

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659039

研究課題名（和文） イムノコンピテントマウスを用いたC型肝炎ウイルス感染評価系の開発

研究課題名（英文） Development of an assay system for hepatitis C virus in mice

研究代表者

近藤 昌夫 (KONDOH MASUO)

大阪大学・薬学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：50309697

研究成果の概要（和文）：

現在、我が国には200万人のC型肝炎ウイルス（HCV）感染者がおり、肝臓の8割がHCV陽性である。昨今のインターフェロン療法の進展に伴い、C型肝炎の奏効率が50～70%に向上しているものの、依然として年間3万人がC型肝炎により死亡しているのが現状である。HCVが感染するモデル動物はチンパンジーのみであることが、C型肝炎治療薬創製を困難なものにしている。以上の背景を踏まえ、本研究では、汎用性および利便性に優れたイムノコンピテントマウスを用いたHCV感染評価系開発を目指し、長鎖RNA導入ベクター系、HCVゲノム発現システムの開発を試みた。

研究成果の概要（英文）：

Host tropism of hepatitis C virus (HCV) is limited to human and chimpanzee. HCV infection has never been fully understood because there are few conventional models for HCV infection. The efficient delivery of the HCV RNA sub-genomic replicon into cells is useful for basic and pharmaceutical studies. The adenovirus (Ad) vector is a convenient and efficient tool for the transduction of foreign genes into cells in vitro and in vivo. However, an Ad vector expressing the HCV replicon has never been developed. In the present study, we developed Ad vector containing an RNA polymerase (pol) I-dependent expression cassette and a tetracycline-controllable RNA pol I-dependent expression system. We prepared a hybrid promoter from the tetracycline-responsive element and the RNA pol I promoter. Ad vector particles coding the hybrid promoter-driven HCV replicon could be amplified, and interferon, an inhibitor of HCV replication, reduced HCV replication in cells transduced with the Ad vector coding HCV replicon. These results indicate that the Ad vector system is useful for HCV research.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：C型肝炎、アデノウイルス、RNA pol I系

1. 研究開始当初の背景

HCVは、コア、外殻蛋白質などの構造蛋白質、RNAポリメラーゼなどの非構造蛋白質、プラス鎖RNA(9.6 kb)からなる55~65 nmのRNAウイルスであり、ウイルス外殻にあるE2蛋白質を介して肝細胞に感染するが、その宿主域は非常に狭くヒトとチンパンジーの肝臓にしか感染しない。現在、HCV薬のin vivo薬効解析では、免疫不全マウスにヒト肝細胞を移植したキメラマウスにC型肝炎患者血清を投与する系が用いられており、論文・特許を見ても分かるように依然として利便性・汎用性を兼ね備えたHCV感染モデル系は皆無である(Moriishi and Matsuura, 2007)。2009年にヒトclaudin-1、occludin、CD81を導入することでマウス肝細胞にHCVが感染することが見出され、HCV受容体トランスジェニックマウスの肝臓にHCV RNAゲノムを導入したHCV感染モデルの概念が提唱された(Ploss et al., 2009)。しかしながら、9.6 kbもの長鎖RNAを効率的にin vivo投与する技術は未だ開発されておらず、肝臓への長鎖RNA導入法の開発がHCV克服に向けた最重要課題となっている。

さて、哺乳細胞におけるRNA発現系は、rRNAを発現するRNA polymerase (pol) I系、mRNAを発現するRNA pol II系、tRNAなどの短鎖RNAを発現するRNA pol IIIに大別され、現在一般的な遺伝子発現ではRNA pol II系、siRNAなどの発現系ではRNA pol III系が利用されている。RNA pol I系は13 kbのサイ

ズを持つrRNAの発現に関与していることから、この長鎖RNA発現系、RNA pol I発現カセットを用いれば、HCV RNAゲノムのin vivo投与が可能になると推察される。

2. 研究の目的

上述した背景を踏まえ、本課題では、独自のRNA pol I発現系を用いてHCVゲノム導入ベクターを開発し、利便性・汎用性に優れた新規HCV感染評価系の開発することを目的とした。

3. 研究の方法

RNA pol Iプロモーターをクローニングし、テトラサイクリン応答性配列を連結したキメラプロモーターを作製し、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として用いてテトラサイクリン応答性RNA pol Iプロモーターの最適化を行った。

本ハイブリッドプロモーターの下流にHCV sub genomic repliconを挿入したベクターを作製し、HCV複製などを解析した。

さらに、本システムを用いてヒトiPS細胞由来肝細胞におけるC型肝炎ウイルス感染の可否を検証した。

4. 研究成果

遺伝子導入効率に優れ、臨床使用実績のある

アデノウイルス (Ad) ベクターに着目し、テトラサイクリン依存的に発現制御可能なRNA pol I発現Adベクターを作製、当該システムを用いることでHCVゲノム発現Adベクター作製が可能になることを見出し、本システムの最適化を行った。

次に、本システムのin vivo遺伝子導入活性を解析したものの、in vivoにおける発現は観察されなかった。そこで、in vivo導入ベクター開発に向けて、国際学会において情報収集を行い、helper dependent Adベクター作製系、発現効率に優れたHCV 2a株のcDNAの入手を図った。

また、予備的にヒトiPS細胞由来肝細胞を用いてHCVゲノム複製を解析したところ、分化誘導前のiPS細胞ではHCVゲノム複製は観察されず、iPS由来肝細胞においてHCVゲノム複製が観察された。このことは、iPS細胞からiPS由来肝細胞をsequential解析することで、HCV複製に関与する新たな宿主因子の同定につながることを示唆している。

今後は、引き続き、HCVゲノム導入ベクターの最適化を行うと同時に、iPS細胞技術と組み合わせることで新規創薬標的の同定も進めていく予定である。

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5件)

①
Takeshi Yoshida, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, Development of an adenovirus vector containing a hepatitis C virus expression cassette and its application, Yakugakuzasshi, 133,

305-311, 2013.

②

Fuminori Sakurai, Masuo Kondoh, New approaches to drug discovery research and medical treatment using viruses-Viruses are valuable materials-, Yakugakuzasshi, 133, 289, 2013.

③

Fuminori Sakurai, Norihisa Furukawa, Maiko Higuchi, Sayuri Okamoto, Kaori Ono, Takeshi Yoshida, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Naoya Sakamoto, Kazufumi Katayama, Hiroyuki Mizuguchi, Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a, Virus Res, 165, 214-218, 2012

④

Takeshi Yoshida, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Promising targets for anti-hepatitis C virus agents, Curr Med Chem, 18, 1239-1244, 2011.

⑤

Takeshi Yoshida, Kazuo Takayama, Masuo Kondoh, Fuminori Sakurai, Hideki Tani, Naoya Sakamoto, Yoshiharu Matsuura, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection, Biochem Biophys Res Commun, 416, 119-124, 2011.

⑥

Takeshi Yoshida, Masuo Kondoh, Manabu Ojima, Hiroyuki Mizuguchi, Yoshiaki

Yamagishi, Naoya Sakamoto, Kiyohito Yagi, Adenovirus vector-mediated assay system for Hepatitis C virus replication, Nucleic Acid Res, 39, e64, 2011.

[学会発表] (計7件)

①

Seiji Yamane, Takeshi Yoshida, Kazuo Takayama, Masuo Kondoh, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, Human iPS-derived hepatocyte-like cells as a model for hepatitis C virus infection, Experimental Biology 2012, Apr 21-25, 2012, San Diego, CA, USA

②

Kiyohito Yagi, Takeshi Yoshida, Seiji Yamane, Kazuo Takayama, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Fuminori Sakurai, Naoya Sakamoto, Yoshiharu Matsuura, Hiroyuki Mizuguchi, Evaluation of HCV infection and replication using human iPS cell-derived hepatocytes, 19th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses 2012, Oct 5-9, 2012, Venice, Italy.

③

Masuo Kondoh, Yoshiaki Yamagishi, Takeshi Yoshida, Hiroyuki Mizuguchi, Naoya Sakamoto, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Development of RNA pol-driven adenovirus vector expressing hepatitis C virus replicon, Experimental Biology 2011, Apr 4-13, 2011, Washington, DC, USA

④

Takeshi Yoshida, Fumi Satoh, Akihito

Watari, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Naoya Sakamoto, Kiyohito Yagi, Development of an RNA polymerase I-driven adenoviral vector and its application in an HCV replication assay, 18th International Symposium of hepatitis C virus and related viruses, Sep8-12, 2011, Seattle, WA, USA.

⑤

吉田孟史、佐藤芙美、渡利彰浩、近藤昌夫、水口裕之、八木清仁、RNA ポリメラーゼ I 発現系を利用した長鎖 RNA 発現ベクターの開発、第27回日本DDS学会、平成23年6月9-10日、東京

⑥

山根誠司、吉田孟史、高山和雄、近藤昌夫、桜井文教、谷英樹、坂本直哉、松浦善治、水口裕之、八木清仁、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた HCV 感染モデルの作製、日本薬学会第132年会、平成24年3月28-31日、札幌

⑦

近藤昌夫、水口裕之、八木清仁、アデノウイルスベクターを利用したC型肝炎研究の新展開、日本薬学会第132年会、札幌、平成24年3月28-31日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 昌夫 (KONDOH MASUO)

大阪大学・薬学研究科 (研究院)・准教授

研究者番号 : 50309697