

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 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 年度 ～ 2012 年度

課題番号：23659393

研究課題名（和文）

ウイルス・プロテアーゼを利用した自然免疫活性化によるC型肝炎自殺療法の開発

研究課題名（英文）

Development of hepatitis C virus suicide therapy employing the viral protease

研究代表者

小池 和彦 (KOIKE KAZUHIKO)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80240703

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルス（HCV）ゲノムによってコードされるタンパク分解酵素 NS3/4a プロテアーゼが、retinoic acid-inducible gene (RIG)-I から IFN β 誘導へと至る自然免疫経路をミトコンドリア外膜に存在する IFN promoter-stimulator (IPS)-1 の特異的切断によって無効化し、肝臓における IFN 活性化システムの機能不全を引き起こすことが、HCV 持続感染化や IFN 治療への抵抗性の原因の一つであることが示されてきている。我々は、発想を転換し、この NS3/4a プロテアーゼを逆用して、IPS-1 と同じ切断部位をもつ転写因子モジュール (HCV-protease activated module; CPAM) を肝細胞内に送り込む（不活性型 CPAM）プロジェクトを企てた。切断部位を切断し転写因子を活性化することで細胞内の自然免疫系を活性化させ、肝臓からの HCV 完全排除を導くという計画である

H23年度は、核内移行転写因子IRF7にミトコンドリア移行シグナル、およびIPS-1がもつNS3/4aプロテアーゼ切断モチーフであるC503アミノ酸残基を接続したモジュールであるCPAMを作製した。H24年度は、NS3/4aプロテアーゼを発現する非構造領域レプリコンの増殖するHuh-7細胞に導入してIRF7の核内移行を検証した。また、CPAMを保持する組替えアデノウイルスを作製し、CPAM組換えアデノウイルスをHCV・JFH-1株の増殖するHuh-7細胞に感染させ、HCV増殖に対する効果を検討した。Huh-7細胞においては、HCV量の有意な減少を観察しており、proof of conceptがなされたものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Hepatitis C virus (HCV) inactivates the innate immunity pathway, which leads from retinoic acid-inducible gene (RIG)-I to IFN β -induction, by the specific digestion of IFN promoter-stimulator (IPS)-1 on the mitochondrial outer membrane, by the action of viral protease NS3/4a. This results in the malfunction of IFN-activation system in the liver, which is considered to play a central role in the persistence of HCV infection and the resistance to IFN treatment. We have attempted to establish “HCV suicide therapy” in that sending the transcription module (HCV-protease activated module; CPAM, inactivation form) into the liver by the utilization of NS3/4a protease. It is supposed that inactivated form of the CPAM is activated by the action of NS3/4a protease in HCV-infected cells, leading to the activation of intrahepatic innate immunity and complete eradication of HCV from the liver.

In 2011, we constructed the CPAM module that carries IRF7 in conjunction with mitochondrial transfer signal and NS3/4a protease digestion motif (c503 amino acid residues), which derived from IPS-1. In 2012, The CPAM was introduced into Huh-7 cells in which the HCV subgenomic replicon replicates and NS3/4a protease is produced. IRF7 was actually transferred from the cytoplasm to nuclei. In addition, we constructed the recombinant adenovirus that carries the CPAM. This was introduced into Huh-7 cells that support the replication of HCV JFH-1 strain to evaluate the load-reducing effect of CPAM. The JFH-1 loads were

significantly reduced in CPAN- introduced Huh-7 cells compared to control Huh-7 cells, demonstrating the proof of concept of this HCV suicide therapy using NS3/4a protease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：挑戦的萌芽研究

キーワード：ウイルス、癌

1. 研究開始当初の背景

我が国における重大な死因である肝細胞癌（以下、肝癌）の80%近くがC型肝炎ウイルス（HCV）感染症に起因している。肝癌の基礎疾患である慢性C型肝炎の治療としては、現在の標準的治療法であるリバビリン併用ペグインターフェロン（IFN） α がC型慢性肝炎患者の約60%に有効とされるが、無効例の治療には有効な肝炎制御方法がなく、慢性肝炎から肝硬変・肝癌への進展を、なすすべなく見守っている状況である。数学モデルを用いた研究から、IFN治療無効例においては血中からのHCV排除は速やかであるが、HCVの感染した肝細胞が排除されにくく、それが無効の原因であることが明らかにされている。したがって、少数残存したHCV感染肝細胞からHCVが効率よく排除されれば、慢性C型肝炎におけるIFN治療成績は飛躍的に向上することが期待される。

2. 研究の目的

リバビリン併用ペグIFNがC型慢性肝炎患者の約60%に有効とされるが、無効例では慢性肝炎から肝硬変・肝癌への進展を、なすすべなく見守っている状況である。HCVのNS3/4aプロテアーゼが、retinoic acid-inducible gene (RIG)-IからIFN β へと至る自然免疫経路をIFN promoter-stimulator (IPS)-1の特異的切断によって無効化し、肝臓におけるIFN活性化システムの機能不全が、HCV持続感染化やIFN治療への抵抗性の原因の一つであることが示されてきている。我々は、発想を転換し、このNS3/4aプロテアーゼを逆用して、IPS-1と同じ切断部位をもつ転写因子モジュール（HCV-protease activated module; CPAM）を肝細胞内に送り込む（不活性型CPAM）。切断部位を切断し転写因子を活性化させて細胞内の自然免疫系を活性化さ

せ、肝臓からのHCV完全排除を試みる。すなわち、HCVの武器であるNS3/4aプロテアーゼを逆に利用して、新たな抗HCV兵器を作製するものである。

3. 研究の方法

核内移行転写因子IRF7に、ミトコンドリア移行シグナル、およびIPS-1がもつNS3/4aプロテアーゼ切断モチーフであるC503アミノ酸残基を接続したモジュールCPAMを作製する。これをまず、NS3/4aプロテアーゼを発現する非構造領域レプリコンが増殖するHuh-7細胞に導入してIRF7の核内移行を検証する。

ついで、CPAMを保持する組換えアデノウイルスを作製する。これを、我々が既に樹立しているHCV非構造領域遺伝子導入トランスジェニックマウスに接種し、生体内におけるIRF7の核内移行を検証する。CPAM組換えアデノウイルスを、Huh-7細胞にて増殖するJFH-1およびHCVが増殖するヒト化肝臓キメラマウスを用いてHCV増殖に対する効果を検証する。

4. 研究成果

HCVゲノムによってコードされるタンパク分解酵素NS3/4aプロテアーゼが、RIG-IからIFN β 誘導へと至る自然免疫経路をミトコン

ドリア外膜に存在する IPS-1 の特異的切断によって無効化し、肝臓における IFN 活性化システムの機能不全を引き起こすことが、HCV 持続感染化や IFN 治療への抵抗性の原因の一つであることが示されてきている。我々は、発想を転換し、この NS3/4a プロテアーゼを逆用して、IPS-1 と同じ切断部位をもつ転写因子モジュール CPAM を肝細胞内に送り込む（不活性型 CPAM）プロジェクトを企てた。切断部位を切断し転写因子を活性化することで細胞内の自然免疫系を活性化させ、肝臓からの HCV 完全排除を導くという計画である

2011 年度は、核内移行転写因子 IRF7 にミトコンドリア移行シグナル、および IPS-1 がもつ NS3/4a プロテアーゼ切断モチーフである C503 アミノ酸残基を接続したモジュールである CPAM を作製し、配列を確認した。2012 年度は、NS3/4a プロテアーゼを発現する非構造領域レプリコンを複製する Huh-7 細胞に、これを導入し IRF7 の核内移行を検証した。また、CPAM を保持する組替えアデノウイルスを作製し、これを HCV・JFH-1 株が増殖する Huh-7 細胞に感染させ、HCV 増殖に対する効果を検討した。Huh-7 細胞においては、HCV 量の有意な減少を観察しており、proof of concept がなされたものと考ええる。当初の計画では、CPAM を保持する組替えアデノウイルスを我々が既に樹立している HCV 非構造領域遺伝子導入トランスジェニックマウスに接種して、in vivo における CPAM の効果までを検証する予定であった。しかしながら、2 年間という限られた時間の中では、Huh-7 細胞を用いた培養細胞の系での検証が限度であった。この意味で、達成度は 80%程度であったと考えるが、培養細胞系において CPAM による HCV 複製制御という方法の実証ができた意義は大きく、今後のより完全な HCV 制御へ向けて大きな意義をもつと考えられる。

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 6 件)

- 1) Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, Koike K. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci* 2012;103(4):670-676. PMID: 22320381.
- 2) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, Koike K. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- κ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. *Hepatology* 2013;57:162-170. PMID: 22898998.
- 3) Arano T, Nakagawa H, Tateishi R, Ikeda H, Uchino K, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Serum level of adiponectin and the risk of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer* 2011;129(9):2226-2235. PMID: 21170963.
- 4) Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, Matsuura Y. Expression of miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with HCV. *J Virol* 2012;86(15):7918-7933 PMID: 22593164.
- 5) Soroida Y, Ohkawa R, Nakagawa H, Satoh Y, Yoshida H, Kinoshita H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Shiina S, Sato T, Obi S, Hoshino T, Nagatomo R, Okubo S, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased activity of serum mitochondrial isoenzyme of

creatine kinase in hepatocellular carcinoma patients predominantly with recurrence. J Hepatol 2012;57(2):330-336. PMID: 22521349.

- 6) Yoshikawa T, Takata A, Otsuka M, Kishikawa T, Kojima K, Yoshida H, Koike K. Silencing of microRNA-122 enhances interferon- α signaling in the liver through regulating SOCS3 promoter methylation. Sci Rep 2012;2:637. PMID: 22957141.

[学会発表] (計 3 件)

- 1) Kazuhiko Koike. Metabolic abnormality in hepatitis C. 22nd Asian Pacific Association for the Study of Liver (APASL) (招待講演) 2012/2/18, in Taipei (Taiwan).
- 2) Kazuhiko Koike. Viral factors for hepatocarcinogenesis in HBV infection. JSGE 3rd International Forum. (招待講演) 2012/4/21, in Tokyo (Japan).
- 3) Kazuhiko Koike. Metabolic aspects of hepatitis C. 14th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (招待講演) 2012/6/24, in Shanghai (China).

[図書] (計 1 件)

建石良介, 小池和彦. 肝癌 診療ガイドライン UP-TO-DATE, メディカルレビュー社 2012 年, 455 ページ.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 和彦 (KOIKE KAZUHIKO)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号 : 80240703