

10. Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee YJ, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Mori K, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. **Microbes Infect.** 9: 515-21 (2007).
11. 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, Nishimura H. Rapid genome sequencing of RNA viruses. **Emerg. Infect. Dis.** 13: 322-324 (2007).
12. Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. The NS3 helicase and NSSB-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. **J. Virol.** 81: 8030-8040 (2007).
13. Inoue Y, Murakami K, Hmwe SS, Aizaki H, Suzuki T.

Transcriptomic comparison of human hepatoma Huh-7 cell clones with different hepatitis C virus replication efficiencies. **Jpn. J. Infect. Dis.** 60: 173-178 (2007).

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告書

HCV 複製増殖の分子基盤解析

分担研究者 下遠野 邦忠 千葉工業大学 附属総合研究所

研究要旨 HCV 複製における細胞内の代謝異常を解析し、HCV 感染増殖細胞における脂肪代謝異常を見いだした。さらに、細胞内に蓄積された脂肪滴にはウイルス蛋白質に加えてウイルスの複製複合体が会合している。油滴と会合出来ないウイルス蛋白質を産生する変異体からは感染ウイルス粒子の産生は見られない。また、感染性ウイルス粒子はおよび非感染性粒子が培養上清に見られるが、感染性ウイルス粒子は、浮遊密度が非感染性粒子よりも小さいことがわかり、浮遊密度の小さい感染性ウイルス粒子の産生は、ウイルスタンパク質が油滴と会合している場合に見られることがわかった。以上から油滴が感染性ウイルス粒子の産生に重要な働きをしていることを明らかにした。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) は肝炎発症、および肝がん発症の危険因子である。HCV 感染によるこれらの疾患を予防するにはウイルス複製を効率よく阻害する薬剤の開発が急務である。そのためには、HCV 複製機構を理解して、その基本的なメカニズムを標的にした抗ウイルス剤の開発が必要である。本研究では、これまでに樹立した HCV サブゲノムが効率よく自立複製する細胞およびウイルス感染複製系を用いて、複製を制御する細胞側の因子の解析を行う。

B. 研究方法

(1) ウイルスゲノム自立複製細胞を用いたウイルス蛋白質の細胞内局在の解析。

HCV ゲノムを効率よく自立複製可能な細胞を（倫理面への配慮）

本研究はヒト臨床検体、あるいは動物実験を含まない。

おけるウイルスタンパク質の細胞内局在について。

用いて、ウイルス蛋白質の細胞内局在を明らかにする。特に、サブゲノムレプリコン複製細胞での解析を行う。さらにウイルスゲノム複製を簡便に測定するためにルシフェラーゼ活性を指標にして解析できる系を用いてアッセイを行う。同時にウイルス RNA の局在についても解析する。

(2) HCV 感染増殖系を用いて、(1) と同様に実験を行う。これまでの研究から、コアは油滴と会合することが明らかにされている。そこで、コアと油滴との会合がウイルス産生にどのような役割を果たすかについて、感染性ウイルス粒子産生系を用いて解析する。具体的にはすでに感染性が証明されている HCV-2a 遺伝子由来の JFH1 を用いて、そのレプリコンが複製している細胞における油滴への HCV タンパク質の会合とウイルス粒子産生について調べる。

C. 研究結果

(1) ウウイルスタンパク質を発現した細胞に HCV 非構造タンパク質の細胞内局在を調べるために、それぞれのタンパク質を単独に培養細

胞 Hub7 に発現させその細胞内局在を調べた。これまで、コアタンパク質については油滴に局在することが報告されている。そこで、主として非構造タンパク質に注目して解析を行った。NS5A, NS5B を中心に非構造タンパク質の局在は核膜周辺に局在した。小胞体膜タンパク質のマーカである PDI の局在とほぼ一致したことからこれらのウイルスタンパク質は主として小胞体膜に局在することが明らかになった。コアタンパク質の細胞内局在も、主として小胞体膜周辺に観察された。これまでにコアは油滴に会合している都の報告があるために、油滴を染色するボディピィーを用いて解析したところ、コアタンパク質の一部はボディピィーと局在が一致した。以上から、このウイルスタンパク質の局在は、小胞体あるいは油滴であることが明らかになった。

(2) 感染性ウイルス粒子を産生する HCV レプリコンを用いたウイルスタンパク質の細胞内局在

感染性ウイルスゲノムレプリコン JFH1 を Hub7 に導入し、その細胞におけるウイルスタンパク質の細胞内局在を解析した。特にコアタンパク質および非構造タンパク質として NS5A, 5B, 4A, 4B を中心に調べた。いずれのタンパク質も単独で発現させたときと同様に小胞体膜に存在するマーカータンパク質 PDI と局在が一致した。しかし、細胞内局在の解析で小胞体膜と油滴とを区別しながら解析することにより、コアタンパク質は小胞体膜近辺の油滴にも局在することが分かった。さらにこの解像条件下で非構造ウイルスタンパク質の局在を調べたところ、油滴の近辺にも非構造タンパク質が一部局在することが分かった。

(3) 油滴の周りにはコアタンパク質の他に非構造タンパク質も同時に局在する

ウイルスタンパク質が小胞体膜周辺への局在と油滴周辺への局在の違いを示すことが明らかになった。そこで、これらの違いがウイルス産生にどのような影響を与えるかについて調べるために、ウイルス粒子産生を指標にして油滴とウイルスタンパク質の会合に意義を調べた。

まず、油滴に隣接する周辺にコアタンパク質が局在すること、そのコアを取り巻く様にして非構造タンパク質が局在することが分かった。非構造タンパク質とコアの直接的な会合は電子顕微鏡観察からは見られなかった。一方、ウイルスタンパク質が会合している油滴の周りには膜様構造が構築されていることが分かった。

(4) ウウイルスタンパク質が油滴と会合することが感染性粒子産生に重要である

油滴へのウイルスタンパク質の会合が粒子産生に果たす役割を調べるために、油滴と会合できない HCV 変異ゲノムを構築して、そのゲノムを発現している細胞におけるウイルス粒子産生を調べた。それらの細胞上清からウイルスを濃縮して、蔗糖密度勾配遠心によりウイルス粒子を分画した。各分画について、ウイルス粒子をコアの量で定量すると同時に、感染性の解析を行った。その結果、油滴と会合できないウイルスゲノムを産生する細胞からは非感染性粒子が産生されるににもかかわらず、感染性粒子の産生は見られなかった。一方、もとの HCV ゲノムを産生する細胞の上清には非感染性、感染性粒子の両方が産生された。

(5) 感染性ウイルス粒子は、非感染性ウイルス粒子に比べ浮遊密度が小さい

蔗糖密度勾配遠心により分画したウイルス粒子の解析から、感染性ウイルス粒子は浮遊密度が 1.12、非感染性粒子のそれは 1.15 であっ

た。油滴に会合できない HCV ゲノム変異体からは、感染性粒子の産生が見られなかったことから、浮遊密度の小さい感染性粒子の産生には油滴が重要な働きをしていると結論づけた。

D. 考察

HCV が細胞内で複製し、感染性粒子を産生する機構は明らかでない。この機構を明らかにすることにより、抗 HCV に向けた薬剤の開発が可能になると期待される。本研究ではウイルスタンパク質の細胞内局在を解析しながら、粒子産生の分子機構解明に役立てようと試みた。その結果、粒子産生には油滴が重要な役割を果たしていることを明らかにした。すなわち、構造タンパク質コアが油滴に会合し、その周りに新たな膜様構造が構築される。その膜様構造の中にウイルス非構造タンパク質が会合する。非構造タンパク質が油滴に会合できない変異体では感染性粒子の産生が見られないことから、油滴とウイルスタンパク質との会合が感染性粒子の産生に重要であるといえる。なお、感染性粒子は非感染性粒子に比べて浮遊密度が小さいことも分かった。これらのことから、HCV が感染性を付与されるためには、脂質性の因子と会合する可能性が考えられる。これらの成果より、コアが油滴に会合できなくなる方策、非構造タンパク質が油滴に会合できなくなる方策の開発は抗 HCV 剤開発に道を開くと期待される。また、感染性粒子の物理的性状の解析はウイルス感染の分子機構を明らかにするために重要である。

E. 結論

HCV の複製に油滴が重要な働きをしていることを明らかにした。この様な油滴の働きは、HCV 感染による脂肪代謝の変化を示唆し、さらには感染者における脂肪症発症の原因になるかも知れない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watashi K, Shimotohno K., Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy. *Rev Med Virol.* 2007, in press
2. Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K., Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. *J Biol Chem.* 2007, inpress
3. Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K., Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol.* 46 (1):26-36, 2007.
4. Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Sakamoto T, Araki H, Shimotohno K., Helper virus-independent trans-replication of hepatitis C virus-derived minigenome. *Biochem Biophys Res Commun.* 352 (1):170-176, 2007
5. El-Farrash MA, Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Egawa H, Shimotohno K., In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporin. *Microbiol Immunol.* 2007;51 (1):127-133, 2007
6. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K., The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat*

Cell Biol. 9(9):1089-9710, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

発明の名称：「肝炎ウイルスの増殖法、およ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：下遠野 邦忠、土方 誠、山口達哉

国際出願番号：PCT/JP2007/068611

出願日：2007年9月26日

C型肝炎治療薬創薬シーズの探索に関する研究
ウイルス蛋白-宿主因子相互作用の分子機構に関する研究

分担研究者 堀田 博 神戸大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）は慢性肝炎や肝硬変、肝細胞がん等の肝内病変を引き起こすのみならず、2型糖尿病等の肝外病変を引き起こすことが知られている。一方、グルコーストランスポーター（GLUT）ファミリーは細胞内への糖の取り込みに重要な役割を果たしている。GLUT2は肝細胞、膵β細胞に特異的に発現しており、GLUT1は肝細胞がんをはじめとする様々な悪性腫瘍に発現が認められている。本研究では、ヒト肝がん由来 Huh-7.5細胞、HCVサブゲノムRNAレプリコン複製細胞（SGR）、HCV全長ゲノムRNAレプリコン複製細胞（FGR）及びHCV J6/JFH-1感染細胞を用いて、肝細胞におけるグルコースの取り込みに対するHCVの影響に関して検討を行った。その結果、SGR、FGR及びHCV感染細胞では、いずれも、細胞内グルコースの取り込みが抑制されていることがわかった。FACS解析により、GLUT2及びGLUT1の細胞表面への発現が、SGR、FGR及びHCV感染細胞において、いずれも著明に抑制されていることがわかった。さらにGLUT2については、SGR、FGR、HCV感染細胞においてmRNA発現の抑制を認めた。HCV感染ヒト肝組織においては、非感染対照肝組織に比べて、GLUT2の発現が著明に抑制されていた。以上の結果から、HCV感染により、GLUT2及びGLUT1の細胞表面の発現が低下し、グルコースの取り込みが抑制されていることが示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は慢性肝炎や肝硬変、肝細胞がん等の肝内病変のみならず、2型糖尿病等の肝外病変を引き起こすことが知られている。その一因として、HCV持続感染により誘導される肝臓の線維化が関与していることが指摘されている。一方、HCV感染そのものがインスリン抵抗性に直接関与する可能性も報告されているが、詳細な機序については未だ不明の点も多い。

細胞内糖代謝の入り口である糖の取り込みにおいて、グルコーストランスポーター（GLUT）ファミリーがその役割を果たしている。GLUTファミリーには14のアイソフォームが存在することが報告さ

れている。そのうち、GLUT2は肝細胞、膵β細胞及び小腸に特異的に発現しており、GLUT1は肝細胞がんをはじめとする様々な悪性腫瘍に発現が認められている。

本研究では、HCV RNAレプリコン複製細胞とHCV J6/JFH-1感染培養細胞を用いて、肝細胞におけるグルコースの取り込み及びグルコース取り込みを司るGLUT2及びGLUT1の発現に及ぼすHCVの影響について検討を行った。

B. 研究方法

(1) ヒト肝がん細胞（Huh-7.5）と同細胞由来のHCVサブゲノムRNAレプリコン複製細胞（SGR）、

HCV 全長ゲノム RNA レプリコン複製細胞 (FGR) 及び HCV J6/JFH-1 感染細胞を用いて、2-deoxy-D-[1,2-³H] glucose (2-DG) の取り込みを測定した。

(2) 上記細胞の細胞表面の GLUT2 及び GLUT1 の発現について、各マウスモノクローナル抗体(Alpha Diagnosis)を用いて、フローサイトメトリーで測定した。対照として、トランスフェリン受容体の細胞表面発現を測定した。

(3) 上記細胞における GLUT2 及び GLUT1 の mRNA 発現を定量 RT-PCR により測定した。また、GLUT2 についてはルシフェラーゼをレポーター (pGL 4.23 ルシフェラーゼレポーターベクター、プロメガ) としたプロモーターアッセイを行った。プロモーター部分には、GenBank ID: AH002747 の-1296~+312 を用いた。

(4) 剖検検体及び病理診断用に採取した HCV 及び B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染肝組織並びに非感染肝組織 (いずれも非がん部) を用いて、ウサギ GLUT2 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) によって、免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト肝組織は、肝がん患者から治療目的で摘出し病理検査に供したものと及び剖検組織を用いた。組み換え遺伝子を用いた実験は神戸大学組換え遺伝子実験安全委員会の承認及び文部科学大臣の確認を得て行った。

C. 研究結果

(1) グルコースの取り込み：SGR、FGR 及び HCV 感染細胞においては、対照 Huh-7.5 細胞に比して、2-DG の取り込み能が約 60%抑制された。

(2) 細胞表面の GLUT の発現：SGR 及び FGR において、GLUT2 及び GLUT1 の細胞表面への発現は、対照 Huh-7.5 細胞に比して、著明に抑制されていた。また HCV 感染細胞においても、非感染対照細胞に比して、GLUT2 及び GLUT1 の発現の抑制が認められた。一方、膜タンパク質であり膜への輸送によって機能が制御されることが知られているト

ランスフェリン受容体では、その細胞表面の発現レベルに有意な差は認められなかった。

さらに、細胞内プロテアソームにおける GLUT タンパク分解の関与を検討するために、SGR、FGR、HCV 感染細胞及び対照 Huh-7.5 細胞にプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンの処理を行った。その結果、ラクタシスチン処理の有無に関わらず、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、GLUT2 及び GLUT1 の細胞表面の発現レベルは、対照細胞に比して低値のままであった。

(3) GLUT mRNA の発現とプロモーター解析：SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、対照 Huh-7.5 細胞に比して、GLUT2 mRNA の著明な発現の抑制を認めた。一方、GLUT1 mRNA の発現には有意な差は認められなかった。GLUT2 のプロモーター活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討したところ、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、対照 Huh-7.5 細胞に比して、有意に低値を示した。

(4) ヒト肝組織を用いた検討：非感染肝組織においては、肝細胞の細胞質辺縁部に GLUT2 の発現を認めたが、HCV 感染肝組織においては GLUT2 の発現は著明に抑制されていた。この発現の抑制は、一様ではなく、肝小葉の限局された肝細胞で認められた。一方、HBV 感染肝組織においてリンパ球浸潤が認められ、肝全体で GLUT2 の発現低下が認められた。

D. 考察

HCV が糖尿病発症に関与する機序として、細胞内糖代謝の入り口である糖の取り込み異常が肝臓の代謝異常に関与することが考えられる。そこで本研究では、細胞の糖の取り込みに及ぼす HCV の影響について検討を行った。2-DG の取り込み能が、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、対照 Huh-7.5 細胞に比して抑制されていた。この結果から、HCV 感染により糖の取り込みが抑制されると考えられた。すなわち、生体における耐糖能異常の原因の一つとして、HCV 感染による糖の取り込み低下が関与している可能性が示唆された。

細胞内への糖取り込みの役割を演じる GLUT について、細胞表面への発現を検討したところ、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、対照 Huh-7.5 細胞に比して、細胞表面の GLUT2 及び GLUT1 の発現が低値を示した。この結果から糖取り込みの低下は、細胞表面の GLUT2、GLUT1 の発現低下によるものであると考えられた。

GLUT 細胞表面発現の低下のメカニズムを検討するために、細胞内プロテアソームでのタンパク分解の影響について調べた。プロテアソーム阻害剤であるラクタシスチン処理を施したが、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、GLUT2 及び GLUT1 の細胞表面の発現レベルの回復は認められなかった。

次に、GLUT の mRNA 発現レベルを検討するために、定量 RT-PCR を行った。GLUT2 mRNA は、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、対照 Huh-7.5 細胞に比して、有意に低値を示した。また、GLUT2 のプロモーター活性についても SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、対照細胞に比して、有意に低値を示した。これらの結果から、HCV 感染は、GLUT2 の転写レベルでの発現制御を介して細胞表面の発現を低下させることが考えられた。一方、GLUT1 mRNA については、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、対照 Huh-7.5 細胞に比して差を認めなかったことから、GLUT1 の細胞表面発現の抑制は、転写やプロテアソーム系を介したタンパク質分解とは異なる制御機構により引き起こされている可能性が考えられる。近年、いくつかの膜タンパク質ではリサイクリング機構も提唱され、トラフィッキング経路の存在が認められてきている。GLUT ファミリーのうち、GLUT4 ではインスリン作用による細胞膜へのトラフィッキングが報告されている。本研究において、HCV における GLUT2 及び GLUT1 の細胞表面の発現低下に、HCV によるトラフィッキング作用への影響が関与する可能性が考えられる。HCV による GLUT 細胞表面発現の低下機構については、今後トラフィッキング機構を含めて、詳細な検討を進めたい。

非感染肝組織で認められる細胞質辺縁部での

GLUT2 の発現が、HCV 感染肝組織において著明に抑制されていた。またこの抑制は肝小葉の限局された肝細胞で認められたことから、HCV 感染では肝組織内の HCV 感染の起こっている細胞で、GLUT2 の発現の低下が引き起こされている可能性が考えられる。一方、HBV 感染肝組織では、肝全体で GLUT2 の発現低下が認められ、肝でのリンパ球浸潤が認められたことから、炎症反応に伴った肝全体の GLUT2 の発現低下が考えられる。HCV 感染及び HBV 感染における GLUT2 の発現抑制のメカニズムについては、今後の詳細な検討が必要である。

E. 結論

HCV レプリコン複製細胞及び HCV 感染細胞において、糖輸送担体の GLUT2 及び GLUT1 の細胞表面の発現が低下し、グルコースの取り込みが抑制されていることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya N, Kohara M, Sada K, Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J Gen Virol* (in press)
2. Goto E, Mito-Yoshida M, Uematsu M, Aoki M, Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Hotta H, Miyagishi M, Ishido S. An excellent monitoring system for surface ubiquitination-induced internalization in mammals. *PLoS ONE* 3(1):e1490, 2008.
3. Nishise Y, Saito T, Sugahara K, Ito JI, Saito K, Togashi H, Nagano-Fujii M, Hotta H, Kawata S. Risk of hepatocellular carcinoma and secondary structure of hepatitis C virus (HCV) NS3 protein amino-terminus, in patients infected with HCV subtype 1b. *J Infect Dis.* 196(7):1006-1009, 2007.

4. El-Shamy A, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Prediction of efficient virological response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy by NS5A sequences of hepatitis C virus and anti-NS5A antibodies in pre-treatment sera. *Microbiol Immunol.* 51(4):471-482, 2007.
 5. Lu L, Li C, Fu Y, Thaikruea L, Thongswat S, Maneekarn N, Apichartpiyakul C, Hotta H, Okamoto H, Netski D, Pybus OG, Murphy D, Hagedorn CH, Nelson KE. Complete genomes for hepatitis C virus subtypes 6f, 6i, 6j and 6m: viral genetic diversity among Thai blood donors and infected spouses. *J Gen Virol.* 88(5):1505-1518, 2007.
 6. Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Goto E, Aoki M, Mito-Yoshida M, Uematsu M, Hasegawa T, Koseki H, Ohara O, Nakayama M, Toyooka K, Matsuoka K, Hotta H, Yamamoto A, Ishido S. Novel regulation of MHC class II function in B cells. *EMBO J.* 26(3):846-854, 2007.
 7. Vallet S, Gouriou S, Nkontchou G, Hotta H, Vilerio M, Legrand-Quillien MC, Beaugrand M, Trinchet JC, Nousbaum JB, Dény P, Gaudy C, Goudeau A, Picard B, Payan C. Is hepatitis C virus NS3 protease quasispecies heterogeneity predictive of progression from cirrhosis to hepatocellular carcinoma? *J Viral Hepat.* 14(2):96-106, 2007.
2. 学会発表
1. Kasai D, Nagano-Fujii M, Bungyoku Y, Sasayama M, Sada K, Hotta H Glucose uptake and GLUT1/2 expression are down-regulated in Huh-7.5 cells harboring an HCV subgenomic RNA replicon and full-genomic RNA replicon. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, 2007.
 2. Kitayama K, Bungyoku Y, Deng L, An C, Nagano-Fujii M, Hotta H. HCV with high replication/release capacity in Huh-7.5 cell cultures obtained by a simple, rapid method exhibits two distinct types of cytopathic effect. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, 2007.
 3. Deng L, Nagano-Fujii M, Kitayama K, An C, Bungyoku Y, Hotta H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis via a mitochondrial-related caspase pathway. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, 2007.
 4. Bungyoku Y, Kitayama K, Nagano-Fujii M, Hotta H. Analysis of adaptive mutants of the J6/JFH-1 strain of hepatitis C virus genotype 2a. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, 2007.
 5. El-Shamy A, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Kim, RS, Hotta H. Sequence variations in and around the V3 region of NS5A of HCV genotype 1b: a predictive marker for sustained virological response upon treatment with pegylated interferon and ribavirin. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, 2007.
 6. 笠井大介、長野基子、分玉泰彰、笹山美紀子、定清直、堀田博 C型肝炎ウイルスは GLUT2、GLUT1 の細胞膜表面への発現の抑制を介してグルコース取り込みを抑制する 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007
 7. Deng Lin、長野基子、北山喜久美、安春英、分玉泰彰、堀田博 C型肝炎ウイルス感染による細胞変性効果の分子機序の解析 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007
 8. 北山喜久美、分玉泰彰、Deng Lin、安春英、長野基子、堀田博 高感染力価の HCV J6/JFH-1 株の産生とウイルス細胞変性効果(CPE)の解析 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007
 9. 分玉泰彰、北山喜久美、長野基子、堀田博 長期間培養により得られた増殖適応変異を有す

る C 型肝炎ウイルス (HCV) の解析 第 55
回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2007

10. Ahmed El-Shamy、笹山美紀子、長野基子、金
守良、堀田博 C 型肝炎ウイルス NS5A V3 領
域近傍のアミノ酸配列多様性：ペグインター
フェロン・リバビリン併用療法における SVR
予測因子の検討第 55 回日本ウイルス学会学術
集会, 札幌, 2007
11. 笠井大介、長野基子、分玉泰彰、北山喜久美、
足達哲也、堀田博 C 型肝炎ウイルスによる
GLUT2、GLUT1 の細胞膜表面への発現の抑制
を介したグルコース取り込みの抑制に関する
検討 第 60 回日本細菌学会関西支部総会、
大阪, 2007.
12. 北山喜久美、分玉泰彰、Deng Lin、安春英、長野
基子、堀田博 高感染力価の HCV J6/JFH-1 株
の産生とウイルス細胞変性効果の解析 第 60
回日本細菌学会関西支部総会、大阪, 2007.

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基礎研究

分担研究者 瀬谷 司 北海道大学教授

研究要旨 ヒト樹状細胞が肝実質細胞の HCV 感染 debris を取り込み、免疫応答（NK 細胞活性化、Th1 誘導）を誘起するメカニズムを明らかにした。

A. 研究目的

樹状細胞は成熟化すると Natural killer (NK) 細胞・細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を活性化する。この活性化にウイルス感染を感知する細胞内外の RNA センサーが関与するかを解析する。HCV は宿主肝細胞に感染するが、樹状細胞には感染しない。HCV が宿主に type I interferon (IFN) を誘導させる機構も解明することを目的とする。

B. 研究方法

1. HCV 感染により樹状細胞・肝実質細胞が IFN を誘導するか、HCV の感染認識が上記細胞において TLR3, RIG-I, MDA5 のいずれの経路によって起こるか、を明らかにする。これらのアッセイ系は当講座で確立されている。

2. CTL/NK を活性化する *in vitro* 評価システムを確立する。HCV 存在下でヒト樹状細胞が CTL/NK 活性化の指向性を獲得するか、をテストする。NK 活性化を付与する樹状細胞因子を同定する。

（倫理面への配慮）

Huh7.5.1 に感染する HCV の亜株を脇田博士より恵与を受けた。他のヒト試料とともに倫理委員会の承認を得た。他に倫理的配慮を要するものはない。

C. 研究結果

1. ヒト myeloid 樹状細胞は脇田株に如何なる条件でも感染が証明できなかった。しかし、肝細胞株 Huh7.5.1 には moi=1-10 の間で CPE が観察できた。この肝細胞株の debris を樹状細胞が取り込むと強い Mixed lymphocyte reaction (MLR), Th1 誘導、NK 細胞活性化が *in vitro* assay で確認できた。

2. この樹状細胞の debris 取り込みで HCV 由来の dsRNA が endosome (TLR3 が存在する) にマージするのが共焦点レーザー顕微鏡で確認できた。樹状細胞は TLR3, TICAM-1 (TRIF) 経路を持ち TICAM-1 経路が活性化すると NK 細胞が誘導される (Akazawa PNAS 2007)。HCV 感染の場合、この経路がヒトの樹状細胞でも機能して IFN 誘導、NK 活性化が誘起すると判明した。

3. NK 細胞を HCV が直接活性化する可能性も調べたが、殆ど起きない事が判明した。

D. 考察

TICAM-1 陽性、陰性の KO マウスを使って genechip subtraction を行ない、NK 指向性の樹状細胞を誘導する分子機構を明らかにすることを試みた。TICAM-1 特異的に誘導される膜分子を 2 種同定できた。これらをレンチウイルスベクターで樹状細胞に発現させると *in vitro* で NK 活性化が高く誘導された (未公表)。従って HCV 感染では肝実質細胞が感染巣となり、HCV の RNA を含んだ細胞小胞ができると樹状細胞が取り込んで細胞性免疫が活性化すると考えられる。この樹状細胞経路

はヒトでも TLR3-TICAM-1 経路を使うことが分かっている。

TICAM-1 経路は IFN を誘導する系でもある。しかし、IFN-beta は NK 活性化を誘導しなかった。一方、樹状細胞膜の NK リガンドが NK 活性化を誘導することが判明した。この細胞応答は一般に+鎖 RNA ウイルスと 2 重鎖 RNA ウイルスの産物 (dsRNA) で起きる (未発表データ)。HCV も特有な外因性のウイルス RNA 取り込みによって細胞性免疫を起動する結果になっているのかもしれない。

肝炎の予防にワクチンを開発する際、TLR3 を活性化するワクチン株は CTL/NK を効率よく誘導できるはずである。また、in vitro で樹状細胞の maturation を評価し、必要であれば MLR で allostimulatory capacity と DC-NK interaction を評価するとワクチンの有効性を査定できる。

最後に、HCV は樹状細胞に感染しにくいので、ワクチン投与の際抗原を (非感染性に) endosome に取り込む経路を使う必要がある。一般に抗原取り込みとともに cross-priming が起きるはずで、これに付随する CTL 誘導機構も解析し、今後の肝炎対策への基礎資料としたい。

E. 結論

ヒト樹状細胞の NK 活性化の誘導機構を HCV RNA の外因性取り込みによることを明らかにした。

G. 研究発表

別紙 4 参照

動物モデルの開発およびそれを用いた解析

分担研究者 小原 道法（財）東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所 参事研究員

研究要旨 HCV 遺伝子発現により発現量が亢進する分子 Dehydrocholesterol reductase 24 (DHCR24) を同定した。DHCR24 阻害剤である U18666A を投与したヒト型肝臓キメラマウスは異常を示すことなく、HCV 複製を特異的に阻害できたことから、U18666A が抗 HCV 薬になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

DHCR24 が HCV の複製の場である脂質ラフトの構成分子でもあるコレステロールの合成に関与していることから、DHCR24 と HCV 複製の関連性について解析を行った。

B. 研究方法

DHCR24 に対する siRNA を 2 種類作成し、DHCR24 発現抑制による HCV 複製への影響を検討した。さらに、ヒト型肝臓キメラマウスに HCV を感染後、U18666A 投与時の血清中 HCV RNA 量を定量した。

（倫理面への配慮）

動物実験は東京都臨床医学総合研究所の実験動物指針に基づいて行った。

C. 研究結果

DHCR24 に対する siRNA での発現抑制により HCV 複製は約 40%減少した。DHCR24 阻害剤として知られている U18666A および 4-hydroxitamoxifen (4OH-Tam) を用いて HCV 複製を検討した結果、阻害剤添加後 48 時間で細胞傷害性を示すことなく HCV 複製能のみを約 60-80%減少させた。U18666A をヒト型肝臓キメラマウスに 2 週間単独投与する事により

血清中の HCV RNA 量が約 1/100 に減少した。

D. 考察

DHCR24 が HCV 複製に重要な因子であることが明らかとなり、治療薬の標的分子となる事が示唆された。また、HCV は DHCR24 のようなコレステロール合成に関与する宿主因子の発現量を亢進させ自己複製しやすい環境を整えていることが明らかになった。

E. 結論

U18666A を投与したヒト型肝臓キメラマウスは異常を示すことなく、HCV 複製を特異的に阻害できたことから、U18666A が抗 HCV 薬になる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitabatake M., et al. : SARS-CoV spike protein recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in spite of pre-immunization with vaccinia virus. *Vaccine* 25 : 630-637 (2007)

- 2) Nakagawa S., et al. : Inhibition of Hsp90 suppresses HCV replication in replicon cell lines and in chimeric mice with humanized liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353:882-888 (2007)
- 3) Inoue K., et al. : Evaluation of the cyclophilin inhibitor DEBIO-025 in hepatitis C virus-infected chimeric mice in vivo. *Hepatology* 45:921-928 (2007)
- 4) Watanabe T., et al. : Liver target delivery of small interfering RNA to the HCV gene by lactosylated cationic liposome. *J. Hepatology* 47: 744-750 (2007)

2. 学会発表

- 1) 小原道法 : スフィンゴ脂質とC型肝炎ウイルス複製. 第49回日本脂質生化学会 2007.6.5-6. 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称 : 「抗ウイルス剤」、特願 : 2007-070028、発明者 : 小原道法、中川慎一郎、出願日 : 2007年3月19日、出願人 : 東京都医学研究機構、日本新薬株式会社

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HCV 複製モデルの改良

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨 既存の HCV 複製モデルを使いやすい形に改良することや新規 HCV 複製モデルを創出することを目的として実験を行い、以下のような成果を得た。(1) 生細胞のまま HCVRNA の複製レベルを定量できる OGF7 システム（昨年度開発）はルシフェラーゼによるこれまでの OR6 レポーターアッセイシステムと同程度の感度を有する定量システムであることを示した(2) C 型急性肝炎患者血清(AH1)由来の HCVRNA を用いて、HCV レプリコン複製細胞株(sAH1)と全長 HCVRNA 複製細胞株(AH1)を樹立した(3) HCVRNA の複製に対する抗 HCV 剤の効果を AH1 株と HCV-O 株と比較した結果、AH1 株は HCV-O 株に比べてインターフェロン(IFN)-gに感受性が低く、シクロスポリン(CsA)に感受性が高いことが分った。これらの結果から、HCV 株により薬剤に対する感受性が異なる可能性が考えられた。

A. 研究目的

我が国における肝がんによる犠牲者は毎年3万人を超えており、その8割にはC型肝炎ウイルス(HCV)の感染が認められている。肝発がんを予防するためには、HCVを体内から排除して持続感染状態を脱することが必須であることが明らかになっている。しかしながら、現時点で最も有効なペグインターフェロン(ペグIFN)とリバビリンとの併用療法によっても、なお、半数の患者ではHCVを体内から排除できない状況が続いている。

HCVを体内から排除する、あるいはHCVの増殖を抑制する方法を開発するためにはHCVの生活環の解明が必須である。この解明を目指して、これまでにHCVレプリコン複製細胞株や全長HCVRNA複製細胞株が樹立され、さらに、2a遺伝子型に属するJFH1株によるHCV増殖システムが構築され汎用されている。しかしながら、現在、多くの実験室では、1株のHCV株(Con1, HCV-N, H77, HCV-Oなど)のみを用いて様々な研究を行っていることから、様々な実験結果がHCV株により異なっているかどうか、或は使用している細胞クローンにより異なっているかどうかを判定できない状況にある。そこで、本研究では、

これまでまったく樹立例のないC型肝炎患者由来のHCVRNAを用いて、新しいHCV株の複製モデル系を構築することを目指した。また、昨年度構築開発した生細胞のまま蛍光強度を測定するだけでHCVRNAの複製レベルを定量的にモニターできる細胞システム(OGF7アッセイシステム)が様々な抗HCV剤の評価系として十分機能して有用なものであるかどうかを知ることを目的として、我々が現在汎用しているルシフェラーゼ活性を測定してHCVRNAの複製レベルを定量的にモニターできる細胞システム(OR6アッセイシステム)との性能比較実験を行った。

B. 研究方法

(1) OGF7アッセイシステムとOR6アッセイシステムの性能比較

抗HCV剤の効果を調べるためにOGF7細胞あるいはOR6細胞を1ウェルあたり 2×10^4 ずつ24ウェルプレートに蒔き込み翌日に、各種薬剤(IFN-a、シクロスポリン(CsA)、フルバスタチン(FLV))を添加して72時間後にOGF7細胞については細胞の蛍光強度を、OR6細胞については細

胞のルシフェラーゼ活性を測定した。これらの実験は少なくとも3回行った。

(2) レプリコン複製細胞株(sAH1)と全長 HCVRNA 複製細胞株(AH1)の樹立

C 型急性肝炎患者 (AH1) の血清より RNA を抽出し、RT-PCR により HCV ゲノムの前半部と後半部を NS3 領域で一部重複させるようにして増幅を行った。増幅産物 (前半部と後半部) を pBR322MC ベクターに組み込み、それぞれ3clone ずつ塩基配列を決定して、AH1 のコンセンサス配列を決定した。

別途、後半部の増幅産物を HCV-O 株のレプリコン複製細胞を樹立した際に使用したレプリコンカセットプラスミド (Kato et al, BBRC 306;756,2003)に導入して、*Xba*I にて切断後、*in vitro* にてレプリコン RNA ライブラリーを作成した。この RNA ライブラリーを各種治療細胞 (sOc, Oc, OR6c など) にエレクトロポレーション法により導入して G418 (0.3 mg/ml)存在下3週間ほど培養して細胞の選択を行った。

LightCycler を用いた RT-PCR 定量解析 (少なくとも3回行った)、Genomic PCR 解析, Western blot 解析, Northern blot 解析については常法に従った。

(3) AH1 株および HCV-O 株 HCVRNA の複製に対する抗 HCV 剤の効果

AH1 細胞と O 細胞に IFN-a (1, 10, 100 IU/ml), IFN-g (0.25, 1.0, 10, 100 IU/ml) および CsA (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml) を添加して、72 時間後に RNA を調製した。何も添加していない細胞を対照コントロールとした。得られた RNA を用いて、RT-LightCyclerPCR にて HCVRNA 量を定量した。これらの実験は少なくとも3回行った。並行して、薬剤で処理した細胞から蛋白質を調製してコア抗体による Western blot 解析を行った。

(倫理面への配慮)

本年度の研究に用いたヒトの臨床材料は 1991 年の臨床サンプルであるが、当時においても患者のインフォームド・コンセントを書面により得ている。実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究成果

(1) OGF7 アッセイシステムと OR6 アッセイシステムの性能比較

IFN-a (1~100 IU/ml) 、CsA (0.125~0.50 mg/ml) および FLV (1.25~5 mM) を OR6 細胞および OGF7 細胞に添加して 72 時間後にそれぞれアッセイを行い、両細胞における抗 HCV 効果を比較した。その結果、3 薬剤の抗 HCV 効果は両アッセイ系においてほとんど同じ結果となった。これらの結果から、O 両アッセイ系の感度はほぼ同程度であることが分った。次に、OGF7 アッセイシステムを用いて、IFN-a (0.4 と 2.0 IU/ml) と CsA (0.125 と 0.25 mg/ml) との併用効果を測定することができるかどうかを調べた。その結果、両薬剤の添加による相加効果についても OGF7 アッセイシステムにより確認することができた。

(2) レプリコン複製細胞株(sAH1)と全長 HCVRNA 複製細胞株(AH1)の樹立

作成した AH1 レプリコン RNA ライブラリーを各種治療細胞に導入して G418 選択を行った結果、OR6c 細胞に導入したケースにおいて、G418 耐性コロニーが1個得られた。このコロニーは増殖して細胞株として樹立することができ sAH1 細胞と名付けた。定量的 RT-PCR で測定した結果、sAH1 細胞におけるレプリコン RNA は 3.1×10^7 copies/mg RNA と算出され、HCV-O 株由来の sO 細胞 (3.5×10^7 copies/mg RNA) とほぼ同程度であった。Genomic PCR により HCV の 5'UTR 領域が DNA に組み込まれていないことを確認した。また、sAH1 細胞内でのレプリコン RNA の複製が IFN-a, IFN-b および IFN-g に感受性を有していることも確認した。

次に sAH1 細胞内で複製しているレプリコン RNA の遺伝子解析を行った。RT-PCR によりレプリコン RNA を増幅させて、増幅産物をサブクローニング後に3クローンについて塩基配列を決定した。その結果、3クローンに共通して NS3 内に1カ所 (L1262S) と NS4B 内に1カ所 (V1897A) のアミノ酸置換が検出された。後者は過去の論文 (Lohmann et al, JVI, 77:3007,2003) により適応変異であることが報告されており、1クローンからは別の適応変異 (P1115L) も検出された。2種類の適応変異を組み合わせることにより HCVRNA の複製効率がさらに亢進する

ことを、最近明らかにしている (Abe et al., *Virus Res.* 125:88, 2007) ので、次に V1897A と P1115L 変異を有するクローンと AH1 株由来の構造領域の DNA 断片 (RT-PCR にて得られた増幅産物をサブクローニングしたもの) を基にして、全長 HCVRNA を含むプラスミドを作成、*Xba*I にて切断後 *in vitro* にて RNA を作成した。得られた RNA を sAH1c 細胞 (sAH1 細胞を IFN-g にて処理して治癒細胞を作成した) に導入して、G418 存在下 3 週間培養した。その結果、幾つかの G418 耐性コロニーが得られ、最終的に増殖した 4 種類の細胞株 (2-1, 2-2, 2-3 および 2-5) が得られた。これらの細胞株について、HCVRNA のレベルを定量的 RT-PCR 法により、HCV 蛋白質のレベルを Western blot 法により調べた。その結果、2-2 細胞における HCVRNA の複製レベルが高いことが分かった。2-2 細胞を AH1 細胞と命名して、以後の解析に使用することとした。Northern blot 解析により AH1 細胞において予想される 11 kb の全長 HCVRNA を検出した。HCVRNA のレベルは HCV-O 株の全長 HCVRNA 複製細胞である O 細胞と同程度であった。NS5B 領域をプローブに用いた Northern blot であったが、11kb より短い RNA は AH1 および O 細胞において検出されなかった。Western blot 解析によっても、各種 HCV 蛋白質 (コア、E2, NS3, NS4A, NS5A および NS5B) を検出することが出来、それらの発現レベルも O 細胞と同程度であった。ただ、E2 のサイズは 65 kDa と O 細胞の場合の 57 kDa より幾分大きいという特徴があった。このサイズの違いは N 型糖鎖付加部位が AH1 株の場合 11 カ所と予想され、HCV-O 株の 9 カ所と比べて 2 カ所多いために生じたものと推測される。また、AH1 細胞内で複製している全長 HCVRNA を RT-PCR 法により増幅して sAH1 細胞の場合と同様に遺伝子解析を行ったが、解析した 3 クローンに共通して認められるアミノ酸置換を伴う変異は検出されなかった。

以上の結果、今回得られた AH1 細胞は以前我々が樹立した全長 HCVRNA 複製細胞である O 細胞と同程度の複製効率を有する全長 HCVRNA 複製細胞であると判断された。

(3) AH1 株および HCV-O 株 HCVRNA の複製に対する抗 HCV 剤の効果

AH1 細胞と O 細胞における HCVRNA の複製に対する IFN- α 、IFN-g および CsA の効果を調べた。IFN- α の場合は AH1 株での EC₅₀ が約 1.0 IU/ml、O 株での EC₅₀ が約 1.5 IU/ml となったが、western blot 解析ではその差は反映されていなかったもので、ほぼ同程度と判断された。しかしながら、IFN-g の場合は、AH1 株での EC₅₀ が 1.85 IU/ml、O 株での EC₅₀ が 0.34 IU/ml となり、Western blot 解析においても、明らかに AH1 株の方が感受性に乏しいという結果になった。一方、CsA の場合は、逆に AH1 株での EC₅₀ が 0.13 mg/ml、O 株での EC₅₀ が 0.35 mg/ml という結果になり、Western blot 解析でも明らかに AH1 株の感受性が高いという結果が得られた。以上の結果から、AH1 株と O 株の HCVRNA 複製に対する抗 HCV 剤の感受性は幾分異なることが示唆された。

D. 考察

(1) OGF7 アッセイシステムと OR6 アッセイシステムの性能比較

OGF7 アッセイシステムの感度は OR6 アッセイシステムと同等であったという実験結果と OGF7 アッセイシステムが OR6 アッセイシステムに比べて、非常に安価で時間もかからないという点から、多くの物質を一気に探索するようなハイスループットスクリーニングに非常に有効な手段であると思われる。さらに、改良するとすれば、もう少し高い蛍光強度を達成して、96 ウェル以上の小さなウェルでのアッセイ法の開発が望まれる。

(2) レプリコン複製細胞株(sAH1)と全長 HCVRNA 複製細胞株(AH1)の樹立

AH1 株についても、以前 HCV-O 株で採用したレプリコン RNA ライブラリーを用いた方法でトライしたが、sO 細胞を樹立した際とは異なり、sAH1 細胞を得るまでに予想外に何種類もの治癒細胞や何度となく実験を行う必要があった。得られた sAH1 細胞においては、特徴的な適応変異が見つかったことから、おそらく、作成したレプリコン RNA ライブラリーにはこの適応変異は存在していなかったのではないかと推察される。従って、この方法が今後も有効であるかどうかは現時点では判断できない結果となった。得られた AH1 細胞は OR6c 細胞 (O 細胞がその親細

胞) から得られたものだが、O 細胞と AH1 細胞を比較すると、細胞の増殖速度がかなり異なる。予備的実験によると、O 細胞の倍化時間は30時間程度であるのに対して AH1 細胞の倍加時間は48時間程度と遅い。しかし、AH1 細胞から治癒細胞を作成すると細胞増殖速度がかなり上昇することから、HCV 株により細胞増殖に与える影響が異なる可能性もあり、今後検討に値する現象ではないかと思われる。急性肝炎症例の HCV 株についての HCVRNA 複製細胞は未だ報告されていないことから、既報の HCV レプリコン複製細胞や全長 HCVRNA 複製細胞との様々な比較実験に使用できるのではないかと思われる。

(3) AH1 株および HCV-O 株 HCVRNA の複製に対する抗 HCV 剤の効果

今回の比較において、IFN-a ではほぼ同程度の結果を得たが、IFN-g や CsA ではかなり異なることが分った。この違いが宿主側に原因があるのか或はウイルス側にあるのかは現時点では分らないが、AH1 細胞の親細胞は OR6c 細胞であり、そのさらに一代前の細胞は O 細胞であることから HCV 株による違いの可能性があると考えられる。この点を明らかにするために、IFN-g については、IFN-g 応答配列を有する Guanine binding protein (GBP) 遺伝子プロモーターを用いて、AH1 細胞と O 細胞において IFN-g のシグナル伝達効率に差があるかどうかを検討する予定である。また、現在 AH1 細胞を基にしてルシフェラーゼレポーターアッセイシステムを構築中であることから、作成できた場合には O 細胞を基にして作成した OR6 ルシフェラーゼレポーターアッセイシステムと詳細な比較が可能になるものと思われる。今回は3種類の抗 HCV 剤についての比較を行ったが、さらに幾つかの抗 HCV 剤 (各種スタチン剤やミリオシンなど) についても同様の検討を行う予定で、抗 HCV 剤の評価は1種類の HCV 株で十分なのか、或は複数の HCV 株が必要なのかを明らかにする予定である。

E. 結論

(1) 生細胞のまま HCVRNA の複製レベルを定量できる OGF7 システムはルシフェラーゼによるこれまでの OR6 レポーターアッセイシステムと同程度の定量システムであることを示した。(2) C 型急性肝炎患者血清(AH1)

由来の HCVRNA を用いて、HCV レプリコン複製細胞株 (sAH1) と全長 HCVRNA 複製細胞株(AH1)を樹立した。

(3) AH1 株の RNA 複製は HCV-O 株のものに比べて IFN-g に感受性が低く、CsA に感受性が高いことを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, Kato N. Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 125: 88-97 (2007).
2. Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus (HCV) RNA replication. *J. Virol.* 81:13922-13926 (2007).
3. Ikeda M, Kato N. Modulation of host metabolism as a target of new antivirals. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 59:1277-1289 (2007).
4. Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for hepatitis C virus (strain O of genotype 1b) replication. *Virus Res.* 125:162-168 (2007).
5. Dansako H, Ikeda M, Kato N. Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. *FEBS J.* 274:4161-4176 (2007).
6. Ikeda M, Kato N. Life style-related diseases of the digestive system: cell culture system for the screening of anti-HCV reagents: suppression of HCV replication by statins and synergistic action with interferon. *J Pharmacol Sci.* 105:145-150 (2007).
7. Yano M, Ikeda M, Abe K, H. Dansako H., Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Comprehensive Analysis of the Effects of Ordinary Nutrients on Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 2016-2027

(2007).

8. Peng LF, Kim SS, Matchacheep S, Lei X, Su S, Lin W, Rungphan W, Choe WH, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Beeler AB, Porco Jr, JA, Schreiber SL, Chung RT. Identification of novel epoxide inhibitors of hepatitis C virus replication using a high-throughput screen. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3756-3759(2007).

2. 学会発表

1. 森 京子、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之 C型急性肝炎患者血清由来の1b型 HCV レプリコン複製細胞株の樹立 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月。

2. Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. HCV genetic variability and dynamics in long-term culture of genom-length HCV RNA replicating cells. 第66回 日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月。

3. 森 京子、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之。C型急性肝炎患者血清由来のHCV1bレプリコン複製細胞株の樹立。第23回中国四国ウイルス研究会、松山、2007年6月。

4. 阿部 健一、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之。持続的な全長HCV RNA複製を維持できる無血清培地を用いた細胞培養系の開発。第23回中国四国ウイルス研究会、松山、2007年6月。

5. Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. HCV genetic variability and dynamics in long-

6. term culture of genome-length HCV RNA-replicating cells. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.

7. Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for genome-length HCV RNA replication. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.

8. Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Kato N. A new antiviral assay system using the living cells harboring genome-length HCV RNA. 14th International Meeting on

Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.

9. 加藤 宣之、阿部 健一、森 京子、有海 康雄、團迫 浩方、池田 正徳 全長 HCV RNA 複製細胞の長期培養により生じる HCV の遺伝的多様性 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月。

10. 團迫 浩方、池田 正徳、阿部 健一、森 京子、有海 康雄 加藤 宣之 全長 HCV-RNA の複製レベルを指標として生細胞のままアッセイできる新しい抗ウイルス剤評価システム 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許番号：第4009732号

出願番号：特願2006-101483号

発明の名称：レポーター遺伝子産物を発現するHCV全長ゲノム複製細胞、並びに、当該細胞を用いたスクリーニング方法およびスクリーニングキット

発明人：加藤 宣之、池田 正徳

特許権者：岡山大学

出願日：2006年4月3日

特許原簿登録日：2007年9月14日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし