

ルとなる。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- Sato M, Kamada Y, Takeda Y, Kida S, Ohara Y, Fujii H, Akita M, Mizutani K, Yoshida Y, Yamada M, Hogaku K, Takehara T, Miyoshi E. (2014) Fetuin A negatively correlates with liver and vascular fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease subjects. *Liver International* in press.
- Asazawa H, Kamada Y, Takeda Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kim Y, Nezu R, Kuzushita N, Mita E, Kato M, Miyoshi E. (2014) Serum fucosylated haptoglobin in chronic liver diseases as a potential biomarker of hepatocellular carcinoma development. *Clin Chem Lab Med.* 53(1), 95-102.
- Kamada Y, Sato M, Kida S, Akita M, Mizutani K, Fujii H, Sobajima T, Yoshida Y, Shinzaki S, Takamatsu S, Takehara T, Miyoshi E. (2014) *N*-Acetylglucosaminyltransferase V exacerbates concanavalin A-induced mouse hepatitis. *Molecular Medicine Reports* Aug 14, in press.

2. 学会発表

- 第104回アメリカ癌学会 (AACR) April 5-9 in San Diego, USA  
2014年4月6日ポスター発表  
Kamada Y, Mizutani K, Fujii H, Akita

M, Ohara Y, Takamatsu S, Miyoshi E. Serum Mac-2 binding protein levels as a novel diagnostic biomarker for prediction of disease severity and nonalcoholic steatohepatitis.

- The AASLD LIVER MEETING November 7-11, Boston, USA

2014年11月9日ポスター発表

Kamada Y, Sato M, Takeda Y, Kida S, Ohara Y, Fujii H, Akita M, Mizutani K, Yoshida Y, Ymada M, Hougaku H, Takehara T, Miyoshi E. Fetuin-A negatively correlates with liver and vascular fibrosis in NAFLD subjects

- 2014 Joint Meeting of The Society for Glycobiology and The Japanese Society of Carbohydrate Research November 16-19 Honolulu Hawaii

2014年11月19日ポスター発表

Miyoshi E, Akita M, Mizutani K, Fujii H, Takamatsu S, Kamada Y.

Combination of two glycol-biomarkers could make a noninvasive diagnosis for nonalcoholic steatohepatitis.

- 第3回Kansai Liver Club

2014年3月15 口頭発表

木田祥穂、鎌田佳宏、佐藤元哉、藤井宏修、高松真二、三善英知

糖転移酵素GnT-Vの過剰発現は、肝臓でのHDL産生を促進する～糖鎖を介したがん動脈硬化の微妙な関係～

- 第8回日本病院総合診療医学会学術総  
会 2014年2月21日  
三善英知  
糖鎖関連腫瘍マーカーの開発と機能解  
析 口頭発表、招待講演

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

## 改良型 TK-NOG ヒト肝キメラマウスの作製に関する研究

担当責任者 末水 洋志 公益財団法人実験動物中央研究所実験動物研究部長

研究要旨：ヒト肝キメラ TK-NOG マウスでは長期飼育中に宿主由来の肝腫瘍が発生する問題がある。本研究では改良型 TK-NOG マウスを基盤とした肝キメラマウスを用いて長期観察型 C 型肝炎ウイルス感染モデルを作製する。

### A. 研究目的

HCV 感染モデルであるヒト肝キメラ TK-NOG マウスでは宿主由来の肝腫瘍が自然発生する。そのため、感染後の長期観察が十分に行えない問題がある。現行型 TK-NOG マウスを改良したヒト肝キメラ TK-NOG マウスについて、長期飼育による腫瘍発生の検証、および、HCV 感染感受性の検証を行い、長期観察可能な C 型肝炎ウイルス感染モデルの確立を目指す。長期観察型 HCV 感染モデルではヒト免疫細胞の共存により、ウイルス慢性肝炎モデルへの発展が期待され、肝炎治療薬開発に貢献すると思われる。

### B. 研究方法

実中研にて作製され既に戻し交配 5 世代まで進行した改良型 TK-NOG を基盤にヒト肝キメラマウスを作製した。ガンシクロビル投与により肝傷害を誘導し、市販の凍結ヒト肝細胞を移植した。ヒト肝細胞の生着を血中ヒトアルブミン測定により評価した。

### C. 研究結果

トランスサイレチン遺伝子プロモータにより発現制御される HSVtk-Tg-NOG マウス (TtrTK-NOG) ではガンシクロビル投与により肝

傷害が確認された。市販の凍結ヒト肝細胞を移植したところ、移植 4 週以降で血中ヒトアルブミンが検出され、20 週以降も継続している。

### D. 考察

戻し交配第 6 世代の TtrTK-NOG マウスでさえヒト肝細胞の生着が確認できたことから、次年度取得を見込む戻し交配第 8 世代以降（遺伝背景が完全に NOG 化された）の TtrTK-NOG マウスではヒト肝キメラマウスが更に安定して作製できると思われる。ヒト肝キメラマウスの長期観察に加えウイルス感染性の確認に供する予定である。

### E. 結論

TtrTK-NOG マウスを基盤としたヒト肝キメラマウスは HCV 感染研究、および、診断薬・治療薬開発における新たな研究ツールとなる。

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

### 手術検体を用いたヒト肝細胞の生着の検討

(肝移植後難治性 C 型肝炎に対する抗ウイルス治療および切除肝サンプル由来肝細胞を用いたヒト肝細胞置換マウス作成に関する研究)

担当責任者	永野 浩昭	山口大学大学院医学系研究科	消化器・腫瘍外科学	教授
担当責任者	江口 英利	大阪大学大学院医学系研究科	消化器外科学	講師
研究協力者	和田 浩志	大阪大学大学院医学系研究科	消化器外科学	助教

#### 研究要旨

HCV 陽性症例に対する肝移植後の HCV 肝炎再発に対して、従来の Peg-IFN/RBV 無効例を中心にシメプレビル(SMV)・Peg-IFN・RBV 療法を 9 例に導入し、その治療効果、免疫抑制剤の血中濃度を与える影響および有害事象発現率について検討した。9 例中 8 例で、HCV-RNA の陰性化が得られた。また、第一世代のテラプレビルと比較して、免疫抑制剤の血中濃度に及ぼす影響は少なく、免疫抑制剤内服中の肝移植後症例に対しても安全に施行可能であった。しかし、有害事象中止を 2 例に認めており、さらに標準用量で開始した 2 例では、いずれも減量投与が必要であったため、副作用に注意しながら慎重に施行する必要があると考えられた。また、切除肝サンプル由来肝細胞を用いたキメラマウス作成に対して、7 例の肝組織を提供した。

#### A. 研究背景、目的

##### (背景)

免疫抑制剤や術後管理の進歩により、末期肝硬変に対する治療として、肝移植術は確立されつつある。しかし、本邦における末期肝硬変の主たる原因疾患である、C 型肝炎症例では、肝移植後の HCV 肝炎再発は必発であり、他の原疾患による肝移植と比較して成績は不良である。教室では、これまでにステロイドを使用しない免疫抑制療法と、術後早期から低用量より開始するペグインターフェロン (Peg-IFN) とリバビリン (RBV) による preemptive な抗ウイルス療法を行ってきたが、Genotype 1b 型に対する SVR 率は、約 40% と十分とは言えない。そこで本研究では、Peg-IFN/RBV 無効例を中心にシメプレビル (SMV)・Peg-IFN・RBV 療法を導入したので、その効果について検討した。また、日本人由来肝細胞を用いたヒト肝細胞置換マウス作成に関する研究に対して、肝切除症例の肝組織の提供を行った。

#### B. 研究方法

1998 年～2014 年までに当院で施行した HCV 陽性肝移植 54 例のうち Genotype 1b の 9 例に SMV・Peg-IFN・RBV 剤併用による抗ウイルス治療を施行した。平均年齢は、60 歳 (42-72)、男女比 6:3、肝移植後からの期間は

中央値 6.3 年 (0.6-12.2) であった。全例で Peg-IFN  $\alpha$  2a を使用し、SMV は 100mg/日の標準用量を投与し、7 例では、Peg-IFN・RBV を減量して開始した。9 例に関して HCV-RNA 量の経時的変化、免疫抑制剤の血中濃度を与える影響、有害事象について解析した。

#### C. 研究結果

SMV・Peg-IFN・RBV による 3 剤治療を施行した 9 例中 8 例で、肝移植後に Peg-IFN/RBV の治療歴があり、その治療効果は、再燃 2 例、無効 6 例であった。HCV-RNA 量は、開始 2 週目で 3 例 (33%) が陰性化し、4 週目で 5 例 (55.5%)、6 週目までに 8 例 (88.9%) が陰性化したが、1 例のみ 12 週投与にても HCV-RNA の陰性化が得られず、治療を中止とした。それ以外の有害事象中止として、貧血により 1 例が治療開始 8 週目で中止、腸閉塞にて 1 例が治療開始 13 週目で中止となっている。また、標準用量で開始した 2 例は、いずれも Hb 値低下を認めたため、RBV を 1 段階減量する必要があった。

また、免疫抑制剤としてカルシニューリン阻害剤は、シクロスポリン 2 例、タクロリムス製剤 7 例であったが、シクロスポリン投与の 1 例で治療開始前のトラフ値が 146ng/ml であったが、治療開始後 4 週目のトラフ値が 101ng/ml と

30%の減少を認めた。また、タクロリムス製剤の1例で治療開始前のトラフ値が2.9ng/mlであったが、治療開始後4週目のトラフ値が4.0ng/mlと38%の増加を認めた。いずれの9例も免疫抑制剤の投与量を変更することなく継続可能で、免疫抑制剤の血中濃度の増減も50%以内であり、拒絶反応も認めなかった。現在、SVRが1例、24週の治療終了・経過観察中が1例、Peg-IFN/RBVによる治療継続中が5例(いずれもHCV-RNA陰性化)である。

#### D. 考察

肝移植後の難治性HCV肝炎症例に対して、Peg-IFN・RBV無効例6例と再燃例2例を含む9例にSMV・Peg-IFN・RBVによる3剤治療を施行した。第一世代のテラプレビルと比較して、免疫抑制剤の血中濃度に及ぼす影響は少なく、免疫抑制剤内服中の肝移植後症例に対しても安全に施行可能であった。また、9例中8例でHCV-RNAの陰性化が得られており、高い治療効果があると考えられる。しかし、貧血による有害事象中止を1例に認め、標準用量で開始した2例では、いずれも減量投与が必要であったため、副作用の発現には、細心の注意を要すると考えられる。

#### E. 結論

HCV陽性肝移植症例に対するSMV・Peg-IFN・RBV3剤併用によるウイルス治療は、免疫抑制剤の血中濃度に与える影響は少なく、比較的良好な治療効果を示したが、多くの症例で減量投与が必要であり、副作用に注意しながら慎重に施行する必要があると考えられた。また、肝切除検体として、2014年12月までに肝提供者および肝腫瘍に対する肝切除術を施行した7症例について、消化器内科に肝組織サンプルを提供し、細胞単離とキメラマウス作成に取り組んでいる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
特になし。
2. 実用新案登録  
特になし。
3. その他  
特になし。

厚生労働科学研究委託費（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））  
委託業務成果報告（業務項目）

HCV NS3-4A Proteaseに制御される宿主因子の解析と新規治療法への応用

担当責任者：坂本直哉 北海道大学 大学院医学研究科 消化器内科学分野

研究要旨：

培養細胞を用いてHCV・NS3-4Aプロテアーゼ発現調節可能細胞株を作成し、宿主蛋白発現量変化を網羅的・比較定量的にプロテオーム解析することによりNS3-4Aプロテアーゼにより調整される新規宿主蛋白を同定し解析するのが目的である。さらに同定した新規細胞性基質の解析を行いHCVライフサイクルのメカニズム解明に取り組むことにより、HCVの粒子形成機構、分泌機構、病原性発現機構を分子レベルで解明し、宿主因子をターゲットにした新たな抗ウイルス薬開発の基盤形成を目指す。

A. 研究目的

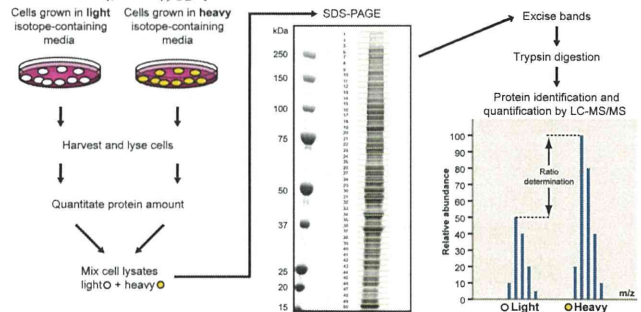
C型肝炎治療は今後経口抗ウイルス薬が主体となり、肝硬変例、高齢者、肝移植例など治療困難例にウイルスのほぼ完全排除が可能となる。しかしウイルス排除後の肝発癌の頻度、またその危険因子である肝病態の進展軽快に関わる遺伝要因を含む宿主因子は十分に知られていない。本研究計画で我々は下記の目的を設定し研究を進める。

1. L-カルニチンの肝脂肪化抑制効果を介した抗ウイルス作用の解析：HCV genotype 1b, 2a 培養系を用いて L-カルニチンの肝脂肪滴合成抑制効果および抗ウイルス効果を解析し、臨床にてDAAを用いた抗ウイルス療法の併用効果の可能性について検討する。
2. ウイルス培養系と in-silico 解析を用いてNS5A 阻害薬、NS3 プロテアーゼ阻害薬の標的蛋白結合性と薬剤耐性化発現機構の解析をおこなう。DAA とそれぞれの標的蛋白との高精度の動的結合モデルを構築し、薬剤耐性変異が標的結合性、複合体安定性に与える影響を解析し、得られた結果を標的蛋白(NS3, NS5A)に変異を導入した HCV replicon 細胞を用いた増殖・薬剤耐性レベルの解析で確認する。
3. HCV・NS3-4A プロテアーゼにより調整される宿主蛋白発現量変化を網羅的・比較定量的にプロテオーム解析することにより NS3-4A プロテアーゼに影響される新規宿主蛋白を同定し解析する。

B. 研究方法

培養細胞で選択的 HCV 蛋白発現調節細胞株を作成し、SILAC 法にて標識を行う。蛋白発現量変化を網羅的・定量的にプロテオーム解析する。

I. SILAC法の概要



（倫理面への配慮）

臨床検体、ヒト遺伝子情報を用いた研究における個人情報保護、ならびに検体の使用や保管等に関しては「ヘルシンキ宣言(2008年10月修正)」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成24年2月3日改正)」を遵守して実施する。

本研究における遺伝子組換え実験は、「遺伝子組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」に基づく「研究開発二種省令・研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」に準拠し遂行する。研究の施行に当たっては、北海道大学組み換えDNA実験安全管理委員会の承認(承認番号 23(34)号)を取得している。

C型肝炎ウイルスを含む病原微生物の使用に当たっては、国立大学法人北海道大学病原微生物等安全管理規則に基づく実験計画の承認を得ている。

C. 研究結果

(1) Glutathione peroxidase 8 (GPx8) が HCV・NS3-4A プロテアーゼにより切断される宿主因子であるという事を SILAC 法による網羅的プロテオーム解析により同定した。GPx8 をクローニング後、HCV 生活環への関与を各段階毎に解析した結果、HCV のエントリーや RNA 複製ではなくウイルス粒子産生に関与している事が示唆された。

(2) Telaprevir 併用 interferon 治療の副作用予測に血清 granulysin が有用であることを報告した。

#### D. 考察

今回行ったプロテオーム解析の結果より、HCV・NS3-4A プロテアーゼが細胞内で発現する事により多くの宿主因子が直接および間接的に影響を受けることが示唆された。今回同定された新規宿主因子の GPx8 は、HCV のライフサイクルに直接影響する可能性が示唆された。

#### E. 結論

HCV・NS3-4A 蛋白発現細胞モデルを構築し、蛋白発現下において誘導される宿主因子を網羅的にプロテオーム解析することにより、NS3-4A プロテアーゼにより修飾を受ける細胞性因子を同定した。同定した細胞性因子を詳細に解析することにより、HCV 複製増殖機構、病原性発現機構を分子レベルで解明し、宿主因子をターゲットにした新たな抗ウイルス薬開発に貢献する事が期待できると考えられた。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 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; 134:279-89.  
doi: 10.1007/s00439-014-1520-7

2. Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kusano-Kitazume A,

Watanabe T, Kawai-Kitahata F, Otani S, Taniguchi M, Goto F, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M: Impaired induction of IL28B and expression of IFN $\lambda$ 4 associated with non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2015; Epub ahead of print  
doi: 10.1111/jgh.12902

3. Chuma M, Terashita K, Sakamoto N: New molecularly targeted therapies against advanced hepatocellular carcinoma: From molecular pathogenesis to clinical trials and future directions. *Hepatol Res* 2014; Epub ahead of print  
doi: 10.1111/hepr.12459

4. 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: Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions. *Hepatol Res* 2014; Epub ahead of print  
doi: 10.1111/hepr.12421

5. Matsuura K, Tanaka Y, Watanabe T, Fujiwara K, Orito E, Kurosaki M, Izumi N, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsushashi H, Kusakabe A, Shinkai N, Nojiri S, Joh T, Mizokami M: ITPA genetic variants influence efficacy of PEG-IFN/RBV therapy in older patients infected with HCV genotype 1 and favourable IL28B type. *J Viral Hepat* 2014; 21:466-74.  
doi: 10.1111/jvh.12171

6. Nakai M, Seya T, Matsumoto M, Shimotohno K, Sakamoto N, Aly HH: The J6JFH1 strain of hepatitis C virus infects human B-cells with low replication efficacy. *Viral Immunol* 2014; 27:285-94.  
doi: 10.1089/vim.2013.0140

##### 2. 学会発表

なし

H. 知的所得権の所得状況  
該当なし

## 細胞培養系を用いたHCVライフサイクル評価法の構築

担当責任者：加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

**研究要旨：**新規に開発された抗HCV薬であるNS5A阻害剤の培養細胞での評価系として、効率的な感染複製が可能なHCV遺伝子型2a株、JFH-1株のNS5A領域を他の遺伝子型のNS5Aに入れ換えたキメラウイルスの複製モデルを構築した。さらに遺伝子型1b株のNS5Aに入れ換えたキメラウイルスではNS5A阻害剤に対する耐性変異として知られているL31とY93の変異を導入し、その感受性をEC50値を測定することにより評価した。その結果、L31Mの変異では約4倍、L31Iでは1.4倍、L31Vでは約22倍の耐性を示した。また強い耐性変異として知られているY93Hは約700倍の耐性を示した。以上のような結果から、このNS5AキメラウイルスはNS5A阻害剤の薬剤感受性評価系として有用であると考えられた。

### A. 研究目的

これまでC型慢性肝炎の治療はインターフェロンを中心に行われてきた。しかし副作用が多く治療効果が十分ではないことから、より治療効果の高い新規薬剤が待ち望まれていた。近年、ウイルス蛋白質を直接標的とした抗ウイルス剤（direct antiviral agents；DAA）が開発された。中でもNS5A阻害剤は、経口投与が可能であり強い抗ウイルス作用を持つことから治療効果の向上が期待されている。しかしこれらDAA製剤はウイルス蛋白質を直接標的としているため、耐性変異により抗ウイルス効果が著しく低下する。治療中の耐性変異株の出現は肝炎再燃の原因となり、また治療前に耐性変異株が検出される症例では治療効果が不良となることが危惧されている。そこで本研究では培養細胞でのHCV感染増

殖系を用い、既報の耐性変異を導入したキメラウイルスを用いることでNS5A阻害剤に対する耐性変異評価系の構築を行った。

### B. 研究方法

培養細胞での感染と効率的な複製が可能なHCV JFH-1株を用い、そのNS5A領域を他の遺伝子型のNS5Aに入れ換えたキメラウイルスを作製した。さらに遺伝子型1b株のNS5Aに入れ換えたキメラウイルスでは、NS5A阻害剤の耐性変異として知られているL31とY93の変異を導入した株も作製した。これら作製したキメラウイルスコンストラクトからHCV全長RNAを合成し、Huh-7.5.1細胞に導入した後にNS5A阻害剤を添加しHCVの増殖を評価した。HCVの増殖の指標として培養細胞内と上清中のコア抗原量を測定した。



(倫理面への配慮)

本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株およびHCV株であり倫理面での問題はない。

### C. 研究結果

JFH-1 株の NS5A 領域を他の遺伝子型の NS5A に入れ換えたキメラウイルスを用いた検討では、すべての株で細胞内のコア抗原量の継時的な増加を認め、ウイルスの増殖が確認された。培養上清中のコア抗原量は NS5A が遺伝子型 2a 株、2b 株のもので高く、1a 株に置換したものではありません。JFH-1 株と同様であり、1b 株に置換したものではありません。これらの結果から、NS5A を置換したキメラウイルスでは培養上清中へのウイルス粒子の放出効率が増加していると考えられた。この系を用いて NS5A 阻害剤の感受性を評価したところ、NS5A を 1a、1b 株に置換した株では高い、2a、2b 株に置換した株では低い感受性を示し、遺伝子型 2a、2b の NS5A は NS5A 阻害剤に対し耐性と考えられた (表 1)。

表 1. NS5A 置換キメラウイルスの NS5A 阻害剤に対する EC50

ウイルス株	EC50
JFH-1	62.2 ± 12.8
NS5A-1a 株	15.4 ± 1.5
NS5A-1b 株	3.4 ± 0.2
NS5A-2a 株	2753.0 ± 342.3
NS5A-2b 株	> 5000

次に JFH-1 株の NS5A 領域を遺伝子型 1b 株の NS5A に入れ換えたキメラウイルスを用い、NS5A 阻害剤の耐性変異として知られている L31M, L31V, L31I, Y93H それぞれの変異を導入したキメラウイルスを作製した。これらのキメラウイルスは培養細胞中でほぼ同様の複製活性を示したが、Y93H を導入したキメラウイルスでは培養上清中のコア抗原量が高くなっており、この変異により培養上清中への粒子放出量が増加していると考えられた。NS5A 阻害剤に対する感受性評価の結果、L31I の変異ではあまり EC50 値は変化しなかったが、L31M の変異ではやや耐性を、L31V の変異ではさらに強い耐性を示した。また Y93H の変異では最も強い耐性を示したが、NS5A を 2a、2b 株に置換した株に比較してその耐性は軽度であった (表 2)。

表 2. 耐性変異導入キメラウイルスの NS5A 阻害剤に対する EC50

ウイルス株	EC50
NS5A-1b 株	4.8 ± 0.6
L31M	18.1 ± 1.1
L31V	104.1 ± 4.6
L31I	6.8 ± 0.4
Y93H	341.7 ± 50.5

### D. 考察

JFH-1 株の NS5A を他の株に置換したキメラウイルスを用い、NS5A 阻害剤に対する感受性評価を行った。他の遺伝子型株の NS5A に置換した検討では、遺伝子型 2 の

株に置換したもので強い耐性を示した。薬剤耐性変異を導入した株を用いた検討では、L31V や Y93H の変異で耐性を示した。しかしこれらの変異による耐性は、遺伝子型 2 型の NS5A に置換した株の耐性に比較すれば軽度であった。しかし Y93H の変異を導入した株では、薬剤耐性の獲得とともに増殖能も強くなっており、患者中でこの耐性変異が誘導されると NS5A 阻害剤で排除されにくくなる可能性が示唆された。

## E. 結論

NS5A を置換した JFH-1 株キメラウイルスを用い、NS5A 阻害剤の薬剤感受性評価系を構築した。この系を用いて得られる情報は、新規 C 型慢性肝炎治療薬として期待されている NS5A 阻害剤の臨床での使用においても重要であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kato T, Nakayama K, Lai MM, Shimosegawa T. HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. *PloS One*, 9(6), e98521, 2014.
- 2) Sung PS, Murayama A, Kang W, Kim MS, Yoon SK, Fukasawa M, Kondoh M, Kim JS, Kim H, Kato T, Shin EC. Hepatitis C virus entry is impaired by claudin-1 downregulation in diacylglycerol

acyltransferase-1-deficient cells. *J Virol*, 88(16), 9233-9244, 2014.

- 3) Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I-alpha in infectious virus production. *J Virol*, 88(13), 7541-7555, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) Kato T, Sugiyama N, Murayama A, Matsumura T, Shiina M, Asabe S, Wakita T, Imawari M. Antimicrobial Peptide LL-37 Deteriorate Infectivity of Hepatitis C Virus. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.
- 2) Sugiyama R, Sugiyama N, Murayama A, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Wakita T, Kato T. Elucidation of effects on HCV propagation and ISG induction by amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.
- 3) 杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、脇田隆宇、加藤孝宣.

NS5A-ISDRアミノ酸変異がHCV増殖に与える影響の解析. 第24回抗ウイルス療法研究会総会、2014年5月.

4) 村山麻子、藤原圭、脇田隆宇、加藤孝宣. C型肝炎ウイルスの細胞培養系を用いた第二世代NS5A阻害剤の抗ウイルス活性の評価. 第50回日本肝臓学会総会、2014年5月29-30日、東京.

5) 杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田

めぐみ、山田典栄、新田沙由梨、脇田隆宇、加藤孝宣. NS5A-ISDRアミノ酸変異によるHCV増殖およびIFN感受性への影響. 第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10-12日、横浜.

G. 知的所有権の出願・取得状況  
なし

## ヒト iPS 細胞を用いた HCV 感染系の構築

担当責任者 水口 裕之（大阪大学大学院薬学研究科・教授）

### 研究要旨

革新的な抗 C 型肝炎（HCV）治療薬の開発に向けた最大の課題は、HCV の生活環が再現でき、かつ利便性の高い *in vitro* HCV 感染評価系の開発である。本研究では、ゲノム編集技術を用いて HCV による自然免疫経路をノックアウトしたヒト iPS 細胞を調製することで、高効率に HCV が感染可能な細胞を調製することを試みる。これによって、様々な遺伝的背景を有する細胞における HCV の感染を評価可能になることが期待される。本年度は、HCV による自然免疫経路のノックアウトに向けて、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の自然免疫受容体の発現レベルの解析と、ヒト iPS 細胞のシングルクローンの採取および培養に関して検討を行った。

### 研究協力者

櫻井 文教 大阪大学院薬学研究科  
准教授  
高山 和雄 大阪大学大学院薬学研究科  
大学院生  
長基 康人 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

Acid-inducible gene-I (RIG-I) 遺伝子に変異が生じている。そのため、HCV が感染しても自然免疫活性化が起こらず、高効率に HCV が感染可能である。しかし一方でこのような特性から、Huh7.5.1 細胞では HCV による自然免疫活性化を評価することが出来ない。また近年、HCV の感染に影響を与える種々の一塩基多型 (SNP) が報告されているが、Huh7.5.1 細胞のみではこれらの影響を評価できない。

### A. 研究目的

革新的な抗 C 型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus; HCV) 薬の開発に向けた最大の課題は、HCV の生活環が再現でき、かつ利便性の高い *in vitro* HCV 感染評価系の開発である。現在、*in vitro* HCV 感染評価系としては、肝癌細胞株である Huh7.5.1 細胞が汎用されている。Huh. 7.5.1 細胞は、HCV 感染受容体を高発現していること、HCV の感染に必須の miR-122a を高発現していることに加え、HCV ゲノムを認識し、I 型インターフェロン (IFN) の発現上昇をはじめとする自然免疫を活性化する Retinoic

一方で近年、新たな *in vitro* HCV 感染評価系として、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が大きな注目を集めている。ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は、様々な遺伝的背景を有する個人から調製可能であることや、HCV による自然免疫活性化を評価可能であることなどの長所を有する。すでに我々はヒト初代肝細胞と同等の性質を有するヒト iPS 細胞由来肝細胞を分化誘導可能であること、ヒト iPS 細胞由来肝細胞に HCV レプリコンを導入することで HCV レプリコンが維持・増幅されること、HCV シュードウイルスが感染可能であることを明らかとしている。しかし一方で、HCV 感染により自然免疫が

活性化することで、HCV 感染が抑制される可能性がある。

そこで本研究では、HCV が高効率に感染可能なヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を調製することを目的に、RIG-I もしくはその下流分子をノックアウトしたヒト iPS 細胞を調製し、HCV 感染を評価することを目的とする。自然免疫が不活化された状態であるが、様々な遺伝的背景を有する細胞を調製し、HCV 感染能を評価することで、種々の遺伝的背景が HCV 感染に及ぼす影響を評価可能な系を確立することを試みることにした。

## B. 研究方法

### B.1. ヒト iPS 細胞の培養 (MEF 法)

ヒト iPS 細胞株は 10 ng/mL bFGF を含むヒト iPS 細胞用培地 ReproStem (ReproCELL) を用いて、マイトマイシン C 処理済みの MEF 上で培養した。4-6 日ごとに 0.1 mg/mL Dispase II (Roche) を用いてヒト iPS 細胞コロニーを回収後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。

### B.2. ヒト iPS 細胞の培養 (フィーダーフリー法)

ヒト iPS 細胞は 3 通りのフィーダーフリー法で培養した。各法に使用するコーティング剤と培地は以下の通り ; ①コーティング : iMatrix (LN511-E8、ニッピ)、培地 : AK03 (味の素) ②コーティング : vitronectin-XF (Stem Cell Tech.)、培地 : TeSR-E8 (Stem Cell Tech.) ③コーティング : N-Vitronectin (Invitrogen)、培地 : ReproFF (ReproCELL)。

### B.3. シングルクローンの採取および培養

$5 \times 10^3$  個のヒト iPS 細胞を 150 mm dish に播種し、シングルセルから形成されるコロニーを取得した。シングルセルから得たヒ

ト iPS コロニーは B.2. の方法に準じて 5 継代した。

### B.4. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製

肝細胞への分化を開始する前に、ヒト iPS 細胞を dispase で剥離し、Matrigel 上に継代し、MEF-conditioned medium を用いて 3-4 日間培養した。ヒト iPS 細胞を内胚葉細胞へ分化誘導する際は、100 ng/ml Activin A、4 mM L-Glutamine、0.2% FBS (PAA Laboratories)、1×B27 Supplement Minus Vitamin A (Life Technologies) を含む L-Wnt3A-expressing cell (ATCC、CRL2647)-conditioned RPMI1640 培地で 4 日間培養した。内胚葉細胞から肝幹前駆細胞へ分化誘導する際は、30 ng/ml BMP4、20 ng/ml FGF4、4 mM L-Glutamine、1×B27 Supplement Minus Vitamin A を含む RPMI1640 培地で 5 日間培養した。肝幹前駆細胞から肝細胞へ分化誘導する際は、20 ng/ml HGF、4 mM L-Glutamine、1×B27 Supplement Minus Vitamin A を含む RPMI1640 培地で 5 日間培養したのちに、20 ng/ml OsM を含む HCM 培地 (HCM 培地は EGF を含まないものを使用) で 11 日間培養した。

### B.5. 遺伝子発現解析

ISOGEN (Nippon Gene) を用いて、Total RNA を回収した。各 Total RNA を RNase-free DNaseI (NEB) で処理した後、Superscript VILO cDNA Synthesis kit (Invitrogen) を用いて、逆転写反応を行い、Complementary DNA (cDNA) を合成した。SYBR Green gene expression assays (Applied Biosystems) を用いた定量的リアルタイム RT-PCR 法を行い、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) により定量した。GAPDH 遺伝子を内部標準遺伝子として用いた。

(倫理面への配慮)

該当事項無し。

## C. 研究成果

### C.1. ヒト iPS 細胞のシングルクローンの採取および培養に関する検討

RIG-I もしくはその下流分子をノックアウトした iPS 細胞を作製するためには、ヒト iPS 細胞のシングルクローンを取得する必要がある。ヒト iPS 細胞の培養に汎用されている MEF フィーダーはシングルクローン取得には適さないため、シングルセル・クローニングが可能な培養法の確立を試みた。次に示す 3 条件を用いてヒト iPS 細胞をシングルセルから増幅可能か検証した；  
①コーティング：LN511-E8、培地：AK03 (511-E8 法) ②コーティング：vitronectin-XF、培地：TeSR-E8 (TeSR 法)  
③コーティング：N-Vitronectin、培地：ReproFF (Repro 法)。Repro 法を用いてヒト iPS 細胞をシングルセル培養することにより、脱分化した細胞が多数みられるようになったため、本法ではヒト iPS 細胞維持は難しいと判断した。一方、511-E8 法および TeSR 法を用いてヒト iPS 細胞をシングル培養した際は、典型的な iPS コロニー形態を維持しており、分化細胞はほとんど観察されなかった。また、511-E8 法および TeSR 法を用いて 5 継代したヒト iPS 細胞における未分化マーカー遺伝子 (hOCT3/4、hNANOG、hSOX2) の発現量は継代前のヒト iPS 細胞と比較してほとんど変化がなかった。以上の結果から、511-E8 法および TeSR 法を用いてヒト iPS 細胞のシングルセル・クローニングが可能であることが示唆された。

C.2. ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞における自然免疫受容体の発現解析  
ヒト iPS 細胞由来肝細胞が HCV 感染によ

る自然免疫活性化を評価できるか調べるため、ヒト iPS 細胞由来肝細胞における自然免疫関連分子 (RIG-I、TLR3、IPS-1、IFNRA1) の発現量を解析した (Fig. 1)。未分化ヒト iPS 細胞における TLR3、IPS-1、IFNRA1 遺伝子発現量はヒト初代培養肝細胞よりも低かったが、ヒト iPS 細胞由来肝細胞における RIG-I、TLR3、IPS-1、IFNRA1 遺伝子発現量はヒト初代培養肝細胞とほぼ同程度であった。以上のことから、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は HCV 感染による自然免疫活性化を評価できる可能性が示唆された。

## D. 考察

### D.1. ヒト iPS 細胞のシングルクローンの採取および培養に関する検討

511-E8 法あるいは TeSR 法を用いてヒト iPS 細胞のシングルセル・クローニングが可能であることが示唆された。本培養法と TALEN・CRISPR などのゲノム編集技術を組み合わせて用いることにより、標的遺伝子部位において NHEJ を起こした細胞をシングルセルレベルで選択し、標的遺伝子を欠損したヒト iPS 細胞株を効率よく増殖できると考えられる。

### D.2. ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞における自然免疫受容体の発現解析

ヒト iPS 細胞由来肝細胞はヒト初代培養肝細胞に近い自然免疫受容体の遺伝子発現量を示した。したがって、Huh7.5.1 細胞とは異なり、HCV 感染による自然免疫活性化を評価できる可能性が示唆された。

## E. 結論

本年度は、HCV による自然免疫経路のノックアウトに向けて、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の自然免疫受容体の発現レベルがヒト初代培養肝細胞に匹敵すること、ヒト iPS 細胞のシングルクローンの採取お

よび培養が可能であることを確認した。

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) 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。

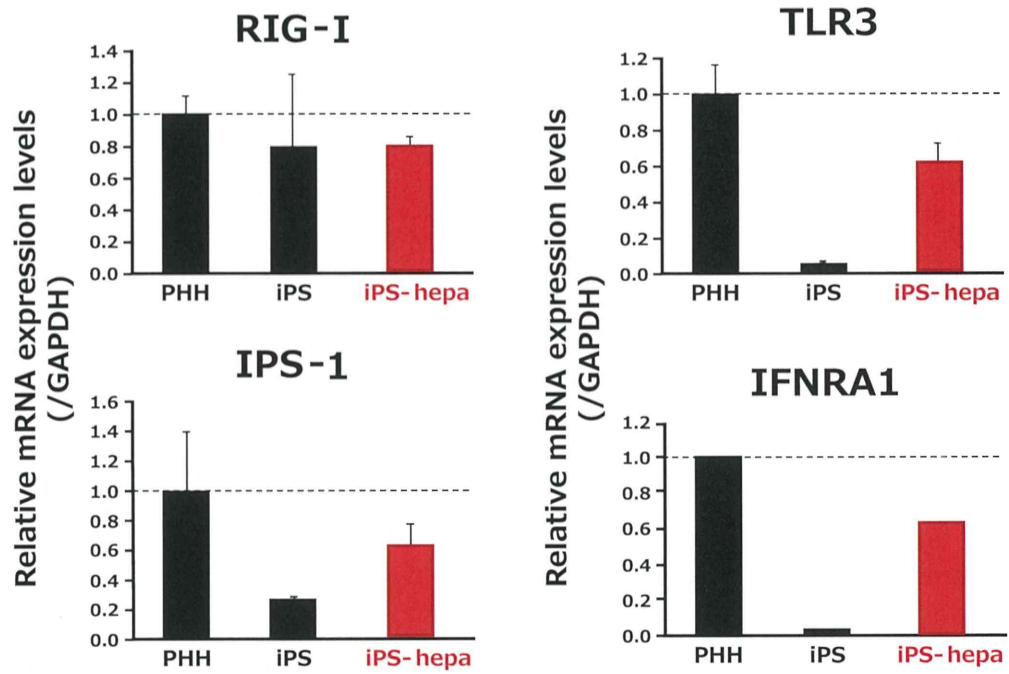


Fig.1 初代培養ヒト肝細胞 (PHH)、未分化ヒト iPS 細胞 (iPS)、ヒト iPS 細胞由来肝細胞 (iPS-hepa) における自然免疫関連分子 (RIG-I、TLR3、IPS-1、IFNRA1) の発現量解析



### Ⅲ. 学会等発表実績

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「モデル動物等を用いたHCV感染病態と関連する宿主・ウイルス因子の解析と新規治療法の開発に関する研究」

機関名 国立大学法人大阪大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Serum Mac-2 binding protein levels as a novel diagnostic biomarker for prediction of disease severity and nonalcoholic steatohepatitis. （ポスター発表）	Kamada Y, Mizutani K, Fujii H, Akita M, Ohara Y, Takamatsu S, Miyoshi E.	第104回アメリカ癌学会 (AACR) April 5-9 in San Diego, USA	2014年4月6日	国外
Fetuin-A negatively correlates with liver and vascular fibrosis in NAFLD subjects （ポスター発表）	Kamada Y, Sato M, Takeda Y, Kida S, Ohara Y, Fujii H, Akita M, Mizutani K, Yoshida Y, Ymada M, Hougaku H, Takehara T, Miyoshi E.	The AASLD LIVER MEETING November 7-11, Boston, USA	2014年11月9日	国外
Identification of sialylated glycoproteins in doxorubicin-treated hepatoma cells with glycoproteomic analyses. （ポスター発表）	Takamatsu S, Azuma K, Serada S, Terao N, Takeishi S, Kamada Y, Naka T, Miyoshi E.	2014 Joint Meeting of The Society for Glycobiology and The Japanese Society of Carbohydrate Research November 16-19 Honolulu Hawaii	2014年11月19日	国外
Combination of two glycol-biomarkers could make a noninvasive diagnosis for nonalcoholic steatohepatitis. （ポスター発表）	Miyoshi E, Akita M, Mizutani K, Fujii H, Takamatsu S, Kamada Y.	2014 Joint Meeting of The Society for Glycobiology and The Japanese Society of Carbohydrate Research November 16-19 Honolulu Hawaii	2014年11月19日	国外
糖転移酵素GnT-Vの過剰発現は、肝臓でのHDL産生を促進する～糖鎖を介したがん動脈硬化の微妙な関係～ （口頭発表）	木田祥穂、鎌田佳宏、佐藤元哉、藤井宏修、高松真二、三善英知	第3回 Kansai Liver Club	2014年3月15日	国内
糖鎖関連腫瘍マーカーの開発と機能解析（口頭発表、招待講演）	三善英知	第8回 日本病院総合診療医学会学術総会	2014年2月21日	国内

Antimicrobial Peptide LL-37 Deteriorate Infectivity of Hepatitis C Virus. (ポスター発表)	Kato T, Sugiyama N, Murayama A, Matsumura T, Shiina M, Asabe S, Wakita T, Imawari M.	21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses	September 7-11, 2014.	国外
Elucidation of effects on HCV propagation and ISG induction by amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region. (ポスター発表)	Sugiyama R, Sugiyama N, Murayama A, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Wakita T, Kato T.	21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses	September 7-11, 2014.	国外
NS5A-ISDRアミノ酸変異がHCV増殖に与える影響の解析. (口頭発表)	杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、脇田隆宇、加藤孝宣.	第24回抗ウイルス療法研究会総会	2014年5月7-9日	国内
C型肝炎ウイルスの細胞培養系を用いた第二世代NS5A阻害剤の抗ウイルス活性の評価. (口頭発表)	村山麻子、藤原圭、脇田隆宇、加藤孝宣.	第50回日本肝臓学会総会	2014年5月29-30日	国内
NS5A-ISDRアミノ酸変異によるHCV増殖およびIFN感受性への影響. (ポスター発表)	杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、新田沙由梨、脇田隆宇、加藤孝宣.	第62回日本ウイルス学会学術集会	2014年11月10-12日	国内
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 (口頭発表)	水口裕之	第41回日本毒性学会学術集会	2014年7月	国内
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 (口頭発表)	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	第64回日本薬学会近畿支部総会・大会	2014年10月	国内
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 (口頭発表)	水口裕之、高山和雄	第87回日本生化学会大会	2014年10月	国内

## 2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Simeprevir for the treatment of chronic hepatitis C genotype 1 infection.	Takehara T	Expert Rev Anti Infect Ther. 12(8):909-17	2014	国外
Significance of post-treatment alpha-fetoprotein levels for hepatocellular carcinoma incidence after interferon therapy.	Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Miyazaki M, Yamada A, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Fukui H, Inui Y, Hijioka T, Inada M, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Hayashi E, Kato M, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kasahara A, Hamasaki T, Hayashi N, Takehara T, and the Osaka Liver Forum.	Clin Gastroenterol Hepatol 12: 1186-1195	2014	国外
Suppression of hepatocellular carcinoma development in hepatitis C patients given interferon-based antiviral therapy.	Hiramatsu N, Oze T, Takehara T.	Hepatol Res 45: 152-161	2014	国外
【ダクラタスビル・アスナプレビル併用療法】作用機序と薬剤特性	竹原 徹郎	肝胆膵 69 : 627-630	2014	国内
Fetuin A negatively correlates with liver and vascular fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease subjects	Sato M, Kamada Y, Takeda Y, Kida S, Ohara Y, Fujii H, Akita M, Mizutani K, Yoshida Y, Yamada M, Hogaku K, Takehara T, Miyoshi E.	Liver International	in press	国外
Serum fucosylated haptoglobin in chronic liver diseases as a potential biomarker of hepatocellular carcinoma development.	Asazawa H, Kamada Y, Takeda Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kim Y, Nezu R, Kuzushita N, Mita E, Kato M, Miyoshi E	Clin Chem Lab Med. 53(1), 95-102	2014	国外
N-Acetylglucosaminyltransferase V exacerbates concanavalin A-induced mouse hepatitis.	Kamada Y, Sato M, Kida S, Akita M, Mizutani K, Fujii H, Sobajima T, Yoshida Y, Shinzaki S, Takamatsu S, Takehara T, Miyoshi E.	Molecular Medicine Reports	in press	国外