

平成 21 年 3 月 30 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2008

課題番号：19041077

研究課題名（和文）：免疫系の攪乱による C 型肝炎ウイルスの持続感染化及び発症機序の解析とその制御

研究課題名（英文）：Persistent infection of Hepatitis C virus to get over the acquired immunity system

研究代表者

小原 道法 (KOHARA MICHINORI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・参事研究員

研究者番号：10250218

研究成果の概要：HCV 感染の大きな特徴として感染後高率に持続感染化し、慢性肝炎、さらに肝細胞癌を発症することがあげられる。HCV の持続感染および免疫系の攪乱機序などを明らかにし、ウイルス感染に対する新たな防御法および治療法を確立することを目的とする。

HCV の病原性発現機序を解析するために HCV 遺伝子導入トランスジェニックマウスの開発を行い、任意の時期に HCV 遺伝子をスイッチング発現するトランスジェニック (Cre/loxP/HCV-MxCre Tg) マウスを樹立した。これにより、正常な免疫応答下で持続的に HCV 蛋白を発現させることを可能にした。Cre/loxP/HCV-MxCre Tg マウスは正常な免疫応答下で持続的に HCV 蛋白を発現させることができ、慢性肝炎を発症させることができる HCV 持続感染モデルとして非常に有用であり、これまで困難とされていた HCV の持続感染化と宿主の免疫応答の関係を解析することを可能にした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,100,000	0	8,100,000
2008年度	8,300,000	0	8,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	16,400,000	0	16,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 細目：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス、持続感染、自然免疫、獲得免疫、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

難治性のウイルス疾患の中でも 200 万人と感染者が多く、予後も悪い C 型肝炎ウイルス (HCV) 疾患の征圧を研究の基軸とする。HCV は感染後 80～90% の高率で持続感染化し、慢性肝炎、さらに肝細胞癌を発症する。持続感染が成立するためには細胞内自然免疫と宿主の獲得免疫監視機構の両方から逃

避する必要がある。HCV は感染肝細胞内で持続的に複製し、インターフェロン (IFN) 系による複製阻害を受けない。これまでに、HCV レプリコン細胞を用いた研究から、HCV の NS3/4A プロテアーゼが RIG-I-IPS-1 経路の修飾を行うことによって IFN ベータの産生を抑制することが報告されてきた。しかしながら、我々は、培養細胞やマウス肝臓組

織細胞と異なり、ヒト肝臓組織中ではもともと TLR3 などのセンサー分子などの発現及び活性化が少ないことを見いだしている。また、獲得免疫系からの逃避については、HCV 遺伝子スイッチング発現トランスジェニック (HCV-Tg) マウスの解析から、特異的 CTL が誘導されているにもかかわらず免疫寛容が成立し、HCV 発現細胞が排除されなくなることを見いだした。これらの知見から、細胞内自然免疫系の解析にはヒト肝臓組織で、獲得免疫系の解析には C 型肝炎発症動物モデルで行う必要性が示された。

2. 研究の目的

本研究では申請者が世界に先駆けて確立してきた HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウス及び HCV-Tg マウスなどの動物実験系を用いて、持続感染成立から肝がん発症に至るウイルス側、細胞側、宿主側要因を同定する。また、免疫寛容の成立との因果関係や慢性肝炎発症に重要と考えられる、自己と非自己認識機構の破綻機序の解析を行う。これまで困難であった HCV の感染複製時に修飾される肝臓細胞側因子および獲得免疫系の攪乱機序などを明らかにし、これらの結果をもとに HCV 感染者の病態制御を目指した。

3. 研究の方法

これまで HCV の病原性発現機序を解析するために HCV の cDNA を組み込んだトランスジェニックマウスの開発が行われてきた。しかし、HCV 遺伝子が導入されたマウスは出生時からすでに HCV 蛋白の発現があるために免疫寛容状態となり、宿主の免疫反応すなわち慢性肝炎状態の解析が困難であった。そこでそれらの問題を解決するために、Cre/loxP システムで HCV 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスと Cre を誘導する Mx-Cre トランスジェニックマウスを交配することにより、任意の時期に HCV 遺伝子をスイッチング発現するトランスジェニック (Cre/loxP/HCV-MxCre Tg) マウスを樹立した。これにより、正常な免疫応答下で持続的に HCV 蛋白を発現させることを可能にした。また、ヒト肝細胞キメラマウスに HCV を感染させ、感染ヒト肝臓キメラマウス肝細胞での IFN 関連遺伝子発現抑制の機序について、cDNA チップにより網羅的に解析した。

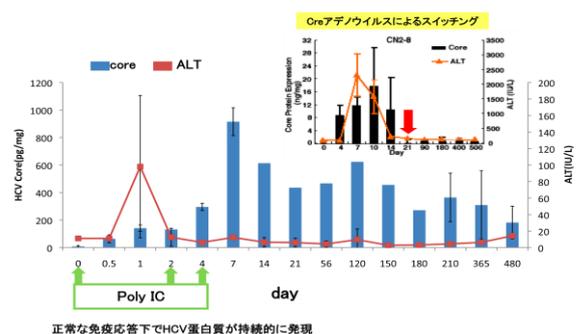
4. 研究成果

HCV 蛋白を発現させた Cre/loxP/HCV-MxCre Tg マウスは、急性肝炎から慢性肝炎状態に移行し、受動的に免疫寛容が成立することが確認できた。すなわち、スイッチング発現システムを樹立したことにより、発生段階での

HCV 遺伝子の発現はなくなり、HCV 感染に似た免疫反応状態をつくることができた。さらに、HCV 蛋白は完全に排除されることなく、持続的に発現がみられ、慢性肝炎の症状を呈した (図 1、図 2)。この免疫寛容を破綻させる目的で、HCV 蛋白質の持続発現が成立している HCV-Tg マウスに正常マウス由来のナイーブな脾細胞を移入したところ一過性に HCV 蛋白質の減少が認められた。また、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスの遺伝子発現解析から、HCV 培養細胞やマウス肝臓組織細胞と異なり、ヒト肝臓組織中ではもともと TLR3 などのセンサー分子などの発現及び活性化が少ないことが明らかとなった。

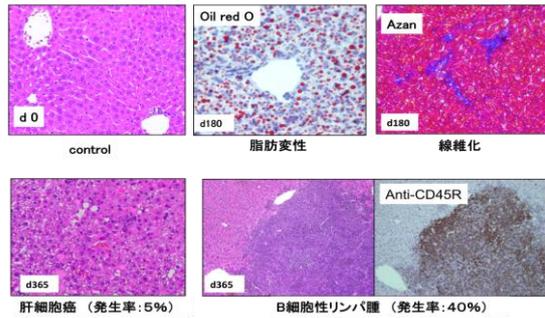
Cre/loxP/HCV-MxCre Tg マウスは正常な免疫応答下で持続的に HCV 蛋白を発現させることができ、慢性肝炎を発症させることができる HCV 持続感染モデルとして非常に有用であり、これまで困難とされていた HCV の持続感染と宿主の免疫応答の関係を解析することを可能にした。ナイーブな脾細胞移入による一過性の HCV 蛋白質の減少は、HCV 排除機構が機能しているにもかかわらず速やかに免疫寛容状態に移行することを示しており、この機序について解析を進めている。また、HCV が持続感染しているヒト肝細胞キメラマウスに、自然免疫活性化剤を投与することにより、強力に HCV を排除できることを見いだした。これは、現在治療に用いられている PEG インターフェロンよりも 20 倍以上強いものであった。この自然免疫活性化剤を投与しても IFN ベータ及びアルファは産生されず、HCV の排除機序は不明である。そこで、この自然免疫活性化剤による HCV 排除機序の解析を進めている。

図 1. MxCre/HCV-Tg マウス肝臓における core 蛋白の定量と ALT の推移



正常な免疫応答下で HCV 蛋白質が持続的に発現

図2. スイッチング後のTgマウス肝臓における形態学的検索



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Keigo Machida, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Eiji Seike, Shigenobu Tōne, Yukiko Hayashi, Yuri Kasama, Masumi Shimizu, Hidemi Takahashi, Chyoji Taya, Hiromichi Yonekawa, Nobuyuki Tanaka, and Michinori Kohara. Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins. *Gastroenterology* (2009) in press.
- ② Yoshihito Ueno, Yuuji Watanabe, Aya Shibata, Kayo Yoshikawa, Takashi Takano, Michinori Kohara, Yukio Kitade. Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing universal overhangs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17(5):1974-81. (2009). 査読有
- ③ Leiyun Weng, Jiamu Du, Jingling Zhou, Jianping Ding, Takaji Wakita, Michinori Kohara, Tetsuya Toyoda. Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain. *Arch Virol*. 154(5):765-773. (2009). 査読有
- ④ Sachiko Inubushi, Motoko Nagano-Fujii, Kikumi Kitayama, Motofumi Tanaka, Chunying An, Hiroshi Yokozaki, Hirohei Yamamura, Hideko Nuriya, Michinori Kohara, Kiyano Sada, and Hak Hotta. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J. Gen. Virology* 89: 1231-1242 (2008). 査読有
- ⑤ T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, K. Tsukiyama-Kohara. Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and picornavirus RNAs. *Compara. Immu. Microbio. Infect. Dis.* 31: 435-448 (2008). 査読有
- ⑥ Naoya Sakamoto, Yoko Tanabe, Takanori Yokota, Kenichi Satoh, Yuko Sekine-Osajima, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Megumi Tasaka, Yuki Sakurai, Chen Cheng-Hsin, Masahiko Yano, Shogo Ohkoshi, Yutaka Aoyagi, Shinya Maekawa, Nobuyuki Enomoto, Michinori Kohara, and Mamoru Watanabe. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J. Gastroenterology Hepatology*. 23(9):1437-47 (2008). 査読有
- ⑦ Fumihiko Yasui, Chieko Kai, Masahiro Kitabatake, Shingo Inoue, Misako Yoneda, Shoji Yokochi, Ryoichi Kase, Satoshi Sekiguchi, Kouichi Morita, Tsunekazu Hishima, Hidenori Suzuki, Katsuo Karamatsu, Yasuhiro Yasutomi, Hisatoshi Shida, Minoru Kidokoro, Kyosuke Mizuno, Kouji Matsushima, Michinori Kohara. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunology* 181(9):6337-48 (2008). 査読有
- ⑧ Kei Ogata, Takahito Kashiwagi, Jun Iwahashi, Koyu Hara, Haruhito Honda, Tatsuya Ide, Ryukichi Kumashiro, Michinori Kohara, Michio Sata, and Nobuyuki Hamada. A mutational shift from domain III to II in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus after interferon-ribavirin therapy. *Arch Virol*. 153(8):1575-9. (2008). 査読有
- ⑨ Masahiro Kitabatake, Shingo Inoue, Fumihiko Yasui, Shoji Yokochi, Masaaki Arai, Kouichi Morita, Hisatoshi Shida, Minoru Kidokoro, Fukashi Murai, Mai Quynh Le, Kouji Matsushima and Michinori Kohara. SARS-CoV spike protein recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in spite of pre-immunization with vaccinia virus. *Vaccine* 25: 630-637 (2007). 査読有
- ⑩ Shin-ichiro Nakagawa, Takuya Umehara, Chiho Matsuda, Shusuke Kuge, Masayuki Sudoh and Michinori Kohara. Inhibition of Hsp90 suppresses HCV replication in replicon cell lines and

in chimeric mice with humanized liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 353: 882-888 (2007). 査読有

- ⑪ Kazuaki Inoue, Takuya Umehara, Urs T. Ruegg, Fumihiko Yasui, Tsunamasa Watanabe, Hiroshi Yasuda, Makoto Yoshiba, Jean-Maurice Dumont, Pietro Scalfaro, Michinori Kohara. Evaluation of a Cyclophilin Inhibitor in Hepatitis C Virus-Infected Chimeric Mice In Vivo. Hepatology 45: 921-928 (2007). 査読有
- ⑫ Toshie Mashiba, Keiko Udaka, Yasuko Hirachi, Yoichi Hiasa, Tomoya Miyakawa, Yoko Satta, Tsutomu Osoda, Sayo Kataoka, Michinori Kohara and Morikazu Onji. Identification of CTL epitopes in hepatitis C virus by a genome-wide computational scanning and a rational design of peptide vaccine. Immunogenetics 59: 197-209 (2007). 査読有
- ⑬ Totsugawa T, Yong C, Rivas-Carrillo JD, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Noguchi H, Okitsu T, Westerman KA, Kohara M, Reth M, Tanaka N, Leboulch P, Kobayashi N. Survival of liver failure pigs by transplantation of reversibly immortalized human hepatocytes with Tamoxifen-mediated self-recombination. J. Hepatology 47: 74-82 (2007). 査読有
- ⑭ Tsunamasa Watanabe, Takuya Umehara, Fumihiko Yasui, Shin-ichiro Nakagawa, Junichi Yano, Tadaaki Ohgi, Satoru Sonoke, Kazuaki Inoue, Makoto Yoshiba and Michinori Kohara. Liver target delivery of small interfering RNA to the HCV gene by lactosylated cationic liposome. J. Hepatology 47: 744-750 (2007). 査読有
- ⑮ Tsunamasa Watanabe, Takuya Umehara, Michinori Kohara. Therapeutic application of RNA interference for Hepatitis C Virus. Advanced Drug Delivery Reviews 59: 1263-1276 (2007). 査読有

[学会発表] (計 27 件)

- ① Hirata Y, Umehara T., Sudoh M., Yasui F., Kohara M.: Serine Palmitoyltransferase Inhibitor Suppresses HCV Replication in a Mouse Model. 21th International Conference on Antiviral Research 2008. 4. 13-17 Montreal
- ② Yasui F., Kai C., Kohara M. : Prior immunization with SARS-CoV

nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. XIV International Congress of Virology 2008. 8. 10-15 Istanbul

- ③ Hirata Y., Umehara T., Sudoh M., Kohara M.: Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model. XIV International Congress of Virology 2008. 8. 10 -15 Istanbul
- ④ Sekiguchi S., Tobita Y., Kohara M.: Presistent infection of Hepatitis C virus to get over the acquired immunity system 第8回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2008. 9. 7-11 兵庫県
- ⑤ Takano T., Hirata Y., Tsukiyama-Kohara K., Sudoh M., Kohara M. : Regulation of HCV replication by DHCR24. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses 2008. 10. 5 -9 Texas
- ⑥ Sudoh M., Itoh T., Aoki M., Ohmori Y., Hirata Y., Yasui F., Kohara M., Aoki Y. : Proteome analysis of HCV inhibitor from natural product, onjisaponin. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses 2008. 10. 5-9 Texas
- ⑦ 関口 敏、飛田良美、千代智子、小原道法: 新規 HCV 持続感染モデルマウスの作製とその病態解析 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008. 10. 26-28 岡山
- ⑧ 小原道法、高野貴士、平田雄一、小原恭子: DHCR24 による HCV 複製能制御の検討 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008. 10. 26-28 岡山
- ⑨ 平田雄一、須藤正幸、池田和貴、榎原琢哉、飛田良美、田口 良、小原道法: SPT 阻害剤による HCV 複製阻害機序の解析 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008. 10. 26-28 岡山
- ⑩ Takano T., Hirata Y., Tukiyaama-Kohara K., Kohara M. : Characterization of HCV replication by DHCR24. 第67回日本癌学会学術総会 2008. 10. 28-30 名古屋
- ⑪ 関口 敏、千代智子、飛田良美、松原明弘、保富康宏、水野喬介、村井 深、小原道法: HCV 遺伝子組換えワクチニアウイルスの治療ワクチン効果 第12回日本ワクチン学会学術集会 2008. 11. 8-9 熊本
- ⑫ 千代智子、関口 敏、松原明弘、保富康宏、脇田隆宇、志田壽利、水野喬介、村井 深、小原道法: HCV 遺伝子組換えワクチニアウイルスの作製とワクチンとしての検討 第12回日本ワクチン学会学術集会 2008. 11. 8-9 熊本

- ⑬ 松田千穂、渡邊綱正、須藤正幸、榎原琢哉、小原道法 : 高 RNAi 活性をもつ Dicer 認識型 siRNA 配列の同定 第 31 回日本分子生物学会 2008.12.9-12 神戸
- ⑭ 千代智子、関口 敏、林 昌弘、小原道法 : HCV 遺伝子スイッチング発現 Tg マウスにおける改良型 Cre 組換えアデノウイルスの効果 第 31 回日本分子生物学会 2008.12.9-12 神戸
- ⑮ 平田雄一、池田和貴、須藤正幸、榎原琢哉、飛田良美、田口 良、小原道法 : スフィンゴミエリンは、C 型肝炎ウイルス (HCV) 複製に必要な脂質成分である 第 31 回日本分子生物学会 2008.12.9-12 神戸
- ⑯ 小原道法 : スフィンゴ脂質と C 型肝炎ウイルス複製. 第 49 回日本脂質生化学会 2007.6.5-6. 札幌
- ⑰ Kohara M., Sekiguchi S., Tobita Y. : Persistent infection of Hepatitis C Virus. 第 7 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2007.9.1-5. 兵庫
- ⑱ Arai M., Suzuki H., Tobita Y., Okamoto K., Ohta A., Sudoh M., Kohara M. : Inter-genotype comparison of replicating and infecting abilities using partitioned-full genomic replicon system. 14th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses 2007.9.9-13. GLASGOW
- ⑲ Nakagawa S., Kohara M. : Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized-liver mice. 14th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses 2007.9.9-13. GLASGOW
- ⑳ Inoue K., Umehara T., Watanabe T., Yoshida M., Kohara M. : The cyclophilin inhibitor DEBIO-025 shows anti-HCV effect in chimeric mouse with human hepatocytes. 第 66 回日本癌学会学術総会 2007.10.3-5. 横浜
- ㉑ 井上和明、榎原琢哉、安井文彦、渡邊綱正、与芝真彰、小原道法 : 免疫抑制作用のないサイクロスポリン A 誘導体によるヒト肝臓キメラマウスにおける HCV 複製阻害. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 2007.10.21-23. 札幌
- ㉒ 安井文彦、甲斐知恵子、北島正大、井上真吾、米田美佐子、森田公一、松島綱治、小原道法 : SRAS-CoV ヌクレオキャプシドタンパク質の免疫による SARS-CoV 感染後の肺炎重篤化への関与. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 2007.10.21-23. 札幌
- ㉓ Yasui F., Kai C., Kitabatake M., Inoue S., Morita K., Matsushima K., Kohara

M. : Immunization of SARS-CoV nucleocapsid protein is involved in an aggravation of pulmonary inflammatory response to subsequent SARS-CoV infection. 第 37 回日本免疫学会 2007.11.20-22. 東京

- ㉔ 安井文彦、甲斐知恵子、北島正大、井上真吾、米田美佐子、横地祥司、加瀬良一、森田公一、松島綱治、志田壽利、水野喬介、小原道法 : SARS-CoV 全構造タンパク質発現型 RVV 免疫マウスでの SARS-CoV 感染後に起きる肺炎増悪の解析. 第 11 回日本ワクチン学会 2007.12.8-9. 横浜
- ㉕ Yasui F., Kai C., Kitabatake M., Inoue S., Yoneda M., Yokochi S., Kase R., Morita K., Matsushima K., Sida K., Mizuno K., Kohara M. : Pathogenesis of SARS-CoV infection in BALB/c mice pre-immunized with recombinant vaccinia virus expressing SARS-CoV structural proteins. 第 30 回日本分子生物学会 2007.12.11-15. 横浜
- ㉖ Takano T., Hayashi M., Umehara T., Hirata Y., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. : Characterization of HCV Replication regulatory by DHCR24. 第 30 回日本分子生物学会 2007.12.11-15. 横浜
- ㉗ Matsuda C., Inoue K., Takahashi N., Sudoh M., Watanabe T., Yoshida S., Kohara M. : Cyclophilins are essential for HCV RNA replication 第 30 回日本分子生物学会 2007.12.11-15. 横浜

[図書] (計 4 件)

- ① 小原道法 : C 型肝炎ウイルス ; 宿主因子を標的にした HCV 増殖抑制・阻害を目指して. ファルマシア 44(1):17-21 (2008)
- ② 平田雄一、須藤正幸、小原道法 : 宿主因子を標的とした C 型肝炎ウイルスの抑制ウイルス 58 (2) : 207-214 2008
- ③ 榎原琢哉、坂本洋、須藤正幸、小原道法 : スフィンゴ脂質生成と C 型肝炎ウイルス増殖. BIO Clinica 22(1):90-95 (2007)
- ④ Tsunamasa Watanabe, Takuya Umehara, Michinori Kohara. Therapeutic application of RNA interference for Hepatitis C Virus. Advanced Drug Delivery Reviews 59: 1263-1276 (2007)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 3 件)

- ① 名称 : 「C 型肝炎ウイルス阻害剤」
発明者 : 国立大学法人熊本大学
後藤正明、小原恭子、
財団法人東京都医学研究機構
小原道法、

財団法人化学及血清療法研究所
西村知裕
権利者：国立大学法人熊本大学
財団法人東京都医学研究機構、
財団法人化学及血清療法研究所
種類：特許
番号：特願 2008-072420
出願日：2008年3月14日

床医学総合研究所・参事研究員
研究者番号：30142110
関口 敏 (SEKIGUCHI SATOSHI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨
床医学総合研究所・研究員
研究者番号：10462780

(3) 連携研究者

② 名称：「ベシクル製剤」
発明者：財団法人東京都医学研究機構
小原道法、
北海道システム・サイエンス株
式会社 中野善郎
中外製薬株式会社 須藤正幸
権利者：中外製薬株式会社、財団法人東
京都医学研究機構、北海道シス
テム・サイエンス株式会社
種類：特許
番号：特願 2008-066158
出願日：2008年11月26日

③ 名称：「C型肝炎ウイルスの働きを
阻害するオリゴリボヌクレオ
チドまたはペプチド核酸」、
発明者：財団法人東京都医学研究機構
小原道法
中外製薬株式会社 須藤正幸、
権利者：中外製薬株式会社
財団法人東京都医学研究機構
種類：特許
番号：特願 2008-301764
出願日：2008年11月26日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 道法 (KOHARA MICHINORI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨
床医学総合研究所・参事研究員
研究者番号：10250218

(2) 研究分担者

安井 文彦 (YASUI FUMIHIKO)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨
床医学総合研究所・研究員
研究者番号：40399473
林 昌弘 (HAYASHI MASAHIRO)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨
床医学総合研究所・研究員
研究者番号：70446566
塗谷 秀子 (NURIYA HIDEKO)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨
床医学総合研究所・主任研究員
研究者番号：80270685
米川 博通 (YONEKAWA HIROMICHI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨