

- 3) 田邊陽子、坂本直哉、中川美奈、小山知行、井津井康浩、関根裕子、柿沼晴、脇田隆宇、渡辺守、キメラレポーター遺伝子発現 HCV replicon を用いたウイルス増殖動態の多種細胞株での検討、第9回日本肝臓学会大会、神戸 (2005, 10.5)
- 4) 森川賢一、趙子江、田邊純一、伊達朋子、宮本道子、村山麻子、脇田隆宇、C型肝炎ウイルス粒子の Huh7 細胞への感染における heparin 様分子の関与、第53回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (2005, 11.20)
- 5) 田邊純一、森川賢一、伊達朋子、宮本道子、村山麻子、脇田隆宇、培養細胞から分泌されたC型肝炎ウイルス粒子の生化学的特徴化、第53回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (2005, 11.20)
- 6) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの感染複製系の樹立とその応用」、第8回仙台Liver Meeting、仙台エクセルホテル東急、(2006, 6.24)
- 7) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルス培養系の構築とその応用」、第7回横浜青葉・緑消化器病研究会、青葉台フォーラム、(2006, 7.21)
- 8) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスのウイルス培養系の構築とその応用」、第4回 湯沢リバーシンポジウム、NASPA ニューオータニ、(2006, 9.9)
- 9) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルス培養系の開発とその展望」、第14回 Schering-Plough Liver Forum (Tokyo)、赤坂プリンスホテル、(2006, 11.18)
- 10) 脇田隆宇、ランチョンセミナー「C型肝炎ウイルスの感染複製系の樹立とその応用」日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 11) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスのウイルス培養系開発とその応用」、第10回東海ウイルス感染症研究会、安保ホール (名古屋市)、(2007, 1.13)
- 12) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスのウイルス培養系の開発とその応用」、第13回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、笹川記念会館、(2007, 1.19)
- 13) 赤澤大輔、伊達朋子、森川賢一、村山麻子、加賀美奈子、脇田隆宇、「HCV感染に関する宿主因子の探索」、第2回広島大学肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島大学廣仁会館(2006, 6.18)
- 14) 森川賢一、脇田隆宇 C型肝炎ウイルス粒子の Huh7 細胞への感染における HSPG および CD81 の関与 第42回日本肝臓学会総会、国立京都国際会館(2006, 5.25-26) ワークショップ 1「ウイルス性肝炎研究の最前線」
- 15) 脇田隆宇、相崎英樹、鈴木哲朗 C型肝炎ウイルスの感染増殖とそれに関与する宿主因子の解析 第10回日本肝臓学会大会、札幌(2006, 10.11-12) シンポジウム6「ウイルス肝炎進展因子の解明」
- 16) 関根裕子、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、C型肝炎ウイルス感染増殖系を用いた薬剤のウイルス増殖抑制効果の検討、第42回日本肝臓学会総会、国立京都国際会館(2006, 5.25-26)
- 17) 棟方翼、脇田隆宇、野本明男、C型肝炎ウイルス (HCV) による自然免疫受容体 TLR3 の発現制御、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 18) 森田奈央子、野村知里、石橋真理子、楠美嘉晃、杉谷雅彦、脇田隆宇、高山忠利、江角真理子、類洞内皮C型レクチン L-SIGN とC型肝炎ウイルス、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)

- 19) 赤澤大輔, 伊達朋子, 森川賢一, 村山麻子, 脇田隆宇, HCV 感染に関与する宿主因子の探索、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 20) 相崎英樹、原 弘道、井上 寧、松田麻未、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、マイケルライ、鈴木哲朗、HCV RNA 複製を調節する分子シャペロンの同定とその機能解析、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 21) 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 promoter/terminator 系を用いた感染性 HCV 粒子の作成、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 22) 石橋真理子、脇田隆宇、江角真理子、C 型肝炎ウイルス量の多い肝臓で発現増強する遺伝子 OASL の機能解析、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 23) 村山麻子、伊達朋子、森川賢一、赤澤大輔、脇田隆宇、HCV JFH-1 株の RNA 複製に必要な領域の同定、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 24) 福田浩一郎、勝二郁夫、白倉雅之、村上恭子、下地徹、高橋由利絵、阿部克俊、奈須純一、鈴木哲朗、脇田隆宇、水本清久、宮村達男、E6AP 依存性 HCV core 蛋白分解の分子認識機構の解析、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 25) 石井孝司、張斌、李津、白倉雅之、森川賢一、鈴木亮介、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV の subgenomic replicon を持つウイルス様粒子の形成と放出、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 26) 脇田隆宇、「C型肝炎のウイルス培養系の開発とその応用」、第43回肝形態科学研究会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.30)
- 27) 脇田隆宇、「in vivo と in vitro における HCV 複製」、第4回ウイルス学キャンプ in 湯河原、ウエルシティ湯河原、(2007, 6.6-7)
- 28) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの基礎研究」、第3回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島大学廣仁会館、(2007, 6.29)
- 29) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの感染増殖機構」、The 6th Hepatitis Expert Meeting、軽井沢プリンスホテル、(2007, 8.25)
- 30) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの複製および増殖機構」、第27回名古屋肝炎セミナー 第116回名古屋肝疾患研究会、名古屋東急ホテル、(2007, 9.21)
- 31) 脇田隆宇、「Infection and replication of hepatitis C virus」、アジア太平洋消化器病週間 Asian Pacific Digestive Week 2007 サテライトシンポジウム、神戸商工会議所会館、(2007, 10.17)
- 32) 脇田隆宇、「基礎研究に基づくC型肝炎ウイルスの新規治療とワクチン開発」、第10回熊本ウイルス感染症研究会、熊本全日空ホテル、(2007, 10.26)
- 33) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの基礎研究」、第22回臨床肝臓カンファレンス、日本海運倶楽部、(2007, 11.10)
- 34) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルス基礎研究の進歩」、第167回高知肝疾患症例検討会、高知新阪急ホテル、(2007, 11.20)
- 35) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの複製および粒子形成」、学術講演会第10回 リサーチフォーラム「ウイルスとヒト」、芝蘭会館別館、(2007, 12.22)
- 36) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスに対するワクチン開発」第11回日本ワクチン学会学術集会、パシフィ

コ横浜、(2007, 12.8-9)

37) 今村道雄、平賀伸彦、木村俊之、畠山剛、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、培養細胞および動物モデルを用いた肝炎ウイルス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)、ワークショップ1「肝炎ウイルス研究の進歩」

38) 相崎英樹、原弘道、森川賢一、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、脂質のC型肝炎ウイルス感染、粒子形成における役割、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)、ワークショップ1「肝炎ウイルス研究の進歩」

39) 森川賢一、脇田隆宇、培養細胞で作製した感染性C型肝炎ウイルス(HCV)粒子のワクチン開発への応用、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)、ワークショップ1「肝炎ウイルス研究の進歩」

40) 脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの感染および複製増殖機構、第31回阿蘇シンポジウム「ウイルスと戦う」、阿蘇プリンスホテル、(2007, 7.27-28)

41) 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、トロノ ディディエ、加藤宣之、DNA損傷センサーATMとChk2はHCV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4

3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、リバーシ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、脇田隆字, 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、脇田隆字, 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、脇田隆字、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、脇田隆字, 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、脇田隆字、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、脇田隆字, 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、脇田隆字, 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、脇田隆字、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、脇田隆字、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、脇田隆字、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、脇田隆字、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、脇田隆字, 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、脇田隆字, 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 ewcwptor 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, T 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, T 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, T 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, I 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 Zaidi, 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 DI_s 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 55 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 DI_s の組換え SARS ワクチンとしての検討、第 55 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 55 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 55 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 55 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 54 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、湯山直英、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 長期持続感染マーカーモセットの解析、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.

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 脇田隆字、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 脇田隆字、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 脇田隆字、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 脇田隆字、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 脇田隆字、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

分担研究報告書

ウイルス様中空粒子の開発およびバイオリアクターによる ウイルス粒子産生細胞の培養

分担研究者 国立感染症研究所ウイルス第2部 主任研究官 石井 孝司

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ったことである。脇田らが分離した 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 subgenomic replicon を保持する細胞に JFH-1 株の構造蛋白を trans に供給し、一過性の感染はおこるが増殖はしない HCV の virus-like particles の作成を最終的な目標としている。

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ったためである。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った。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ェ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

ワクチンなどによる中和抗体誘導能を検討可能となる。

さらに本研究ではリコンビナントウイルス粒子を大量に回収、精製する方法を開発する。精製ウイルス粒子を動物に免疫して中和抗体価の誘導を検討する。さらに JFH-1 株の構造遺伝子領域をほ乳細胞で発現させると、培養液中にウイルス様中空ウイルス粒子を分泌する。ウイルス様中空粒子を大量に回収、精製する方法を開発する。その免疫原性を検討する。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。

B. 研究方法

JFH-1 株の構造遺伝子領域を発現する組換えワクチニアウイルスの取得

JFH-1 株の構造遺伝子領域を PCR 法により増幅し、ワクチニアウイルストランスファーベクターに挿入した。高度弱毒ワクチニアウイルス DIIs 株が唯一増殖できる細胞株であるニワトリ胎児線維芽細胞に、構築したトランスファーベクターをエレクトロポレーション法により導入し、その後に DIIs 株を導入細胞に感染させて細胞内で homologous recombination をおこさせた。トランスファーベクター上に存在する薬剤耐性遺伝子を用いて組換えウイルスを選択し、増幅した。取得した組換えウイルスを哺乳類細胞に感染させ、目的とする JFH-1 株の構造蛋白が発現していることを確認した。本ウイルスをヒト肝臓由来細胞株である Huh7 に感染させ、培養上清を濃縮してショ糖密度勾配遠心で分画し、HCV 構造蛋白の培養上清中での挙動を調べた。

JFH-1 株の構造遺伝子領域を恒常的に発現する

哺乳動物細胞株の取得

pEF ベクターは、EF プロモーターと Zeocin 耐性遺伝子を持ち、目的蛋白を恒常的に発現する哺乳動物細胞株を作成することができる。本ベクターの EF プロモーターの下流に JFH-1 株の構造遺伝子領域を挿入し、エレクトロポレーション法で Huh7 細胞に導入し、Zeocin でスクリーニングして HCV 構造蛋白を恒常的に発現する細胞株を取得した。培養上清を濃縮してショ糖密度勾配遠心で分画し、HCV 構造蛋白の培養上清中での挙動を調べた。

粒子中に HCV replicon を保持する HCV-LPs の形成

上記の HCV 構造蛋白を発現するプラスミドを、HCV の subgenomic replicon を保持する Huh7 細胞に同様に導入し、Zeocin でスクリーニングして HCV 構造蛋白を恒常的に発現する細胞株を取得した。培養上清を濃縮してショ糖密度勾配遠心で分画し、HCV 構造蛋白と replicon RNA の培養上清中での挙動を調べた。

HCV-LPs の感染性の確認

上記の方法で精製した HCV-LPs を naive な Huh7 細胞に感染させ、G418 を添加した培地で 2 週間培養し、コロニー形成の有無を調べた。

(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、遺伝子解析研究に関する倫理指針」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、個人情報等を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. JFH-1 株の構造遺伝子領域を発現する組換えワクチニアウイルスの取得

組換え DIIs を哺乳動物細胞に感染させ、目的とする JFH-1 株の構造蛋白が発現していることを確認した。培養上清から DIIs 粒子を除いた後に濃縮し、ショ糖密度勾配で分画したところ、密度が 1.15 前後の画分にコア蛋白が存在したことから、発現した構造蛋白が粒子様構造を形成している可能性が示唆された。また、HCV のレプリコンを保持する Huh7 細胞に同様に組換え DIIs を感染させ、同様に培養上清を濃縮してショ糖密度勾配で分画すると、コア蛋白の存在する画分にレプリコン RNA が存在していることが判明した。この RNA は RNase 処理で抵抗性を示し、粒子様構造の中に含まれている可能性が示唆された。レプリコン細胞は genotype 1b のものを用いたが、構造蛋白領域は genotype 1a、1b、2a を用いた。蛋白分泌量では 2a(JFH-1)が最も良好であった。

2. JFH-1 株の構造遺伝子領域を恒常的に発現する哺乳動物細胞株の取得

JFH-1 株の構造領域遺伝子を pEF4 の EF プロ

モーターの下流に挿入し、Huh7 細胞に導入した。目的蛋白を発現している細胞株を選択したところ、培養上清にも HCV 構造蛋白が分泌されることが確認された。また、培養上清を濃縮してショ糖密度勾配で分画したところ、密度が 1.15 付近にコア蛋白が存在していることが確認され、HCV の粒子様構造物が形成されている可能性が示唆された。

3. 粒子中に HCV replicon を保持する HCV-LPs の形成

Genotype 1b の subgenomic replicon を保持する Huh7 細胞に JFH-1 の構造蛋白を恒常的に発現するプラスミドを導入した細胞株を樹立した。この株からは構造蛋白と replicon RNA が分泌され、蔗糖密度勾配で分画したところ、構造蛋白と RNA は比重が 1.15 前後の画分に回収された。この画分の構造蛋白と RNA の大部分がヘパリンカラムに結合したことから、同様に何らかの構造体を形成していることが示唆された。

4. HCV replicon を保持する HCV-LPs の感染性の有無の検討

上記の実験で得られた構造体は粒子中に HCV replicon を保持していると考えられるため、もし感染性を有するなら感染した細胞に replicon が導入される。導入された replicon が複製することにより、感染細胞は neomycin 耐性を有することになる。上記の画分を naive な Huh7 細胞に感染させ、G418 存在下で培養したところ耐性コロニーが検出された。このことから、上記の画分に存在する構造体は感染性を有する HCV-LPs であることが明らかとなった。

D. 考察

本研究は、HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に構造蛋白を trans に供給し、一過性の感染はおこるが増殖はしない HCV のウイルス様粒子 (HCV-LPs) の作成を目標とした。HCV の構造蛋白を供給する方法として、組換えウイルスを用いる方法と薬剤耐性プラスミドを用いる方法の2つを検討したが、いずれの場合も構造蛋白が培養上清中に分泌されることが確認された。この構造蛋白はショ糖密度勾配遠心で native な HCV 粒子と類似の比重の画分に集積していることが見出され、同じ画分から subgenomic replicon RNA も検出された。このことから、いずれの方法で構造蛋白を供給した場合も発現蛋白は HCV 粒子様構造を取っていることが示唆され、また、HCV-LPs には subgenomic replicon RNA が含まれていることも示唆された。この推定構造が正しければ、感受性細胞に一過性に感染し、細胞内で増殖しない粒子である可能性が高い。しかしながら、組換えワクチニアウイルスを用いた場合には精製した HCV-LPs にワクチニアウイルスが少量ではあるが混入するため、感染性を検討することが困難であった。従って HCV-LPs の感染性の有無については、構造蛋白を恒常的に発現する細胞株由来のもののみを検討した。HCV-LPs 中には replicon RNA が含まれるため、感染性を有する場合はこの replicon が感染細胞中に導入され、さらに複製することにより感染細胞は neomycin 耐性を獲得する。本実験により、形成された HCV-LPs は感染性であることを証明することができた。本粒子は感染性を有するが増殖せず、HCV 蛋白をす

べて感染細胞内で発現するため、HCV に対する免疫を誘導する上で安全かつ理想的であり、優れたワクチンとして用いることができると考えられる。また、構造蛋白や replicon RNA に変異を入れ、粒子形成に重要な部分の解析を行うことも検討している。

E. 結論

HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に HCV の構造蛋白を trans に供給することにより、HCV 様粒子が培養上清中に放出されることが示唆された。また、本粒子に一過性の感染能があることを証明した。本粒子は一過性に感染するのみで増殖能のない HCV-LPs であり、HCV の粒子形成や細胞への吸着、侵入過程の解析に好適であり、また優れたワクチン候補であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Murakami K., Inoue Y., Hmwe S., Omata K., Hongo T., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Matsuura T., Shoji I., Miyamura T. and Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *Journal of Virological methods* in press
2. Suzuki T., Ishii K., Aizaki H. and Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 411-423 (2007).
3. Yokota T., Iijima S., Kubodera T., Ishii K., Katakai Y., Ageyama N., Chen Y., Lee J.-J., Nishina K., Maki N., Mizusawa H. and Akari H. Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361: 294-300 (2007).
4. Murayama A., Date T., Morikawa K., Akazawa D., Miyamoto N., Kaga M., Ishii K., Suzuki T., Kato T., Mizokami M. and Wakita T. NS3 helicase and NS5B to 3' X regions are important for efficient JFH-1

- replication in Huh7 cells. *Journal of Virology* 81: 8030-8040 (2007)
5. Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kurane I., and Morikawa S. Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *Archives of Virology* 152: 1019-1025 (2007).
 6. Ishii K., Iijima S., Kimura N., Lee Y.-J., Ageyama N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Iwata N., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. *Microbes and Infection*, 9, 515-521 (2007).
 7. Mizutani T., Endoh D., Shirato K., Shimizu H., Fukushi S., Saijo M., Sakai K., Kwang L., Ito M., Nerome R., Takasaki T., Ishii K., Suzuki T., Kurane I., Morikawa S. and Nishimura H. System for rapid determination of viral RNA sequence by ligation-mediated amplification and direct sequencing technology for emerging viral infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 322-324 (2007).
 8. 石井孝司、李 天成、武田直和 E 型肝炎 食品由来感染症と食品微生物 中央法規出版 印刷中 (2007)
 9. 石井孝司、李 天成、武田直和 E 型肝炎 感染・炎症・免疫 37 : 58-59 (2007)
 10. Nakai K., Kimura-Someya T., Okamoto 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. *Journal of Virology* 80: 11265-11273 (2006)
 11. Matsuyama S., Ujike M., Ishii K., Fukushi S., Morikawa S., Tashiro M. and Taguchi F. Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Adv. Exp. Med. Biol.* in press. (2006)
 12. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Miyamura T. and Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.* in press. (2006)
 13. Ishii K. Vaccines for severe acute respiratory syndrome. SARS, Mizutani T. ed.: 107-117, Transworld Research Network, Kerala, India (2006).
 14. Mizutani T., Fukushi S., Ishii K., Sasaki Y., Kenri T., Saijo M., Kanaji Y., Shiota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347: 261-265 (2006).
 15. Murakami K., Ishii K., Ishihara Y., Yoshizaki S., Tanaka K., Gotoh Y., Aizaki H., Kohara M., Yoshioka H., Mori Y., Manabe N., Shoji I., Sata T., Bartenshalager R., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351: 381-392 (2006).
 16. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Tsunetsugu-Yokota Y. and Miyamura T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs. *Virology* 351: 368-380 (2006).
 17. 李 天成、石井孝司、武田直和 E 型肝炎ウイルス：感染様式と食中毒 生物の科学遺産 別冊 19 (食の安全科学) : 40-44 (2006)
 18. 石井孝司、水谷哲也 SARS コロナウイルス研究の最前線 医学のあゆみ 218 : 839-844 (2006)
 19. 石井孝司、李 天成 肝炎ウイルス VLP の作成と応用 感染・炎症・免疫 36: 44-47 (2006)
 20. Ohnishi K., Sakaguchi M., Kaji T., Akagawa K., Taniyama T., Kasai M., Tsunetsugu-Yokota Y., Ohshima M., Yamamoto K., Takasuka N., Hashimoto S., Ato M., Fujii H., Takahashi Y., Morikawa S., Ishii K., Sata T., Takagi H., Itamura S., Odagiri T., Miyamura T., Kurane I., Tashiro M., Kurata T., Yoshikura H. and Takemori T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 58: 88-94 (2005)
2. 学会発表
1. 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.
2. 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.
 3. 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.
 4. 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。
 5. 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 55 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。
 6. 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 55 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。
 7. 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 55 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。
 8. 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 55 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。
 9. 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 55 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。
 10. 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.
 11. 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。
 12. 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 54 回日本ウイルス学会、平成 18 年 11 月、名古屋。
 13. 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。
 14. 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。
 15. 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。
 16. 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。
 17. 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.
18. 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.
 19. 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.
 20. 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。
 21. 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。
 22. 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。
 23. 飯島沙幸、石井孝司、李 永仲、八木慎太郎、山口健次郎、榎 昇、吉崎佐矢香、町田早苗、木村展之、揚山直英、寺尾恵治、鈴木哲朗、宮村達男、明里宏文：サル類を用いたC型肝炎の新規感染病態モデルの樹立、第140回日本獣医学会、平成17年10月、鹿児島
 24. 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。
- G. 知的所有権の取得状況
1. 2007-167916・石井孝司他3名・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
 2. 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
 3. 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
 4. 2005-300350・石井孝司他4名・新規RNA結合ペプチド・2005年9月6日出願

分担研究報告書

ウイルス粒子大量調整法と精製法の開発

東レ株式会社医薬研究所 望月 英典

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ったことであるが、JFH-1 株の発見により初めてHCVのウイルス培養が可能となった。本研究では、JFH-1 株のレプリコン複製系を用いてウイルス産生能の高い細胞を見出し、ウイルス粒子の大量調整法と精製法の開発を目指す。

A. 研究目的

HCV ワクチン開発のためには、HCV 高産生細胞培養系の開発が必須要件である。我々は、脇田らが開発した JFH-1 株のレプリコン複製系を用いた感染性ウイルス産生系を用いて、ウイルス粒子の大量調整法と精製法の開発を目指して研究を行っている。本課題を達成するためには、HCV 高産生細胞株の作製と、HCV 粒子を産生する能力の高い組換え型 HCV ゲノムを構築する必要がある。そこで本研究では、主に、①HCV 感染感受性およびレプリコン複製能の高い細胞株の作製、②構造タンパク質が JFH-1 以外の株由来であり、非構造タンパク質が JFH-1 であるキメラウイルス粒子を作製し、様々な遺伝子型の HCV 粒子を高産生する組換え型 HCV ゲノムの作製を行った。さらに、これらの成果を利用して、構造タンパク質が遺伝子型 2a の J6CF 株由来であり、非構造タンパク質が JFH-1 由来であるキメラウイルス(J6/JFH-1)を大量調製し、マウスに免疫することにより、マウス血清中に構造タンパク質が遺伝子型 1b または遺伝子型 2a であるキメラウイルスの感染を中和する抗体が誘導されていることを見出した。これらの成果を今後のワクチン開発に繋げていく。

B. 研究方法

1. HCV 感染に係わる宿主因子の解析

細胞培養系で作製した JFH-1 は従来の Huh7 細胞にのみ感染し、その感染効率は 1 %以下と低い。感染感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 感染感受性、レプリコンの複製能、細胞表面分子の発現について解析した。

2. 構造タンパク質が JFH-1 以外の株由来であるキメラウイルスの作製。

JFH-1 株の構造タンパク質をコードする遺伝子を JFH-1 以外の株の遺伝子と組換えたキメラウイルスを作製した。JFH-1 以外の株として、遺伝子型 1b の TH1 株、遺伝子型 2a の J6CF 株を用いた。キメラウイルスをそれぞれ、TH/JFH-1, J6/JFH-1 とした。

3. キメラウイルス感染細胞の培養

細胞培養系での HCV 粒子大量生産を目指し、キメラウイルス感染細胞をマイクロキャリアー（サイトデックス）、多段式培養器（セルスタッ