

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化	藤原成悦 ……	589
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 ……	636
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 ……	656
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 ……	691
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 ……	707
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 ……	720
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 ……	728
KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 ……	740
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 ……	761
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 ……	772
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 ……	783
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 ……	795
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 ……	836
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 ……	839
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 ……	919
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 ……	939
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一 ……	951
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 ……	966

KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 979
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間 正充 …… 1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森 静志 …… 1021
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾 和人 …… 1042
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野 泰雄 …… 1054
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田 康文 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 …… 1115

バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術 の開発

所属 大阪大学微生物病研究所
研究者 松浦善治
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨：HCVのエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプウイルスや組換えウイルスを作製し、その感染様式を解析した。高度弱毒化ワクチニアウイルス DI_s 株はワクチンとして極めて有効であることが証明された。PPIase 活性を指標に抗HCV薬のスクリーニングを試みた。

分担研究者名

- (1) 大阪大学微生物病研究所 森石恆司
- (2) 国立感染症研究所 鈴木哲朗
- (3) 三菱ウェルファーマ株式会社 伊丹清馬

A. 研究目的

輸血による感染症の最も大きな原因の一つであるC型肝炎ウイルス(HCV)は、その遺伝子構造の解析からペスティウイルスやフラビウイルスに近縁なプラス鎖RNAウイルスであることが明らかにされている。高感度なHCV抗体アッセイ系の導入により、先進国では輸血によるHCV感染は激減した。しかしながら、本邦だけでも200万人以上、全世界では2億人ものHCVキャリアが既に存在するものと推定されており、感染予防ばかりでなく既感染者の発症予防やウイルスの排除法の確立が強く望まれている。HCV感染の最も深刻な問題点は、惹起される肝炎の多くが慢性化し、その大部分は持続感染したまま肝硬変、肝癌へ移行する点である。しかしながら、効率のよいHCVの*in vitro*での複製系や細胞培養系が存在しないため、HCVによる肝炎及び肝癌発症機構の解析はあまり進んでいない。さらに、HCVの感染過程の知見も極めて乏しく、リセプターに関する研究もあまり進んでいない。本研究事業では、HCVの感染複製過程を解析し、その成績を基にした抗ウイルス剤や治療用ワクチンの開発を目的とする。

B. 研究方法

- (1) HCVのキメラエンベロープ蛋白質を水疱性口内炎ウイルス(VSV)に被らせたもの(HCVcpv)と、ポリプロテインの形で発現させたエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプVSV(HCVpv)を作製した。
- (2) 1a型H77株および1b型Con1株のHCVエンベロープ遺伝子を、VSVのエンベロープ遺伝子を欠損させたVSVのcDNAに挿入し、HCVrvを各種動物細胞で作製した。HCVrvの性状ならびに、感染様式をHCVpvおよびJFH-1株と比較した。
- (3) HCV及びGBV-Bの構造領域、2つの非構造領域(NS3、NS5A)をコードする遺伝子、SARS-CoVの各構造蛋白遺伝子を、高度弱毒化ワクチニアウイルス DI_s 株へ組み込んだ組換えウイルスを作製

した。

- (4) GBV-B全長cDNAを持つプラスミドからゲノムRNAを合成し、タマリンに接種して感染が成立するか、成立した場合ウイルス肝炎を発症させられるかどうかを検討した。また、GBV-Bの遺伝子をDI_s株へ組み込んだ組換えウイルスを作製した。
- (5) 香港で分離されたSARS-CoV株HKU39849からクローニングされた各構造蛋白遺伝子を組み込んだ組換えDI_sを作製し、マウスに皮下あるいは経鼻接種し、SARS-CoV構造蛋白に対する液性、細胞性および粘膜免疫の誘導能を検討した。
- (6) 病態モデルに対するワクチン効果を検討するため、Sを発現する組換えDI_sをマウスに皮下接種して免疫誘導し、PasteurellaとSARS-CoVを経鼻接種により共感染させて1週間経過を観察した。また、血液中の抗体価、中和抗体価、肺及び鼻腔洗浄液中のSARS-CoV量の測定、各種サイトカイン濃度の測定を行った。
- (7) Cyclosporine Aの抗HCV活性に関する作用点はT細胞活性化後NFATが活性化されるまでの細胞内シグナル伝達の一部に関与する因子であると推定される。そこで、まずT細胞刺激条件下でNFATを阻害する物質をスクリーニングし、その中から抗HCV活性を有する化合物のスクリーニングを行った。
- (8) Cyclophilin A、cyclophilin B、cyclophilin Dを大腸菌で発現し、PPIase活性の評価系を構築した。
- (9) Cyclophilinを50mM Hepes (pH7.9)、0.01% Tween20、10μM キモトリプシン共存下でインキュベートし、そこに基質ペプチドであるsuc-Ala Ala Pro Phe-MCAを添加し、励起波長380nm、蛍光波長500nmでペプチドの切断を指標にPPIaseの活性を評価した。

(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

(1) HCVcpv は HepG2 細胞に特異的に感染した。また、ヘパリンが HCVcpv の感染を阻害することから、ヘパリンとの結合が活性発現に重要な各種成長因子による HCVcpv の感染阻止活性を調べたところ、hFGF、特に hFGF2 と hFGF7 が HCVcpv の感染を特異的に阻害した。また、その可溶化型の受容体の中で、hFGFR4 と hFGFR5 が HCVcpv の感染を特異的に阻害し、HCV 様粒子 (HCV-LP) や C 型肝炎患者血清中の HCV 粒子とも結合した。また、セファロースに固着化した hFGFR4 と hFGFR5 は HCV-LP のみならず、ウインドウ期血清中の HCV を特異的に沈降した。さらに、hFGFR4 あるいは hFGFR5 を恒常的に発現する CHO 細胞は HCV-LP や患者血清中の HCV と特異的に結合した。特に hFGFR5 を発現する CHO 細胞株は HCVcpv 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 HCVcpv の侵入受容体である可能性が示唆された。一方、HepG2 細胞から、siRNA によって hFGFR4 をノックダウンさせても、HCVcpv に対する感受性の低下は観察されなかった。

(2) 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 HCVcpv 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。これまでは、CHO 細胞で発現させた HCV エンベロープ蛋白質を被ったシールドタイプウイルス HCVcpv を用いて解析を進めてきたが、293T 細胞で作製したシールドタイプレトロウイルスは hCD81 依存的な感染性を示し、HepG2 細胞には全く感受性を示さなかった。そこで、HCV のエンベロープ蛋白質を発現させた CHO 細胞と 293T 細胞を用いて、それぞれ HCVpv/CHO と HCVpv/293T を作製した。両シールドタイプウイルスとも高マンノース型のエンベロープ蛋白質を保持していた。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。患者血清中に存在する天然の HCV 粒子も、HCVpv と同様に HepG2 細胞と Huh7 細胞に結合した。HCV 粒子の HepG2 細胞への結合は可溶性 hFGFR5 や抗 hFGFR5 抗体で、また、Huh7 細胞への結合は抗 hCD81 抗体によって阻害された。

(3) HCVrv は HCVpv と同様に、293T や Huh7 細胞で作製すると感染性を示すウイルスが得られ、これらのウイルスは Huh7 細胞に最も高い感染性

を示した。HCVrv の作製は 37°C よりも、30°C で培養した方が高い感染性のウイルスが得られた。また、293T や Huh7 細胞で作製した HCVrv は、HCVpv と同様に、抗 hCD81 抗体や C 型肝炎患者血清で中和された。さらに、新たに樹立した JFH-1 株の増殖効率の良い Huh7 細胞では、HCVrv の感染の拡大が観察された。

(4) HCV の構造蛋白質領域を発現する組換え DI 5 をマウスに接種した場合、Core、E2 いずれの蛋白質に対する抗体も検出され、NS3、NS5A を発現するウイルスでもそれぞれに対する抗体が検出されたことから、組換え DI 5 の投与により目的の組換え蛋白質に対する液性免疫を誘導できることが確認された。また、いずれの組換え DI 5 を投与した場合も、ELISPOT assay 及び MTT assay により目的蛋白質に対する細胞性免疫が誘導されることを確認することができた。

(5) タマリンにウイルスゲノム RNA を接種することで、肝機能マーカーである ALT、AST の顕著な上昇が接種後平均 2 週目から観察され、急性肝炎を発症していることが確認できた。急性期には血中からも GBV-B RNA が検出されたが、接種後 8 週程度で血中から消失し、ほぼ同時期に肝機能マーカーも正常に回復した。一方、抗 GBV-B 抗体価はウイルスが血中から消失した後も高いレベルで維持されており、個体から完全にウイルスが排除されずに潜伏している可能性も示唆された。GBV-B の遺伝子を組み込んだ組換え DI 5 を取得し、哺乳類細胞に感染させたところ目的蛋白質が発現していることが確認できた。これらの組換えウイルスをマウスに皮下接種した場合、いずれの蛋白質の場合も目的蛋白質に対する液性、細胞性免疫が誘導された。

(6) SARS-CoV の構造蛋白質を発現する各種組換え DI 5 を経鼻あるいは皮下接種されたマウスは SARS-CoV を認識する抗体が誘導され、目的蛋白質に対する細胞性および粘膜免疫も同様に誘導されていた。S を発現する組換えウイルスを接種した群の血清は、in vitro で SARS-CoV の哺乳類細胞への感染を阻止する活性を有していた。E/M/S あるいは E/M/N/S を発現する組換え DI 5 を経鼻あるいは皮下接種された群は、SARS-CoV を経鼻感染させた場合感染から完全に防御された。一方、N を発現する組換え DI 5 を接種された群は SARS-CoV に対する強い抗体価が誘導されたが、SARS-CoV を経鼻感染させた場合に感染を防御することはできなかった。

(7) 田口らによって確立された Pasteurella と SARS-CoV の共感染により惹起されるマウス重症肺炎モデルを用いて、組換え DI 5 の接種によるワクチン効果を検討した。組換えウイルスを 1 ヶ月間隔で 2 回皮下接種し、その 1 週後に pasteurella と SARS-CoV を経鼻で共感染させた。組換え DI 5 接種群の体重は一過性に減少した後す

みやかに回復し、7日後まで全例が生存していたが、コントロール接種群では体重減少に回復傾向は見られず、5日後には80%が死亡した。また、組換えDIs接種群では鼻腔及び肺洗浄液からSARS-CoVは全く検出されなかった。肺洗浄液中の各種サイトカイン量を測定したところ、コントロール接種群ではワクチン接種群と比較してIL-6、MCP-1量に顕著な増加が見られ、TNF- α 量も増加していた。

(8) NFAT レポーターアッセイにより、75%以上阻害活性を有する化合物を取得し、さらにそれらの化合物について細胞増殖抑制作用を解析し、細胞生存率が75%以上である化合物47検体を得た。それらの化合物は構造活性相関を評価した結果、8つのグループに分けられた。47化合物についてすべて subgenomic replicon 細胞を用いて抗HCV活性を評価したが、抗HCV活性を有する化合物を取得することはできなかった。

(9) PPIase assay 系は反応速度が非常に速く、基質添加後30秒以内にペプチドの切断をほぼ終了してしまっただけであった。今後のさらなる改良が必要と考えられた。

(10) PPIase 活性を指標に化合物を assay したが、酵素活性を阻害するものは確認できなかった。

D. 考察

1) hFGFR4 と hFGFR5 が HCV の新しい受容体候補分子であることが示された。

2) 293T 細胞で作製した HCVpv はレトロウイルスで作製したシュードタイプと同様に hCD81 依存的な感染指向性を示し、CHO 細胞で作製すると hFGFR5 依存的に感染することが示された。また、C型肝炎患者血清中にも同様な親和性を示す HCV 粒子が存在することが示された。

3) HCV のエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換え VSV (HCVrv) は、これまでのシュードタイプウイルスや JFH-1 ウイルスと同様に、hCD81 依存的な感染性を示した。また、一部の Huh7 細胞株では、HCVrv によって発現された HCV エンベロープ蛋白質を利用して、感染を拡大していることが確認された。自立増殖可能な組換え VSV を用いることにより、各種遺伝子型の HCV の感染機構を詳細に解析することが可能になるものと思われる。

4) 高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs 株は約40年前に副作用のない種痘の候補としてヒトへの投与実験も行われており、安全性の高さはすでに確認されている。

5) GBV-B 蛋白質を発現する組換え DIs は、マウスに接種した場合ターゲットとなるウイルス蛋白に対する液性、細胞性免疫を誘導した。従ってこれらの組換え DIs は安全な組換え生ワクチンの有望な候補であると考えられる。

6) SARS-CoV の S 蛋白質を発現する組換え DIs に

は SARS 発症を抑制する効果があることが示され、この組換えウイルスはワクチンとして有効であることが証明された。

7) Cyclophilin A、B、D を大腸菌で発現し酵素活性を評価する系の構築に成功した。

8) Cyclophilin を大腸菌で発現し PPIase 阻害活性を評価したが阻害活性を示す化合物は得られなかった。

E. 結論

- 1) hFGFR4 は HCV の結合受容体候補分子である。
- 2) 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。
- 3) HCV のエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換えウイルス (HCVrv) は、Huh7 細胞に高い感染性を示し、抗 hCD81 抗体や C 型肝炎患者血清で中和された。
- 4) 自立増殖可能な HCVrv は、各種遺伝子型の HCV の感染機構の解析に有用である。
- 5) 組換え DIs は効率よく、液性、細胞性及び粘膜免疫を誘導できるベクターであることが示された。
- 6) 組換え DIs は生体内で目的蛋白に対する液性、細胞性及び粘膜免疫を誘導することができ、安全な組換え SARS-CoV の構造蛋白を発現する組換え DIs は、マウスに接種した場合ターゲットとなるウイルス蛋白に対する液性、細胞性免疫及び粘膜免疫を誘導し、S 蛋白質を発現する DIs を接種されたマウスの抗血清にはウイルス中和活性も存在した。
- 7) 組換え DIs は、重症肺炎モデルマウスに接種した場合、発症を完全に抑制する効果があることが示され、ワクチンとして極めて有効であることが証明された。
- 8) Cyclosporine A の PPIase 活性を指標にした、抗 HCV 薬のスクリーニング系を構築が阻害活性を示す化合物は得られなかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y. Involvement of PA28 γ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 81, 1727-1735 (2007).
- 2) Shirakura M., Murakami K., Ichimura T., Suzuki R., Shimoji T., Fukuda K., Abe K., Sato S., Fukasawa M., Yamakawa Y., Nishijima M., Moriishi K., Matsuura Y., Wakita T.,

- Suzuki T., Howley P.M., Miyamura T., and Shoji I. The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 81, 1174-1185 (2007).
- 3 Nakai K., Okamoto T., Kimura-Someya T., Ishii K., Lim C-K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T., Nunberg J.H., Moriishi K., and Matsuura Y. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J. Virol.*, 80, 11265-11273 (2006).
 - 4 Okamoto T., Nishimura Y., Ichimura T., Suzuki K., Miyamura T., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.*, 25, 5015-5025 (2006).
 - 5 Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K. J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C.-S., Sousa C. R., Matsuura Y., Fujita T., and Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441, 101-105 (2006).
 - 6 Ishii K., Iijima S., Kimura N., Lee Y.-J., Ageyama N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Iwata N., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. *Microbes and Infection*, in press.
 - 7 Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kanaji H., Shiota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Archives of Virology*, in press.
 - 8 Mizutani T., Endoh D., Shirato K., Shimizu H., Fukushi S., Saijo M., Sakai K., Kwang L., Ito M., Nerome R., Takasaki T., Ishii K., Suzuki T., Kurane I., Morikawa S. and Nishimura H. System for rapid determination of viral RNA sequence by ligation-mediated amplification and direct sequencing technology for emerging viral infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 322-324 (2007).
 - 9 Matsuyama S., Ujike M., Ishii K., Fukushi S., Morikawa S., Tashiro M. and Taguchi F. Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 253-258 (2006)
 - 10 Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Miyamura T. and Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 593-596 (2006)
 - 11 Ishii K. Vaccines for severe acute respiratory syndrome. SARS, Mizutani T. ed.: 107-117, Transworld Research Network, Kerala, India (2006).
 - 12 Mizutani T., Fukushi S., Ishii K., Sasaki Y., Kenri T., Saijo M., Kanaji Y., Shiota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347: 261-265 (2006).
 - 13 Murakami K., Ishii K., Ishihara Y., Yoshizaki S., Tanaka K., Gotoh Y., Aizaki H., Kohara M., Yoshioka H., Mori Y., Manabe N., Shoji I., Sata T., Bartenshalager R., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351: 381-392 (2006).
 - 14 Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Tsunetsugu-Yokota Y. and Miyamura T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs. *Virology* 351: 368-380 (2006).
 - 15 Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K, and Matsuura Y. Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B. *J. Virol.* 79:13473-13482, (2005).
 - 16 Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y., Wang JC, Engvall H, Hammar L, Xing L, and Cheng RH. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 79, 12999-13006, (2005).
 - 17 Abe T, Hemmi H, Moriishi K, Tamura S, Takaku H, Akira S, and Matsuura Y. Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J. Virol.* 79, 2847-2858, (2005).
 - 18 Kitagawa Y, Tani H, Limn CK, Matsunaga TM, Moriishi K, and Matsuura Y. Ligand-directed

- gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J. Virol.* 79, 3639-3652, (2005).
- 19 Mori Y, Okabayashi T, Yamashita T, Zhao Z, Wakita T, Yasui K, Hasebe F, Tadano M, Konishi E, Moriishi K, and Matsuura Y. Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *J. Virol.* 79, 3448-3458, (2005).
 - 20 Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, Moriishi K, Iwasaki T, Mizumoto K, Matsuura Y. Miyamura T, and Suzuki T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 79, 1271-1281, (2005).
 - 21 Ohnishi K., Sakaguchi M., Kaji T., Akagawa K., Taniyama T., Kasai M., Tsunetsugu-okota Y., Ohshima M., Yamamoto K., Takasuka N., Hashimoto S., Ato M., Fujii H., Takahashi Y., Morikawa S., Ishii K., Sata T., Takagi H., Itamura S., Odagiri T., Miyamura T., Kurane I., Tashiro M., Kurata T., Yoshikura H. and Takemori T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Japanese Journal of Infectious Diseases.* 58: 88-94 (2005)
 - 22 Okamoto K., Moriishi K., Miyamura T., and Matsuura Y. Intramembrane proteolysis and ER retention of HCV core protein. *J. Virol.* 78, 6370-6380 (2004).
 - 23 Kaimori A., Kanto T., Limn C-K., Komoda Y., Oki C., Inoue M., Miyatake H., Itose I., Sakakibara M., Yakushiji T., Takehara T., Matsuura Y., and Hayashi N. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology* 324, 74-83 (2004).
 - 24 Migliaccio C. T., Follis K. E., Matsuura Y., and Nunberg J. H. Evidence for an alternative topology of the E1 envelope glycoprotein of hepatitis C virus. *Virus Res.* 105, 47-57 (2004).
2. 学会発表
- 1 Toru Okamoto, Yorihiro Nishimura, Tohru Ichimura, Kensuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006.
 - 2 Tetsuo Yamashita, Yoshio Mori, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tomitake Tsukihara and Yoshiharu Matsuura: Crystal Structure of Catalytic Domain of Japanese Encephalitis Virus NS3 Helicase/Nucleoside Trisphosphatase at a Resolution 1.8 Å. 同上。
 - 3 Toru Okamoto, Yorihiro Nishimura, Tohru Ichimura, Kensuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. 13th International Meeting on HCV and Related Viruses, Cairns, August 27-31, 2006.
 - 4 Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Hironobu Miyamoto, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura: Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. 同上。
 - 5 Yoshio Mori, Yoshimi Tsuda, Tetsuya Yamashita, Yoshinori Tanaka, Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Biological significance of nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein. 同上。
 - 6 Takayuki Abe, Shyu-hei Taguwa, Yuhki Kaname, Kohji Moriishi, Osamu Takeuchi, Kawai Taro, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Shizuo Akira, and Yoshiharu Matsuura: Modulation of Toll-like receptor signaling in immune cells by expression of hepatitis C virus non-structural proteins. 同上。
 - 7 Ishii K., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Assembly and release of HCV-like particles in which the viral subgenomic replicon RNAs are encapsidated. 13th International Meeting on HCV and Related Viruses, Cairns, Australia, August 27-31, 2006.
 - 8 Itsuki Hamamoto, Yorihiro Nishimura, Toru Okamoto, Hideki Aizaki, Minyi Liu, Yoshio Mori, Takayuki Abe, Tetsuro Suzuki, Micheal M. C. Lai, Tatsuo Miyamura, Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura. Human VAP-B is involved in HCV replication through interaction with NS5A and NS5B. 121th International Meeting on HCV and Related Viruses, Montreal, Canada, October 2-7, 2005.
 - 9 Hironobu Miyamoto, Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Tetsuro Suzuki, Kazuhiko Koike, Tatsuo Miyamura,

- and Yoshiharu Matsuura. Involvement of PA28 γ in the development of insulin resistance in the HCV core gene transgenic mice. 同上。
- 10 Kosuke Nakai, Kohji Moriishi, Chang Kwang Limn, Toru Okamoto, Tetsuro Suzuki, Jack H. Nunberg, 19 Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Multimerization of HCV core protein is required for the interaction with the cytoplasmic region of E1 protein. 同上。
- 11 Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Tetsuo Yamashita, Kensuke Suzuki, Eiko Matsuo, Itsuki Hamamoto, Yoshimi Tsuda, Chang Kweng Lim, Kohji Moriishi, Arvind H. Patel, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Cell tropism of pseudotype VSV bearing 21 HCV envelope proteins expressed in different cell lines. 同上。
- 12 Yasumasa Komoda, Hideki Tani, Chang Kweng Lim, Kensuke Suzuki, Eiko Matsuo, Yoshimi Tsuda, Kohji Moriishi, Arvind H. Patel, Tatsuo Miyamura, 22 and Yoshiharu Matsuura. Human fibroblast growth factor receptor 5 is a novel candidate entry receptor for HCV. 同上。
- 13 Ishii K., Iijima S., Kimura N., Iwata N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B is a pleiotropic virus in vivo. 同上。
- 14 Murakami K., Ishihara Y., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Tanaka K., Kohara M., Shoji I., Sata T., Bartenshalager R., Miyamura T. and Suzuki T. Thermoreversible gelation polymer-based three-dimensional culture system to produce HCV particles from cells harboring the genome-length dicistronic RNA. 同上。
- 15 Ishii K., Yokota Y., Takemori T., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F. and Miyamura T. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. Xth International Nidovirus Symposium, Colorado Springs, USA, June 25-30. 2005.
- 16 Matsuo E., Limn C. K., Komoda Y., Kitagawa Y., Miyamoto H., Yagi S., Moriishi K., and Matsuura Y. Characterization of HCV-like particles produced in a human hepatoma cell line. 11th International Meeting on HCV and Related Viruses, Heidelberg, Germany, October 2-7, 2004.
- 17 Limn C. K., Komoda Y., Suzuki K., Otsubaki T., Tani H., Matsuo E., Tsuda Y., Moriishi K., Miyamura T., and Matsuura Y. Human fibroblast growth factor receptor 4 is a novel binding receptor for HCV. 同上。
- 18 Okamoto T., Kimura-Someya T., Moriishi K., Watanabe R., Ishii K., Nunberg J.H., Suzuki T., Miyamura T., and Matsuura Y. Polytopic topology of HCV E1 glycoprotein on the endoplasmic reticulum. 同上
- Sakamoto S., Shiroki K., Suzuki R., Matsuura Y., Suzuki T., and Miyamura T. HCV capsid assembly: role of basic residue clusters in the core protein. 同上
- 20 岡本 徹、西村順裕、市村 徹、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司、松浦善治：C型肝炎ウイルスの複製におけるFKBP8の役割、第54回日本ウイルス学会総会、名古屋、平成18年11月19-21日。
- 阿部隆之、田鋏修平、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治：C型肝炎ウイルス蛋白質による免疫細胞における自然免疫シグナルの阻害機構の解析、同上。
- 田鋏修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治：C型肝炎ウイルスの複製に関与する新規宿主因子の解析、同上。
- 23 森 嘉生、山下哲生、田中佳典、森石恆司、松浦善治：カテプシンLによってコア蛋白質がプロセスされない日本脳炎ウイルスの性状、同上。
- 24 津田祥美、森 嘉生、阿部隆之、山下哲生、岡本 徹、市村 徹、森石恆司、松浦善治：核小体蛋白質B23は日本脳炎ウイルスのコア蛋白質と結合しウイルス複製に関与する、同上。
- 25 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、松尾栄子、岡本 徹、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治：HCVエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換えVSV、同上。
- 26 山下哲生、海野英明、森 嘉生、森石恆司、月原富武、吾郷昌信、松浦善治：日本脳炎ウイルスのRNAヘリケースドメインのX線結晶構造解析、同上。
- 27 森石恆司、森屋恭爾、宮本大伸、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治：HCVコア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症におけるPA28 γ の役割、同上。
- 28 松永朋子、谷 英樹、佐藤 薫、森石恆司、藤原晴彦、松浦善治：カイコ幼虫へ遺伝子導入可能な水疱性口内炎ウイルスベクターの開発、同上。
- 29 水谷哲也、福士秀悦、石井孝司、西條政幸、緒方もも子、酒井宏治、遠藤大二、座本 綾：SARS-coronavirusとMycoplasma fermentansの共感染が細胞に及ぼす影響、同上。
- 30 明里宏文、石井孝司、飯島沙幸、榎 昇、森健一、吉崎佐矢香、木村展之、片貝祐子、揚山直英、岩崎優紀、鈴木哲朗、宮村達男：C型肝炎のサロゲート霊長類モデル：GBV-B長

- 期持続感染マーマセットの解析、同上。
- 31 石井孝司、張 斌、李 津、白倉雅之、森川賢一、鈴木亮介、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗：HCV の subgenomic replicon を持つウイルス様粒子の形成と放出、同上。
- 32 松浦善治、森屋恭爾、田中啓二、宮村達男、鈴木哲朗、小池和彦、森石恆司：C型肝炎ウイルスによる脂肪肝および肝癌発症における PA28gamma の役割、第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、平成 18 年 9 月 28-30 日。
- 33 吉崎佐矢香、松田麻未、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗：温度感応性高分子 TGP を用いて三次元培養したヒト肝癌細胞の機能的解析とプロテオーム解析、日本分子生物学会、平成 18 年 12 月、名古屋。
- 34 水谷哲也、遠藤大二、白戸憲也、岡本道子、渡辺理恵、福土秀悦、西條政幸、倉根一郎、石井孝司、鈴木哲朗、清水博之、高崎智彦、森川茂、西村秀一：新興・再興感染症に備えた迅速な網羅的ウイルスゲノム検出方法 (LAV 法)、第 142 回日本獣医学会、平成 18 年 9 月、山口。
- 35 横田隆徳、石井孝司、榎 昇、矢野純一、榎本信幸、明里宏文：siRNA の静脈注射による C 型肝炎の遺伝子治療：サルを用いた C 型肝炎サロゲートモデルによる有効性の検討、第 42 回日本肝臓学会総会、平成 18 年 5 月、京都。
- 36 浜本いつき、岡本 徹、相崎英樹、西村順裕、森 嘉生、阿部隆之、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルスの複製における宿主因子 VAP-B の機能、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、平成 17 年 11 月 21-23 日。
- 37 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、鈴木健介、松尾栄子、浜本いつき、津田祥美、林 昌宏、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、宮村達男、松浦善治：HCV エンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプ VSV の感染機構、同上。
- 38 岡本 徹、西村順裕、市村 徹、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルス NS5A と相互作用する新しい宿主因子の同定、同上。
- 39 森 嘉生、山下哲生、森石恆司、松浦善治：日本脳炎ウイルスコア蛋白質のプロセッシング機構、同上。
- 40 宮本大伸、森石恆司、森屋恭爾、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男、松浦善治：C 型肝炎ウイルスコア蛋白質によるインスリン抵抗性誘発における PA28 γ の役割、同上。
- 41 岡本貴世子、森石恆司、大河内正康、武田雅俊、松浦善治：シグナルペプチドペプチダーゼによる HCV コア蛋白質のプロセッシングとその生物学的意義、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、平成 17 年 12 月 8-11 日。
- 42 石井孝司、横田恭子、竹森利忠、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、水谷哲也、田口文広、田代真人、鈴木哲朗、宮村達男：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIIs の組換え SARS ワクチンとしての検討、同上。
- 43 石井孝司、飯島沙幸、山口健次郎、榎 昇、八木慎太郎、森 健一、吉崎佐矢香、李 永仲、木村展之、揚山直英、鈴木哲朗、宮村達男、明里宏文：タマリンを用いた C 型肝炎のサロゲートモデル：tissue tropism に関する解析、同上。
- 44 村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、田中恵子、小原道法、勝二郁夫、佐多徹太郎、宮村達男、鈴木哲朗：三次元肝細胞培養システムによる C 型肝炎ウイルス (HCV) 粒子形成とその応用、同上。
- 45 飯島沙幸、石井孝司、李 永仲、八木慎太郎、山口健次郎、榎 昇、吉崎佐矢香、町田早苗、木村展之、揚山直英、寺尾恵治、鈴木哲朗、宮村達男、明里宏文：サル類を用いた C 型肝炎の新規感染病態モデルの樹立、第 140 回日本獣医学会、平成 17 年 10 月、鹿児島。
- 46 石井孝司、横田恭子、大西和夫、竹森利忠、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、水谷哲也、田口文広、田代真人、鈴木哲朗、宮村達男：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIIs の組換え SARS ワクチンとしての検討、第 9 回日本ワクチン学会、平成 17 年 10 月、大阪。
- 47 松尾栄子、林 昌宏、菰田泰正、森石恆司、八木慎太郎、松浦善治：ヒト肝癌由来細胞で作製した HCV 様粒子の性状、第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、平成 16 年 11 月 21-23 日。
- 48 林 昌宏、菰田泰正、鈴木健介、谷 英樹、大椿朋子、松尾栄子、津田祥美、森石恆司、宮村達男、松浦善治：HCV 感染におけるヒト繊維芽細胞成長因子受容体の役割、同上。
- 49 谷 英樹、Michael A. Whitt、森石恆司、松浦善治：HCV エンベロープ遺伝子を組み込んだ組換え VSV の作製、同上。
- 50 森 嘉生、脇田隆宇、小西英二、山下哲生、森石恆司、松浦善治：コア蛋白質が核に移行しない変異日本脳炎ウイルスの性状、同上。
- 51 阿部隆之、森石恆司、高久洋、田村慎一、審良静男、松浦善治：パキウイルスによる Toll-like receptor 非依存的な IFN 誘導機構、同上。
- 52 飯島沙幸、石井孝司、李 永仲、岩田奈織子、八木慎太郎、山口健次郎、榎 昇、吉崎佐矢香、町田早苗、木村展之、鈴木哲朗、佐多徹太郎、宮村達男、明里宏文：C 型肝炎ウイルスのサル病態モデル開発。 同上。
- 53 町田早苗、松井政則、石井孝司、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、赤塚俊隆：HCV envelope E1 (signal peptide)-E2 をコードする DNA を用いた HCV E2 特異的 CTL の誘導、同

上

- 54 石井孝司、横田恭子、竹森利忠、長谷川秀樹、水谷哲也、森川 茂、田口文広、田代真人、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男。高度弱毒化ワクチニアウイルス DI_s の SARS 生ワクチンとしての応用。 同上

H. 知的所有権の出願・登録状況

特許出願

- 1 2005-300350・石井孝司他 4 名・新規 RNA 結合ペプチド・2005 年 9 月 26 日出願
- 2 2004-242937・石井孝司他 12 名・財団法人ヒ

ューマンサイエンス振興財団・SARS-コロナウイルスタンパク質の全部もしくは一部のタンパク質をコードする DNA をゲノム DNA 上に保有し、該タンパク質を発現し得る組換えワクチニアウイルス DI_s 株。・2004 年 8 月 23 日出願、同海外出願

- 3 004-225043・石井孝司他 4 名・独立行政法人医薬品医療機器総合機構・HCV ウイルスタンパク質をコードする DNA を保有する組換えワクチニアウイルス DI_s 株、およびその利用・2004 年 8 月 2 日出願

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル(小伝馬町駅前)4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社