

61. Hussein H. Aly, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: A novel culture system for HCV infection and replication. 14th International symposium on hepatitis C Virus & related viruses. Glasgow UK, Sept, 2007
62. Kaku Goto, Koichi Watashi, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: The emergence of a cyclophilin inhibitor-resistant HCV variant with a mutation in NS5A. 14th International symposium on hepatitis C Virus & related viruses. Glasgow UK, Sept, 2007
63. 村上善基、土方誠、下遠野邦忠：マイクロ RNA を用いた新規 HCV 治療法の確立
64. 第 66 回日本癌学会学術総会、平成 19 年 9 月、横浜 2007
65. Tanaka Y, Yamaguchi T, Segawa M, Sugiyama M, Hijikata M, Shimotohno K, Mizokami M. In vitro infection of immortalized human hepatocytes by hepatitis B virus and its application to anti-viral treatment. 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 2-6 2007. Boston.
66. Tanaka Y, Yamaguchi T, Segawa M, Sugiyama M, Hijikata M, Shimotohno K, Mizokami M. A novel three-dimensional long-term culture system of human hepatocytes for hepatitis B virus infection. 2007 International HBV meeting: The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. September 16-20 2007. Rome, Italy.
67. Tanaka Y, Sugiyama M, Takahashi S, Kato T, Shimada T, Sakamoto T, Orito E, Mizokami M. HBV Now in Asia. Difference of HBV genotype in vivo and in vitro. 17th APASL Conference. March 27-30 2007. Kyoto.
68. Tanaka Y, Yamaguchi T, Segawa M, Sugiyama M, Mizokami M. A novel three-dimensional long-term culture system of human hepatocytes for HBV infection. 17th APASL Conference. March 27-30 2007. Kyoto.
69. Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Nakayama N, Mochida S, Mizokami M. Influences on hepatitis B virus replication by a naturally occurring mutation in the core gene. 17th APASL Conference. March 27-30 2007. Kyoto.
70. Shuhei Tagawa, Toru Okamoto, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with HCV NS5A and regulates HCV replication. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, September 9-13, 2007.
71. Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Xiaoyu Wen, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Enhancement of IP-10 expression via TLR signaling pathway in cells expressing HCV proteins. 同上。
72. Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Eiko Matsuo, Kensuke Suzuki, Itsuki Hamamoto, Tetsuo Yamashita, Kohji Moriishi, Kazuhito Fujiyama, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Ania Owsianka, Arvind H. Patel, Michael A. Whitt, and Yoshiharu Matsuura: Replication-

- competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding HCV envelope proteins. 同上。
73. Yoshio Mori, Kiyoko Okamoto, Toru Okamoto, Yasumasa Komoda, Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Intramembrane processing by SPP regulates membrane localization of HCV core protein and viral propagation. 同上。
74. Toru Okamoto, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura : FKBP8 Plays a Crucial Role in the Replication of Hepatitis C Virus, HEP DART 2007, Hawaii, 9-13 December, 2007.
75. 森石恆司、森屋恭爾、村田茂穂、田中啓二、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治:HCV コア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症における PA28 $\gamma$  の役割: 第 43 回日本肝臓学会総会ワークショップ、東京、5 月 31 日-6 月 1 日, 2007.
76. 田鍬修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスゲノム複製に関与する宿主蛋白質 B-ind1 の機能解析: 第 55 回日本ウイルス学会総会、札幌、10 月 21 日-23 日, 2007.
77. 阿部隆之、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治: C 型肝炎ウイルスによる TLR シグナル伝達経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上。
78. 谷 英樹、菰田泰正、鈴木健介、山下哲生、稲田大彦、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、松浦善治: シュードタイプと組換え水疱性口内炎ウイルスを用いた C 型肝炎ウイルスの感染機構の解析、同上。
79. 岡本 徹、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスゲノム複製における FKBP8 の役割、同上。
80. 森 嘉生、岡本貴世子、岡本 徹、菰田泰正、鈴木哲朗、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼによるプロセッシングの生物学的意義、同上。
81. 山下哲生、森 嘉生、森石恆司、李 天成、宮村達男、武田直和、月原富武、吉村政人、松浦善治: E 型肝炎ウイルス様粒子の結晶化と X 線結晶構造解析、同上。
82. Kohji Moriishi. Critical role of PA28  $\gamma$ -proteasome pathway in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. 7th Awaji International forum on infection and immunology, Awaji, September 1-5, 2007.
83. Kohji Moriishi. Critical role of REG  $\gamma$  /PA28  $\gamma$  -proteasome pathway in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. 2007 International RIMD-CVRDC Joint Symposium, Osaka, December 18, 2007.
84. Megumi Tasaka, Naoya Sakamoto, Yoshie Itakura, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Yuko Sekine-Osajima, Yuki Nishimura-Sakurai, Chen-Hsin Chen, Mamoru Watanabe: HCV nonstructural proteins responsible for impairing RIG-I/ Cardif -induced interferon responses. APASL May-27-2007, Kyoto, Japan.
85. Sakamoto N, Nakagawa M, Watanabe M, for the Ochanomizu Liver Conference: Clinical and virological factors that predict outcomes of interferon plus

- ribavirin combination therapy for HCV infection (APDW2007 Symposium, Oct-18-2007, Kobe, Japan).
86. 第 43 回日本肝臓学会総会ワークショップ、Bone morphogenetic proein-7 (BMP-7) による HC 増補区抑制効果と interferon- $\alpha$  との相乗効果の解析、2007 年 6 月 1 日;肝臓 2007; 48 suppl (1) p27.
  87. Isogai, M., Uenishi, R., Hase, S., Suzuki, R., Suzuki, T., Wakita, T., and Takebe, Y. Identification of new class of HCV inhibitors targeting to the entry or late stages in HCV replication cycle using newly developed JFH-1-based infectivity/ replication assay. HCV 2007 (Sept. 9-13, 2007, Glasgow, UK).
  88. Takebe, Y. Identification of novel antiviral small molecule compounds that are likely to block early processes in HCV replication cycle. 2nd Hepatitis C, resistance and new compounds workshop (Oct 31-Nov 1, 2007, Boston)
  89. Uenishi, R., Nohtomi, K., Hase, S., Suzuki, R., Suzuki, T., and Wakita, T., and Takebe, Y. Identification of new class of HCV inhibitors using newly developed JFH-1-based infectivity/ replication assay. 第 7 回あわじしま感染症・免疫フォーラム (Sept. 1-5, 2007, 淡路島)
  90. 武部豊、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もつ HCV 阻害剤の同定とその解析. 第 5 回日本ウイルス学会 (2007. 10. 20-23, 札幌)
  91. 上西理恵、納富香子、長谷彩希、鈴木哲朗、鈴木亮介、脇田隆宇、武部豊. 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. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会総会 (2007. 10. 20-23. 札幌)
  92. 池田 正徳. HCV RNA 複製細胞を用いた抗 HCV 剤の探索: スタチン剤とインターフェロン併用の有用性を中心として. 第 80 回日本薬理学会年会, 名古屋, 2007 年 3 月.
  93. 池田正徳、矢野雅彦、阿部健一、有海康雄、團迫浩方、加藤宣之. C 型慢性肝炎に対する新しい治療剤候補の培養細胞アッセイ系を用いた探索・評価. 第 72 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2007 年 7 月.
  94. 團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之. Limited suppression of the interferon-production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. 第 72 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2007 年 7 月.
  95. 池田 正徳、矢野 雅彦、阿部 健一、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. 新しい C 型肝炎治療を目指した培養細胞系の開発. 第 17 回 抗ウイルス化学療法研究会、高松、2007 年 5 月.
  96. 矢野 雅彦、池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、大越 章吾、青柳 豊、加藤 宣之. 抗 HCV 剤治療効果の増強が期待される物質の網羅的スクリーニングー C 型肝炎に対する治療効果の最大化を目指してー. 第 43 回日本肝臓学会総会、東京、2007 年 5 月.
  97. 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.
98. 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. 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月.
99. Ikeda M, Yano M, Abe K, Dansako H, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Comprehensive screening of ordinary nutrients expected to enhance the effects of anti-HCV reagents. 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月.
100. 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.
101. 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.
102. 矢野 雅彦、池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、大越 章吾、青柳 豊、加藤 宣之. 全長HCV RNAの複製に影響を与える日常的に摂取する栄養成分の同定および評価. 第23回中国四国ウイルス研究会、松山、2007年6月.
103. 101) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. HCV genetic variability and dynamics in long-term culture of genome-length HCV RNA-replicating cells. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
104. 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.
105. Yano M, Ikeda M, Abe K, Dansako H, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Comprehensive analysis of the ordinary nutrients as the novel partners of anti-HCV reagents. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
106. 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.
107. 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. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
108. 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.

109. 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 5 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月。
110. 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。
111. 矢野 雅彦、池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、大越 章吾、青柳 豊、加藤 宣之。日常的に摂取し抗 HCV 効果を有する栄養成分の全長 HCV RNA 複製細胞を用いた網羅的探索。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月。
112. 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、Didier Trono、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。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月。
113. 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。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月。
- 山口達也、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人、下遠野邦忠、土方誠、出願番号：PCT/JP2007/068611
2. 「新規 HCV エントリー阻害剤」(特願 2008-33598、平成 20 (2008) 年 2 月 14 日出願)
  3. 「HIV-1 特異的 RNA 干渉分子」(特願 2007-156767、平成 19 年 6 月 13 日出願)
  4. 「C 型肝炎ウイルス (HCV) 増殖阻害剤」(特願 2007-018145、平成 19 年 1 月 29 日)[PCT 出願：PCT/JP2008/51086 (Jan 25, 2008)]
  5. 「C 型肝炎ウイルス阻害剤を検出するためのアッセイ方法」(特願 2006-351809、平成 18 年 12 月 27 日出願)

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

##### 特許出願

##### 1. 特許取得

1. 2007 年 9 月 26 日出願、“肝炎ウイルスの増殖方法、及び肝炎ウイルス感染細胞を培養するための中空糸並びにその利用”発明者ならびに特許出願人：東洋紡績株式会社、

## II. 分担研究報告

分担研究報告書

肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発の総括

主任研究者 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長 脇田 隆字

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のウイルス培養系が確立された。また、B型肝炎ウイルス（HBV）の場合、複製増殖実験は可能だが、培養細胞による感染実験系は確立されていない。HCV感染に対する治療はインターフェロンとリバビリンの併用により改善してきたが、未だに不十分である。HBV感染では最近の研究によりウイルスの遺伝子型による病態の差が明らかとなり、ラミブジンなど抗ウイルス療法の導入により治療法も大きく変わりつつあるとともに、両肝炎ウイルスに対する新たな治療法の開発が望まれている。本研究ではHBVやHCVのウイルス培養系や増殖系を用いて新規肝炎治療法を開発する。HBVの感染系を含めて新たな実験系の開発も行うことで、治療法開発のための新たな標的を探索する。

A. 研究目的

肝炎ウイルスによる慢性肝炎は我が国の国民病とも呼ばれている。新規感染者は激減したものの、その原因ウイルスであるHBVのキャリアは約130万人、HCVキャリアも約200万人がいまだに存在すると推定されている。その多くが肝硬変から肝臓癌へ移行し、肝臓癌による年間死亡者は3万人におよぶ。HBV感染にはラミブジンによる化学療法が導入されたが、長期に投与する必要がある、耐性ウイルスの問題が生じている。また、HCV感染に対する治療法はインターフェロンとリバビリンの併用療法が行われているが、その有効率は40-50%程度である。従って、肝炎ウイルスに対する新たな治療法の開発は患者の予後を改善するのみならず、肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らすことにより、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与することが可能である。

B. 研究方法

1. 薬剤ライブラリーによる抗HCV薬の探索  
JFH-1株によるHCV培養細胞を用いて抗HCV薬の探索を行った。ライブラリーはSIGMA社から市販されている、LOPACを使用した。

2. 新規抗HCV薬候補の抗ウイルス活性  
NS3プロテアーゼ、NS4A、NS5B RNAポリメラーゼなどに対する抗ウイルス薬の開発が企業において進行している。新規抗HCV薬候補の提供を受け、その抗ウイルス活性、細胞障害性、薬剤耐性に関して解析した。

（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、個人情報厳格に管理保存する。

## C. 研究結果

### 1. 薬剤ライブラリーによる抗HCV薬の探索

J6/JFH-1株の全長cDNAからウイルスRNAを合成し、そのRNAをHuh7細胞に導入して得られたHCVウイルスを持続感染させたHuh7細胞を用いた。HCV感染細胞を96well plateに播種し、6時間後に薬物を添加した。72時間の培養後、培養上清を回収してコアタンパク質の濃度をELISA法により測定した。LOPACライブラリーは1268の化合物が利用可能だが、現在720化合物を検討した。その結果、3化合物がウイルス分泌を増加、4化合物がウイルス分泌を抑制した。抗ウイルス作用を示した化合物の一つはサイクロスポリンであり、細胞毒性を示さなかったが、他の抗ウイルス作用を示した3化合物はいずれも細胞障害性が強く、抗ウイルス作用は主として細胞障害性によると考えられた。

### 2. 新規抗HCV薬候補の抗ウイルス活性

ベーリンガー社から分与された、NS3プロテアーゼ阻害剤BILN2061のJFH-1感染細胞に対する高ウイルス作用を解析した。HCV持続感染細胞を用いて、薬剤を添加し培養上清中のウイルスコア蛋白濃度を測定した。BILN2061添加0.1 $\mu$ M以上の濃度で80%以上の阻害活性を示した。また、1 $\mu$ M以下の濃度で細胞障害性はほとんど示さなかった。さらに、他社から分与された薬剤を現在解析中である。

## D. 考察

HCVは1989年に遺伝子がクローニングされたが、ウイルス培養が困難であり、ウイルス学的研究や抗ウイルス薬の開発が進んでこなかった。1999年にRNAレプリコンが開発され(Lohmann, 1999 Science)、培養細胞におけるウイルスゲノム複製が可能となった。さらに、2005年に申請者らが世界に先駆けてHCVのウイルス培養系を開発した(Wakita, 2005 Nat Med)。これらHCVのウイルス培養系やレプリコン実験系を用いてウイルスの生活環をより詳細に解析し、その成果を新たな抗ウイルス治療法の開発につなげることが重要である。しかし、ウイルスの培養系は未だに単一のウイルス株でのみ可能であり、患者血清からウイルスを分離培養することはできない。日本や他の国で感染者が多く、インターフェロンの効きにくい遺伝子型1のウイルスの培養系の確立が急務である。そのために、より効率の良いウイルス複製系の開発が望まれる。一方、HBVもウイルス培養は困難だが、ウイルスゲノムの培養細胞への導入により、ウイルスの複製増殖が可能であり、この実験系を使用してウイルスゲノムの機能的解析が行われてきた。最近、HBVの遺伝子型の研究が進展し、遺伝子型と病態の関連が報告されている。ラミブジンなどの抗ウイルス薬がHBV感染症の治療に臨床導入され、B型肝炎の治療は変革しようとしている。しかし、耐性ウイルスの出現が問題となり、HIVウイルスの化学療法導入初期と同様の問題が生じている。このため、HBVに対して作用機序の異なる複数の抗ウイルス薬の開発が望まれる。

今年度スクリーニングをおこなった、LOPACライブラリーは作用機序の明らかな低分子化合物からなる。現在までのスクリーニングではサイクロスポリンのみが抗ウイルス作用を示した。今後はさらに他のライブラリーにスクリーニングも行っていく予定である。また、製薬



企業の研究所にも共同研究を呼びかけ、企業の持つ多くのライブラリーを我々の実験系でスクリーニングすることも推進していく。また、企業が開発中の様々な抗ウイルス薬候補を提供してもらっている。これら候補薬の抗ウイルス活性や薬剤耐性ウイルスについて解析していく予定である。

#### E. 結論

1. LOPAC ライブラリーを用いて抗 HCV 薬のスクリーニングを行った。
2. 抗 NS3 薬の JFH-1 ウイルスに対する活性を検討した。

#### 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, Doffoel 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, Rouillou 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.

## 2. 学会発表および講演など

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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回名古屋肝炎研究会、名古屋東急ホテル、(2007, 9. 21)
6. 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)
7. 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)
8. 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)
9. 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)
10. 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)
11. 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)
12. 今村道雄、平賀伸彦、木村俊之、島山剛、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」
13. 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」
14. 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」
15. 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)
16. 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

- イエ、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
17. 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)
  18. 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)
  19. 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)
  20. 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複製および性状解析、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)
  21. 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)
  22. 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)
  23. 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)
  24. 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)
  25. 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)
  26. 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)
  27. 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)
  28. 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)
29. 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)
  30. 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)
  31. 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)
  32. 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)
  33. 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)
  34. 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)
  35. 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)
  36. 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)
  37. Munakata T, Wakita T, Nomoto A, Toll-like receptor 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)
  38. T Wakita. HCV replication in vitro and in vivo, 3<sup>rd</sup> Pasteur-Areva Course on Blood-Borne Viruses: Hepatitis C Virus, Shanghai, China (Oct 15-18, 2007)
  39. T Wakita, H Aizaki, Critical roles of virion-associated cholesterol and sphingolipids in the viral infectivity, The 7<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, (2007 9/1-5)
  40. 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)

41. R Fischer, S Gorke, L Lan, S J. Rau, T Wakita, H E. Blum<sup>1</sup>, 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)
42. 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)
43. D Sir, W-l 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)
44. P Podevin, S Lagaye, A Carpentier, L Aoudjehane, M Carri $\ddot{u}$ re, S Za $\ddot{u}$ di, 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)
45. 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)
46. 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)
47. 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)
48. 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)
49. 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)
50. 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)
51. 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)
52. 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)
53. 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)
54. 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)
55. 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)
56. 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)
57. 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)
58. 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)
59. P Podevin, S Lagaye, A Carpentier, L Aoudjehane, M Carriere, S Zaoui, 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 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (November 2-6, 2007)

60. Masaki Wakita T, Analysis of NS5A region important for hepatitis C virus particle production, The 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (November 2-6, 2007)

G. 知的所有権の出願 ・ 登録状況  
なし

分担研究報告書

不死化肝細胞の改変によるHCVの高効率感染増殖実験系の開発と  
これを用いた新規抗HCV薬剤標的分子の同定

分担研究者 京都大学ウイルス研究所 准教授 土方 誠

研究要旨 初代培養ヒト肝細胞に極めて類似した形質を有する、独自に樹立した不死化肝細胞を用いてヒト血清由来の天然型C型肝炎ウイルス(HCV)の感染増殖を効率良く再現する実験系の構築をおこなった。これまでにこの細胞を温度感受性ゲル化担体メビオールゲルにより立体培養することで天然型HCVの感染増殖がさらに効率良くおこなわれることを示してきたが、この方法は実際に実験に用いるために必要な簡便性等に問題があった。そこで新たに中空糸培養法を用いて簡便にこの細胞を立体培養する方法を開発した。この方法を用いた場合の天然型HCVの感染増殖効率は上記メビオールゲル使用時と同等であり、さらに培養上清は簡便に解析可能であった。通常の培養同様に培地への薬剤添加も容易であり、インターフェロンやサイクロスポリンAなども通常培養と同様にその抗HCV効果を評価することが可能であった。また、一ヶ月にわたる天然型HCVの継続感染増殖を観察することが可能であり、その培養上清にHCV RNAの産生が認められた。このヒト不死化肝細胞を用いた天然型HCV感染増殖実験系は天然型HCVの感染増殖を標的とした新たな創薬の基礎研究のみならず、高い多様性が存在する患者血清由来HCVに対するテーラーメイド治療開発のために有用であることが考えられた。

A. 研究目的

血清由来天然型C型肝炎ウイルスが感染増殖する、独自に樹立した不死化肝細胞を用いてさらに効率の高くその感染増殖を再現する培養細胞実験系を構築することにより、その感染増殖を標的とした新しい効果的な抗HCV治療法の確立を目指した。

B. 研究方法

1. 既に独自に樹立したヒト不死化肝細胞を新規に開発された培養用中空糸中に充填し、立体培養をおこなう。これに患者血清由来HCVを感染させ、その増

殖ならびに培養上清中のHCV産生について検討する。

2. この実験系にインターフェロンやサイクロスポリンなどの抗HCV作用を示す薬剤を加えて、この系の抗HCV薬効作用評価系として可能性を検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト初代培養肝細胞作成は、京都大学附属病院移植外科においておこなわれた先天性代謝異常症患者への生体肝臓移植において切除された患者肝臓組織を用いておこなった。この研究はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に



承認されたものである。肝臓提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

#### C. 研究結果

1. 我々が独自に樹立したヒト不活化肝細胞は温度感受性ゲル化担体メビオールゲルにより立体培養することで天然型 HCV の感染増殖が効率良くおこなわれたが、この方法は実際に実験に用いるために必要な簡便性等に問題があった。そこで新たに開発された中空糸培養法を用いて簡便にこの細胞を立体培養したところ、天然型 HCV の感染増殖効率は上記メビオールゲル使用時と同等であり、さらに培養上清は簡便に解析可能であることがわかった。
2. 通常の細胞培養と同様に培地へ各種薬剤を添加することが可能であり、インターフェロンやサイクロスポリン A などを用いてその抗 HCV 作用も簡便に評価することが可能であった。
3. 天然型 HCV を感染させ、経時的にその増殖を観察したところ、一ヶ月間に渡りその細胞内感染増殖が観察された。またこの時培養上清に細胞内 HCV RNA 量の変動とは逆相関する量的変動パターンを伴って HCV RNA の存在が確認された。

#### D. 考察

1. 独自に樹立したヒト不活化肝細胞は新規培養用中空糸を用いて立体培養することによって、本来の肝臓中の肝細胞に類似した性質に変化する可能性が考えられた。
2. 異なる血清由来の HCV による感染増殖では、細胞内における HCV の増殖性と培養上清へのウイルス RNA の検出パターンに相違が認められたことからこの系を改良することにより、個々の患者の治療法に関する評価系に応用できる可能性が考えられた。

3. 長期間にわたる血清由来 HCV の感染増殖の維持が可能であるため、この実験系が HCV の病原性に関する研究に応用できる可能性が考えられた。

#### E. 結論

1. 中空糸を用いたヒト不活化肝細胞培養系は血清由来の天然型 HCV の感染増殖を再現するために基礎となる実験系であることが考えられた。
2. この実験系は多様な天然型 HCV に対する抗 HCV 薬の開発や薬効評価に用いるための新しい実験系開発のために有用な基礎実験系であると考えられた。

#### G. 研究八俵

##### 1. 論文発表

- 1) Hussein H. Aly, Koichi Watashi, Makoto Hijikata, Hiroyasu Kaneko, Yasutugu Takada, Hiroto Egawa, Shinji Uemoto, Kunitada Shimotohno: Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7- suppressed human primary hepatocytes. *J. Hepatol.* 46:26-36, 2007
- 2) Mohamed A. El-Farrash, Hussein H. Aly, Koichi Watashi, Makoto Hijikata, Hiroto Egawa, Kunitada Shimotohno: In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporine. *Microbiol. Immunol.* 51(1):127-133, 2007
- 3) Yusuke Miyanari, Kimie Atsuzawa, Nobuteru Usuda, Koichi Watashi, Takayuki Hishiki, Margarita Zayas, Ralf Bartenschlager, Takaji Wakita, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: The lipid droplet is an

important organelle for hepatitis C virus production. Nat. Cell Biol. 9 (9), 1089-1097, 2007

野邦忠、土方 誠

出願番号：PCT/JP2007/068611

- 4) Koichi Watashi, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Kaku Goto, Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno: Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptors with viral RNA polymerase NS5B. J. Biol. Chem., 282, 32765-32772, 2007

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

2. 学会発表

- 1) Hussein H. Aly, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: A novel culture system for HCV infection and replication. 14th International symposium on hepatitis C Virus & related viruses. Glasgow UK, Sept, 2007
- 2) Kaku Goto, Koichi Watashi, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: The emergence of a cyclophilin inhibitor-resistant HCV variant with a mutation in NS5A. 14th International symposium on hepatitis C Virus & related viruses. Glasgow UK, Sept, 2007
- 3) 村上善基、土方 誠、下遠野邦忠：マイクロ RNA を用いた新規 HCV 治療法の確立。第 66 回日本癌学会学術総会、平成 19 年 9 月、横浜 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2007 年 9 月 26 日出願

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

分担研究報告書

不死化肝細胞を用いた 3 次元培養系の試み～HBV 感染モデル～

分担研究者 名古屋市立大学大学院医学研究科 准教授 田中 靖人

研究要旨 中空糸に初代肝細胞を詰めることにより組織形成がみられ、長期にわたり肝合成能が保たれる 3 次元培養系を確立した。この 3 次元培養系における B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染実験を行った結果、培養上清中の HBV-DNA 量は  $10^7$  copies/mL 以上検出され、約 1 ヶ月間は持続した。細胞内 cccDNA も検出され、感染・複製が確認された。また、不死化肝細胞（正常肝細胞）を用いた 3 次元培養系でも HBV 感染・複製は証明された。再感染も成立することから、完全粒子の分泌が示唆された。結語：3 次元培養系は 1 ヶ月程度の長期培養が可能であり、各種変異体の感染効率の違いや HBV 感染・複製様式の解明、特にレセプターの探索や粒子放出過程などを解析できる。不死化肝細胞を用いた 3 次元培養系は、安価・簡便で非常に有用な HBV 感染モデルである。

共同研究者

名古屋市立大学大学院 溝上 雅史  
杉山 真也

A. 研究目的

中空糸に初代肝細胞を詰めることにより組織形成がみられ、長期にわたり肝合成能（アルブミンやアンモニア、CYP3A など）が保たれる 3 次元培養系を確立した。この中空糸に初代肝細胞や不死化細胞を詰めた 3 次元培養系における B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染・複製の可能性を探る。将来的には、このモデルを用いて、薬剤感受性試験や感染防御実験を行う。

B. 研究方法

1) 中空糸に初代肝細胞や不死化細胞を詰めた 3 次元培養系を作成。培養上清中のアルブミン濃度

測定。

2) 培養上清中の HBV-DNA, HBs 抗原、細胞内 cccDNA (複製中間体) を測定し、HBV 感染・複製を確認する。

3) HBV genotype による感染・複製の違いを検討する。

C. 研究結果

1) 初代肝細胞及び不死化細胞の 3 次元培養系で組織形成が見られた。アルブミン産生は、1 ヶ月以上保たれた。

2) 培養上清中の HBV-DNA 量は  $10^7$  copies/mL 以上検出され、約 1 ヶ月は持続した。培養上清中に HBs 抗原やコア蛋白が検出された。

3) 細胞内 cccDNA が検出され、感染・複製が確認された。免疫染色により細胞内 HBs 抗原の発現を確認した。

4) Genotype による違いが見られ、遺伝子導入実験と類似の傾向であった (C>Ae)。

5) 再感染実験により感染が確認され、培養上清中に感染性 HBV 完全粒子の存在が示唆された。

#### D. 考察

3次元培養系は1ヶ月程度の長期培養が可能であり、各種変異体の感染効率の違いや HBV 感染・複製様式の解明、特にレセプターの探索や粒子放出過程などを解析できる。今後は、標的分子薬剤の探索研究や新規治療法の開発研究に応用したい。

#### E. 結論

不死化肝細胞を用いた3次元培養系は、安価・簡便で非常に有用な HBV 感染モデルである。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Nakayama N, Mochida S, Mizokami M. Influences on hepatitis B virus replication by a naturally occurring mutation in the core gene. *Virology*. 365 (2):285-91. 2007.

##### 2. 学会発表

1. Tanaka Y, Yamaguchi T, Segawa M, Sugiyama M, Hijikata M, Shimotohno K, Mizokami M. In vitro infection of immortalized human hepatocytes by hepatitis B virus and its application to anti-viral treatment. 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November

2-6 2007. Boston.

2. Tanaka Y, Yamaguchi T, Segawa M, Sugiyama M, Hijikata M, Shimotohno K, Mizokami M. A novel three-dimensional long-term culture system of human hepatocytes for hepatitis B virus infection. 2007 International HBV meeting: The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. September 16-20 2007. Rome, Italy.
3. Tanaka Y, Sugiyama M, Takahashi S, Kato T, Shimada T, Sakamoto T, Orito E, Mizokami M. HBV Now in Asia. Difference of HBV genotype in vivo and in vitro. 17th APASL Conference. March 27-30 2007. Kyoto.
4. Tanaka Y, Yamaguchi T, Segawa M, Sugiyama M, Mizokami M. A novel three-dimensional long-term culture system of human hepatocytes for HBV infection. 17th APASL Conference. March 27-30 2007. Kyoto.
5. Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Nakayama N, Mochida S, Mizokami M. Influences on hepatitis B virus replication by a naturally occurring mutation in the core gene. 17th APASL Conference. March 27-30 2007. Kyoto.

H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。