

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～19 年度 総合研究報告書

主任研究者 茶山 一彰

平成 20 年 (2008) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告

C型肝炎ウイルス感染モデルの改良と創薬へ応用可能なモデルの確立・
リバースジェネティクスシステムの開発・考察・総括

茶山 一彰 1

(資料) 分担研究報告

1. 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

吉里 勝利 17

2. C型肝炎ウイルス感染に伴うヒト肝細胞キメラマウスの遺伝子発現

プロファイル解析

金子 周一 25

3. レプリコンを用いたウイルス増殖に関与する宿主分子の網羅的解析、 リバースジェネティクスの構築

土方 誠 31

4. RNA 干渉を利用した肝疾患治療に関する基礎的検討

高倉 喜信 39

5. 脂質代謝制御による抗 HCV 戦略の検討

榎本 信幸 43

6. ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた HCV の感染機構の解析

松浦 善治 49

7. C型肝炎ウイルス感染モデルの改良と創薬へ応用可能なモデルの確立

高橋 祥一 57

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 63

III. 研究成果の刊行物・別刷り

(平成18～19年度研究成果は【別冊】に集録した。) 81

I . 総合研究報告

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：我々は、C型肝炎に対する新規治療を開発するために、抗ウイルス作用を有する薬剤の探索、ウイルス増殖に関連する人遺伝子の探索を行うとともに、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肝炎ウイルスを感染させた動物モデルを作製し、探索された分子の薬剤としての可能性を検証する系の開発を行った。この動物モデルおよび細胞を用いて、下記の点につき重点的に研究を行った。①増殖能力の異なるHCVレプリコン細胞のプロテオーム解析によるウイルス高増殖メカニズムの網羅的解析。②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の開発。③創薬研究に使用可能な肝炎ウイルス感染マウスモデルの安定供給の技術の確立。④マウスモデルによる新規薬剤の薬効、ドラッグデリバリーの効率の検定システムの確立⑤治療用ワクチン、感染防止用ワクチンの有効性のマウスモデルを用いた検証。⑥インターフェロン抵抗性を示すウイルス株の特性の解明と有効な対策の探索。⑦薬剤耐性のメカニズム解明に向けたHCVのリバースジェネティックスの確立。まず我々は、B型あるいはC型肝炎の患者血清を投与することにより、マウスへのウイルス感染が可能となることを示した。これらのマウスは、インターフェロン、核酸アナログといった抗ウイルス剤に感受性を示し、薬剤の効果判定に有用なモデルになることが明らかになった。さらに、B型およびC型肝炎ウイルスのリバースジェネティックスが可能となり、この技術を利用し、野生型や薬剤耐性の変異型の肝炎ウイルスを投与し、持続感染させることに成功した。この研究をさらに発展させ、genotype 1b型のC型肝炎ウイルス全長をクローニングし、このクローンを用いて、genotype 1b型のリバースジェネティックスの系を確立することができた。この系を用いて、これまでレプリコン細胞を用いて報告されている、U-stretchの長さとはHCV増殖の関係を*in vivo*においても明らかにした。これらの系はB型、C型肝炎ウイルスのウイルス学的解析、各種耐性ウイルスに対する治療薬の効果判定、感染の成立、予防に関する研究に有用なモデルになると考えられる。さらに班員により多数の抗ウイルス効果を示す候補化合物、候補遺伝子が見いだされた。

【分担研究者】

吉里勝利 (株)フェニックスバイオ
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
松浦喜治 大阪大学微生物研究所
教授
高橋祥一 広島大学自然科学研究支援開発
センター 助教

【班長研究協力者】

脇田隆宇 国立感染研究所ウイルス第二部

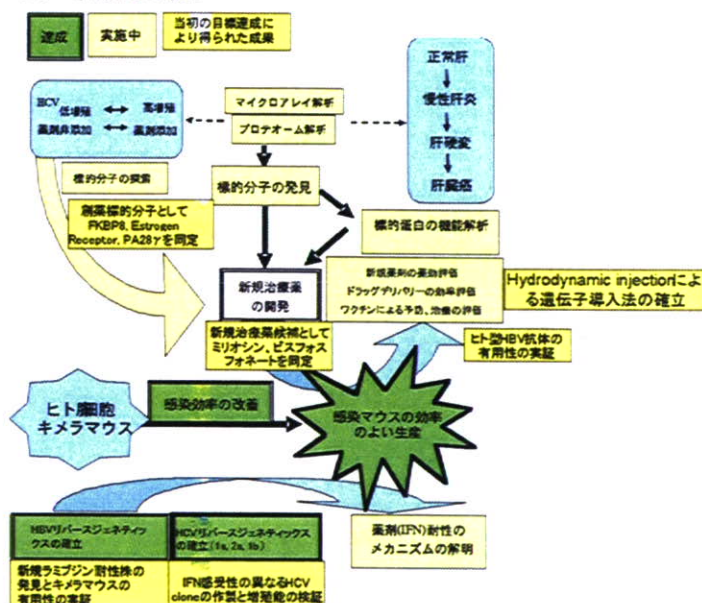
A. 研究目的

C型慢性肝炎に対する治療はPEG-インターフェロン+リバビリンの導入により改善が見込まれるが、なお症例の半数は治癒せず、副作用により使用できない症例も多い。肝硬変、肝癌による死亡は急速に増加しつつあり、世界的にも大きな健康問題である。特に日本ではキャリアの高齢化が進んでおり、早急に副作用の少ない有効な治療法を開発することは社会的にも強く要請されている。また、B型肝炎ウイルスについても、日本に100万人、世界に3億人以上のキャリアが存在し、抗ウイルス薬耐性株の問題があるため、早急な対策が必要である。我々はウイルス・細胞・動物レベルでHCVに対する新規治療薬標的分子の探索と効果の実証ができるシステムの構築を目的とし、下記の点につき重点的に研究を行うこととして班研究を開始した。

①増殖能力の異なるHCVレプリコン細胞のプロテオーム解析によるウイルス高増殖メ

カニズムの網羅的解析。②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の開発。③創薬研究に使用可能な肝炎ウイルス感染マウスモデルの安定供給の技術の確立。④マウスモデルによる新規薬剤の薬効、ドラッグデリバリーの効率の検定システムの確立⑤治療用ワクチン、感染防止用ワクチンの有効性のマウスモデルを用いた検証。⑥インターフェロン抵抗性を示すウイルス株の特性の解明と有効な対策の探索。⑦薬剤耐性のメカニズム解明に向けたHCVのリバースジェネティクスの確立。

B. 研究方法



7名の分担研究者および1名の班長研究協力者の協力の下に、目的にあげた7つの項目を柱とした研究を3年間にわたって実施した。

C. 結果と考察

目的①②に関しては、宿主側のウイルス増殖に関与する因子として、これまでに replicon 細胞を使用して La protein (Honda et al. Gastroenterology 2005)、VAP-B (Hamamoto et al. J. Virol. 2005)、FKBP8 および Hsp90 (Okamoto et al. EMBO J, 2006)

が重要な働きをしていることを明らかにした。さらに、cyclosporinが cyclophilin を介して、HCV の増殖を抑制することも明らかにした (Nakagawa et al. Gastroenterol 2005, Watashi et al. Molecular Cell 2005, Ishii et al. J Virol 2006)。また、HCV 感染キメラマウスの肝組織遺伝子発現プロファイルを検討し、HCV 感染キメラマウスでは IFN シグナルの活性化が顕著であり、ウイルス感染状態を強く反映していることを明らかにした。また外来 IFN 投与に伴う IFN 誘導遺伝子の発現誘導は HCV 感染キメラマウスでは非感染マウスに比し有意に抑制されていることを明らかにした。

③創薬研究に使用可能な肝炎ウイルス感染マウスモデルの安定供給の技術の確立に関しては、良い感染材料を使用すると、 10^3 個のウイルスでも高率にキメラマウスに持続的なウイルス血症を起こすことを明らかにした。④マウスモデルによる新規薬剤の薬効、ドラッグデリバリーの効率の検定システムの確立に関しては、HBV の reverse genetics の手法を用いて、今年度は YMDD motif に変異のない lamivudine 耐性株の存在を明らかにした。この株が *in vitro* よりも、キメラマウスを用いた *in vivo* の系でより明瞭に lamivudine 耐性を有していることを示し、この系の有用性を示すことができた。(Yatsuji et al. Antimicrob Agnet and Chemother, 2006)。HCV の研究では、Serine palmitoyltransferase inhibitor が *in vivo* で HCV の増殖抑制に有用であり、新規治療の候補となり得ることをキメラマウスを用いて実証することができた (Umehara et al. BBRC 2006)。また HIF-1 α を標的とする shRNA を肝臓にデリバリーすることにより、結腸癌肝転移が著明に抑制されることを見いだした (Takahashi et al. Gene Ther. 2008

in press.)。⑤に関しては、まだ具体的な成果はあがっていないが、ウイルスの純化と精製に関しては有効な手法を確立しつつある。⑥インターフェロン抵抗性を示すウイルス株の特性の解明と有効な対策に関しては、HCV のリバーシジェネティクス系を構築することができたので、これを利用してインターフェロンの治療効果と関連する領域に様々な変異を導入したウイルスを作成してインターフェロン抵抗因子の研究を行うことができるようになった。⑦HCV のリバーシジェネティクスについては、予想以上の進展がみられ、genotype 2a (JFH1 株)、NIH より供与された genotype 1a 株のみならず、日本人劇症肝炎患者から得られた genotype 1b 株を使用したウイルス遺伝子を使用した reverse genetics が可能となった (Kimura et al. JGV 2008 in press)。

個々の研究者の成果を下記に示す。

主任研究者(茶山一彰) (1) 患者血清から高い感染性を有する接種材料を見だし、長期間ウイルス血症を呈する感染モデルを安定供給できるようになった。(2) YMDDモチーフに変異のない新規ラミブジン耐性株を発見し、薬剤耐性の評価にキメラマウスを用いた感染モデルが有用であることを明らかにした。(3) C型肝炎ウイルスの genotype 2a、genotype 1a の infectious clone による reverse genetics のシステムを開発し、IFN の治療効果が genotype により異なることを明らかにした。(4) C型肝炎ウイルスの genotype 1b の infectious clone の作製に成功した。このウイルスに変異を加えることにより、増殖性に変化があることを証明した。(5) C型肝炎ウイルス genotype 1b クローンをを用いて、感染マウスを作製した。また U-stretch の長さが感染・増殖に関与していることを見いだした。(5) 新規 HCV 治療薬候補

としてミリオシンを同定した。

分担研究者(吉里勝利) (1)継代培養可能な肝実質細胞は、そのものには成熟肝細胞マーカーは発現していないが、uPA-scid mouse に接種して増殖させると成熟肝細胞マーカーを発現し、B型肝炎ウイルス感染も可能となることを示した。(2)HBs 抗体を産生するヒト B 細胞クローンを得てキメラマウスを使用してウイルス中和活性があることを示した。

分担研究者(土方誠) (1) C型肝炎ウイルスが肝細胞内の脂肪滴で増殖し、core 蛋白がその他のウイルス蛋白を膜にアンカリングしていることを明らかにした。(2) estrogen receptor が HCV の NS5B と会合し、ウイルス増殖に寄与していることを明らかにした。(3) C型肝炎ウイルス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)、TGF- β 、そして MAP キナーゼシグナル阻害剤である PD98059 を見出した。(4)抗がん剤として用いられているタモキシフェン(TAM)が C型肝炎ウイルスの複製を抑制することを明らかにした。

分担研究者(松浦善治) (1) FKBP8 は NS5A の TPR 領域に特異的に結合すること、Hsp90 を HCV の複製複合体にリクルートすること、FKBP8 と Hsp90 は C型肝炎ウイルスの複製に必須な宿主因子であることを明らかにした。(2) PA28 γ が C型肝炎ウイルスによる肝細胞の脂肪化、癌化およびインスリン抵抗性に重要な役割を果たすことを明らかにした。

分担研究者(榎本信幸) (1) スフィンゴミエリン合成経路、コレステロール合成経路の阻害により HCV レプリコン増殖は抑制され、相乗効果があることを明らかにした。(2) Bisphosphonate に強い C型肝炎ウイルス抑制効果があることを見いだした。さらに、Bisphosphonate の HCV 増殖抑制効果は蛋白の

グラニルグラニル化の阻害によることを明らかにした。(3) HCV レプリコンを用いてミリオシン、インターフェロン、シンバスタチンを併用することにより、抗 HCV 相乗効果が認められることを見いだした。

分担研究者(金子周一) (1) インターフェロン投与中の人末梢血リンパ球の発現プロファイルを解析し C 型慢性肝炎の症例では炎症性サイトカインの分泌が抑制されていること、また、これらのプロファイルからインターフェロン治療の効果が予測できる可能性があることを明らかにした。(2) 肝臓内の IL8 産生が、肝臓の繊維化が進行するとともに増加すること、特に肝細胞癌の症例では肉眼的な癌の悪性度の進展と相関し、生命予後と逆相関することを示した。(3) HCV 感染キメラマウスの肝組織遺伝子発現プロファイルを検討し、HCV 感染キメラマウスでは IFN シグナルの活性化が顕著であり、ウイルス感染状態を強く反映していることを明らかにした。(4) 外来 IFN 投与に伴う IFN 誘導遺伝子の発現誘導は HCV 感染キメラマウスでは非感染マウスに比し有意に抑制されていることを明らかにした。

分担研究者(高倉喜信) (1) インターフェロン遺伝子を腫瘍内で発現させ抗腫瘍効果を発揮させるときに、CpG 配列を極力とりのぞいた plasmid を使用することによって抗腫瘍効果が高まることを明らかにした。

(2) hydrodynamic injection により導入された遺伝子の発現が生理食塩水の静脈内再投与により内因性 c-fos と c-jun の発現の亢進とともに増加することを明らかにした。(3) HIF-1 α を標的とする shRNA を肝臓にデリバリーすることにより、結腸癌肝転移が著明に抑制されることを見いだした。

分担研究者(高橋祥一) (1) YMDDモチーフに変異のない新規ラミブジン耐性株を発見、

薬剤耐性の評価にキメラマウスを用いた感染モデルが有用であることを明らかにした。(2)HCVの genotype 2a、genotype 1aの infectious cloneによる reverse geneticsのシステムを開発し、インターフェロンの治療効果が genotypeにより異なることを明らかにした。(3) Genotype 1b クローンをを用いて感染させたマウスを用いて ISDR に変異が多いほど、HCV 感染の成立が低下していくことを明らかにした。

D. 結論

キメラマウスを用いて B 型肝炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルスのリバースジェネティクスの系を構築することができた。リバース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に、広く応用が可能であると思われる。特に、薬物耐性の研究には重要な価値を有すると考えられる。

E. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得（土方班員）

2007年9月26日出願、“肝炎ウイルスの増殖方法、及び肝炎ウイルス感染細胞を培養するための中空糸並びにその利用” 発明者ならびに特許出願人：東洋紡績株式会社、山口達也、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人、下遠野邦忠、土方誠、出願番号：PCT/JP2007/068611

F. 研究発表

1. Noguchi C, Ishino H, Tsuge M, Fujimoto Y, Imamura M, Takahashi S, Chayama K. G to A hypermutation of hepatitis B virus. *Hepatology* 2005;41:626-33.
2. 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.

3. Takahashi S, Chayama K. Integration of hepatitis B virus DNA and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20:1141-2.
4. Yatsuji H, Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato K, Suzuki F, Kumada H, Chayama K. Emergence of a Novel Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus Variant with a Substitution Outside the YMDD Motif. *AMAC.* 50:3867-74, 2006.
5. Utoh R, Tateno C, Yamasaki C, Hiraga N, Kataoka M, Shimada T, Chayama K. Hepatitis B Virus-Infectibility of Chimeric Mice with Liver Repopulated by Serially Subcultured Human Hepatocytes. *Hepatology* 2008 in press
6. Uka K, Aikata H, Takaki S, Miki D, Kawaoka T, Jeong SC, Takahashi S, Toyota N, Ito K, Chayama K. Pretreatment predictor of response, time to progression, and survival to intraarterial 5-fluorouracil/interferon combination therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2007 ;42(10):845-53. 2007 .
7. Yatsuji H, Hiraga N, Mori N, Hatakeyama T, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Suzuki F, Kumada H, Chayama K. Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. *J Med Virol.* 2007 Dec;79(12):1811-7.
8. Uka K, Aikata H, Takaki S, Miki D, Jeong SC, Hiramatsu A, Kodama H, Shirakawa H, Kawakami Y, Takahashi S, Toyota N, Ito K,

- Chayama K. Similar effects of recombinant interferon-alpha-2b and natural interferon-alpha when combined with intra-arterial 5-fluorouracil for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2007 Nov;27(9):1209-16.
9. Tashiro H, Itamoto T, Sasaki T, Ohdan H, Fudaba Y, Amano H, Fukuda S, Nakahara H, Ishiyama K, Ohshita A, Kohashi T, Mitsuta H, Chayama K., Asahara T. Biliary Complications after Duct-to-duct Biliary Reconstruction in Living-donor Liver Transplantation: Causes and Treatment. *World J Surg.* 2007 Nov;31(11):2222-9.
10. Jeong SC, Aikata H, Katamura Y, Azakami T, Kawaoka T, Saneto H, Uka K, Mori N, Takaki S. Kodama H, Waki K, Imamura M, Shirakawa H, Kawakami Y, Takahashi S, Chayama K. Effects of a 24-week course of interferon-alpha therapy after curative treatment of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2007 Oct 28;13(40):5343-50.
11. Jeong S, Aikata H, Katamura Y, Azakami T, Kawaoka T, Saneto H, Uka K, Mori N, Takaki S, Kodama H, Waki K, Imamura M, Shirakawa H, Kawakami Y, Takahashi S. Chayama K. Low-dose intermittent interferon-alpha therapy for HCV-related liver cirrhosis after curative treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2007 Oct 21;13(39):5188-95.
12. Hiraga N, Aikata H, Takaki S, Kodama H, Shirakawa H, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S. Toyota N, Ito K, Tanaka S, Kitamoto M, Chayama K. The long-term outcome of patients with bleeding gastric varices after balloon-occluded retrograde transvenous obliteration. *J Gastroenterol.* 2007 Aug;42(8):663-72.
13. Hatakeyama T, Noguchi C, Hiraga N, Moril N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S. Kawakami Y, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Kawakami H, Yatsuji H, Aisaka Y, Kohno H, Aimitsu S, Chayama K. Serum HBV-RNA is a Predictor of Early Emergence of YMDD Mutant in Patients Treated with Lamivudine. *Hepatology* 45:1179-1186, 2007.
14. Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S. Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Yatsuji H, Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Chayama K. Dual effect of APOBEC3G on Hepatitis B virus. *J Gen Virol.* 2007 ;88(Pt 2):432-40.
15. Uka K, Aikata H, Takaki S, Shirakawa H, Jeong SC, Yamashina K, Hiramatsu A, Kodama H, Takahashi S. Chayama K. Clinical features and prognosis of patients with extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2007 21;13(3):414-20.
16. Hiraga M, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S. Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Sakai A, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Wakita T and Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Letts.* 2007;581:1983-1987
17. Yatsuji H, Hiraga N, Mori N, Hatakeyama T, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S. Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Suzuki F, Kumada H, Chayama K. Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. *J Med Virol.* 2007;79:1811-7.
18. Ohishi W, Fujiwara S, Zuzuki G and Chayama K. Validation of the use of freeze-dried sera for the diagnosis of hepatitis B and C virus infections in a longitudinal study cohort. *Res. Adv. In*

- Microbiology 2007;7:1-9.
19. Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K, Yokoi T. In vivo induction of human cytochrome P450 enzymes expressed in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metabolism and Disposition*. 2005;33:754-763.
 20. Saito M, Kimoto M, Araki T, Shimada Y, Fujii R, Hide M, Usui T, Yoshizato K. Proteome analysis of gelatin-bound urinary proteins from patients with bladder cancers. *European Urology*. 2005;48:865-871.
 21. Nishimura M, Yokoi T, Tateno C, Kataoka M, Takahashi E, Horie T, Yoshizato K, Naito S. Induction of human CYP1A1 and CYP3A4 in primary culture of hepatocytes from chimeric mice with humanized liver. *Drug Metabol. Pharmacokin.* 2005;20:121-126.
 22. Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, 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 which genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology*. 2005;42:1046-1054.
 23. Okumura K, Asahina K, Fujimori H, Ozeki R, Shimizu-Saito K, Tanaka Y, Teramoto K, Arii S, Takase Y, Kataoka M, Soeno Y, Tateno C, Yoshizato K, Teraoka H. Generation of hybrid hepatocytes by cell fusion from monkey embryoid body cells in the injured mouse liver. *Histochemistry and Cell Biology*. 2005;125: 247-257.
 24. Katoh M, Matsui T, Okumura H, Nakajima M, Nishimura M, Naito S, Tateno C, Yoshizato K, Yokoi T. Expression of human phase II enzymes in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metabolism and Disposition*. 2005;33: 1333-1340.
 25. Nishimura M, Yoshitugu H, Yokoi T, Tateno C, Kataoka M, Horie T, Yoshizato K, Naito S. Evaluation of mRNA expression of human drug-metabolizing enzymes and transporters in Chimeric mouse with humanized liver. *Xenobiotica*. 2005;35:877-890.
 26. Emoto K, Tateno C, Hino H, Amano H, Imaoka Y, Asahina K, Asahara T, Yoshizato K. Efficient In Vivo Xenogeneic Retroviral Vector-Mediated Gene Transduction into Human Hepatocytes. *HUMAN GENE THERAPY*. 2005; 16:1138-1174.
 27. Yamasaki C, Tateno C, Aratani A, Ohnishi C, Katayama S, Kohashi T, Hino H, Marusawa H, Asahara T, Yoshizato K. Growth and differentiation of colony-forming human hepatocytes in vitro. *J. Hepatol.* 2006;44: 749-757.
 28. Aoki K, Kashiwagura Y, Horie T, Sato H, Tateno C, Ozawa N, Yoshizato K. Characterization of Humanized Liver from Chimeric Mice Using Coumarin as a Human CYP2A6 and Mouse CYP2A5 Probe. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2006;21: 277-285
 29. Yoshitsugu H, Nishimura M, Tateno C, Kataoka M, Takahashi E, Soeno Y, Yoshizato K, Yokoi T, Naito S. Evaluation of Human CYP1A2 and CYP3A4 mRNA Expression in Hepatocytes from Chimeric Mice with Humanized Liver. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2006;21:465-474.
 30. Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Tanaka S, Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Sakai A, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Wakita T, Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Letter*. 2006;581:1983 -1987.
 31. Gerashchenko B I, Yamagata A, Oofusa K, Yoshizato K, de Toledo S M, Howell R W. Proteome analysis of proliferative response of bystander cells adjacent to

- cells exposed to ionizing radiation. *Proteomics*. 2007;7:2000-8.
32. Katoh M, Sawada T, Soeno Y, Nakajima M, Tateno C, Yoshizato K, Yokoi T. In vivo drug metabolism model for human cytochrome P450 enzyme using chimeric mice with humanized liver. *J Pharm Sci*. 2007;96:428-37.
33. Okumura H, Katoh M, Sawada T, Nakajima M, Soeno Y, Yabuuchi H, Ikeda T, Tateno C, Yoshizato K, Yokoi T. Humanization of excretory pathway in chimeric mice with humanized liver. *Toxicol Sci*. 2007; 97: 533 -8.
34. Shoda J, Okada K, Inada Y, Kusama H, Utsunomiya H, Oda K, Yokoi T, Yoshizato K, Suzuki H. Bezafibrate induces multidrug-resistance P-Glycoprotein 3 expression in cultured human hepatocytes and humanized livers of chimeric mice. *Hepatol Res*. 2007;37:548-56.
35. Masumoto N, Tateno C, Tachibana A, Utoh R, Morikawa Y, Shimada T, Momisako H, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K. GH enhances proliferation of human hepatocytes grafted into immunodeficient mice with damaged liver. *J Endocrinol*. 2007;194:529-37.
36. Tokimitsu Y, Kishi H, Kondo S, Honda R, Tajiri K, Motoki K, Ozawa T, Kadowaki S, Obata T, Fujiki S, Tateno C, Takaishi H, Chayama K, Yoshizato K, Tamiya E, Sugiyama T, Muraguchi A. Single lymphocyte analysis with a microwell array chip. *Cytometry Part A*. 2007 ;71A:1003 -1010
37. Utoh R, Tateno C, Yamasaki C, Hiraga N, Kataoka M, Shimada T, Cyayama K, Yoshizato K. Susceptibility of Chimeric Mice with Livers Repopulated by Serially Subcultured Human Hepatocytes to Hepatitis B Virus. *Hepatplogy* 2008 in press.
38. 吉里勝利 ヒト肝細胞キメラマウス. *化学と生物*. 2006;44:352-354.
39. 大房 健、吉里勝利. プロテオミクス研究とそれに注目した動機及びその後の発展について. *月刊細胞*. 2006;38:2-4.
40. 吉里勝利. キメラマウス. *医学のあゆみ*. 2006;218:805-807.
41. 立野知世、森川良雄、吉里勝利. ヒト肝細胞キメラマウス Chimric mice with human hepatocytes. *メディカルサイエンスダイジェスト*. 2007;33:650-651
42. Takayuki Murata, Takayuki Ohshima, Masashi Yamaji, Masahiro Hosaka, Yusuke Miyanari, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta, *Virology* 331(2): 407-417, 2005
43. Hitoshi Takahashi, Masashi Yamaji, Masahiro Hosaka, Hiroe Kishine, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: Analysis of the 5' ent structure of HCV subgenomic RNA replicated in a Huh7 cell line, *Intervirology*, 48(2-3): 104-111, 2005
44. Koichi Watashi, Naoto Ishii, Makoto Hijikata, Daisuke Inoue, Takayuki Murata, Yusuke Miyanari, Kunitada Shimotohno: Cyclophilin B is functional regulator of Hepatitis C virus RNA polymerase, *Mol. Cell*. 19(1): 111-122. 2005
45. Takayuki Murata, Makoto Hijikiata, Kunitada Shimotohno: Enhancement of internal ribosome entry site-mediated translation and replication of hepatitis C virus by PD98059. *Virology*. 340, 105-115, 2005
46. Naoto Ishii, Koichi Watashi, Takayuki Hishiki, Kaku Goto, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Takaji Wakita, Nobuyuki Kato, Kunitada Shimotohno: Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J. Virol*. 80: 4510-4520, 2006
47. Kaku Goto, Koichi Watashi, Takayuki Murata, Takayuki Hishiki, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno:

- Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:879-884, 2006
48. Hussein H. Aly, Koichi Watashi, Makoto Hijikata, Hiroyasu Kaneko, Yasutugu Takada, Hiroto Egawa, Shinji Uemoto, Kunitada Shimotohno: Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J. Hepatol.* 46:26-36, 2007
49. Mohamed A. El-Farrash, Hussein H. Aly, Koichi Watashi, Makoto Hijikata, Hiroto Egawa, Kunitada Shimotohno: In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporine. *Microbiol. Immunol.* 51(1): 127-133, 2007
50. Yusuke Miyanari, Kimie Atsuzawa, Nobuteru Usuda, Koichi Watashi, Takayuki Hishiki, Margarita Zayas, Ralf Bartenschlager, Takaji Wakita, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* 9 (9): 1089-1097, 2007
51. Koichi Watashi, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Kaku Goto, Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno: Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptors with viral RNA polymerase NS5B. *J. Biol. Chem.*, 282: 32765-32772, 2007
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. 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-I T, 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.
57. 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. *Intervirol.* 2005 Nov-Dec;48(6):381-8.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. Yamashiro T, Sakamoto N, Kurosaki M, Kanazawa N, Tanabe Y, Nakagawa M, Chen CH, Itsui Y, Koyama T, Takeda Y, Maekawa S, Enomoto N, Sakugawa H, Watanabe M. Negative regulation of intracellular hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 3. *J Gastroenterol.* 2006 Aug;41(8):750-7.
62. 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 Hepat.* 2006 Oct;13(10):690-700.
63. Kohashi T, Maekawa S, Sakamoto N, Kurosaki M, Watanabe H, Tanabe Y, Chen CH, Kanazawa N, Nakagawa M, Kakinuma S, Yamashiro T, Itsui Y, Koyama T, Enomoto N, Watanabe M. Site-specific mutation of the interferon sensitivity-determining region (ISDR) modulates hepatitis C virus replication. *J Viral Hepat.* 2006 Sep;13(9):582-90.
64. Hosogaya S, Ozaki Y, Enomoto N, Akahane Y. Analysis of prognostic factors in therapeutic responses to interferon in patients with chronic hepatitis C. *Transl Res.* 2006 Aug;148(2):79-86.
65. Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu T, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, and Miyake S. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology* in press.
66. Takano S, Kanai F, Jazag A, Ijichi H, Yao J, Ogawa H, Enomoto N, Omata M, Nakao A. Smad4 is essential for downregulation of E-cadherin induced by TGF- β in pancreatic cancer cell line PANC-1 *J Biochem.* 2007 Mar;141(3):345-51.
67. Tasaka M, Sakamoto N, Itakura Y, Nakagawa M, Itsui Y, Sekine-Osajima Y, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Yoneyama M, Fujita T, Wakita T, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. HCV nonstructural proteins responsible for suppression of RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol.* 2007 Dec;88(Pt 12):3323-33.
68. Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Satoh K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Cheng-Hsin C, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Aug 7; [Epub ahead of print]
69. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa N, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Wakita T, Enomoto N

- and Watanabe M. Development of plaque assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology*. 2008 Feb 5;371(1):71-85.
70. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui S, Takano S, Yamaguchi T, Itakura T, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita S, Sakamoto N, Itoh M, Enomoto N. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C. *J Infect Dis*. 2008 Feb 1;197(3):361-70.
71. Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N, and Ito M. Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses HCV replication in vitro. *Hepatol. Res*. 2008; in press.
72. Yoshinaga T, Yasuda K, Ogawa Y, Nishikawa M, Takakura Y; DNA and its cationic lipid complexes induce CpG motif-dependent activation of murine dendritic cells. *Immunology*, 2007;120(3):295-302.
73. Kawano H, Nishikawa M, Mitsui M, Takahashi Y, Hattori K, Yamaoka K, Watanabe Y, Takakura Y; Improved anti-cancer effect of interferon gene transfer by sustained expression using CpG-reduced plasmid DNA. *Int. J. Cancer*. 2007; 121 (2):401-6.
74. Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y; Inhibition of tumor cell growth in the liver by RNA interference-mediated suppression of HIF-1 α expression in tumor cells and hepatocytes. *Gene Ther*. 2008 in press.
75. Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y. Critical role of PA28 α in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *PNAS*, 2007, 104, 1661-1666.
76. Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. *J. Virol.*, 2007, 81, 8953-8966.
77. Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells. *J. Virol.*, 2007, 81, 8477-8487.
78. Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.*, 2007, 81, 8601-8612.
79. Yamamoto M., Uematsu S., Okamoto T., Matsuura Y, Sato S., Kumar H., Satoh T., Saitoh T., Takeda K., Ishii K.J., Takeuchi O., Kawai T., and Akira S. Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.*, 2007, 204, 2233-2239.
80. Moriishi K., and Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev. Med. Virol.*, 2007, 17, 343-354.
81. Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y. Involvement of PA28 α -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. 2007, *J. Virol.*, 81, 1727-1735.

82. 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.*, 2007, 81, 1174-1185.
83. 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.*, 2006, 80, 11265-11273.
84. 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*, 2006, 25, 5015-5025.
85. 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*, 2006, 441, 101-105.
86. 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.* 2005, 79:13473-13482.
87. 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.* 2005, 79, 12999-13006.
88. 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.* 2005, 79, 2847-2858.
89. 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.* 2005, 79, 3639-3652.
90. 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.* 2005, 79, 3448-3458.
91. 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.* 2005, 79, 1271-1281.
92. Minagawa H, Honda M, Miyazaki K, Tabuse Y, Teramoto R, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Ueda T, Kamijo K, Kaneko S. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Feb 1;366(1):186-92. Epub 2007 Dec 4.
93. Aburatani S, Sun F, Saito S, Honda M, Kaneko S, Horimoto K. Gene systems network inferred from expression profiles in hepatocellular carcinogenesis by graphical gaussian model. *EURASIP J Bioinform Syst Biol.* 2007;:47214.

94. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, Miyamoto K, Kaneko S. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology*. 2007 Nov;46(5):1392-403.
95. Oishi N, Shilagardi K, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S, Murakami S. Hepatitis B virus X protein overcomes oncogenic RAS-induced senescence in human immortalized cells. *Cancer Sci*. 2007 Oct;98(10):1540-8.
96. Takamura T, Honda M, Sakai Y, Ando H, Shimizu A, Ota T, Sakurai M, Misu H, Kurita S, Matsuzawa-Nagata N, Uchikata M, Nakamura S, Matoba R, Tanino M, Matsubara K, Kaneko S. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Sep 21;361(2):379-84. Epub 2007 Jul 16.
97. Komura T, Mizukoshi E, Kita Y, Sakurai M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Ohta T, Shimizu K, Nakamoto Y, Honda M, Takamura T, Kaneko S. Impact of diabetes on recurrence of hepatocellular carcinoma after surgical treatment in patients with viral hepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2007 Sep;102(9):1939-46. Epub 2007 Jun 15.
98. Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Sakai A, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Wakita T, Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett*. 2007 May 15;581(10):1983-7. Epub 2007 Apr 20.
99. Tateno M, Honda M, Kawamura T, Honda H, Kaneko S. Expression profiling of peripheral-blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C undergoing interferon therapy. *J Infect Dis*. 2007 Jan 15;195(2):255-67. Epub 2006 Dec 13.
100. Kaji K, Nakamoto Y, Kaneko S. Analysis of hepatitis C virus-specific CD8+ T-cells with HLA-A*24 tetramers during phlebotomy and interferon therapy for chronic hepatitis C. *Oncol Rep*. 2007 Oct;18(4):993-8.
101. Tachibana Y, Nakamoto Y, Mukaida N, Kaneko S. Intrahepatic interleukin-8 production during disease progression of chronic hepatitis C. *Cancer Lett*. 2007 Jun 18;251(1):36-42. Epub 2007 Jan 19.
102. Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Marukawa Y, Kitahara M, Mukaida N, Kaneko S. Prolonged, NK cell-mediated antitumor effects of suicide gene therapy combined with monocyte chemoattractant protein-1 against hepatocellular carcinoma. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):574-83. PMID: 17182598
103. 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.
104. Yamashita T, Arai K, Sakai A, Mizukoshi E, Sakai Y, Kagaya T, Nakamoto Y, Honda M, Wada T, Yokoyama H, Kaneko S. Virological effects and safety of combined double filtration plasmapheresis (DFPP) and interferon therapy in patients with chronic hepatitis C: A preliminary study. *Hepatol Res*. 2006 Nov;36(3):167-75. Epub 2006 Sep 7.
105. Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Kaneko S. Different signaling pathways in the livers of patients with chronic

- hepatitis B or chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2006 Nov;44(5):1122-38.
106. Tateno M, Honda M, Kawamura T, Honda H, Kaneko S. Expression profiling of peripheral-blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C undergoing interferon therapy. *Infect Dis*. 2007 Jan 15;195(2):255-67. Epub 2006 Dec 13.
107. Sunagozaka H, Tsuji H, Mizukoshi E, Arai K, Kagaya T, Yamashita T, Sakai A, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S. The development and clinical features of splenic aneurysm associated with liver cirrhosis. *Liver Int*. 2006 Apr;26(3):291-7.

(資 料)

分担研究報告

厚生労働省科学研究費

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 分担研究報告書（平成17～19年度）

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

分担研究者 吉里勝利 株式会社フェニックスバイオ 学術顧問

研究要旨：ヒト肝細胞をもつキメラマウスに HCV を感染させ、感染により発現量が変動する肝臓タンパク質をプロテオーム解析により調べた。発現量が 2 倍以上増加するタンパク質として 34 種類、1/2 以下に減少するタンパク質 20 種類を同定した。また、インターフェロン (IFN) 投与後のスポット濃度の経時変化プロファイルを調べることにより、HCV 非感染群において IFN 投与により 2 倍以上に増加するスポットは見られなかったが、HCV 非感染群において IFN 投与により 1/2 以下に減少するタンパク質 17 種を同定した。また、HCV 感染群においては、IFN 投与により 2 倍以上増加するタンパク質 8 種、1/2 以下への減少が見られるタンパク質 27 種を同定するなど、HCV 感染並びに IFN 投与により変動するタンパク質のリストを網羅的に作成することができた。さらに、HBV Pre-S 抗原に結合する肝細胞タンパク質の網羅的探索を行い、肝細胞表面に存在し、ウイルスタンパク質と相互作用を持つタンパク質の同定に成功した。

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 (HCV) が感染し増幅することが既に確認されている。本年度は、ウイルス性の肝炎、繊維化、発癌に対する新規治療法の開発に資するため、(1) HCV 感染キメラマウス肝臓に特異的に発現するタンパク質と、(2) 肝炎に対する新規薬剤標的分子を、プロテオーム技術を利用して網羅的に探索することを目指した。

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) HCV 感染キメラマウス肝臓のプロテオーム解析

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実施した。標本は、HCV 感染

の有無及び感染群についてはインターフェロン (IFN) 投与無し、投与後 6 時間、24 時間の合計 6 群から採取した。各群それぞれ同一ドナーの肝細胞を移植して得られた 70% 以上の高置換キメラマウス 3 頭より採取した肝臓組織のヒト置換部を用いた。

(2) 肝炎に対する新規薬剤標的分子の網羅的探索

昨年に引き続き、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する疑似感染系を採用した。これを用いて 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。昨年に引き続き、本年度は、得られたタンパク質画分より得られた架橋反応物について、膜画分及び細胞質画分に分け、それぞれを Pre-S 抗体を用いた免疫沈降を得て、SDS-PAGE 及び 2 次元電気泳動の両方の解析を行った。

(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. 結果

(1) HCV 感染キメラマウス肝臓のプロテオーム解析

各群の 3 個体間における 2 次元電気泳動像の比較において、大きな違いが見られるケースが発生し、厳密なゲルイメージ間比較が困難な状況が生じた。個体の背景情報を確認したところ、この違いは、非感染群においてはキメラマウス個体間における血清中のヒトアルブミン濃度及び感染群においては感染後の日数にそれぞれ起因する問題であることが判明した。このため血清中のヒトアルブミン濃度および感染後の日数がそろった個体のみを解析に用いることによりこの問題を克服し、各群 3 検体、合計 18 枚のゲルにお

ける比較解析を実施した。

この解析により、HCV 感染によりタンパク質発現量において、2 倍以上の増加が見られたものが 24 スポット、1/2 (0.5 倍) 以下に減少したものが 23 スポット見いだされた。2 倍以上増加が見られたスポットからは 34 種類、0.5 倍以下に減少が見られたスポットからは 20 種類 (重複のため) のタンパク質が同定された。

また、IFN 投与後の経時変化については、スポット濃度の変動プロファイルを、自己組織化マップ法などを用いて解析し、HCV 感染後の IFN 作用のマーカールあるいは標的となりうるタンパク質が多数見いだされた。その中で、HCV 非感染群において IFN 投与により 2 倍以上に増加するスポットは見られなかったが、HCV 非感染群において IFN 投与により 1/2 以下に減少するタンパク質 17 種を同定した。また、HCV 感染群においては、IFN 投与により 2 倍以上増加するタンパク質 8 種、1/2 以下への減少が見られるタンパク質 27 種を同定し、HCV 感染並びに IFN 投与により変動するタンパク質を網羅的に探索した。

これらの候補タンパク質については、今後の詳細な解析が必要となるが、HCV 感染によるタンパク質の変動並びに、IFN 投与これらの中には interferon regulatory factor との相互作用が確認されているタンパク質や interferon inducing MX protein などが見いだされた。

(2) 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 に固定したビー