

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

C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた
治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウス
HCV感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 茶山 一彰

平成18年（2006）年3月

目 次

I. 総括研究報告

- C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウス HCV 感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究 1
茶山 一彰

II. 分担研究報告

1. キメラマウス中のヒト肝細胞 HBV リセプター探索の試み 5
吉里 勝利
2. 慢性肝炎におけるゲノミクス情報の活用 8
金子 周一
3. HCV 増殖に関わる細胞機能の検索 10
土方 誠
4. インターフェロン遺伝子治療効果増強の試み 12
高倉 喜信
5. 脂質代謝制御による抗 HCV 戦略の検討 14
榎本 信幸
6. C型肝炎ウイルスの感染機構 17
松浦 善治
7. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルスの感染実験 20
高橋 祥一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷 29

I. 総括研究報告

C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウス HCV 感染モデルを用いた 実証系の開発に関する研究

主任研究者 茶山一彰 広島大学病院消化器内科 教授

研究要旨：マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換された、ヒト肝細胞キメラマウスに野生型や変異株型の B 型および C 型肝炎ウイルスを投与し、持続感染させることに成功した。このモデルマウスは抗ウイルス剤の効果判定に有用であり、さらにはウイルス蛋白の機能解析にも有用であった。また、ラミブジン投与中に検出された YMDD モチーフに変異がなく、polumerase RT 領域 B domain にアミノ酸変異を持つ genome がラミブジン耐性に関与していることも本マウスを用いて確認することが可能であった。本モデルマウスは、肝炎ウイルスの分子生物学的検討や変異ウイルスの生物学的意義の解明などの *in vivo* 研究に広く応用が可能であると思われる。

【分担研究者】

吉里勝利 広島大学大学院理学研究科
教授
金子周一 金沢大学大学院医学系研究科
教授
土方 誠 京都大学ウイルス研究所
助教授
高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科
教授
榎本信幸 山梨大学医学部内科学講座第一
教授
松浦善治 大阪大学微生物病研究所
教授
高橋祥一 自然科学研究支援開発センター
助手

【班長研究協力者】

脇田隆字 東京都神経科学総合研究所
微生物研究部門
研究員

A. 研究目的

肝炎ウイルスに感染する小動物モデルは確立されておらず、生体内における感染・複製のメカニズムの解明は困難である。本研究は、

マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスを用いて肝炎ウイルス感染マウスを作製し、このマウスを用いてウイルス増殖のメカニズムの解明や変異ウイルスの分子生物学的解明を行う。

B. 研究方法

Alb-uPA Tg マウスと重症免疫不全である SCID マウスを交配させた uPA-SCID マウスにヒト肝細胞を経脾的に投与し、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換された、ヒト肝細胞キメラマウス（キメラマウス）を用いた。キメラマウスへ B 型（HBV）および C 型肝炎ウイルス（HCV）陽性患者血清や HBV を産出する細胞培養上清を経静脈的に投与後、定時的にマウス血液を採取し、血中 HBV-DNA および HCV-RNA を測定した。さらにはラミブジン投与中に、YMDD motif に変異のない新規ラミブジン耐性 HBV genome が検出され、ウイルス再増殖および肝炎の再燃を認めた患者血清を投与した。

なお、血清を用いる患者には、あらかじめ本研究目的を説明し、同意を得た。また、

マウスの処置の際は、ジエチルエーテルを用いた麻酔下に行い、マウスの苦痛はごく軽度にとどまるものと思われる。

C. 結果

HBV 陽性血清の投与により、 $10^7 \sim 10^9$ copies/mL のウイルス血症が長期にわたり持続した。肝免疫組織学的検討において、ヒトアルブミン陽性のヒト肝細胞は、HBc-Ag 陽性であり、置換されたヒト肝細胞に特異的に HBV が感染していることが確認された。この HBV 感染マウスに 30 mg/kg/日のラミブジンを経口投与すると、血中 HBV-DNA は著明に低下した。

- ・ 1.4 倍長の HBV ゲノムを組み込んだ plasmid を作製し、HepG2 細胞に stable transfection し、上清中に約 10^6 copies/mL の HBV を恒常的に産出する細胞を作製した。野生型の YMDD 株と同時に、ラミブジン耐性である YVDD 株を産出する細胞も作製した。これらの細胞の培養上清をキメラマウスへ投与することにより、HBV 感染が確認された。これらの感染マウスに 30 mg/kg/day のラミブジンを経口投与したところ、YMDD 株感染マウスでは血中 HBV-DNA は低下したが、YVDD 株感染マウスでは低下しなかった。

- ・ e 抗原の機能解析のため、e 抗原を欠失させたコンストラクトを作製し、その培養上清をキメラマウスに投与したところ、HBV 感染が成立した。このことより、e 抗原は HBV の感染・複製には必須ではないことが示された。

- ・ HCV 陽性患者血清の投与により、 $10^6 \sim 10^7$ copies/mL のウイルス血症が長期にわたり持続した。この HCV 感染マウスへ 7000 単位/kg/day の IFN- α を連日筋注したところ、血中 HCV-RNA 量は感度以下に低下した。また IFN- α の投与中止により、HCV-RNA は再陽性化した。

- ・ ラミブジン耐性を得た患者血清より HBV-DNA を抽出し、direct sequence 法を用いて、HBV polymerase 領域のアミノ酸変異を同定したところ、ラミブジン耐性獲得前後の HBV polymerase のアミノ酸比較にて、spacer 領域に 1 ヶ所、reverse transcriptase (RT) 領域の B domain に 1 ヶ所、計 2 ヶ所のアミノ酸変異を認め、YMDD motif には変異を認めなかった。また、B domain に認められたアミノ酸変異に伴う

HBsAg のアミノ酸変異は、過去に報告のない新しい変異であった。

- ・ この HBV-DNA を用いて 1.4 倍長のラミブジン耐性 HBV genome を挿入した HBV 産生 plasmid を作成し、HepG2 細胞に transient transfection し、in vitro においてラミブジン感受性を評価した。野生株、spacer 領域のアミノ酸変異のみ、RT 領域の B domain のアミノ酸変異のみ、spacer および B domain どちらも変異ありの 4 種類の HBV 産生株で検討し、IC₅₀ 値はそれぞれ 0.19、0.23、0.58、0.57 (μ M) を示した。以上より、RT 領域の B domain のアミノ酸変異は、野生株と比べ 3 倍のラミブジン耐性を示したが、spacer 領域のアミノ酸変異はラミブジン耐性に関与していないことが証明された。Laboratory strain を用いた in vitro study においても同様の結果であった。一方この変異株は、アデフォビル、エンテカビルに対して、野生株と同等のウイルス増殖抑制効果を認めた。

- ・ ラミブジン耐性患者血清および野生型 HBV 患者血清をキメラマウス各 2 匹ずつに投与したところ、2 群とも高い HBV-DNA 量を伴う持続感染を確認した。患者血清投与 12 週もしくは 13 週よりラミブジンを経口投与し、投与 6 週後の HBV-DNA 量の変化は野生株群で -2.8 log copies/ml(mean)、ラミブジン耐性群で -0.39 log copies/ml(mean) であり、ラミブジン耐性群で明らかにウイルス量の変化が少なかった。

D. 考察

キメラマウスを用いて有効な肝炎ウイルス感染モデルマウスが作製された。作製したモデルは、既知の抗ウイルス剤の効果判定に有用あり、今後、新規候補となる抗ウイルス剤の生体内における効果判定としても有用であると思われる。また、今回我々は YMDD motif に変異のない新規ラミブジン耐性 HBV genome を検出し、in vitro study にて RT 領域の B domain のアミノ酸変異により 3 倍のラミブジン耐性を獲得することを証明し、キメラマウスを用いた in vivo study においてもラミブジン耐性を証明することができた。ラミブジン耐性とそのアミノ酸変異との関連については以前 Yeh らにより報告されている。しかし彼らの症例は YMDD 変異株出現後の経過中にこのアミノ酸変異が出現しており、また B

domain のアミノ酸変異に伴う HBsAg のアミノ酸変異は我々のものと異なっていた。今回我々がラミブジン耐性として同定した B domain のアミノ酸変異は、過去にファミシクロビル、アデフォビルにおいても耐性との関与が指摘されており、多剤耐性に関与する重要なアミノ酸変異である可能性がある。今後、各種核酸アナログ投与症例において、このアミノ酸変異も念頭に注意を払っていく必要があると考える。

E. 結論

リバーシジェネティクス法により種々の変異ウイルスを血中に有するマウスの作製が可能であり、生体内における肝炎ウイルスの分子生物学的な検討や変異ウイルスの生物学的解明に、広く応用が可能であると思われる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hiromi Yatsuji, Chiemi Noguchi, Nobuhiko Hiraga, Nami Mori, Masataka Tsuge, Michio Imamura, Kazuaki Chayama et al. Emergence of a novel lamivudine-resistant mutant with no amino acid substitution in the YMDD motif. (in submission)
2. Noguchi C, Ishino H, Tsuge M, Fujimoto Y, Imamura M, Takahashi S, Chayama K. G to A hypermutation of hepatitis B virus. *Hepatology*. 2005 Mar;41(3):626-33.
3. Tsuge M, Takaishi H, Hiraga N, Noguchi C, Oga H, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Chayama K, Tateno C, Yoshizato K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 2005;42:1046-54.
4. Takahashi S, Chayama K. Integration of hepatitis B virus DNA and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005 Aug;20(8):1141-2.
5. Tanaka E, Matsumoto A, Suzuki F, Kobayashi M, Mizokami M, Tanaka Y, Okanoue T, Minami M, Chayama K, Imamura M, Yatsushashi H, Nagaoka S,

Yotsuyanagi H, Kawata S, Kimura T, Maki N, Iino S, Kiyosawa K; HBV Core-Related Antigen Study Group. Measurement of hepatitis B virus core-related antigen is valuable for identifying patients who are at low risk of lamivudine resistance. *Liver Int*. 2006 Feb;26(1):90-6.

6. Yamaguchi A, Tazuma S, Nishioka T, Ohishi W, Hyogo H, Nomura S, Chayama K. Hepatitis C virus core protein modulates fatty acid metabolism and thereby causes lipid accumulation in the liver. *Dig Dis Sci*. 2005 Jul;50(7):1361-71.

7. Kanno K, Tazuma S, Nishioka T, Hyogo H, Chayama K. Angiotensin II participates in hepatic inflammation and fibrosis through MCP-1 expression. *Dig Dis Sci*. 2005 May;50(5):942-8.

8. Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology*. 2005;128(1):138-46.

2. 学会発表

- ・平賀信彦, 他. ヒト肝細胞キメラマウスを用いたC型肝炎ウイルス感染マウスモデル作製に寄与する因子の検討. 第41回日本肝臓学会総会. 平成17年6月6日、大阪。
- ・今村道雄, 他. ヒト肝細胞キメラマウスを用いたリバーシジェネティクスによるHBV感染モデルマウスの作製. 第36回日本肝臓学会大会. 平成17年10月6日、神戸。
- ・Takahashi S, et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. 第56回AASLD. 平成17年11月16日、サンフランシスコ。

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし

II. 分担研究報告

C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウス HCV 感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究班

分担研究報告書

キメラマウス中のヒト肝細胞 HBV レセプター探索の試み

分担研究者 吉里勝利 広島大学大学院理学研究科 教授

研究要旨 肝臓のプロテオーム解析による肝炎、繊維化、発癌に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索と新規治療法の開発を目的として、キメラマウス肝臓におけるプロテオーム解析法の確立を行った。また、免疫沈降法とプロテオーム解析を利用した HCV レセプター探索法をほぼ確立することができた。

A. 研究目的

これまでの研究からヒト肝細胞キメラマウス（以下、キメラマウス）にはヒト肝炎ウイルスが感染し増幅することが既に確認されている。本年度は、肝臓のプロテオーム解析による肝炎、繊維化、発癌に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索と新規治療法の開発の一環として、(1) キメラマウス肝臓におけるプロテオーム解析法の確立、(2) プロテオーム解析による肝炎に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索を目指した。

B. 研究方法

肝臓のプロテオーム解析による肝炎、繊維化、発癌に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索と新規治療法の開発

(1) キメラマウス肝臓を利用したヒト肝細胞プロテオーム解析法の確立

キメラマウス肝臓中のヒト肝細胞のプロテオーム解析を行うことを計画している。実験は、同一ドナーの肝細胞を移植して得られたキメラマウスを用いて行った。キメラマウス肝臓には、ヒト肝細胞、マウス肝細胞、マウス非実質細胞が含まれている。キメラマウス肝臓からコラゲナーゼ灌流法により肝臓細胞を得て、これから 95%以上の純度のヒト肝細胞を分離することは可能である。しかし、実験の度にこの操作を行うことは煩雑で現実的ではない。一方、高置換キメラマウスにおいては、ヒト肝細胞に置換された領域とマウスの領域を肉眼的に見分けることができる。そこで、70%以上の高置換キメラマウス肝臓組織のヒト置換部（3匹）、70%以上の高置

換キメラマウス肝臓からコラゲナーゼ灌流により得たヒト肝細胞（純度 95%、3匹）、キメラマウス作製に使用したドナーヒト肝細胞（1例）、ヒト肝臓組織（3例）及びこれらにコラゲナーゼ灌流を施して得られたヒト肝細胞（3例）、マウス肝臓組織（uPA-/-/SCIDマウス、1匹）を準備し、2次元電気泳動を行い、蛋白質の分布パターンを比較した。キメラマウス肝臓組織および肝細胞は文部科学省知的クラスターより、ヒト肝臓組織は広島大学大学院医歯薬総合研究科より入手した。

(2) プロテオーム解析による肝炎に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索

C型肝炎の新規薬剤標的分子候補となりえる HCV レセプター探索法の確立を目指した。実験従事者の感染リスクが低い感染モデル系として HBV Pre-S 抗原をキメラマウスに投与し、疑似感染系を作成した。HBV Pre-S 抗原のキメラマウス体内のヒト肝細胞表面に対する親和性の確認をプロテオーム解析および免疫沈降法により実施した。キメラマウスに尾静脈から HBV Pre-S 抗原を注入後に、キメラマウスの門脈より生理食塩水を注入し、肝臓内より血液を除去し架橋剤を注入した。架橋反応後に、キメラマウス肝臓のヒト置換領域を採取し、タンパク質を抽出した。得られたタンパク質画分を、抗 Pre-S 抗体を CNBr-activated Sepharose に固定化したビーズを用いた免疫沈降法により精製した。この操作により得られた抗 Pre-S 抗体への結合画分を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析を行った。陰性対象としては、HBV

Pre-S 抗原を注入していないキメラマウスから調製したタンパク質画分を、陽性対象としては Pre-S 抗原そのものを用いた。キメラマウスは(株)フェニックスバイオより購入した。

(倫理面への配慮)

本年度の解析は、ヒト肝細胞キメラマウス及び組換え型 Pre-S 抗原を用いて実施した。ヒト肝臓組織およびキメラマウスに移植するヒト肝細胞は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に基づく手続きを経て入手したもの、あるいは海外から正式な手続きをもって購入した凍結保存ヒト肝細胞を用いた。

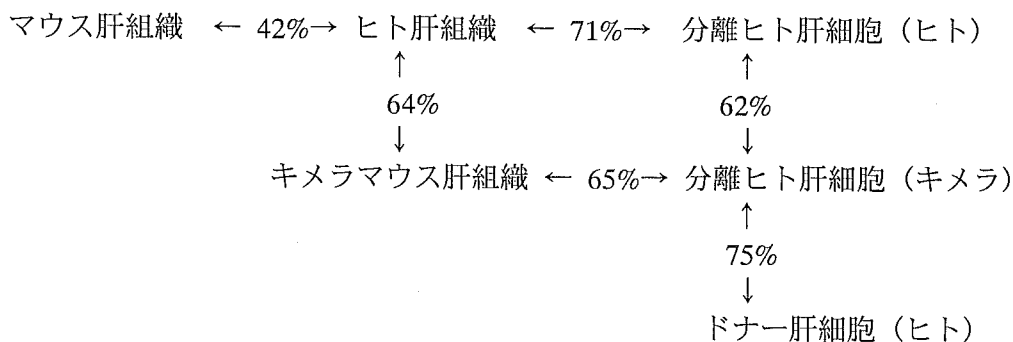
動物実験においては、動物愛護ならびに福祉の観点から、必要最低限の供試動物を使用し、実験動物の生理、生態や習性等を理解し、

動物に苦痛を与えないように最大限の配慮をした。

C. 研究結果

(1) キメラマウス肝臓を利用したヒト肝細胞プロテオーム解析法の確立

70%以上の高置換キメラマウス肝臓組織のヒト置換部(3匹)、70%以上の高置換キメラマウス肝臓からコラゲナーゼ灌流により得たヒト肝細胞(純度95%、3匹)、キメラマウス作製に使用したドナーヒト肝細胞(1例)、ヒト肝臓組織(3例)及びこれらにコラゲナーゼ灌流を施して得られたヒト肝細胞(3例)、マウス肝臓組織(uPA-/-/SCIDマウス、1匹)を準備し、それぞれからタンパク質を抽出し、2次元電気泳動を行い、蛋白質の分布パターンを比較した。それぞれのパターン間での蛋白質スポットの一致率は以下の通りであった。



(2) プロテオーム解析による肝炎に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索

蛍光標識 HBV Pre-S 抗原を分離キメラマウス肝細胞に *in vitro* で反応させたところ、肝細胞への蛍光標識 HBV Pre-S 抗原の取り込みが確認できた。そこで、Pre-S 抗原のキメラマウス投与実験を行い、抗 Pre-S 抗体を CNBr-activated Sepharose に固定化したビーズを用いた免疫沈降法により HBV Pre-S 抗原結合タンパク質の検出を行った。その結果、HBV Pre-S 抗原注入群からは複数の細胞表面タンパク質が検出された。また、陽性対象からは Pre-S タンパク質自体が検出された。さらに、陰性対象においても微量なタンパク質が検出されたが、これらは実験群サンプルにおいても検出されたことから、これらは抗体に対する非特異的吸着に由来するものと考えられた。

D. 考察

(1) キメラマウス肝臓を利用したヒト肝細胞プロテオーム解析法の確立

キメラマウスの肝臓のヒト置換領域からタンパク質を分離し2次元泳動することにより、

キメラマウス肝臓におけるヒト肝細胞タンパク質のプロファイリングが可能と考えられた。今後、この方法によりプロテオーム解析を行う。

(2) プロテオーム解析による肝炎に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索

細胞表面へのウイルス由来タンパク質の吸着が確認された。今後、HBV Pre-S 抗原結合タンパク質の同定を進める。今回の結果から、C型肝炎の新規薬剤標的分子候補となりえる HCV レセプター探索にもこの手法が使えることが示唆された。

E. 結論

キメラマウス肝臓を利用したヒト肝細胞のプロテオーム解析法を確立した。免疫沈降法とプロテオーム解析を利用した HCV レセプター探索法をほぼ確立できた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 出願予定
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他

C 型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウス HCV 感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究班

分担研究報告書

慢性肝炎におけるゲノミクス情報の活用

分担研究者 金子 周一 金沢大学がん遺伝子治療学 教授

研究要旨：キメラマウスを用いることによってヒト肝組織内での HCV の感染・複製機構の研究が可能になると同時に、感染に伴う宿主側の遺伝子発現変化の解析が可能である。今回、Hutchinson strain (H77) から得られた感染クローン pCV-H77 から合成 RNA を作成し、6 匹のキメラマウスの肝組織に注入した。6 匹中 5 匹において HCV の感染成立が認められた。感染キメラマウス肝組織の遺伝子発現では Type1-IFN 誘導遺伝子の発現亢進が認められ、感染モデルとして今後、極めて有用と考えられた。

A. 研究目的

現在のところ C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染モデルは限られており、唯一チンパンジーを用いた感染実験が行われているのみである。しかし、実験可能な施設は限られており、様々な制約から容易に感染実験を行うことはできない。キメラマウスを用いることによってヒト肝組織内での HCV の感染・複製機構の研究が可能になると同時に、感染に伴う宿主側の遺伝子発現変化も検討することが可能である。

これまでに我々は、C 型慢性肝炎症例の肝組織における遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイを用いて解析し、肝炎組織内での情報伝達機構の変化を解析し報告してきた (Honda et al, 2001, 2005)。本研究班では患者血清や感染クローンを用い、キメラマウスに HCV を感染させ、肝組織における遺伝子発現変化を網羅的に解析し、HCV の複製・慢性化に伴う宿主側の変化とその機構を解明することを目的とした。

B. 研究方法

Hutchinson strain (H77) から得られた感染クローン

感染クローン pCV-H77 (Yanagi et al, 1997) から合成 RNA を作成し、6 匹のキメラマウスのヒト肝組織生着部に注入した (図 1)。経時的にマウスの血清を採取し HCV-RNA をリアルタイム PCR (RTD-PCR) を用いて測定し感染の成立を確認した。また感染成立後マウスの肝臓を採取

し、HCV 感染に伴う遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイを用いて解析した。肝組織より RNA を抽出し、アンチセンス RNA 増幅法にて 1 回増幅後、ヒト正常肝組織由来 RNA を Cy3 (reference)、HCV 感染肝組織を Cy5 (test) でラベルし、約 1 万の cDNA クローンより成る cDNA マイクロアレイを用いて解析した。解析に用いた cDNA マイクロアレイは SAGE (serial analysis of gene expression) 法により様々な肝疾患で発現する遺伝子より選出されたクローンよりなり、肝疾患を解析するのに適している。これまでに B 型慢性肝炎、C 型慢性肝炎、肝細胞癌症例の肝組織における遺伝子発現解析を行い報告してきた (Honda et al, 2001, 2005)。

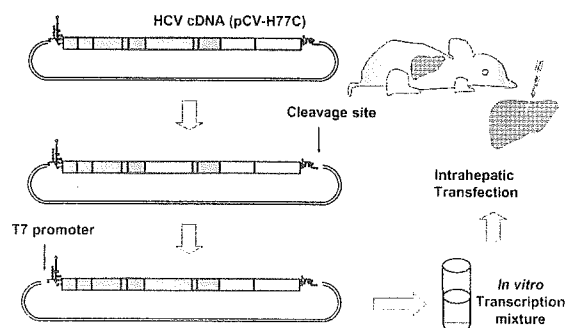


図1. HCV感染クローン:試験管内HCV RNA合成と肝内接種

C. 研究結果

6 匹中 5 匹において RNA 注入後 2 週より血清中の HCV-RNA が陽性となった。4 週後では一匹が死亡したが、他の 4 匹でいずれも HCV-RNA が 2 週後より更に増加し、HCV の感染成立が確認

された。6週後に更に一匹が死亡したため（図2, 3）、3匹において肝臓を採取し解析に用いた。

HCV-RNA			
Mouse No.	2w	4w	6w
1	2.1×10 ⁵	2.0×10 ⁶	death
2	6.0×10 ⁶	2.1×10 ⁷	analysis
3	1.9×10 ⁶	3.4×10 ⁶	analysis
4	1.8×10 ⁵	death	
5	death		
6	1.3×10 ⁵	4.0×10 ⁶	analysis

図2. HCV感染クローン(H77)のキメラマウスへの感染

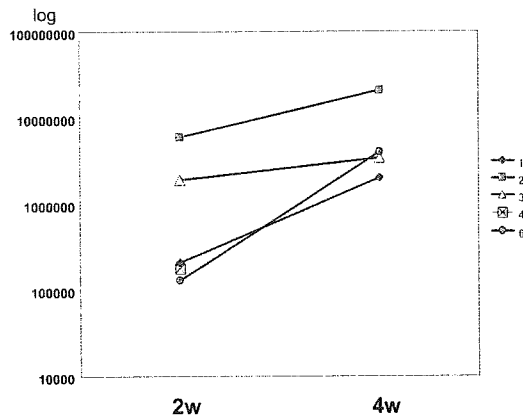


図3. HCV-RNAの推移

pCV-H77 感染肝細胞では Interferon (gamma)-induced cell line (IP-10), Interferon alpha-inducible protein 27, Interferon alpha-inducible protein (clone IFI-15K), Myxovirus (influenza virus) resistance 1 など Type I-インターフェロン誘導遺伝子の発現亢進が認められ、感染クローンの感染に伴うものと考えられた(図4)。これらの遺伝子発現は実際のC型慢性肝炎肝組織でも認められている。今後さらに詳細な検討を行い、HCVのinnate immunityに及ぼす影響を含め、様々な観点から解析を試みる。

D. 考察

Hutchinson strain (H77)から得られた感染クローン pCV-H77 はキメラマウスに感染することが証明された。今後様々な感染クローンや変異体を用いてHCVの増殖効率や肝細胞に及ぼす遺伝子発現変化を検討することが可能である。

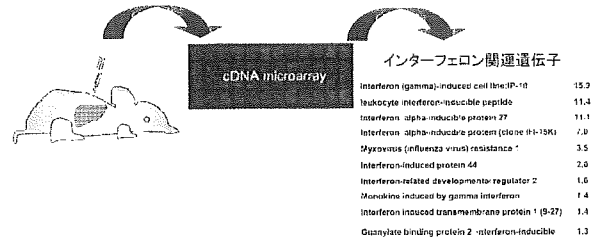


図4. HCV感染クローン(H77)によるインターフェロン関連遺伝子誘導

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

- Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Aug 5;94(16):8738-43.
- Honda M, Kaneko S, Kawai H, Shiota Y, Kobayashi K. Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterology.* 2001 Mar;120(4):955-66
- Honda M, Shimazaki T, Kaneko S. La protein is a potent regulator of replication of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C through internal ribosomal entry site-directed translation. *Gastroenterology.* 2005 Feb;128(2):449-62.
- Honda M, Kawai H, Shiota Y, Yamashita T, Kaneko S. Differential gene expression profiles in stage I primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2005 Sep;100(9):2019-30.
- Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S, Murakami S. Effect of Hepatitis C Virus (HCV) NS5B-Nucleolin Interaction on HCV Replication with HCV Subgenomic Replicon. *J Virol.* 2006 Apr;80(7):3332-40.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウス HCV 感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究班

分担研究報告書

HCV 増殖に関わる細胞機能の検索

分担研究者 土方誠 京都大学ウイルス研究所 助教授

研究要旨 C型肝炎ウイルス(HCV)が効率良く感染増殖する培養細胞ならびに実験動物を作成し、これを用いて新規抗 HCV 薬開発のための標的分子を見いだすことを目指した。レプリコン細胞を各種の薬剤等で処理し、この細胞内における HCV 部分ゲノム複製に影響与える薬剤をスクリーニングした。今回新たに MAP キナーゼシグナル阻害剤である PD98059 がその複製を活性化することを見出した。PD98059 の少なくともその一つの効果は HCV-IRES の活性化によって HCV ゲノム RNA からの翻訳が亢進することであることが明らかになった。また本来の HCV 感染標的組織である肝臓の細胞と同じ特性をもつ培養肝細胞を樹立するため、ヒト初代培養肝細胞にパピロウイルスの E6/E7 分子を導入し、不死化することを試みたところ、初代培養肝細胞と各種遺伝子発現様式が類似している不死化肝細胞クローンを得る事に成功した。この細胞には患者血清中の HCV が感染し、増殖することが確認されたため、キメラマウスへ移植するヒト肝細胞への応用が期待された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルスが効率良く感染増殖する培養細胞ならびに実験動物を作成し、これを用いて HCV の感染増殖機構を解析することにより、このウイルスの感染増殖を抑制する新規薬剤の標的分子を見いだすことで抗 HCV 戦略構築を目指した。

B. 研究方法

1. 既に樹立しているレプリコン細胞、つまり HCV の部分ゲノム RNA が自律複製している培養細胞を各種の薬剤等で処理し、この細胞内における HCV 部分ゲノム複製に影響与える薬剤をスクリーニングした。また得られた薬剤の薬効機序を明らかにすることで HCV ゲノム複製機構を明らかにし、新たな薬剤をスクリーニングするための標的分子を同定することを目指した。
2. 本来の HCV 感染標的組織である肝臓の細胞と同じ特性をもつ培養肝細胞を樹立するため、ヒト初代培養肝細胞に各種

がん関連遺伝子を導入し、不死化することを試みた。

（倫理面への配慮）

ヒト初代培養肝細胞作成は、京都大学附属病院移植外科においておこなわれた先天性代謝異常症患者への生体肝臓移植において切除された患者肝臓組織を用いておこなった。この研究はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認されたものである。肝臓提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

1. レプリコン細胞を種々の薬剤で処理することで、これまで HCV 部分ゲノム複製を抑制する薬剤としてシクロスポリン A(CsA)並びに TGF- β を同定しているが、今回新たに MAP キナーゼシグナル阻害剤である PD98059 がその複製を活性化することを見出した。PD98059 の

少なくともその一つの効果は HCV-IRES の活性化によって HCV ゲノム RNA からの翻訳が亢進することであることが明らかになった。

2. これまで初代培養肝細胞の不活化にはサルウイルスの一種 SV40 の Large T 抗原 (LT) が用いられてきた。しかしながら、LT は染色体変異を誘導することが知られているため、不活化した細胞の性質が安定しないことが問題となっていた。そこで LT に代わる不活化誘導分子としてパピローマウイルスの E6/E7 分子を用いて肝細胞の不活化を試みた。その結果、遺伝子発現パターンが現在までのところ初代培養肝細胞と類似している不活化肝細胞クローンを得る事に成功した。またこの細胞には患者血清中の HCV が感染し、増殖することが確認された。

D. 考察

1. PD98059 は細胞内において IRES 依存的な翻訳を活性化することから、HCV ゲノムからの IRES 依存的翻訳活性の上昇が HCV ゲノム複製の活性化の少なくとも一つの要因になっている可能性が考えられた。PD98059 は MAPK シグナル経路のひとつのキナーゼである MEK の阻害剤として知られているが、さらに正確な HCV-IRES 活性化制御機構を明らかにすることで新たな抗 HCV 薬剤の標的分子を見いだす可能性が考えられた。
2. パピローマウイルス E6/E7 分子によって新たに樹立した不活化肝細胞は現時点まで比較的安定した肝細胞様形質を示している。このことはこの細胞が HCV

感染増殖の高効率化のための標準細胞となる可能性があるのみならず、キメラマウス作成に用いるヒト肝細胞を安定に供給するために利用できる可能性も考えられた。

E. 結論

1. PD98059 によって阻害される MEK から下流の細胞内シグナルは本来 HCV IRES 活性を抑制している可能性があるため、その制御系は新たな抗 HCV 薬剤開発のための標的となる可能性が考えられた。
2. 現時点まで初代肝細胞に近い形質を維持しており、患者血清中の HCV が感染増殖することが可能な不活化肝細胞クローンを樹立した。

F. 研究発表

1. 論文

Virology 2005;340:105-115

2. 学会発表

Murata T., Hijikata M., Shimotohno K.. Enhancement of IRES-mediated translation and replication of HCV by PD98059. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2005, Montreal, Canada

G. 知的所有権取得状況

1. 特許取得 特になし。
2. 実用新案登録 特になし。
3. その他 特になし。

C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウスHCV感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究班

分担研究報告書

インターフェロン遺伝子治療効果増強の試み

分担研究者 高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 肝炎治療を目的としたインターフェロン（IFN）遺伝子デリバリーの最適化を実現するため、プラスミドDNA（pDNA）に含まれるCpG配列数を低減させた新規ベクターを構築した。マウスを用いたin vivo遺伝子導入実験の結果、本ベクター投与により肝臓で発現させたIFN遺伝子の発現が持続化し、血中IFNレベルが有意に上昇、持続化することが明らかとなった。

A. 研究目的

HCV感染による肝炎治療に応用可能なIFN遺伝子デリバリーの最適化を実現するため、遺伝子発現の持続化に影響することが考えられるpDNAに含まれるCpG配列数を低減させた新規ベクターを構築する。

B. 研究方法

pDNAの構築：CMVプロモータを有するpcDNA3 (Invitrogen)を、CpG配列を多く含むプラスミドDNA（pDNA）として選択し、マウスIFN β のcDNAをそれぞれ組み込んだpCMV-Mu β を作製した。CpG配列数を低減させたpGZB (米国Genzyme社 Dr. Yewより供与)をもとに同様にpGZB-Mu β を作製した。比較のため、IFN γ 発現ベクターpCMV-Mu γ 及びpGZB-Mu γ も作製した。各pDNA中のCpG配列は、pCMV-Mu β 、pCMV-Mu γ で686個、696個であるのに対し、pGZB-Mu β 及びpGZB-Mu γ では116個、112個と、約80%の低減化が実現された。**pDNAの静脈内急速投与実験**：pDNAのマウスへの投与は、naked pDNAをマウスの体重の約8%に相当する大容量の生理食塩水溶液として、5秒間で急速に尾静脈内投与することで肝臓において高い遺伝子発現が得られるハイドロダイナミクス法を用いた。血清サンプルをマウス尾静脈より採取し、血清中IFN濃度を測定した。IFN β は抗ウイルス活性を利用したバイオアッセイにより、IFN γ はELISA

法により定量した。

C. 研究結果

pCMV-Mu β を投与した後の血清中IFN β 活性を経時的に測定したところ、投与後6時間で最大となり、その後24時間後までに急速に消失した。一方、pGZB-Mu β を投与した場合、24時間後でも血清中のIFN β 活性は高レベルであり、48時間程度まで維持された。ファーマコキネティック解析の結果、血中濃度-時間曲線下面積AUCは約8倍、平均滞留時間MRTは約2倍になることが示された。IFN γ 発現pDNAを用いて検討を行なった場合も同様の結果が得られたが、AUCは約33倍、MRTは約5.5倍となりIFN β に比較してより顕著に遺伝子発現が増大、持続化することが示された。

D. 考察

新規のベクターの開発に際して、遺伝子発現の調節に深く関与しているCpG配列に着目した。CpG配列はバクテリア由来のDNAであるpDNA中に高頻度に存在する配列であり、その大部分は哺乳類のDNAの場合と異なりメチル化されていない状態で存在している。一方、哺乳類のDNA中ではCpG配列の頻度はかなり抑制されており、その大半はメチル化されている。その差異によりプラスミドDNAは哺乳類体内に投与されると異物として認識され、TNF- α の産生などの炎症性応答が誘導される。また、CpG配列がメチ

ル化を受けることで遺伝子発現が抑制されることも考えられる。そこで本研究では、CpG配列を低減させたベクターにIFN遺伝子を組み込んだpDNAを新たに構築し、従来型ベクターと比較して持続的かつ高レベルのIFN遺伝子の発現が得られることが示され、治療効果の改善に繋がる可能性が示された。

E. 結論

CpG配列数を低減させた新規IFN発現ベクターを開発した。検討の結果、マウス肝臓で発現させたIFN遺伝子の発現が持続化し、血中IFNレベルが有意に上昇、持続化することが明らかとなり、治療効果の改善に繋がる可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

CpG配列削減プラスミド DNA を用いたインターフェロン遺伝子発現の持続化による抗腫瘍効果の増強、西川元也、高橋有己、高倉喜信、第64回日本癌学会学術総会、札幌、2005年9月

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウス HCV 感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究班

分担研究報告書

脂質代謝制御による抗 HCV 戦略の検討

分担研究者 榎本信幸 山梨大学医学工学総合研究部 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の複製は、細胞内における小胞体などのオルガネラ脂質膜上において、HCV複製複合体が形成されて行われるものと考えられる。近年、オルガネラ脂質膜構造は均一でなく、特定の脂質成分が「脂質ラフト」と呼ばれる機能ドメインを形成し、様々な細胞内機能のみならず、ウイルス増殖にも重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。我々は、脂質代謝制御を通じたHCV増殖制御を目的として、HCVレプリコン・システムを用い、脂質ラフトを構成するスフィンゴ脂質、コレステロール、飽和脂肪酸、各々の合成阻害剤によるHCV増殖への影響について検討をおこない、これらの薬剤によってHCVレプリコン増殖が特異的に抑制されることを明らかとした。今後これら薬剤の抗ウイルス効果および機序について、HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスによるin vivoの系を含む詳細な検討を行い、新たな抗ウイルス治療開発の可能性について探ってゆく予定である。

共同研究者
前川伸哉 山梨大学医学部附属病院
助手

トの役割を明らかにし、さらに脂質代謝制御を通じたHCV増殖制御を目的として、脂質代謝関連薬剤のHCV増殖に対する影響について検討を行った。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の複製は小胞体(ER)等のオルガネラ脂質膜上において、HCV 蛋白複製複合体の形成を通じて行われるものと考えられており、実際に HCV レプリコン増殖細胞においては複製複合体と考えられる構造物“membranous web”の形成が報告されている。近年、オルガネラ脂質膜構造は均一ではなく、スフィンゴミエリンとコレステロールが”脂質ラフト”と呼ばれる機能ドメインを形成し、この脂質ラフトがシグナル伝達等の様々な細胞内機能を果たすことが明らかにされてきた。のみならず HIV 等のウイルスにおいても、脂質ラフトが細胞内増殖に重要な働きをすることが報告されている。一方、HCV 増殖において脂質ラフトが、どのような役割を持つのか全く明らかとはされていない。

本研究において我々は、HCVの増殖、および複製複合体形成における脂質ラフ

B. 研究方法

脂質ラフトは、スフィンゴミエリン、コレステロール、飽和脂肪酸より形成される。今回、それぞれの合成阻害剤、すなわちスフィンゴミエリン合成阻害剤であるミリオシン、コレステロール合成阻害剤である HMG-CoA 還元阻害剤（スタチン）、さらに飽和脂肪酸に対しては不飽和脂肪酸を各々もちいて、HCV 増殖に対する影響を HCV レプリコン・システムを用いて解析した。

（倫理面での配慮）

該当せず。

C. 研究結果

(1) スフィンゴミエリン合成系路阻害は HCVレプリコン増殖を抑制する

ミリオシンは、スフィンゴミエリン合成経路におけるセリンパルミチルトランスフェラーゼの阻害剤である。ミリオシン投与により HCV レプリコン増殖は濃度

依存性に抑制され、その効果は経時的に増強した。すなわち 72hr 後から増殖抑制が出現し、120hr 後にその効果は最大となった。また、スフィンゴミエリンの直接的な基質であるフィトスフィンゴシンの添加により、ミリオシンで抑制されたレプリコン活性は濃度依存性に回復した。さらにセリンパルミチルトランスフェラーゼに対する siRNA の投与でも HCV replicon 増殖は抑制された。一方、ミリオシンによる ISRE promoter の活性化は認められず、同薬剤による抗 HCV 作用はインターフェロンによる抗ウイルス機序とは別経路であることが考えられた。

(2)HMG-CoA 還元阻害薬、不飽和脂肪酸は HCV 増殖を制御する。

シンバスタチンの投与で、HCV replicon の増殖は濃度依存性に抑制された。脂肪酸の投与においては、飽和度の高いオレイン酸では、増殖抑制が認められなかったが、飽和度の低いアラキドン酸によって HCV replicon 増殖は濃度依存性に抑制された。

D. 考察と結論

脂質ラフトを構成する脂質成分であるスフィンゴミエリン、コレステロール、飽和脂肪酸、各々の合成を阻害することによって、HCVレプリコン増殖が特異的に抑制されることが明らかになった。この結果は、複製複合体形成における脂質ラフトの重要性を示唆すると共に、脂質ラフトがHCV増殖制御における重要なターゲットであることを示している。これらのin vitroの結果を踏まえ、今後はこれら薬剤の抗ウイルス機序についてさらに詳細な検討を行い、新たな抗ウイルス療法の可能性について検討してゆくと同時に、ヒト肝細胞キメラマウスモデルを用いて、これらの薬剤のin vivoにおける効果を検証してゆく予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Chen CH, Nagayama K, Enomoto N, Miyasaka Y, Kurosaki M, Sakamoto N, Maekawa S, Kakinuma S, Ikeda T, Izumi N, Sato C, Watanabe M. Enhancement of mitochondrial gene expression in the liver of primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 2005 Jan;31(1):24-30.
2. Tanabe Y, Nagayama K, Enomoto N, Izumi N, Tazawa J, Kurosaki M, Sakamoto N, Sato C, Watanabe M. Characteristic sequence changes of hepatitis C virus genotype 2b associated with sustained biochemical response to IFN therapy. *J Viral Hepat.* 2005 May;12(3):251-61.
3. Nakagawa M, Sakamoto N, Tanabe Y, Koyama T, Itsu Y, Takeda Y, Chen C-H, Kakinuma S, Oooka S, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin A is mediated by blockade of cyclophilins *Gastroenterology.* 2005 Sep;129(3):1031-41.
4. Hamano K, Sakamoto N, Enomoto N, Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Ueda E, Tanabe Y, Maekawa S, Itakura J, Watanabe H, Kakinuma S, Watanabe M. Mutations in the NS5B region of the hepatitis C virus genome correlate with clinical outcomes of interferon-alpha plus ribavirin combination therapy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Sep;20(9):1401-9.
5. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-IT, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2005 Oct;42(4):962-73.
6. Nakanishi H, Kurosaki M, Asahina Y, Onuki Y, Ueda K, Nishimura Y, Tsuchiya K, Kitamura T, Uchihara M, Miyake S, Enomoto N, Izumi N. Polymerase domain B mutation is associated with hepatitis relapse

- during long-term lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *Intervirology*. 2005 Nov-Dec;48(6):381-8.
7. Asahina, Izumi N, Enomoto N, Uchihara M, Kurosaki M, Onuki Y, Nishimura Y, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Kitamura T, Miyake S. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2005 Oct;43(4):623-9.
 8. Maekawa S, Enomoto N. Genetic changes in the interferon sensitivity-determining region of hepatitis C virus (HCV) during the natural course of infection: an implication for the gene function in the role of chronic infection. *J Gastroenterol*. 2005 Jan;40(1):113-5.
 9. Itakura J, Nagayama K, Enomoto N, Hamano K, Sakamoto N, Fanning LJ, Kenny-Walsh E, Shanahan F, Wanatabe M. Viral load change and sequential evolution of entire hepatitis C virus genome in Irish recipients of single source-contaminated anti-D immunoglobulin. *J Viral Hepatitis* 2005 Nov;12(6):594-603.
 10. Itsui Y, Sakamoto N, Kurosaki M, Kanazawa N, Tanabe Y, Koyama T, Takeda Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Sekine Y, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. *J Viral Hepatitis* 2005 (in press).
 11. Kohashi T, Maekawa S, Sakamoto N, Watanabe H, Tanabe Y, Chen C-H, Nakagawa M, Kakinuma S, Enomoto N, Watanabe M. Site-specific mutation of the interferon sensitivity-determining region (ISDR) modulates hepatitis C virus replication. *J Viral Hepatitis* 2005 (in press).
- Inhibition of sphingolipid synthesis attenuates HCV replication in vitro International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (12th Annual Meeting) October 2-6,2005; Montreal (Canada).
2. Maekawa S, Amemiya F, Itakura Y, Itakura J, Sakamoto M, Saitoh H, Okada S, Yamauchi K, Kanayama A, Sakamoto N, Enomoto N. Identification of viral elements determining hepatitis C virus replication by homologous recombination of the viral genome. International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (12th Annual Meeting) October 2-6,2005; Montreal (Canada).

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

2. 学会発表

1. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Itakura J, Yamauchi K, Minoru Sakamoto M, Saito H, Okada H, Sakamoto N, Enomoto N.

C型肝炎新規治療開発に資するプロテオーム解析を用いた治療標的分子の網羅的検索系とヒト肝細胞キメラマウス HCV 感染モデルを用いた実証系の開発に関する研究班

分担研究報告書

C型肝炎ウイルスの感染機構

分担研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)に感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には2百万人ものHCV感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。遺伝子型の異なるHCVのエンベロープ蛋白質をポリプロテインの形で発現させたCHO細胞と293T細胞を用いて、HCVのエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプ水疱性口内炎ウイルス、HCVpv/CHOとHCVpv/293Tをそれぞれ作製した。HCVpv/CHOはhFGFR5依存的にHepG2細胞に高い感染性を示したのに対し、HCVpv/293TはhCD81依存的にHuh7細胞に高い感染性を示した。また、慢性C型肝炎患者血清中にはHCVpv/293Tに対する高い中和抗体が高率に検出されたのに対し、HCVpv/CHOに対する中和抗体価は低かった。C型肝炎患者の体内にはhCD81-tropicとhFGFR5-tropicなHCVが産生されている可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)のリセプター候補として、hCD81, SR-B1, LDLr, DC-SIGNなどが報告されているが決定的なものはない。本研究はHCVの宿主細胞への侵入とシグナル伝達機構を解析し、HCVの感染および持続感染成立の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

これまで、CHO細胞に発現させたHCVのキメラエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプウイルスを用いて、HCVの感染機構の解析を進めてきた。今回新たに、遺伝子型の異なるHCVのエンベロープ蛋白質をポリプロテインの形で発現させたCHO細胞と293T細胞を用いて、シュードタイプ水疱性口内炎ウイルス(HCVpv)を作製した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」

に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

HCVの受容体候補分子であるhCD81を全く発現していないHepG2細胞にHCVpvが感受性を示すことから、HCVの感染にhCD81以外の細胞表面因子の関与が示唆された。HCVpvの感染はヒト繊維芽細胞成長因子(hFGF)、特にFGF2とFGF7によって阻害され、可溶化型のhFGF受容体5(hFGFR5)がHCVpvの感染性を特異的に阻害した。また、hFGFR5を恒常的に発現するCHO細胞株はHCVpvの感染を許容できるようになり、siRNAによってhFGFR5をHepG2細胞からノックダウンさせると感受性の低下が観察されたことから、hFGFR5がHCVpvの新規受容体であることが示唆された。これまで、CHO細胞で発現させたHCVエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプウイルスを用いて解析を進めてきたが、293T細胞で作製したシュードタイプレトロウイルスはhCD81依