

HCV 複製における役割は明らかとなっていない。

今回、HCV 複製に対するビタミン A 誘導体の影響を、HCV 培養細胞系を用いて検討した。

## B. 研究方法

- 今回ビタミン A 誘導体として、all-trans retinoic acid (ATRA)、9-cis retinoic acid (9-cis RA)、13-cis retinoic acid (13-cis RA)、NIK333 (Peretinoin) の 4 種類を用いた。
- ビタミン A 誘導体の HCV 複製に与える影響は、肝癌細胞株 (Huh-7.5) 細胞を用いて検討した。
- 用いた HCV 株は、いずれも肝癌細胞株において複製することが知られている、Gt1a H77S. 3、Gt 1b N. 2、Gt2a JFH1、Gt1a/2a chimera HJ3-5 を用いた。
- これら HCV 遺伝子の p7 と NS2 の間には、分泌型ルチフェラーゼである Gaussia luciferase (以下 GLuc) 配列が挿入されているため、GLuc 活性をウイルス複製の指標として用いた。感染性粒子産生能は、FFU assay、細胞増殖に与える影響は MTT assay により評価した。

(倫理面への配慮)

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

使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。

## C. 研究結果

- 上述した 4 種類の HCV RNA を Huh-7.5 細胞に遺伝子導入し、ATRA、9-cis RA、13-cis RNA、Peretinoin を様々な濃度で投与したところ、いずれのビタミン A 誘導体投与においても HCV 複製の抑制を認めたため、ウイルス複製を 50%抑制する濃度 EC50 を算出した(表 1)。全てのビタミン A 誘導体が、いずれの HCV 株に対してもウイルス複製抑制効果を認めた。また Peretinoin が最も強い抗ウイルス効果を示した。

表 1 ビタミン A 誘導体 EC50

HCV	Peretinoin		ATRA		9-cis RA		13-cis RA	
	Mean (μM)	SD (μM)	Mean (μM)	SD (μM)	Mean (μM)	SD (μM)	Mean (μM)	SD (μM)
H77S.3	9	1	32	3	29	7	41	4
N.2	19	1	53	5	75	8	83	17
HJ3-5	18	2	25	1	51	6	82	17
JFH1	20	1	25	1	61	8	78	11

- 4 種類のビタミン A 誘導体に関して培養細胞の細胞増殖に与える影響を CC50 により評価した(表 2)。Peretinoin が最も強い細胞増殖抑制効果を示したが、それは HCV 複製を抑制する濃度より高濃度であった。

表 2 ビタミン A 誘導体 CC50

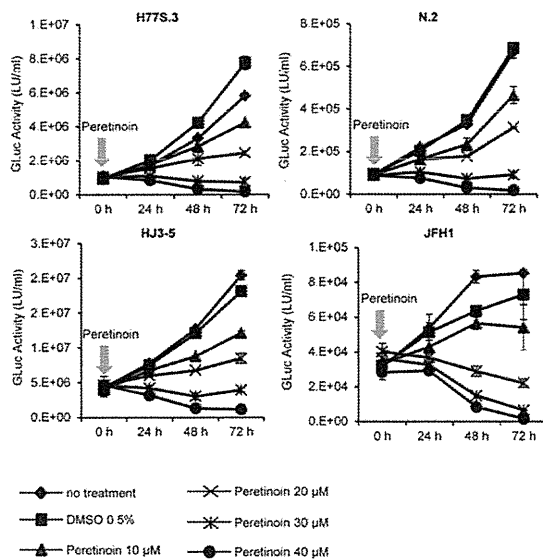
Peretinoin		ATRA	9-cis RA	13-cis RA
Mean (μM)	SD (μM)	Mean (μM)	Mean (μM)	Mean (μM)
68	5.2	>100	>100	>100

4 種類のビタミン A 誘導体の中で最も強い抗ウイルス効果を示し、さらに発癌抑制効果も報告されている

Peretinoin に着目して詳細な解析を行った。

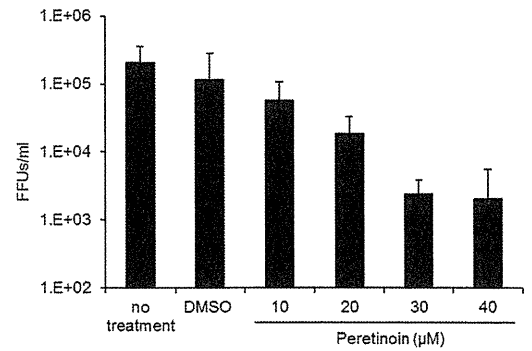
- H77S.3、N.2、JFH1、HJ3-5 RNA を Huh-7.5 細胞に遺伝子導入し、これらの HCV が持続的に複製していることを確認後、Peretinoin を 10、20、30、40  $\mu\text{M}$  の濃度で投与し、経時的にウイルス複製を GLuc 活性により測定した。(図 1) その結果、Peretinoin は、いずれの HCV に対しても濃度依存的かつ時間依存的なウイルス複製抑制効果を示した。

図1 Peretinoinによる抗ウイルス効果



- HJ3-5 株持続複製 Huh-7.5 細胞を 10、20、30、40  $\mu\text{M}$  の Peretinoin で 48 時間処理し、感染性粒子産生能に与えるを FFU assay により評価した (図 2)。その結果、Peretinoin は濃度依存的に感染性粒子産生能も抑制した。

図2 Peretinoinの感染粒子産生能に与える影響



#### D. 考察

今までの報告ではビタミン A 誘導体の HCV 複製に与える効果は不明であった。しかしながら、今回の検討でビタミン A 誘導体は HCV 複製抑制効果を有することが明らかとなった。特にビタミン A 誘導体の中でも、肝癌治療後の発癌抑制効果が報告されている Peretinoin が最も強力な抗ウイルス効果を有していたことは非常に興味深い。

さらに現在の C 型慢性肝疾患患者の肝癌治療後の Peretinoin による発癌抑制効果を検証する第 3 相試験が本邦において行われている。そのため Peretinoin は発癌抑制効果と HCV に対する抗ウイルス効果を有する分子である可能性が考えられる。

来年度以降 Peretinoin による抗ウイルス効果の作用機序を明らかにする予定である。

#### E. 結論

- 複数のビタミン A 誘導体において、Gt1a、Gt1b、Gt2a いずれの Genotype の HCV に対しても HCV 複製抑制効果を認めた。
- ビタミン A 誘導体の中でも、肝癌の chemoprevention の有用性が報告され

ている Peretinoin (NIK333)による HCV 複製抑制効果が最も強力であった。

- Peretinoin による HCV 複製抑制効果は、時間依存性かつ用量依存性であった。
- Peretinoin はウイルスの RNA 複製のみでなく、感染性粒子産生能も抑制した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- $\beta$  signaling pathway. *Hepatology*. 60(5):1519-30. 2014
- 2) Yamane D, McGivern DR, Wauthier E, Yi M, Madden VJ, Welsch C, Antes I, Wen Y, Chugh PE, McGee CE, Widman DG, Misumi I, Bandyopadhyay S, Kim S, Shimakami T, Oikawa T, Whitmire JK, Heise MT, Dittmer DP, Kao CC, Pitson SM, Merrill AH Jr, Reid LM, and Lemon SM. Regulation of the hepatitis C virus RNA replicase by endogenous lipid peroxidation. *Nature Medicine*. 20(8):927-35. 2014
- 3) Li Y, Masaki T, Shimakami T, Lemon SM. hnRNP L and NF90 Interact with Hepatitis C Virus 5'-Terminal Untranslated RNA and Promote Efficient

Replication. *J Virol*. 88(13):7199-7209. 2014

- 4) Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. *Sci Rep*. 4:4688. 2014

### 2. 学会発表

1. 島上哲朗、本多政夫、金子周一 前治療無効例に対するテラプレビル併用3剤併用療法48週間延長投与に関する検討 第100回日本消化器病学会総会 シンポジウム6-9, 口演
2. 島上哲朗、本多政夫、金子周一 IL28B Genotype, ISGs 発現量, 前治療反応を用いたテラプレビル併用抗HCV療法における治療効果予測と至適治療期間に関する検討 第50回日本肝臓学会総会 シンポジウム1-8, 口演
3. Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Murakami S, and Kaneko S. ACYCLIC RETINOID, PERETINOIN, INHIBITS HEPATITIS C VIRUS REPLICATION AND INFECTIOUS VIRUS RELEASE IN CELL CULTURE. The 49th Meeting of the European Association for the Study of the Liver (London) Poster

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項無し

## 宿主因子を標的とする新規薬剤の開発

担当責任者 京都大学 ウイルス研究所 土方 誠 准教授

### 研究要旨

近年用いられている C 型肝炎ウイルス（HCV）タンパク質を直接標的とした薬剤、所謂 DAA に対する抵抗性 HCV の出現に対処するため、抵抗性ウイルスが出現しにくいことが予想される宿主因子を標的とした薬剤の開発をおこなった。まずは、これまで既に我々が報告している感染性 HCV 産生阻害効果を持つトロンボキサン A2 合成酵素（TXAS）阻害薬の薬効作用機序の解析をおこなった。肝癌由来培養細胞を TXAS 阻害薬で処理した時に発現が変動する遺伝子をマイクロアレイ法で解析し、数十種類の候補遺伝子を見出した。また、HCV レプリコン細胞を用いて薬剤ライブラリーによって HCV 複製を抑制する新たな薬剤をスクリーニングすることにより、ステアシル CoA デサチユラーゼ（SCD）阻害薬が効果的に HCV ゲノム複製を抑制することを見出した。SCD 阻害薬は既存の DAA と併用することで相加的にその効果を上昇させ、またインターフェロンと併用することで相乗効果を示した。このことから SCD 阻害薬が既存薬の効果を上昇させる併用薬の候補となることがわかった。

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の慢性感染患者に対する治療法の開発は近年著しく進歩し、HCVタンパク質を直接標的とした薬剤、所謂、DAAによる治療が極めて効果が高いことがわかっている。一方、DAAによる治療ではHCVのゲノム変異による薬剤抵抗性ウイルスの出現が問題となりつつある。そこで、抵抗性ウイルスが出現しにくいことが予想される宿主因子を標的とした薬剤を併用することでこの問題は解決可能であると考えられた。そこで、本研究ではHCVの生活環の様々な過程について、これを阻害するような宿主細胞因子に対する阻害薬を見出し、その抗HCV効果について明らかにすることを目

的とした。

本研究では2つの研究で宿主因子を標的とした抗HCV薬開発をおこなった。まず一つは、これまで明らかにしているトロンボキサン合成酵素（TXAS）阻害薬による感染性HCV粒子産生抑制の薬効機序の詳細を明らかにして、さらに直接的に感染性HCV粒子産生抑制をおこなう薬剤の開発をおこなうものである。これまでの解析からTXAS阻害薬の効果は脂質メディエーターであるトロンボキサンA2（TXA2）の合成阻害であり、TXA2下流因子による感染性HCV粒子産生亢進の阻害であることがわかっているが、ヒト肝細胞には既知TXA2受容体であるTPの発現が認められていない。したがって、ヒト肝細胞に

はTP非依存的なTXA2シグナル系が存在することが考えられた。

まず、この未知のTXA2シグナル系を同定し、感染性HCV粒子産生の関連を明らかにして、これを効率良く阻害する方法の間髪を目指した。さらに、既存のHCVレプリコン細胞と薬剤ライブラリー等を用いて、HCV複製に関与する未知の細胞因子を同定し、その阻害剤を抗HCV薬へと応用することも目指した。

## B. 研究方法

1. ヒト肝細胞における新規TXA2シグナルを見出すために、TXAS阻害薬による感染性HCV粒子産生抑制効果が観察できるHuH7細胞をTXAS阻害薬ON01301で処理し、その遺伝子発現様式を未処理のものとマイクロアレイ法によって比較した。

2. HCVサブゲノムレプリコン細胞LucNeo#2細胞を用いて、いくつかの薬剤ライブラリーをスクリーニングした。効果的にHCVサブゲノムレプリコンの複製を阻害した薬剤について、その標的に関連する細胞因子に対する阻害剤などを用いて、その効果を検証した。また既存の抗HCV薬との併用効果について検証した。

### (倫理面への配慮)

この研究は既存の培養細胞を用いておこなっているものであり、特に倫理面に問題となるような実験は含まれていない。

## C. 研究結果

1. TXAS阻害剤ON01301処理／未処理のHuH7細胞の遺伝子発現様式を比較することで発現が上昇した遺伝子約150個、発現が著しく

低下した遺伝子490個を見出した。Pathway解析により活性化されているシグナルが約70、抑制されているシグナルが約70見出された。いくつかの遺伝子発現について異なるTXAS阻害剤Ozagrelに対する反応性を検証して、標的を絞っている。

2. 薬剤ライブラリーのスクリーニングにより、抑制効果を示す薬剤十数種類を見出した。いくつかの標的に対する薬剤について解析を進めているが、抑制効果に強かったものとして、アセチルCoAカルボキシダーゼ1 (ACC1) 阻害剤CP640186についてさらに解析を進めた。ACC1は、HCVゲノム複製に関与することが既に報告されている脂肪酸生合成系の初発酵素である。ACCにはACC1とACC2が存在するが、ACC2阻害剤1717-1はHCV複製にまったく影響しなかったため、HCV複製に関与するのがACC1であることが明らかになった。脂肪酸生合成経路でACC1下流に存在する脂肪酸合成酵素FASに対する阻害剤GSK1995010は他のFAS阻害薬で報告されている通りHCVゲノム複製を抑制したが、どのようにFASによって産生される長鎖飽和脂肪酸がHCVゲノム複製に関与するのかは不明だった。そこで次にFASで産生される長鎖飽和脂肪酸を修飾する酵素に着目した。長鎖飽和脂肪酸はステアシルCoA不飽和化酵素 (SCD) により一価不飽和脂肪酸へと修飾されることが知られている。そこでSCD阻害薬であるMK8245の効果を検証した結果、用量依存的に効果的なHCVゲノム複製阻害が認められた。この抑制効果はSCDの産物である一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸やパルミトレイン酸を培地に添加する事で解除されたことから、これら一価不飽和脂肪

酸がHCVゲノム複製に機能していることがわかった。オレイン酸やパルミトレイン酸の培地への添加はACC1阻害剤によるHCVゲノム複製阻害を抑制したことから、脂肪酸生合成系のHCVゲノム複製への関与の少なくとも一部はこの一価不飽和脂肪酸合成が重要な役割を果たしていると考えられた。MK8245処理はレプリコン細胞のみならず、組換え体HCVであるJFH 1株の感染増殖をも抑制した。また、既存の抗HCV薬テラプレビル（プロテアーゼ阻害薬）、ダクラタスビル（抗NS5A薬）あるいはインターフェロン $\alpha$ 1 $\text{pha}$ との同時処理をおこなって、その抑制効果を検証したところ、テラプレビルとダクラタスビルとは相加的に阻害抑制効果を示し、インターフェロン $\alpha$ 1 $\text{pha}$ とは相乗効果を示すことを明らかにした。

#### D. 考察

1. HuH7遺伝子発現様式はTXAS阻害剤により大きく変化していることがわかった。このことはこの細胞にはTP非依存的なTXA2シグナル系が存在し、各種遺伝子発現の制御に機能していることが推定された。

2. SCD阻害剤は効率良くHCVゲノム複製を抑制することがわかった。このことは本年度内に海外の別のグループからも報告され、一価不飽和脂肪酸がHCV複製複合体の形成に機能することが示されている。つまり、SCD阻害剤はウイルスタンパク質を介さず直接HCVゲノム複製を阻害する効果的な抗HCV薬になることが考えられる。MK8245は構造上肝臓に運ばれるようにデザインされているため、副作用の少ない薬剤とされており、他の抗HCV薬との併用で十分な効果を示すことが期待された。近年、脂肪酸生合成

抑制剤は、糖尿病や肥満の治療薬や抗がん剤としての効果が示されており、抗HCV効果だけでなく、同時にHCVの感染と関連する疾患の抑制にも効果がある可能性が考えられた。

#### E. 結論

肝細胞ではTXA2が種々の遺伝子発現の制御に関与している可能性があり、今後の研究でこの新しい細胞内シグナル系の発見やその応用としての新たな抗HCV薬細胞因子標的の同定が期待された。また、脂肪酸生合成系の阻害薬、特にSCD阻害薬による一価不飽和脂肪酸合成阻害は耐性変異を誘導しにくい新たな抗HCV薬となることがわかった。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
準備中

2. 学会発表

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

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

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  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし



## インターフェロン-λ3 遺伝子導入に基づく C 型肝炎治療法の開発 （抗ウイルス性サイトカインを利用した新規治療法の開発）

担当責任者 高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科 教授

### 研究要旨

インターフェロン（IFN）-λ は 3 種のサブクラスからなる III 型 IFN であり、治療抵抗性 HCV 感染の治療への適用が期待される。本研究では HCV 感染治療を目的とした IFN-λ3 遺伝子治療法の開発に関する検討を行った。本年度は短期発現型 IFN-λ3 発現ベクターとして pcDNA3.1 ベクター、持続型 IFN-λ 発現ベクターとして pCpG-mcs を選択し、これにヒト IFN-λ3 の cDNA を挿入したベクター、pCMV-IFN-λ3 および pCpG-IFN-λ3 を構築した。構築したプラスミドベクターを HCV レプリコン感染細胞 LucNeo#2 細胞にトランスフェクションしたところ IFN-λ3 の発現と HCV レプリコンの減少を確認した。また、ハイドロダイナミクス法により遺伝子導入されたマウスにおいて、血中 IFN-λ3 が検出されることを確認した。

### A. 研究目的

C型肝炎の治療は直接作用型抗ウイルス剤（DAA）の登場により大きな変化を迎えた。現在までに認可され使用されているテラプレビル、シメプレビルにより C型肝炎治療は格段に改善され、DAA経口剤のみでも 80%を超える高率の治療が期待されている。しかしながら、これらの高い効果にもかかわらず、多剤耐性ウイルスの出現によって完治が困難となった症例も明らかとなった。また、患者数が多いために治療の開発が先行して来た C型肝炎ウイルス（HCV）の genotype 1b, 2 以外の感染に対する治療手段もいまだ不十分である。また、DAA は肝機能あるいは腎機能の低下した患者において使用が困難な場合が存在する。したがって、難治性あるいは治療適用が困難な症

例に対しての治療手段の開発が望まれる。

インターフェロン（IFN）-λ は、III 型 IFN であり、IFN-λ1, -λ2, -λ3 の 3 種類のサブタイプが存在する。IFN-λ1 のポリエチレングリコール（PEG）修飾体を用いて、C型肝炎患者に対する臨床試験が行われ、従来汎用されてきた PEG 修飾 IFN-α と同程度の治療効果を得られる一方で、副作用の発生を大きく低減可能であることが報告されている。この結果は、ユビキタスに発現している IFN-α の受容体とは異なり、IFN-λ の受容体は肝細胞をはじめとした一部の細胞においてのみ発現していることから、標的細胞以外への作用が少なかったために副作用が誘導されにくかったことを示す結果と考えられる。また、これまでの C型肝炎の治療において、患者のゲノム DNA における IFN-λ3（別

名：インターロイキン-28B) の遺伝子多形が治療効果に影響すること、とくにIFN- $\lambda$ 3の発現が低くなる多形を有する患者において治療効果が有意に低いことが報告されていたことから、IFN- $\lambda$ 3も抗HCV効果を有すると期待されるが、IFN- $\lambda$ 3の抗HCV効果についての情報は乏しい。

本研究ではIFN- $\lambda$ 3のHCV感染治療への適用の可能性について検証することを目的として、IFN- $\lambda$ 3を遺伝子の形で導入するIFN- $\lambda$ 3遺伝子治療の開発について検討を開始した。これまでの分担者らの遺伝子治療に関する研究から、治療用遺伝子をコードしたプラスミドDNAの特性が遺伝子発現プロファイルに大きな影響を与えることを明らかとなっている。そこで本研究では、持続的あるいは短期の発現を可能とするプラスミドベクター、pCpGベクターおよびpCMVベクターを選択し、これにIFN- $\lambda$ 3遺伝子を挿入することとした。培養細胞系を用いて、構築したプラスミドベクターからのIFN- $\lambda$ 3遺伝子発現の確認を行うとともに、HCVレプリコン細胞を用いてその抗HCV効果について検証を行った。また、マウスに対してハイドロダイナミクス法を用いて遺伝子導入を行った後に、IFN- $\lambda$ 3の血清中濃度推移について評価を行った。

## B. 研究方法

### プラスミドベクター

IFN- $\lambda$ 発現プラスミドベクターとして、pCpGベクターにIFN- $\lambda$ 3遺伝子を挿入したpCpG-IFN- $\lambda$ 3、およびpCMVベクターにIFN- $\lambda$ 3遺伝子を挿入したpCMV-IFN- $\lambda$ 3を構築した。

### 培養細胞

アフリカミドリサル腎細胞COS7細胞、HCVレプリコン肝細胞LucNeo#2細胞は定法に従って培養した。

### 培養細胞への遺伝子導入

LucNeo#2細胞への遺伝子導入はX-tremGeneを用いて行った。COS7細胞への遺伝子導入はLipofectamine2000を用いて行った。

### IFN- $\lambda$ 3濃度の測定

IFN- $\lambda$ 3濃度はR&D社のIFN- $\lambda$ 3のELISAキットを用いて測定した。

### LucNeo#2細胞を用いた抗HCV効果の評価

LucNeo#2細胞にIFN- $\lambda$ 遺伝子を導入あるいはその培養上清にIFN- $\lambda$ を添加した後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ (Luc) 活性を測定することでHCV数を評価し、抗HCV効果を判定した。

### マウスへの遺伝子導入と血中濃度推移の評価

NakedのプラスミドDNAをマウス体重の約10%に相当する容量の生理食塩水に溶解し、マウス尾静脈から急速に投与した。経時的に採血を行い血清を回収した後、ELISA法により血清中IFN- $\lambda$ 濃度を測定した。

## C. 研究結果

構築した各プラスミドベクターをCOS7細胞に遺伝子導入したところ、いずれのプラスミドベクターのトランスフェクションによっても培養上清中にIFN- $\lambda$ 3が産生されることを確認した。また、pCMV-IFN- $\lambda$ 3遺伝子導入後の培養上清中へのIFN- $\lambda$ 3産生は、pCpG-IFN- $\lambda$ 3遺伝子導入後の産生量と比較

して10倍以上高かった。次に、COS7細胞にIFN- $\lambda$ 3遺伝子を導入後に回収した培養上清を、LucNeo#2細胞に添加し、Luc活性を測定することでHCVレプリコン量を評価した。その結果、添加したIFN- $\lambda$ 3量依存的な抗HCV効果が得られた。

LucNeo#2細胞に各プラスミドDNAを遺伝子導入後にLuc活性を測定することでHCV量について評価した。その結果、pCMV-IFN- $\lambda$ 3遺伝子導入によってpCpG-IFN- $\lambda$ 3群と比較して10倍以上高いIFN- $\lambda$ 3産生が認められた。pCMV-IFN- $\lambda$ 3の遺伝子導入によりある程度の抗HCV効果が得られた一方で、pCpG-IFN- $\lambda$ 3の遺伝子導入による抗HCV効果はほとんど得られなかった。また、その抗HCV効果はIFN- $\gamma$ 遺伝子導入により得られるものと比較して有意に低かった。

マウスに対して各プラスミドDNAを遺伝子導入後のIFN- $\lambda$ 3血清中濃度推移を評価したところ、pCMV-IFN- $\lambda$ 3遺伝子導入初期に比較的高いIFN- $\lambda$ 3血中濃度が得られたが、速やかに低下した。pCpG-IFN- $\lambda$ 3遺伝子導入後に得られる血中IFN- $\lambda$ 3濃度は低く、投与後3日後には検出限界以下となった。

#### D. 考察

pCMV-IFN- $\lambda$ 3から発現するIFN- $\lambda$ 3は、抗HCV効果を有することが明らかとなった。一方でその抗HCV効果はpCpG-IFN- $\gamma$ 遺伝子導入と比較して低かったが、これはpCMV-IFN- $\lambda$ 3からのIFN- $\lambda$ 3の産生量がpCpG-IFN- $\gamma$ からのIFN- $\gamma$ 産生量の1/10以下と低かったためと推察された。また、マウスにpCMV-IFN- $\lambda$ 3を投与することでIFN- $\lambda$ 3が

認められたことから、IFN- $\lambda$ 3遺伝子導入によりIFN- $\lambda$ 3を供給可能であることが実証された。一方で、pCpG-IFN- $\lambda$ 3を投与した後に持続的なIFN- $\lambda$ 3発現が得られなかったが、これはこのベクターからのIFN- $\lambda$ 3の発現効率が低かったためであると推察された。

#### E. 結論

IFN- $\lambda$ 3によって抗HCV効果が得られる可能性が示されるとともに、マウスに対して遺伝子導入することでIFN- $\lambda$ 3遺伝子発現が得られることを実証した。今後は、プロモーター領域をはじめとしたプラスミド骨格の最適化によって、高効率かつ持続的なIFN- $\lambda$ 3発現を可能とするプラスミドベクターを開発する。併せて、IFN- $\lambda$ 1遺伝子治療のC型肝炎への適用の可能性について検討を行う予定である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Watcharanurak K, Zang L, Nishikawa M, Yoshinaga K, Yamamoto Y, Takahashi Y, Ando M, Saito K, Watanabe Y, Takakura Y. Effects of upregulated indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 by interferon  $\gamma$  gene transfer on interferon  $\gamma$ -mediated antitumor activity. *Gene Ther.* 2014;21:794-801.
2. Yin Y, Takahashi Y, Ebisuura N, Nishikawa M, Takakura Y. Removal of transgene-expressing cells by a specific immune response induced by sustained transgene expression. *J Gene Med.* 2014;16:97-106.

## 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 藤本眞衣、安藤 満、高橋有己、濱名温志、西川元也、高倉喜信. 腫瘍血栓結合性ペプチド融合インターフェロンの設計と遺伝子導入による腫瘍指向性インターフェロン遺伝子治療法の開発 アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014、東京、9月
2. 濱名温志, 安藤満, 藤本眞衣, 高橋有己, 西川元也, 高倉喜信. 血栓結合型インターフェロン $\gamma$ 誘導体の遺伝子導入によるインターフェロン $\gamma$ 癌遺伝子治療効果の増強 日本薬学会第135年会、神戸、3月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 次世代シーケンサーと系統樹解析を用いた DAA 耐性変異の検討 （宿主因子を標的とする新規薬剤の開発）

担当責任者 前川伸哉 山梨大学医学部 第一内科 講師

研究要旨：Direct antiviral agents (DAA)は、従来の治療で難治性のC型慢性肝炎に高い有効性を示すが、薬剤耐性の出現が大きな問題となる。しかし耐性変異 HCV がどのような過程で出現するのか十分に解明されてはいない。

本研究ではプロテアーゼ阻害剤/PEG-IFN/RBV3 剤併用療法において、DAA 治療に伴う quasispecies の動態および薬剤耐性変異の発生と経過を明らかにするために、次世代シーケンサーにより得られる大量のウイルスゲノムデータを系統樹解析によって詳細に解析した。

その結果、治療後超早期のウイルスゲノム多様性減少と最終治療効果、あるいは宿主 IFL3SNPは有意な関連があり、超早期における多様性変化で治療効果を予測しうる可能性が示唆された。治療前に少数の耐性変異を認めた症例では、そのHCVは臨床的耐性HCVに進展せず、臨床的耐性は野生型のHCVに変異が生じ耐性を獲得したと考えられた。一方、治療抵抗性になるにつれて、

Quasispecies の系統は大きく変化することが明らかとなった。

共同研究者氏名

佐藤光明

山梨大学医学部第一内科 助教

榎本信幸

山梨大学医学部第一内科 教授

されてはいない。

一方、C型肝炎ウイルス(HCV)は宿主内で quasispecies と呼ばれる混在状態で存在し治療反応や病態形成に関与することが想定されていたが詳細な検討はこれまで技術的に困難であった。しかしながら近年の次世代シーケンス技術を用いることにより、このような解析も可能になりつつある。

DAA 治療に伴う quasispecies の動態および薬剤耐性変異の発生と経過を明らかにするために、次世代シーケンサーに

### A. 研究背景・目的

Direct antiviral agents (DAA)は、従来の治療で難治性のC型慢性肝炎に高い有効性を示すが、薬剤耐性の出現が大きな問題である。しかし耐性変異 HCV がどのような過程で出現するのか十分に解明

より得られる大量のウイルスゲノムデータを系統樹解析によって詳細に解析した。

## B. 研究方法

テラプレビル (TVR) /ペグインターフェロン/リバビリン3剤併用療法を施行した genotype1b HCV 34 例を対象とし、次世代シーケンサーRoche GS Junior を用い、HCV の NS3 プロテアーゼ領域の deep sequence を行い、以下の検討を行った。

(1) 3 剤併用療法開始超早期の quasispecies の変化と治療効果の関連を明らかにする。

(2) Non-SVR 8 症例における TVR 耐性変異の発生と経過を明らかにする

(3) 治療に伴う quasispecies の動態を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本研究は梨大学における倫理委員会の承認を得て行われた。

## C. 研究成果

(1) 34 症例中、SVR 群は 26 例 (76%) であり、non-SVR は 8 例 (24%) であった。ウイルスゲノムの多様性をシャノンエントロピー (Sn) あるいはウイルスゲノムの平均変異率 (Mf) で求めると、ウイルスゲノム多様性は 3 剤併用療法開始わずか 12 時間後には SVR 群で減少していたが、non-SVR 群では減少は認めなかった。また IFL3 SNP のメジャー群 (TT) ではマイナー群 (TG/GG) と比較して多様性の減少が顕著であった。

(2) Non-SVR 群では治療抵抗性になるにつれて、ウイルス量が再上昇するが、ウイ

ルス量再上昇に伴い、治療前に存在した一部の population が選択され、quasispecies の構成が変化した。

しかし、治療終了後耐性変異が消失しても quasispecies の構成変化は維持された。一方、治療前に認めた少数の耐性変異 HCV は、臨床的耐性 HCV へと進展しなかった。(3) ウイルス再上昇に伴う quasispecies の系統変化は non-SVR 全例で認められた。耐性変異が消失しても quasispecies の系統は治療前に戻らなかった。シメプレビルでもテラプレビル同様 quasispecies の選択が生じたが、PEG-IFN+RBV 治療経過、自然経過では特定の quasispecies の選択は認めなかった。

## D. 考察

3剤併用療法開始後、わずか12時間後の多様性の変化で治療効果を予測することができる可能性が示唆された。その多様性の変化はIFL3 SNPとも関連があり、IL28B SNPはIFN反応性を規定するため、早期の多様性の変化はIFNが関連していると考えられた。

治療前に少数の耐性変異を認めた症例は、そのHCVが臨床的耐性HCVに進展せず、野生型のHCVに変異が生じ耐性を獲得したと考えられた。

一方、ウイルス再上昇に伴う quasispecies の系統変化は、NS3プロテアーゼ阻害剤使用における一般的な現象であることが考えられた。耐性変異が消失しても系統変化が維持される理由は現時点で明らかではないが、本現象はその後の経過やDAAによる再治療に影響を与える可能性があり、今後の検討を要する。

## E. 結論

耐性変異を含む広範囲の塩基配列を deep sequence を用いて直列的に解析し、従来のホットスポット部位だけの検討では分からなかった耐性の起源、quasispecies の動態を詳細に解析し得た。

## G. 研究発表論文発表

### 1. 論文発表

1. Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsushashi H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, Honda M, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, Tanaka Y.

Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C.

Hum Genet. 2015 Mar;134(3):279-89. doi: 10.1007/s00439-014-1520-7. Epub 2014 Dec 17.

2. Itakura J, Kurosaki M, Takada H, Nakakuki N, Matsuda S, Gondou K, Asano Y, Hattori N, Itakura Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Takahashi Y, Maekawa S, Enomoto N, Izumi N.

Naturally occurring, resistance-associated hepatitis C virus NS5A variants are linked to IL28B genotype and are sensitive to

interferon-based therapy.

Hepatol Res. 2015 Jan 6. doi: 10.1111/hepr.12474. [Epub ahead of print]

3. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K.

Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus.

J Virol. 2014 Nov 15;88(22):13352-66.

4. Tatsumi A, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N.

Liver stiffness measurement for risk assessment of hepatocellular carcinoma.

Hepatol Res. 2014 Jun 24. doi: 10.1111/hepr.12377. [Epub ahead of print]

5. Miura M, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Tatsumi A, Takano S, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N.

Deep sequencing analysis of variants resistant to the non-structural 5A inhibitor daclatasvir in patients with genotype 1b hepatitis C virus infection.

Hepatol Res. 2014 Feb 25. doi: 10.1111/hepr.12316. [Epub ahead of print]

6. Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T,

Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T,  
Araki T, Enomoto N.

Hepatocellular carcinoma risk assessment  
using gadoxetic acid-enhanced hepatocyte  
phase magnetic resonance imaging.

Hepatol Res. 2014 Dec;44(13):1339-1346.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし。

##### 2. 実用新案登録

該当なし。

##### 3. その他

特記事項無し



## HCV 感染の細胞特異性における Quasispecies の意義に関する検討 （宿主因子を標的とする新規薬剤の開発）

担当責任者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨 C型肝炎ウイルス (HCV)の慢性感染に伴う末期肝硬変および肝細胞癌に対する治療として肝臓移植が広く行われているが、肝移植後再発肝炎は難治性であり、再感染機構を解明する必要がある。本研究は、新しいグラフトへの再感染における HCV の遺伝子多型(Quasispecies)の意義を明らかにすることを目的とした。In vitro の感染系で、Huh7 細胞に馴化した HCVcc (HCVcc/Huh7)と Hep3B 細胞に馴化した HCVcc (HCVcc/Hep3B)を作製した。次世代シーケンスの結果、それぞれ異なった Quasispecies を保持しており、異なる細胞株に感染させた際に、さらに新たな Quasispecies が出現することが明らかになった。HCVcc/Huh7 は Huh7 細胞に対して、HCVcc/Hep3B は Hep3B/miR-122 細胞に対して特異的に高い感染性を示した。これらの結果から、Quasispecies は細胞特異的な高い感染性を得るために重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、SCID マウスを用いた in vivo の検討では、Huh7 細胞や Hep3B 細胞と異なる Quasispecies が in vivo で選択されることが明らかになった。HCV-RNA の Quasispecies は移植時のドナーグラフトや新規感染者に対する効率的な感染成立に重要な役割を担う可能性がある。また、ウイルスが薬剤抵抗性を獲得する際にも Quasispecies が重要な役割を演じる可能性がある。

### A. 研究目的

HCV に感染すると高率に慢性化し、肝硬変を経て肝細胞癌を発症する。ペグ化 IFN とリバビリン、プロテアーゼ阻害剤の併用により治療効果に改善が認められているが、末期肝硬変や切除不能な肝癌に対する治療法は肝移植のみである。肝移植後再発 C型肝炎は難治性であり、HCV の再感染機構を明らかにする必要がある。最近我々は、miR-122 を強制発現させた Hep3B 細胞が Huh7 細胞と同程度に HCVcc の感染増幅を許容することを明らかにした。本研究では HCVcc が増幅可能な細胞株である Huh7 細胞および Hep3B/miR-122 細胞、さらに in vivo モデルとしてヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HCV 感染の細胞特異性における Quasispecies の意義を明らかにすることを目的とした。さらに、本研究では、

miR-122 阻害剤の抵抗性獲得における Quasispecies の役割を明らかにする。

### B. 研究方法

In vitro で合成した JFH1 株由来の HCV-RNA を Huh7.5.1 および Hep3B/miR-122 細胞に導入し、それぞれの細胞でウイルスの Passage を継続し、それぞれの細胞に馴化した高力価のウイルスである HCVcc/Huh7 および HCVcc/Hep3B を産生し、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析を行った。同時に、HCVcc/Huh7 および HCVcc/Hep3B の細胞特異的な感染性を評価した。さらに、それらのウイルスを異なる細胞に感染させた際の Quasispecies の変化を解析

した。また、HCVcc/Huh7 および HCVcc/Hep3B を2種類のドナー由来のヒト肝細胞キメラマウスそれぞれに感染させ、感染成立後の Quasispecies の変化を検討した。また、TALEN を用いて miR-122 ノックアウト Huh7 細胞を作製し、HCV の感染性を評価した。

#### (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、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、個人情報に厳格に管理、保存する。

### C. 研究結果

In vitro で合成した HCV-RNA を導入した Huh7.5.1 細胞からは 18 日後に、Hep3B/miR-122 細胞からは 55 日後に  $10^5$  FFU/ml を超える力価の感染性粒子が産生された。Huh7 細胞に馴化した HCVcc を HCVcc/Huh7、Hep3B 細胞に馴化した HCVcc を HCVcc/Hep3B とし、それぞれから独立した獲得変異が同定された。HCVcc/Huh7 は Huh7.5.1 細胞に、HCVcc/Hep3B は Hep3B/miR-122 細胞に高い感染性を示した。HCVcc/Hep3B および HCVcc/Huh7 をそれぞれ新たに Huh7 細胞および Hep3B 細胞に再馴化させたところ、新たな Quasispecies が出現した。出現した変異を導入した HCV-RNA は細胞特異的な感染性の違いを認めなかったことから、細胞特異的な感染性には単一の変異ではなく、Quasispecies が重要な役割を演じていることが示唆された。また、HCVcc/Huh7 および HCVcc/Hep3B は2種類のドナー由来のヒト肝細胞キメラマウ

スに同等の感染性を示した。

HCVcc/Hep3B は6頭中1頭で、HCVcc/Huh7 は6頭中5頭で感染が成立した。そこで、HCVcc/Huh7 の感染後 24、72、120 時間および7日での遺伝子多型を Deep Sequence で検討した。キメラマウス内では、Huh7 細胞では、消失した多型が主に増殖しており、Huh7 細胞とキメラマウスの肝臓では、異なったウイルス株が選択されることが示唆された。

次に、miR-122 阻害剤の抵抗変異株を得るために、TALEN を用いて miR-122 ノックアウト Huh7 細胞を作製した。親株に比べて感染性は低いものの、HCV の感染増殖は miR-122 非依存的に起こりうるということが明らかになった。

### D. 考察

肝移植や急性感染における新規感染巣への HCV の感染成立における Quasispecies の役割を in vitro および in vivo で Huh7 細胞および Hep3B 細胞を用いることで検討した。In vitro でも in vivo でも新たな感染環境で効率的に HCV が増えるために、Quasispecies が関与していることが示唆される。今後は、薬剤耐性における Quasispecies の意義、特に miR-122 阻害剤に抵抗を示す HCV を用いて、その意義を明らかにする予定である。

### E. 結論

HCV の肝移植後再感染や急性感染における効率的な複製において、Quasispecies が重要な役割を演じている。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, and Matsuura Y. Amphipathic  $\alpha$ -Helices in apolipoproteins are crucial

to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens* 2014;

DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534

2. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, and Matsuura Y. Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus. *J. Virol.* 2014; 88: 5578-5594
2. 学会発表
1. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
2. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
3. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
4. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic  $\alpha$ -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of HCV. 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
5. Sayaka Aizawa, Toru Okamoto, Takahisa Kouwaki, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura, Processing of core protein by signal peptide peptidase participates in

propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014

6. Yoshiharu Matsuura, Toru Okamoto, Takasuke Fukuhara, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
7. 山本聡美、福原崇介、小野慎子、和田真実、塩川舞、岡本徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスの感染におけるアポリポタンパク質受容体の役割、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
8. 和田真実、福原崇介、中村昇太、小野慎子、山本聡美、塩川舞、岡本徹、小池和彦、松浦善治、アポリポ蛋白質の両親媒性 $\alpha$ ヘリックスはHCVの感染性粒子産生に寄与する、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
9. 岡本徹、相澤清香、杉山由加理、幸脇貴久、福原崇介、森石恆司、小池和彦、松浦善治、C型肝炎ウイルスの病原性発現におけるシグナルペプチドペプチダーゼの役割、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
10. 福原崇介、山本聡美、小野慎子、和田真実、岡本徹、茶山一彰、松浦善治、HCVのQuasispeciesは増殖性に関与する、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
11. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic  $\alpha$ -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
12. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 21st

International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014

13. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014

H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。