

- の RNA 複製に必要な宿主因子である、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)、ワークショップ
- 6 ウイルスと癌
- 42) 政木隆博、鈴木亮介、松田麻未、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、RNA polymerase I システムを用いた感染性 C 型肝炎ウイルス粒子の作成と抗ウイルス薬の薬効評価への応用、第 43 回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007,5.31-6.1)
- 43) 箴島裕子、坂本直哉、中川美奈、田坂めぐみ、櫻井幸、井津井康浩、陳正新、榎本信幸、脇田隆宇、渡辺守、plaque-forming assay を用いた細胞障害性 HCV の選択と機能解析、第 43 回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007,5.31-6.1)
- 44) 平賀伸彦、今村道雄、木村俊之、柘植雅貴、野口千笑、高橋祥一、本多政夫、金子周一、脇田隆宇、茶山一彰、リバーズジェネティクスにより作製した HCV 感染マウスを用いた genotype 別のインターフェロン感受性の検討、第 43 回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007,5.31-6.1)
- 45) 伊達朋子、村山麻子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、野本明男、鈴木哲朗、脇田隆宇、遺伝子型 2a/2b 間でのキメラウイルスの作製および性状解析、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)
- 46) 有海康雄、黒木美沙緒、阿部健一、團迫浩方、池田正徳、脇田隆宇、加藤宣之、HCV の RNA 複製に必要な宿主因子 DDX3 DEAD box RNA ヘリカーゼ、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)
- 47) 村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆宇、HCV JFH-1 株の複製および感染性ウイルス粒子形成に重要な領域の解析、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)
- 48) 下池貴志、Mckenna Sean, Lindhout Darrin, 脇田隆宇、Puglisi Joseph、HCV IRES は PKR を活性化するが、それによる翻訳は eIF2 のリン酸化耐性である、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)
- 49) 阿部克俊、村上恭子、市村徹、高宮智史、大崎一直、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆宇、勝二郁夫、HCV コア蛋白と結合する新規宿主因子 hnRNP H1/H2 の同定と相互作用、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)
- 50) 加藤孝宣、脇田隆宇、HCV JFH-1 株の in vivo での病原性の検討、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)
- 51) 海老原敬、松本美佐子、脇田隆宇、瀬谷司、HCV 感染アポトーシス細胞を介した樹状細胞の成熟化、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)
- 52) 上西理恵、納富香子、長谷彩希、鈴木哲朗、脇田隆宇、竹部豊、新規阻害剤探索のための HCV 感染・増殖アッセイ系の樹立とその評価、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)
- 53) 尾見法昭、赤澤大輔、高橋仁、森川賢一、伊達朋子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆宇、細胞培養により産生された HCV ウイルスの免疫原性に関する検討、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007,

10. 21-23)
- 54) 竹部豊, 上西理恵、納富香子、長谷彩希、鈴木哲朗、脇田隆宇, 感染性 HCV クローン JFH-1 を用いた感染・増殖アッセイに基づくスクリーニングによる新規標的を持つ HCV 阻害剤の同定とその解析、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター (2007, 10. 21-23)
- 55) 村上恭子, 勝二郁夫, 木村敬郎、鈴木哲朗, 宮村達男、脇田隆宇, 血球系細胞に HCV JFH-1 株の感染および複製の検討、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター (2007, 10. 21-23)
- 56) 赤澤大輔、伊達朋子、森川賢一、村山朝子、尾見法昭、高橋仁、白倉雅之、鈴木哲朗、脇田隆宇, 肝細胞株における感染性 HCV 粒子の作製と性状解析、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター (2007, 10. 21-23)
- 57) 高橋仁、尾見法昭、赤澤大輔、白倉雅之、鈴木哲朗、脇田隆宇、エピトープタグを付加した組換え HCV 粒子の作製と性状解析、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター (2007, 10. 21-23)
- 58) 江角真理子、石橋真理子、清水洋子、森田奈央子、山口裕美、高山由理子、野本聡美、脇田隆宇、清水一史、L-SIGN 陽性細胞の C 型肝炎ウイルス感染感受性解析、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター (2007, 10. 21-23)
- 59) 相崎英樹、原弘道、森川賢一、井上寧、谷英樹、松浦善治、斎藤恭子、深澤征義、花田賢太郎、マイケル・ライ、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルス脂質成分の感染における役割、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター (2007, 10. 21-23)
- 60) 村上裕子、山越智、鈴木哲朗、脇田隆宇、深澤秀輔、培養細胞を用いた C 型肝炎ウイルス (HCV) の阻害剤のスクリーニング、日本ウイルス学会第 55 回学術集会、札幌コンベンションセンター (2007, 10. 21-23)
- 61) 石橋真理子、清水洋子、山口裕美、高山由理子、野本聡美、脇田隆宇、清水一史、江角真理子、C 型肝炎ウイルス感染における肝臓類洞内皮 C 型レクチン (L-SIGN) の役割、第 30 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (2007, 12. 11-15)
- 62) Munakata T, Wakita T, Nomoto A, Toll-like ewcaptor 3 is a downstream target of Rb/E2F pathway activated by hepatitis C virus, 、第 30 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (2007, 12. 11-15)
- 63) T. Wakita. Lessons learned from in vitro cultivation of hepatitis C. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver CO, USA (2006, 2.6).
- 64) T Date, J Tanabe, T Kato, M Miyamoto, I Wakita. A full-length hepatitis C virus replicon infectious for cultured cells. IUMS 2005. 7.25, San Francisco CA, USA
- 65) K Morikawa, Z Zhao, J Tanabe, T Date, M Miyamoto, A Murayama, T. Wakita. Binding of hepatitis C virus to glycosaminoglycan does not cause productive infection. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 66) J Tanabe, K Morikawa, T Date, M Miyamoto, A Murayama, S Sone, T. Wakita. Purification and biological characterization of JFH-1 HCV

- particles produced in tissue culture, 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 67) J Zhong, G Cheng, P Gastaminza, T Wakita, F Chisari. Acute cytopathic and persistent noncytopathic HCV infection in vitro. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 68) S Kapadia, T Wakita, F Chisari. Differential regulation of HCV genotype 1b and 2a RNA replication by the cholesterol and fatty acid biosynthetic pathways. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 69) T Kato, T Wakita, T Heller, S Saito, T Matsumura, R Sapp, K Murthy, J Liang. Production of infectious hepatitis C virus in cell culture. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 70) P Gastaminza, S Kapadia, M Wood, I Wakita, F Chisari. Morphological aspects of HCV infection in vitro. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 71) S Uprichard, F Chisari, T Wakita. Replication of hepatitis C virus genotype 2a replicons in mouse cells. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 72) G Cheng, J Zhong, J Bukh, R Purcell, I Wakita, F Chisari. HuH-7 and HuH-7.5.1 cells produce hepatitis C virus after transfection by the JFH-1 molecular clone but not by H77c or J4L6S. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 73) Pietschmann T, Kaul A, Koutsoundakis G, Kallis S, Steinmann E, Kato T, Negro F, Fong S, Wakita T, Bartenschlager R. Chimeric Hepatitis C Virus Infectious in Cell Culture., 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 74) M Joyce, K Walters, T Pietschmann, LF Zhu, TJ Gao, N Kneteman, M Katze, T Wakita, R Bartenschlager, L Tyrrell. Infection of the SCID/BG alb-UPA transgenic human chimeric mouse with both full-length positive strand RNA from hepatitis C virus, and virus derived from tissue culture. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 75) G Cheng, J Zhong, T Wakita, F Chisari. Inhibition of HCV infection by structural region synthetic peptides. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 76) G Luo, Z Cai, C Zhang, K-S Chang, J Jiang, B-C Ahn, T Wakita, TJ Liang. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005
- 77) T Wakita. Production of Infectious Hepatitis Particles in vitro. 2nd international workshop on clinical pharmacology of hepatitis therapy. Vienna, Austria (2006, 4. 25).
- 78) T Wakita. In vitro cultivation of hepatitis C virus. Current strategy of new drug development

for HCV. Biomedical Engineering Research Laboratories, Industrial Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan (2006, 5. 3).

79) T Wakita. Development of an Infectious HCV system JFH-1, a Fulminant Hepatitis. 2006 ASV Medical Virology Club Satellite meeting. Madison WI, USA (2006, 7. 1)

80) T Wakita. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Cultured Cells. 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Paris, France, on July 1-5, 2006.

81) T Wakita. HCV and cell culture-progress and problems. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

82) T Wakita. HCV replication Update. 17th Asian Pacific Association for the study of the Liver (APASL) Conference. Kyoto, Japan (2007, 3. 27)

83) K Morikawa, T Date, A Murayama, M Kaga, D Akazawa, T Wakita.

CHARACTERIZATIONS OF HIGHLY PURIFIED INFECTIOUS HCV PARTICLES PRODUCED IN CULTURED CELLS. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

84) K Fukuda, I Shoji, M Shirakura, K Murakami, T Ichimura, R Suzuki, T Suzuki, T Shimoji, K Abe, J Nasu, Y Takahashi, S Sato, M Fukasawa, Y Yamakawa, M Nishijima, T Wakita, K Mizumoto, T Miyamura. Molecular determinants of E6AP-dependent degradation of hepatitis C virus core protein. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

85) T Masaki, R Suzuki, M Matsuda, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

86) H Aizaki, Y Inoue, M Matsuda, T Shimoji, M Lai, T Wakita, T Miyamura, T Suzuki. Identification of molecular chaperones as regulators for HCV RNA replication through proteomics approaches. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

87) A Murayama, T Date, M Miyamoto, K Morikawa, D Akazawa T Wakita. NS3 helicase and NS5B to 3' X regions are important for efficient JFH-1 replication in Huh7 cells. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

88) Zeisel MB, Schnober EV, Haberstroh A, Lavilette D, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Royer C, Schuster C, Stoll-Keller F, Barth H, Baumert TF, Blum HE. Scavenger receptor class B type I is a co-receptor for infection with cell culture-derived hepatitis C virus. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

89) D Akazawa T Date, K Morikawa, A Murayama, K Kaga, T Wakita CD81 expression is important for the heterogenous HCV permissiveness of Huh7 cell clones. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

- 90) Machida M, Huang J, Wang CH, Kondo Y, Sung VMH, Wakita T, Lai MMC. Preferential lymphotropism vs. hepatotropism of different HCV isolates established through infectious full-length viral RNA studies. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)
- 91) Miyanari Y, Usuda N, Atsuzawa K, Watashi K, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The analysis of HCV proteins around the lipid droplet-associated membrane in HCV-producing cells. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)
- 92) K Ishiii, B Zhang, J Li, M Shirakura, K Morikawa, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki. Assembly and release of HCV-like particles in which the viral subgenomic replicon RNAs are encapsidated. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)
- 93) Kato T, Heller T, Matsumura T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang JT. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell culture. The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)
- 94) M Imamura, N Hiraga, M Tsuge, C Noguchi, S Takahashi, E Iwao, Y Fujimoto, C Tateno, M Honda, S Kaneko, T Wakita, K Yoshizato, K Chayama. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon- α . The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)
- 95) Zeisel MB, Schnober EV, Haberstroh A, Lavilette D, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Royer C, Schuster C, Stoll-Keller F, Blum HE, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor class B type I is a co-receptor for infection with cell culture-derived hepatitis C virus. The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)
- 96) K Morikawa, T Wakita. Infectious hepatitis C virus particle binding to the Huh7 cell surface is mediated by glycosaminoglycans and its internalization by CD81. The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)
- 97) T Wakita. HCV replication in vitro and in vivo, 3rd Pasteur-Areva Course on Blood-Borne Viruses: Hepatitis C Virus, Shanghai, China (Oct 15-18, 2007)
- 98) T Wakita, H Aizaki, Critical roles of virion-associated cholesterol and sphingolipids in the viral infectivity, The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, (2007 9/1-5)
- 99) H Aizaki, M Fukazawa, K Morikawa, H Hara, H Tani, K Hanada, Y Matsuura, M Lai, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki, Critical roles of virion-associated cholesterol and sphingolipids in the viral infectivity, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow,

Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

100) R Fischer, S Gorke, L Lan, S J. Rau, T Wakita, H E. Blum¹, M B. Zeisel, T F. Baumert, Hepatitis C virus replication sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

101) G Mateu, R O. Donis, J Bukh, T Wakita, A Grakoui, Intragenotypic chimeric hepatitis C viruses produce high levels of infectious particles but cause increased cell death, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

102) D Sir, W-I Chen, T Wakita, T.S. B Yen and J.-H. J Ou, INDUCTION OF AUTOPHAGY BY HEPATITIS C VIRUS VIA ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

103) P Podevin, S Lagaye, A Carpentier, L Aoudjehane, M Carrière, S Zaïdi, M Dreux, O Scatton, T Wakita, F-L Cosset, F Conti, Y Calmus, A R Rosenberg, Production of infectious hepatitis C virus in primary culture of human adult hepatocytes, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

104) Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Ishii K, Wakita T, The important regions for RNA replication and infectious virus particle formation of JFH-1, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

105) K Murakami, I Shoji, I Hamamoto, T Suzuki,

T Miyamura, T Wakita, Virological characterization of HCV JFH-1 strain in B-lymphocytes, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

106) Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp R, Furusaka A, Wakita T, Krawczynski K, Liang J, The hepatitis C virus JFH-1 is associated with attenuated infection and low virulence in chimpanzee, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

107) Machida K, Huang J, Wang C-H, Liu H, Kondo Y, Sung V, Wakita T, Lai M, Preferential lymphotropism vs. hepatotropism of different HCV isolates established through infectious full-length viral RNA studies, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

108) Shimoike T, Mckenna SA, Lindhout DA, Wakita T, Puglisi JD, The HCV IRES is a potent activator of PKR but resistant to eIF2 phosphorylation, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

109) Masaki T, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, Analysis of NS5A region for hepatitis C virus particle production, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

110) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Trono D, Kato N, DNA damage sensors, ATM and Chk2, are required for hepatitis C virus RNA replication, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related

- Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 111) Fukasawa M, Nitahara-Kasahara Y, Shinki-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M, Cellular vimentin affects the protein level of hepatitis C virus core protein and the activity of hepatitis C virus production in cultured cells, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 112) Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Mishima K, Nakagawa M, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Yamamoto M, Onui Y, Sudo G, Itsui Y, Wakita T, Watanabe M, Development of plaque-forming assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 113) Takahashi H, Akazawa D, Omi N, Nakamura N, Mochizuki H, Suzuki T, Wakita T, An adaptive mutation in E2 glycoprotein allow an efficient production of HCV particles with epitope-tagged envelope, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 114) Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doffoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor BI is required for an entry step closely linked to CD81, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 115) Akazawa D, Takahashi H, Omi N, Date T, Morikawa K, Murayama A, Nakamura N, Mochizuki H, Wakita T, Characterization of infectious HCV particles produced from various liver-derived cell lines, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 116) Isogai M, Uenishi R, Hase S, Suzuki R, Suzuki T, Wakita T, Takebe Y, Identification of new class of HCV inhibitors targeted to the entry or late stages in HCV replication cycle using newly developed JFH-1 based infectivity/replication assay, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 117) Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouille Y, Dubuisson J, Wakita T, Duverlie G, Wychowski C, Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in HCV structural proteins, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 118) P Podevin, S Lagaye, A Carpentier, L Aoudjehane, M Carrière, S Zaïdi, JF Meritet, M Dreux, O Scatton, T Wakita, F-L Cosset, F Conti, A R Rosenberg, Y Calmus, Production of infectious hepatitis C virus in primary culture of human adult hepatocytes, The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (November 2-6, 2007)
- 119) Masaki Wakita T, Analysis of NS5A region important for hepatitis C virus particle production, The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases,

Boston, MA, USA (November 2-6, 2007)

120) Murayama A., Date T., Morikawa K., Akazawa D., Ishii K., Wakita T. The important regions for RNA replication and infectious virus particle formation of JFH-1. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, Scotland, 2007.

121) Akari H., Ishii K., Iwasaki Y., Iijima S., Maki N., Mori K., Katakai Y., Kimura N., Yoshizaki S., Ageyama N., Yokota T., Suzuki T., Miyamura T. Development of chronic GBV-B infection in marmosets with smoldering plasma viremia. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, Scotland, 2007.

122) Ishii K., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. 8th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Washington DC, USA, May 27-31, 2007.

123) 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代真人、田口文広：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 11 回日本ワクチン学会、平成 19 年 12 月、横浜。

124) 尾見法昭、赤澤大輔、高橋 仁、森川賢一、伊達朋子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字：細胞培養系により産生された HCV ウイルスの免疫原性に関する検討、第 5 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。

125) 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代真人、田口文広：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 5 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。

126) 岩崎優紀、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、鈴木哲朗、神奈木真理、宮村達男、明里宏文：C 型肝炎サロゲート霊長類モデル：GBV-B は新世界ザルに潜伏感染する、第 5 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。

127) 村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、野本明男、鈴木哲朗、脇田隆字：HCV JFH-1 株の複製および感染性ウイルス粒子形成に重要な領域の解析、第 5 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。

128) 伊達朋子、村山麻子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、野本明男、鈴木哲朗、脇田隆字：遺伝子型 2a/2b 間でのキメラウイルスの作製および性状解析、第 5 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。

129) 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.

130) 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、脇田隆字、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。

131) 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、第 5 回日本ウイ

ルス学会、平成18年11月、名古屋。

131)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、第54回日本ウイルス学会、平成18年11月、名古屋。

132)石井孝司、張 斌、李 津、白倉雅之、森川賢一、鈴木亮介、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：HCV の subgenomic replicon を持つウイルス様粒子の形成と放出、第54回日本ウイルス学会、平成18年11月、名古屋。

133)水谷哲也、遠藤大二、白戸憲也、岡本道子、渡辺理恵、福士秀悦、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。

134)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。

135)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*. 12th International Meeting on HCV and Related Viruses, Montreal, Canada, October 2-6, 2005.

136)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. 12th International Meeting on HCV and Related Viruses, Montreal, Canada, October 2-6, 2005.

137)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.

138)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 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討、第53回日本ウイルス学会、平成17年11月、横浜。

139)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、第53回日本ウイルス学会、平成17年11月、横浜。

140)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、第53回日本ウイルス学会、平成17年11月、横浜。

141)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

の新規感染症モデルの樹立、第140回日本
獣医学会、平成17年10月、鹿児島

142)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 DIs 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。

143)Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A,
Nakamura N, Mochizuki H, Wakita T. Production and
characterization of infectious HCV particles from
various liver-derived cell lines. 14th International
Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses
Glasgow, Scotland, 2007.

144)Takahashi H, Omi N, Nakamura N, Mochizuki
H, Suzuki T, Wakita T. Characterization of
recombinant HCV with modified envelope
glycoprotein. 14th International Meeting on Hepatitis
C Virus & Related Viruses Glasgow, Scotland, 2007.

G. 知的所有権の出願・登録状況

特許出願

1. 特願 2006-510335 (対応する国際出願
W02005080575A1)

ヒトC型肝炎ウイルスの全長ゲノムを含む核酸
構築物及び該核酸構築物を導入した組換え全長
ウイルスゲノム複製細胞、並びにC型肝炎ウイ
ルス粒子の作製方法

2. 特願 2006-532743 (対応する国際出願
W20006022422A1)

自律複製能を有する改変されたヒトC型肝炎ウ
イルスゲノム RNA

3. 特願 2007-167916 脇田隆宇、鈴木哲朗、石
井孝司、尾見法昭 UV によるC型肝炎ウイルス
の不活化方法・2007年6月26日出願

4. 特願 2007-184587 脇田隆宇、鈴木哲朗、高
橋 仁 感染性エピトープタグ化 HCV 粒子とそ
の利用・2007年7月13日出願

5. 特願 2007-193413 脇田隆宇、鈴木哲朗、森
川賢一、尾見法昭、中村紀子、赤澤大輔 C型
肝炎ウイルスの感染阻害活性を有する抗体およ
びその用途・2007年7月25日出願

6. 2005-287825・石井孝司他6名・新規ヒトC型
肝炎ウイルス粒子とその生産方法・2005年9月
30日出願、同海外出願

2005-287646・石井孝司他6名・感染性C型肝炎
ウイルス粒子産生系・2005年9月30日出願、
同海外出願

7. W02007/037429 脇田隆宇、石井孝司、鈴木亮
介、鈴木哲朗、宮村達男田邊純一、曾根三郎 新
規組換え型ヒトC型肝炎ウイルス様粒子とその
生産方法・2006年9月29日出願

8. W02007/037428 脇田隆宇、石井孝司、鈴木亮
介、鈴木哲朗、宮村達男田邊純一、曾根三郎 感
染性C型肝炎ウイルス粒子高産生系・2006年9
月29日出願

II. 分担研究報告

分担研究報告書

HCV の感染中和アッセイ系の確立、ウイルス不活化法の開発、 ワクチン免疫

主任研究者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のワクチン開発が進まなかった最大の理由は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかつたことである。我々が分離した JFH-1 株により初めて HCV のウイルス培養が可能となった。本研究では、HCV の感染中和アッセイ系を樹立し、リコンビナントウイルス粒子産生系やウイルス様中空粒子産生系によるワクチン開発を試みる。最終的にチンパンジーに接種可能なワクチン作製を目指す。

A. 研究目的

未だに多くの C 型肝炎ウイルス（HCV）感染者が世界中に存在する。HCV 感染は持続感染化し、肝細胞癌を発症する重大な感染症である。しかし、インターフェロンおよびリバビリンによる治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少しているが、医療従事者などのハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待されるので、HCV のワクチン開発が望まれている。

これまでに HCV のワクチン開発が進まなかった大きな理由の 1 つは、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかつたためである。Lohmann らが Con1 株の HCV レプリコンを開発して以来、培養細胞で HCV 複製に関する研究が可能となった。しかし、Con1 株の HCV 全長遺伝子を導入したレプリコンでもウイルス粒子は分泌されなかつた。一方、我々が劇症肝炎患者から分離した JFH-1 株は、これまでの HCV 株と比較して培養細胞における複

製能力が非常に高く、この JFH-1 株の合成全長 RNA を培養細胞に導入することにより感染性のウイルス粒子を分泌した。

そこで本研究では、JFH-1 株によるウイルス感染系を用いて、ウイルス感染中和アッセイ系を樹立し、JFH-1 株によるリコンビナントウイルス粒子産生系によるワクチン開発を試みる。これは世界で初めての native HCV 粒子を用いたワクチン開発である。

JFH-1 株による実験系は、VSV やレトロウイルスのシュードタイプウイルスと異なり、HCV の native なウイルス粒子を用いる。さらに JFH-1 株の構造遺伝子領域を他のウイルス株と組み換えることにより、他のウイルス株の構造蛋白をもつ感染性キメラウイルス粒子の産生が可能である。JFH-1 株およびキメラウイルス粒子によりウイルス感染中和アッセイ系を樹立する。このシステムにより様々な HCV 株による交差中和活性を検討することができる。また、これまでに開発された HCV 遺伝子を挿入した組み換えウイルス（組み換えワ

クチニア、組み換えアデノなど) やDNAワクチンなどによる中和抗体誘導能を検討可能となる。

B. 研究方法

1. 培養細胞におけるウイルス感染系

感染性のウイルス粒子を作成できる実験系を用いてウイルス培養系の樹立を目指した。全長の合成ウイルスRNAを培養細胞中に導入してウイルス粒子を回収した。培養液を濃縮して感染用ウイルス液とした。HCV RNA コピー数、HCV コア蛋白量、および感染力価を測定した。感染価は Huh7 細胞にウイルス液の段階希釈液を感染させて、感染細胞数と感染スポット数を免疫染色により定量した。

2. 感染中和活性測定系

Luciferase 遺伝子をレポーターにもつレプリコンを作製した。このレポーターウイルス感染系に HCV 感染系に感染中和活性を持つと考えられる材料を添加して感染効率の変化を観察した。さらにウイルス感染系の実験で確立したウイルス感染力価測定系を用いて同様に中和活性を定量的に測定した。

Native ウイルス粒子の場合は、希釈した血清とウイルス液を混合し、1 時間 37°C にて培養し、あらかじめ培養した Huh7 に加え、3 時間培養した。血清/ウイルス液を除き、洗浄後、新鮮培地を加え 4 8 時間培養した。その後、Isogen を加えて、total RNA の抽出した。total RNA を用いた定量的 RT-PCR により total RNA 1 μ g あたりの HCV RNA の copy 数を測定した。

3. ウイルス粒子の精製法の確立と改良

シードウイルスを高感受性 Huh7 細胞に感染させて継代培養した。感染細胞を通常の細胞培養用大型フラスコの 5-10 倍の培養面積を持つセル・スタックチャンバーにて培養し、ウイルス粒子を含む培養液を回収した。限外ろ過、しょ糖密度遠心、ヘパリンカラムを段階的に組み合わせることにより、ウイルス粒子の精製法を確立した。

さらに精製法を改良するため、ウイルス培養に用いる培養液中の FCS 濃度について検討した。回収したウイルス培養液を様々な膜による限外濾過を試みた。

4. インターフェロン誘導系が阻害された細胞でのレプリコン複製能の検討

Huh7 細胞に IRF-3 ドミナントネガティブ発現ベクターを導入し、ハイグロマイシン耐性クローンを選択した。樹立したドミナントネガティブ型 IRF-3 発現 Huh7 細胞株の IFN- β および IFN- γ の反応性はそれぞれ、pISRE-Luc および pGAS-Luc をレポーター遺伝子として使用して解析した。

5. 突然変異誘発剤による HCV レプリコン高複製能細胞株の取得

4X10⁵ 個の Huh7 細胞を 10%FCS 含有 D-MEM(以下、D-MEM+10F と略す) にて培養し、フレームシフト型突然変異誘発剤である ICR-191 を含む D-MEM+10F に置換後、2 時間培養した。細胞を洗浄後、D-MEM+10F にて培養を続けた。その後細胞を 1 個/well となるように 96well プレートに播種し、独立した 70 個のクローンを得た。

ICR191 にて処理して得られたクローンに HCV レプリコン RNA を導入し、48 時間後にルシフ

ェラーゼ活性を測定した。

6. HCV感染に係わる宿主因子の解析

JFH-1株、HCVは従来のHuh7細胞にのみ感染可能だがその感染効率は1%以下と低い。感染感受性の異なる細胞株の混在を考慮して、Huh7細胞を限界希釈法によりクローニングして亜細胞株を得た。亜細胞株をHCV感染性、レプリコンの複製感受性、細胞表面マーカーの解析を行った。

7. マイクロキャリアによるHCV感染細胞の培養

細胞培養系でのHCV粒子大量生産を目指し、HCV感染細胞のマイクロキャリアによる培養を検討した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究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、提供試料、個人情報を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. HCVのウイルス感染実験系

JFH-1の全長RNAを導入した細胞から分泌されたウイルス粒子はHuh7細胞に感染性があった。その感染効率を向上させるために感染の標的細胞にHuh7細胞の亜細胞群を用いた。Huh7.5.1細胞および米国スクリプス研究所から導入されたHuh7細胞(Huh7S)を用いた。両細胞株共に当研究室由来のHuh7細胞よりもはるかに感染効率が良いことが判明した。ウイルス感染細胞を継代培養することが可能で、ほぼ100%感染した状態で1ヶ月以上細胞を維持することが可能であった。

Huh7.5.1細胞あるいはHuh7S細胞を用いてウイルス感染力価の測定が可能となった。顕微鏡下にinfectious focusを計測して、感染力価を定量化した。培養上清中のウイルス粒子は4度あるいは-70度において一定の期間安定であることが判明した。

培養上清中のHCVをチンパンジーに感染させた。チンパンジーに対する感染力価を同定するために最大希釈(1万倍希釈液)から段階的に濃いウイルス液を接種したところ、1000倍希釈のウイルス液接種により、一過性のウイルス血症を発症したが、肝炎は発症しなかった。また、持続感染化はなく、抗体反応も検出できなかった。これはJFH-1株の病原性の問題やあるいは感染時のウイルス量の問題があると考えられた。

また、最近開発されたヒト肝細胞を移植したキメラマウスに培養上清中のJFH-1ウイルスを感染させたところ感染が成立した。マウス血清中のウイルスタイターは 10^4 - 10^5 copies/ml程度であった。このマウスに感染したウイルスの遺伝子配列などについて解析を進めている。

2. 感染中和活性測定系

レポーターウイルスによる中和実験でHCVに持続感染している患者血清中に感染中和活性が存在することを確認した。遺伝子型1および2の血清がともに遺伝子型2aのウイルスであるJFH-1株のウイルス感染を中和することが判明した。さらに感染力価測定系を用いて、抗E2モノクローナル抗体に感染中和活性があることを証明できた。

また、nativeウイルス粒子の感染実験の場合には感染細胞のウイルスRNAコピー数のリアルタイムRT-PCRによる精密な測定により感染阻害活性を測定することが可能となった。

3. ウイルス粒子の精製法の確立

JFH-1株またはJ6/JFH-1キメラウイルス株の合成RNAをHuh7細胞にトランスフェクションしてシードウイルスを回収した。このシードウイルスをHuh7細胞またはHuh7.5.1細胞に感染させて継代培養した。ウイルス粒子を含む培養液を回収するために、感染細胞を通常の細胞培養用大型フラスコの5-10倍の培養面積を持つセル・スタックチャンバーにて継代培養した。さらにウイルス液に含まれる蛋白量を減らすために、培養液回収にはFCS濃度を2%の培養液を使用した。回収したウイルス液はまずフィルターで濾過して、細胞のデブリスなどを取り除いた後に、分子量カットオフ100kDの限外ろ過膜を用いて低分子の夾雑物を除去すると同時に濃縮した。この濃縮ウイルス液中のウイルス分画をしょ糖密度遠心法により回収した。さらに感染性ウイルスを吸着するヘパリンカラムによりウイルス粒子をさらに精製した。精製前の原液と比較して、2000倍から8000倍程度の精製が可

能となった。

ウイルス培養の際に培養液中のFCS濃度を10%、5%、2%、1%、0.5%、0%として培養を継続しウイルス産生量を比較した。2%FCSまではウイルス量は低下しなかったが、1%以下のFCSではウイルス産生量が低下した。しかし、ウイルス産生量は半分程度に低下するもののFCS無添加でも数日間であればウイルス培養が可能ことが判明した。従って無血清培養によるウイルス産生の可能性が示された。培養液中に分泌されたウイルス粒子を効率よく回収するために、最初の精製は限外濾過が最も効率がよいと考えられる。ウイルスをなるべくロスせずに夾雑タンパク質を取り除く膜を選択することが必要である。カットオフが100kDa、300kDa、500kDaの膜を比較したところ、300kDaの膜を使用することによりウイルスをほとんどロスすることなくウイルス液を濃縮し低分子夾雑物を濾過することができた。

4. インターフェロン誘導系が阻害された細胞でのレプリコン複製能の検討

IFN遺伝子転写誘導誘導に関与するIRF-3を不活化するために、恒常的にドミナントネガティブ型IRF-3を発現する細胞株を作製した。

ドミナントネガティブ型IRF-3恒常発現細胞ではHCVレプリコンの複製が持続し、複製能の向上が示唆された。これらのクローンの中にはIFN-βに対する反応性の変化が認められた。

5. 突然変異誘発剤によるHCVレプリコン高複製能細胞株の取得

フレームシフト型突然変異誘発剤である

ICR191にて処理した細胞からクローン化した細胞にHCVレプリコンRNAを導入し、その複製能をルシフェラーゼ活性で検出した。その結果、親株と比較して、複製能が4～6倍高いクローンを得た。

6. HCV感染に係わる宿主因子の解析

従来のHuh7細胞から限界希釈法により70クローンの亜細胞株を得た。HCVの感染性を比較すると親株よりも最大10倍程度まで感染性の良いクローンや感染性のより低い細胞株、さらに感染性の全くない細胞株が存在することが明らかとなった。次にルシフェラーゼ遺伝子を持つレプリコンによるHCV遺伝子の複製感受性を検討すると、複製感受性も様々な程度の細胞株が存在したが、感染感受性と複製感受性の間に相関関係は無かった。そこで、HCVの感染性に関与することが報告されている細胞表面マーカーを解析した。CD81, SR-BI, LDLrについて検討すると、CD81の発現の有無が亜細胞株の感染感受性と相関していることが明らかとなった。つまり、CD81の発現がある細胞株は感染感受性があり、CD81の発現のない細胞株では感染性が見られなかった。さらにレプリコンによる解析により、CD81を発現していない細胞は複製感受性が高かった。そこで、CD81を発現せず、感染感受性の無い細胞株(Huh7-25)にCD81発現プラスミドのトランスフェクションにより、CD81を強制発現すると感染感受性が回復した。さらにCD81を持続して発現する細胞株を樹立した(Huh7-25-CD81)。このHuh7-25-CD81はこれまでに報告されたHuh7.5.1などの細胞よりも高い感染感受性を示し、ウイル

ス培養に適した細胞株であることが明らかとなった。

7. マイクロキャリアによるHCV感染細胞の培養

ウイルスを大量に取得するためにはHCV感染細胞を平面培養するよりもマイクロキャリア上で細胞を培養して、スピナー培養を行うことで、効率よく、高濃度のウイルス培養液を取得できると考えられる。そこで前項で樹立したHuh7-25-CD81をマイクロキャリア上に培養する条件を検討した。しかし、至適条件下でHuh7-25-CD81をマイクロキャリア上で培養し、HCVを感染させると、細胞増殖が停止して培養液中のウイルス産生量があまり増加しないことが明らかとなった。そこで、ウイルス感染細胞の培養条件の至適化を試みている。

D. 考察

HCVのワクチン開発が進んでこなかった理由はHCVのウイルス培養系が存在しなかったことである。JFH-1株を用いた実験系により感染性ウイルスを用いた実験が可能となった。

ウイルス粒子を含む培養液を大量に調整して、ウイルス粒子を精製する方法を構築した。現在の方法によって約2000倍から8000倍程度の精製が可能である。ウイルス粒子の精製法の確立はワクチン開発に必須であるとともに、HCV粒子の性状解析にも非常に重要である。精製法をさらに改善していくことと、ウイルス培養時によりタイターの高い培養方法を用いることにより、より精製度の高いウイルス液が得られることは他のウイルスの例からも明らかである。従って、

より効率の良いウイルス培養法の開発は HCV のワクチン開発に重要である。精製ウイルス粒子の観察によりウイルス粒子の可視化が可能となった。さらに精製度を高めて、ウイルス粒子の構造解析へつなげていくことが期待される。ウイルス粒子の構造解析は新たな抗ウイルス薬開発につながる可能性もある。また、ウイルス粒子液に含まれる蛋白質を同定すると多くの細胞性蛋白質が同定された。この結果からはウイルス液の精製度がまだ不十分なことが推測されるとともに、ウイルス粒子に様々な細胞性蛋白質が吸着、または粒子中に含まれていることが示唆された。従って、ウイルスの精製度をより向上させて、特異的にウイルス粒子と共存する細胞性蛋白質を同定することが重要である。この解析はウイルス粒子の生成過程に関与する宿主因子の解明につながることを期待できる。

Huh7 細胞をクローニングすることにより、親細胞株中には感染感受性の異なる亜細胞株が混在していることが明らかとなった。感染感受性を決定する重要な宿主因子は細胞表面の CD 8 1 分子であった。また、ウイルス複製感受性は逆に CD 8 1 発現の無い亜細胞株で高いものが見られた。そこで、CD 8 1 を強制発現して得られた Huh7-25-CD81 細胞は感染感受性が高く、ウイルス培養に適していると考えられた。HCV の感染感受性にはさらに多くの宿主因子が関与していると考えられている。最近では肝細胞のタイトジャンクションに発現する Claudin-1 という分子が HCV 感染に重要であることが報告された。従って、関与する宿主因子の発現を調整することにより感染感受性をコントロールできると考えられる。また、ウイルス粒子を大量に取得するため

に、より効率の良い感染細胞培養法を開発する必要がある。

E. 結論

1. JFH-1 株およびキメラウイルスの大量培養法および精製法を樹立した。
2. ウイルス粒子精製法の改良を試みた。
3. C 型肝炎ウイルスの感染中和活性測定系を樹立した。
4. 精製ウイルス粒子と共存する細胞性タンパク質を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol.* 2007 88:3323-33.
2. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doeffel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology.* 2007 46(6):1722-1731.
3. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Mishima K, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Kanai T,

- Tsuchiya K, Wakita T, Enomoto N, Watanabe M. Development of plaque assays for hepatitis C virus-JFH1 strain and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology*. 2007 Oct 18; [Epub ahead of print]
4. 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 RNA replication. *J Virol*. 2007 81(24):13922-6.
5. 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*. 2007 Sep;9(9):1089-97.
6. Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouillé Y, Dubuisson J, Wakita T, Duverlie G, Wychowski C. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol*. 2007 88(Pt 9):2495-503.
7. Kim CS, Jung JH, Wakita T, Yoon SK, Jang SK. Monitoring the antiviral effect of alpha interferon on individual cells. *J Virol*. 2007 81(16):8814-20.
8. 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 NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol*. 2007 81(15):8030-40.
9. 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 581(10):1983-7.
10. D Akazawa, T Date, K Morikawa, A Murayama, M Miyamoto, M Kaga, H Barth, T F Baumert, J Dubuisson, T Wakita. CD81 Expression Is Important for Heterogeneous HCV Permissiveness of Huh7 Cell Clones. *J Virol*. 2007 81(10):5036-45.
11. Kato T, Matsumura T, Heller T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang TJ. Production of Infectious Hepatitis C Virus of Various Genotypes in Cell Culture. *J Virol*. 2007 81(9):4405-11.
12. K Morikawa, Z Zhao, T Date, M Miyamoto, A Murayama, D Akazawa, J Tanabe, S Sone, and T Wakita. The Roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J. Med. Virol* 2007 79(6):714-23.
13. E Larrea, JI Riezu-Boj, L Gil-Guerrero, N Casares, R Aldabe, P Sarobe, MP. Civeira, JL Heeney, T Wakita, F Borrás-Cuesta, JJ. Lasarte, J Prieto. Upregulation of indoleamine 2,3 dioxygenase in hepatitis C virus Infection. *J Virol*. 2007. 81(7):3662-6.
14. Date T, Miyamoto M, Kato T, Morikawa K, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S, Mizokami M, Wakita T. An infectious and selectable full-length replicon system with hepatitis C virus JFH-1 strain. *Hepatology Research*, 2007 37(6):433-43
15. 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 PM, Miyamura T, Shoji I. The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 2007 81(3):1174-85.
16. Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nature Protocols*, 2006 1(5): 2334-2339.
17. SL Uprichard, J Chung, FV Chisari, T Wakita. Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse cells. *Virology Journal* 2006, 3:89
18. Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Arch Virol.* 2007 152(3):457-61.
19. Wagoner J, Austin M, Green J, Imaizumi T, Casola A, Brasier A, Khabar, KS, Wakita T, Gale M Jr, Polyak SJ. Regulation of CXCL-8 (Interleukin 8) Induction by dsRNA Signaling Pathways During Hepatitis C Virus Infection. *J Virol.* 2006 81(1):309-18
20. E Blanchard, S Belouzard, L Goueslain, T Wakita, J Dubuisson, C Wychowski, Y Rouillé. Hepatitis C virus entry depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol.* 2006. 80(14):6964-72.
21. T Kanda, A Basu, R Steele, T Wakita, JS. Ryerse, R Ray, RB Ray. Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. *J Virol.* 2006. 80(9):4633-9.
22. N Ishii, K Watashi, T Hishiki, K Goto, D Inoue, M Hijikata, T Wakita, N Kato, K Shimotohno. Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus. *J Virol.* 2006. 80(9):4510-20.
23. Kato T, Date T, Miyamoto M, Wakita T. A novel virus culture system for hepatitis C virus. *Future Virology*, 2006, 1: 519-525.
24. Kato T and Wakita T. Development of an Infectious HCV Cell Culture System. In: *Hepatitis C Viruses Genomes and Molecular Biology* (ed. by Tan, S-L.) Horizon Bioscience, 2006, pp451-464.
25. Y Rouillé, F Helle, D Delgrange, P Roingear, C Voisset, E Blanchard, S Belouzard, J McKeating, A Patel, G Maertens, T Wakita, C Wychowski, J Dubuisson. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of Virology*, 2006. 80. 2832-41.
26. Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(7):2310-5, 2006.
27. M Miyamoto, T Kato, T Date, M Mizokami, I Wakita. Characterization of Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon in Comparison with Genotype 1b Replicon. *Intervirology*, 49:37-43, 2006.
28. T Kato, T Date, M Miyamoto, M Sugiyama, Y Tanaka, E Orito, T Ohno, K Sugihara, I Hasegawa, K Fujiwara, K Ito, A Ozasa, M Mizokami, T Wakita. Detection of Anti-Hepatitis C Virus Effects of Interferon and Ribavirin by a Sensitive Replicon System. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43:5679-84

29. Cai Z, Zhang C, Chang K-Y, Jiang J, Ahn B-C, Wakita T, Liang, JT, Luo G. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *Journal of Virology*. 79: 13963-13973, 2005.
30. J Zhong, P Gastaminza, G Cheng, S Kapadia, T Kato, DR Burton, SF Wieland, S Uprichard, I Wakita, FV Chisari. Robust Hepatitis C Virus Infection in Vitro. *PNAS* 2005, 102:9294-9299.
31. I Wakita, T Pietschmann, T Kato, T Date, M Miyamoto, Z Zhao, K Murthy, A Habermann, H-G Kräusslich, M Mizokami, R Bartenschlager, T J Liang. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome. *Nat Med*. 2005 11:791-796.
32. Zhao Z, Date T, Li Y, Kato T, Miyamoto M, Yasui K, Wakita T. Characterisation of the E-138 (Glu/Lys) mutation in Japanese encephalitis virus using a stable full-length infectious cDNA clone. *J. Gen. Virol*. 2005, 86:2209-20.
33. 脇田隆字 ウイルス性肝炎 増刊号・ICPのためのウイルス学・臨床と微生物 2006, 33(10) 611-615
34. 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆字 HCV増殖機構の解明 別冊・医学のあゆみ・消化器疾患 Ver. 3 II. 肝・胆・膵 2006, 143-6
35. 脇田隆字 HCV発現細胞系の確立 別冊・医学のあゆみ・消化器疾患 Ver. 3 II. 肝・胆・膵 2006, 147-51
36. 脇田隆字 JFH-1株を用いたC型肝炎ウイルス研究の進歩 医学のあゆみ 2006, 218(10) 883-888
37. 脇田隆字 C型肝炎ウイルス 分子細胞治療 2006 Vol. 5, p364-367
38. 脇田隆字 HCVレプリコンシステム カレントセラピー、2006, 24(8), 67
39. 脇田隆字 培養細胞で効率よく複製するC型肝炎ウイルス株 *BIO Clinica*、2006, 21(4)366-371
40. 脇田隆字 HCVレプリコン 肝臓、2005, 46(12)691-702
41. 加藤孝宣、脇田隆字 C型肝炎ウイルス培養細胞感染系の確立 *ウイルス*、2005, 55(2)287-296
42. 脇田隆字 HCV粒子形成システム 肝疾患レビュー、2006, 119-23
43. 脇田隆字 感染性C型肝炎ウイルス粒子の培養細胞における作製 *医学のあゆみ*、2005, 215(11)920-1
44. 脇田隆字 宿主の新たな抗ウイルス活性によるB型肝炎ウイルス複製の抑制 *Hepatoday*、2005, (9)6-7
45. 脇田隆字 遺伝子型2aのC型肝炎ウイルス(HCV)由来のRNAレプリコン *バイオテクノロジージャーナル*、2005, 5(3)300-2
2. 学会発表
- 1) 脇田隆字、C型肝炎ウイルスの感染複製系の開発、第41回日本肝臓学会総会、パネルディスカッション「ウイルス肝炎治療戦略の今後の展望」、大阪国際会議場 (2005, 6.17)
- 2) 田邊陽子、坂本直哉、中川美奈、小山知行、井津井康浩、武田嘉恵、関根裕子、田坂めぐみ、柿沼晴、陳正新、脇田隆字、渡辺守、キメラレポーター遺伝子発現HCVレプリコンシステムを用いた多種細胞株でのウイルス増殖動態の解析、第41回日本肝臓学会総会、ワークショップ6「ウイルス性肝炎の最近の進歩」、大阪国際会議場 (2005, 6.17)