

厚生労働科学研究研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルスによる宿主細胞のがん化  
メカニズムの解明に関する研究

平成14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 加藤 宣之

平成17(2005)年 5月

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
総括研究報告書

肝炎ウイルスによる宿主細胞のがん化メカニズムの解明に関する研究

主任研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：本研究においては、1) C型肝炎ウイルス（HCV）が宿主側のDNA修復能を低下させる可能性の追究、2) HCV 蛋白質による細胞の増殖変化に関する解析、3) HCV の複製増殖制御機構およびその制御法の開発などを軸に研究を行い、以下に示す成果を得た。1) 新規アッセイ法を構築して、コア蛋白質がマイクロサテライト不安定性を増強させること、および塩基除去修復能を低下させることを見出した。2) コア蛋白質が核内受容体 RAR $\alpha$  に対して転写抑制的に作用する Sp110b と会合することにより核内受容体に依存した転写を活性化することを見出した。新規に作成樹立した2種類の HCV レプリコン細胞株を用いたマイクロアレイ解析により HCV レプリコンの複製増殖により発現レベルに変動が起こる宿主因子を同定した。HCV の NS5B がインターフェロン- $\beta$  の発現を誘導して S 期の進行を遅らせることを見出した。3) HCV 全ゲノムが効率よく複製する培養肝細胞および複製効率を定量的に評価できる簡便な測定法を開発した。マウスにヒト肝細胞を移植して HCV RNA の複製を定量化できる方法を開発した。インターフェロン抵抗性 HCV レプリコン細胞株を樹立して、インターフェロン抵抗性獲得機序の一部を解明した。自然免疫を調節する細胞側因子である TLR3、およびサイクロフィリン B が HCV の増殖制御に重要であることを見出した。細胞内で複製している HCV RNA の 5' 末端構造を明らかにした。HCV レプリコン細胞などを用いて HCV の複製を抑制する化合物としてサイクロスポリン A、TGF- $\beta$ 、およびミゾリピンを見出した。

分担研究者 下遠野 邦忠  
京都大学ウイルス研究所・教授

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の数十年に亘る持続感染が肝発がん重要な要因であることがこれまでの研究で示されているが、早期の肝がん組織において共通した特定のがん遺伝

子やがん抑制遺伝子の異常は認められておらず、依然として肝発がん機構の詳細は不明である。我々は、HCV 感染増殖により生じる HCV 蛋白質が細胞にとって異質な分子となり、それ自体が宿主側の遺伝子の不安定化や細胞増殖の変化を徐々にもたらすように作用し、最終的な肝発がんに至るのではないかと発がん機

構を想定している。また、HCV の持続感染状態を維持するために、HCV が感染に対する生体防御機構である免疫、特にインターフェロン (IFN) シグナル伝達系の機能低下を引き起こしている可能性も想定している。しかしながら、HCV の効率の良い複製増殖系がないことが、研究を推進するための大きな障害となっている。さらに、HCV を排除できる有効な薬剤も IFN しかないのが現状であり、新規抗 HCV 剤の発見も切望されている。そこで、我々は、上記の仮説を実験的に検証でき、抗 HCV 剤の探索評価も可能と考えられる幾つかの実験システム (HCV レプリコン細胞、HCV 全長ゲノム複製細胞など) を新たに開発して、最終的に肝発がんのメカニズムの解明に迫るとともに、有効な抗 HCV 剤を見出し、肝発がんの予防に役立てることを目的とした。

## B. 研究方法

(1) ヒト不死化肝細胞やヒト大腸がん細胞を用いてこれまでに開発したマイクロサテライト不安定性を定量的に測定できる新しいアッセイ系を用いて解析を行う。このアッセイ系の基本原理は平成14年度総括研究報告書に詳細に記載した通りである。

(2) ヒト不死化肝細胞やヒトがん細胞を用いて塩基除去修復活性を測定できるアッセイ系を開発する。新しいアッセイ系を用いて HCV 蛋白質が塩基除去修復活性に影響を与えるかど

うかの解析を行う。このアッセイ系の構築法については平成14年度および平成15年度総括研究報告書に詳細に記載した通りである。

(3) コア蛋白質発現プラスミドを培養細胞内に導入して、恒常的に産生しているコア蛋白質の発現量が異なる細胞コロニーを分離し樹立する。得られるコア蛋白質産生細胞を用いて種々の薬剤処理による細胞の増殖が、コア蛋白質の有無でどのように変化するかを観察する。

コア蛋白質に会合する細胞側蛋白質の単離を酵母の two-hybrid 系を用いて行う。コア蛋白質と会合する蛋白質の機能解析を行い、コア蛋白質と会合する蛋白質の機能からコア蛋白質の機能を推定する。

(4) HCV 1B-2 株由来の新規 HCV レプリコン細胞株の樹立を試みる。これ迄に樹立してある HCV 1B-1 株由来の 50-1 レプリコン細胞と HCV 1B-2 株由来の新規 HCV レプリコン細胞を IFN で処理することにより、それぞれの細胞より HCV レプリコンを排除した「Cured 細胞」を作成し、HCV レプリコン細胞と Cured 細胞間で約 10,000 遺伝子についてのマイクロアレイ解析を行う。

(5) ヒト不死化肝細胞 (PH5CH8 および NKNT-3) において各種 HCV 蛋白質を恒常的に発現させ、細胞周期や細胞増殖能に及ぼす影響を解析する。

(6) 本研究により新規に開発した HCV 1B-2 株由来の HCV レプリコ

ン (1B-2R1) に HCV 1B-2 株由来のコアから NS2 領域までの部分を結合させ、HCV IRES で drive される G418 抵抗性遺伝子 (Neo<sup>R</sup>) と内部の EMCV IRES で drive される全長 HCV RNA を有する dicistronic な全長 HCV RNA を作成した。この RNA を IFN 処理によりレプリコンを排除した Cured 細胞に導入し、G418 耐性細胞の選択を行う。

上記の dicistronic な全長 HCV RNA の Neo<sup>R</sup> 遺伝子上流に Renilla ルシフェラーゼ遺伝子を組み込み、その RNA を Cured 細胞に導入して、G418 耐性細胞の選択を行う。得られた細胞のクローン化を行う。

(7) 全長 HCV RNA の複製レベルを定量することが可能な動物モデルを開発する。全長 HCV RNA が複製可能な細胞を移植したマウスを構築する。それを用いて全長 HCV RNA の複製レベルをモニターして評価できる系を樹立する。

(8) 50-1 HCV レプリコン細胞に 100 国際単位(IU)/ml の IFN- $\alpha$  を 4-5 日おきに添加しながら数カ月間培養する。その後、細胞より HCV レプリコン RNA を含む総 RNA を回収して、再度ヒト肝 HuH-7 細胞内に導入して G418 抵抗性の細胞のコロニーを形成させる。得られたコロニーに IFN- $\alpha$  或は IFN- $\beta$  を添加して、IFN に抵抗性を示す HCV レプリコン細胞の単離を試みる。

(9) (8) で得られる IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞の性状解析 (レ

プリコン RNA の細胞内複製レベル、IFN に対する抵抗性の程度など) を行う。IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞内で複製増殖しているレプリコン RNA の遺伝子解析を行う。親株の IFN 高感受性 HCV レプリコン細胞と樹立された IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞間で約 20,000 遺伝子についてのマイクロアレイ解析を行う。

(10) IFN に抵抗性を示す HCV レプリコン細胞にサイクロスポリン A を添加して細胞から HCV レプリコンを排除した Cured 細胞をそれぞれ作成する。pISRE-Luc プラスミドを用いたレポーターアッセイにより HCV レプリコン細胞と Cured 細胞における IFN シグナルの伝達度を比較する。IFN 抵抗性レプリコン細胞内で複製している HCV レプリコンの遺伝子解析により見出された Q1737H や M2174V のアミノ酸置換を有する HCV レプリコン RNA 変異体を合成し、Cured 細胞を用いて再度 HCV レプリコン細胞を樹立する。得られるレプリコン細胞に IFN- $\beta$  (200 IU/ml) を添加して IFN 抵抗性の程度を評価する。

(11) IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞について、IFN システムを司る遺伝子群 (IFN 受容体である IFNAR1 と IFNAR2c、およびその下流の Jak1 と Tyk2) の cDNA を RT-PCR で増幅してプラスミドベクターにクローニングしてそれらの塩基配列を決定し比較解析する。親株で IFN 高感受性の 50-1 HCV レプリコン細胞由来の遺伝子を比較対照とする。

(12) 自然免疫に関わるシグナル系が HCV RNA の複製に与える影響を解析する。自然免疫機構のうち二本鎖 RNA により活性化される TLR3 シグナル経路が HCV RNA の複製にどのような効果を及ぼすかを調べる。そのために TLR3 を人為的に発現させた時の HCV RNA の複製能を調べる。

(13) HCV RNA の複製を制御する細胞側因子の解析を行うために、市販されている各種薬剤を HCV レプリコン細胞に添加して、レプリコン RNA の複製レベルの変化を調べる。複製を強く抑制する薬剤が見つかった場合に、その薬剤の作用機序を指標にして複製の分子機構および複製制御の分子機構の解析を行う。

(14) 細胞内での HCV RNA の複製増殖レベルをルシフェラーゼアッセイにより定量的にモニターできる方法を用いて、リバピリンの構造類似体であり既存薬でもあるミゾリピンの抗 HCV 活性を測定し、リバピリンの抗 HCV 活性と比較する。

(15) HCV レプリコンおよび全長 HCV RNA 複製細胞から HCV RNA を抽出し、5'末端標識後、末端の塩基配列を薄層クロマトグラフィーにより決定する。

#### (倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのためには、倫理面への配

慮は特に必要がない。

#### C. 研究結果

(1) 1b 遺伝子型の HCV コア蛋白質がヒト不死化肝細胞 (PH5CH8) においてマイクロサテライト不安定性を増強することをこれ迄に見出していたが、本研究では他の遺伝子型由来のコア蛋白質によっても同様の現象が観察されるかどうかについて検討した。その結果、マイクロサテライト不安定性の増強効果は 1b 型のコア蛋白質で最も顕著であり、2a 型の場合においても認められることが分った。しかし、1a、2b、3a 型由来のコア蛋白質ではほとんどこのような効果は認められなかった。また、このマイクロサテライト不安定性は 100  $\mu$ M の Fe イオン存在下で 1.5 倍程度増強されることも観察された。この現象の分子機序の一つとして、コア蛋白質がミスマッチ修復系に関わる遺伝子群 (hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS2, hMSH3, hPMS1) の発現量を低下させることが想定されたが、RT-PCR 法により解析した結果、コア蛋白質を発現している細胞でこれらの遺伝子群の発現が低下しているという現象は認められなかった。

(2) ヒト培養細胞において 8-oxo グアニンに関する塩基除去修復能を測定できるアッセイ系を構築した。このアッセイ系を用いて、HCV 蛋白質の存在による影響を調べた。その結果、HepG2 細胞を用いた場合、塩基除去修復能力を示す修復効率は HCV 蛋白質が発現していない細胞や

HCV の NS5A を発現している細胞では、約 0.3 の値を示したが、コア蛋白質を発現している細胞では約 0.15 と値が低下していることが分かった。この結果から、コア蛋白質が塩基除去修復能を低下させていることが示唆された。

(3) コア蛋白質を恒常的に発現する培養細胞を複数得た。これらの細胞におけるコア蛋白質の発現を解析したところ、発現量に違いが観察されたので、発現量の違いに応じて3種類に分類した。コア蛋白質発現細胞を種々の細胞増殖制御因子で処理し、細胞増殖性についてアポトーシス感受性の観点で解析した。その結果、all trans retinoic acid (ATRA) で処理した細胞において顕著にアポトーシスが誘導されることが分かった。このアポトーシス誘導性はコア蛋白質の発現量と相関していた。ATRA は核内受容体の一つである RAR $\alpha$  依存的な転写活性を活性化するので、RAR $\alpha$  結合配列を持つレポータープラスミドを用いて転写活性の解析を行った。その結果、RAR $\alpha$  依存的な転写活性化の増強がコア蛋白質の発現で観察された。コア蛋白質による RAR $\alpha$  の転写活性化には細胞内でコア蛋白質と会合して転写活性化を上げる働きを持つ介在分子があると考え、酵母を用いた Two-hybrid 法を用いてコア蛋白質と会合する蛋白質のスクリーニングを行った。その結果、RAR $\alpha$  の転写活性を上げる候補蛋白質として Sp110b が得られたため、この遺伝子の機能解析を行った。その

結果、コア蛋白質が RAR $\alpha$  依存的転写活性に抑制的に作用する Sp110b と会合することにより、RAR $\alpha$  依存的転写活性の高進が引き起こされていることが明らかとなった。RAR $\alpha$  依存的転写活性の高進という現象は、コア蛋白質が Sp110b と会合することにより Sp110b の細胞内局在性が核から細胞質に変わり、Sp110b による RAR $\alpha$  依存的転写活性の抑制が解除されることによるものであることが示唆された。また、ATRA 処理により誘導されるアポトーシスに関与する遺伝子として RAR $\alpha$  の下流に存在する tissue transglutaminase 遺伝子が得られた。

(4) HCV 1B-2 株を感染させたヒト不死化肝 PH5CH8 細胞より HCV ゲノムの NS 領域をコードする cDNA を回収して、それをもとにして新規 HCV レプリコン細胞株、1B-2R1 を樹立した。1B-2R1 レプリコン細胞の性状解析を行い、細胞内で効率よくレプリコン RNA の複製が起こっていることを確認した。

本研究開始前に樹立した HCV 1B-1 株由来の 50-1 HCV レプリコン細胞と今回樹立した 1B-2R1 レプリコン細胞を IFN- $\alpha$  で処理することにより、それぞれの細胞より HCV レプリコンを排除した「Cured 細胞」を得た。これら2種類の HCV レプリコン細胞と Cured 細胞間で約 10,000 遺伝子についてのマイクロアレイ解析を行った。その結果、これら2組の比較解析で共通して HCV レプリコン細胞において2倍以上発現レベルが

上昇する 2 遺伝子 (Phosphatidylserine-specific phospholipase A1  $\alpha$ 、Oncostatin M receptor) と 1/2 以下に低下している 6 遺伝子 (Large multifunctional protease 2 (LMP2)、Large multifunctional protease 7 (LMP7)、Similar to interferon-induced protein 35、Weakly similar to zinc finger protein 91、Protein phosphatase 1, regulatory subunit 1A、Serpine clade C) を特定した。

(5) ヒト不死化肝細胞 (PH5CH8 および NKNT-3) に NS5B 蛋白質を発現させると、IFN- $\beta$  が産生され、S 期進行阻害が引き起こされることが観察された。このような現象は、HeLa や HuH-7 などのヒトがん細胞では認められなかったことから、自然免疫系が正常に働く細胞系においてのみ認められる現象であることが示唆された。

(6) HCV 1B-2 株由来の全長 HCV RNA が細胞内で複製している G418 耐性細胞 (O 細胞) を樹立した。細胞内において HCV RNA が効率良く複製していることを Northern blot および Western blot 解析により確認した。HCV 遺伝子の解析により NS3 のヘリカーゼ領域に複製効率を亢進させる適応変異が 1 カ所存在することを見出した。

Renilla ルシフェラーゼ遺伝子を有する全長 HCV RNA が効率良く複製している G418 耐性細胞を樹立した。この細胞から幾つかのクローン細胞

を得ることが出来、その中から安定的に継代培養ができるクローン細胞 OR6 を得た。OR6 細胞を用いるとルシフェラーゼアッセイを行うことにより HCV RNA の複製レベルを簡便にかつ定量的にモニターできることを実験的に証明した。OR6 細胞を用いて、IFN- $\alpha$  の抗 HCV 作用を定量化した結果、IFN 添加後、72 時間における 50% 阻害濃度は 0.5 IU/ml であることを示した。

(7) 全長 HCV RNA が複製可能な細胞を移植したマウスを構築し、それを用いて HCV RNA の複製レベルを評価する系を樹立するために、全長 HCV RNA が自律的に複製しているヒト肝細胞をマウスに移植して、体内に維持される期間を観察した。その結果、1ヶ月以上に亘り細胞が増殖維持されることが明らかになった。これにより、HCV の複製阻害を定量的に測定可能なマウスモデル系が樹立された。

(8) 50-1 HCV レプリコン細胞に IFN- $\alpha$  の添加を約 5 カ月間に渡って行ったところ、G418 存在下でも増殖を示す細胞が多くなり、若干 IFN 抵抗性の様相を示すようになった。そこで、細胞よりレプリコン RNA を含む総 RNA を抽出回収して、親株の HuH-7 細胞に再度導入し、G418 抵抗性の多数のレプリコン細胞コロニーを再度形成させた。これらのコロニーをプールして、IFN- $\alpha$  の濃度を徐々に増加させ、G418 存在下でも生き残ってくる細胞コロニーの選択作



業を行った。その結果、最終的に IFN- $\alpha$  (2,000 IU/ml) 処理によっても増殖してくる5クローンが得られた。また、IFN- $\beta$ は $\alpha$ よりも強い HCV RNA 複製抑制活性を示したが、IFN- $\beta$  (1,000 IU/ml) 処理によっても増殖してくる別のクローン細胞が4種類得られた。

(9) (8) で得られた IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞 (9クローン) の IFN 抵抗性の程度について解析した。その結果、IFN 添加によりレプリコン RNA のレベルが少し低下する5クローン (IFN 部分抵抗性) と IFN 添加によってもレプリコン RNA のレベルが低下しないに4クローン (IFN 完全抵抗性) に分類することができたことが分った。これらのレプリコン細胞は IFN- $\alpha$ と IFN- $\beta$ の両方に抵抗性を示した。また、IFN に対する抵抗性の度合いとは関係なくこれらのクローン細胞内では効率よく HCV レプリコンの複製が起きていることも Northern および Western blot 解析により確認した。

IFN に抵抗性を示すレプリコン細胞よりレプリコン RNA を RT-PCR により増幅してプラスミドベクターにクローニングの後、それらの塩基配列を決定した。その結果、レプリコン RNA の NS4B 領域に単純継代培養を12ヶ月間行っても出現しないアミノ酸置換が1箇所、すべての IFN 抵抗性レプリコン(9種類)に認められた。それ以外には、IFN に完全抵抗性を示すレプリコン RNA にのみ

NS5A 領域にそれぞれのクローン細胞で特異的なアミノ酸置換が認められた。親株の 50-1 レプリコン細胞と樹立した IFN 抵抗性レプリコン細胞 (完全抵抗性を示す1クローン) 間で約 20,000 遺伝子についてのマイクロアレイ解析を行い、IFN 抵抗性レプリコン細胞において10倍以上発現量が高進している10遺伝子と10分の1以下に低下している6遺伝子を特定した。

(10) ルシフェラーゼレポーターアッセイによる検討の結果、IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞とその Cured 細胞との間で IFN のシグナル伝達度に差は認められなかった。IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞株に認められたアミノ酸置換を有する HCV レプリコンを新規に作成して再度レプリコン細胞を樹立してそれらの IFN 感受性を調べたが、これらの HCV レプリコンが IFN 抵抗性に変化することはなかった。従って、IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞で見出されたレプリコンの遺伝的変異が直接 IFN 抵抗性を誘導するわけではないことが判った。

(11) IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞由来の IFNAR1、IFNAR2c、Jak1 および Tyk2 mRNA の塩基配列解析の結果、Jak1 や Tyk2 には異常は認められなかったが、IFNAR1 や IFNAR2c に高頻度にナンセンス変異や塩基の欠損が認められ、IFN 受容体の mRNA に構造異常が生じていることが明らかとなった。これらの構造異常は IFN に高度に抵抗性を示す

レプリコン細胞に高頻度に認められたが、IFN に部分的抵抗性を示すレプリコン細胞ではほとんど認められなかった。親株の HCV レプリコン細胞でもこのような構造異常は認められなかった。さらに、IFNAR1 mRNA に構造異常を有する HCV レプリコン細胞に正常型の IFNAR1 を発現させると IFN 感受性に変化することを実験的に証明した。

(12) HCV ゲノム自律複製細胞 (HCV レプリコン細胞や全長 HCV RNA 複製細胞) を IFN で処理すると HCV ゲノムの複製は阻害されたが、二本鎖 RNA (この場合ポリ IC) で処理しても HCV RNA の複製は阻害されず、ポリ IC 処理で活性化されるはずの IRF3 の活性化も認められなかった。しかし、この細胞に TLR3 を外来的に発現させると、HCV RNA の複製は強く抑制されることが判った。以上の結果、HCV RNA の複製は二本鎖 RNA により誘導される自然免疫により強く制御されていることが分かった。

(13) 市販の薬の中に HCV RNA の複製を阻害するものがあるかどうかについて HCV レプリコン細胞を用いて解析した。約 100 種類の薬について HCV RNA の複製に及ぼす影響を調べた結果、IFN- $\alpha$ および IFN- $\beta$ に加えて、サイクロスポリン A に強い阻害効果を見出した。サイクロスポリン A と類似の免疫抑制剤である FK506 にはこのような HCV RNA の複製抑制能は観察されなかった。従

って、サイクロスポリン A の免疫抑制能以外の働きが HCV ゲノムの複製阻害に重要であることが示唆された。さらに解析を進めた結果、免疫抑制能がないサイクロスポリンの誘導体でも HCV ゲノム複製抑制能が存在することを確認した。

サイクロスポリン A がどのような機序により HCV RNA の複製を抑制するかについて、サイクロスポリン A が相互作用するタンパク質の中から、可能性のあるタンパク質の機能解析を行った。その結果、サイクロフィリンの機能阻害が HCV RNA の複製阻害を引き起こすことを明らかにした。哺乳動物細胞において知られている 15 種類のサイクロフィリンのうちでどのサイクロフィリンが HCV RNA の複製に関与するかを調べた結果、サイクロフィリン B を siRNA でノックダウンした場合のみ HCV RNA の複製が抑制されることを明らかにした。

HCV RNA の複製を制御する別の薬剤として、TGF- $\beta$ が HCV RNA の複製を強く抑制することを見出した。

(14) ミゾリピンもリバビリン同様、HCV RNA の複製を抑制する作用を有していることを見出した。薬剤添加 3 日後における 50%阻害濃度はリバビリンで 76  $\mu$ M、ミゾリピンで 99  $\mu$ M であり、これらの濃度における細胞増殖速度の低下は認められなかった。次に、IFN- $\alpha$ との併用効果を調べたところ、ミゾリピンはリバビリンと同等以上の抗 HCV 作用を

有することが判った。臨床治療において実際に薬剤を投与された肝炎患者における血中濃度は約 10  $\mu\text{M}$  程度であるが、この濃度においてもミソリピンは IFN- $\alpha$  の抗 HCV 効果を 20%ほど増強することが判った。リバピリン 10  $\mu\text{M}$  の IFN- $\alpha$  に対する増強効果は 15%程度であった。

(15) HCV RNA 複製細胞から抽出した HCV RNA を用いて解析した結果、その 5'末端は G と A が混在していることが判った。複製細胞の樹立に用いた HCV RNA の 5'末端は G であったことから、細胞樹立後の経時的な変化を調べた。その結果、樹立後最初の 1 ヶ月までには、ほとんどの塩基は G であったのに対して 3 ヶ月を経ると G 以外に A も観察された。

#### D. 考察

(1) コア蛋白質によるマイクロサテライト不安定性の増強効果が我が国に多い遺伝子型である 1b 型に顕著に認められた事は、我が国に多発している肝がん患者における 1b 型の比率が高くなっているという現象と合致しているように思われる。不死化肝細胞においてマイクロサテライト不安定性が認められる原因として、不死化肝細胞内で発現している SV40 ラージ T 抗原による p53 の機能低下が考えられたが、p53 を欠損している Saos-2 細胞においてもマイクロサテライト不安定性が認められなかったことから、マイクロサテライト不安定性の出現に p53 の機

能状態は関与していないことが示唆された。コア蛋白質がミスマッチ修復関連遺伝子群の発現量を低下させることはなかったが、コア蛋白質とミスマッチ修復関連酵素との相互作用による機能低下などの別の機序についても検討する必要がある。

(2) コア蛋白質を発現している HepG2 細胞 (ヒト肝癌細胞) では塩基除去修復能の低下が認められたことから、コア蛋白質はマイクロサテライト不安定性などのミスマッチ修復能ばかりでなく、塩基除去修復能にも影響を与えている可能性が示唆された。今後、他のヒト培養肝細胞においてもこのような現象が認められるかどうかを検討する必要がある、このような現象の分子機序の解明に役立つものと思われる。

(3) HCV による肝疾患の発症にはウイルス蛋白質による細胞増殖の制御異常が関与するものと考えられる。コア蛋白質が核内受容体の転写活性を増進させることを明らかにしたことから、この現象は細胞増殖の制御異常に関わるものと考えられる。また、核内転写因子により活性化される細胞側因子は多岐に亘り、その結果細胞増殖も種々に制御されるものと考えられる。今回明らかにした ATRA 添加によるコア蛋白質発現細胞のアポトーシスの誘導は核内受容体の下流に位置する遺伝子の一つ tissue trans-glutaminase によるものと考えられる。これまでに HCV 感染細胞でホルモンの作用により病

態が変化するという報告は多くないが、HCV 感染とレチノイドとが密接に関連することを示唆している。

また、核内受容体の下流の遺伝子の一つに TGF ベータ II が存在するが本因子はコラーゲンの産生を促進することが知られている。HCV 感染患者は肝硬変を発症しやすいと言われているが、これらの患者においては肝組織の線維化も観察される。HCV 感染により生じる肝の線維化にはコア蛋白質のこのような働きが関与する可能性が考えられる。今後この様な方面からの研究が重要であると考えられる。

(4) HCV レプリコンの複製増殖により発現抑制が認められる遺伝子群の中には、免疫プロテアソームのサブユニットである LMP2 と LMP7 が含まれていたことから、HCV レプリコンの増殖により、ウイルス抗原提示能の低下が引き起こされる可能性が示唆される。また、今回、HCV レプリコンの増殖により影響を受ける遺伝子群が特定されたことから、今後、これらの遺伝子の発現レベルが HCV レプリコンにコードされているどの蛋白質によるものなのかを明らかにする必要がある。また、これらの遺伝子の発現制御と HCV の複製や肝疾患がどのように関与しているかについても検討していく必要がある。

(5) NS5B の発現により IFN- $\beta$  が発現誘導される現象は、HCV RNA の複製が起こらなくても、細胞内で

二本鎖 RNA が生成されうることを示唆しており、今後その分子機序を解明する必要がある。IFN- $\beta$  により S 期の進行が遅れるという現象は一見がん細胞の性質とは逆のようではあるが、S 期により長い時間がかかるということを考えれば、様々な外来性因子による DNA の損傷の機会が増すと言うこともできることから、がん化細胞の出現を有利にする現象であるとも言える。このような点についても今後実験的に検証していく必要がある。

(6) 国産の全長 HCV RNA 複製細胞とルシフェラーゼアッセイにより HCV RNA の複製レベルを定量化できる培養細胞系を確立できたことは今後の HCV 研究を大きく前進させることができると考えられる。具体的には経済的にも安価で時間の節約にもなるこの培養細胞システムを用いた抗 HCV 剤の大規模探索が可能であると思われる。また、HCV 蛋白質の細胞内機能を解析するための有用な実験系にもなるものと思われる。

(7) 体内で HCV RNA が複製しているマウスが得られたことは、本マウスを用いてウイルスの複製を制御する薬剤の評価系として使用出来ることを示唆する。この系は今後抗 HCV 剤開発に有用であると考えられる。

(8) これまでに世界中で樹立された HCV レプリコン細胞はすべて IFN に高感受性を示し、G418 存在下ではすべて死滅してしまうことから、実際の

肝炎患者体内に存在する IFN 抵抗性の HCV に対する抗ウイルス剤のスクリーニング系とはなりにくい面があったが、本研究において樹立に成功した HCV レプリコン細胞は IFN- $\alpha$  や IFN- $\beta$  存在下でも HCV レプリコンの複製増殖が起こると予想されることから、IFN の改良或いは IFN との併用を目的とした薬剤のスクリーニング系として有用になるのではないかと考えられる。また、HCV の IFN 抵抗性の分子機序の解明にも有用な実験系になるものと思われる。

(9) 樹立した IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞 (9 クローン) は IFN に対して部分的抵抗性を示す 5 クローンと IFN に対して完全抵抗性を示す 4 クローンの 2 系統に分類できたことから、これらの系統における IFN 抵抗性獲得機序は異なるものと推定される。このような IFN 抵抗性の獲得がウイルス側因子によるものなのか、或いは細胞側因子によるものなのかを明らかにすることは重要である。レプリコン RNA の塩基配列にも IFN 抵抗性にリンクしていると思われる変異が見つかったことから、これらのウイルス側の遺伝的変異が IFN 抵抗性の獲得に関与しているかどうかを実験的に検討していく必要がある。また、IFN 感受性 HCV レプリコン細胞と IFN 完全抵抗性 HCV レプリコン細胞間におけるマイクロアレイ解析でも発現量が大きく異なる宿主遺伝子群が特定されたことから、今後これらの遺伝子群が HCV

レプリコンの IFN 抵抗性の獲得に関与しているのかどうかを実験的に検証していく必要がある。

(10) 本研究においては、HCV レプリコン細胞の IFN 抵抗性は、ウイルス側の遺伝的因子により規定されているわけではなく、宿主側の IFN シグナル伝達系の異常により起こっていることを実験的に示したが、HCV レプリコンの複製増殖が長期間細胞内で起こることにより、IFN のシグナル伝達系に異常が生じるという可能性もあることから、さらなる解析が必要である。

(11) HCV レプリコン細胞が IFN に高度に抵抗性を示す原因として、IFN 受容体の構造異常を明らかにしたが、このような遺伝子異常が IFN 治療を受けた患者の肝臓で実際に起こっているかどうかについては不明であり、今後の解析が必要である。IFN に部分的抵抗性を示す HCV レプリコン細胞では IFN 受容体の構造異常はほとんど認められなかったことから、別の宿主因子の遺伝子異常或は別の分子機序が考えられる。この点についても、さらなる解析が必要である。

(12) HCV RNA の複製が自然免疫機構により強く抑制されるという事実、すなわち、二本鎖 RNA によりプライムされる IFN シグナルの初期過程が正常に働く場合には IFN の効果が強く現れるが、そうでない場合には内在性の IFN 産生は強く抑制され結果として HCV RNA の複製を許

すものと考えられる。これが感染患者の生体内でも生じていることであれば、IFN 投与に加えて自然免疫を外因的に活性化すれば効率良く HCV の複製を抑制出来るものと考えられる。

(13) 免疫抑制活性のないサイクロスポリンの誘導体でも HCV RNA の複製を阻害する活性を有していたことから、本研究において見出したサイクロスポリン A の HCV RNA の複製阻害活性は免疫抑制機序とは異なる機序によるものと考えられる。

本研究ではサイクロスポリン A による HCV RNA の複製阻害機構の解析によりサイクロスポリン A の抗 HCV 作用はサイクロフィリン B の機能阻害によるものであることを明らかにした。従って、今後はサイクロフィリン B を標的にした新規抗 HCV 剤の開発が可能になるものと思われる。

サイクロスポリン A とは別に本研究では TGF- $\beta$  も HCV RNA の複製を抑制する活性を有していることを見出したが、その際に細胞の増殖も抑制されたので、HCV RNA の複製増殖に関与する因子が細胞の増殖を制御する因子にも関連しているものと考えられる。

(14) ミゾリピンは我が国では抗リウマチ薬などとして認可使用されている薬剤であり、リバビリンの使用で問題になっている貧血などの副作用がほとんどないことと、リバビリンと同等以上の抗 HCV 作用が期

待されることから、高齢者を中心にした IFN との併用による抗 HCV 療法に十分使用できるものと思われる。早期の臨床試験の開始が望まれる。ミゾリピンやリバビリンはイノシン酸デハイドロゲナーゼの阻害剤として知られているが、同じ阻害剤であるミコフェノール酸には抗 HCV 作用を確認出来なかったことから、この酵素阻害が抗 HCV 作用に直接関わっているとは考えにくく、免疫作用などの他の機序によるものと思われる。

(15) 本研究による解析の結果から細胞内で複製している HCV RNA の 5'末端には特別な修飾構造は存在せず、単にリン酸が付加した状態になっているものと考えられた。

## E. 結論

(1) 我が国に多い遺伝子型である 1b や 2a 型由来のコア蛋白質がマイクロサテライト不安定性を増強させることが分った。このようなマイクロサテライト不安定性は Fe イオン存在下で増強されることを明らかにした。

(2) 培養細胞を用いて塩基除去修復能を測定できるアッセイ系を構築した。このアッセイ系を用いて、コア蛋白質が塩基除去修復能を低下させることを見出した。

(3) コア蛋白質発現細胞の ATRA 処理により細胞のアポトーシスが亢進することを見出した。この現象の分子機序の解析により、コア蛋白質が核内受容体 RAR $\alpha$  に対して転写抑制的に作

用する新規因子 Sp110b に会合して核内受容体を活性化することを明らかにした。

(4) 新規 HCV レプリコン細胞株、1B-2R1 を樹立した。HCV レプリコンの複製増殖により発現量に変化を受ける宿主遺伝子群をマイクロアレイ解析により特定した。

(5) NS5B をヒト肝細胞内で発現させると、IFN- $\beta$ が産生され、S 期の進行阻害が引き起こされることを明らかにした。

(6) 細胞内での HCV RNA の複製増殖レベルを定量的にモニターできる方法を開発した。

(7) マウスを用いて HCV RNA の複製を定量化できる方法を開発した。

(8) IFN- $\alpha$ や $\beta$ 存在下でも HCV レプリコンの複製が抑制されない細胞の樹立に成功した。

(9) 樹立した IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞には IFN に部分的抵抗性を示すものと完全抵抗性を示すものの 2 種類存在することと、IFN 抵抗性を示す細胞由来のレプリコンゲノムにも特徴的な遺伝的変異が認められることを明らかにした。

(10) HCV レプリコンの IFN 抵抗性の獲得には宿主側因子の変化が主に寄与していることが判った。

(11) IFN に高度に抵抗性を示す HCV レプリコン細胞では 2 種類の IFN 受容体のどちらかで異常が生じ、機能欠損型になっていることを明らかにした。

(12) 自然免疫を調節する細胞側因子である TLR3 が HCV の増殖制

御に重要であることを見出した。

(13) サイクロスポリン A が HCV RNA の複製に対する強い阻害活性を有することを見出し、その作用機序を解析した結果、免疫抑制能以外の働きによることを明らかにした。さらに解析を進めた結果、HCV RNA の複製を制御する細胞側因子としてサイクロフィリン B の存在を明らかにした。

HCV RNA の複製に対する別の抑制剤として TGF- $\beta$ を新たに見出した。

(14) リウマチ薬などとして既に用いられているミゾリピンがリバビリンと同程度の抗 HCV 作用を示すことを明らかにした。

(15) 細胞内で複製している HCV RNA の 5'末端構造を明らかにした。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Kishine, H., Sugiyama, K., Hijikata, M., Kato, N., Takahashi, H., Noshi, T., Nio, Y., Hosaka, M., Miyanari, Y. and Shimotohno, K. Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293, 993-999, 2002.
2. Nozaki, A. and Kato, N. Quantitative method of intracellular hepatitis C virus RNA using LightCycler PCR. *Acta Med. Okayama*, 56, 107-110, 2002.
3. Alam, S.S., Nakamura, T., Naganuma, A., Nozaki, A., Nouse, K., Shimomura, H. and Kato, N. Hepatitis C virus

- quasispecies in cancerous and noncancerous hepatic lesions: The core protein-encoding region. *Acta Med. Okayama*, 56, 141-147, 2002.
4. Hara, K., Ikeda, M., Saito, S., Matsumoto, S., Numata, K., Kato, N., Tanaka, K. and Sekihara, H. Lactoferrin inhibits hepatitis B virus infection in cultured human hepatocytes. *Hepatology Res.*, 24, 228-235, 2002.
  5. Shimotohno, K., Watashi, K., Tsuchihara, K., Fukuda, K., Marusawa, H., Hijikata, M. Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation. *J. Gastroenterol.*, 37, 50-54, 2002.
  6. Ueda, Y., Hijikata, M., Takagi, S., Takada, R., Takada, S., Chiba, T., Shimotohno, K. Wnt/beta-catenin signaling suppresses apoptosis in low serum medium and induces morphologic change in rodent fibroblasts. *Int. J. Cancer.*, 99, 681-688, 2002.
  7. Nozaki, A., Ikeda, M., Naganuma, A., Nakamura, T., Inudoh, M., Tanaka, K and Kato, N. Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. *J. Biol. Chem.*, 278, 10162-10173, 2003.
  8. Kato, N., Sugiyama, K., Namba, K., Dansako, H., Nakamura, T., Takami, M., Naka, K., Nozaki, A. and Shimotohno, K. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306, 756-766, 2003.
  9. Dansako, H., Naganuma, A., Nakamura, T., Ikeda, F., Nozaki, A. and Kato, N. Differential activation of interferon-inducible genes by hepatitis C virus core protein mediated by the interferon stimulated response element. *Virus Res.*, 97, 17-30, 2003.
  10. Suzuki, K., Aoki, K., Ohnami, S., Yoshida, K., Kazui, T., Kato, N., Inoue, K., Kohara, M. and Yosida, T. Adenovirus-mediated gene transfer of Interferon alpha improves dimethinitrosamine-induced liver cirrhosis in rat model. *Gene Ther.*, 10, 765-773, 2003.
  11. Suzuki, K., Aoki, K., Ohnami, S., Yoshida, K., Kazui, T., Kato, N., Inoue, K., Kohara, M. and Yoshida, T. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon alpha inhibits hepatitis C virus replication in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307, 814-819, 2003.
  12. Naganuma, A., Dansako, H., Nakamura, T., Nozaki, A. and Kato, N. Promotion of microsatellite instability by hepatitis C virus core protein in human non-neoplastic hepatocyte cells. *Cancer Res.*, 64, 1307-1314, 2004.
  13. Watashi, K., Hijikata, M., Hosaka, M., Yamaji, M. and Shimotohno, K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology*, 38, 1282-1288, 2003.
  14. Watashi, K., Hijikata, M., Tagawa, A., Doi, T., Marusawa, H. and Shimotohno, K. Modulation of retinoid signaling by a cytoplasmic viral protein via sequestration of Sp110b, a potent transcriptional corepressor of retinoic acid receptor, from the nucleus. *Mol. Cell. Biol.*, 23,



- 7498-7509, 2003.
15. Miyanari, Y., Hijikata, M., Yamaji, M., Hosaka, M., Takahashi, H., and Shimotohno, K. Hepatitis C virus Non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *J. Biol. Chem.*, 78, 50301-50308, 2003.
  16. Ohshima, T. and Shimotohno, K. TGF- $\beta$  mediated signaling via the p38 MAP kinase pathway activates Smad-dependent transcription through SUMO-1 modification of Smad4. *J. Biol. Chem.* 278, 50833-50842, 2003.
  17. Watashi, K., and Shimotohno, K. The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: A novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation by nuclear hormone receptors. *Cancer Sci.*, 94, 937-943, 2003.
  18. Namba, K., Naka, K., Dansako, H., Nozaki, A., Ikeda, M., Shiratori, Y., Shimotohno, K. and Kato, N. Establishment of hepatitis C virus replicon cell lines possessing interferon-resistant phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323, 299-309, 2004.
  19. Abe, K., Ikeda, M., Dansako, H., Naka, K., Shimotohno, K. and Kato, N. cDNA microarray analysis To compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells. *Virus Res.*, 107, 73-81, 2005.
  20. Tamura, K., Oue, A., Tanaka, A., Shimizu, N., Takagi, H., Kato, N., Morikawa, A. and Hoshino, H. Efficient formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing the native forms of hepatitis C virus envelope proteins detected after sonication. *Microbes Infect.*, 7, 29-40, 2005.
  21. Kato, N., Nakamura, T., Dansako, H., Namba, K., Abe, K., Nozaki, A., Naka, K., Ikeda, M. and Shimotohno, K. Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J. Gen. Virol.*, 86, 645-656, 2005.
  22. Shimakami, T., Hijikata, M., Luo, H., Ma, Y. Y., Kaneko, S., Shimotohno, K. and Murakami, S. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J. Virol.*, 78, 2738-2748, 2004.
  23. Zhang, J., Yamada, O., Sakamoto, T., Yoshida, H., Iwai, T., Matsushita, Y., Shimamura, H., Araki, H. and Shimotohno, K. Down-regulation of viral replication by adenoviral-mediated expression of siRNA against cellular cofactors for hepatitis C virus. *Virology*, 320, 135-143, 2004.
  24. Ohshima, T., Koga, H. and Shimotohno, K. : Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.*, 279, 29551-29557, 2004.
  25. Lin, J-Y. Ohshima, T. and Shimotohno, K.: Association of Ubc9, an E2 ligase for SUMO conjugation, with p53 is regulated by phosphorylation of p53. *FEBS Letters*, 573, 15-18, 2004.

26. Iwai, A., Marusawa, H., Matsuzawa, S., Fukushima, T., Hijikata, M., Reed J. C., Shimotohno, K. and Chiba, T. : Siah-1L, a novel transcript variant belonging to the human Siah family of proteins, regulates b-catenin activity in a p53-dependent manner. *Oncogene*, 23, 7593-7600. 2004.
27. Kodama, Y., Hijikata, M., Kageyama, R., Shimotohno, K. and Chiba, T. : The role of Notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology*, 127, 1775-1786. 2004.
28. Murata, T., Ohshima, T., Yamaji, M., Hosaka, M., Miyanari, Y., Hijikata, M., and Shimotohno, K. Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. *Virology*, 331:407-417, 2005.
29. Takahashi, H., Yamaji, M., Hosaka, M., Kishine, H., Hijikata, M., and Shimotohno, K. Analysis of the 5' end structure of HCV subgenomic RNA replicated in a Huh7 cell line. *Intervirology*, 48, 104-111, 2005.
30. Obata, Y., Yamamoto, K., Miyazaki, M., Shimotohno, K., Kohno, S., Matsuyama, T. Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3. *J. Biol. Chem.*, 280, 18355-18360, 2005.
31. Ikeda, M., Abe, K., Dansako, H., Nakamura, T., Naka, K. and Kato, N. Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press (2005)
32. Naka, K., Ikeda, M., Abe, K., Dansako, H., and Kato, N. Mizoribine Inhibits hepatitis C virus RNA replication: effect of combination with interferon-a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press (2005)
33. Li, K., Chen, Z., Kato, N., Gale, M. Jr., and Lemon, S. M. Distinct poly-I:C and virus-activated signaling pathways leading to interferon-b production in hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, in press (2005)
34. Zhang, J., Yamada, O., Sakamoto, T., Yoshida, H., Araki, H., Shimotohno, K. Exploiting cis-Acting Replication Elements To Direct Hepatitis C Virus-Dependent Transgene Expression. *J. Virol.*, 79, in press, 2005.

#### 学会発表

- 野崎 昭人、長沼 篤、能祖 一裕、下村 宏之、加藤 宣之、肝癌および非癌部におけるC型肝炎ウイルスの準種：コア蛋白質をコードしている領域、第61回日本癌学会総会、東京、平成14年10月、
- 団迫 浩方、長沼 篤、野崎 昭人、加藤 宣之、C型肝炎ウイルスコア蛋白質によるインターフェロンシグナル伝達経路の活性化、第61回日本癌学会総会、東京、平成14年10月、
- 野崎 昭人、中村 孝志、長沼 篤、能祖 一裕、下村 宏之、加藤 宣之、肝癌および非癌部におけるC型肝炎ウイルスの準種：コア蛋白質をコードしている領域、第50回日本ウイルス学会総会、札幌、平成14年10月、
- 団迫 浩方、長沼 篤、中村 孝

- 志、高見 まり香、野崎 昭人、加藤 宣之、C型肝炎ウイルスコア蛋白質のインターフェロン刺激応答配列に対する転写活性化能、第50回日本ウイルス学会総会、札幌、平成14年10月
- 5.高橋 仁、土方 誠、岸根 弘依、熨斗 武、仁尾 泰徳、保坂 匡洋、宮成 悠介、杉山 和夫、加藤 宣之、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルス持続複製(full-genome replicon)細胞の構築、第50回日本ウイルス学会、札幌、平成14年10月
- 6.保坂 匡洋、土方 誠、岸根 弘依、高橋 仁、熨斗 武、仁尾 泰徳、宮成 悠介、杉山 和夫、加藤 宣之、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルス(HCV)full-genome repliconの構築、第50回日本ウイルス学会、札幌、平成14年10月、
- 7.宮成 悠介、土方 誠、岸根 弘依、熨斗 武志、高橋 仁、仁尾 泰典、保坂 匡洋、杉山 和夫、加藤 宣之、下遠野 邦忠、新規C型肝炎ウイルス(HCV) Subgenomic Repliconを用いたゲノム複製機構の解析、第50回日本ウイルス学会、札幌、平成14年10月、
- 8.団迫 浩方、長沼 篤、中村 孝志、高見 まり香、野崎 昭人、加藤 宣之、インターフェロン刺激応答配列を介したC型肝炎ウイルスコア蛋白質の転写活性化能、第25回、日本分子生物学会総会、横浜、平成14年12月
- 9.中村 孝志、野崎 昭人、長沼 篤、能祖 一裕、下村 宏之、加藤 宣之、肝癌および非癌部におけるC型肝炎ウイルスの準種：コア蛋白質をコードしている領域、第25回日本分子生物学会総会、横浜、平成14年12月
- 10.野崎 昭人、中村 孝志、犬童 道治、長沼 篤、高見まり香、池田 正徳、田中 克明、加藤 宣之、C型肝炎ウイルスエンベロープE2蛋白質とヒトラクトフェリンとの相互作用、第25回日本分子生物学会総会、横浜、平成14年12月
- 11.野崎 昭人、加藤 宣之、田中 克明、ラクトフェリンのC型肝炎ウイルス(HCV) E2エンベロープ蛋白質結合領域の同定、第10回浜名湖シンポジウム、浜松、平成14年12月
- 12.高橋 仁、岸根 弘依、仁尾 泰徳、保坂 匡洋、宮成 悠介、土方 誠、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルス持続複製(subgenomic replicon)細胞の抗ウイルス剤スクリーニングに対する有効性の検討、第12回抗ウイルス化学療法研究会、東京、平成14年3月
- 13.松本 美貴子、土方 誠、下遠野 邦忠、HCVNS5A タンパク質と相互作用する宿主細胞因子の検索、第50回日本ウイルス学会、札幌、平成14年10月
- 14.川田 早苗、有海 康雄、下遠野 邦忠、Tax 発現細胞におけるp21(Waf1/Cip1)の機能、第25回日本分子生物学会年会、横浜、平成14年12月、
- 15.宮成 悠介、土方 誠、保坂 匡洋、山路 剛史、高橋 仁、岸根 弘依、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルスRNAゲノム複製機構の解析、第25回日本分子生物学会年会、横浜、平成14年12月
- 16.加藤 宣之、杉山 和夫、団迫 浩方、仲 一仁、野崎 昭人、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルス感染ヒト肝細胞由来の新規HCVサブジェノミックレプリコン細胞の樹立、第62回日本癌学会総会、名古屋

- 屋、平成 15 年 9 月
17. 団迫 浩方、仲 一仁、長沼 篤、野崎 昭人、加藤 宣之、ヒト培養細胞における C 型肝炎ウイルス蛋白質の DNA 修復能に及ぼす影響、第 6 2 回日本癌学会総会、名古屋、平成 15 年 9 月
18. 加藤 宣之、杉山 和夫、難波 克行、団迫 浩方、中村 孝志、仲 一仁、野崎 昭人、下遠野 邦忠 C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染ヒト肝細胞由来の新規 HCV subgenomic replicon 細胞の樹立、第 5 1 回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成 15 年 10 月
19. 阿部 健一、野崎 昭人、中村 孝志、仲 一仁、池田 正徳、田中 克明、加藤 宣之、C 型肝炎ウイルス E2 エンベロープ蛋白質に結合活性を有するラクトフェリン由来ペプチドの解析、第 5 1 回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成 15 年 10 月
20. 団迫 浩方、中村 孝志、仲 一仁、野崎 昭人、加藤 宣之、C 型肝炎ウイルス蛋白質によるインターフェロンシグナル伝達系の活性化、第 5 1 回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成 15 年 10 月
21. 中村 孝志、団迫 浩方、難波 克行、田村 隆彦、仲 一仁、野崎 昭人、下遠野 邦忠、加藤 宣之、長期培養における C 型肝炎ウイルス subgenomic replicon の遺伝的変異と多様性、第 5 1 回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成 15 年 10 月
22. 難波 克行、仲 一仁、中村 孝志、団迫 浩方、野崎 昭人、白鳥 康史、下遠野 邦忠、加藤 宣之、インターフェロン抵抗性 C 型肝炎ウイルス subgenomic replicon 細胞の樹立、第 5 1 回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成 15 年 10 月
23. Kato, N., Nakamura, T., Dansako, H., Namba, K., Tamura, T., Nozaki, A., Naka, K. and Shimotohno, K. Genetic evolution of hepatitis C virus subgenomic replicon in long-term culture. 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Kyoto Japan, 2003.
24. Naka, K., Namba, K., Nakamura, T., Dansako, H., Nozaki, A., Shimotohno, K. and Kato, N. Establishment of interferon-resistant hepatitis C virus subgenomic replicons. 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Kyoto Japan, 2003.
25. Kato, N., Sugiyama, K., Namba, T., Dansako, H., Nakamura, T., Naka, K., Nozaki, A. and Shimotohno, K. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related viruses, Kyoto Japan, 2003.
26. Dansako, H., Naganuma, A., Nakamura, T., Nozaki, A. and Kato, N. Differential activation of interferon-inducible genes by hepatitis C virus core protein mediated with the interferon