、これまでは輸入感染症と認識されてきた。しかしながら近年、HEVはブタ、イノシシなどの動物に感染することが明らかになり、特に国産ブタでは幼少期にかなりの割合がHEVに感染していることが抗体保有調査から示され、我が国に土着したウイルスであることが判明してきている。これらの肉を生、あるいは加熱不十分なままで摂食することによってHEVに感染すると考えられる。

近年、HEVを培養細胞系で増殖させる系が確立されたが、ウイルスの増殖は非常に遅く、ウイルスの病原性やトロピズムを解明する上で、効率のよいHEVの増殖系を確立することが望まれている。

本年度は、感染性のHEV cDNAクローンから構築したレプリコンを用いてHEVの増殖を阻害する物質のスクリーニングを行った。複数の阻害活性を有する化合物が得られており、急性E型肝炎治療薬としての可能性を検討する。

B. 研究方法

感染性のHEVクローン83-2の構造蛋白領域をレポーター遺伝子(SecNanoLuc)で置換したcDNAを作成し、合成したRNAをヒト肝癌由来細胞PLC/PRF/5細胞に導入するとレプリコンが複製しレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)が分泌されることを確認した。レポーターの分泌を指標にレプリコン複製を阻害する物質のスクリーニングを行った。

C. 研究結果

感染性クローン83-2の構造蛋白であるORF2領域をレポーター遺伝子と置き換えることによりHEVレプリコンを構築した。ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として持つレプリコンRNAをトランスフェクションした細胞でLOPAC化合物ライブラリー(約1,200)のスクリーニングを行った。100 μ Mでルシフェラーゼの分泌が50%以下に低下し、MTTアッセイで強い毒性が見られない化合物の中で、20 μ Mでも阻害活性が認められた化合物が17存在した。その中に、細胞培養系でHEV増殖阻害効果が報告され、慢性E型肝炎の治療にも実際に使われているリバビリンが含まれていた。一方、レプリコンの複製を促進する10の化合物も見出された。

また、東京大学創薬オープンイノベーションセンターの化合物ライブラリーについて

もスクリーニングを開始した。2058 化合物のスクリーニングを行い、20 μ M で 50%以下に低下させる薬剤が 157、20%以下に低下させる薬剤が 33 見出された。これらの化合物の作用機序を調べ、HEV 複製メカニズムを解析する。また、阻害剤の in vivo での効果の検討を行い、E 型肝炎治療薬としての可能性を検討する。

D. 考察

LOPAC 化合物ライブラリーから、HEV レプリコン複製阻害活性を持つ化合物 17 をピックアップした。ピックアップされた化合物の中には、すでに HEV 増殖阻害活性が報告されていたリバビリンが含まれており、本スクリーニング系の妥当性が示されたのではないと思われる。また、東京大学創薬オープンイノベーションセンターの化合物ライブラリーからは、さらに強い増殖阻害活性を持つ化合物 33 をピックアップすることができた。今後、これらの複製抑制および促進活性を有する化合物を利用し、HEV の感染、増殖機構や病原性発現メカニズムの解析を行う。

E. 結論

HEV レプリコンを構築し、化合物ライブラリーからレプリコン複製阻害物質のスクリーニングを開始した。特に東京大学の化合物ライブラリーから、比較的強い複製阻害活性を有すると考えられる化合物を得ることができた。今後 E 型肝炎治療薬としての検討、HEV の感染、増殖機構や病原性発現メカニズムの解析を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Li T.C., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Haga K., Nakamura T., Ochiai S., Wakita T. and Johne R. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. *Journal of General Virology* in press.
2. Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Kato T., Wakita T. and Ishii K. Establishment of Hepatitis E Virus Infection-Permissive and -Nonpermissive Human Hepatoma

PLC/PRF/5 Subclones. *Microbiology and Immunology* in press.

3. Jiang X., Kanda T., Wu S., Nakamoto S., Saito K., Shirasawa H., Kiyohara T., Ishii K., Wakita T., Okamoto H. and Yokosuka O. Suppression of La Antigen Exerts Potential Antiviral Effects against Hepatitis A Virus. *PLOS One*, 9, e101993 (2014)
4. Li T.C., Yang, T., Shiota T., Yoshizaki S., Yoshida H., Saito M., Imagawa T., Malbas F., Lupisan S., Oshitani H., Wakita T. and Ishii K. Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90: 764-766 (2014)
5. 石井孝司 A 型肝炎、E 型肝炎 臨床と微生物 41: 72-78 (2014)

2. 学会発表

1. Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of an outbreak of hepatitis A in Japan, 2014. The 11th Japan-Taiwan Symposium on New Technologies Applied to Public Health Including Foodborne Diseases and Drug Resistance. Taipei, Taiwan, September 11-12, 2014
2. Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of a large outbreak of hepatitis A in Japan, 2014. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China, August 25-27, 2014
3. Li T.C., Ochiai K., Yang T., Yoshizaki S., Takeda N., Ishii K., Wakita T. Characterization of a case of hepatitis E that imported from Spain. 10th Asia Pacific Travel Health Conference, Ho Chi Minh City, Viet Nam, May 7-11, 2014
4. Ishii K. Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y., Noda M., Wakita T. Molecular epidemiological analysis of recent hepatitis A in Japan and Asian countries. 10th Asia Pacific Travel Health Conference, Ho Chi Minh City, Viet Nam, May 7-11, 2014
5. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Tada T., Shimada T., Nakashima K., Noda M., Wakita T. Epidemiological and genetic

analysis of hepatitis A in Japan.
Blankenberge, Belgium, March 9-14, 2014

6. 石井孝司：日本における A 型肝炎の現状について、第 11 回日本小児消化管感染症研究会、平成 27 年 2 月、大阪
7. 清原知子、石井孝司、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字：10-15 歳児における HBs 抗原保有率調査、第 18 回日本ワクチン学会、平成 26 年 12 月、福岡
8. 福島慎二、清原知子、石井孝司、中野貴司、濱田篤郎：不活化 A 型肝炎ワクチンの互換性研究～エイムゲンと HAVRIX～、第 18 回日本ワクチン学会、平成 26 年 12 月、福岡
9. 河端邦夫、清原知子、石井孝司、脇田隆字、金山敦宏、八幡裕一郎、松井珠乃、砂川富正、大石和徳：A 型肝炎の家族内感染についての疫学的解析（2014 年上半期を中心に）、第 18 回日本ワクチン学会、平成 26 年 12 月、福岡
10. 塩田智之、李 天成、吉崎佐矢香、西村順裕、清水博之、下島昌幸、西條政幸、脇田隆字、石井孝司：E 型肝炎ウイルス感染性規定因子宿主候補に関する研究、第 62 回日本ウイルス学会、平成 26 年 11 月、横浜
11. 石井孝司、清原知子、吉崎佐矢香、八幡裕一郎、河端邦夫、金山敦宏、山岸拓也、高橋琢理、有馬雄三、木下一美、齊藤剛仁、松井珠乃、大石和徳、砂川富正、脇田隆字：2014 年春季に日本で多発した A 型肝炎の分子疫学的解析、第 62 回日本ウイルス学会、平成 26 年 11 月、横浜
12. 横川 寛、中村紀子、東濃篤徳、鈴木紗織、明里宏文、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字：培養細胞由来 HAV 粒子のマリモセットにおける抗 HCV 抗体誘導能の検討、第 62 回日本ウイルス学会、平成 26 年 11 月、横浜
13. 石井孝司：日本における A 型肝炎の現状について、第 29 回関東甲信静支部ウイルス研究部会、平成 26 年 9 月、長野

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：大西俊介 北海道大学消化器内科 講師

分担課題名：HCV 増殖・培養系を用いたウイルス側因子の複製増殖への影響の解析

研究要旨：HCV 感染は肝脂肪化を引き起こし、HCV の生活環と肝細胞内脂肪酸代謝は深く関与する。我々は、今回 NASH などにてその治療効果が既に報告されている脂肪酸のβ酸化において重要な役割を果たす L-カルニチン（以下カルニチン）の HCV 生活環に与える影響に着目し検討した。HCV 感染培養系にカルニチンを投与する事により HCV 感染により、誘導された肝脂肪化をβ酸化の律速酵素である CPT-1 を誘導する事により改善する可能性が確認された。更に、肝細胞内・培養上清中の HCV に対して粒子形成抑制によると思われる増殖抑制効果が確認された。更に、HCV 感染により惹起される酸化ストレスについても同様に改善効果が確認された。

A. 研究目的

【背景と目的】

慢性 C 型肝炎に対する治療は、HCV のウイルスタンパクを特異的に阻害する薬剤：direct-acting antivirals (DAAs) が多数開発され治療成績の改善が報告されている。しかしながら DAAs に対する薬剤耐性 HCV の問題や、DAAs に非代償性肝硬変患者への治療適応が無いなどの問題があり、DAAs が治療の主流になると思われる今後においても、HCV に対する新たな治療や補助療法の研究が求められる。

HCV は肝脂肪化を引き起こし、HCV の生活環と肝細胞内脂肪酸代謝は深く関与していることが知られている。また、肝脂肪化は肝線維化や肝発癌を引き起こしたり、インスリン抵抗性を惹起し HCV 感染患者の予後増悪の原因となっている。以上のことから、細胞内脂肪酸代謝をコントロールし肝脂肪化を抑制することでウイルス増殖を抑制し、さらに患者の予後改善に寄与しうる可能性が想定される。そこで今回我々は、脂肪酸のβ酸化において重要な役割を果たす L-カルニチン（以下カルニチン）に着目した。C 型慢性肝炎～肝硬変の患者で血清カルニチン濃度が低下していることや、NASH の患者にカルニチンを投与すると肝脂肪化が改善した報告があり、カルニチンが HCV 感染細胞の脂肪化を抑制するという仮説を立てた。本研究ではカルニチンの抗脂肪化効果・HCV 増殖抑制効果ならびに HCV によって惹起される酸化ストレスに対する抑制効果について検討した。

B. 研究方法

HCV 増殖をレポーターアッセイとしてルシフェラーゼアッセイを行うことで定量できる HCV レプリコン細胞にカルニチン投与を行い、ウイルス増殖抑制効果について検討した。次に、Huh7.5.1 細胞にジェノタイプ 2a 由来の JFH-1 株 RNA を遺伝子導入し、HCV 感染細胞を培養した。この HCV 感染培養系にカルニチン投与を行い、培養上清中の HCV コア抗原の測定、ウェスタンブロット、免疫蛍光染色を施行してウイルス増殖抑制効果について検討した。また、HCV 感染培養系にカルニチンを投与し、Oil Red O 染色と免疫蛍光染色を行って肝脂肪化抑制効果について検討した。最後に、HCV 感染培養系にカルニチンを投与して GSH/GSSG アッセイならびに MitoSOX 染色を行い、カルニチンの HCV 感染細胞に対する酸化ストレス効果について検討を行った。

（倫理面への配慮）

肝疾患患者からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮する。遺伝子組み換え実験においては「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（平成 15 年法律第 97 号）を遵守して実施する。

C. 研究結果

HCV レプリコン細胞にカルニチンを投与し HCV 増殖抑制効果の検討を行ったが、HCV レプリコ

ン細胞に対する HCV 増殖抑制効果は認めなかった。JFH-1 感染細胞にカルニチン投与を行い培養上清中のウイルス量の測定・細胞内 HCV コアタンパクの定量を行い抗ウイルス効果の検討を行ったところ、カルニチンは濃度依存性にウイルス量を減少させた。次に、カルニチン投与による HCV 感染細胞の脂肪化抑制効果の検討を行った。HCV 感染細胞に Oil Red O 染色を行いその抽出液の吸光度を測定し細胞内脂肪滴の定量を行った。培養細胞は、HCV 感染にて有意に細胞内脂肪量の増加を認め、更にカルニチン投与にて有意に細胞内脂肪滴が減少することが確認された。また免疫蛍光染色を行なったところ、HCV 感染細胞では HCV コアタンパクと共局在して多数の細胞内脂肪滴が認められたのに対し、カルニチンを投与した HCV 感染細胞では細胞内脂肪滴が小さくなり減少しているのが認められた。カルニチンの抗脂肪化の機序を検討する目的で、 β 酸化の律速酵素である CPT-1 の発現をウェスタンブロットにて定量した。CPT-1 は HCV 感染により発現が低下したが、カルニチン投与により発現の回復が認められた。最後に HCV 感染による酸化ストレスへのカルニチン投与が及ぼす影響を検討した。HCV 感染細胞に対しカルニチンを投与し、GSH/GSSG アッセイならびに MitoSOX 染色を行い酸化ストレスの定量を行った。培養細胞は HCV 感染により細胞内酸化ストレスは有意に上昇したが、カルニチン投与により有意に酸化ストレスの抑制が確認された。

D. 考察

カルニチンは HCV 感染培養系において HCV 増殖抑制効果を示した。ウイルス増殖抑制の機序は CPT-1 の発現亢進を介した細胞内脂肪滴の減少による粒子形成抑制が関与している事が予想された。またカルニチンは HCV 感染細胞に対し酸化ストレスの抑制効果を示し、HCV 感染患者に対する新たな治療オプションとなりうる可能性が示唆された。

E. 結論

HCV 感染患者に対する新たな治療オプションとなりうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1 論文発表

1. [Ohnishi S](#), Takeda H. Herbal medicines for the treatment of cancer chemotherapy-induced side effects. **Frontiers in Pharmacology** (in press)
2. Onishi R, [Ohnishi S](#), Higashi R, Watari M, Yamahara K, Okubo N, Nakagawa K, Katsurada T, Suda G, Natsuzaka M, Takeda H, Sakamoto N. Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates dextran sulfate sodium-induced severe colitis in rats. **Cell Transplantation** (in press)
3. Yoshimura A, [Ohnishi S](#), Orito C, Kawahara Y, Takasaki H, Takeda H, Sakamoto N, Hashino S. Associations between peripheral lymphocyte and monocyte counts and obesity-related complications in young adults. **Obesity Facts** 2015;8:1-16
4. Shimizu Y, Takahashi M, Mizushima T, Ono S, Mabe K, [Ohnishi S](#), Kato M, Asaka M, Sakamoto N. Chromoendoscopy with iodine staining, as well as narrow-band imaging, is still useful and reliable for screening of early esophageal squamous cell carcinoma. **American Journal of Gastroenterology** 2015;110(1):193-4.
5. Yamada C, Sadakane C, Nahata M, Saegusa Y, Nakagawa K, Okubo N, [Ohnishi S](#), Hattori T, Takeda H. Serotonin 2C receptor contributes to gender differences in stress-induced hypophagia in aged mice. **Psychoneuroendocrinology** (in press)
6. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Chuganji Y, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terasita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuzaka M, Ogawa K, [Ohnishi S](#), Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N for the NORTE Study Group. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological

- reactions. **Hepatology Research** (in press)
7. Hanamatsu H, Ohnishi S, Sakai S, Yuyama K, Mitsutake S, Takeda H, Hashino S, Igarashi Y. Altered levels of serum sphingomyelin and ceramide containing distinct acyl chains in young obese adults. **Nutrition & Diabetes** 2014;4:e141.
 8. Nahata M, Saegusa Y, Sadakane C, Yamada C, Nakagawa K, Okubo N, Ohnishi S, Hattori T, Sakamoto N, Takeda H. Administration of exogenous acylated ghrelin or rikkunshito, an endogenous ghrelin enhancer, improves the decrease in postprandial gastric motility in an acute restraint stress mouse model. **Neurogastroenterology and Motility** 2014;26(6):821-31.
 2. 学会発表
 1. Ohnishi S, Mitsutake S, Hanamatsu H, Yuyama K, Sakai S, Takeda H, Igarashi Y, Hashino S, Sakamoto N. Involvement of sphingomyelin metabolism in the development of NAFLD and insulin resistance. United European Gastroenterology Week 2014. Vienna. October 2014.
 2. Ohnishi S, Muto S, Nakagawa K, Yamada C, Saegusa Y, Nahata M, Sadakane C, Hattori T, Sakamoto N, Takeda H. Gender difference influences food intake under an emotional stress via 5-HT_{2C}R activation in aged mice. Digestive Disease Week 2014. Chicago. May 2014.
 3. Ohnishi S, Kubo K, Sakamoto N. Transplantation of human amnion-derived mesenchymal stem cells ameliorates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. 第22回日本消化器関連学会週間, 国際シンポジウム, 神戸, 2014年10月
 4. 大西俊介, 光武進, 花松久寿, 湯山耕平, 酒井翔太, 折戸智恵子, 川原由佳子, 吉村彩, 高崎裕代, 武田宏司, 五十嵐靖之, 橋野聡, 坂本直哉 NAFLD およびインスリン抵抗性の発症におけるスフィンゴミエリン代謝系の関与 第50回日本肝臓学会総会, 一般演題, 東京, 2014年5月
- 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 26 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：萩原正敏 京都大学 教授
研究協力者：奥野友紀子 山本誠

分担研究課題：酸化ストレスを低下させて肝炎ウイルス増殖を抑制する
新規治療薬候補物質の探索

研究要旨：分担研究者萩原らはこれまでに、SR蛋白質リン酸化酵素SRPKの特異的阻害剤RPIN340の合成展開化合物SFV785が、おそらく宿主キナーゼをターゲットとして、フラビウイルスの増殖を抑制することを見出していた。また東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中から、C型肝炎ウイルスの増殖を抑制する新たな化合物を見出し、その作用機序を解析した。さらに、同じくRPIN340の合成展開化合物より、別途広汎なDNAウイルスに対し抗ウイルス能を示す化合物FIT-039を創製した。

本年度はこれら化合物の抗HCV能・抗HBV能の評価及び進め、抗HCV能については東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーから同定された合成レチノイドTp80がより有効であること、Tp80特有の酸化ストレス抑制作用/ターゲットが抗HCV薬の新規ターゲットとなりうる可能性が示唆された。また、抗DNAウイルス薬FIT-039が抗HBV薬としても働くことが示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎について、近年ウイルス因子をターゲットとした抗ウイルス薬が上市され、治療効果の改善が見込まれているが、同時に耐性ウイルスの出現に備えた異なる作用機序の抗ウイルス剤の創製が重要となる。また薬剤耐性ウイルスの出現によりB型肝炎ウイルスの新たな治療薬も必要とされている。

分担者は現在までに各種のキナーゼ阻害剤を創製し、そのいくつかが抗ウイルス効果を示すことを見いだした。また、先行事業に於いて抗HCV剤の新規スクリーニングを行い、キナーゼ阻害剤とは骨格の全く異なる化合物 Tp80 を見いだしている。本研究では、宿主細胞のリン酸化酵素阻害剤のC型肝炎治療薬としての可能性を検討するとともに、更に効果的にC型肝炎ウイルス増殖を抑制する新たな化合物をケミカルライブラリーから探索する。またヘルペスウイルスなどDNAウイルスの増殖を抑制することが判明している独自化合物が、B型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性についても検討し、新規肝炎治療薬の開発を目指す。

B. 研究方法

1) 増殖ルシフェラーゼ発現 HCV レプリコン細胞

を用いて、東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中から、見つかった合成レチノイドについて昨年度に引き続きその作用機序の解析を行った。

2) 分担者は共同研究先キノファーマとの共同研究において独自合成した新規抗DNAウイルス薬FIT-039がin vitro評価系にて単純ヘルペスウイルス、アデノウイルスなど幅広い薬効が確認されており、また、in vivo評価系においてヘルペスウイルスマウス皮膚感染モデルにて高い治療効果が認められることを確認している。現在当該化合物はパピローマ感染性疣贅に対する治験に向けPMDAとの協議を進めているが、さらにB型肝炎ウイルスへの適用拡大の可能性について再度検討を行った。

（倫理面への配慮）

京都大学の倫理規定にしたがって、遺伝子組み換え実験や感染実験などを実施した。

C. 研究結果

1) 増殖ルシフェラーゼ発現 HCV レプリコン細胞を用いて、東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中から、見つかった合成レチノイド Tp80 について、GI-GPx の発現回復が作用機序の一端であることが示

唆されるデータが得られていたが、他のグルタチオンペルオキシターゼ等発現変動が見られなかった。実際 Tp80 処理前後の RepFeo/Huh7 細胞内 GSH/GSSH 比に変動はなかった。このことから、GI-GPx に特異的な酸化基質が HCV 増殖に関わっている可能性が示唆される。現在、その詳細について解析を進めている。

2) 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、昨年度初期的な実験では B 型肝炎ウイルス増殖への影響が薄いと判断されたが、本年度複数の HBV 感染モデル系においてそれぞれ薬効を評価したところ、初期的な段階ながら、特に HBV 初期感染を模倣する系において HBV 増殖抑制能が見られた。

D. 考察

合成レチノイド Tp80 は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うち、GI-GPx のみ発現量を HCV 感染による発現抑制状態から回復させる。昨年度の構造活性相関解析からは、Tp80 のもつ Tropolone 環の抗 HCV 作用への関与及びレチノイド活性自身との非相関性が明らかとなった。このことは Tp80 特異的な酸化ストレス応答系を明らかにすることによって、新規宿主要素をターゲットとした抗ウイルス剤の創製が可能となることを示している。

また、分担者において同定されている抗ヘルペス薬 FIT-039 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。本年度の結果より、FIT-039 HBV 増殖抑制能に関し、HBV の感染時期が薬効に影響を与える可能性が示唆された。

E. 結論

本年度得られた結果を元に、今後は抗 HCV 薬に関しては Tp80 類縁体及び同一作用機序の化合物とその作用機序を明らかにすることを優先して行う。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。同時に FIT-039 の抗 HBV 薬効評価及び抗 HBV 薬としての作用機序の同定を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamamoto M, Onogi H, Kii I, Yoshida S, Iida K, Sakai H, Abe M, Tsubota T, Ito N, Hosoya T, and Hagiwara M., CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses. *J Clin Invest.* 124(8):3479–3488.

2. 学会発表

1. 山本誠、小野木博、吉田優、細谷孝充、萩原正敏：宿主リン酸化酵素を標的とした次世代抗ウイルス薬の開発 第 62 回日本ウイルス学会 横浜 2014 年 11 月

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

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（2014 年特許取得）、韓国（審査請求済み）

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 26 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 京都大学ウイルス研究所 准教授

分担課題名：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：近年の治療法の進歩により、C 型肝炎ウイルス (HCV) の効果的な排除が可能になっている。一方、ウイルス排除後の肝発がんの可能性などが懸念されている。そこで、できるだけ正常な肝細胞に類似した培養細胞を用いて、HCV の持続感染増殖とこれによる発癌を再現する実験系を開発し、その分子機構の解明を目指した。まず、HCV の持続感染に関連が指摘されているインターフェロン (IFN) lambda について、その特異的な抗 HCV 機構を解析した。インターネット上の情報、および IFN lambda 処理ヒト肝細胞キメラマウスの遺伝子発現様式の解析から ApoF 遺伝子が IFN lambda によって発現誘導されることが明らかとなった。ヒト肝細胞キメラマウスでは ApoF タンパク質が IFN lambda 処理により血清中に産生誘導されることも確認された。組換え体 HCV 感染に許容する Huh7, 5 細胞に組換え体 ApoF 発現させると組換え体 HCV の感染増殖は抑制された。また組換え体 ApoF を含む培養上清から ApoF を免疫学的に減少させるとその効果は低下したことから、ApoF は IFN lambda によって誘導され、その感染性を低下させる新たな抗 HCV 因子である可能性が考えられた。

A. 研究目的

近年、C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する治療法は、直接 HCV タンパク質を標的とした薬剤 DAA が登場したことで、大きな進歩があり、HCV 排除に極めて高い効果を示している。一方、今後の問題として、薬剤耐性ウイルスの出現やウイルス排除後の肝発がんが懸念されている。しかしながら、未だに HCV 感染による肝発がん機構の詳細は不明である。そこで、できるだけ正常な肝細胞に類似した培養細胞を用いて、HCV の持続感染増殖とこれによる発癌を再現する実験系を開発し、その分子機構の解明を目指した。これまでに HCV の持続感染には自然免疫、特にインターフェロン (IFN) lambda が関連することがわかっている。したがって、IFN lambda 特異的な抗 HCV 機構を明らかにすることが、培養細胞を用いた HCV の持続感染を可能にするために必要であると考えられた。そこで、本年度は、IFN alpha では誘導されず、IFN lambda によって誘導される遺伝子群の解析を行い、IFN lambda 特異的な抗 HCV 効果を示す遺伝子の同定を目指した。

B. 研究方法

インターネット上に存在するマイクロアレイのデータを解析することにより、初代培養肝細胞を IFN alpha と IFN lambda で処理した時のそれぞれの細胞内で誘導される遺伝子発現を比較し、IFN lambda 処理によってのみ、顕著に発現が変化する遺伝子群を明らかにした。また、この結果を確認するためにヒト肝細胞キメラマウスを IFN lambda で処理し、その肝臓から RNA を抽出して、未処理マウスとの間で遺伝子発現様式を比較した。得られた候補遺伝子について cDNA を作成し、Huh7.5 細胞に発現させ、組換え体 HCV JFH1 株を感染させて、その感染増殖に対する効果を検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面に配慮する必要のある実験は行っていない。遺伝子組換え実験は、京都大学大学遺伝子組み換え実験安全管理規程に従って、京都大学総長の承認を得て行った。

C. 研究結果

インターネット上の情報の解析から、IFN lambda によってその発現が変化する遺伝子群がいくつか見出された。その中に HCV の感染増殖と

関連することが知られている脂質代謝関連遺伝子群が見出された。さらに、その中の脂質輸送関連遺伝子群が有意に上昇していることが示唆された。ヒト肝細胞キメラマウスを IFN lambda で処理し、処理後 24 時間における肝臓内 mRNA 発現様式を未処理マウスのもものと比較したところ、同様の結果が得られた。特に脂質輸送関連遺伝子群の中で IFN lambda 処理によって分泌タンパク質であり、コレステロールエステル輸送タンパク質の阻害因子として知られるアポリポタンパク質 F (ApoF) の遺伝子発現が有意に誘導されていた。そこで IFN lambda 処理 24 時間後のヒト肝細胞キメラマウスの血清中の ApoF タンパク質を ELISA 法と ImmunoBlot 法を用いて検出したところ、タンパク質レベルにおいてもその産生誘導が確認された。そこでヒト ApoF cDNA を RT-PCR 法を用いて合成し、その発現プラスミドを作成した。この発現プラスミドを Huh7.5 細胞に導入し、ApoF 発現 Huh7.5 細胞を作成し、別に作成した組換え体 HCV (JFH 株) を感染させたところ、効率良くその感染増殖を抑制されていることがわかった。この抑制効果は、ヒト腎臓由来細胞 293 細胞に myc-tagged ApoF を発現させて、その上清を組換え体 HCV に混合して感染実験をおこなっても再現された。しかしながら、myc-tagged ApoF を発現していない Huh7.5 細胞をこの myc-tagged ApoF 含有上清で前処理しても、この効果は認められなかった。このことから、myc-tagged ApoF 含有培養上清は組換え体 HCV の感染性を抑制する効果を持つことが示唆された。さらに ApoF 含有培養上清から抗 myc-tag 抗体を用いて ApoF を除いた場合、この抑制効果は認められなくなったことから、ApoF そのものが組換え体 HCV の感染性抑制効果があることが考えられた。

D. 考察

マイクロアレイ解析から IFN lambda はヒトの肝細胞において IFN alpha とは異なる細胞遺伝子を誘導することを確認した。その中で特に ApoF 遺伝子の発現誘導は著しく、そのタンパク質の産生も亢進していた。この ApoF は組換え体 HCV の感染を抑制したが、今回の結果からは ApoF が細胞を変化させるのではなく、直接的に HCV の感染性を低下させる可能性が考えられた。今後、ApoF がどのようなメカニズムで HCV の感染性の低下を誘導するのかなど明らかにする必要があると考えられた。また、培養肝細胞における HCV 感染の低い効率の理由の一つはこの IFN-lambda による ApoF の産生誘導である可能性も考えられた。

E. 結論

IFN lambda は I 型 IFN とは異なる遺伝子を誘導し、異なる方法で HCV の感染増殖を抑制することがわかった。その中に一つは ApoF の産生誘導であると考えられた。ApoF は HCV に働きかけて、その感染性を低下させるものと思われた。効率の高い HCV 感染系の構築のためには、今後、効率良く IFN-lambda 系を抑制する方法の開発も必要であることが考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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, 9, e89869, 2014

2. 学会発表

- ① 長谷川輝、岡村 瞳、赤堀祐一、津川陽司、仁尾泰徳、土方 誠、一価不飽和脂肪酸合成は HCV ゲノム複製に重要な役割を有する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、平成 26 年 11 月、横浜
- ② 阿部雄一、土方 誠、朝長 毅、リン酸化プロテオミクス解析による C 型肝炎ウイルス増殖に必要なウイルスタンパク質リン酸化就職の網羅的探索、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、平成 26 年 11 月、横浜
- ③ 土方 誠、HCV 培養系開発から見出された新たな HCV 薬の標的、第 27 回広島肝臓研究会学術講演会、平成 26 年 5 月、広島

H. 知的所有権の出願・登録状況

土方 誠、阿部雄一、山口達哉、内胚葉性幹細胞の製造方法、特願 2014-121780 号、登録日：平成 26 年 6 月 12 日。

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 26 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）

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 型肝炎治療薬創製に向けては、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 rs12979860 の解析、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞における②1 型インターフェロン (IFN) に対する応答能の解析、③HCV RNA に対する自然免疫応答能の解析を行った。

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

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 型肝炎治療薬の創製に向けては、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。

そこで本研究では、既に HCV のクリアランスおよび 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 rs12979860 の解析、②ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞における 1 型 IFN に対する応答の解析、③分化誘導肝細胞における HCV RNA に対する自然免疫応答の解析を行った。

B. 研究方法

B.1. 各種ヒト ES/iPS 細胞における rs12979860 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 rs12979860 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 株) 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 1 型 IFN に対する応答の解析

IL28B メジャーアリル (rs8099917 T/T、rs12979860 C/C) をもつヒト iPS 細胞株 (Tic 株) から分化誘導した肝細胞に対し、1 型 IFN である IFN- α 2A を 100pg/mL の濃度で作用させ、経時的に Total RNA を回収し、定量的 RT-PCR により Interferon-stimulated gene (ISG) の mRNA

量を定量した。

B.4. 分化誘導肝細胞における HCV RNA に対する自然免疫応答の解析

HCV サブゲノムレプリコン発現細胞である Huh7.5.1 1b Feo 細胞より回収した Total RNA を、IL28B メジャーアリル (rs8099917 T/T、rs12979860 C/C) をもつヒト iPS 細胞株 (Dotcom 株) から分化誘導した肝細胞に対し、1 μ g/mL の濃度で transfection した。その後、経時的に Total RNA を回収し、定量的 RT-PCR により HCV ゲノム量及び各種 IFN、ISG の mRNA 量を定量した。コントロールとして、HCV レプリコン非発現細胞である Huh7.5.1 細胞より回収した Total RNA を 1 μ g/mL で transfection した群を用いた。

(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、大阪大学 (独) および医薬基盤研究所 (研究分担者が招へいプロジェクトリーダーを併任) における倫理審査を受け、承認されたのちに実施した。

C. 研究成果

C.1. 各種ヒト ES/iPS 細胞における rs12979860 の解析

ヒト ES 細胞 5 株、ヒト iPS 細胞 12 株における rs12979860 の SNP について検討したところ、ヒト ES 細胞 1 株がマイナーアリル (T/T)、ヒト iPS 細胞 5 株がマイナーアリル (C/T) であった。その他の株についてはすべてメジャーアリル (C/C) であった。

C.2. ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞における 1 型 IFN に対する応答の解析

ヒト iPS 細胞より分化誘導した肝細胞に IFN- α 2A を作用させ、各種 ISG (ISG15, ISG56, MxA) の発現を解析したところ、作用後 6 時間、24 時間後において非作用時の

10~300 倍に発現が上昇していた。このことから、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞が 1 型 IFN に対する応答能を有していることが示された。

C. 3. 分化誘導肝細胞における HCV RNA に対する自然免疫応答の解析

分化誘導肝細胞に HCV サブゲノムレプリコン発現細胞である Huh7.5.1 1b Feo 細胞の Total RNA を導入し、導入後 6 時間、24 時間において 1 型 IFN (IFN α , IFN β)、3 型 IFN (IL29, IL28A, IL28B)、および各種 ISG (ISG15, ISG56, MxA) の発現を解析したところ、Huh7.5.1 細胞の Total RNA を導入した群と比較して、1 型 IFN は約 5~30 倍、3 型 IFN は約 40~100 倍、ISG は約 10~30 倍の発現上昇が認められた。また、未分化 iPS 細胞を用いて同様の検討を行ったところ同様の発現上昇が認められたが、発現量は分化誘導肝細胞の 1/10~1/100 程度であった。以上の結果より、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は、HCV RNA に対する自然免疫応答能を有することが示された。

D. 考察

D. 1. 各種ヒト ES/iPS 細胞における rs12979860 の解析

HCV の感染や治療に関連するとされる IL28B 遺伝子近傍の SNP である rs12979860 について解析した結果、ヒト ES 細胞 1 株がマイナーアリル (T/T)、ヒト iPS 細胞 5 株がマイナーアリル (C/T) であった。さらにこのうちの ES 細胞 1 株、iPS 細胞 2 株については、これまでに解析を行った rs8099917 のマイナーアリル (T/G) をもつ株であり、代表的な IL28B SNP である両 SNP がともにマイナーアリルである株を見出すことができたが、両 SNP がともにホモのマイナーアリルである株を見出すことはできなかった。今後さらに他の株についても解析を進める

予定である。

D. 2. ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞における 1 型 IFN に対する応答の解析

HCV に対する自然免疫応答や IFN 治療において、IFN による ISG の誘導は重要な機構である。本検討では、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞に対し 1 型 IFN を作用させることにより ISG の発現上昇が認められ、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は 1 型 IFN に対する応答能を有することが示された。

D. 3. 分化誘導肝細胞における HCV RNA に対する自然免疫応答の解析

これまでに、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞ではウイルス RNA センサー分子である Retinoic Acid-inducible gene-I (RIG-I) を始めとする自然免疫関連分子についてヒト初代培養肝細胞とほぼ同程度の遺伝子発現を示すことを確認した。実際に分化誘導肝細胞が HCV RNA による自然免疫応答能を有するのかを評価するため、HCV サブゲノムレプリコン発現細胞由来 RNA を導入したところ、1 型 IFN、3 型 IFN および ISG の発現上昇が認められたことから、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞内は、HCV RNA に対する自然免疫応答能を有していることが示された。今後、IL28B マイナーアリルをもつ iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いて同様の検討を行い、IFN および ISG 発現を比較検討予定である。

E. 結論

- ・ ヒト ES 細胞 5 株、ヒト iPS 細胞 12 株における rs12979860 の SNP について検討したところ、ヒト ES 細胞 1 株がマイナーアリル (T/T)、ヒト iPS 細胞 5 株がマイナーアリル (C/T) であった。その他の株についてはすべてメジャーアリル (C/C) であった。
- ・ ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は、1

型 IFN に対する応答能を有していた。

- ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は、HCV RNA に対する自然免疫応答能を有していた。
- ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞に対し HCVcc は感染可能であり、細胞内 HCV ゲノム量の増加に対し IFN および ISG の誘導による抗ウイルス応答が観察された。

F. 健康危険情報

該当事項無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takayama K., Morisaki Y., Kuno S., Nagamoto Y., Harada K., Furukawa N., Ohtaka M., Nishimura K., Imagawa K., Sakurai F., Tachibana M., Sumazaki R., Noguchi E., Nakanishi M., Hirata K., Kawabata K., Mizuguchi H. Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A., 2014; 111:16772-16777.
- 2) 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, 147-158, 2014, In: M. Akashi, T. Akagi, M. Matsusaki (eds.)

2. 学会発表

- 1) 水口裕之; 創薬応用を目指したヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の作製技術の現状と今後の課題・可能性、第 41 回日

本毒性学会学術集会、神戸、2014 年 7 月

- 2) 高山和雄、三村菜摘、萩原康子、立花雅史、櫻井文教、神田勝弘、川端健二、水口裕之; ヒト多能性幹細胞由来肝細胞を用いた次世代型創薬の実現を目指した基盤技術創成、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、京都、2014 年 10 月
- 3) 水口裕之、高山和雄; 再生医療、創薬応用を目指した多能性幹細胞由来肝細胞の創出、第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月
- 4) 水口裕之; ヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導法の開発とその実用化に関する研究、BioJapan 2014 World Business Forum、2014 年 10 月
- 5) 國戸偉丸、櫻井文教、高山和雄、脇田隆字、立花雅史、水口裕之; ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞における C 型肝炎ウイルス作用後の宿主応答の解析、日本薬学会第 135 年会、神戸、2015 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し。

2. 実用新案登録

該当無し。

3. その他

該当無し。