

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6670322号
(P6670322)

(45) 発行日 令和2年3月18日(2020.3.18)

(24) 登録日 令和2年3月3日(2020.3.3)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	5/0775	(2010.01)	C 12 N	5/0775
C 12 N	7/00	(2006.01)	C 12 N	7/00
C 12 Q	1/04	(2006.01)	C 12 Q	1/04
C 12 Q	1/70	(2006.01)	C 12 Q	1/70

請求項の数 19 (全 47 頁)

(21) 出願番号	特願2017-554627 (P2017-554627)
(86) (22) 出願日	平成27年1月7日(2015.1.7)
(65) 公表番号	特表2018-501820 (P2018-501820A)
(43) 公表日	平成30年1月25日(2018.1.25)
(86) 國際出願番号	PCT/CN2015/070243
(87) 國際公開番号	W02016/109947
(87) 國際公開日	平成28年7月14日(2016.7.14)
審査請求日	平成29年12月20日(2017.12.20)

前置審査

(73) 特許権者	517240665 フロンティア バイオードラッグ ティペ ロップメント リミティッド 英國領ヴァージン諸島 トルトラ ロード タウン ウィックカムズ ケイ 1 オー エムシー チェンバーズ
(74) 代理人	100067828 弁理士 小谷 悅司
(74) 代理人	100115381 弁理士 小谷 昌崇
(74) 代理人	100162765 弁理士 宇佐美 綾

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血清由来C型肝炎ウイルスを増殖させるためのヒト脂肪由来幹細胞の使用およびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

C型肝炎ウイルス(HCV)を増殖させるためのヒト脂肪由来幹細胞(hADSC)に基づくシステムであって、hADSCと、hADSCの培養に適した培地と、HCVとを含み、

前記hADSCが、第1～6継代細胞であり特異的マーカーDLK-1に対して陽性であるシステム。

【請求項2】

前記HCVが、HCVに感染した個体の血液、血清、血漿もしくは体液に由来するか、または臨床HCV単離物である、請求項1に記載のシステム。

10

【請求項3】

前記HCVが、遺伝子型1a、1b、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、3e、3f、4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g、4h、4i、4j、5aおよび6aまたはそれらの任意の組み合わせである、請求項1または2に記載のシステム。

【請求項4】

前記HCVが、遺伝子型1a、1b、2a、2bまたは混合型2a+2bである、請求項3に記載のシステム。

【請求項5】

前記システムがHCVの完全な複製を支援する、請求項1～4のいずれか1項に記載の

20

システム。

【請求項 6】

C型肝炎ウイルス（HCV）を増殖させる方法であって、HCVの複製に適した条件下でhADSCの培養に適した培地の中でHCVを増殖させるためにhADSCを使用することを含み、

前記hADSCが、第1～6継代細胞であり特異的マーカーDLK-1に対して陽性である、方法。

【請求項 7】

前記HCVが、HCVに感染した個体の血液、血清、血漿もしくは体液に由来するか、または臨床HCV単離物である、請求項6に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記HCVが、遺伝子型1a、1b、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、3e、3f、4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g、4h、4i、4j、5aおよび6a、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項6または7に記載の方法。

【請求項 9】

前記HCVが、遺伝子型1a、1b、2a、2bまたは混合型2a+2bである、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記方法がHCVの完全な複製を支援する、請求項6～9のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 11】

HCVの増殖、またはHCV生活環分析の実施、または抗ウイルス化合物の選抜、またはそのようなHCVに感染した被験体のHCVの特性評価のための、hADSCの使用であって、前記hADSCが第1～6継代細胞であり特異的マーカーDLK-1に対して陽性である使用。

【請求項 12】

HCV感染の診断、またはHCVの増殖、またはHCV生活環分析の実施、または抗ウイルス化合物の選抜、またはそのようなHCVに感染した被験体のHCVの特性評価のための、キットの製造におけるhADSCの使用であって、前記hADSCが第1～6継代細胞であり特異的マーカーDLK-1に対して陽性である使用。

30

【請求項 13】

a) hADSCを提供する工程であって、前記hADSCが第1～6継代細胞であり特異的マーカーDLK-1に対して陽性である工程、

b) hADSCの培養に適した培地の中で、前記被験体から得た生体試料と共にhADSCをインキュベートする工程、

c) 前記hADSCを、HCV複製を可能にするのに十分な時間培養する工程、および

d) HCV複製のレベルを検出する工程を含む、方法。

【請求項 14】

前記生体試料が、血液、血清、血漿または体液に由来するものである、請求項13に記載の方法。

40

【請求項 15】

抗HCV化合物を選抜する方法であって、

a) 第1容器内の培地中のhADSCを候補化合物の非存在下でHCVと接触させる工程であって、前記hADSCが第1～6継代細胞であり特異的マーカーDLK-1に対して陽性である工程；

b) 前記第1容器内の前記培地中のHCVのレベルを前記候補化合物の非存在下で決定する工程；

c) 第2容器内の培地中のhADSCを候補化合物の存在下でHCVと接触させる工程；

d) 前記第2容器内の前記培地中のHCVのレベルを前記候補化合物の存在下で決定す

50

る工程；

e) 前記候補化合物の存在下での H C V のレベルを、前記候補化合物の非存在下での H C V のレベルと比較する工程；および

f) 前記候補化合物の存在下での H C V レベルが前記候補化合物の非存在下での H C V レベルよりも低い場合に前記候補化合物を抗 H C V 化合物として同定する工程を含む、方法。

【請求項 16】

H C V のレベルが、H C V 力価、H C V 核酸のレベル、またはH C V ポリペプチドのレベルを測定することによって決定される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記候補化合物が、化学化合物、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、抗体、核酸、アンチセンス核酸、s h R N A 、リボザイムおよび小分子化学化合物からなる群から選択される少なくとも 1 つである、請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 H C V が、遺伝子型 1 a 、 1 b 、 2 a 、 2 b 、 2 c 、 2 d 、 3 a 、 3 b 、 3 c 、 3 d 、 3 e 、 3 f 、 4 a 、 4 b 、 4 c 、 4 d 、 4 e 、 4 f 、 4 g 、 4 h 、 4 i 、 4 j 、 5 a および 6 a またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される H C V 遺伝子型の少なくとも 1 つである、請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記 H C V が、遺伝子型 1 a 、 1 b 、 2 a 、 2 b および混合型 2 a + 2 b からなる群から選択される H C V 遺伝子型の少なくとも 1 つである、請求項 18 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、C 型肝炎ウイルス (H C V) を増殖させるためのシステムおよび方法ならびにその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

H C V は、フランソワ・カミル・ラブリエウス科のエンベロープを有するプラス鎖 R N A ウィルスである。それは、非翻訳領域 (5 ' - U T R) から始まる 9 . 6 k b のゲノムを含有し、引き続いで、構造タンパク質（コア、E 1 および E 2 ）と、p 7 、 N S 2 、 N S 3 、 N S 4 および N S 5 を含む非構造 (N S) タンパク質とをコードする配列を含有している（総説については参考文献¹、² 参照）。B 型肝炎ウイルス (H B V) の感染とは異なり、H C V 感染は、肝臓徴候と肝外徴候との両方を呈する多面的疾患であり³、H C V は非肝細胞に存在することができるが^{4 ~ 6}、それはウイルスの存続および再活性化において役割を担っている可能性がある。しかしながら、H C V の肝外複製を調べる試験管内システムは厳しい制約を受けてきた。初代細胞に関して、血清 H C V (H C V s e r) の直接感染はヒトおよびチンパンジーの肝細胞でのみ実証されており、それは培養下での維持が難しく、また、細胞特性がドナー間で著しく変動する。その上、ほとんどの試験管内細胞培養方法は、天然ウイルスではなく分子クローニングを使用するものである（総説については参考文献⁷ 参照）。また、これらのモデルは、臨床 H C V 単離物の感染を支援すると近年報告されている H L Z 0 1 肝細胞腫細胞株を含めた非初代細胞内でウイルスを増殖させる⁸。したがって、データを実際の臨床上のウイルス - 宿主相互作用にどの程度まで外挿できるかは懸念事項であり続けている。

【0003】

したがって、血清 C 型肝炎ウイルス (H C V) を増殖させる代替のシステムおよび方法が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0004】

この概要は、本発明の特質および本質を手短に示す発明の概要を提示するために提供す

10

20

30

40

50

る。これは、特許請求の範囲または特許請求の範囲の意味を解釈または限定するために用いられるものではないという理解と共に、提供される。

【0005】

一態様において、本開示は、C型肝炎ウイルス（HCV）を増殖させるためのヒト脂肪由来幹細胞（hADSC）に基づくシステムであって、hADSCと、hADSCの培養に適した培地と、HCVとを含むシステムを提供する。いくつかの実施形態において、hADSCは、初代細胞または継代細胞、好ましくは第1～15継代細胞、より好ましくは第1～6継代細胞である。いくつかの実施形態において、hADSCは、特異的マーカーDLK-1（すなわち、Pref-1）に対して陽性である。いくつかの実施形態において、HCVは、HCVに感染した個体の血液、血清、血漿もしくは体液に由来するか、または臨床HCV単離物である。いくつかの実施形態において、HCVは、1a、1b、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、3e、3f、4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g、4h、4i、4j、5aおよび6aならびにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される遺伝子型、好ましくは遺伝子型1a、1b、2a、2bまたは混合型2a+2bである。いくつかの実施形態において、システムは、感染性ウイルスの產生を含めてHCVの完全な複製を支援する。10

【0006】

別の態様において、本開示は、C型肝炎ウイルス（HCV）を増殖させる方法であって、HCVの複製に適した条件下でhADSCの培養に適した培地中でHCVを増殖させるためにhADSCを使用することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態において、hADSCは、初代細胞または継代細胞、好ましくは第1～15継代細胞、より好ましくは第1～6継代細胞である。いくつかの実施形態において、hADSCは、特異的マーカーDLK-1（すなわち、Pref-1）に対して陽性である。いくつかの実施形態において、HCVは、HCVに感染した個体の血液、血清、血漿もしくは体液に由来するか、または臨床HCV単離物である。いくつかの実施形態において、HCVは、1a、1b、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、3e、3f、4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g、4h、4i、4j、5aおよび6aならびにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される遺伝子型、好ましくは遺伝子型1a、1b、2a、2bまたは混合型2a+2bである。いくつかの実施形態において、方法は、HCVの完全な複製を支援する。20

【0007】

別の態様において、本開示は、HCVの増殖、またはHCV生活環分析の実施、またはHCV感染の診断、または抗ウイルス化合物の選抜、またはそのようなHCVに感染した被験体のHCVの特性評価のための、hADSCの用途を提供する。

【0008】

別の態様において、本開示は、HCV感染の診断、またはHCVの増殖、またはHCV生活環分析の実施、または抗ウイルス化合物の選抜、またはそのようなHCVに感染した被験体のHCVの特性評価のための、キットの製造におけるhADSCの用途を提供する。30

【0009】

別の態様において、本開示は、被験体のHCV感染を診断する方法であって、
a) hADSCを提供する工程、
b) hADSCの培養に適した培地中で、被験体から得た生体試料と共にhADSCをインキュベートする工程、
c) 上記hADSCを、HCV複製を可能にするのに十分な時間培養する工程、および
d) HCV複製のレベルを検出する工程を含み、
HCV複製の検出が、上記被験体がHCVに感染していることを指示す、方法を提供する。40

【0010】

いくつかの実施形態において、上記生体試料は、血液、血清、血漿または体液に由来す50

るものである。

【0011】

別の態様において、本開示は、抗HCV化合物を選抜する方法であって、

a) . 第1容器内の培地中のhADSCを候補化合物の非存在下でHCVと接触させる工程；

b) . 第1容器内の培地中のHCVのレベルを候補化合物の非存在下で決定する工程；

c) . 第2容器内の培地中のhADSCを候補化合物の存在下でHCVと接触させる工程；

d) . 第2容器内の培地中のHCVのレベルを候補化合物の存在下で決定する工程；

e) . 候補化合物の存在下でのHCVのレベルを、候補化合物の非存在下でのHCVの10
レベルと比較する工程；および

f) . 候補化合物の存在下でのHCVレベルが候補化合物の非存在下でのHCVレベルよりも低い場合に候補化合物を抗HCV化合物として同定する工程を含む、方法を提供する。

【0012】

いくつかの実施形態において、HCVのレベルは、HCV力価、HCV核酸のレベル、またはHCVポリペプチドのレベルを測定することによって決定される。

【0013】

いくつかの実施形態において、候補化合物は、化学化合物、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、抗体、核酸、アンチセンス核酸、shRNA、リボザイムおよび小分子化学化合物からなる群から選択される少なくとも1つである。20

【0014】

いくつかの態様において、HCVは、遺伝子型1a、1b、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、3e、3f、4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g、4h、4i、4j、5aおよび6aならびにそれらの任意の組み合わせからなる群、好ましくは遺伝子型1a、1b、2a、2bおよび混合型2a+2bからなる群から選択されるHCV遺伝子型の少なくとも1つである。

【0015】

その他の態様は以下に記載される。

【0016】

上記の概要および以下の詳細な説明は、限定ではなく例として含まれる添付の図面と併せて読むと、よりよく理解される。30

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1A】ヒト脂肪由来DLK-1⁺幹細胞は生体内でHCVの標的となる。(A)3人のHCV(+)個体(表1)の脂肪組織を手術創から採取し、HCV特異的5'-UTR(223bp)のRT-PCRのためにRNAを抽出した。3人のHCV(-)個体から採取した脂肪組織もまた比較のために並行して研究し、HCV(+)血清を陽性対照として用いた。

【図1B】(B) HCV(+)個体の脂肪組織を細かく刻み、ホモジネートし、遠心分離して浮遊物、緩衝液および細胞ペレットの層にした。細胞ペレットの赤血球をさらに溶解してSVFを採取した。各細胞母集団からRNAを抽出し、5'-UTRのRT-PCRに供した。ウイルス転写物はSVF細胞に検出され、浮遊物中には検出されなかった(左パネル)。SVF細胞をさらにDLK-1⁺細胞とDLK-1⁺細胞とに免疫分離し、RT-PCRのためにRNAを個別に抽出した。ウイルス転写物はDLK-1⁺細胞に存在しており、DLK-1⁻細胞には存在していなかった(右パネル)。データは、3人のHCV(+)ドナーからの細胞を使用した3回の実験を代表するものである。40

【図1C】(C) 3人のHCV感染個体から単離されたDLK-1⁻細胞およびDLK-1⁺細胞のRNAを、HCVマイナス鎖RNAのRT-PCRのために抽出した。HCV(+)個体から単離されたヒト初代肝細胞(PHH)を陽性対照として使用した。

【図1D】(D) HCV(-)およびHCV(+)の個体から単離されたDLK-1⁺(パネルbおよびe)およびDLK-1⁺細胞(パネルcおよびf)を、ウイルスNS5(cの茶色標識)およびヘマトキシリン染色(核の青色標識)の免疫細胞化学のためにサイトスピンドライド上で回転させた。マウスIgG1対照抗体による未分画SVF細胞の染色(パネルaおよびd)を陰性対照として用いた。データは、3人のHCV(+)ドナーおよび3人のHCV(-)ドナーからの試料を代表するものである。

【図1E】(E) HCV(+)またはHCV(-)の個体からの脂肪組織について、DLK-1(赤色標識、パネルb、cおよびhの矢印)およびウイルスNS5(茶色標識、パネルeおよびf)およびヘマトキシリン(青色標識、パネルd～fおよびi～j)の染色を同じ切片に対して順次行った。HCV(+)脂肪組織では、DLK-1⁺細胞(赤色標識、矢印、パネルbおよびc)はNS5Ag(褐色標識、矢印、パネルeおよびf)を共発現した。HCV(-)脂肪組織では、DLK-1⁺細胞(パネルh、矢印)はNS5を発現しなかった(パネルj、矢印；h対j)。ウサギIgG(パネルaおよびg)またはマウスIgG1(パネルdおよびi)による染色を陰性対照として用いた。パネルb、eおよびc、fは、別個のドナーからのものであった。データは、3人のHCV(+)ドナーおよび3人のHCV(-)ドナーを代表するものである。

【図1F】(F)4人のHCV(+)個体の脂肪組織から単離されたDLK-1⁺細胞を生体外で49日間培養し、7日毎に上清を5'-UTRのqRT-PCRのために回収した。データは、各時点について3回の平均±SDとして表したものである。

【図2A】ナイーブDLK-1⁺hADSCは、試験管内での血清HCV感染を許容する。(A)ヒト初代肝細胞(PHH)をHCV(-)ドナーから単離し、皿の中に3日間置き、その後にHCVser(レーン「+」、左パネル)またはHCV(-)対照血清(レーン「-」、左)を投与した。投与3時間後に、PHHをさらに5日間培養し、RNAを5'-UTR(左パネル)のRT-PCRのために抽出した。並行して、HCV(-)ドナーから単離されたp-3またはp-4のDLK-1⁺hADSCに、培地交換を7日毎にしながら懸濁液中で0.2moiのHCVserを投与した。表示のある時点において、上清および細胞を別々に採取し、RNAを5'-UTRのRT-PCRのために抽出した。データは、10回の実験を代表するものである。HCV(+)血清のRNAもまたRT-PCRのために対照として抽出した。

【図2B】(B)上清ならびに、d14およびd28のHCVser-1b感染hADSCの細胞を回収し、RNAをHCV特異的マイナス鎖RNAのRT-PCRのために抽出した。データは、4回の実験を代表するものである。^{*}：HCVserによる感染後に洗浄してから1時間後に採取した0日目の培養上清。

【図2C】(C)ウサギ抗ヒトDLK-1抗体(赤色標識、パネルbおよびf)に続くマウス抗NS5抗体(パネルdおよびh；d中の褐色標識)およびヘマトキシリン(青色標識、c、d、gおよびh)の3重染色を同じ切片に対して行うために、HCVser-1bまたはHCV(-)対照血清を投与されたd14のhADSCをサイトスピンドライド上にスピンドルした。HCVserに感染したDLK-1⁺hADSCはNS5Aを含有していたが(パネルb対d)、HCV(-)対照血清を投与された細胞は、NS5が無く、DLK-1を発現した(パネルf対h)。ウサギIgGおよびマウスIgG1での染色を陰性対照として用いた(それぞれ、パネルaおよびe、ならびにcおよびg)。結果は4回の実験を代表するものである。

【図2D】(D)d14(パネルbおよびc)およびd21(パネルeおよびf)のHCVser-1b感染hADSCの透過電子顕微鏡写真。HCV(-)対照血清に曝露されたD14V細胞およびD21細胞をパネルaおよびdに示した。パネルb～fの挿入図は、黄色の四角または黄色の矢印の拡大図である。パネルb、c、eおよびfの挿入図中の白い矢印はウイルス粒子を指し示し、パネルdの挿入図中の白い矢印は、未感染hADSCのタマネギ形状の膜構造体を指し示す。データは、HCVser-1bによる感染からの2回の実験およびHCVser-2aによる感染からの1回の実験を代表するものである。

【図2E】(E) 7日毎に回収したHCVser-1b感染hADSCの細胞溶解物(左パネル)および上清(右パネル)におけるウイルス5'-UTRのqRT-PCR。データは、3回の実験から得た平均±SDとして表したものである。

【図2F】(F) 1~4週間連続培養したHCVser-1b感染hADSCの上清中のウイルス5'-UTR複製物(qRT-PCRによる)を定量した。データは、4回の実験から得た平均±SDとして表したものである。

【図3A】HCVser感染は、細胞に関してはドナー非特異的であり、ウイルスに関しては遺伝子型交差性であり、m i R - 1 2 2 以外の様々な宿主因子によって媒介される。(A)「ドナー1」のP-2のhADSCをHCVser-1bに感染させ、21日目の上清(「HCVadsc(1)」と表示)を0.22μmの細孔フィルタで濾過し、「ドナー2」のp-3のhADSCに感染させるために使用し、その21日目の上清(「HCVadsc(2)」と表示)を、「ドナー3」のp-6のhADSCを感染させるために使用した。21日目の上清中のウイルス複製数をqRT-PCRによって定量した。データは、感染hADSCの各バッチについて3回の平均±SDとして表したものである。
10

【図3B】(B) p2、p6、p9およびp15でのhADSCをHCVser-1bに感染させ、21日目の上清中(左)および細胞溶解物中(右)のウイルス転写物をqRT-PCRによって決定した。データは、独立した3回の実験から得た平均±SDとして表したものである。

【図3C】(C) p0、p2、p6、p9およびp15のhADSCのDLK-1発現のRT-PCR。いずれのバッチの細胞も、同じドナーからのものであった。N:陰性対照として、逆転写酵素なし。データは、3人の異なるドナーからの細胞を使用した実験を代表するものである。
20

【図3D】(D) p5でのhADSCを混合遺伝子型2a+2bのHCVserに感染させ、連続培養した。d21およびd56において細胞をRT-PCRのために回収して、遺伝子型特異的なコア抗原をコードするmRNA(左の遺伝子型2aでは174bp、右の遺伝子型2bでは123bp)を検出した。N:陰性対照としての、HCV(-)対照血清を投与されたd21細胞。P:陽性対照としてのHCV(+)血清そのもの(混合遺伝子型2a+2b)。M:マーカー。データは、2人のHCVser遺伝子型2a+2b感染ドナーからの血清を使用した実験を代表するものである。
30

【図3E】(E) p0、p2、およびp6のhADSCのCD81、LDL-R、SR-B1およびEGFRの表面発現に関するフローサイトメトリー。黒線:アイソタイプ対照Ab。赤線:抗CD81、抗LDL-R、抗SR-B1または抗EGFRのAb。データは、細胞の各継代についての3回の実験を代表するものである。

【図3F】(F) p0、p2およびp6のhADSCのオクルディン(OCLN)、クローディン-1(CLDN1)、NPC1L1およびm i R - 1 2 2 の発現のRT-PCR(左パネル)。データは、3人のドナーからのhADSCを代表するものである。N:陰性対照として、逆転写酵素なし。P:陽性対照としての、HCV(-)個体から単離されたヒト初代肝細胞。また、p0、p2、p6のhADSCでのm i R - 1 2 2 発現を、Hu h7.5またはHCV(-)ヒト初代肝細胞(PHH、右パネル)と比較してqRT-PCRによって決定した。データは、3人の異なるドナーからのhADSCおよびPHHをそれぞれ使用してp0のhADSCに対する発現レベルとして平均±SDで表したものである。
40

【図3G】(G) HCVser-1bによる投与の前にp2のhADSCを1時間、表示の濃度のブロッキングモノクローナル抗CD81(クローンJS-81)、抗LDL-R(クローンC7)もしくは抗EGFR(クローンLA1)のAbまたはポリクローナル抗SR-B1 Abで前処理した。Apo-Eをブロッキングするために、抗ApoE抗体(クローンE6D10)を表示の濃度でHCVserに添加し、続いてそれをhADSCとの3時間のインキュベーションに使用した。21日目の上清のウイルス5'-UTR転写物を定量した。アイソタイプ:アイソタイプ対照抗体(100μg/ml)による処理。データは、(アイソタイプAbによる処理に対して)3回の実験から得た画分阻害の平
50

均±SDとして表されている。また、各処理後の細胞生存率をトリパンブルーで評価した。

【図3H】(H) p2のhADSCに、OCLN、CLDN1、NPC1L1またはDGAT-1に特異的なsiRNAをトランسفェクションした。スクランブルRNAによるトランسفェクションを対照として用いた。トランسفェクションの48時間後に細胞を洗浄し、HCVser-1bに感染させ、21日目の上清中のウイルス5'-UTR複製物を定量した。OCLNおよびCLDN1のノックダウンは同じ実験で実施し、他方、NPC1L1またはDGAT-1のノックダウンは別の実験で行った。細胞生存率は、各トランسفェクションの後にトリパンブルー色素排除アッセイによって測定され、スクランブルsiRNAによるトランسفェクションと比較して有意な変化はなかった。データは、3回の独立した実験の平均±SDとして表されている。10

【図3I】(I) p4~p5の接着性hADSCをHCVser-1bに感染させ、培養下で段階的用量のリバビリン、テラプレビルおよびシクロスボリンAを21日間連続して添加した。また、hADSCを段階的濃度のIFNと共に16時間インキュベートしてその後にHCVser-1bに曝露した。各処理の後、細胞生存率をトリパンブルーで評価した。データは、独立した3回の実験から得た平均±SDとして表したものである。

【図4A】HCVadscは、物理的性質がJFH1/HCVccとは異なっており、ヒト初代肝細胞に対して感染性である。(A) 21日目のHCVser-2a感染hADSCの上清からHCVadsc(遺伝子型2a)を採取し、10~40%のイオジキサノール中で平衡遠心分離による密度勾配アッセイに供した。比較のために、HCVser(遺伝子型2a)およびJFH1/HCVccの濃度勾配アッセイも並行して実施した。データは、5回の実験を代表するものである。20

【図4B】(B) HCVcc画分13は、ウイルス複製物1つ当たりの重量(n g)として表すと、HDLおよびLDL/VLDLの量が最も低かった。データは、3人のドナーからのHCVserおよびそれらに対応するHCVadscを代表するものである。

【図4C】(C) ApoEおよびApoBの測定から、ApoE含有量は、HCVserの主要画分が最も高く、続いてHCVadscが高く、他方でHCVcc画分13ではApoE含量をほとんど検出できなかったということが実証された(左パネル)。対照的に、ApoBはHCVser画分2においてのみ検出された(右パネル)。データは、HCVser(遺伝子型2a)およびその対応するHCVadsc(つまり、HCVadscをHCVser-感染hADSCによって生成させた)を使用した1回の実験であり、3人のHCVserドナーによる代表である。30

【図4D】(D) 6cmのペトリ皿内でP2のhADSCをHCVser(遺伝子型2a)またはHCVccに曝露した。感染後のhADSCを14日間または21日間連続培養し(培地交換なし)、培養終了時に上清中(左パネル)および細胞溶解物中(右パネル)の5'-UTR複製数をqRT-PCRにより定量した。結果より、HCVccがhADSCにおいて効率的に感染/複製しなかったことが分かった。データは、3回の実験から得た平均±SDとして表したものである。

【図4E】(E) HCVcc感染または非感染のHuuh7.5培養物の上清中、およびHCVcc感染またはHCVser感染のhADSCの21日目の上清中のウイルス5'-UTRのRT-PCR。データは、3回の実験を代表するものである。40

【図4F】(F) HCV(-)患者から単離されたPHHを、3日間放置して付着させ、その後、HCVser-1bまたはHCVser-2bに感染したhADSCから回収された21日目の上清に3時間曝露するか、または対照血清による投与に供した。感染5日後に細胞RNAを5'-UTRのRT-PCRのために抽出した。HCVser-1b自身を陽性対照として使用した。データは、3回の実験を代表するものである。

【図4G】(G) 3人のHCV(-)ドナー(ドナー1、2および3)から単離された 1×10^4 /ウェルのPHHを3日間、6ウェルプレートで接種培養して細胞を付着させ、4日目にPHHを、(3人の別個のドナーから回収した)HCVser-1bの3つの異なるバッチの1つに別々に感染させた。HCVser-1bを使用して対応するHCVa50

d s c を生成させ、また並行してそれを使用して P H H を感染させた。H C V s e r およびそれに対応する H C V a d s c を対にして P H H の同じバッチに感染させた。感染 5 日後に P H H 上清を回収し、5' - U T R 複製物を定量した。陰性対照として、(同様に 3 人の異なるドナーからの) H C V (-) 対照血清への P H H の曝露を用いた。データは、3 回の各感染から得た平均 ± S D として表したものである。

【図 5】ヒト脂肪組織のホモジネートの遠心分離による種々の層への分離。記載されているように⁹、H C V (+) 個体の脂肪組織を遠心分離し、浮遊物、緩衝液および細胞ペレットの層に分離した(左パネル)。浮遊母集団は成熟脂肪細胞を含有している。細胞ペレットを回収し、R B C 溶解緩衝液で処理して赤血球を溶解させて、間質血管細胞群(S V F)細胞を採取し、S V F 細胞を、初代(0 繼代) h A D S C とみなすことのできる D L K - 1⁺ ヒト脂肪生成幹細胞(h A D S C)の免疫選択に供した。
10

【図 6 A】選択された画分の純度、および D L K - 1 の R T - P C R。(A) M o F l o X D P フローサイトメータ(B e c t o n C ou l t e r、C A、米国)を使用して D L K - 1⁺(左) および D L K - 1⁻(右) の画分中の D L K - 1⁺ 細胞の割合を決定し、S u b m i t ソフトウェアで解析した。D L K - 1⁺ 画分および D L K - 1⁻ 画分の 99.5% の自家蛍光の排除を用いて、各画分の陽性染色細胞を決定するためのゲートを設定した。アイソタイプ対照抗体(ウサギ Ig G)と共にインキュベートした未分画 S V F 細胞を使用して、同様の結果が得られた。データは、6 回の実験を代表するものである。
。

【図 6 B】(B) 未分画 S V F 細胞、選択された D L K - 1⁻ および D L K - 1⁺ 細胞¹
⁰ から R N A を抽出し、D L K - 1 の R T - P C R に供した(プライマーは記載のとおり^{1 1})。D L K - 1⁺ 細胞での豊富な発現とは対照的に、D L K - 1⁻ 細胞は D L K - 1 の m R N A をほとんど発現しなかった。データは、4 回の実験を代表するものである。
20

【図 7】H C V 感染ヒト初代肝細胞(P H H)は N S 5 抗原を発現した。P H H を H C V (-) または H C V (+) ドナー(それぞれパネル a および b ならびに c および d) から採取し、培養のためにコラーゲン I 被覆ウェルに播種した。対照実験として、本発明者は、H C V (+) または H C V (-) ドナーから新たに単離された、アルギニン不含 W i l l i a m s E 培地(I n v i t r o g e n、C A、米国)中で培養したヒト初代肝細胞(P H H; 播種数 1×10^4 細胞/ウェル)に対する N S 5 染色の特異性を調べた。9 日目に細胞を洗浄し、同様に記載されているサイトスピンドライド上で細胞を染色する方法(「M e t h o d s」参照)を採用してウェル内で免疫細胞化学に供した。データは、3 人の H C V (+) ドナーおよび 3 人の H C V (-) ドナーからの P H H を使用した 3 回の実験を代表するものである。注記: 歴史的に、感染肝臓組織中の H C V 抗原を検出することは困難であった。しかし、単離された細胞の染色は、発色の時間を十分に制御する限り(「M e t h o d s」参照)、肝臓組織の染色ほどには非特異的でないようである。
30

【図 8】H C V 感染個体の脂肪組織中の D L K - 1⁺ 細胞は、H C V N S 5 抗原を共発現した。脂肪組織を H C V 感染個体から採取し(表 1)、M e t h o d に記載されているとおりに、抗 D L K - 1 A b(赤色標識、白色矢印、パネル a および b) に続いて抗 N S 5 A b(茶色標識、白色矢印、パネル c および d) およびヘマトキシリン(パネル c および d の青色標識)を使用して同じ切片に対して免疫染色を行った。調べた H C V (+) 脂肪組織のいずれの切片においても、高倍率視野(400 倍)で約 0 ~ 4 個の D L K - 1⁺ N S 5⁺ 細胞を検出することができた。パネル a および c はドナー 2 からのものであり、パネル b および d はドナー 3 からのものであった。アイソタイプ対照抗体による染色像は、図 1 E に示したものに類似していた。
40

【図 9】懸濁液中で h A D S C を感染させるプロトコル。h A D S C を H C V (-) 個体から調製し、記載されているように培養下で継代した^{1 2}、^{1 3}。第 2 ~ 6 継代の h A D S C を、H C V (+) 血清を新鮮な培地で希釈することによって調節した 0.2 m o i (5×10^5 個の h A D S C 細胞に対して H C V 5' - U T R 複製数が 1×10^5) の H C V s e r に曝露した(表 2)。3 時間後、細胞を P B S で 5 回洗浄し、続いて 6 m l の新鮮な培地で培養した。7、14、21 および 28 日目に上清および細胞溶解物を採取し、
50

R N A を 5 ' - U T R の R T - P C R のために抽出した。

【図 1 0】プラスチックに接着した h A D S C の H C V s e r による感染。h A D S C を 1 日間、6 cm のペトリ皿で接種培養して細胞を付着させた。続いて H C V s e r を終体積 2 m l の培地に添加して、0 . 5 m i (2×10^5 個の h A D S C 細胞に対して 1×10^5 個の 5 ' - U T R 複製物) で細胞を 3 時間インキュベートした。穏やかに洗浄した後、5 m l の新鮮な培地中で H C V s e r 感染 h A D S C を、7 日毎の培地交換の有り無し(それぞれ経路 a または b) で培養した。

【図 1 1】p 2 および p 6 の h A D S C のウイルス複製効率は、p 9 および p 15 細胞のウイルス複製効率よりも高かった。様々な継代の h A D S C を懸濁液中で H C V s e r - 1 a または H C V s e r - 2 a に曝露した。感染後、21日目の上清のウイルス 5 ' - U T R 転写物および細胞溶解物(連続培養物)を q R T - P C R によって決定した。結果により、p 2 および p 6 の細胞とは対照的に p 9 および p 15 の細胞は細胞溶解物中および上清中のウイルス複製物が有意に少ない、ということが分かった。データは、3回の実験の平均 ± S D として表したものである。10

【図 1 2】C D 8 1 、 L D L R 、 S R - B 1 および E G F R の遮断、ならびに A p o E の中和は、21日目の H C V s e r 感染 h A D S C 培養物の細胞溶解物中のウイルス複製物を減少させた。P - 2 の h A D S C を、C D 8 1 (クローン J S - 8 1) 、 L D L - R (クローン C 7) もしくは E G F R (クローン L A 1) に対するモノクローナル A b 、または S R - B 1 に対するポリクローナル A b を段階用量で使用して前処置を1時間行い、次いで洗浄し、その後、 H C V s e r - 1 b を投与した。A p o E 遮断のために様々な濃度の抗 A p o E 抗体(クローン E 6 D 1 0)を、h A D S C と共に3時間インキュベートする前に、記載のとおりに 14 H C V (+) 血清に室温で1時間添加した。H C V (+) 血清では、上清での測定(図 3 G)と一致して、h A D S C の C D 8 1 、 L D L - R 、 S R - B 1 および E G F R の遮断ならびに A p o E の中和は、細胞溶解物中のウイルス転写物の量を用量依存的に有意に減少させた。その一方で、抗体の処理自体は h A D S C 生存率に有意な影響を与えたなかった。データは、各処理について3回の平均 ± S D として表したものである。20

【図 1 3 A】オクルディン(O C L N)、クローディン - 1 (C L D N 1)、N P C 1 L 1 または D G A T - 1 をノックダウンした後の21日目の細胞溶解物での、s i R N A トランスクレクション後の R T - P C R 、およびウイルス複製数。(A) オクルディン、クローディン - 1 または N P C 1 L 1 のノックダウンを記載のとおりに 15 、 16 実施し、記載のとおりに 16 、 17 R T - P C R を行った。O C L N および C L D N 1 のノックダウンは同じ実験で実施したが、N P C 1 L 1 のノックダウンは別個の実験で実施した。データは、3回の実験を代表するものである。30

【図 1 3 B】(B) D G A T 1 の s i R N A プローブは、A m b i o n (カタログ番号 1 1 7 8 2 および 1 1 7 8 4) から得た予め設計された s i R N A であった。スクランブル R N A および D G A T 1 に特異的な s i R N A のトランスクレクション、q R T - P C R 、ならびにウェスタンプロット分析を記載のとおりに 18 実施した。データは、4回の実験から得た平均 ± S D として表したものであり、18 S r R N A に対して標準化された相対比として示される。40

【図 1 3 C】(C) ノックダウン後、h A D S C を H C V s e r - 1 b に曝露し、21日目の細胞溶解物の 5 ' - U T R 複製数を q R T - P C R によって決定した。s i R N A トランスクレクション自体は、スクランブル s i R N A によるトランスクレクションと比較して細胞生存率に有意に影響を与えず、トランスクレクションの48時間後にトリパンブルー排除試験によって決定された。明らかに、D G A T 1 ノックダウンは、細胞よりも上清においてより顕著な阻害効果を有した(パネル C 対図 3 H)。これは、D G A T 1 ノックダウンが細胞内の複製と放出との両方を損なうという知見と一致するが、ウイルス放出はより顕著に影響を受けたようである 19 。データは、4回の実験から得た平均 ± S D として表したものであり、スクランブル対照によるトランスクレクションに対する相対比として示される。50

【図14】hADSCにおけるシクロフィリンA発現のRT-PCR。記載されているように²⁰、シクロフィリンA(CyPA)のRT-PCRをp0-p6のhADSCで実施した。ナイーブHu h7.5細胞を陽性対照として使用した。データは、4回の実験を代表するものである。

【図15A】HCVser、JFH1/HCVccおよびHCVadscの主要画分(密度勾配による)の合計脂質含有量。HDLおよびLDL/VLDLのレベルをHDLおよびLDL/VLDLコレステロールアッセイキット(ABCcam)によって検出した。ApoBおよびApoEの量を、Quantikine(登録商標)ELISAヒトApoB免疫アッセイキット、およびQuantikine(登録商標)ELISAヒトApoE免疫アッセイキット(R&D)によって、製造者の指示に従って測定した。また、種々の画分でのHDLおよびLDL/VLDL、ApoBならびにApoEの量を1複製物当たりの重量に規格化した。(A)HCVser(特に画分2)は、HDLおよびLDL/VLDLの「合計」量がHCVccまたはHCVadscよりも高かった。¹⁰

【図15B】(B)HCVserおよびHCVadscの別の2バッチの分析は、脂質およびApoE/B含量の同じパターンを示した。

【図15C】(C)HCVserおよびHCVadscの別の2バッチの分析は、脂質およびApoE/B含量の同じパターンを示した。

【図16】JFH1/HCVcc感染Hu h7.5の効率 4×10^5 個のHu h7.5細胞/ウェルを一晩、6ウェルプレートで接種培養した。1日後に細胞を洗浄し、HCVccウイルス接種物(0.5mol)と共に3時間インキュベートした。洗浄後に細胞を、10%のウシ胎児血清(FBS)および1%の非必須アミノ酸の補充されたDMEM中で培養した。感染の3日後に上清を採取し、RNAを5'-UTR転写物のqRT-PCRのために抽出した。ウイルス接種物に曝露されていないナイーブHu h7.5細胞を陰性対照として使用した。データは、3回の実験から得た平均±SDとして表したものである。この実験は、hADSCの感染に使用したHCVcc接種物の感染力を立証した(図4D)。²⁰

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明のいくつかの態様を、例示のために示される応用に関して以下に記載する。本発明の完全な理解を提供するために多くの具体的な詳細、関係、および方法が示されていることを理解されたい。しかしながら、1つ以上の具体的な詳細なしで、または他の方法によって、本発明を実施できることは、当業者によって容易に認識されるであろう。本発明は行為または事象の順序によって限定されない、というのも、いくつかの動作は他の行為または事象とは異なる順序でかつ/または同時に生じる可能性があるからである。さらに、本発明に従って方法論を実施するためには、示されている全ての行為または事象が必要とされるわけではない。³⁰

【0019】

(定義)

別段の定義がない限り、本明細書中で用いられる科学技術用語および命名法は、本発明が関係する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。概して、細胞培養、感染、分子生物学方法などのための手順は、当該技術分野において用いられる一般的な方法である。そのような標準的技法は、参考マニュアル、例えばSambrookら(1989、Molecular Cloning - A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratories)およびAusubelら(1994、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、New York)などに見出すことができる。⁴⁰

【0020】

本明細書中で用いられる単数形「1つ(a)」、「1つ(an)」および「その(the)」は、文脈から明白な別段の表示がない限り、複数形も含むことが意図される。さらに、用語「含んでいる(including)」、「含む(includes)」、「有

10

20

30

40

50

している(having)」、「有する(has)」、「共に(with)」、またはそれらの変形が詳細な説明および/または特許請求の範囲において用いられている限りにおいて、そのような用語は、用語「含む(comprising)」と同様に包括的であること意図したものである。

【0021】

本明細書で使用する用語「約」は、量、一時的持続時間などの測定可能な値に言及している場合、指定された値からの±20%または±10%、より好ましくは±5%、よりいっそう好ましくは±1%、よりさらに好ましくは±0.1%の変動を(そのような変動が開示の方法を実施するのに適切である場合)包含することを意図している。

【0022】

本明細書中で用いられる用語「脂肪組織」は、白色脂肪、黄色脂肪または褐色脂肪からなる代謝的に主要な重要性を有する散在性の臓器を定義する。脂肪組織は脂肪細胞および間質を有する。脂肪組織は動物の体全体に見られる。例えば、哺乳類では、脂肪組織は大網、骨髓、皮下腔および周囲の大部分の臓器に存在する。

【0023】

本明細書中で用いられる用語「幹細胞」は、それ自体およびさらなる分化した子孫細胞を産生することのできる成体未分化細胞を定義する。

【0024】

「ヒト脂肪由来幹細胞」、「hADSC」、「ヒト脂肪由来DLK-1⁺幹細胞」および「ヒト脂肪生成DLK-1⁺細胞」という用語は交換可能に用いられ、本明細書で用いられているところでは、脂肪組織を含有する組織源から得られる親細胞であるかまたは親細胞を有する、ヒト成体幹細胞である。これらの細胞は、表皮成長因子様ファミリー²¹のメンバーであり脂肪生成に必須である特異的マーカーDLK-1(すなわち、Pref-1)を発現し、この発現は成熟脂肪細胞において完全に消滅する^{22~24}。

【0025】

本明細書中で用いられる用語「初代細胞」は、個体から得た細胞または組織から直接誘導される細胞を指す。本明細書中で用いられる「継代細胞」は、初代細胞から継代培養された細胞を指す。本明細書中で用いられる「継代数」は、細胞が初代細胞から継代培養された回数を指す。例えば、第1継代細胞(P1細胞)は、初代細胞を直接継代培養することによって得られる細胞であり、第2継代細胞(P2細胞)は、第1継代細胞を直接継代培養することによって得られる細胞である、などである。

【0026】

本明細書中で用いられる場合、「培養」、「培養する」、「増殖させる(grow)」、「増殖する(propagate)」および「増殖(propagating)」という用語は、交換可能に用いられ、調製された培地内で細胞を試験管内で増殖させることをいう。本明細書中で用いられる場合、「培養システム(culture system)」「培養システム(culturing system)」「増殖システム(propagate system)」および「増殖システム(propagating system)」という用語は交換可能に用いられ、ウイルス粒子を生成させる細胞を含む細胞培養物を指す。特に、本発明の培養システムは、HCVを生成する培養下のhADSCを含む。システムは、感染性ウイルスの產生を含めたHCVの完全な複製(例えば、付着、細胞内への侵入、複製、成熟など)、特に、ウイルス侵入、(-)鎖および(+)鎖の合成を含めた複製、ウイルスタンパク質合成、ウイルス組み立て、ウイルス輸送、またはウイルス放出を支援する。

【0027】

本明細書中で用いられる「試料」または「生体試料」という用語は、被験体または試験管内培養物から単離された生体材料を意味する。生体試料は、核酸、ポリペプチドまたは、被験体もしくは試験管内細胞培養物における他の生物学的、物理学的もしくは病理学的プロセスのマーカーを検出するのに適した任意の生体材料を含有し得、培地、体液、組織ならびに、被験体または試験管内細胞培養物から得られた細胞性および/または非細

10

20

30

40

50

胞性の材料を含み得る。

【0028】

本明細書中で用いられる場合、用語「診断」は、疾患または障害の存在の判定をいう。本発明のいくつかの実施形態では、特定の疾患または障害の存在の判定を可能とする、診断を行う方法が提供される。

【0029】

本明細書中で用いられる場合、「患者」、「被験体」、「個体」などの用語は互換的に用いられ、本明細書に記載の方法を受けることのできる任意の動物を指す。特定の非限定的な実施形態において、患者、被験体または個体はヒトである。

【0030】

10

(説明)

本発明は、hADSCがHCVによる感染に対して許容性であるという発見に関する。

【0031】

(hADSC)

ヒト脂肪由来幹細胞は、中胚葉由来の多能性成体幹細胞であり、簡単に大量に得ることができる⁹。これらの細胞は、表皮成長因子様ファミリー^{2 1}のメンバーであり脂肪生成に必須である特異的マーカーDLK-1(すなわち、Pref-1)を発現し、この発現は成熟脂肪細胞において完全に消滅する^{2 2 ~ 2 4}。ヒト脂肪生成DLK-1⁺細胞(hADSC)は複数の細胞系統に分化できるということが、相次ぐ証拠によって実証されており(総説については参考文献^{2 5}、^{2 6}参照)、hADSCは再生療法の考案に有望なツールとなっている。様々な解剖学的区画にある間葉系幹細胞がウイルスの感染に対して感受性であることも報告されている^{2 7 ~ 3 2}。しかし、ウイルス性疾患におけるhADSCの役割はまだ探究されていない。

20

【0032】

一般に、hADSCは任意の利用可能な供給源から得ることができる。一実施形態では、hADSCは適切な組織源から分離される。適切なhADSCの組織源としては、限定はしないが、任意の脂肪含有組織、例えば、褐色脂肪組織または、皮下白色脂肪組織などの白色脂肪組織が挙げられる。典型的には、ヒト脂肪組織は、外科的切除または脂肪吸引を用いて生存ドナーから得られる。いくつかの実施形態では、脂肪組織は、被験体の予め選択された領域、すなわち、腹部、臀部、鼠径部および腹膜、またはそれらの任意の組み合わせから得られる。

30

【0033】

一実施形態では、hADSCは、腹部または臀部の皮下脂肪組織から単離される。一実施形態では、hADSCは初代細胞、すなわち個体の脂肪組織に直接由来する細胞である。別の実施形態では、hADSCは、継代細胞、例えば第1~15継代細胞、好ましくは第1~6継代細胞である。

【0034】

hADSCなどのADSCを分離、単離および増殖させる方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、米国特許第6,391,2971B1号；第6,777,231B1号明細書；米国特許第5,786,207号明細書；米国特許出願第2005/0076396A1号明細書；Burrisら(1999)Mol Endocrinol 13:410-7; Ericksonら(2002)Biochem Biophys Res Commun. 2002年1月18日; 290(2):763-9; Grontbosら(2001)Journal of Cellular Physiology 189:54-63; Halvorsenら(2001)Metabolism 50:407-413; Halvorsenら(2001)Tissue Eng. 7(6):729-41; Harpら(2001)Biochem Biophys Res Commun 281:907-912; Saladinら(1999)Cell Growth & Diff 10:43-48; Senら(2001)Journal of Cellular Biochemistry 81:312-319; Zhouら(1999) 40

50

Bio technol. Techniques 13 : 513 - 517 ; Ericksonら(2002) Biochem Biophys Res Commun. 2002年1月18日; 290(2) : 763 - 9 ; Gronthosら(2001) Journal of Cellular Physiology, 189 : 54 - 63 ; Halvorsenら(2001) Metabolism 50 : 407 - 413 ; Halvorsenら(2001) Tissue Eng. 2001年12月7日; (6) : 729 - 41 ; Harpら(2001) Biochem Biophys Res Commun 281 : 907 - 912 ; Saladinら(1999) Cell Growth & Diff 10 : 43 - 48 ; Senら(2001) Journal of Cellular Biochemistry 81 : 312 - 319 ; Zhouら(1999) Biotechnol. Techniques 13 : 513 - 517 ; Zuiicら(2001) Tissue Eng. 7 : 211 - 228 ; Haunerら(1987) J. Clin. Endocrinol. Metabol. 64 : 832 - 835 ; Katzら(1999) Clin. Plast. Surg. 26 : 587 - 603 に記載されている。

【0035】

例を示すにすぎないが、いくつかの形態学的方法、生化学的方法または分子に基づく方法を用いて当該細胞を単離することができる。一態様において、hADSCは、細胞の大きさおよび粒度に基づいて単離される、というのもhADSCは小さく粒状であるからである。あるいはhADSCは、幹細胞が分化細胞よりも長いテロメアを有する傾向にあることから、テロメアの長さをアッセイすることまたはテロメラーゼ活性をアッセイすることによって単離することができる。 20

【0036】

あるいは、hADSCに特異的な細胞マーカーを選択することによって免疫組織化学的にhADSCを他の細胞から分離することができる。hADSCは、間葉系幹細胞マーカーCD10、CD13、CD29、CD34、CD44、CD54、CD71、CD90、CD105、CD106、CD117およびSTRO-1を発現する。それらは、造血系統マーカーCD45、CD14、CD16、CD56、CD61、CD62E、CD104およびCD106ならびに、内皮細胞(EC)マーカーCD31、CD144およびフォンビルプラント因子に対して陰性である(Zukら、Mol Biol Cell 13(12) : 4279 - 4295、2002；Musinaら、Bull Exp Biol Med 139(4) : 504 - 509、2005；Romanovら、Bull Exp Biol Med 140(1) : 138 - 143、2005)。形態的には、それらは線維芽細胞様であり、試験管内での増殖後にそれらの形状を維持している(Zukら、Mol Biol Cell 13(12) : 4279 - 4295、2002；Arrigoniら、Cell Tissue Res 338(3) : 401 - 411、2009；Zannettinoら、J Cell Physiol 214(2) : 413 - 421、2008)。種々の態様において、hADSCは、DLK-1⁺の免疫選択によって単離される。 30

【0037】

別の実施形態では、hADSCは、市販の供給源、または確立されたhADSCの系統から得られる。そのようなhADSCの非限定的な例は、Poietics(商標)ヒト脂肪由来幹細胞(カタログ番号PT-5006、Lonza Group Ltd.)およびATCC(登録商標)PCS-500-011(商標)などである。 40

【0038】

(細胞培養物)

一般に、hADSCは、当該技術分野において利用可能な周知の培地中で維持しつつ増殖させることができる。このような培地としては、限定はしないが、ケラチノサイトSFM(K培地)、ダルベッコ変形イーグル培地(登録商標)(DMEM)、DMEM F12培地(登録商標)、イーグル最少必須培地(登録商標)、F-12K培地(登録商標)、イスコフ変形ダルベッコ培地(登録商標) RPMI-1640培地(登録商標)、間葉 50

系幹細胞基礎培地（ATCC（登録商標）PCS-500-030（商標））および間葉系幹細胞成長キット・低血清（ATCC（登録商標）PCS-500-040（商標））が挙げられる。

【0039】

また、本発明では、哺乳動物血清、好ましくはウシ胎児血清による細胞培養培地の補充が考えられる。本発明のいくつかの実施形態では、そのような哺乳動物血清濃度は、0体積%～20体積%、好ましくは5体積%～15体積%、より好ましくは10体積%の範囲である。血清の例としては、ウシ胎児血清（FBS）、ウシ血清（BS）、仔ウシ血清（CS）、ウシ胎児血清（FCS）、新生仔ウシ血清（NCS）、ヤギ血清（GS）、ウマ血清（HS）、ヒト血清、ニワトリ血清、ブタ血清、ヒツジ血清、ウサギ血清、血清代替品およびウシ胎児液が挙げられる。10

【0040】

成長因子、ホルモン、アミノ酸、脂質、ミネラルなどの追加の補給物も、最適な成長および増殖のために必要な微量元素を細胞に供給するために好適に使用できる。そのような補給物は市販されている。これらの補給物の適切な濃度を決定することは、当業者の技量の範囲内である。

【0041】

（HCV）

本発明によるHCVは、hADSCに感染することのできる任意のHCV、またはHCV感染個体から分離されることのできる任意のHCVとすることができます。一実施形態において、HCVは、遺伝子型1a、1b、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、3e、3f、4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g、4h、4i、4j、5aおよび6aまたはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるHCV遺伝子型の少なくとも1つである。別の実施形態において、HCVは、遺伝子型1a、1b、2a、2bおよび混合型2a+2bからなる群から選択されるHCV遺伝子型の少なくとも1つである。20

【0042】

一態様において、本発明は、HCVを増殖させるためのhADSCに基づくシステムを含み、それはhADSCを含む。別の態様において、本発明は、HCVの増殖、またはHCV生活環分析の実施、またはHCV感染の診断、または抗ウイルス化合物の選抜、またはHCVに感染した被験体のHCVの特性評価のために本発明のhADSCまたはHCV培養システムを使用する方法を含む。30

【0043】

HCVのレベルは、当該技術分野において既知の任意の技法によって決定することができる。そのような技法としては、HCVタンパク質を試験するものである抗HCV ELLISAアッセイ（酵素結合免疫吸着検定法）が挙げられる。增幅試験されたRNAによるHCV複製の試験（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応すなわちPCR、分岐DNAアッセイ）を用いてもよい。HCVのRNAの合成は、実際には、リアルタイムPCR用に設計された装置を使用して単一工程でRT-PCRによって、またはHCV特異的放射性プローブを使用してフィルタ上のRNAのハイブリダイゼーションによって、分析され得る。例えば、HCVゲノムの增幅を可能にする特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、単離RNAを、対になった逆転写および増幅、例えば、逆転写とポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）による増幅とに供してもよい。その後、上記被験体に、感染したHCVの遺伝子型を決定すべく直接配列決定を実施してもよい。40

【0044】

種々の実施形態において、HCVのレベルは、HCV力価、HCV核酸のレベル、またはHCVポリペプチドのレベルを測定することによって決定される。

【0045】

種々の実施形態において、候補化合物の非存在下で認められるHCVレベルと比較して、候補化合物の存在下で認められるHCVのレベルの低下は、候補化合物の阻害活性を指50

し示す。

【0046】

本発明によれば、候補化合物としては、限定はしないが、化学化合物、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、抗体、核酸、アンチセンス核酸、s h R N A、リボザイムおよび小分子化学化合物が挙げられる。

【0047】

本明細書中で開示されているとおり、選抜方法を用いて同定した抗H C V化合物を、感受性動物モデルでさらに試験することができる。

【0048】

(キット)

10

関連する態様において、本発明はまた、H C Vの増殖、またはH C V生活環分析の実施、またはH C V感染の診断、または抗ウイルス化合物の選抜、またはH C Vに感染した被験体のH C Vの特性評価のための、本明細書に記載のh A D S Cおよびh A D S Cの培養に適した培地を含むキットを提供する。

【0049】

本発明を、以下の実施例によってさらに説明する。これらの実施例は、本発明を例示することを意図したものに過ぎず、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。以下の実施例における実験方法は、特に指定しない限り、慣例的な条件、例えば、S a m b r o o kらによりM o l e c u l e C l o n e : A L a b o r a t o r y M a n u a l、N e w Y o r k : C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s、1989年に記載されている条件、または製造業者によって指示された条件の下で実施した。

20

【実施例】

【0050】

<材料および方法>

(臨床試料)

全ての臨床脂肪組織および肝臓試料は、K a o h s i u n g 医科大学病院から施設研究委員会の承認を得て入手した(K M U H - I R B - 9 6 0 4 7 7、K M U H - I R B - 9 6 0 3 4 3 およびK M U H - I R B - 2 0 1 2 0 4 0 4)。手続きに先立ち、全てのドナーから書面によるインフォームドコンセントを得た。

30

【0051】

(新鮮な脂肪組織の分画およびD L K - 1⁺細胞の培養)

H C V(+)脂肪組織は、肝細胞癌腫を切除するための手術創(開腹術)から得た。H C V(-)脂肪組織については、先に記載されているとおりに^{1 3}、乳癌の乳房切除直後の乳房再建術を受けた女性の横軸型腹直筋皮弁から得た。脂肪吸引を受けている肥満者からもH C V(-)脂肪組織を得た(表1)。手術前に乳癌の管理のために補助化学療法または放射線療法を受けた患者は一人もいなかった。

30

【0052】

試料採集後、組織を無菌標準生理食塩水で洗浄し、検体を無菌バッグに入れて速やかに調製のために送った。新鮮な脂肪組織を、免疫組織化学のために固定するか、または記載されるとおりに^{1 2}、^{1 3}、^{3 3}遠心分離(8 0 0 g、10分)によって上部(成熟脂肪細胞および結合組織を含む)の浮遊層(浮遊物)と、中間部の緩衝液層と、底部の沈降細胞ペレットとに分画するために使用した。簡潔に述べると、はさみで脂肪組織を完全に細かく刻んで小片にし、カルシウムおよびマグネシウムを含まないP B Sで洗浄し、続いてP B S中で30分間、0.075%コラゲナーゼ(37.5 mg / mL; S i g m a - A l d r i c h)を使用して37°で定常攪拌によって消化した。

40

【0053】

底層の細胞ペレット(すなわちS V F細胞)を回収し、記載されているとおりに^{1 2}、^{3 4}(赤血球を溶解させるために)R B C溶解溶液で処理し、続いて100 μmのS t e r i f l i p(M i l l i p o r e)フィルタで濾過した。S V F細胞の数および生存率

50

は、トリパンブルーで染色した後に Countess セルカウンター (Invitrogen) を使用して測定した。その後、記載されているとおりに 10 SVF 細胞を免疫磁気ビーズによって DLK - 1⁺ 細胞について陽性選択し、細胞 RNA を RT - PCR または qRT - PCR のために抽出した。DLK - 1⁺ 細胞も（ウイルス NS5 抗原についての）免疫細胞化学に供した。

【0054】

いずれの試料についても、脂肪試料採取から細胞の単離までの間隔は 3 時間以下であった。DLK - 1⁺ 細胞を培養するために、記載されているとおりに 13 1×10^5 個の細胞を 6 cm のペトリ皿に 49 日間置き、7 日毎に（培地交換と同時進行で）上清を RNA 抽出のために採集した。

10

【0055】

（DLK - 1⁺ 細胞の免疫選択）

HCV 感染または HCV 未感染の個体から調製した RBC 溶解した未分画 SVF 細胞をポリクローナルウサギ抗 DLK1 抗体（Abcam、米国）と共に 4[°] で 30 分間インキュベートした。記載されているとおりに 10 細胞を、0.8 mmol/L の MgCl₂、2.0 mmol/L の HEPES、100 U/mL のペニシリンおよび 100 µg/mL のストレプトマイシンを含有する HBSS 中で 2 回洗浄し、磁気マイクロビーズに結合したヤギ抗ウサギ IgG (Milleniy Biotech Inc、Auburn、CA) と共に 4[°] で 30 分間インキュベートした。細胞懸濁液を洗浄し、Midimacs セパレータ (Milleniy Biotech) 内のカラムに通し、その結果、DLK - 1⁺ 細胞が通過し、DLK - 1⁺ 細胞がカラムに保持された。両方の細胞画分を HBSS 中で 2 回洗浄した。細胞生存率は、DLK - 1⁺ 画分および DLK - 1⁻ 画分についてそれぞれ > 96% および > 97% であった。RT - PCR または qRT - PCR のために RNA を抽出した。別個の実験において、細胞を免疫細胞化学のためにサイトスピンドライドに固定した (5 ~ 7 × 10³ 細胞 / スライド)。試験管内感染の実験では、HCV (+) 血清 (HCVser) への曝露後、DLK - 1⁺ 細胞を、表示の期間、培養および継代した（記載されているとおりに 13 繼代培養した）。その後、RNA をウイルス 5' - UTR 転写物の RT - PCR または qRT - PCR のために抽出した。

20

【0056】

（HCVser による hADSC 感染）

30

この研究では、2 つのプロトコルを採用した。

【0057】

(1) プロトコル 1、懸濁液中での感染 - 本発明者らは、ナイープ hADSC の第 2 継代 (p - 2) ~ 第 6 継代までを HCVser 感染のために使用した。800 µl の新鮮な培地中に懸濁させた 5×10^5 個の hADSC に合計 200 µl の HCV 血清 (1 × 10⁵ 個の 5' - UTR 複製物を含有する) を、エッペンドルフチューブ内で 0.2 の感染多重度 (MOI) で添加し、続いて 37[°] で 3 時間インキュベートした。細胞を PBS で 3 回洗浄し、さらに 7、14、21 および 28 日間培養し、上清中および細胞溶解物中の RNA を 5' - UTR の RT - PCR のために採集した。また、免疫細胞化学および透過型電子顕微鏡 (TEM) 研究のために細胞を回収した。

40

【0058】

(2) プロトコル 2、接着形態での感染 p - 2 ~ p - 6 のナイープ hADSC を 6 cm のペトリ皿内に 1 日間接種培養して細胞を付着させ、HCVser を終体積 2 ml の培地に 0.5 moi (2 × 10⁵ 個の hADSC 細胞に対して 1 × 10⁵ 個の 5' - UTR 複製物) で 3 時間添加した。穏やかに洗浄した後、5 ml の新鮮な培地内で細胞を、7 日毎の培地交換の有り無しで培養した。

【0059】

（5' - UTR の RT - PCR および定量的 RT - PCR ）

QIAamp (登録商標) ウイルス RNA ミニキット (Qiaagen、Basle、スイス) を使用して RNA を 140 µl の HCV (+) 血清または HCVser 感染 hAD

50

S C 培養物の上清から抽出した。PureLink (登録商標) RNAミニキット (Ambion、Carlsbad、CA、米国)を製造業者の指示に従って使用して、細胞溶解物由来のRNAを単離した。その後、高容量cDNA逆転写キットを使用してRNAを一本鎖cDNAに変換し、続いてGoTaq Master Mix (Promega、WI、米国)を使用してPCRを行った。ウイルス複製物を定量するために、Applied Biosystems (登録商標) Viia (商標) 7リアルタイムPCRシステムを使用して、C型肝炎ウイルスアドバンスドキット (Primer Design Ltd.、英国)でPCRを行った。HCV特異的な逆方向プライマーおよび増幅プライマーは、ABIプライマー3.0 Express Soft Wordに従って設計した。記載されているとおりに³ 5'、プライマー5' - ACTCGCAAGCACCCCTATC 10 AG - 3'を逆転写に使用し、PCRおよびリアルタイムPCRに使用するプライマーを、別のHCV遺伝子型の高度に保存された5' - 非翻訳領域(UTR)に適合させた。

【0060】

(ヒト脂肪組織に対する免疫組織化学(IHC))

新鮮な脂肪組織を手術創から採取し、ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。組織を5 μmの切片に切断し、脱ろうし、その後、クエン酸緩衝液 (10 mMのクエン酸、pH 6.0)に浸し、抗原回復のためにマイクロ波で加熱した。室温で30分間、5%のBSAでブロッキングした後、ポリクローナルウサギ抗DLK1抗体 (1:150; カタログ番号ab21682、Abcam、米国)またはウサギIgG Ab (1:150、カタログ番号AB-105-C、R&D)を4で一晩適用し、続いてアルカリフォスファターゼ結合抗ウサギIgG二次抗体 (1:500; Jason ImmunoResearch)を室温で1時間適用し、その後、fast red substrateシステム (シグマアルドリッヂ)で発色させた。連続的なNS5染色のために、試料をPBSに10分間浸漬してカバーガラスを取り外し、スライドを0.3%のH₂O₂中で30分間、室温でインキュベートして、内因性ペルオキシダーゼに由来する非特異的バックグラウンドを減少させた。室温で30分間、5%BSAでブロッキングした後、マウス抗NS5抗体 (1:200、クローンBGN/1246/5G7、カタログ番号0200-0423、AbD Serotec)またはマウスIgG1アイソタイプAb (1:100、カタログ番号14-4714、eBioscience)を4で一晩添加した。本発明者らの経験では、既に試料をパラフィンに包埋していたため、脂肪組織に対するNS5染色には細胞浸透手順が不要であった。その後、切片を西洋ワサビペルオキシダーゼポリマー-Quant o試薬 (抗マウス、既製、Thermo Scientific)と共に室温で7分間インキュベートし、UltraVision Quanto Detection System (発色用DAB基質含有; Thermo Scientific)で発色させた。その後、切片をヘマトキシリント染色し、カバーガラスを元どおりに配置し、それによって細胞輪郭がわずかに変化した (図1Eに示すとおり)。TissueFA XS走査ソフトウェア (TissueGnostics)を使用して高品質顕微鏡 (Zeiss)、高速コンピュータハードウェアおよび高解像度スクリーンによってDLK1およびNS5Aの染色の電子画像をキャプチャした。続いて、画像内の同じ領域を選択し、比較および共局在化の分析のために視覚化した。 30 40

【0061】

脂肪組織 (図1E)では、発色に必要な最適時間は、HCV感染状態に拘らず、様々なドナーからの組織の中で著しく変動 (つまり、ドナー間での変動) した。本発明者らは方法を何度も改変し、発色のための時間が重大な意味を持つことを発見した。本発明者らが従った指針は、アイソタイプAb染色 (ウサギIgGまたはマウスIgG1)の色信号を最も弱く生じる発色の最大時間をまず決定することであり、その後、この発色の期間を抗DLK-1 Ab染色または抗NS5 Ab染色に採用した。これは、基質の過剰発色による偽陽性がほとんど生じないこと、およびアイソタイプAb染色のバックグラウンドが低くなることを確実にするためであった。

【0062】

10

20

30

40

50

H C V (+) ドナー 1 (表 1) の脂肪組織についての本発明者らの研究では、有意な色信号が現れる前のウサギ Ig G 染色の発色の最大時間は 40 ~ 50 秒であったことから、DLK - 1 染色の発色は 40 ~ 50 秒に定めた。同様に、有意な色シグナルのないマウス Ig G 1 染色の発色の最大時間は 15 秒という短さであったが、それを抗 NS5Ab 染色の発色時間として定めた。対照的に、ドナー 2 およびドナー 3 の脂肪組織では、ウサギ Ig G 染色の最適な発色時間は 30 秒であり、マウス Ig G 1 染色の場合はわずか 10 秒であったことから、これらの期間をそれぞれ抗 DLK - 1 染色および抗 NS5Ab 染色の発色のために定めた。HCV (-) 試料を染色する際、同様の指針に従った。

【0063】

(免疫細胞化学 (ICC))

10

未分画 SVF 細胞または DLK - 1⁺ hADSC または DLK - 1⁻ 細胞の免疫細胞化学のために、IHC の場合と同様の指針に従って、最適な発色時間をどの対照実験においても上記のとおりに予め決定した。表示の時点において細胞を回収し、サイトスピニによりポリリジン被覆ガラススライドに接着させ、続いて 4% のホルマリンで 20 分間固定した。DLK - 1 染色のために、細胞を 37 °C で 30 分間、0.05% のトリプシン溶液によって抗原回復に供し、その後、DDW によって 3 回すすいだ。UltraVision Block 缓衝液 (UltraVision Quanto Detection System の中の試薬、Thermo、米国) で 5 分間ブロッキングした後、細胞を 4 °C で一晩ウサギ抗 DLK1 抗体またはウサギ Ig G と共にインキュベートし、続いてアルカリホスファターゼ結合抗ウサギ Ig G 二次抗体と共に室温で 1 時間インキュベートし、fast red substrate システム (Sigma-Aldrich) で 5 ~ 6 分間 (ほとんどの場合) 発色させた。(図 2C に示すように同じスライド上で染色された) HCV 特異的 NS5 の単染色または逐次染色のために、スライドを PBS 中に 10 分間置いてカバーガラスを取り外し、封入剤を洗い流し、0.3% の Triton X-100 と 1% の BSA とを含有する PBS で細胞を 30 分間浸透させブロッキングし、その後、UltraVision Quanto Detection System (Thermo Scientific、Fremont、CA、米国) を適用した。次いで、細胞を Hydrogen Peroxide Block (Abcam、MA、米国) 中で 10 分間インキュベートして、内因性ペルオキシダーゼに起因する非特異的なバックグラウンド染色を減少させた。洗浄後、細胞を UltraVision Block (Thermo Scientific、MA、米国) と共に 5 分間インキュベートして非特異的なバックグラウンド染色をブロッキングし、マウスモノクローナル抗 NS5 抗体を含有する希釈緩衝液と共に 4 °C で一晩インキュベートした。マウス Ig G 1 による染色を陰性対照として用いた。翌日、細胞を Primary Antibody Amplifier Quanto 液と共に 10 分間インキュベートし、さらに 10 分間、HRP Polymer Quanto と共にインキュベートし、各試薬適用の間に PBS で洗浄した。最後に、30 μl の DAB Quanto Chromogen を 1 ml の DAB Quanto Substrate に添加し、旋回混合し、発色のために細胞に (ほとんどの場合) 2 ~ 3 分間適用した。洗浄後、スライドに永久封入剤を載せ、カバーガラスで覆い、Tissue FAXS 顕微鏡 (ZEISS) を使用して視覚化し、撮影した。

【0064】

(血清 HCV 感染 hADSC についての透過型電子顕微鏡検査)

TEM 研究のために、hADSC を回収し、記載されているとおりに^{3~6} 調製し、透過型電子顕微鏡 (JEM 2000 EXII; JEOL、東京、日本) で調べた。

【0065】

(HCV 2a および 2b のコア抗原をコードする mRNA の RT - PCR)

PureLink (登録商標) RNA ミニキット (Ambion、Carlsbad、CA、米国) を製造者の指示に従って使用して hADSC の RNA を単離した。高容量 cDNA 逆転写キット (Applied Biosystems) を使用して RNA を一本鎖 cDNA に変換した。逆転写に使用した特異的プライマーは 5' - ATGTACCC - 30

A T G A G G T C G G C - 3' であった。PCRに使用したプライマーは、別のHCV遺伝子型のコアタンパク質領域に適合させた。第1回目のPCRには、以下の設定での熱プロファイルを用いて、(順方向)5'-C G C G C G A C T A G G A A G A C T T C - 3'および(逆方向)5'-C G C G C G A C G C G T A A A A C T T C - 3'を含有するプライマー混合物を使用した：94で2分間、続いて94で45秒間と55で45秒間と72で90秒間とを35サイクル、次いで最終伸長のために72で7分間。2回目のPCRにおける遺伝子型同定に使用した型特異的なアンチセンスプライマーは、5'-C C A A G A G G G A C G G G A A C C T C - 3' (2a型)および5'-A C C C T C G T T T C C G T A C A G A G - 3' (2b型)であり、熱プロファイルは以下の設定とした：95で2分間、続いて95で30秒間と60で30秒間と72で30秒間とを30サイクル、次いで最終伸長のために72で7分間³⁷、³⁸。

【0066】

(フローサイトメトリーおよびブロッキング実験)

懸濁液中の様々な継代の0.5~1×10⁵個のhADSCを4で1時間、マウス抗ヒトCD81モノクローナルAb(クローンJS-81、BD Biosciences)、抗LDL-R Ab(クローンC7、Millipore)、抗EGFR Ab(クローンLA1、Millipore)またはウサギポリクローナル抗SRB1 Ab(Novus Biologicals)で染色した。それぞれの対照は、マウスIgG1またはポリクローナルウサギIgGであった。洗浄後、細胞をさらにフルオレセインイソチオシアネート(FITC)結合二次Ab(Jackson ImmunoResearch Laboratories、PA、米国)と共にインキュベートし、Cell Quantal SC高解像度フローサイトメトリー(Beckman Coulter Fullerton、CA、米国)により分析した。細胞表面分子をブロッキングするために、(ウェル内に接着した)2×10⁵個のhADSCを37で、表示用量(1~100μg/ml)の抗体を含有する1mlの無血清K培地で前処理した。それぞれのアイソタイプ抗体による処理を対照として用いた。1時間後、未希釈のHCV(+)血清をエッペンドルフチューブ内に加えて、抗体存在下での3時間インキュベーションのためにMOIを0.2にした。その後、細胞を洗浄し、連続培養のために6cmのペトリ皿内に接種培養した。ApоЕ遮断のために様々な濃度の抗ApоЕ抗体(クローンE6D10)を、hADSCと共に3時間インキュベートする前に、記載のとおりに¹⁴HCV(+)血清に室温で1時間添加した。21日間の連続培養後に上清および細胞を回収し、RNAを抽出してウイルス5'-UTR転写物を定量した。別個の実験では、ウェル内のhADSCを表示用量のIFN(Sigma-Aldrich、MO、米国)で16時間、K培地中で3回前処理し、その後、遺伝子型1a、1b、2aおよび2bのHCV(+)血清に曝露した。21日後、細胞溶解物中の5'-UTR転写物をqRT-PCRによって定量し、ビヒクル(PBS)対照で処理した細胞と比較した画分阻害として結果を計算した。

【0067】

(miR-122のRT-PCRのためのRNA抽出)

miR-122のRT-PCRのためのプライマーを調製し、記載されているとおりに³⁹実施した。細胞からの全RNAをRNA抽出試薬REZOL(商標)C&T(Protech、台北、台湾)で単離した。miR-122レベルを決定するために本発明者は、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit(Applied Biosystems)を使用して抽出RNAを逆転写し、miR-122のTaqMan MicroRNA AssayによるリアルタイムPCR解析のテンプレートとしてcDNAを使用した。

【0068】

(合成siRNAと遺伝子サイレンシング)

オクルディンおよびクローディン-1に特異的なsiRNAを、記載されているとおりに¹⁵、⁴⁰、⁴¹Dharmaconによって合成した。それらの各々の標的配列は、

U A A C A U U A G G A C C U U A G A A (クローディン - 1) および G U G A A G A G U A C A U G G C U G C (オクルディン) である。N P C 1 L 1 を記載のとおりに^{1 6} 調製し、D G A T - 1 の s i R N A を記載のとおりに^{1 9} 調製した。X f e c t トランスフェクション試薬 (C l o n t e c h) を使用して、特異的な s i R N A を 6 ウェル細胞プレートのウェル内の h A D S C にトランスフェクトした。H C V 感染は、s i R N A トランスフェクト細胞を H C V s e r と共に 3 7 で 3 時間インキュベートし、その後 H C V s e r を P B S で洗い流すことによって行った。記載されているとおりに^{1 5}、^{1 9}、^{4 0}、^{4 1}、トランスフェクション後 4 8 時間目の細胞を R T - P C R のために溶解して遺伝子サイレンシングの度合いを決定した。2 1 日間の培養後に H C V s e r 感染 h A D S C の細胞溶解物および上清を 5 ' - U T R の q R T - P C R のために採集した。 10

【0069】

(J F H 1 / H C V c c および H u h 7 . 5 細胞)

H u h 7 . 5 細胞を、1 0 % の熱不活性化ウシ胎児血清 (I n v i t r o g e n) と 0 . 1 mM の非必須アミノ酸 (I n v i t r o g e n) とを含有する D M E M (I n v i t r o g e n) 中で培養した。試験管内ゲノム J F H - 1 R N A を転写し、先に記載されているとおりに^{4 2} 電気穿孔によって細胞に送達した。その後、トランスフェクトした細胞を完全な D M E M に移し、3 ~ 4 日毎に継代した。通常の実践では、完全長 J F H 1 c D N A でトランスフェクトした細胞からの馴化培地を、1 0 分間の遠心分離 (3 , 0 0 0 × g) によって浄化し、使用前に滅菌濾過 (0 . 2 μ m 酢酸セルロース、M i l l i p o r e) した。より長期間の保存のために、H C V c c を等分し、- 8 0 で保存した。4 で一晩のインキュベーションのためにウイルスを、1 / 4 体積の滅菌濾過済 4 0 % (w / v) ポリエチレングリコール - 8 0 0 0 の P B S 液の添加によって濃縮した。ウイルス沈殿物を遠心分離 (8 , 0 0 0 × g、1 5 分) によって回収し、記載されているとおりに^{4 3} P B S 中に再懸濁した。 20

【0070】

(薬物阻害アッセイ)

抗ウイルス薬であるリバビリン、シクロスボリン A および I F N は全て S i g m a - A l d r i c h から入手した。テラプレビルは、米国マサチューセッツ州の S e l l e c k C h e m i c a l s から得た。段階用量のリバビリン、テラプレビルまたはシクロスボリン A を 0 日目にペトリ皿内の H C V s e r 感染 h A D S C の培地に添加し、2 1 日間培養した。I F N 処理に関しては、h A D S C を 1 6 時間、表示用量の I F N で前処理し、その後、H C V s e r と共にインキュベートした。その後、細胞溶解物のウイルス 5 ' - U T R 転写物を、ビヒクル対照で処理した細胞と比較した画分阻害として定量および計算した。ビヒクル対照は、リバビリンおよび I F N の場合は P B S 、シクロスボリン A およびテラプレビルの場合は 0 . 1 % の D M S O とした。 30

【0071】

(H C V s e r 、 H C V a d s c および H C V c c の浮遊密度)

H C V c c および H C V a d s c の培地を、先に記載されているとおりに P E G - 8 0 0 で濃縮した。いずれの試料も 5 0 0 μ l の無血清培地に再懸濁させ、先に記載されているとおりに^{4 4}、1 0 mM の H e p e s (p H 7 . 5 5) と 1 5 0 mM の N a C l と 0 . 0 2 % の B S A とを含有する溶液を使用して調製した 1 0 % ~ 4 0 % のイオジキサノール (それぞれ 0 . 5 m l) の連続イオジキサノール (O p t i P r e p 、A x i s - S h i e l d 、ノルウェー) 密度勾配の上に積層した。勾配を S W - 4 1 ローター (B e c k man C o u l t e r) で 6 時間、4 で 4 0 , 0 0 0 r p m で超遠心分離した。超遠心分離後、上部の勾配から 1 7 個の画分を回収した (各画分は 5 0 0 μ l 含んでいた)。最後に、Q I A a m p (登録商標) ウイルス R N A ミニキット (Q I A G E N 、B a s l e 、スイス) を使用して各画分から全 R N A を単離した。R N A を、定量的 R T - P C R による H C V R N A 検出のために使用した。 40

【0072】

(A p o B 、A p o E およびコレステロールの測定)

10

20

30

40

50

Quanti kine(登録商標)ELISAヒトアポリポタンパク質B/ApoBイムノアッセイキットおよびQuanti kine(登録商標)ELISAヒトアポリポタンパク質E/ApoEイムノアッセイキット(R&D Systems)を使用して、ApoBおよびApoEの発現を製造者の説明に従って検出した。HDLおよびLDL/VLDLのコレステロールを、HDLおよびLDL/VLDLコレステロールアッセイキット(Abcam)によって検出した。様々な浮遊密度の画分中のHDLおよびLDL/VLDLのApoB、ApoEおよびコレステロールの発現レベルを複製物に対して規格化した。

【0073】

(HCVserまたはHCVadscによるヒト初代肝細胞(PHH)の感染)

10

HCV関連またはHCV非関連の肝細胞癌腫のために外科的切除された肝臓検体から新鮮な非腫瘍性肝組織を採取し、PHHを単離し、記載されているとおりに^{4 5}培養した。PHHを3日間接種培養して、コラーゲンI被覆6ウェルプレート上に細胞を付着させた。4日目に細胞を穏やかに洗浄し、HCVserまたはそれに対応するd21のhADSC増殖HCV(+)上清(1×10⁴個のHCV5'-UTR複製物を含有する)と混合されたアルギニン不含William's E培地(Invitrogen、CA、米国)中で終体積を0.5mlとして3時間培養した。感染後、細胞を洗浄し、1mlの培地中で感染後d5まで毎日新鮮な培地を交換しながら培養した。その後、5'-UTRのRT-PCRのためのRNA抽出のために細胞を溶解した。

【0074】

(実施例1:hADSCは生体内でHCVの標的となる)

20

臨床上、HCV感染の興味深い特徴は、HCV(+)患者が慢性的に感染した肝臓内に過剰な脂肪蓄積、すなわち脂肪肝を有し得^{4 6}、^{4 7}、脂肪肝の重症度が肝線維症の割合と相関するようである^{4 8}、という点である。また、最近の研究により、HCVのRNA複製は、飽和脂肪酸の利用可能性を高めることによって刺激され、多価不飽和脂肪酸または脂肪酸合成の阻害剤によって阻害される、ということが示されている^{4 9}、^{5 0}。これらの知見は、脂肪代謝がHCVの生活環において重要な役割を果たすことを示唆している。したがって本発明者らは、脂肪組織の細胞成分が生体内でのHCV感染に関与している可能性があるという仮説を立てた。

【0075】

30

本発明者らの仮説を試すために、本発明者ら、HCV感染またはHCV未感染の個体(表1)から皮下脂肪組織を採取し、HCVser遺伝子型1b(HCVser-1b)を陽性対照として使用してHCV特異的5'-UTR転写物のRT-PCRのためにRNAを抽出した。

【0076】

表1Aは皮下脂肪組織および肝臓組織のHCV(+)ドナー。いずれの患者も、肝細胞癌腫の外科的切除のために開腹術を受けた。脂肪組織[およそ(2~2.5cm)³]は手術創(開腹術)から採取し、肝臓組織は、切除した肝臓の(病变から離れた)非腫瘍部分から採取した。患者番号は、図1F中に示されているのと同じであった。

【0077】

40

表1BはHCV(-)肝臓組織のドナー。患者は、HBV関連または非B型もしくは非C型の肝細胞癌腫の犠牲者であり、肝切除術を受けた。

【0078】

【表1】

A.

患者番号	年齢(歳) / 性別	HCV遺伝子型	血清HCV負荷(複製物/mI)
1	48 / 男性	1 b	1. 6 x 10 ⁷
2	71 / 男性	1 b	3. 1 x 10 ⁶
3	56 / 女性	2 a	2. 9 x 10 ⁵
4	51 / 男性	1 a	5. 7 x 10 ⁶

10

注記：患者1～3の試料を図1 A～Eに用い、患者1～4の試料を図1 Fに用いた。患者4の試料の大きさは、要求されたものよりも小さかった〔およそ(0. 6～1. 3 cm)³]ため、この試料の単離された接着性SVF細胞は、長期培養実験(図1 F)にのみ使用した。

B.

20

患者番号	年齢(歳) / 性別	肝炎プロファイル
1	59 / 男性	HBV (+)、HCV (-)
2	66 / 男性	HBV (+)、HCV (-)
3	42 / 男性	HBV (-)、HCV (-)

注記：表1 Aおよび1 Bの肝炎ウイルス感染の診断は、肝細胞癌が診断された時点で行われ、抗ウイルス処置は組織採集後に行われた。

30

【0079】

興味深いことに、HCV(+)個体(遺伝子型1 bまたは2 aの患者番号1～3、表1)の脂肪組織は、HCV(-)個体のそれとは対照的に、ウイルス5' - UTR(223 bp、図1 A)を含有していた。血液からの汚染の可能性を排除し、ウイルス転写物を発現する細胞源を定義するために、本発明者らは、記載されているとおりに^{1 2}、^{1 3}、³遠心分離によって脂肪組織を、成熟脂肪細胞を含有する上部の浮遊層(浮遊物)と、中間部の緩衝液層と、底部の沈降細胞ペレットとに分画した(図5)。細胞ペレットを回収し、さらにRBC溶解緩衝液で処理して赤血球を溶解させて、間質血管細胞群(SVF)細胞を採集した。その後、浮遊物層およびRBC溶解SVF細胞から別々にRNAを抽出したが、緩衝液層からはRNAをほとんど抽出できなかった(データ示さず)。RT-PCRから、浮遊物層ではウイルス5' - UTRが全く検出されず、その一方でSVF細胞ではウイルス転写物が検出されたことが実証された(左パネル、図1 B)。

40

【0080】

本発明者らは次に、記載されているとおりに^{1 0}免疫磁気ビーズによってSVF細胞からのDLK-1⁺細胞の正の選択を行い、フローサイトメトリー分析により、正の選択をした細胞の>99.7%がDLK-1⁺を発現することを確認した(図6)。その後、RT-PCRのためにRNAをDLK-1⁺細胞およびDLK-1⁻細胞から別々に抽出したところ、ウイルス転写物はDLK-1⁺細胞に存在するがDLK-1⁻細胞には存在しないことが確認された(右図、図1 B)。本発明者らはまた、HCV(+)ヒト初代肝細胞

50

(P H H) から抽出した R N A を陽性対照として使用して、H C V 特異的マイナス鎖 R N A⁵¹ の R T - P C R を実施した。データは、H C V 複製中間体が、3人のH C V (+) ドナーの中でも D L K - 1⁺ 細胞には存在するが D L K - 1⁻ 細胞には存在しない、ということを裏付けた (375 b p ; 図 1 C)。また、マウス抗 H C V N S 5 抗体 (クローリン B G N / 1246 / 5 G 7) および (細胞核を識別するための) ヘマトキシリンを用いた免疫細胞化学のために、D L K - 1⁺ 細胞および D L K - 1⁻ 細胞を別々にサイトスピンスライド上にスピニンした。H C V (-) 個体から単離された細胞もまた比較のために染色した。5' - U T R の m R N A 発現と一致して、H C V (+) ドナーから単離された D L K - 1⁺ 細胞は N S 5 抗原 (茶色標識、パネル c、図 1 E) を発現したが、D L K - 1⁻ 細胞の N S 5 発現は、H C V の感染状況に拘らずバックグラウンドに近いものであった (パネル b および e)。アイソタイプ抗体 (マウス I g G 1) による H C V (+) または H C V (-) の未分画 S V F 細胞の染色を、対照として用いた (パネル a および d、図 1 E)。ヘマトキシリン染色 (青色標識) は、N S 5⁺ 細胞が細胞破片ではなく本物の有核細胞であることを裏付けた (パネル c、図 1 E)。抗 N S 5 抗体の特異性は、H C V (+) P H H の染色において検証された (図 7)。

【0081】

生体内での検証のために本発明者らは、H C V 感染および H C V 未感染の個体から採集した皮下脂肪組織に対して免疫組織学的研究を実施した。組織切片を最初に抗 D L K - 1 A b で染色した。P B S による浸漬および洗浄の後に、抗 N S 5 A b およびヘマトキシリンを使用して同じ切片に対して染色を行った。結果は、H C V 感染および H C V 未感染の両方の個体から採集された脂肪組織において、D L K - 1 が、マウス脂肪組織内⁵² の同様に記載されている位置で検出されたこと (赤色標識、白色矢印、それぞれパネル b および c ならびに h、図 1 E) を示した。さらに、N S 5⁺ 細胞は、H C V (+) 脂肪組織 (茶色標識、白色矢印、パネル e および f、図 1 E) では視覚化されたが、H C V (-) 試料 (パネル j) では視覚化されなかった。とりわけ、ウイルス N S 5 は H C V (+) 試料における D L K - 1 発現と共に局在化した (パネル b 対 e、および c 対 f、図 1 E； b および e ならびに c および g は別個のドナーからのものであり、図 8 も参照のこと)。H C V (+) 脂肪組織では、調べたいずれの切片においても、1つの高倍率視野 (400 X) 当たり約 0 ~ 4 個の D L K - 1⁺ N S 5⁺ 細胞が見つかった。

【0082】

H C V (+) 個体の h A D S C がウイルスを産生したか否かを判定するために本発明者らは、H C V (+) 患者から単離された D L K - 1⁺ 細胞を培養し、上清中のウイルス複製数を 7 日毎に定量した。興味深いことに、ウイルスの転写物は最初の 4 週間ではほとんど検出されなかつたが、d 28 ~ d 35 以降の上清で検出され始め、複製数は時間依存的に増加した (d 49まで；図 1 F)。さらに、長期培養した際のウイルス転写物の量は、細胞の単離されたそれぞれの患者の血清ウイルス力価と相関しているようであった (図 1 F および表 1)。

【0083】

まとめると、本発明者らのデータは、h A D S C が生体内で H C V の標的となるという証拠を提供する。

【0084】

(実施例 2：ナイーブ H C V (-) h A D S C は試験管内において H C V s e r 感染および複製に対して感受性である)

ナイーブ H C V (-) h A D S C が試験管内での H C V s e r 感染および複製に対して感受性であるか否かを調べるために、本発明者らは H C V (-) 個体由来の h A D S C を調製し、それらを培養下で継代した。(エッペンドルフチューブ内の) 懸濁液中の第 3 継代 (p - 3) または p - 4 の細胞を、最終体積を 1 ml として 0.2 m o i (すなわち、5 × 10⁵ 個の h A D S C 細胞に対して 1 × 10⁵ の 5' - U T R 複製数) の H C V s e r (表 2) と共にインキュベートした。

【0085】

10

20

30

40

50

表2は本研究で使用したHCV(+)血清のHCV遺伝子型および5'-UTR複製数である。いずれの患者も、HIVまたはB型肝炎ウイルスの感染の証拠を全く有していないかった。患者には急性感染症の徴候も全くなかった。血清を2011年9月～2014年2月に回収し、直ちに使用するか、または使用するまで-80°で保存した。患者番号1～5の血清は図2A～Dにおいて用い、残りは図2E～F、図3および図4において用いた。

【0086】

【表2】

患者番号	遺伝子型	5' - UTR複製数/m
1	1 b	176, 554
2	1 b	489, 226
3	1 b	125, 117
4	2 b	22, 338
5	2 b	269, 274
6	1 b	2, 204, 192
7	2 a	10, 235, 072
8	1 b	3, 416, 616
9	2 b	2, 113, 496
10	2 b	155, 064
11	1 b	408, 572
12	1 a	695, 868
13	1 b	3, 652, 720
14	1 a	582, 610
15	1 b	10, 169, 980
16	1 b	2, 603, 320
17	1 b	576, 728
18	2 a + 2 b	7, 357, 744
19	2 b	53, 428, 656
20	2 a	9, 266, 436
21	1 b	744, 228
22	1 b	60, 154, 272
23	1 b	335, 460
24	2 a	74, 090
25	1 a	9, 179, 112
26	2 a + 2 b	67, 012
27	2 b	1, 455, 144
28	2 a	632, 901
29	2 a	46, 793, 192

【0087】

3時間後、細胞を洗浄し、7日毎に培地交換しつつ培養するために6cmのペトリ皿に移し、上清および細胞溶解物を、RNA抽出のために7、14、21および28日目に採取した（図9のプロトコル）。HCV ser 感染性の対照として、非腫瘍肝臓組織から単離されたHCV(-)PHH（記載^{4,5}および表1のとおり）を、ウェル内に3日間接種培養して細胞を付着させ、次いで4日目に、HCV ser またはHCV(-)対照血清（

10

20

30

40

50

血液型 A B) と共に 3 時間インキュベートし、洗浄後、 P H H をさらに 5 日間培養してから、細胞 R N A 抽出を行った。結果は、 H C V s e r に曝露された P H H が実際にウイルス 5 ' U T R (「 + 」と標識、左、図 2 A) を発現した一方、 H C V (-) 対照血清に曝露された細胞 (「 - 」と標識) がそれを発現しなかったことを示した。

【 0 0 8 8 】

ウイルス転写物は、感染後の培養では d 7 上清または d 7 細胞溶解物のいずれにも検出できなかつたが、全ての実験において d 1 4 細胞溶解物中に、また 1 8 回のうち 1 0 回の実験において上清中に、検出可能となつた (右、図 2 A ; 8 人のドナーからの h A D S C を使用した全 1 8 回の実験、表 3) 。一方、 5 ' - U T R は、全ての実験の中でも d 2 1 と d 2 8 との両方の上清中ならびに細胞溶解液中に一貫して検出された (右、図 2 A) 。 10

【 0 0 8 9 】

本発明者らはまた、 H C V 特異的マイナス鎖 R N A を調べ、その結果は、 d 1 4 と d 2 8 との両方の H C V s e r - 1 b 感染 h A D S C が複製中間体を発現し、それが上清中には存在しないことを予想どおり裏付けた (図 2 B) 。 H C V 感染患者から単離された P H H を陽性対照として使用した。

【 0 0 9 0 】

さらに確認するために、感染 h A D S C を逐次免疫細胞化学研究のためにガラススライド上にスピニした。細胞を最初に抗 D L K - 1 抗体で染色し、続いて同じ切片に対して抗 N S 5 抗体およびヘマトキシリンで染色した。結果は、 D L K - 1 (パネル f) を発現したが N S 5 (パネル h) を発現しなかつた対照血清投与 h A D S C とは対照的に、 d 1 4 の H C V s e r - 1 b 感染 h A D S C が D L K - 1 (赤色標識、パネル b 、図 2 C) を実際に発現し、それらが R T - P C R の所見と一致して N S 5 (茶色標識、パネル d 、図 2 C) も発現したことを示した。アイソタイプ抗体であるウサギ I g G およびマウス I g G 1 (それぞれ抗 D L K - 1 および抗 N S 5 抗体の対照) による染色は、バックグラウンドの色を実証した (それぞれパネル a および c 、ならびに e および g) 。事実上全ての H C V s e r 感染 D L K - 1 + 細胞が N S 5 を発現した (パネル b 対 d) ことから、臨床分離物の感染に対する h A D S C の許容性は、細胞の (1 つ以上の) 部分集合に限定されるのではなく、一般化された特性であるようであった。 20

【 0 0 9 1 】

D 1 4 および d 2 1 の H C V s e r - h A D S C も透過型電子顕微鏡で研究した。 H C V (-) 対照血清に曝露された h A D S C (パネル a および d 、図 2 D) と比較して、直徑約 5 0 ~ 6 0 nm のウイルス粒子を h A D S C の外側 (挿入図中の白矢印、パネル b および e 、図 2 D) および内側 (挿入図中の白矢印、パネル c および f 、図 2 D) で可視化することができた。細胞の外側で同定されたウイルス粒子は、二重膜 (黄色矢印および、拡大した挿入図、パネル b) または電子的に密な膜構造体 (黄色矢印および、拡大した挿入図、パネル e) からなる膜小胞に包み込まれていた。対照的に、細胞内に見つかったウイルス粒子は、膜状の覆いを有さない自由形態 (黄色四角および、拡大した挿入図、パネル c ; 白矢印で示されたウイルス粒子) であるかまたは、多数の丸い同心円状の膜によって取り囲まれていた (「タマネギ形状」、黄色四角および、拡大した挿入図、パネル f ; 白矢印で示されたウイルス粒子) 。 40

【 0 0 9 2 】

懸濁液中で h A D S C を感染させることに加えて (図 2 、 A ~ D) 、本発明者らはまた、 6 cm のペトリ皿内に h A D S C を 1 日間接種培養することによって接着させた h A D S C を感染させ、その後、 0 . 5 m o i ($2 \times 1 0^5$ 個の h A D S C 細胞に対して $1 \times 1 0^5$ 個の 5 ' - U T R 複製物) の H C V s e r を 2 m l の終体積で 3 時間、細胞に投与した。穏やかに洗浄した後、 7 日毎に培地交換しつつ細胞を 5 m l の新鮮な培地中で培養した (図 1 0) 。上清および細胞溶解物の R N A を 7 、 1 4 、 2 1 および 2 8 日目に抽出し、 q R T - P C R に供した。結果は、 7 日目の細胞溶解物においてウイルス転写物は、上清中のそれらの非存在にも拘らず、一貫して検出可能であることを明らかにした (右パネルに対して左パネル、図 2 E) 。さらに、細胞溶解物中のウイルス複製物は、第 2 週 (左 50

パネル、図2E)に最も顕著に増加したが、上清での増加は、1週遅れて、つまり第3週に最も顕著であった(右パネル、図2E)。

【0093】

このシステムによって産生された全ウイルス複製物を測定するために、本発明者らは、培地交換なしでHCVser感染hADSCを連続的に培養し(図10)、表示の培養期間の終了時に上清を回収した。qRT-PCRは、28日間の培養後の総複製数が約 $3 \times 10^5 / ml$ となって第3週に最も実質的なウイルス放出(上清中)が起こることを裏付けた(図2F)。

【0094】

【表3】

10

ナイーブhADSCのドナーの特徴

ドナー	1	2	3	4	5	6	7	8
年齢(年)	40/	41/	52/	55/	49/	60/	36/	27/
/性別	女性	女性	女性	女性	女性	女性	男性	男性
疾患	乳房切除および乳房再建のための乳癌							
hADSCの起源	TRAM皮弁*から切除された脂肪組織							
	腹壁または臀部 /大腿部からの 脂肪吸引材料							

* TRAM皮弁：横軸型腹直筋皮弁

20

【0095】

(実施例3：hADSC産生ビリオンは、臨床分離物の生物学的特性を示す本物の「ビリオン」である)

hADSC産生ビリオン(「HCVadsc」と表示)の感染性を調べるために本発明者らは、「ドナー1」のp2のhADSCをHCVser-1bに感染させ、21日目に上清(「HCVadsc(1)」と表示)を回収した。0.22μmの細孔フィルタで濾過した後、HCVadsc(1)を使用して「ドナー2」のhADSCに感染させてHCVadsc(2)を作り、続いてそれを使用して「ドナー3」のhADSCに感染させた。結果は、HCVadscが、HCVserによる最初の感染に見られるように比較的一貫した複製効率で、様々なドナーのナイーブhADSCに対して感染性を有することを裏付けた(図3A)。最初にHCVser-1a、HCVser-2aおよびHCVser-2bに感染させたhADSCの上清に由来するHCVadscについても、同様の観察がなされた(データ示さず)。

30

【0096】

本発明者らは次に、HCVser-1bでp2、p6、p9およびp15のhADSCを感染させることによって様々な継代数でのhADSCの許容性を研究し、21日間の連続培養後にウイルス複製物を測定した。結果は、p2およびp6の細胞とは対照的にp9およびp15のhADSCが上清中と細胞溶解物中との両方において非常に低いレベルのウイルス転写物を有することを示した(それぞれ左パネルおよび右パネル、図3B)。HCVser-1aおよびHCVser-2aによる感染についても同様の観察がなされた(図11)。ナイーブ[HCV(-)]hADSCのDLK-1発現を定義する実験において本発明者らは、DLK-1発現が、HCV感染の許容性について言及されている類似の傾向に追従してp0からp6までは検出可能であったがしかしp9では減少し、p15では検出不能であったことを見出した(図3C)。

40

【0097】

50

しかも、hADSCは遺伝子型1または2の感染を好まないようである（図3Bおよび図11）。これをさらに調べるために本発明者らは、p5のhADSCに混合遺伝子型2a+2bのHCVserを感染させ、RT-PCRのために細胞を回収して、遺伝子型特異的なコア抗原をコードするmRNAを検出した。実際には、混合型2a+2bのHCVser自体は（陽性対照として）、遺伝子型2aと2bとの両方のコア抗原をコードするmRNA（174bpおよび123bp、レーン「P」、それぞれ左パネルおよび右パネル；図3D）を発現したが、それは、遺伝子型2a+2b感染hADSCのd21およびd56の細胞溶解物中にも検出された。この実験では、HCV（-）対照血清を投与した細胞を陰性対照（「N」と標識）として使用した。したがって、臨床分離物による感染に対するhADSCの許容性は、少なくとも遺伝子型1a、1b、2aおよび2bについて遺伝子型交差性である。

【0098】

テトラスパニンCD81、LDL-R、SR-B1、上皮成長因子受容体（EGFR）、アポリボタンパク質（APOE）、オクルデイン、クローディン-1、ニーマンピックC1様1（NPC1L1）コレステロール吸収受容体およびジアシルグリセロールアセチルトランスフェラーゼ1（DGAT-1）を含めた宿主因子は、ウイルス付着または付着後の段階のいずれかで、ヒト肝細胞または肝細胞腫細胞株におけるHCV感染／複製を媒介することが示されている^{15、16、19、53～58}。本発明者らは、hADSCにおけるこれらの分子の発現をフローサイトメトリーまたはRT-PCRによって調べた。

【0099】

フローサイトメトリーにより、p0（すなわち接着性SVF細胞）、p2およびp6のhADSCがCD81、LDL-R、SR-B1およびEGFRを明瞭に発現することが明らかになった（図3E）。RT-PCRも、オクルデイン（OCLN）、クローディン-1（CLDN1）およびNPC1L1をコードするmRNAは発現されるがmIR-122は発現されないことを裏付けた（図3F左）。対照的に、mIR-122は、Hu h7.5肝細胞腫細胞において豊富に（hADSCより約60倍高く）発現され、PHHではよりいっそう豊富であった（約2000倍高い；図3F右）。

【0100】

これらの分子の役割を判定するために本発明者らは、HCVser-1bの投与の前にp2のhADSCを1時間、CD81（クローンJS-81）、LDL-R（クローンC7）もしくはEGFR（クローンLA-1）に対するモノクローナルAbまたはSR-B1に対するポリクローナルAbの段階用量で前処理した。APOE遮断のために様々な濃度の抗APOE抗体（クローンE6D10）を、感染に使用する前に、記載されているとおりに¹⁴HCV（+）血清に室温で1時間添加した。21日目の上清中のウイルス転写物の定量から、HCV（+）血清におけるCD81、LDL-R、SR-B1、EGFRの遮断およびAPOEの中和は用量依存的にウイルス複製の量を有意に減少させたことが示され、その一方で、処理自体は細胞生存率に有意な影響を与えたかった（図3G）。細胞溶解物のウイルス複製物の同様の用量応答減少もまた認められた（図12）。

【0101】

本発明者らはまた、p2のhADSCを、HCVser-1bによる感染の前に、オクルデインまたはクローディン-1に特異的なsiRNAでトランスクレプトするか、または記載されているとおりに^{15、16}NPC1L1についての別個の実験においてトランスクレプトした。本発明者らはまた、脂質滴へのHCVヌクレオカプシドコアの輸送に必要な、肝細胞腫細胞株におけるHCV産生にとって重要な¹⁹分子であるDGAT-1の役割を調べた。RT-PCRはmRNAノックダウン（図13）の効果を裏付けたが、次いでそれは、21日間の培養後に上清中（図3H）および細胞溶解物中（図13）のウイルス複製物を減少させた。

【0102】

最後に本発明者らは、抗ウイルス薬の阻害効果を調べた。p4～5の細胞をウェルに接種培養し、HCVser-1bに曝露し、リバビリン、テラプレビルまたはシクロスボリ

10

20

30

40

50

ンA（シクロフィリンA阻害剤）を含む段階濃度の抗ウイルス薬を培地に添加した。IFN処理に関しては、hADSCを16時間、表示用量のIFNで前処理し、その後、HCVserと共にインキュベートした。その後、21日目の細胞溶解物中のウイルス転写物を、ビヒクル対照で処理した細胞と比較した画分阻害として測定および計算した。結果は、HCV複製がリバビリン、テラプレビル、シクロスボリンAおよびIFNによって用量応答的に阻害されることを実証した（図3I）。p0、p2およびp6のhADSCにおけるシクロフィリンAの発現は、本発明者らの予備実験において確認された（図14）。したがって、HCVadscは、臨床分離物の生物学的特性を示す本物の「ビリオン」である。

【0103】

10

（実施例4：hADSCは、完全なHCV複製を可能にする生体内HCV保有宿主である）

HCVadscの物理的特性を評価するために本発明者らは、HCVser、HCVccおよびHCVadscの浮遊密度プロファイルを、記載されているとおりに⁴³平衡遠心分離によって比較した。研究したいずれのウイルスも、遺伝子型2aに由来するものであった。以前の報告^{43, 59, 60}と一致して、HCVserはより低い密度1.039（画分2）および1.080（画分7）の画分に大量のRNAを有していたが、HCVccの場合は1.132にピークがあった（画分13；図4A）。HCVadscでのRNAの最高量は密度1.080（画分7）で認められ、続いてより高い密度1.124および1.156（画分12および15）に2つのピークが認められた。興味深いことに、HCVadscの1.080のピークはHCVserのピークと同一であった（図4A）。したがって、HCVadscの物理的性質はHCVccよりもむしろ臨床分離物に類似している。

20

【0104】

本発明者らはまた、HDL、VLDL/LDL、ならびにapoEおよびapoBを含む各主要画分の脂質およびアポリポタンパク質（apo）のプロファイルを決定した。HCVserはHCVccおよびHCVadscと比較して最も高い総脂質量を有するようであった（図15）が、それは、ウイルス増殖の微小環境が異なっていた（血清対培地）ため、予期しないものではなかった。さらに、ウイルス複製物1つ当たりの重量（ng）として表すと、HCVcc画分13はHDLおよびLDL/VLDL含有量が最も低かった（図4B）。また、HCVserの主要分画はapoE含有量が（pg/複製物換算で）最も高く、続いてHCVadscおよびHCVcc画分13は検出可能なapoEレベルをほとんど有していないかった（図4C）。このように、HCVadscは、ウイルス粒子関連脂質含量においてもHCVserとの類似性をHCVccよりも高く示す。興味深いことに、apoBはHCVadscのいずれの画分にも検出されず、apoEとは対照的にapoBがhADSCにおける感染に必要でない可能性があることを示唆していた（図3G）。

30

【0105】

40

本発明者らはまた、HCVserに加えてJFH1/HCVccのウイルス接種物にp2のhADSCを感染させることにより、hADSCに対する様々なウイルスの感染性を比較した。対照として、Huuh7.5細胞におけるHCVcc複製を並行して実施した。本発明者らは、Huuh7.5細胞におけるHCVccの効率的な複製（図16）とは対照的にHCVcc感染hADSCが、14日間または21日間の培養後に上清または細胞溶解物のいずれにおいても5'-UTR転写物をほとんど産生せず（図4D）、hADSCのHCVser感染が以前と同様の複製動態を呈した（図4D対3A）ことを見出した。ナイーブHuuh7.5およびHCVcc感染Huuh7.5細胞の21日目の上清ならびに、HCVcc感染またはHCVser感染のhADSCの上清を、RNA抽出のために回収し、RT-PCRに供した。結果は、Huuh7.5のHCVcc感染およびhADSCのHCVser感染（それぞれレーン2およびレーン4、図4E）とは対照的に、HCVcc感染hADSC上清にはウイルス転写物が全く検出されなかつたことを裏付けた（レ

50

ーン3、図4E)。

【0106】

次に本発明者らは、ナイーブPHHに対するHCVadscの感染性を調べた。記載されているとおりに^{4 5} PHHをHCV(-)個体から単離し、3日間培養(1×10⁴細胞/皿)して細胞を付着させ、その後、HCVser-1b感染hADCS培養物の21日目の上清から調製したHCVadscに曝露した。感染5日後に細胞RNAをRT-PCRのために抽出した。結果は、対照血清投与hADSCの上清による感染(陰性対照としてのもの、レーン「1」、図4F)とは対照的に、HCVadsc感染PHHが実際にウイルス5'-UTR('2'および'3'と標識、図4F)を発現したことを示した。

【0107】

最後に、異なる3人のドナーからのPHHを準備し、上記のようにウェルに播種した。4日目に、(異なる3人の個体からの)HCV(-)対照血清、(別個の3人のドナーからの)HCVser-1bおよびそれに対応するHCVadscに細胞を感染させた。HCVserおよび対応するHCVadscを対にして、同じバッチのPHHに感染させた。上清を感染5日後に回収し、5'-UTR複製物を定量した。HCV(-)対照血清へのPHHの曝露を陰性対照として用いた。結果は、臨床分離物によるPHH感染において以前に報告されているとおりに^{6 1} HCVserの感染が変動性の高い複製動態をもたらすことを示した。HCVadscによる感染も、ウイルス力値の上昇をもたらし、それはHCVser感染の場合と同様に変動性が高かった(図4G)。これらの所見は、肝細胞に対するHCVadscの感染性を裏付けた。

【0108】

要約すると、hADSCは、完全なHCV複製を可能にする生体内HCV保有宿主であり、以前には認識されていなかった臨床的なHCV-宿主相互作用の場所を意味する。その上、hADSCは、臨床HCV単離物の試験管内増殖を可能にする初めての非肝臓初代細胞種であり、それは、HCVの生活環を読み解くための新規ツールとなり得、抗ウイルス戦略の開発を促進し得る。

【0109】

本明細書中で言及されている全ての刊行物および特許は、参照によって本明細書中に組み込まれる。本発明の範囲および精神から逸脱することなく、記載された本発明の方法およびシステムの様々な改変および変形が当業者にとって明らかであろう。特定の好ましい実施形態に関連して本発明を記載してきたが、特許請求の範囲に記載の本発明は必要以上にそのような特定の実施形態に限定されるべきではないことを理解されたい。実際に、細胞培養、分子生物学、生化学または関連分野の当業者に明らかな本発明を実施するための記載された態様の様々な改変は、添付の特許請求の範囲内にあることが意図されている。

【0110】

(参考文献)

1. Lindenbach, B. D. および Rice, C. M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436, 933-938 (2005).
2. Scheel, T. K. および Rice, C. M. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nature Medicine* 19, 837-849 (2013).
3. Blackard, J. T., Kemmer, N. および Sherman, K. E. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology* 44, 15-22 (2006).
4. Laporte, J. および Differential distribution and internal translation efficiency of h

10

20

30

40

50

- hepatitis C virus quasispecies present in dendritic and liver cells. *Blood* 101、52-57 (2003).
5. Wilkinson, J., Radkowsky, M. および Laskus, T. H. Hepatitis C virus neuroinvasion: identification of infected cells. *Journal of virology* 83、1312-1319 (2009).
6. Letendre, S. および Pathogenesis of hepatitis C virus coinfection in the brains of patients infected with HIV. *J Infect Dis* 196、361-370 (2007).
7. Lohmann, V. および Bartenschlager, R. On the history of hepatitis C virus cell culture systems. *Journal of medicinal chemistry* 57、1627-1642 (2014).
8. Yang, D. および Complete replication of hepatitis B virus and hepatitis C virus in a newly developed hepatoma cell line. *Proc Natl Acad Sci* 米国 111、E1264-1273 (2014).
9. Bunnell, B.A., Flaat, M., Gagliardi, C., Patel, B. および Ripoll, C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45、115-120 (2008).
10. Oertel, M. および Purification of fetal liver stem/progenitor cells containing all the repopulation potential for normal adult rat liver. *Gastroenterology* 134、823-832 (2008).
11. Abdallah, B.M. および Regulation of human skeletal stem cells differentiation by DLK 1/Pref-1. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19、841-852 (2004).
12. Yoshimura, K. および Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 208、64-76 (2006).
13. Lin, S.D., Wang, K.H. および Kao, A.P. Engineered adipose tissue of predefined shape and dimensions from human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 14、571-581 (2008).
14. Jammart, B. および Very-low-density lipoprotein (VLDL)-producing and hepatitis C virus-replicating HepG2 cells secrete no more lipoviroparticles than VLDL-deficient HuH7.5 cells. *Journal of virology* 87、5065-5080 (2013).

15. Owen, D. M., Huang, H., Ye, J. および Gale, M., Jr. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* 394, 99-108 (2009).
16. Sainz, B., Jr. ら Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nature Medicine* 18, 281-285 (2012). 10
17. Dorner, M. ら A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 474, 208-211 (2011).
18. Krapivner, S. ら DGAT1 participates in the effect of HNF4A on hepatic secretion of triglyceride-rich lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 962-967 (2010)。
19. Herker, E. ら Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nature Medicine* 16, 1295-1298 (2010). 20
20. Kaul, A. ら Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog* 5, e1000546 (2009).
21. Smas, C. M. および Sul, H. S. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 73, 725-734 (1993). 30
22. Lee, K. ら Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *The Journal of clinical investigation* 111, 453-461 (2003).
23. Gesta, S., Tseng, Y. H. および Kahn, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131, 242-256 (2007).
24. Wang, Y. および Sul, H. S. Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9. *Cell Metab* 9, 287-302 (2009). 40
25. Gimble, J. M., Katz, A. J. および Bunnell, B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research* 100, 1249-1260 (2007).
26. Mizuno, H., Tobita, M. および Uysal, A. C. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative me 50

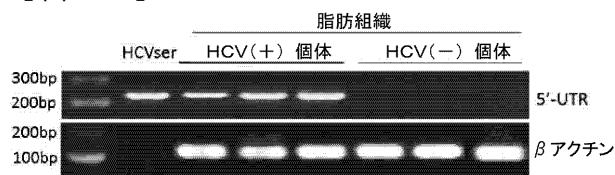
- dicine. Stem Cells 30、804 - 810 (2012)。
27. Parsons, C. H., Szomju, B. および Kedes, D. H. Susceptibility of human fetal mesenchymal stem cells to Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. Blood 104、2736 - 2738 (2004)。
28. Avanzi, S. および Susceptibility of human placenta derived mesenchymal stromal/stem cells to human herpesviruses infection. PLoS one 8、e71412 (2013)。
29. Soland, M. A. および Perivascular stromal cells as a potential reservoir of human cytomegalovirus. American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 14、820 - 830 (2014)。 10
30. Khatri, M. および Saif, Y. M. Influenza virus infects bone marrow mesenchymal stromal cells in vitro: implications for bone marrow transplantation. Cell transplantation 22、461 - 468 (2013)。 20
31. Gibellini, D. および HIV-1 and recombinant gp120 affect the survival and differentiation of human vessel wall-derived mesenchymal stem cells. Retrovirology 8、40 (2011)。
32. Ma, R. および Hepatitis B virus infection and replication in human bone marrow mesenchymal stem cells. Virology journal 8、486 (2011)。 30
33. Rodbell, M. Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects of phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. J Biol Chem 241、130 - 139 (1966)。
34. Eto, H. および Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. Plast Reconstr Surg 124、1087 - 1097 (2009)。 40
35. Bukh, J., Purcell, R. H. および Miller, R. H. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. Proc Natl Acad Sci 米国 89、187 - 191 (1992)。
36. Shimizu, Y. K., Feinstone, S. M., Kohara, M., Purcell, R. H. および Yoshikura, H. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. Hepatology 23、205 - 209 (1996)。 50

37. Okamoto, H. ら Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 73(Pt 3), 673-679 (1992).
38. Toniutto, P. ら Discordant results from hepatitis C virus genotyping by procedures based on amplification of different genomic regions. *J Clin Microbiol* 34, 2382-2385 (1996). 10
39. Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. および Sarnow, P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* 309, 1577-1581 (2005).
40. Al-Sadi, R. ら Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, G1054-1064 (2011). 20
41. Jiang, J. ら Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate. *Journal of virology* 86, 7256-7267 (2012).
42. Kato, T. ら Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nature protocols* 1, 2334-2339 (2006).
43. Lindenbach, B. D. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309, 623-626 (2005). 30
44. Lindenbach, B. D. ら Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci 米国* 103, 3805-3809 (2006).
45. Bhogal, R. H. ら Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience. *PloS one* 6, e18222 (2011).
46. Clark, J. M., Brancati, F. L. および Diehl, A. M. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 122, 1649-1657 (2002). 40
47. Negro, F. Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. *World journal of gastroenterology: WJG* 12, 6756-6765 (2006).
48. Adinolfi, L. E. ら Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* 33, 1358-1364 (2001). 50

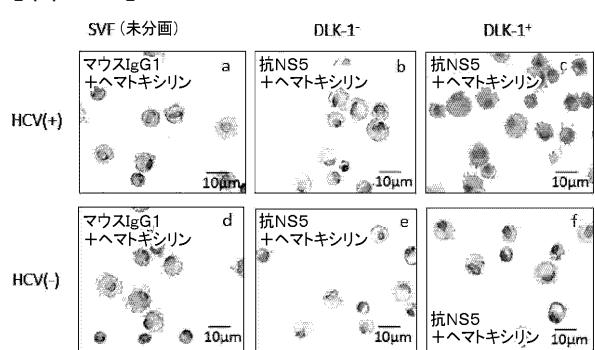
49. Kapadia, S. B. および Chisari, F. V. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci* 米国 102、2561 - 2566 (2005).
50. Mankouri, J. および Enhanced hepatitis C virus genome replication and lipid accumulation mediated by inhibition of AMP-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci* 米国 107、11549 - 11554 (2010). 10
51. Royer, C. および A study of susceptibility of primary human Kupffer cells to hepatitis C virus. *Journal of hepatology* 38、250 - 256 (2003).
52. Olson, L. E. および Soriano, P. Dev PDGFR beta signaling regulates mural cell plasticity and inhibits fat development. *Dev Cell* 20、815 - 826 (2011).
53. Pileri, P. および Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282、938 - 941 (1998). 20
54. Molina, S. および Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *Journal of virology* 82、569 - 574 (2008).
55. Ploss, A. および Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457、882 - 886 (2009).
56. Evans, M. J. および Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446、801 - 805 (2007). 30
57. Liu, S. および Human apolipoprotein E peptides inhibit hepatitis C virus entry by blocking virus binding. *Hepatology* 56、484 - 491 (2012).
58. Lupberger, J. および EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nature medicine* 17、589 - 595 (2011).
59. Kanto, T. および Buoyant density of hepatitis C virus recovered from infected hosts: two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation. *Hepatology* 19、296 - 302 (1994). 40
60. Bartenschlager, R., Frese, M. および Pietschmann, T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv. Virus Res.* 63、71 - 180 (2004).
61. Gondeau, C. および In vitro infection of pri 50

many human hepatocytes by HCV-positive sera: insights on a highly relevant model. Gut (2013).

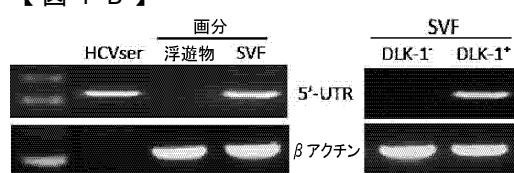
【図1A】



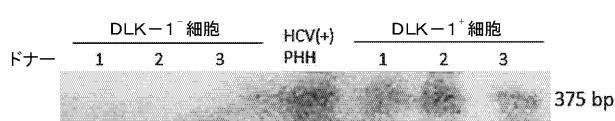
【図1D】



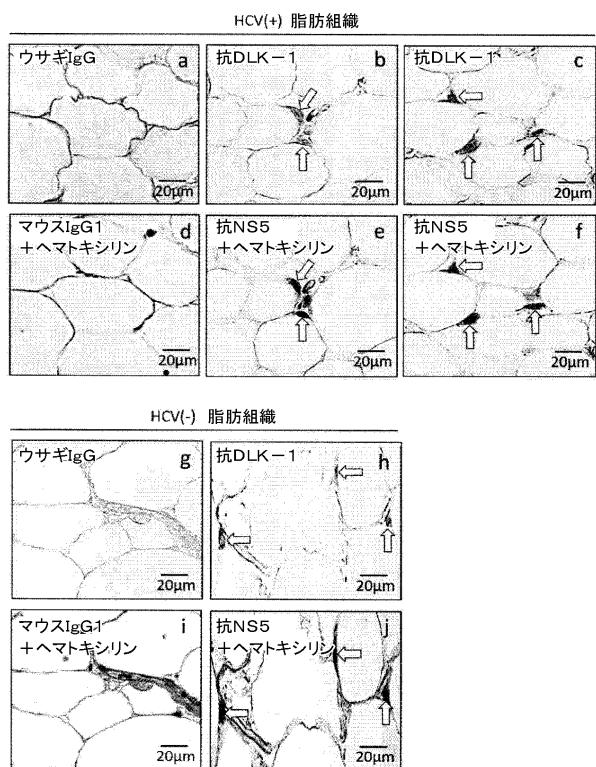
【図1B】



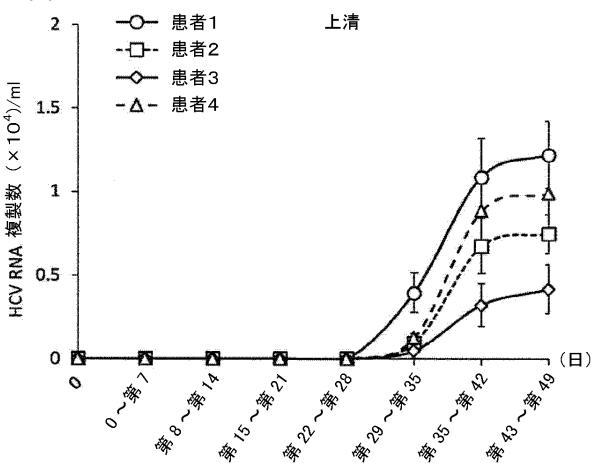
【図1C】



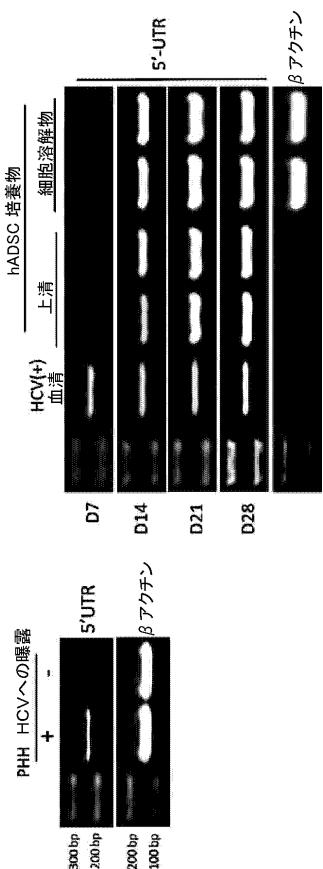
【図1E】



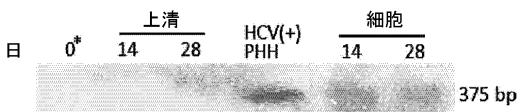
【図1F】



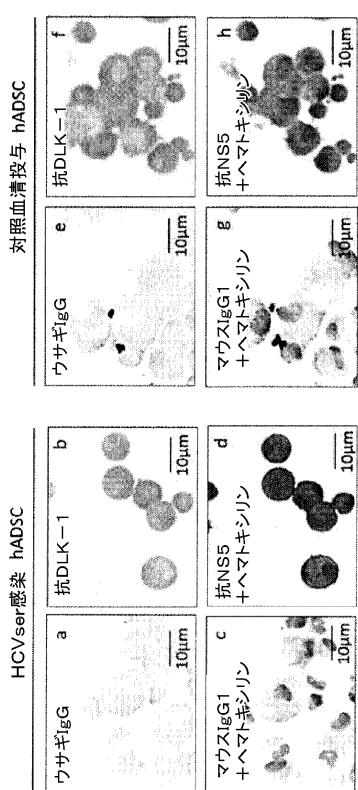
【図2A】



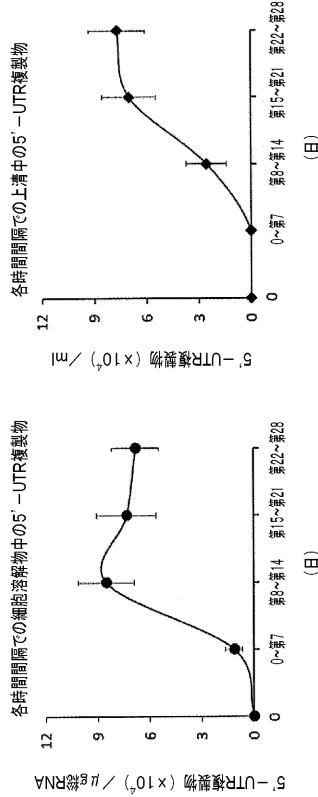
【図2B】



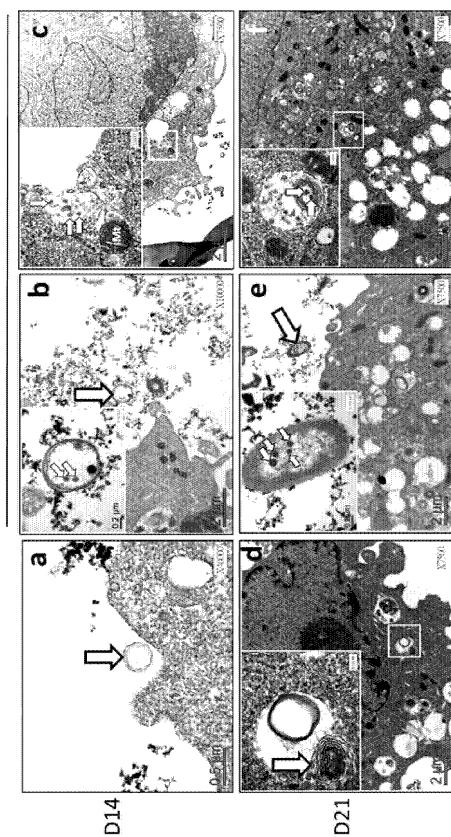
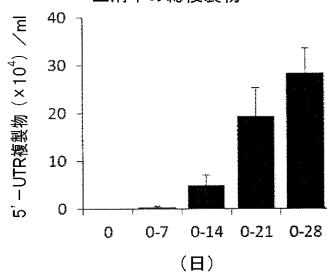
【図2C】



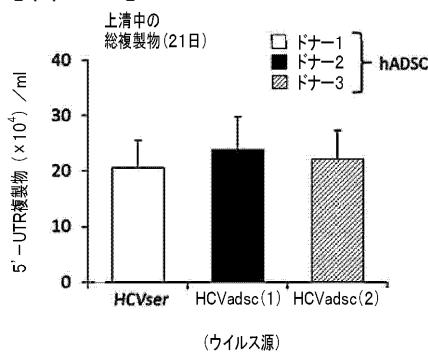
【図2E】



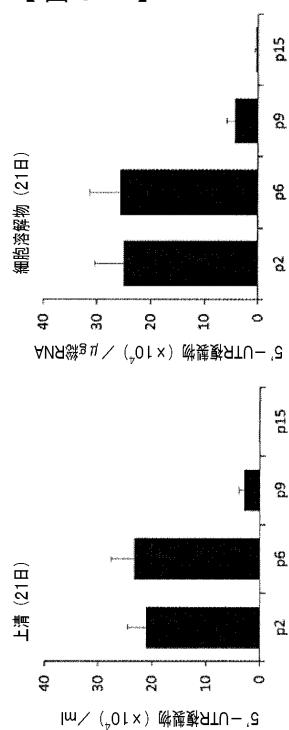
【図2D】

【図2F】
上清中の総複製物

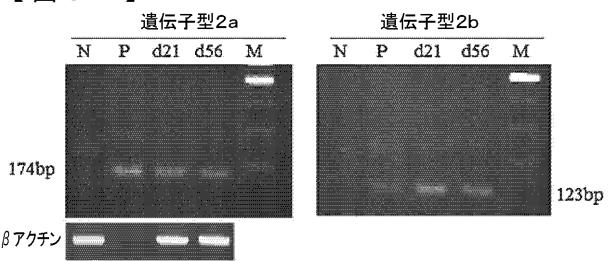
【図3A】



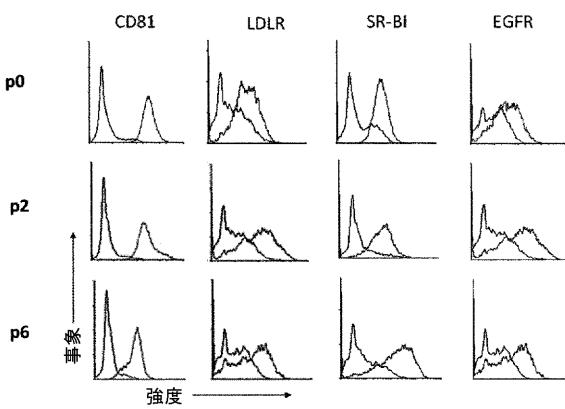
【図3B】



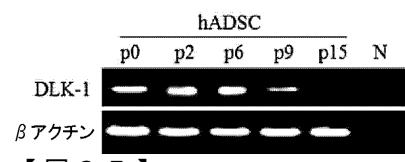
【図3D】



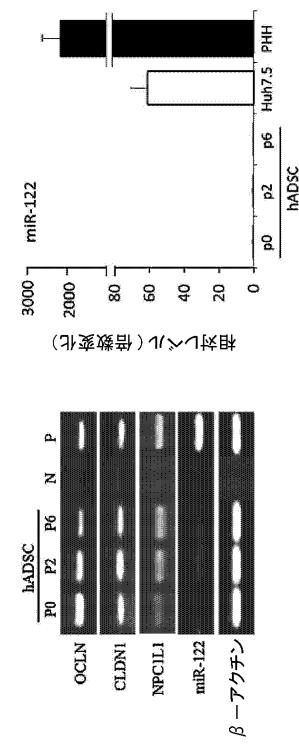
【図3E】



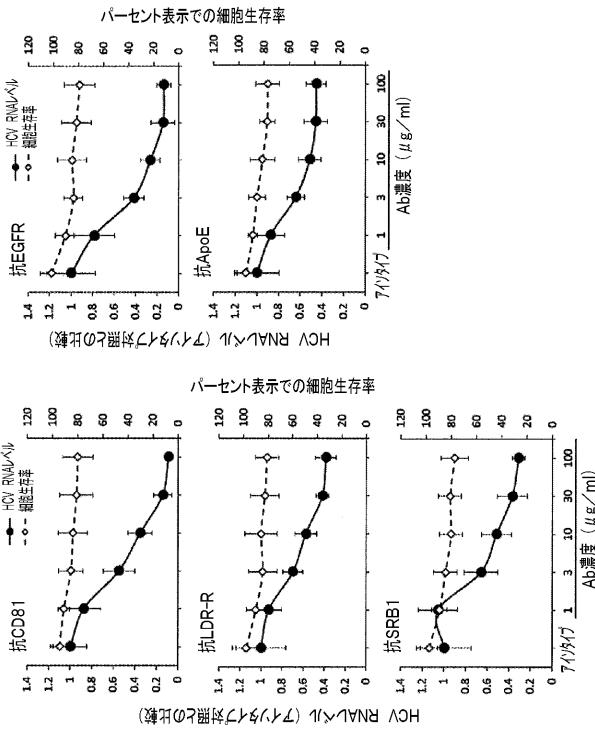
【図3C】



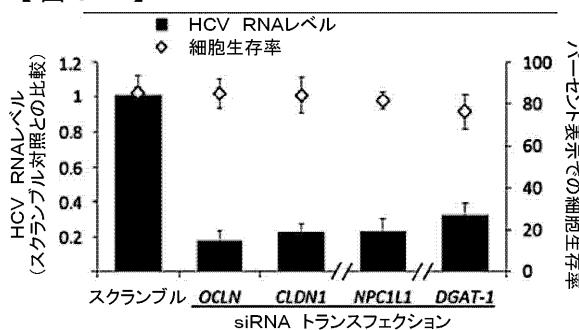
【図3F】



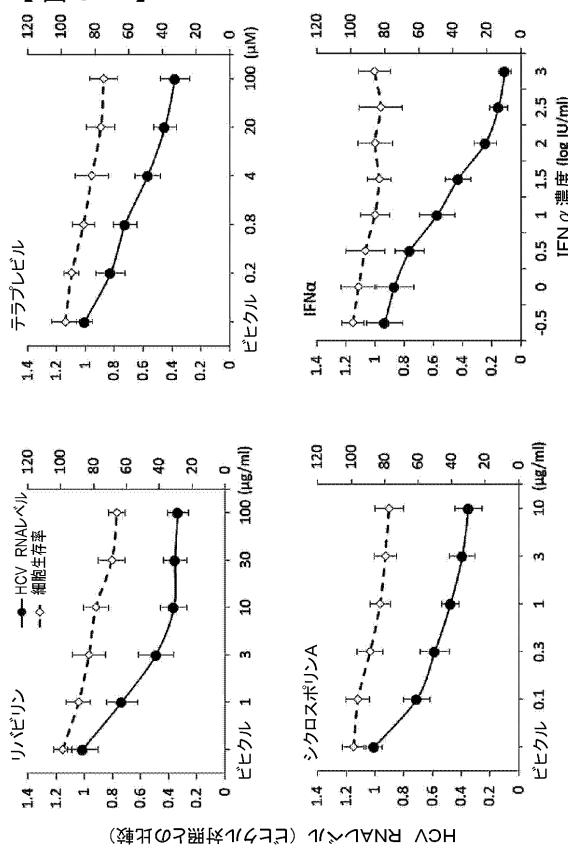
【図3G】



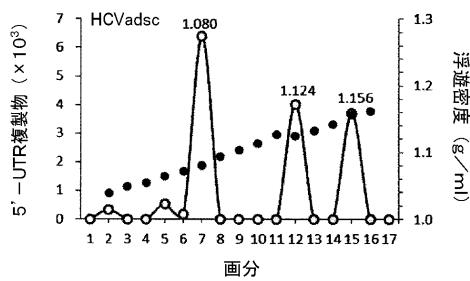
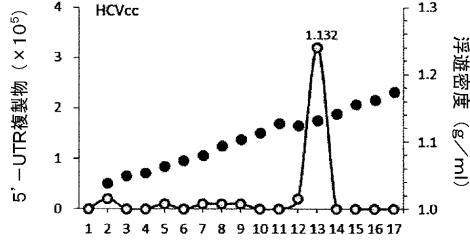
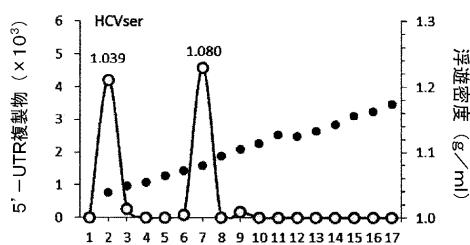
【図3 H】



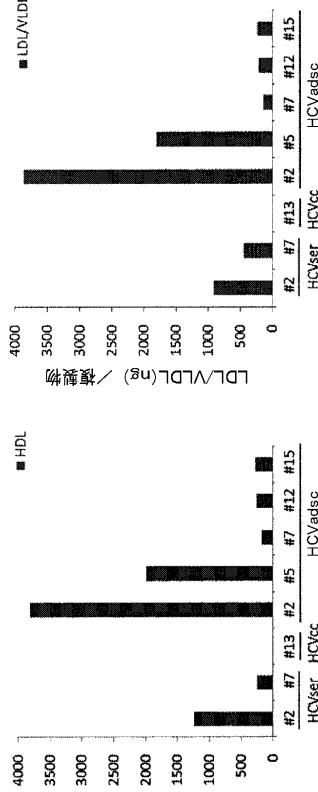
【図3 I】



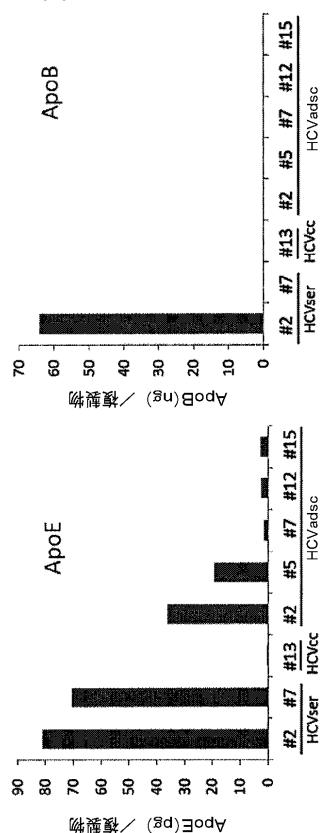
【図4 A】



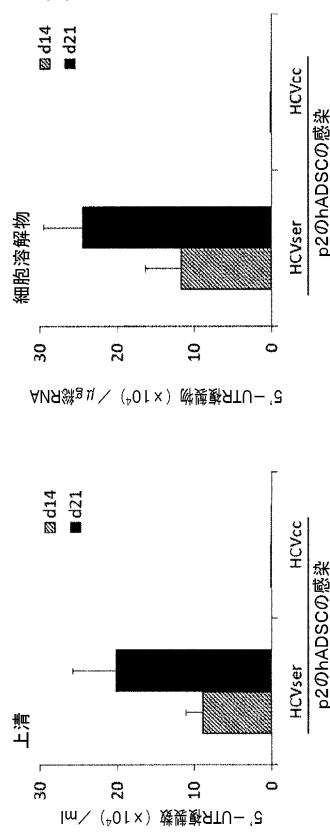
【図4 B】



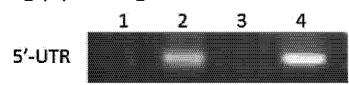
【図4 C】



【図4 D】

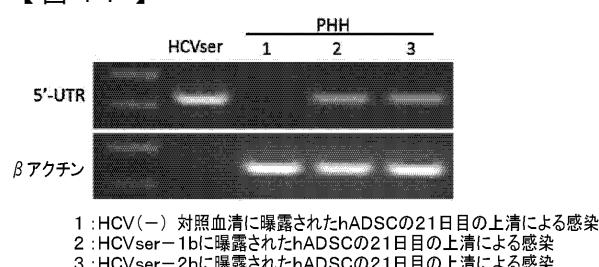


【図4 E】

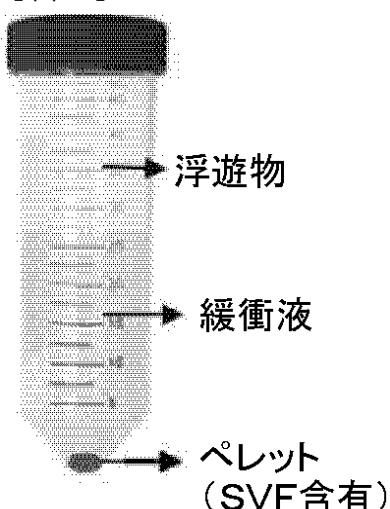


1. ナイーブHu7. 5培養上清
2. HCVcc感染Hu7. 5培養上清
3. HCVcc感染hADSCの21日目の上清
4. HCVser感染hADSCの21日目の上清

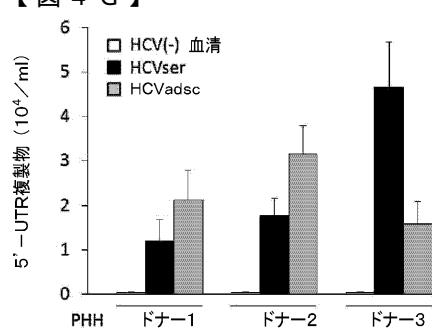
【図4 F】



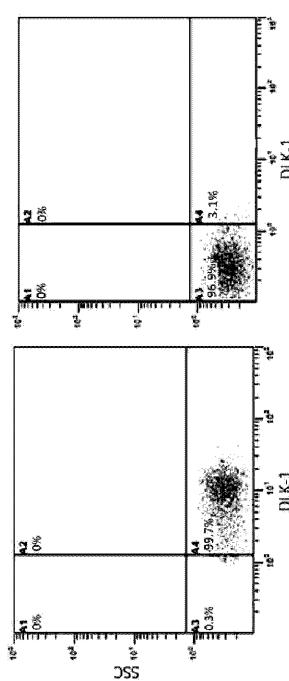
【図5】



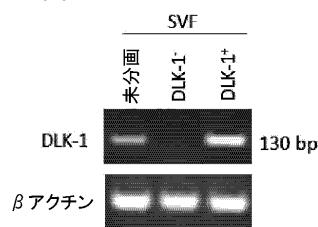
【図4 G】



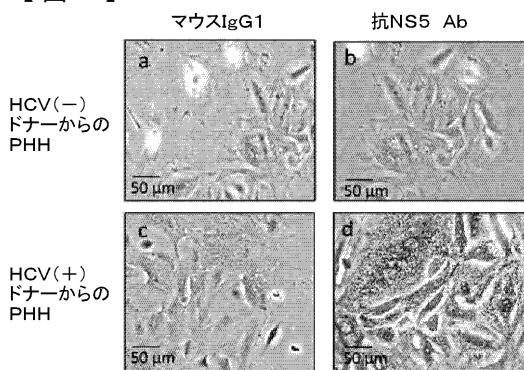
【図 6 A】



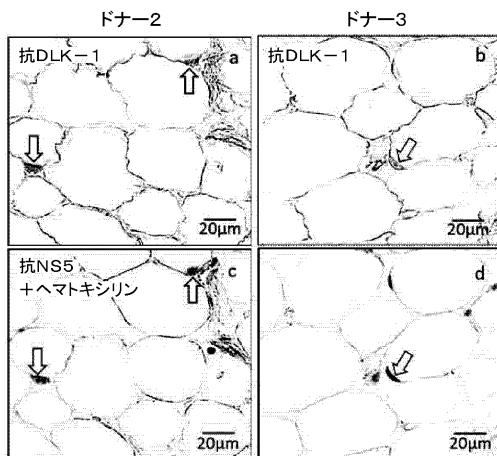
【図 6 B】



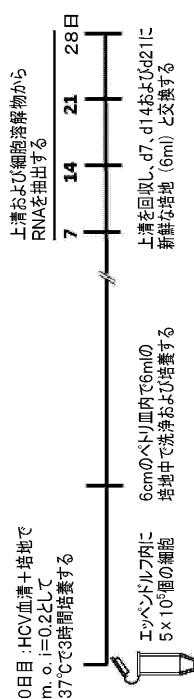
【図 7】



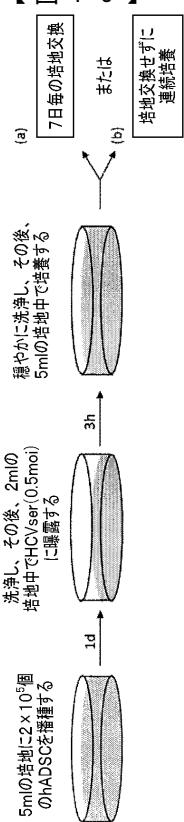
【図 8】



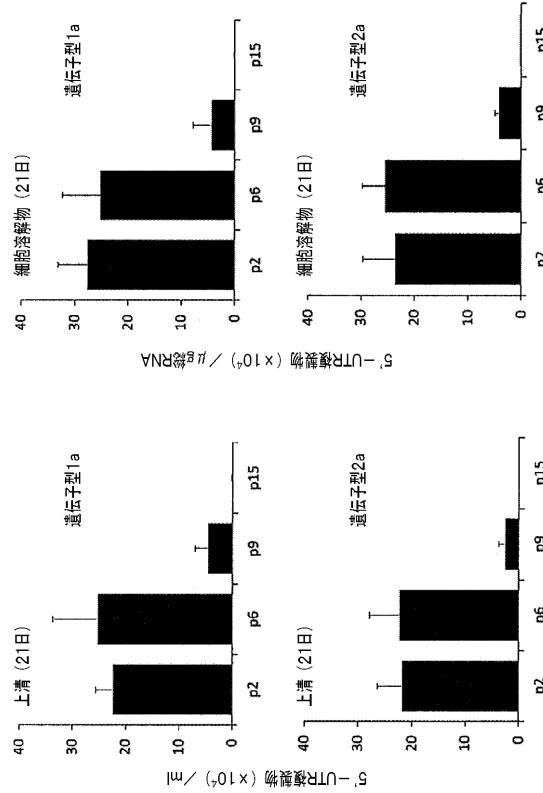
【図 9】



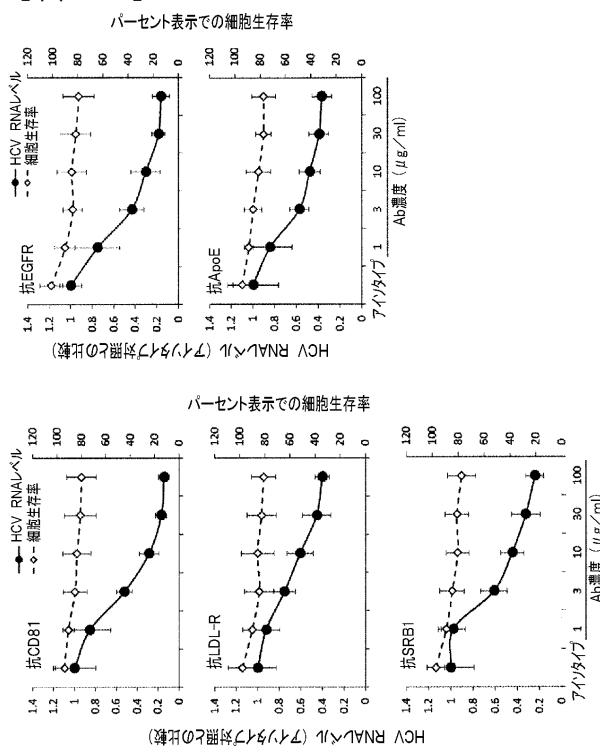
【 図 1 0 】



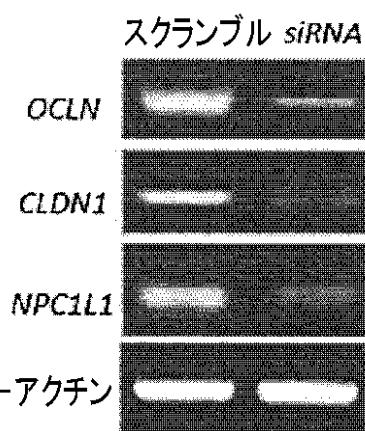
【 図 1 1 】



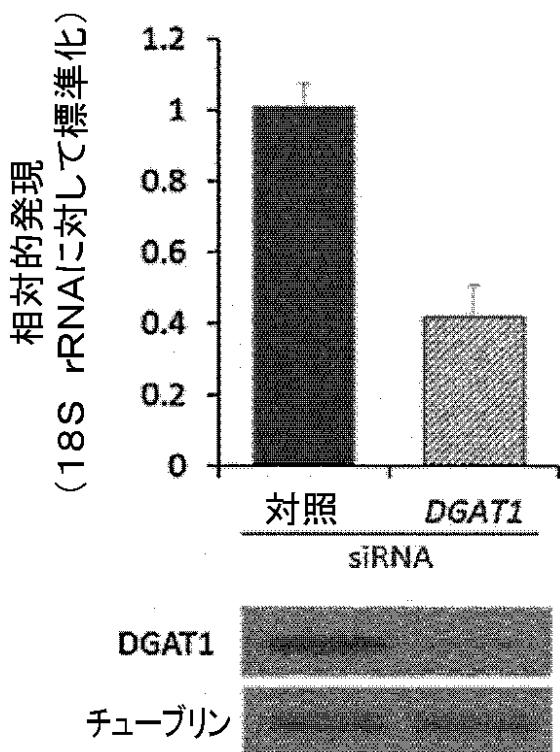
【 図 1 2 】



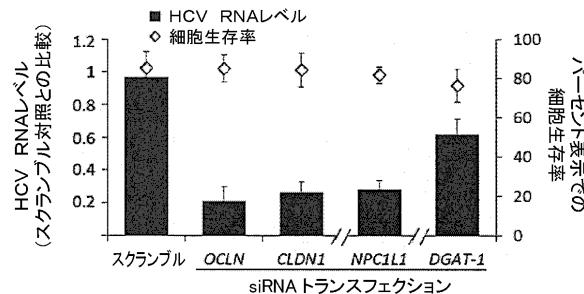
【図13A】



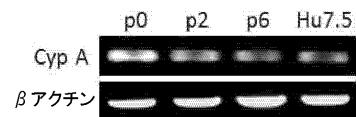
【図 1 3 B】



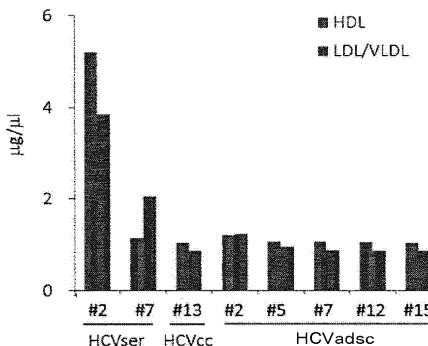
【図 1 3 C】



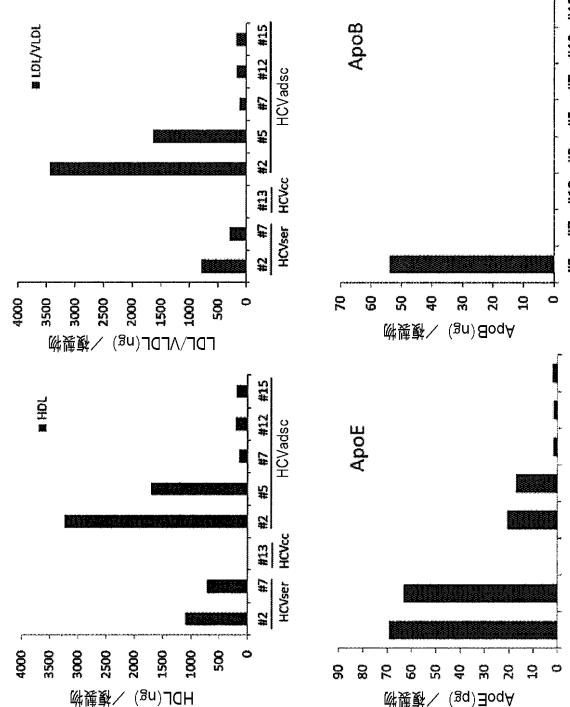
【図 1 4】



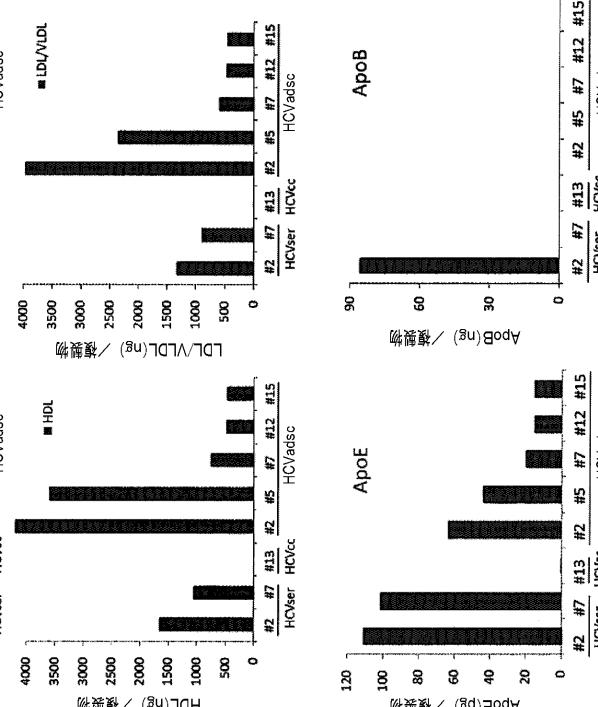
【図 1 5 A】



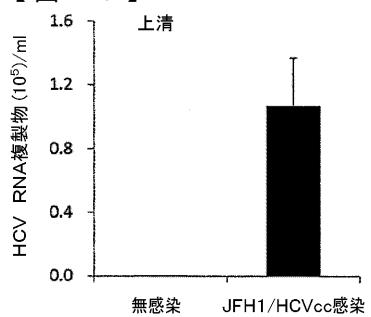
【図 1 5 B】



【図 1 5 C】



【図16】



フロントページの続き

(72)発明者 リン チエン ロン

台湾 804 カオシュン グ-サン ディストリクト メイ-ス イースト フォース ロード
386 7エフ

審査官 高山 敏充

(56)参考文献 特開2009-153383(JP,A)

Human adipose-derived stem cells support complete replication of serum-borne HCV, [醫
學研究所]學位論文, 2013年10月 3日, [retrieved on 2018-10-17], URL, <http://ir.kmu.edu.tw/handle/310902000/35787>
PLOS ONE, 2014年, Volume 9, Issue 5, e91958

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)