

20031400

厚生労働科学研究費補助金

がん予防等健康科学総合研究事業

ウイルスを標的とした発がん予防に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉倉 廣

平成16(2004)年4月

## 目次

### I. 総括研究報告

- ウイルスを標的とした発がん予防に関する研究 ----- 1  
吉倉 廣

### II. 分担研究報告

1. ヒトパピローマウイルスによる子宮頸がん発症機構の解明と感染予防に関する研究  
神田 忠仁 ----- 9
2. 5' side subgenomic HCV-RNA の生物学的意義 ----- 13  
清水 洋子
3. C型肝炎ウイルスの翻訳調節機構の解析 ----- 15  
宮村 達男
4. C型肝炎ウイルスの複製と肝発がん ----- 21  
加藤 宣之
5. 肝疾患におよぼす HCV タンパク質の機能解析 ----- 29  
下遠野 邦忠
6. C型肝炎におけるIFN治療の CTL 応答への影響と新たな CTL エピトープの同定  
井廻 道夫 ----- 33
7. HCV core 蛋白の CDK 活性化キナーゼ(CAK)結合活性とその細胞生物学的意義  
林 紀夫 ----- 35
8. 初回献血者におけるウイルスマーカー陽性率 ----- 37  
2003年の輸血感染症報告 ----- 48  
内田 茂治

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 53

### III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 57

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）

総括研究報告書

ウイルスを標的とした発がん予防に関する研究

主任研究者 吉倉 廣 国立感染症研究所 所長

研究要旨

複数の HPV 型に対する中和抗体エピトープが L2 蛋白のアミノ酸 108-120 に存在することを発見し、これを組み込んだ L1 蛋白を作成し偽粒子を作成すると、当該粒子はマウスに効率良く抗 L2 抗体を誘導した。これは、実用的な子宮がん予防ワクチンの候補となり得る。

HCV ゲノムの 5' 末には、ウイルス複製及び翻訳を抑制する塩基配列がある事が分かった。特に、5' 末の A-rich region で転写が止まり、400nt の短い RNA が多量に作られ、患者でのウイルス量の変動と関連している事が分り、この RNA が HCV 複製を抑制している事が示唆された。又、5' 末の IRES の他に E1 コード領域に新たな IRES 活性を発見し、HCVE2 領域下流の翻訳がこれを利用し得る可能性を見出した。又、HCV のコア蛋白のアポトーシス誘導、細胞周期抑制に於いて、核内受容体 RAR $\alpha$ 、TFIIH の構成成分である CAK が関与する事を明らかにした。

HCV の治療に関係し、抗 HCV 活性を持つラクトフェリンと HCV の E2 蛋白との相互作用部位を確定した。又、全 HCV 抗原に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 応答 (CAI) を HCV 感染者につき検討し、ウイルス増殖と CAI の消長との関係を解析した。

1999 年より開始された日本赤十字社は全国の献血者血液に対して、HBV、HCV および HIV 感染の解析を続行した。

分担研究者

神田 忠仁

国立感染症研究所遺伝子解析室 室長

宮村 達男

国立感染症研究所ウイルス 2 部 部長

井廻 道夫

昭和大学医学部 教授

内田 茂治

東京都赤十字血液センター

林 紀夫

大阪大学大学院医学系研究科 教授

下遠野 邦忠

京都大学ウイルス研究所 教授

加藤 宣之  
岡山大学医学部 教授  
清水 洋子  
国立国際医療センター研究所 室長

#### A. 研究目的

ヒト子宮がんの原因であるヒトパピローマウイルス並びにヒト肝臓がんの原因であるC型肝炎ウイルス (HCV) を対象とした研究を行い、子宮がんと肝臓がん予防の確立を目的とした。HPV、HCV、何れのウイルスについても、その増殖、遺伝子発現機構、宿主細胞との相互作用を解析し、ワクチン、治療法への可能性を探った。HCV については、昨年引き続き、宿主細胞と興味ある相互作用をするコア蛋白の解析、ウイルス複製に関わる問題、更に予防治療の鍵を握る細胞性免疫（特にCTL）の研究を行い、HPV についてはワクチン開発を更に推進した。同時に、がんウイルスの伝搬に関与する可能性のある輸血血液の肝炎ウイルス、白血病ウイルスなどの病原体検出動向を解析し、早期対策の為の情報解析をした。

#### B. 研究方法

研究の総括は吉倉が担当し、HPV については神田が、HCV については下遠野、宮村、加藤、清水、吉倉がウイルス学的側面から、林が臨床分子生物学的手法により、それぞれ研究を分担した。殆ど全ての研究は、細胞レベル、試験管内のものであるが、ヒト材料を用いるもの、ヒトに接

種する場合については倫理審査委員会を経、患者の合意を得た上で行われている。輸血血液の感染症動向については日赤の内田が担当した。

（倫理面への配慮）CTL の研究については自治医科大学、筑波大学臨床医学系、昭和大学医学部の研究倫理委員会の承認を得、患者からはインフォームドコンセントを得て行った。動物実験は全て国立感染症研究所動物実験指針に従い、動物実験委員会の審査を経て行った。

#### C. 研究成果

##### HPV ワクチン

HPV には 80 以上の遺伝子型があり、そのうちがんの発症と関わるのは 16、18 型等少なくとも 12 の型（ハイリスク型）である。HPV16 型 L2 蛋白のアミノ酸 108-120 領域にハイリスク型共通の感染防御エピトープ (L2 エピトープ) が存在することを突きとめ、L2 エピトープのアミノ酸配列を持つ合成ペプチドをマウスやヒトに経鼻接種することで感染防御抗体を誘導できる事が分かった。実用化には免疫原性の強化が必要なことから、L2 エピトープを L1 蛋白質に組み込んだキメラ L1-キャプシドを構築し、3 個の L2 エピトープを導入したキメラ（特許出願準備中）がキャプシド構造を取り、マウスに免疫すると抗 L2 抗体を効率よく誘導することがわかった。これは、実用的な HPV 感染防御ワクチンの抗原候補となる。（神田）

##### HCV 複製

HCV複製培養細胞をジギトニン処理した実験系で、ゲノム複製が膜成分に仕切られた細胞質内コンパートメントで起こることが明らかにし、更にシクロスポリンA (CsA)が複製を強く抑制することを見出した。CsAの免疫抑制作用はHCV複製抑制には直接関係しない。(下遠野)

C型肝炎ウイルス(HCV)は*in vivo*でも*in vitro*でも効率よく増殖しない。これを説明する為に、吉倉は、HCVゲノムRNA合成の際にnt.364-382のA-rich regionでpremature terminationが起こるといふ仮説を出した。実際そのような5' side short RNAは、感染肝組織や血清中にゲノムRNAよりも遙かに多量に存在する。血清中のshort RNAフラグメントの3'末端はA-rich region直後のnt.384で、肝臓由来のものはもう少し短いものが多くnt.339-384に分布していた。血清中及び肝臓中共にshort RNAはコア蛋白と結合していたが、RNase Aには感受性であった。分別浮上遠心において、感染性粒子のあるtop ( $\rho=1.063$  g/ml)にもshort RNAは検出されLDL等との結合が考えられる。ウイルスゲノムのRT/PCR titerは同じであるがチンパンジー感染価は大きく異なる種々のHCV血清を用いて、short RNA量を比較したところ感染価と逆相関した。感染後経時的に採取された血清でみると、short RNA量の増加はlonger-sized RNA量の低下を示した。Short RNAが生体内でHCVの無制限な増殖を抑えている事が示唆された。培養細胞内でも同様な事が観察

され、この事がHCVの組織培養での増殖を難しくしていると考えられる。一方、臨床的応用を考えると、short RNAを何らかの方法で投与し抗HCV薬として開発する事も考えてよい。(清水)

#### HCV 遺伝子発現

HCVゲノムRNAの5'非翻訳領域(5' UTR)には、ポリオウイルスなどの5' UTRと同様にinternal ribosome entry site (IRES)が存在し、この部位へリボゾームが直接結合することにより、cap構造非依存的に翻訳が開始される。この5' UTR IRESは9カ所のstem-loop構造(I, II, IIIa-f, IV)からなるものと推定され、subdomain stem-loop IIIa-IIIcには、40Sリボゾームや翻訳開始因子eIF3などが結合する。stem-loop IIIIdにはコア蛋白が結合し、この結合に伴って5' UTR IRES活性が抑制される。コア蛋白による5' UTR IRES活性の抑制は、IIIId領域への細胞蛋白との競合による可能性を考え、この領域に結合する翻訳調節因子の同定を試みた。6種類(40-, 46-, 52, 63-, 66-, 90-kDa)のIIIId結合蛋白が得られ、質量分析によりp54-nrb、PSFおよびhnRNP-Hを同定した。P54-nrbはコア蛋白が存在することによって、より安定または効率よくHCV IRES IIIIdと結合するようである。(宮村)

HCV蛋白の産生、プロセシング機構を解析する過程で、5' UTR IRES活性に非依存的にE2および非構造蛋白が産生されうることを見出した。当該領域はE1領域の

nt. 1046-1433 が IRES 活性を有することを示唆する成績を得た。この領域には、プロモーター活性が存在せず、スプライシングはおこっていないこと、また上流からの ribosomal readthrough による翻訳ではないことを確認してある。E1 IRES によって E2 から非構造蛋白まで順次長い領域を発現させた場合、E2 蛋白のみの場合に比べ下流の遺伝子を発現させると発現レベルが低下することを観察した。各非構造蛋白や遺伝子が E1 IRES 活性へ及ぼす影響を調べたところ、NS2 蛋白を cis または trans に発現させると E1 IRES 活性が阻害されること、その阻害効果は NS2 蛋白の N 末端側が担っており、NS2 蛋白は 5' UTR や EMCV の IRES 活性は阻害しない。(宮村)

#### HCV コアの細胞への影響

コア蛋白を発現するプラスミドを導入したヒト細胞株 MCF-7 において、all trans-retinoic acid (ATRA) 処理によりアポトーシスが亢進し、その程度はコア蛋白の発現量と比例していた。この ATRA 依存的なアポトーシスの誘導は正常肝組織においても見られる現象であると考えられる。コア蛋白の作用機序として、核内受容体 RARα の転写を抑制する Sp110b と会合し、抑制の解除により RARα の転写を活性化する事が考えられたので、SP110b と会合できない変異を探索し、N 端から 61、62 番目のアミノ酸に変異を発見し、当該変異コアタンパク質発現細胞においては ATRA 依存アポトーシスの活性化は見られなかった。RARα の下流には tissue glutaminase

(tTGase)があり、コア蛋白によりこの発現が亢進し tTGase 阻害剤 MDC でコアによるアポトーシスが抑制された。従って、コア蛋白の SP110b への結合による核内受容体 RARα の活性化、その下流の tTGase 活性化、アポトーシスと云う経路が考えられる。しかし、生体内肝細胞でこのような経路があるのかどうかについては今後確認する必要がある。(下遠野)

HCV コア蛋白の細胞周期阻害に CAK が関与する事を見いだした。細胞抽出液から得た CAK 分画にコア蛋白を添加すると、コア蛋白は CDK7 を介して CDK7-cycH 複合体に結合し、結果、CAK 複合体

(CDK7-cycH-MAT1) から MAT1 が解離し、CAK 活性の低下に至る。CAK は TFIIF の構成因子であり、コア蛋白発現により基本転写に重要である CTD キナーゼ活性や nucleotide 除去修復能の低下に至った。免疫染色によりコア蛋白と CDK7 との核内共在を証明した。(林)

コア蛋白質は 2' -5' オリゴアデニル酸合成酵素や 2 本鎖 RNA 特異的アデノシンデアミナーゼ遺伝子プロモーター内に存在する variant 型 ISRE を活性化し、その活性にはコア蛋白アミノ末端部 20 アミノ酸が必須である。今回、ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞を用いたレポーターアッセイにより、NS5B 蛋白がコア蛋白による ISRE 活性化に相乗的効果を示し NS5B 蛋白質単独でも、コア蛋白と同程度の活性化能があることを明らかにした。両者には、コア蛋白質の 6-13 番目のアミノ酸配列

(KPQRKTKR) と NS5B 蛋白質の 151-158 番目のアミノ酸配列 (KGGRKPAR) というほぼ共通した配列があり、この配列を失うと何れの蛋白質の活性化能も顕著に低下又は消失することが分った。自然免疫系の TLR3 を介したシグナル伝達系を阻害する NS3-4A 蛋白質が NS5B 蛋白質による ISRE 活性化能を顕著に阻害することを見いだした。即ち、NS5B 蛋白質の ISRE 活性化能は TLR3 のシグナル伝達系の活性化を介している可能性がある。実際、NS5B の発現により、TLRS の活性化から予想される IFN- $\gamma$  mRNA の量が顕著に上昇し、更に IRF7 mRNA の発現上昇が認められた。これに反して、コア蛋白質の ISRE 活性化能は NS3-4A 蛋白質によりあまり影響を受けず、NS5B 蛋白質とは異なる作用機序が示唆された。(加藤)

#### HCV 治療

ヒト LF は HCV 感染防御作用をもつが、その 600-632 番目の 33 アミノ酸が HCV E2 蛋白質に結合する。このペプチドには、防御活性はあるものの LF 完全分子より数倍低い。2 量体や 3 量体にすると E2 結合活性が上昇し、感染防御活性も LF 完全分子と同等以上となる。一方、E2 蛋白質の中で LF との結合関与部位を調べる為、E2 蛋白質を 3 分割して TRX との融合蛋白質として大腸菌の系で発現させ、MBP 融合ヒト LF (600-632) をプローブとした Far-Western プロット解析を行った結果、ヒト LF (600-632) は E2 蛋白質の 384-500 番目の断片 (E2A) と強く、600-661 番目

の断片 (E2C) には弱く結合することが分った。即ち、ヒト LF (600-632) は E2 蛋白質の 2 箇所結合するものと考えられる。

C 型肝炎の IFN 治療における CTL 応答の意義を明らかにする為、全 HCV 抗原に対する CTL 応答の測定として限界希釈法を応用した CTL アッセイ (CTL Activity index, CAI) を行った。C 型慢性肝炎を IFN とリバビリンで治療すると、一般的に、CAI は治療開始 2-3 日後に上昇した後一旦低下し、血清 HCV RNA の消失に伴い治療中に再度上昇し、その後低下した。治療終了後再び血清 HCV RNA が陽性化した 2 例中 1 例では陽性化の直前に CAI が上昇し、血清 HCV RNA の増加と共に CAI は再び低下した。治療開始後 4 週で治療を 4 週間一時中断した 3 例中 2 例では治療開始後 4 週に一旦低下していた CAI が HCV の再出現に伴い上昇し、内一例では IFN 治療再開前に治療中止により上昇した血清 HCV RNA の再低下がみられた。IFN 治療の CTL 応答への影響を特定の CTL エピトープ刺激に対する IFN- $\beta$  産生細胞応答で検討した C 型急性肝炎患者 2 例では、1 例で治療開始前強い CTL 応答がみられたが、治療開始後 12 週には CTL 応答は著明に低下し、その低下は治療終了後も持続した。全 HCV 蛋白質をカバーするオーバーラッピングペプチドを用いた ELISpot アッセイによる HCV 特異的 CTL エピトープの同定を 2 例の C 型急性肝炎患者末梢血 CD8 陽性細胞を用いて行い、HLA-A\*0207, 2601, B\*3501, 4601, Cw\*0102,

0303 の患者では HCV NS3 1527-1546 と HCV NS5B 2591-2605 に、HLA-A\*2402, 3303, B\*4403, 5401, Cw\*0803, 1403 の患者では HCV E1 332-351, NS3 1638-1656, NS5B 2591-2605 に CTL エピトープを発見した。

(井廻)

#### 輸血調査

平成7年から東京都、茨城県、栃木県、神奈川県および福岡県の通知による選択を受ける事のない初回献血者を対象として HBs 抗原、HBc 抗体、HCV 抗体および HTLV-I 抗体の陽性率の調査を行って来た。この陽性率は地域住民の陽性率を反映していると考えられる。初回献血者における HBs 抗原陽性率を見ると、平成7年の陽性率と比べ平成15年の陽性率は50歳代を除くほとんどの年齢で陽性率の低下が認められる。特に10歳代の若年者でその陽性率の低下が顕著である。初回献血者における HCV 抗体陽性率は全年代を含めると60歳代の陽性率が年々低下している。16歳から50歳までの陽性率をみると、平成13年、平成15年で20歳代半ばから40歳にかけて陽性率の低下が認められる。初回献血者における HTLV-I 抗体の陽性率(関東の4県)は年毎に陽性率が低下しているとはいえない。輸血感染については平成15年の HBV の取り下げ例を除く53例の解析を行い、7例の HBV-DNA 陽性例が確認された。陽性となった7例では、HBV ウイルス量は全例で150コピー/mlあるいはそれ以下で、サブタイプは adr 3例、 adw 3例および ayw 1例であった。HBV-DNA の遺伝子

型は C が 5 例、 B が 2 例であった。5 例は pre-core mutant であり、2 例は wild タイプであった。mutant の 5 例は HBV キャリアである可能性が高かった。HBV の可変多型領域の塩基配列は、患者血液からの遺伝子増幅が不可であった 1 例を除き、供血者 HBV-DNA と患者 HBV-DNA は完全に一致した。HCV についても同年の取り下げ例を除く 34 例の解析を行ったが、HCV-RNA 陽性例は確認出来ていない。HIV については、取り下げ例を除く 1 例の解析を行ったが HIV-RNA は検出されなかった。(内田)

#### D. 考察

現在米国で大規模な臨床試験が行われている HPV 感染予防ワクチンは HPV16L1-キャプシドを抗原とするものである。対象は 2392 人の 16 才から 23 才の健常女性で、平均 17.4 ヶ月の観察期間においてワクチン投与群には HPV16 の新たな感染は認められなかったが、プラセボ投与群では 41 人の新たな感染者(そのうち 9 人に子宮頸部細胞診に異常)が認められ、ワクチンで HPV の感染を防げることが示された。しかし、このワクチンでは 16 型以外の HPV 感染は予防できないことも明らかにされている。本研究班では、HPV16L2 蛋白質のアミノ酸 108-120 領域に結合する抗体が、6、11、52、58 型等の L2 蛋白質にも結合し、感染防御能を持つ事を見出した。今回、HPV16 型の L1 蛋白質に L2-エピトープを 3 個挿入したキメラ L1-キャプシドを作成し、これが複数のハイ



リスク型 HPV の感染を予防するワクチンの抗原となる可能性がある事を発見した。

本研究班では、HCV の複製に関係し幾つかの研究を行って来た。本年度は、NS5B 蛋白が TLR3 のシグナル伝達系を活性化し、IFN- $\gamma$  が誘導され、ウイルスの増殖が抑制される一方、NS5B の活性は NS3-4A 蛋白質により阻害される事が分かった (加藤)。5' UTR IRES に HCV コア蛋白が結合し翻訳を抑える事 (宮村)、5' UTR とは独立した E1 領域の IRES 活性が NS2 蛋白によって抑制されること (宮村)、ゲノム RNA の転写の際、nt. 384 で転写が止まる機構の存在する事 (清水) 等を考えると、HCV には自身の増殖を程よく抑える仕組みが組み込まれている事が次第にはっきりしてきた。

HCV 治療関係の仕事としては、抗 HCV 活性のあるラクトフェリン (LF) CTL の研究が上げられる。LF については、その感染防御に必須の 600-632 番目のアミノ酸が HCV の E2 蛋白質に対する結合領域として 411-441 番目のアミノ酸を同定した。この配列はウイルス株間でよく保存されており、HCV 受容体に対する囲ペプチドとして予防治療薬としての開発が可能である。一方、CTL については、C 型慢性肝炎の IFN、リバビリン治療に於ける活性の動向を調べた。治療開始 2-3 日後に全 HCV 抗原に対する CTL 活性の上昇がみられたが、これは IFN による免疫増強作用によると考えられる。一旦上昇した CTL 応答は血清 HCV RNA の減少に伴い低下するが、これは

IFN による細胞増殖抑制作用によることが考えられる。更に血清 HCV RNA の減少、消失により再度 CTL 応答が上昇するが、これはトレランスの解除を反映し、その後の CTL 活性の低下は HIV の治療の際と同様に抗原刺激の減少によるものと考えられる。短期間の治療と治療中断の繰り返しは、少数例の検討ではあるが CTL 活性を維持する効果があると共に、CTL 活性の維持がウイルス増加を抑制する可能性があることを示唆する結果が得られ、今後の治療方針の確立に役立つと思われる (井廻)。

HCV 感染の病態解析として、コアに関する研究を行っている。コア蛋白は細胞周期の停止更にはアポトーシスを誘導する。アポトーシスの誘導には核内ホルモン転写因子のコアによる活性化が重要であること、そのために細胞側の因子 SP110b が重要な働きをすることを見出した。コア蛋白を発現するトランスジェニックマウスで出現する肝がん発症の際、脂肪代謝の異常が観察されているが、上記核内受容体を介した転写の下流に脂肪代謝に関与する遺伝子が含まれており脂肪代謝の異常を介した細胞のがん化の可能性が考えられる (下遠野)。

## E. 結論

子宮がんの原因となる HPV に関しては、複数の HPV 型に対する中和抗体エピトープが L2 蛋白のアミノ酸 108-120 に存在することを発見し、これを組み込んだ LI 蛋

白を作成し偽粒子を作成すると、当該粒子はマウスに効率良く抗 L2 抗体を誘導した。これは、実用的な子宮がん予防ワクチンの候補となり得る。

HCV ゲノムの 5' 末には、ウイルス複製及び翻訳を抑制する塩基配列がある事が分かった。特に、5' 末の A-rich region で転写が止まり、400nt の短い RNA が多量に作られ、患者でのウイルス量の変動と関連している事が分り、この RNA が HCV 複製を抑制している事が示唆された。又、5' 末の IRES の他に E1 コード領域に新たな IRES 活性を発見し、HCVE2 領域下流の翻訳がこれを利用し得る可能性を見い出した。又、HCV のコア蛋白のアポトーシス誘導、細胞周期抑制に於いて、核内受容体 RAR $\alpha$ 、TFIIH の構成成分である CAK が関与する事を明らかにした。

HCV の治療に関係し、抗 HCV 活性を持つラクトフェリンと HCV の E2 蛋白との相互作用部位を確定した。又、HCV 感染者を IFN とリバビリン治療し、その経過中の全 HCV 抗原に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 応答 (CAI) を調べ、HCV 感染治療に於いて CTL が重要な役割を果たす事を見い出した。則ち、IFN/リバビリンと治療ワクチンの併用療法の開発の重要性を示した。1999 年より開始された日本赤十字社は全国の献血者血液に対して、行っている HBV、HCV および HIV 感染の解析は今後も重要である。

F. 健康危険情報 なし

G. 発表文献 別紙

H. 知的所有権の取得  
申請準備中 (神田)。

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）  
分担研究報告書

ヒトパピローマウイルスによる子宮頸がん発症機構の解明と感染予防に関する研究  
分担研究者 神田忠仁 国立感染症研究所・遺伝子解析室・室長

子宮頸がん発症の最大リスクファクターはヒトパピローマウイルス（HPV）の感染である。従って、HPVの感染をワクチンで防ぐことができれば、子宮頸がんを予防できると考えられる。HPVには80以上の遺伝子型があり、そのうちがんの発症と関わるのは16、18型等少なくとも12の型（ハイリスク型）である。HPVキャプシドは360分子のL1蛋白質と12分子のL2蛋白質からなる。HPV16型のL1蛋白質からのみ形成されるウイルス様粒子（L1-キャプシド）をワクチン抗原とする臨床試験が米国で進められている。L1-キャプシドの強い免疫原性・安全性と誘導される感染防御抗体が16型に特異的であることが明らかにされ、他のHPV型への対応が課題となっている。我々は、HPV16型L2蛋白質のアミノ酸108-120領域にハイリスク型共通の感染防御エピトープ（L2エピトープ）が存在することを突きとめ、L2エピトープのアミノ酸配列を持つ合成ペプチドをマウスやヒトに経鼻接種することで感染防御抗体を誘導できる可能性を示してきた。実用化には免疫原性の強化が必要なことから、本年度はL2エピトープをL1蛋白質に組み込んだキメラL1-キャプシドの構築を試みた。これまでに、3個のL2エピトープを導入したキメラ（特許出願準備中）がキャプシド構造を取り、マウスに免疫すると抗L2抗体を効率よく誘導することがわかった。実用的なHPV感染防御ワクチンの抗原候補となる。

A. 研究目的

HPV16型L2のアミノ酸108-120領域には、複数のHPV型を中和できるエピトープ（L2-エピトープ）が存在する。このエピトープを利用したHPV感染予防ワクチンの抗原を作製する。

B. 研究方法

1) バキュロウイルスベクターを用いたHPV16キメラL1-キャプシドの作製

L2-エピトープを含むHPV16L2蛋白質断片をコードするプライマーを合成した。これを用いたPCRによって、HPV16L1遺伝子の様々な領域にL2エピトープを挿入または置換した。HPV16L1-キャプシドを認識する中和抗体のエ

ピトープがあると推測されている領域、またキャプシドの形成に必要なシステイン残基の領域などにL2-エピトープを導入した。HPV16L1キメラ遺伝子を発現する組み換えバキュロウイルスを作り、昆虫細胞（Sf-9）に感染させた。感染72時間後に細胞核を回収し、超音波で破碎してから塩化セシウム溶液中で遠心し、比重1.28g/ml付近の分画を回収した。発現したキメラ蛋白質の高次構造はショ糖密度勾配遠心での沈降度で予測し、粒子形態をとっていると予測されたものは電子顕微鏡写真にてその形態を観察した。

2) マウス抗血清の作製

Balb/cマウス（6週令、雌）に、PBSで透析したHPV16L1キメラ蛋白質を皮下接種もしく

は経鼻接種した。経鼻接種（1回12 $\mu$ g）は1週間間隔で4回投与し、初回投与から4週、6週、8週、10週時に下大静脈より全採血を行った。皮下接種（1回40 $\mu$ g）はTiterMaxをアジュバンドとし、2週間間隔で4回投与し4週、6週、8週に全採血した。

### 3) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

HPV16L1/L2-、HPV16L1-、HPV52L1/L2-、HPV52-L1キャプシドと16型L2蛋白質のN末端領域（アミノ酸61-140）及びこれからアミノ酸105-126を欠失させた蛋白質を抗原とした。96穴プレートの各ウェル抗原（キャプシドは1mg、L2蛋白質は2mg）を固定し、5%スキムミルクPBS-T(0.1% Tween20)溶液でブロッキングしたのち、ブロッキング液で希釈したマウス血清50 $\mu$ lを加え、室温で60分反応させた。洗浄後、ブロッキング液にて2000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGヤギ血清50 $\mu$ lを加え、室温で30分反応させた。洗浄したのち、*o*-フェニレンジアミン、過酸化水素水を添加した0.1Mクエン酸ナトリウム溶液(pH4.7)を加え、450nmの吸光度を測定した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験は全て国立感染症研究所動物実験指針に従い、動物実験委員会の審査を経て行った。

### C. 研究結果

#### 1) キメラ蛋白質の性状

これまでに17種のキメラ蛋白質を作製した。HPV16L2蛋白質のアミノ酸105-126及び108-120領域を導入したHPV16L1キメラ蛋白質は、 $\text{Sho}$ 糖密度勾配遠心における沈降度が極めて大きく、凝集塊となっていることが示された。L2蛋白質断片を再検討し（特許の申請を考慮し、挿入断片の大きさは記載しない）凝集しない挿入断片を作製した。電子顕微鏡による観察で、この断片を挿入したキメラ蛋白質

は野生型L1-キャプシドよりはやや小さい粒子構造を形成することが分かった。この領域を2個ないし3個挿入したキメラ蛋白質も同様の粒子を形成することが示された。（特許申請を考慮しL2-エピトープの挿入部位は記載しない）

#### 2) キメラ蛋白質の抗原性

キメラ蛋白質によって形成された粒子は、アミノ酸108-120領域の配列を持つ合成ペプチドを免疫して得たウサギ抗血清と反応した。キメラ蛋白質による粒子上にL2エピトープが提示されていることが示された。

#### 3) キメラ蛋白質の免疫によって誘導された抗体の性質

粒子構造をとるキメラ蛋白質の免疫では、抗L1抗体と共にL2エピトープに対する抗体も誘導された。特に、3個のL2エピトープを含むキメラ蛋白質では、効率よく抗L2抗体が誘導された。経鼻接種群と皮下接種群では抗L1抗体の誘導においては違いがなかったが、抗L2抗体の誘導は皮下接種群が優れていた。HPV52型及び6型のL1/L2-キャプシドにも結合した。凝集を形成するキメラ蛋白質の免疫では、抗L1抗体は誘導できたが、L2エピトープに対する抗体は誘導できなかった。

### D. 考察

現在米国で大規模な臨床試験が行われているHPV感染予防ワクチンはHPV16L1-キャプシドを抗原とするものである。対象は2392人の16才から23才の健常女性で、平均17.4ヶ月の観察期間においてワクチン投与群にはHPV16の新たな感染は認められなかったが、プラセボ投与群では41人の新たな感染者（そのうち9人に子宮頸部細胞診に異常）が認められ、ワクチンでHPVの感染を防げることが示された。しかし、このワクチンでは16型以外のHPV感染は予防できないことも明らかにされている。従って、12のハイリスク型HPVの感染を幅広く予防できるワクチン抗原の開発が求められている。我々は、HPV16L2蛋白質のアミノ酸

108-120領域に結合する抗体が、6、11、52、58型等のL2蛋白質にも結合し、感染防御能を持つことを見出した。このL2エピトープをワクチン抗原に利用できれば複数のHPV型の感染が予防できると考えている。

L2エピトープに対する抗体を効率よく誘導する抗原として、HPV16型のL1蛋白質にL2-エピトープを挿入したキメラL1-キャプシドを作製した。L1蛋白質及びL1-キャプシドの立体構造の解析と、抗L1抗体のエピトープの解析から得られた情報を参考に、キャプシド表面に存在すると予測される領域にL2-エピトープを挿入した。HPV粒子ではL2蛋白質の分子数はL1蛋白質の1/30に過ぎないが、キメラキャプシドでは粒子あたりのエピトープ数を大幅に増やすことができることも利点と考えた。また、キャプシド様構造を形成するキメラ蛋白質をワクチン抗原とすれば、L1-キャプシドの強い免疫原性を利用できると考えた。これまでに作製した、3個のL2エピトープを持つキメラL1-キャプシドは、複数のハイリスク型HPVの感染を予防するワクチンの抗原となる可能性がある。

投与方法の検討が今後の課題である。粘膜からのHPVの侵入を阻止するためには経鼻接種が適切と考えられるが、L1-キャプシドワクチンの臨床試験では抗原の筋注で有効性が示されている。投与経路による抗体誘導の質的、量的な相違を詳細に検討する必要がある。

#### E. 結論

複数のハイリスク型HPVの感染を予防するワクチンの抗原候補として、HPV16型L2蛋白質にある中和エピトープを3個含むキメラHPV16L1-キャプシドを作製した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kawana, K., Yasugi, T., Kanda, T., Onda, N., Oda, K., Okada, S., Kawana, Y., Nei, T., Takada, T., Toyoshima, S., Tsuchiya, A., Kondo, K., Yoshikawa, H., Tsutsumi, O., and Taketani, Y. : Safety and immunogenicity of a peptide containing the cross-neutralization epitope of HPV16 L2 administered nasally in healthy volunteers. *Vaccine*, 31: (27-30):4256-4260, 2003.
2. Kawana, K., Yasugi, T., Yoshikawa, H., Kawana, Y., Matsumoto, K., Nakagawa, S., Onda, T., Kikuchi, A., Fujii, T., Kanda, T., and Taketani, Y. : Evidence for the presence of neutralizing antibodies against human papillomavirus type 6 in infants born to mothers with condyloma acuminata. *American J. Perinatology*, 20:11-15, 2003.
3. Enomoto, K., Enomoto, Y., Ishii, Y., Araie, M., and Kanda, T. : Genes up- or down-regulated by expression of keratinocyte-specific POU transcription factor hSkn-1a. *BBRC*, 303:580-585, 2003.
4. Ishii, Y., Tanaka, K., and Kanda, T. : Mutational analysis of human papillomavirus type 16 major capsid protein L1: the cysteines affecting the intermolecular bonding and structure of L1-capsids. *Virology*, 308:128-136, 2003.
5. Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Yasugi, T., Nakagawa, S., Kawana, K., Takeoka, A., Yaegashi, N.,

Iwasaka, T., Kanazawa, K., Taketani, Y., and Kanda, T. : IgG Antibodies to Human Papillomavirus 16, 52, 58 and 6 L1-Capsids: a Case-Control Study of Cervical Intraepithelial Neoplasia in Japan. J. Medical Virology, 69:441-446, 2003.

## 2. 学会発表

- 1) Mori, S., Takeuchi, T., Enomoto, Y., Ono, F., Sata, T., and Kanda, T.: Systemic administration of recombinant AAV-2 vector in cynomolgus monkeys: Organ-tropism and expression of transgene. 第9回日本遺伝子治療学会
- 2) Kanda, T.: HPVがんの攻略。第62回日本癌学会
- 3) 神田忠仁、森清一郎、竹内隆正、佐多徹太朗：アデノ随伴ウイルスベクターの体内動態。第51回日本ウイルス学会
- 4) 緒方敏彦、神田忠仁：アデノ随伴ウイルス組み込み領域 (AAVS1) の insulator。分子生物学会

H. 知的所有権の取得  
申請準備中。

ウイルスを標的とした発がん予防に関する研究

分担研究者 清水洋子 国立国際医療センター研究所 室長

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）は *in vivo* でも *in vitro* でも効率よく増殖しない。Negative strand RNAウイルスにおけるmRNA転写停止機構に基き吉倉は、HCV RNA新生の際に nt.364-382 の A-rich region で premature termination が起こるといふ仮説を出した。昨年度我々は仮説が predict するプラス極性の 5' side short RNA が実際に感染肝組織や血清中に多量に存在することを明らかにした。本年度は、5' side short RNA の物理学的性状を調べると共に、患者血清のHCV感染価と short RNA の相対量が逆相関することを明らかにした。HCVの複製レベルの低さがこの short RNA に起因する可能性がある。

A. 研究目的

HCVの複製機構、持続感染、発がんメカニズムなどを明らかにするためには効率の良い培養細胞内増殖系が必須である。しかし現在までに得られている系でのHCV増殖レベルは非常に低く詳細なウイルス学的研究への応用は難しい。本研究の目的は、5' side short RNA のウイルスゲノム複製抑制のメカニズムを明らかにすることにより培養細胞におけるHCV増殖効率の増強への手掛りを得ることである。

B. 研究方法

ヒト感染肝（癌部、非癌部）、感染チンパンジー肝、感染価が分っているヒト血清、患者から経時的に採取されたパネル血清などを材料とした。5' short RNA の 3' 末端塩基は oligoRNA ligation 法、コア蛋白との結合は antigen-captured RT/PCR 法、浮上密度は分別浮上遠心法で調べた。short RNA の相対量は次のようにして調べた。A-rich region (nt.364-382)の上流及び下流にプライマーを設定し、材料から抽出したウイルスRNAの逆転写をこれらのポイントからスタートさせ、出来た cDNA 量を end-point dilution PCR で比較した。

C. 研究結果

(1). 血清中の shortRNA フラグメントの 3' 末端は A-rich region 直後の nt.384 であった。肝臓由来のものはもう少し短いものも多く nt.339-384 に分布していた。(2). 血清中及び肝臓中共に shortRNA はコア蛋白と結合した状態で存在した。しかし RNase A には感受性であった。(3). 分別浮上遠心において、top ( $\rho=1.063$  g/ml)と bottom の両フラクションから shortRNA が検出された。Top では LDL との結合が考えられる。(4). ウイルスゲノムの RT/PCR titer は同じであるがチンパンジー感染価は大きく異なる種々の HCV 血清を用いて、shortRNA 量を比較したところ感染価と逆相関した。(5). 感染後経時的に採取された血清でみると、shortRNA 量の増加は longer-sized RNA 量の低下を示した。

D. 考察

血清中の 5' side short RNA の 3' 末端部位はかなりユニフォームで A-rich region 直後の nt.384 であったことは吉倉の仮説を支持する。肝組織内でのサイズのばらつきは RNase による分断と思われる。short RNA の存在がウイルス複製の抑制に働く機構の一つとしてコア蛋白がフルサイズゲノムに結合する際の競合等が考えられる。

E. 結論

5' side short HCVRNA の生物学的意味として  
ウイルス複製抑制が示唆された。

G. 研究発表

学会発表

1. C型肝炎ウイルスにおける shortRNA 相対  
量比と感染性の解析

大島正道、清水洋子、土方美奈子、吉倉廣

第51回日本ウイルス学会学術総会、2003

年10月、京都

2. Characterization of the 5' side subgenomic  
forms of Hepatitis C viral RNA in the liver  
and serum.

Y. K. Shimizu, M. Hijikata, M. Oshima, H.  
Yoshikura

10<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C  
Virus and Related Viruses, 2003.  
December, Kyoto



C型肝炎ウイルスの翻訳調節機構の解析

分担研究者 宮村達男 国立感染症研究所ウイルス第二部部长

研究要旨 HCVコア蛋白が5'UTR IRESのstem-loop III<sub>d</sub>領域と結合し、それに伴ってIRES活性が抑制されることを見出してきた。コア蛋白がIII<sub>d</sub>領域を介した翻訳調節に対して競合阻害的に働いているのではないかと考え、この領域に結合する翻訳調節因子の同定を試みた。その結果、III<sub>d</sub>結合蛋白としてp54-nrb、PSFおよびhnRNP-Hを同定した。p54-nrbはコア蛋白存在下で、より安定または効率よくIII<sub>d</sub> RNAと結合することが示唆された。

一方、HCV 蛋白の産生、プロセシング機構を解析する過程で、5'UTR 以外に E1 領域にも IRES 活性が存在することを明らかにした。また、NS2 蛋白を cis または trans に発現させることによりこの E1 IRES 活性が阻害されること、その阻害効果は NS2 蛋白の N 末端側が担っていること、NS2 蛋白は 5'UTR や EMCV の IRES 活性は阻害しないこと、を見出した。

A. 研究目的

HCVゲノムRNAの5'非翻訳領域(5'UTR)には、ポリオウイルスなどの5'UTRと同様にinternal ribosome entry site (IRES)が存在し、この部位へリボソームが直接結合することにより、cap構造非依存的に翻訳が開始される。この5'UTR IRESは9カ所のstem-loop構造(I, II, III<sub>a-f</sub>, IV)からなるものと推定され、その中で翻訳開始に特に重要な領域も明らかにされつつある。subdomain stem-loop III<sub>a</sub>-III<sub>c</sub>には、40Sリボソームや翻訳開始因子eIF3などが結合することが示されている。また我々はヌクレオキャプシドを構成するコア蛋白がstem-loop III<sub>d</sub>領域と結合すること、この結合に伴って5'UTR IRES活性が抑制されることを見出してきた。そこで、コア蛋白がIII<sub>d</sub>領域を介した翻訳調節に対して競合阻害的に働いているのではないかと考え、この領域に結合する翻訳調節因子の同定を試みた。

また最近、HCV 蛋白の産生、プロセシング機構を解析する過程で、5'UTR IRES 活性に非依存的に E2 および非構造蛋白が産生されうること

を見出した。そこで、このHCVゲノムのE1領域に存在する新たなIRES活性による翻訳機構の解析を合わせて行った。

B. 研究方法

1. HCV IRES結合蛋白のスクリーニング

ヒト肝癌細胞Huh7をisotonic bufferで洗浄した後、hypotonic bufferを加えホモジナイズを行った。さらに10分の1量のincubation buffer: 0.2 M HEPES (pH7.5), 1.2M KCl, 50mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 60mM beta-MEを加えた後、10000g, 15分間の遠心操作を4回行いその上清をcrude S10分画とした。HCV 5'UTR III<sub>d</sub>配列(nt 250-281)の5'末端をビオチン化した合成RNAをこの分画と混合し、蛋白-RNA複合体を形成させた後、アビジン化磁気ビーズを加えビオチン化RNAを回収した。陰性コントロールとして相補鎖RNAに対する結合蛋白を同様に調製した。これらについてSDS-PAGEを行いIII<sub>d</sub>配列特異的に結合が認められた蛋白を切り出し、ゲル内トリプシン消化後、MALDI-TOF MSにより質量分析を行いデータベース検索により蛋白を特定した。

## 2. HCV 蛋白の発現と検出

HCV感染性クローンH77cの遺伝子断片をCAGプロモーター下流に挿入し、発現プラスミドを作製した。トランスフェクション48時間後に細胞を回収し、抗コア、E1、E2、NS3、およびFlag抗体を用いてウエスタンブロット法により発現HCV蛋白を検出した。

## 3. ルシフェラーゼアッセイ

HCV IRES 領域遺伝子を、1st cistron (Renilla ルシフェラーゼ) と 2nd cistron (Firefly ルシフェラーゼ) 遺伝子の間に挿入した dicistronic レポータープラスミドを作製した。レポータープラスミドを293T細胞あるいはヒト肝由来細胞に導入し、24時間後に両ルシフェラーゼの活性を測定した。IRES (Firefly ルシフェラーゼ) 活性は Renilla ルシフェラーゼ活性により標準化した。

## C. 研究結果

### 1. HCV IRES結合蛋白の同定

Huh7細胞のcrude S10分画を用いてHCV IRES IIIId配列に選択的に結合する蛋白の同定を行った。結合蛋白群のうちで、同配列によってcompeteされないもの、および相補鎖配列にも結合の認められたものを排除したところ、6種類(40-, 46-, 52-, 63-, 66-, 90-kDa)のIIIId結合蛋白が得られた。これらについて質量分析を行ったところ、p54-nrb、PSFおよびhnRNP-Hを同定することができた。抗体の得られたp54-nrbについてはウエスタンブロットにより確認を行った(図1)。p54-nrbとIRES IIIIdとの結合がHCVコア蛋白の影響をうけるかどうかを調べる目的で、crude S-10分画とRNAを混合する際に精製コア蛋白を加えRNA結合蛋白を調製し、ウエスタンブロットで解析したところ、加えるコア蛋白の量依存的にp54-nrbが増加することが示された。コア蛋白が存在することによって、p54-nrbはより安定または効率よくHCV IRES IIIIdと結合することが示唆された。

## 2. E1 IRESの解析

HCV蛋白の産生、プロセシング機構を解析する過程で、コアまたはE1領域に翻訳終止コドンを挿入しE1蛋白が産生されない場合でも、下流のE2蛋白が発現しうることを見出した。そこで、5'UTR IRESとは独立の翻訳機構がコアからE1遺伝子内に存在する可能性を考え、dicistronicレポータープラスミドを作製し、細胞内で発現する2種類のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、E1領域のntl046-1433がIRES活性を有することを示唆する成績を得た(図2)。さらに、この領域には、プロモーター活性が存在しないこと、スプライシングはおこっていないこと、また上流からのribosomal readthroughによる翻訳ではないことが証明されたためE1遺伝子に5'UTRとは別のIRES活性が存在することが明らかとなった。

一方、E1 IRESによってE2から非構造蛋白までを発現させた場合、E2蛋白のみの場合に比べ発現レベルが低下することを観察した。パルスチエイス実験により、非構造蛋白がE2蛋白を不安定化させる可能性は否定されたため、非構造領域の蛋白またはRNAがE1 IRES活性を抑制する可能性を考えた。各非構造蛋白や遺伝子がE1 IRES活性へ及ぼす影響を調べたところ、NS2蛋白をcisまたはtransに発現させるとE1 IRES活性が阻害されること、その阻害効果はNS2蛋白のN末端側が担っていること、NS2蛋白は5'UTRやEMCVのIRES活性は阻害しないこと、を見出した。

## D. 考察

### 1. HCV IRES結合蛋白の同定

プロテオミクス解析により、5'UTR IRES IIIId結合蛋白として、p54-nrb、PSFおよびhnRNP-Hを同定した。これらの蛋白はいずれもmRNAスプライシングなどRNAプロセシングに関与することが知られているものの翻訳調節への関与については報告されていない。また、p54-nrbはPSFと結合し、PSFとhnRNP-HはPTBと結合することが知られて

いることから、同定した3種類の蛋白がPTBを介してIII<sub>d</sub> RNA上で複合体を形成している可能性が考えられる。今後はIII<sub>d</sub> RNAと蛋白複合体との結合様式を明らかにするとともに、これらの宿主因子がHCVの翻訳過程にどのように関わっているのかをコア蛋白の介在を踏まえながら解析していく予定である。

## 2. E1 IRESの解析

HCV RNAには、5'UTRとは独立してE1領域にIRES活性が存在することを初めて示した。またこのE1 IRES活性がNS2蛋白によって抑制されることも明らかとなった。ゲノムRNAに2カ所のIRES領域を持つウイルスとしては、昆虫のピコルナ様ウイルス (cricket paralysis virus)が知られている。このウイルスでは構造蛋白と非構造蛋白の産生がそれぞれ別のIRES活性によってコントロールされている。また、レトロウイルスではHIV gagなどORF内にIRES領域を持つ例が報告されている。HCVのライフサイクルにおいて、E1 IRES活性がどのような役割を果たすのかを今後明らかにする必要があるが、E1 IRES活性によって主としてウイルス複製に関わる非構造蛋白が翻訳されること、NS2蛋白がこの活性を抑制することを考え合わせると、1) ウイルス複製の初期には蛋白産生が進み、2) ある程度のウイルス蛋白が蓄積した時点でIRES活性が抑えられ、3) これが引き金となって、NS5B蛋白などにより効率よくRNAが複製されるようになる、というモデルを考えている。

## E. 結論

1. HCV 5'UTR IRES の subdomain III<sub>d</sub> に結合する宿主因子として、p54-nrb、PSF および hnRNP-H を同定した。
2. p54-nrb は、コア蛋白が存在することによって、より安定または効率よく HCV IRES III<sub>d</sub> と結合することが示唆された。
3. HCV RNA には、5'UTR 以外に E1 領域にも IRES

活性が存在することを初めて示した。

4. NS2 蛋白は、E1 IRES 活性を特異的に阻害する。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Uno-Furuta, S., Matsuo, K., Tamaki, S., Takamura, S., Kamei, A., Kuromatsu, I., Kaito, M., Matsuura, Y., Miyamura, T., Adachi, Y., and Yasutomi, Y. Immunization with recombinant Calmette-Guerin bacillus (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine* 21, 3149-3156, 2003.
2. Li, T.C., Takeda, N., Kato, K., Nilsson, J., Xing, L., Haag, L., Cheng, R.H., and Miyamura, T. Characterization of self-assembled empty virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *Virology* 311, 115-124, 2003.
3. Watanabe, H., Saito, T., Shinzawa, H., Okumoto, K., Hattori, E., Adachi, T., Takeda, T., Sugahara, K., Ito, J.I., Saito, K., Togashi, H., Suzuki, R., Hayashi, M., Miyamura, T., Matsuura, Y., and Kawata, S. Spontaneous elimination of serum hepatitis C virus (HCV) RNA in chronic HCV carriers: A population-based cohort study. *J. Med. Virol.* 71, 56-61, 2003.
4. Moriishi, K., Okabayashi, T., Nakai, K., Moriya, K., Koike, K., Mutrata, S., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, R., Suzulki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. PA28γ-dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. *J. Virol.* 77, 10237-10249, 2003.
5. Aizaki, H., Nagamori, S., Matsuda, M., Kawakami, H., Hashimoto, O., Ishiko, H., Kawada, M., Matsuura, T., Hasumura, S.,

- Matsuura, Y., Suzuki, T., and Miyamura, T. Production and release of infectious virions from persistently infected human liver cell cultures transfected with full length- HCV RNA. *Virology* 314, 16-25, 2003.
6. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Miyoshi, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology* 38, 820-828, 2003.
  7. Brunetti, C.R., Amano, H., Ueda, Y., Qin, J., Miyamura, T., Suzuki, T., Li, X., Barrett, J.W., and McFadden, G. The complete genomic sequence and comparative analysis of the human tumorigenic poxvirus Yaba monkey tumor virus. *J. Virol.* 77, 13335-13347, 2003.
  8. Sacco, R., Tsutsumi, T., Suzuki, R., Otsuka, M., Aizaki, H., Sakamoto, S., Matsuda, M., Seki, N., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Suzuki, T. Anti-apoptotic regulation by hepatitis C virus core protein in the ecdysone-inducible system of human liver cells. *Virology* 317, 24-35, 2003.
  9. Ruggieri, A., Murdolo, M., Harada, T., Miyamura, T., and Rapicetta, M. Cell cycle perturbation in a human hepatoblastoma cell line constitutively expressing hepatitis C virus core protein. *Arch. Virol.* 149, 61-74, 2004.
2. 学会発表
1. Suzuki T, Suzuki R, Matsuura Y, Miyamura T. Molecular Determinants for the Subcellular Localization of HCV Core Protein. The 24th Joint Meeting of the US-Japan Hepatitis Panels, Tokyo, January 11-13, 2003.
  2. Miyamura T. HCV infection and hepatocellular carcinoma. 11th International Symposium on Viral Hepatitis & Liver Disease. Sydney, Australia, April 6-10, 2003.
  3. Ishikawa T., Fukushima Y., Shiobara Y., Shoji I., Suzuki T., Matsui T., Shimada Y., Ohyama T., Nagai R., and Miyamura T. An outbreak of hepatitis C in an outpatient clinic in Japan. *ibid.*
  4. Suzuki R., Murakami K., Suzuki T., and Miyamura T. Potential mechanism of cap-independent translation conferred by E1 region of the HCV genome. 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Kyoto, December 2-6, 2003.
  5. Sakamoto S., Shiroki K., Suzuki R., Suzuki T., and Miyamura T. In vitro particle assembly of HCV core protein. *ibid.*
  6. Murakami K., Inoue Y., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Suzuki T., and Miyamura T. Dynamics of HCV replication in the three-dimensional radial flow bioreactor system. *ibid.*
  7. 椛山裕一、勝二都夫、松田麻未、瀬戸裕之、宮村達男. HPV16E6 蛋白と結合する宿主蛋白 E6AP の新規標的蛋白の解析. 第 51 回日本ウイルス学会, 京都, 2003 年 10 月.
  8. 森石恒司、岡本貴世子、中村理加、鈴木亮介、鈴木哲朗、森屋恭爾、小池和彦、宮村達男、松浦善治. C 型肝炎ウイルスコア蛋白質の成熟・分解の分子機構. 同上.
  9. 坂本真一郎、根岸英雄、鈴木亮介、瀬戸裕之、鈴木哲朗、宮村達男. C 型肝炎ウイルス NSSA 蛋白のリン酸化が HCV 複製に及ぼす影響. 同上.
  10. 町田早苗、石井孝司、鈴木亮介、赤塚俊隆、宮村達男、鈴木哲朗. C 型肝炎ウイルス Core 蛋白による B 細胞表面分子の発現変化. 同上.
  11. 鈴木亮介、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男. C 型肝炎ウイルスの新たな翻訳抑制機構. 同上.
  12. 石井孝司、町田早苗、鈴木亮介、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、赤塚俊隆、宮村達男. 高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs のウイルスベクタ