

が多い肝臓における HO-1 の誘導薬剤は C 型肝炎による肝障害の遅延と肝発癌抑制をもたらすことが強く期待される。

今年度 HCV core 遺伝子発現トランスジェニックマウス腹腔内に鉄を投与することにより酸化ストレスの増加、肝臓内鉄含有量変化、HO-1 発現変化を検討した。HCV core 蛋白が酸化ストレス、肝臓内の鉄蓄積をもたらすこと、Hepcidine による鉄吸収制御は HCV core 蛋白により傷害されていないこと、抗酸化系において HO-1 の鉄による発現亢進が特異的に傷害されているが Nrf2 と HCV core 蛋白の直接的な結合は見出されないことを新たに認めた。

C 型肝炎症例における血中鉄の減少または抗酸化系 HO-1 発現により肝炎肝細胞癌発症抑制を示唆している。

B. 研究方法

同一月齢雄の HCV core 遺伝子発現トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスに対し経腹腔的に硫酸鉄を体重 100 g 当たり同一量投与 3 日連続投与し 24 時間後肝臓摘出し、肝臓内鉄量、ALT、酸化ストレス

(Tbars)、HO-1 発現量を蛋白レベルで検討した。

また同一月齢雄の HCV core 遺伝子発現トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスに対し同様に週 1 回 3 ヶ月投与し肝臓内鉄量、ALT、酸化ストレス (Tbars)、HO-1 発現量を蛋白レベルで比較検討した。

倫理面の配慮) 薬剤の投与は苦痛を与えぬよう細針でおこない、苦痛を与

えぬよう配慮して処理を行った。

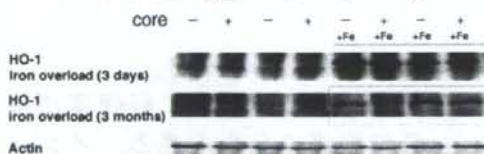
C. 研究結果

3 日鉄連続投与によって肝臓内 HO-1 発現は HCV core 遺伝子発現トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスにおいて差異を認めなかった。

いっぽう 3 ヶ月投与群においては HCV core 遺伝子発現トランスジェニックマウスにおいて肝臓内鉄含有量増加と HO-1 発現誘導低下を認めたが、catalase, グルタチオン合成酵素など他の抗酸化系は鉄長期投与においても障害を受けていなかった。

Core 発現培養細胞による検討から HO-1 誘導蛋白である Nrf2 と core 蛋白の相互直接結合は認められなかった。

Attenuation of anti-oxidant system by HCV core protein: hemoxygenase-1 (HO-1)



A long-term exogenous iron-overload in HCV core gene transgenic mice attenuates HO-1 gene expression in response to iron.

D. 考察

HO-1 によって分解されたヘムの反応産物である一酸化炭素、ビリルビンは、抗酸化作用を有する。したがって、酸化ストレスによって誘導された HO-1 は酸化促進剤である遊離ヘムを除去し、かつ一酸化炭素、ビリルビンを介して細胞保護的に機能する。一方、HO-1 の発現抑制や HO 活性の阻害は酸化ス

トレスによる組織障害を悪化させる。HCV core 蛋白による HO-1 発現抑制メカニズムの解明が重要である。肝臓特異的な HO-1 発現亢進により、肝細胞保護作用がもたらされ、肝細胞の保護・回復がもたらされる可能性が高い。

E. 結論

HCV core 蛋白は肝臓における長期酸化ストレス発生時の HO-1 誘導を阻害する。抗酸化系 HO-1 の活性誘導阻害が C 型肝炎酸化ストレス亢進病態の一因である可能性が示唆された。HO-1 誘導薬剤の開発が C 型肝炎治療の新しい候補として期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masao Hashimoto, Yasuhiko Sugawara, Sumihito Tamura, Junichi Kaneko, Yuichi Matsui, Junichi Togashi, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike, Masatoshi Makuuchi Colonization and/or infection with methicillin-resistant Staphylococcus aureus after living donor liver transplantation: a case control study BMC Infectious Diseases, 2008;8:155.
- 2) Tomoko Ichibangase, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike, Kazuhiro Imai Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics Biomedical Chromatography Published Online: 2008
- 3) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and

persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. Int J Cancer. 2008;122(1):124-31.

- 4) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPARalpha activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. J Clin Invest. 2008;118(2):683-94.
- 5) Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H, Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular basis for the synergy between alcohol and hepatitis C virus in hepatocarcinogenesis J Gastroenterol Hepatol. 2008;23 Suppl 1:S87-91.
- 6) Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H, Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular basis for the synergy between alcohol and hepatitis C virus in hepatocarcinogenesis. J Gastroenterol Hepatol. 2008;23 Suppl 1:S87-91.
- 7) Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of hepatitis B virus in Japanese patients with HIV. Hepatol Res. 2008;38(3):310-4.

2. 学会発表

- 1) Yotsuyanagi H, Yamada N, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Itoh F, Iino S, Koike K. Hepatitis B virus splicing

variants emerge and dominate in the immune clearance phase of chronic hepatitis B. #677, 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Milan, 2008.

- 2) Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K: Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. #1071, 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Disease, San Francisco, 2008.

G. 知的所有権の取得状況
なし

肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究
分担研究報告書

HCV感染とBリンパ腫発症機構の解明

研究分担者	山口 一成	国立感染症研究所 血液・安全性研究部長
研究協力者	溝呂木ふみ	慈恵医大第3病院診療部長、血液腫瘍内科教授
	岡田 誠治	熊本大学 エイズ学研究センター・予防開発分野 教授
	池淵 研二	埼玉医科大学輸血部 教授
	水落 利明	国立感染症研究所 血液・安全性研究部第2室長
	濱口 功	国立感染症研究所血液・安全性研究部第4室長
	百瀬 暖佳	国立感染症研究所血液・安全性研究部研究員

研究要旨（Ⅰ～Ⅲ班で構成される）

Ⅰ. HCV の病原ゲノム遺伝子がヒト血液細胞に与える影響を *in vivo* で解析するため、モデルマウスの作製を行った。このモデルに HCV 病原ゲノム遺伝子を導入したヒト血液細胞を移植し、導入遺伝子の与える影響を検討した。

Ⅱ. 1) 新規免疫不全マウスを用いたヒト B 細胞 *in vivo* 増殖系を樹立し、C 型肝炎研究へ応用した。

2) C 型肝炎患者の NK 細胞機能を検討した。

Ⅲ. HCV 慢性感染患者においては末梢血 B 細胞指向性に HCV が感染していることを明らかにした。そのような B 細胞においては HCV 蛋白の発現が見られることから、HCV が B 細胞内で増殖していることが示唆された。HCV 慢性感染患者の末梢血 B 細胞では、DNA に変異を誘導することで知られている AID (Activation-induced cytidine deaminase) 遺伝子や、cyclin D などの腫瘍化関連遺伝子の発現に変動が起きており、非ホジキン型 B 細胞リンパ腫の発症との関連が強く示唆された。

Ⅰ. モデルマウスを用いた C 型肝炎関連悪性リンパ腫発症のメカニズム（百瀬暖佳、浜口功）

A. 研究目的

近年、HCV 感染によって慢性の肝臓疾患が誘発されるだけでなく、悪性 B リンパ腫への進展例が存在することが示唆される。しかし、その作用機序は明らかでなく、HCV

感染に伴随する B 細胞リンパ腫の予防法や治療法は確立されていない。これまでに我々は、重症免疫不全マウス

(NOD/Scid/Jak3^{-/-}) にヒト血液細胞を移植し、ヒト B 細胞の動態を *in vivo* で解析できる新しい評価系の検討を行ってきた。本年度はこの *in vivo* 評価系の構築を行うとともに、HCV 病原ゲノム遺伝子のうち

core-E1-E2 および NS5A をヒト血液細胞に遺伝子導入し、遺伝子導入細胞の動態の *in vivo* 解析を試みた。

B. 研究方法

細胞の調整

日本赤十字社より譲渡された献血血液を Lymphoprep™ (AXIS-SHIELD PoC AC) に重層して 1,800rpm、25 分間、室温にて遠心したのち、境界面にある単核球層をヒト末梢単核球として用いた。ヒト造血幹細胞は、臍帯血 CD34⁺細胞を三光純薬株式会社より購入して用いた。

遺伝子発現ウイルスベクターの構築

pBMN-GFP ベクター (Orbigen) のマルチクローニングサイトに Flag タグを付与した HCV の core-E1-E2 遺伝子、NS5A 遺伝子を組み込んだ。pBMN-GFP/Flag-core-E1-E2 および pBMN-GFP/Flag-NS5A はリン酸カルシウム法を用いて Phoenix™-Ampho (Orbigen) に遺伝子導入し、回収したウイルス浮遊液 (培養上清) をウイルスベクターとして用いた。

細胞への遺伝子導入

ヒト末梢単核球は electroporation 法 (Nucleofector II (amaxa biosystems))、またはレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った。導入遺伝子の発現は抗 Flag 抗体または GFP を指標にし、フローサイトメトリー法により解析した。臍帯血 CD34⁺細胞は、レトロウイルスベクターを用いて目的遺伝子の導入を行い、導入効率は GFP を指標にフローサイトメトリー法によ

り解析した。

ヒト細胞の移植

ヒト末梢単核球は 5×10^6 の細胞を 10 μ l の PBS に懸濁し、NOD/Scid/Jak3(-/-) マウスの脾臓内に移植した。ヒト造血幹細胞は 5×10^4 の細胞を 500 μ l の PBS (含 2%FCS) に懸濁し、NOD/Scid/Jak3(-/-) マウスの尾静脈より移植した。移植 2 週間後にマウスの脾臓を摘出、または経時的に末梢血を採取し、ヒト由来血液細胞の分化についてフローサイトメトリーによる解析を行った。

C. 研究結果

1. ヒト末梢単核球を用いた移植実験

ヒト末梢単核球を脾臓内に移植した NOD/Scid/Jak3^{-/-} マウスでは、2 週間後からヒト細胞の *in vivo* における B 細胞への分化が認められたが、その割合は週を追うごとに減少した。同時に electroporation 法 (導入効率 60%) およびウイルスベクターを用いて遺伝子導入したヒト末梢単核球の移植も行ったが、レシピエントマウスの長期生存が望めず、コントロールと比較して有意な差を認めるには至らなかった。

2. ヒト造血幹細胞を用いた移植実験

そこで、マウス体内におけるヒト由来細胞の動態を長期に解析するため、移植方法の切り替えを試みた。第一は、ヒト造血幹細胞 (臍帯血 CD34⁺細胞) を新生仔マウス (NOD/Scid/Jak3^{-/-}) の肝臓へ移植するもの、第二はヒト造血幹細胞を成体マウス (NOD/Scid/Jak3^{-/-}) の尾静脈経由で移植するものである。共にヒト B 細胞の構築に 2

カ月程度を要し、また効率も脾臓内移植の場合より劣ったが、長期間にわたる解析を実現させるため、レシピエントマウスの生存期間が長く、手技が比較的簡便な第二の手法を用いることとした。

ヒト臍帯血 CD34⁺細胞への遺伝子導入は、ウイルスベクターを用いて行い、約 30%の感染効率を認めた。これを NOD/Scid/Jak3^{-/-}マウスの尾静脈より移植し、脾臓での腫瘍形成等に対する導入遺伝子の影響について、検討を行っている。

D. 考察

ヒト血液細胞をマウス体内で再構築する場合、ヒト末梢単核球を脾臓内に接種すると B 細胞の出現率が比較的高いものの、マウス自体の長期生存は望めなかった。一方、ヒト造血幹細胞を尾静脈経由で移植した場合は、ヒト由来 B 細胞が構築されるまでに時間を要し、出現率も高くない。しかし、マウスの長期生存は望めるので、HCV 病原ゲノム遺伝子を導入したヒト血液細胞を移植し、B 細胞リンパ腫発症の有無について、数年単位で解析するのに適すると考えられ、現在解析中である。

近年、理化学研究所バイオリソースセンターよりヒト不死化 B 細胞の提供が始まった。この細胞は *in vitro* での長期培養が可能であり、またヌードマウスに造腫瘍性を示さないものであることが示されている。今回の研究ではマウス体内で短期間にヒト B 細胞を高効率に再構築させ、それを長期に追跡することが困難であったが、ヒト不死化 B 細胞を用いることで、これらの課題を克服できる可能性がある。

E. 結論

HCV の病原ゲノム遺伝子がヒト B 細胞の動態に与える影響を解析するため、NOD/Scid/Jak3^{-/-}マウスにヒト血液細胞を移植し、*in vivo* での追跡を試みた。脾臓内に core-E1-E1 または NS5A を遺伝子導入したヒト末梢単核球を移植した場合、遺伝子の導入効率は高いものの移植細胞の追跡期間に限度があり、HCV 病原ゲノム遺伝子導入の効果を評価することはできなかった。そこで、core-E1-E2 または NS5A を導入したヒト臍帯血 CD34⁺細胞を経尾静脈で移植し、長期間遺伝子導入細胞の追跡を行う手法に切り替え、造腫瘍性等への影響に関して検討を行っている。

II. 1) 新規免疫不全マウスを用いたヒト B 細胞 *in vivo* 増殖系の樹立と C 型肝炎研究への応用(岡田誠治)

A. 研究目的

HCV は、肝細胞のみならず B 細胞などにも感染し、自己免疫疾患や悪性リンパ腫の発症に深く関わっていることが知られている。しかし、HCV と血液細胞の関係を見る良い解析系が存在しないため、その機序ははっきりしていない。本研究では、ヒト B 細胞が生着・増殖するマウスモデルを構築し、HCV の血液・免疫系への影響や腫瘍との関連について解析可能なモデル系を構築することを目的とする。

B. 研究方法と結果

1) NOD/Scid/Jak-3 欠損マウスの樹立

NOD/Scid マウスと Jak-3 欠損マウスを 1

0世代交配してNOD/Scid/Jak-3欠損マウスを作成した。本マウスにおいては、T細胞、B細胞、NK細胞、NKT細胞が欠損し、高度の免疫不全状態にあることを確認した。また、本マウスにヒト臍帯血由来CD34陽性造血幹細胞(5×10^4 個/マウス)を移植したところ、移植後8週以降にマウス骨髄への造血幹細胞の生着とB細胞への分化が認められた。移植後、12週ではT細胞が確認され、脾臓と骨髄では樹状細胞の構築も確認できた。B細胞は、最終分化した形質細胞まで確認された。(Int J Hematol, 2008)

2) 免疫不全マウス体内におけるヒトB細胞増殖・分化系の構築

2Gy放射線照射したNOD/Scid/Jak-3欠損マウス腹腔内及び脾臓にヒト臍帯血単核球を移植したところ、移植後2週間で両者共にヒトリンパ球の生着が認められた。腹腔内投与では、主にT細胞の構築が認められたのに対し、脾臓内投与では、B細胞とT細胞の両者の構築が認められた。T細胞B細胞共にナイーブなフェノタイプを示すものから記憶細胞までが存在することを確認した。また、麻疹ウイルスを攻撃接種したところ、麻疹特異的抗体(Ig-M, Ig-G)の産生が認められた。(Cytometry Research, 2008)

C. 考察

NOD/Scid/Jak-3欠損マウス脾臓にヒト臍帯血由来単核球を移植することにより、マウス体内でヒトナイーブB細胞から記憶B細胞まで増殖・分化する系を構築した。本システムでは抗原特異的抗体反応が認められたことから、ヒトの免疫系をmimicす

る系が構築できたと考えられる。今後この系を用いて、①C型肝炎患者B細胞の増殖分化異常の検討(自己免疫疾患発症との関連)、②EBウイルス感染によるC型肝炎関連悪性リンパ腫モデル系の樹立、③HCVに対する免疫応答、に関する研究を進めていく予定である。

II. 2) C型肝炎患者のNK細胞機能の検討(岡田誠治)

A. 研究目的

慢性C型肝炎患者では免疫機能が抑制されており、C型肝炎の持続感染に関与していることが知られている。そこで、抗ウイルス作用のあるNK細胞の機能に着目してC型肝炎とNK細胞についての解析を行った。

B. 研究方法と結果

日本人慢性C型肝炎患者の末梢におけるNK細胞数、NK細胞の亜分画、NK細胞の活性化能をフローサイトメトリー等を用いて解析したところ、慢性C型肝炎患者ではNK細胞数が減少するが、CD56⁺CD16⁺前NK細胞の割合は増加し、K562刺激によるCD107a発現を指標としたNK細胞活性化能は減弱していることが判明した。また、インターフェロン療法を受けた患者において、治療前、治療終了直後、治療6ヵ月後のNK細胞の状態を解析しところ、治療成功例ではNK細胞数もNK活性もコントロールレベルに上昇することが判明した。一方、エジプトではGenotype IVのHCV感染が90%を占めている。そこでエジプトの症例におけるウイルスのGenotypeの違いによるNK細胞への影響を解析中である。

C. 考察

慢性C型肝炎患者ではNK細胞機能が抑制されており、治療により回復することが判明した。治療直後のNK細胞の状態により治療の有効性を判定することが可能であることを期待したが、治療直後のNK細胞機能は抑制されており、判定は不可能であった。NK細胞機能の抑制は、C型肝炎の慢性化に寄与していることが示唆され、NK細胞活性化によるC型肝炎慢性化の回避が期待できる。C型肝炎ウイルスのGenotypeの違いによるヒト免疫機能への影響の相違について、今後更なる解析を進めていく予定である。

Ⅲ. HCV感染とB細胞リンパ腫

(水落利明、池淵研二、溝呂木ふみ、浜口 功、山口一成)

A. 研究目的

HCV感染による病変として、肝病変以外にマクログロブリン血症などのB細胞機能異常が原因と考えられる様々な肝外病変が報告されており、特にHCV感染と非ホジキン型B細胞リンパ腫発症との関連が強く示唆されている。しかし実際にB細胞にHCVが感染し、さらにはHCVがB細胞内で増殖するかについては結論が出ていない。われわれは、HCV慢性感染患者末梢血B細胞におけるHCV感染・増殖の有無を検討し、さらにはHCV感染とB細胞リンパ腫発症との関連を検討する目的で本研究を行った。

B. 研究方法

HCV慢性感染患者および対照として健康人から採取した末梢血液より、Ficollを用いてPBMCを分離し、さらにAutoMACS(抗

体標識磁気ビーズ吸着法)を用いてCD19陽性(B細胞)およびCD19陰性細胞(非B細胞)を分離した。得られた各細胞群からRNAおよび蛋白質を抽出し、リアルタイムPCR(rt-PCR)法、およびイムノプロテイング法により、HCV遺伝子、および非ホジキン型Bリンパ腫発症に関連することが示唆される様々な遺伝子および蛋白質の発現解析を行った。またB細胞に存在するHCV遺伝子配列の解析、およびEIA法と蛍光免疫染色法によるHCV慢性感染者末梢B細胞でのHCV蛋白質の発現を調べた。

C. 研究結果

rt-PCR法により、HCV慢性感染患者由来のB細胞指向性にHCVが感染していることを明らかにした。B細胞から単離したHCVゲノムの5'非翻訳領域(IRESを含む)の遺伝子配列は、血液中に存在するHCV RNAの遺伝子配列とほぼ同一であった。またHCVのE2/NS領域に存在する起可変領域(HVR-1)の遺伝子配列も両者で同様に変異しており、B細胞に固有の変異は見られなかった。さらにELISA法とWestern Blottingおよび蛍光免疫染色法によりB細胞内でのHCV蛋白発現が示され、HCVがB細胞内で増殖していることが示唆された。

HCV感染により誘導されるB細胞内での遺伝子発現変動について、主に腫瘍関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子に焦点をあててrt-PCR法により解析を行った。その結果、ウイルス性肝炎およびB細胞リンパ腫発症との関連が強く示唆されているAID mRNAの発現が、健康人に比較して約90倍上昇していた。またAID蛋白発現も同様に

上昇していることが確認された。さらに、非ホジキン型 B 細胞リンパ腫発症において顕著に発現が変動することが報告されている遺伝子に関して rt-PCR により検討した結果、HCV 慢性感染患者 B 細胞においては LM02、CCND1、CCND2 mRNA の発現が同様に変動することが明らかになった。

D. 考察

HCV 慢性感染患者においては末梢血 B 細胞に HCV が感染していることが明らかになったことから、その合目的性を考察した。つまり、HCV 感染末期では肝臓の組織破壊が生じることから HCV が増殖できる「場」を失うことが予想される。そのために HCV が感染/増殖の「場」を肝臓細胞以外に求めることは理にかなっている。その一例として末梢 B 細胞がその「場」になることは、B 細胞が HCV の受容体を構成する CD81 分子、SR-B1 (スカベンジャーレセプター B-1)、DC-SIGN (C タイプレクチン) といった分子群を発現していることから容易に予想ができる。実際にごく最近の論文においては、B 細胞に HCV (JFH-1) が感染 (付着および内包) すること、そしてその HCV が HuH-7.5 (肝臓由来細胞株) に trans-infection することが報告されている (Stamatakis et al. *Blood in press*)。このように HCV が B 細胞を reservoir (貯留場) として利用しているとすると、血中の HCV を peginterferon や ribavirin 投与によって減少させるだけでなく、HCV 感染/増殖の場である可能性を持つ B 細胞を rituximab の投与により消滅させる治療法が有効であることが考えられるだろう。

本研究ではさらに、HCV に感染した B 細胞において腫瘍化関連遺伝子発現に異常をきたし、非ホジキン型 B リンパ腫へと transform する可能性を、特に AID および cyclin 遺伝子の発現亢進から示唆した。今後は HCV 陽性の非ホジキン型リンパ腫患者末梢血を用いて、それらの腫瘍化関連遺伝子発現について同様の解析を行いたい。

E. 結論

HCV 慢性感染患者においては末梢血 B 細胞指向性に HCV が感染していることを明らかにした。また、そのような B 細胞においては HCV 蛋白の発現が見られることから、HCV が B 細胞内で増殖していることが示唆された。HCV 慢性感染患者の末梢血 B 細胞では、DNA に変異を誘導することで知られている AID (Activation-induced cytidine deaminase) 遺伝子や、cyclin D などの腫瘍化関連遺伝子の発現に変動が起きており、非ホジキン型 B 細胞リンパ腫の発症との関連が強く示唆された。

F. 研究発表

学会発表

- 1) HCV 慢性感染患者における B 細胞リンパ腫発症機序の解明：末梢血 B 細胞での HCV 感染・増殖および AID (Activation-induced cytidine deaminase) の発現上昇：伊藤昌彦、村上恭子、鈴木哲朗、山口一成、水落利明 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 2) Peripheral B cells are reservoirs for HCV infection/replication：水落利

明 第38回日本免疫学会学術集会、京都、
2008.

G. 知的所有権の取得状況

なし

肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究
分担研究報告書

マウスモデルを用いたHCV誘発性リンパ腫発生機序の解析に関する研究

研究分担者 小原 恭子 熊本大学大学院医学薬学研究部・特任教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)感染は肝臓以外にも自己免疫疾患の発生や悪性リンパ腫、扁平苔癬などの疾患を引き起こす。本研究では、これら肝外病変のうちリンパ腫に関して発症機序解明を目的として2種のモデルマウスを樹立した。HCVのB細胞への直接作用を解析するために樹立した全長HCV遺伝子をB細胞で発現するトランスジェニックマウス(Rz-CD19Cre)を600日以上経過観察した結果、雌での死亡率が有意に高く、脾臓の腫大や腫瘍の発生が観察されリンパ腫の発生が観察される個体があった。もう1つのHCV構造蛋白質遺伝子を生後任意の時期からCreアデノウイルスで発現誘導するマウス(CN2 IRF-1^{-/-})は、肝臓でのHCV蛋白質発現が長期に渡って持続しリンパ腫を形成する事が明らかとなった。IL-2, IL-10の産生上昇が見られ、Bcl-2の発現上昇が観察された。試験管内でリンパ球にIL-2, IL-10を処理するとCN2遺伝子存在下でコロニー形成能が亢進しアポトーシス耐性を獲得してBcl-2の発現が上昇する事が明らかとなった。また、IL-2, IL-10の産生を誘導するのはコアタンパク質である事も明らかとなった。コアタンパク質存在下でIL-2, IL-10処理を行うとBcl-2の発現が誘導される事も明らかとなった。

A. 研究目的

HCV感染に伴う肝外病変の発症機序は未だ不明な点が多い。B細胞リンパ腫の発生は欧米でまず報告され、日本においても発生が報告されている。これらのBリンパ腫細胞にはHCVが存在するという報告があるが、HCV感染によるリンパ腫発症の機序は未だ明らかではない。本研究では、2種のHCVトランスジェニックマウスを樹立して、HCVによるBリンパ腫発症機序を明かにすると同時に、治療法開発に寄与する基礎的知

見を得る実験モデル系の確立を目的とした。

B. 研究方法

Rz-CD19Creマウス;HCV全長遺伝子を発現するRzマウスとB細胞でCre酵素を発現するCD19Creマウスを交配して樹立した。600日齢以上まで経過を観察し脾臓や末梢リンパ球におけるHCVの発現をELISAやRT-PCRで確認した。さらに、腫瘍などの異常が発生したマウスを解剖し組織を病理学的に解析した。

HCV持続発現マウス;HCV構造蛋白質遺

伝子 (CN2) を Cre/loxP システムで任意の時期に発現するマウスに、CTL や NK 活性の低下した IRF-1^{-/-} マウスを交配して樹立した (CN2 IRF-1^{-/-} マウス)。CN2 IRF-1^{-/-} マウスの尾静脈から Cre-adenovirus (2x10⁹ PFU) を投与後 HCV コア蛋白質を 500 日以上に渡って測定した。また、これらマウスの生存率を測定し、リンパ腫形成の有無を観察した。リンパ腫については病理組織切片の観察、及びこれらを構成する細胞種については CD3, CD45R, CD4, CD8 などに対する抗体を用いた FACS 解析で同定を試みた。Fas 抗体投与によるアポトーシス感受性については、TUNEL アッセイやカスパーゼの測定によって検索した。肝炎の指標は血中 ALT を測定 (nissui) し、組織は HE 染色で検索した。血清中の IL-2, 4, 10, 12 のレベルは ELISA キット (R&D Systems) を用いて測定した。Bcl-2 蛋白質は特異抗体 (SantaCruz 社) を用いて検出した。リンパ球のコロニー形成能はメチルセルロースを用いて解析した。カスパーゼ 3/7 や 9 の活性は Ac-LEHD-AFC か Ac-DEVD-AFC を基質として測定した。IL-2, 4, 10, 12, bcl-2 の mRNA 量は定量 PCR 法で測定した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、熊本大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会の承認を得ている (H18 年 6 月)。動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(H18. 6. 1) に従った。また、熊本大学本荘・大江地区動物実験委員会の承認を得た (H18 年 4 月)。

C. 研究結果

RzCD19Cre マウスについては、生後 6 0

0 日以上経過を観察しており、脾臓やリンパ球での HCV 遺伝子の発現が確認できた。コントロール群のマウス (WT, CD19Cre, Rz) と比べ有意な体重減少は見られず肝炎の指標である ALT 値にも顕著な違いはなかった。また死亡率は他のマウス群で 5 ~ 15 % 前後であったのに対し RzCD19Cre マウス (雌) では 25 % 以上と有意に高かった。腫瘍の発生 (雄 4.3% 雌 12.1%) 脾臓の腫大 (雄 2%, 雌 12.1%) などの異常が観察され大型のリンパ系腫瘍細胞が脾臓に結節状に浸潤していた (~10%; 検討中)。

CN2 IRF-1^{-/-} マウスについては、Cre-adenovirus 感染後 500 日まで肝臓において HCV コア蛋白質の発現が確認でき、接種後 180 日を過ぎると HCV 発現マウスの中にリンパ腫を発生する個体が現れた。生後 500 日を過ぎると 50% 以上のマウスがリンパ性増殖を発症し死亡した。リンパ性増殖を形成する細胞は B, T 細胞の双方で構成されていた。IRF-1 欠損マウスでは IL-12 の産生が低下しており、このうち HCV 遺伝子を発現するマウス群では非発現群に比べ IL-2 や IL-10 の産生が顕著に増加していた。さらに、リンパ組織での Bcl-2 の発現亢進が観察された。HCV 遺伝子を発現するリンパ球に IL-2, IL-10 を処理するとコロニー形成能が亢進する事、アポトーシス耐性になりカスパーゼ 3/7 や 9 の活性が低下する事、Bcl-2 の発現が上昇する事が明らかとなった。さらに IL-2 や IL-10 の産生はコアタンパク質が誘導する事、コアタンパク質存在下で IL-2, IL-10 を作用させると Bcl-2 の発現が上昇する事も明らかとなった。

D. 考察

2 つのモデルマウスを用いて HCV によるリンパ腫発症機序の解析が可能となった。

まず、RzCD19CreマウスではBリンパ腫様変化も見られた事からHCVがBリンパ球に長期に存在する事によって一定の頻度で腫瘍化する可能性が明らかとなった。

CN2 IRF-1^{-/-}マウスではIL-2, IL-10のリンパ球の増殖性獲得における重要性、特にコアタンパク質との共役によるアポトーシス耐性の獲得、Bcl-2タンパク質の発現誘導が明らかとなった。さらに、RzCD19CreマウスよりもCN2 IRF-1^{-/-}マウス群でのリンパ性増殖の発生率が高い事からIL-2, IL-10の発症における重要性が示唆された。

最近共同研究者である東京都医学研究機構の小原道法博士らのグループにより、poly(IC)でHCV遺伝子を発現誘導するMx-1Cre-CN2マウスが樹立された。本マウスでは肝臓やリンパ球においてHCVを高いレベルで発現できるが、生後180日を過ぎると40%程度のマウスにBリンパ腫が発生する事が明らかとなった。

E. 結論

HCV遺伝子の発現がIL-2, IL-10と共役してリンパ球にアポトーシス抵抗性やコロニー形成能を賦与する事が明らかとなった。その結果リンパ性増殖が継続すると、遺伝子変異によるセカンドヒットが生じ(myc遺伝子の活性化)腫瘍化したリンパ球がモノクローナル性に増殖してBリンパ腫を形成する可能性が考えられた。以上の研究結果から、HCV感染がBリンパ腫発生誘導に関与する可能性が明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Yamaguchi, H. Ishihara, T. Yamada, A. Tamura, M. Usui, R. Tominaga, Y. Munakata, C. Satake, H.

Katagiri, F. Tashiro, H. Aburatani, K. Tsukiyama-Kohara, J. Miyazaki, N. Sonenberg and Y. Oka. ATF4-Mediated Induction of 4E-BP1 Contributes to Pancreatic β Cell Survival under Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Metabolism* 2008, 7(3):269-276.

- 2) T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Comparative Aspects on the Role of Polypyrimidine Tract Binding Protein in Internal Initiation of Hepatitis C Virus and Picornavirus RNAs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2008, 5:435-448.
- 3) Y. Terao-Muto, M. Yoneda, T. Seki, A. Watanabe, K. Tsukiyama-Kohara, K. Fujita, and C. Kai. Heparin-like glycosaminoglycans prevent the infection of measles virus in SLAM-negative cell lines. *Antiviral Res.* 2008, 80(3):370-376.
- 4) H. Sato, R. Honma, M. Yoneda, R. Miura, K. Tsukiyama-Kohara, F. Ikeda, T. Seki, S. Watanabe, and C. Kai. Measles virus induces cell-type specific changes in gene expression. *Virology* 2008, 375(2):321-330.
- 5) Y. Inoue, K. Tsukiyama-Kohara, M. Yoneda, H. Sato, and C. Kai. Inhibition of host protein synthesis in B95a cells infected with the HL strain of measles virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2009, 32(1):29-41.

(その他)

紀要：

- 1) T. Nishimura, M. Satoh, M. Saito, Y. Kasama, M. Kohara, and K. Kohara. Significance of 3 β -dehydroxysterol- Δ -24-reductase (DHCR24) in life cycle of Hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2008, 78 A54.

In revise:

- 2) K. Machida, K. Tsukiyama-Kohara, S. Sekiguch, E. Seike, S. Tóne, Y. Hayashi, Y. Tobita, Y. Kasama, M. Shimizu, H. Takahashi, C. Taya, H. Yonekawa, N. Tanaka, and M. Kohara. Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins.

Gastroenterology

In review:

- 3) M. Satoh, M. Saito, T. Takano, Y. Kasama, T. Nishimura, K. Tanaka, Y. Nishito, Y. Hirata, M. Arai, M. Sudo, C. Kai, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Antibody against 3 β -hydroxysterol- Δ 24-reductase (DHCR24) suppresses hepatitis C virus infection through BGT-1

J. Virology

2. 学会発表

「国内学会」

- 1) T. Nishimura, M. Sato, Y. Kasama, M. Shuda, S. Nakagawa, M. Saito, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. "Significance of 3 β -dehydroxysterol- Δ 24-reductase (DHCR24) in life cycle of Hepatitis C

virus." 第8回あわじしま感染症・免疫フォーラム 淡路島 2008

- 2) 佐藤正明、齊藤誠、田中康介、岩永寿真子、岡田誠治、甲斐知恵子、小原恭子 「ヒトリンパ球移入 NOD/SCID マウス (huPBL NOD/SCID) を用いた組換麻疹ウイルス評価系の構築」 第61回 日本細菌学会九州支部会 第45回日本ウイルス学会九州支部会合同大会 熊本 2008
- 3) 西村知裕、笠間由里、齊藤誠、小原道法、小原恭子 「DHCR24 を介した HCV の p53 活性抑制」 第61回 日本細菌学会九州支部会 第45回日本ウイルス学会九州支部会合同大会 熊本 2008
- 4) 齊藤誠、小原恭子 「C型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御機構の解析」 第61回 日本細菌学会九州支部会 第45回日本ウイルス学会九州支部会合同大会 熊本 2008
- 5) 佐藤正明、笠間由里、小原道法、小原恭子 「抗 DHCR24 単クローン抗体の C 型肝炎ウイルス複製抑制作用を担う宿主因子」 第56回 日本ウイルス学会学術集会 岡山 2008
- 6) 齊藤 誠、小原恭子 「C型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御機構の解析」 第56回 日本ウイルス学会学術集会 岡山 2008
- 7) 徳永 優子、齊藤 誠、小原 道法、小原恭子 「C型肝炎ウイルスが誘導する宿主因子 DHCR24 の相互作用分子の探索」 第56回 日本ウイルス学会学術集会 岡山 2008

- 8) T. Nishimura, Y. Kasama, M. Shuda, M. Arai, M. Saito, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. "Hepatitis C virus abrogates p53 activity through 24-dehydrocholesterol reductase." 第67回日本癌学会学術総会 名古屋 2008
- 9) 高野貴士、林 昌弘、榎原琢也、平田雄一、小原恭子、小原道法 「DHCR24 による HCV 複製能制御の検討」 Characterization of HCV replication regulatory by DHCR24 第67回日本癌学会学術総会 名古屋 2008
- 10) T. Nishimura, Y. Kasama, M. Shuda, M. Arai, M. Saito, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. "Hepatitis C virus suppresses p53 activity through 24-dehydrocholesterol reductase." BMB2008 (第 31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会年会・合同大会) 神戸 2008
- 11) 齊藤 誠、小原恭子 「C 型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御機構の解析」 Molecular mechanism of DHCR24 over-expression induced by hepatitis C virus BMB2008 (第 31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会年会・合同大会) 神戸 2008
- 2) T. Nishimura, M. Satoh, Y. Kasama, M. Shuda, S. Nakagawa, M. Saito, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Significance of 3 β -dehydroxysterol- Δ 24-reductase (DHCR24) in life cycle of Hepatitis C virus. 21th International Congress of Antiviral Research, Montreal, 2008.
- 3) T. Nishimura, Y. Kasama, T. Takano, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus abrogates p53 activity by over-expression of 3-beta-hydroxysterol delta-24-reductase (Oral presentation). IUMS (XIVth International Congress of Virology), Turkey, 2008.
- 4) M. Satoh, M. Saito, T. Takano, Y. Kasama, Y. Hirata, T. Nishimura, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Significance of DHCR24 in life cycle of Hepatitis C virus. "15th International Meeting on Hepatitis C & Related viruses" Texas, 2008.
- 5) T. Takano, Y. Hirata, K. Tsukiyama-Kohara, M. Sudoh, and M. Kohara. Regulation of HCV replication by DHCR24. "15th International Meeting on Hepatitis C & Related viruses" Texas, 2008.

「国際学会」

- 1) K. Tsukiyama-Kohara. Molecular Basis of Hepatocarcinogenesis elevated by Hepatitis C virus. The Asia and Africa International Network Symposium of JSPS Asia and Africa Science Platform Program and the

Fourth Liver Care Center Symposium (invited) Khon Kaen, Thai-land, 2008.

- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
- 「ウイルスの複製に関与する宿主因子」特願：2008-66158、発明者：小原恭子、小原道法、佐藤正明、西村知裕、出願日：平成20年3月14日、出願人：

国立大学法人 熊本大学、(財)東京都医学
研究機構、(財)化学及血清療法研究所

熊本大学、(財)東京都医学研究機構、(財)化学及血清療法研究所
共同研究費助成による研究報告書
研究題目：がん細胞の増殖抑制と転移抑制に関する研究
研究期間：平成25年度
研究責任者：[氏名不明]
研究員：[氏名不明]
研究内容：がん細胞の増殖抑制と転移抑制に関する研究
研究結果：[結果不明]
研究の意義：[意義不明]

熊本大学、(財)東京都医学研究機構、(財)化学及血清療法研究所
共同研究費助成による研究報告書
研究題目：がん細胞の増殖抑制と転移抑制に関する研究
研究期間：平成25年度
研究責任者：[氏名不明]
研究員：[氏名不明]
研究内容：がん細胞の増殖抑制と転移抑制に関する研究
研究結果：[結果不明]
研究の意義：[意義不明]

熊本大学、(財)東京都医学研究機構、(財)化学及血清療法研究所
共同研究費助成による研究報告書
研究題目：がん細胞の増殖抑制と転移抑制に関する研究
研究期間：平成25年度
研究責任者：[氏名不明]
研究員：[氏名不明]
研究内容：がん細胞の増殖抑制と転移抑制に関する研究
研究結果：[結果不明]
研究の意義：[意義不明]

熊本大学、(財)東京都医学研究機構、(財)化学及血清療法研究所
共同研究費助成による研究報告書
研究題目：がん細胞の増殖抑制と転移抑制に関する研究
研究期間：平成25年度
研究責任者：[氏名不明]
研究員：[氏名不明]
研究内容：がん細胞の増殖抑制と転移抑制に関する研究
研究結果：[結果不明]
研究の意義：[意義不明]

肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究
分担研究報告書

HCV産生に関する宿主因子hnRNPHの機能解析

研究分担者 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨 肝細胞以外の細胞で効率良く C 型肝炎ウイルス (HCV) が感染増殖する実験系がないため、肝外病変発現機構の解明が進んでいない。HCV JFH1 株とリンパ球系細胞株を用いた HCV 増殖系の解析から HCV 増殖に関する宿主因子の検討が必要となった。肝細胞および B 細胞に共通に発現している宿主因子の中から HCV コア蛋白および HCV RNA の IRES 領域に結合する宿主因子 hnRNPH を同定した。hnRNPH の過剰発現で HCV 産生は増加し、hnRNPH のノックダウンで HCV 産生は減少したことから、hnRNPH は HCV 産生を制御している可能性が示された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は肝臓で複製し、肝炎、肝硬変、肝癌を発生するウイルスである。また、HCVは肝臓以外の臓器(血液、心臓、腎臓、代謝性疾患など)で混合型クリオグロブリン血症、Bリンパ腫、心筋症、糸球体腎炎、耐糖能異常などの多様な病態を引き起こすことが知られており、慢性C型肝炎の制圧とともに肝外病変への対策は社会的要請が極めて高く、厚生労働行政上の重要課題である。HCVは肝臓のみでなくBリンパ球、Tリンパ球などの血球系細胞や心筋、腎細胞に感染増殖することが示唆されているが、肝以外の細胞で効率良くHCVが増殖する実験系がないため、肝外病変発現機構の解明が進んでいない。HCV JFH1株とリンパ球系細胞株を用いたHCV増殖系の解析からHCV増殖を制御する宿主因子の同定を目的とした。

B. 研究方法

- (1)HCV core 蛋白質に結合する宿主因子のスクリーニングと同定：myc-TEV-Flag-tag を N 末端に付加した HCV core 遺伝子をヒト胎児腎臓細胞にトランスフェクトし、tandem affinity purification 法で HCV core 蛋白に結合する宿主因子を分離し、質量分析法にて同定した。
- (2)HCV RNA IRES IIIId 領域に結合する宿主因子のスクリーニングと同定：ビオチン化した HCV RNA IRES IIIId 領域とアンチセンスコントロールに Huh-7 細胞抽出液を混じ、アビジンビーズで結合因子を分離し、質量分析法で結合因子を同定した。
- (3)同定された結合因子のうち肝細胞および B 細胞系で発現する宿主因子をプロテオームデータベースで検索した。
- (4)HCV core 蛋白質と hnRNPH1/H2 の細胞

内での結合を免疫沈降法で解析した。

(5)HCV RNA IRES IIIId 領域と hnRNPH との結合をアビジンビーズで pull down し、その後、anti-hnRNP 抗体を用いたウエスタンブロット法で確認した。

(6)HCV core 蛋白質と hnRNPH1 の結合が RNA を介した間接結合なのか、蛋白同士の直接結合なのか解析した。

(7)HCV JFH1 感染 Huh-7.5 細胞に hnRNPH1 を発現するプラスミドをトランスフェクトし、培養上清中に産生される HCV 粒子量を解析した。

(8)HCV JFH1 感染 Huh-7.5 細胞で内在性の hnRNPH1 をノックダウンし、培養上清中の HCV 粒子量を解析した。

(倫理面への配慮)

取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われた。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。患者試料を用いる際は当研究所の倫理委員会に報告し承認を受けたのちに行う。

C. 研究結果

(1)HCV core 蛋白質に結合する新規宿主因子 hnRNPH1 を同定した。hnRNPH1 は分子量 49kDa の細胞内蛋白であり、448 アミノ酸からなり、三カ所の RNA 結合領域を有する。

(2)HCV RNA IRES IIIId 領域に結合する新規宿主因子 hnRNPH1 を同定した。

(3)hnRNPH1 は HCV コア蛋白質と HCV RNA に結合し、肝細胞および B 細胞に発現している。

(4)HCV core 蛋白質は hnRNPH1/H2 のいずれとも Huh7 細胞内で特異的に結合する

ことが分かった。HCV コア上の aa 1-43 が結合に重要であった。

(5)HCV RNA IRES IIIId 領域と hnRNPH との結合をアビジンビーズで pull down し、その後、anti-hnRNP 抗体を用いたウエスタンブロット法で解析したところ、特異的に結合した。

(6)HCV core 蛋白と hnRNPH1 の結合に HCV RNA は阻害的に働いた。

(7)HCV JFH1 感染 Huh-7.5 細胞に hnRNPH1 を発現するプラスミドをトランスフェクトしたところ、培養上清中に産生される HCV 粒子量が 2 倍以上に増加した。

(8)HCV JFH1 感染 Huh-7.5 細胞で内在性の hnRNPH1 をノックダウンしたところ、培養上清中に産生される HCV 粒子量が減少した。

D. 考察

HCV core 蛋白質および HCV RNA に結合する宿主因子として hnRNPH を同定した。これらは肝細胞および B 細胞系に発現している。hnRNPH が HCV core 蛋白質と結合する際、core 蛋白質の aa 1-43 が重要であることが分かった。HCV core 蛋白質と hnRNPH1 は共に RNA 結合蛋白質であるため、両者の結合が RNA を介した間接結合なのか、蛋白同士の直接結合なのか二通りの可能性が考えられた。両蛋白同士の結合に RNA が阻害的に機能したことから、蛋白同士の直接結合であることが示唆された。

HCV の生活環における hnRNPH1 の機能を明らかにするために HCV JFH1 株が感染した肝細胞に hnRNPH1 を強制発現させた場合と内在性の hnRNPH1 をノックダウンさせた場合でウイルス産生への影響を解析した。

hnRNPH1を強制発現させるとウイルス産生が増加し、hnRNPH1をノックダウンさせるとウイルス産生が減少することから、hnRNPH1はウイルス産生を調節している可能性が考えられた。ウイルス複製への影響を解析したところ、有意な変化が認められなかったことから、ウイルス複製ではなくウイルスの粒子形成や成熟機構に関与している可能性が考えられた。

E. 結論

hnRNPH1はHCV core蛋白質とHCV IRESへの結合を介してHCVウイルス産生を調節していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murakami, K., Inoue, Y., Hmwe, S.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*, **148**, 174-181, 2008.
- 2) Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Wakita, T., and Shoji, I. Virological characterization of the HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *Journal of General Virology*, **89**, 1587-92, 2008.
- 3) Sasase, N., Kim, S.R., Kim, K.I., Taniguchi, M., Imoto, S., Mita, K., Hotta, H., Shoji, I., El-Shamy, A., Kawada, N., Kudo, M., and Hayashi, Y. Usefulness of a new immunoradiometric assay of

HCV core antigen to predict virological response during PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis with high viral load of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, **51**, 70-5, 2008.

- 4) Deng, L., Adachi, T., Kitayama, K., Bungyoku, Y., Kitazawa, S., Ishido, S., Shoji, I., and Hotta, H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondria-mediated, Caspase-3-dependent pathway. *Journal of Virology*, **82**, 10375-85, 2008.
- 5) Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Shoji, I., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., and Suzuki, T. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by dual mechanisms, ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *Journal of Virology*, [epub ahead of print], 2008.
- 6) Shimoji, T., Murakami, K., Sugiyama, Y., Matsuda, M., Inubushi, S., Nasu, J., Shirakura, M., Suzuki, T., Wakita, T., Kishino, T., Hotta, H., Miyamura, T., and Shoji, I. Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *Journal of Cellular Biochemistry*, in press.
- 7) 金守良、井本勉、婦木秀一、金啓二、谷口美幸、長野基子、堀田博、勝二郁 夫、
- 8) 寒原芳浩、前川陽子、工藤正俊、林祥剛。1b型高ウイルス量高齢者C型慢性

- 肝炎に対する PEG IFN α -2 b/リバビリン治療 (併用療法) の検討. 肝臓, **49**, 145-152, 2008.
2. 学会発表
- 1) Shoji, I., Osaki, M., Fukuda, K., Murakami, K., Hotta, H., Suzuki, T., Wakita, T., and Miyamura T. Molecular mechanism of E6Ap-mediated regulation of hepatitis C virus production. Keystone Symposia, Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis, Victoria, Canada, 2008.
 - 2) Murakami, K., Abe, K., Shoji, I., Takamiya, S., Kimura, T., Aizaki, H., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Wakita, T. Identification of hnRNPH1 as a binding partner of hepatitis C virus core protein and the IRES IIIId region of viral RNA. International Union of Microbiology 2008, Istanbul, Turkey, 2008.
 - 3) Hara, H., Aizaki, H., Matsuda, M., Murakami, K., Shoji, I., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T. Involvement of creatinine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
 - 4) Hamamoto, I., Murakami, K., Suzuki, T., Tanaka-Taya, K., Okabe, N., Wakita, T., and Shoji, I., ERGIC-53 regulates the HCV RNA replication through interaction with the viral NS3 protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
 - 5) El-Shamy, A.M., Apichartpiyakul, C., Kim, S.R., Adachi, T., Shoji, I., and Hotta, H. Polymorphism of HCV-1b core protein and interferon/ribavirin resistance -determining region (IRRDR) of NS5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/rivavirin combination therapy. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
 - 6) Abe, K., Murakami, K., Takamiya, S., Suzuki, T., Miyamura, T., Koike, K., Wakita, T., and Shoji, I. Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as biding partners for HCV core protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
 - 7) Deng, L., Adachi, T., Kitayama, K., Bungyoku, Y., Kitazawa, S., Ishido, S., Shoji, I., and Hotta, H. HCV infection induces Bax-triggered, mitochondria-mediated, caspase-3-dependent apoptosis. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
 - 8) Hotta, H., Kitayama, K., Yabuki, R., Deng, L., Nagano-Fujii, M., and Shoji, I. HCV induces nucleolar enlargement of the host cell that is associated with anti-apoptotic status and cell cycle progression during the chronic persistent phase of infection. 15th International