

20083/009A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルスの培養系を用いた 新規肝炎治療法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成21（2009）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルスの培養系を用いた 新規肝炎治療法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発 1
脇田 隆宇

II. 分担研究報告

1. 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 27
脇田 隆宇
2. 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 37
土方 誠
3. 不死化ヒト肝細胞を用いた3次元培養系の試み～HBV感染モデル～ 40
田中 靖人
4. HCV コア蛋白質に相互作用する宿主蛋白質の感染における役割 43
森石 恆司
5. HCV タンパク翻訳に関わる宿主因子と HCV 複製制御 47
本多 政夫
6. HCV ゲノム RNA 二次構造を標的とした抗HCVペプチドの創製とそのHCV治療薬への応用 50
原田 和雄
7. 肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発：HCV増殖・感染細胞モデルを用いた抗ウイルス化合物・宿主因子の探索 54
坂本 直哉
8. 化合物ライブラリーを用いた抗HCV創薬シーズの探索とその同定 58
武部 豊
9. 栄養成分のHCVに及ぼす効果の検討 63
池田 正徳

10. ラミブジン耐性 B 型慢性肝炎に対するアデホビル追加投与における治療 効果に影響を及ぼす HBV 遺伝子変異の網羅的解析	69
竹原 徹郎	
11. GFP 挿入ウイルスを用いた HCV 感染細胞検出系の確立	75
加藤 孝宣	
12. HBV pseudotype 作製の試みとレセプターの分離・同定に関する研究	79
上田 啓次	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	81
IV. 研究成果の刊行物・別冊	89

I. 総括研究報告

肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発

研究代表者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）の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。

分担研究者 土方 誠
京都大学ウイルス研究所
准教授

分担研究者 田中靖人
名古屋市立大学大学院
准教授

分担研究者 森石恒司
大阪大学微生物研究所
准教授

分担研究者 本多政夫
金沢大学大学院
准教授

分担研究者 原田和雄
東京学芸大学
准教授

分担研究者 坂本直哉
東京医科歯科大学
准教授

分担研究者 武部 豊
国立感染症研究所
室長

分担研究者 池田正徳
岡山大学大学院
准教授

分担研究者 竹原徹郎
大阪大学大学院
准教授

分担研究者 加藤孝宣
国立感染症研究所
室長

分担研究者 上田啓次
浜松大学医学部
教授

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り、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パ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。そこで、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の開発を目的とする。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の探索を可能とする。

B. 研究方法

1. 肝炎ウイルスの新規感染モデルの開発

1) ヒト不死化肝細胞の中空系立体培養により種々の患者血清由来HCVの感染増殖を試みた。さらに、種々の患者血液由来HCVの感染増殖ならびに細胞との相互作用の解析をおこなった。マイクロアレイ法を用いて通常培養と立体培養によって変化する遺伝子発現パターンを解析した。

2) 中空系に不死化細胞を詰めた3次元培養系を作成した。3次元培養系にHBVを感染させ、その後3次元培養上清中のHBVを測定し、HBV感染・複製を確認した。抗体による感染防御実験をおこなった。

2. HCV増殖機構の解析と新規治療法の開発

1) コア蛋白質の野生型およびIle176, Phe177をAla, Leuに置換した変異体(コア蛋白質AL)のアミノ末端にFLAGエピトープタグを付加し、293T細胞に発現して、Triton X-100で溶解した後、密度勾配遠心法によってコア蛋白質を分画した。また、JFH1が持続感染しているHuh7.5.1細胞にSPP抑制剤L685458を培養上清に加えて、感染持続細胞におけるコア蛋白質の画分を上記方法で解析した。RNA polymerase I 制御下で全長JFH1 RNA

が転写されるpHH21/JFH1およびコア蛋白質AL変異をもつpHH21JFH1/ALをHuh7.5.1に導入し、上清中のウイルスRNA量およびコア蛋白質量を測定した。

2) JFH-1のIRES構造のstem-loop IVに一塩基置換(339A→U)を導入し蛋白翻訳を阻害するクローンJFH-1 339Uを作成した。La proteinの発現抑制を目的として、La proteinに対するショートヘアピンRNA(shRNA)をデザインし、shRNA組み替えアデノウイルスを作成した。JFH-1感染に伴うLa proteinの発現変動はリアルタイムPCR(RTD-PCR)及びウエスタンブロット法にて行った。

3) SL2 RNAと#3d001ペプチドの結合様式を、SL2 RNAのループおよびステム上部の塩基を種々置換した変異体を作成し、アンチターミネーション・システムを用いて解析した。標的RNAであるHCV IRESのIIIe, IIIf、およびIIIefを持つカナマイシン耐性pACKレポーター・プラズミドを作製し、アンチターミネーション・システムを用いたHCV IRES IIIeおよびIIIf結合ペプチドをスクリーニングした。

3. HCV生活環に関与する宿主側因子の探索と新規治療法の開発

1) HCV複製増殖に関与する代謝・シグナルネットワークを網羅的に解析した。

2) JFH-1株のNS5a領域にGFPを挿入したコンストラクトのRNAをHuh7.5.1細胞に導入し、長期に培養することにより、そのウイルス増殖能とGFPをもったウイルスの安定性を検討した。GFP挿入ウイルス感染増殖細胞の比率はFACSを用いた解析により同定した。また野生型JFH-1株をHuh7.5.1細胞に導入し、長期培養することにより得られた適応変異をGFP挿入ウイルスに導入し、そのウイルス生成効率と感染性に与える影響を検討した。

4. HBV増殖機構の解析と新規治療法の開発

1) LAM耐性をきたしADV追加投与を施行したB型慢性肝炎30例を対象として、ADV投与前に採取

した血清サンプルを用いて、直接シーケンス法にて HBV 全長の塩基配列解析を行い、ADV 治療感受性に影響を与える HBV 変異を網羅的に検討した。

2) HBVpseudotype作製の試みとレセプターの分離・同定: Gfp-hygrを含むレトロウイルスコア粒子をHBV膜粒子で覆ったHBVpの作製を試みた。本HBVpを用いてヒト肝細胞cDNAライブラリーをスクリーニングした。

5. 肝炎ウイルス培養系および増殖系を用いた抗ウイルス薬のスクリーニング

1) 抗 HCV 薬のスクリーニング

HCV レプリコン系を用いた High-Throughput Screening (HTS)により、HCV 増殖を制御する薬剤・化合物の網羅的スクリーニングを進める。対象化合物として、生理活性物質ライブラリー、及び Diversity-oriented synthesis 化合物ライブラリー、漢方生薬・抽出精製化合物を使用する。

多様性指向低分子化合物ライブラリー (8,000 化合物)、天然物誘導体ライブラリー (3,000 化合物)を用いて HCV 阻害剤のスクリーニングを行った。また、alpha-グリコシダーゼの活性中心の構造情報を利用した molecular docking 法によって virtual library から選択された約 30 種の化合物の HCV 阻害効果を評価した。Huh7.5.1 細胞 (1×10^4 細胞/well) を培養し、およそ 24 時間後、試験化合物を添加し、HCV を感染させた。感染から 72 時間後の培養上清中の HCV コアタンパク質量を定量した。

2) HCV-0 株 (遺伝子型 1b) 由来の全長 HCV RNA 複製細胞 (OR6 細胞)を用いて栄養成分の HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討した。本年度は β -カロテン (BC)、ビタミン D2 (VD2)、多価不飽和脂肪酸 (LA)、アラキドン酸 (AA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、CsA、IFN- γ 、フルバスタチン (FLV)、ピタバスタチン (PTV) を単独あるいは MEK 阻害剤である U0126 と併用して 24 時間前に 2×10^4 個の OR6 細胞を播種した 24 well plate に処理し、72 時間培養した。細胞を回収してレニラルシフェラーゼ活性を測定した。

3) 新規抗 HCV 薬候補の抗ウイルス活性について解析する。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、個人情報を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 肝炎ウイルスの新規感染モデルの開発

1) HCV: 不死化肝細胞を小規模な中空糸に充填することで立体的に培養する方法で、遺伝子型 1b を含む複数の患者血液由来 HCV の感染増殖と感染細胞の相互作用について解析した。患者血清による感染は種々の HCV 増殖パターンを観察した。感染後培養液を濃縮し、非感染細胞に加えることで二次感染が成立する患者血清もあった。中空糸立体培養による遺伝子発現を解析したところ、ペルオキシソーム誘導剤活性化受容体 (PPAR) alpha シグナルの下流遺伝子群の発現上昇が認められた。PPARalpha に対するアゴニストであるフェノフィプレートやアンタゴニストである MK886 で中空糸立体培養不死化肝細胞を処理すると、HCV の増殖をそれぞれ亢進そして抑制した。

2) HBV: 感染初期のウイルス動態の検討では、感染後経時的に培養上清中の HBV-DNA 量の増加を確認し、感染 3-6 時間後に peak に達し、そのまま

24 時間後まで plateau となった。長期培養の検討では、培養上清中の HBV-DNA 量は 10^{-5} copies/mL 以上検出され、約 1 ヶ月は持続した。培養上清中に HBs 抗原やコア関連抗原が検出された。細胞内の cccDNA を検出したことで、感染・複製を確認した。HBV ウイルス粒子を含む培養上清は 30mIU/mL (抗体量 約 27.5 μ g/mL) 以上の HBIG 添加によりで培養上清中に HBV-DNA が検出されなくなった。

2. HCV 増殖機構の解析と新規治療法の開発

1) 成熟コア蛋白質の C 末端は 177 番目の Phe である。Ile176 と Phe177 を変異させたコア蛋白質 AL は SPP によって切断を受けなくなる。コア蛋白質は SPP 切断を受けると、一部のコア蛋白質は界面活性剤抵抗性膜画分 (DRM) に分画された。しかし、コア蛋白質 AL は DRM に分画されなかった。HCV 持続感染細胞を SPP 抑制剤で処理するとコア蛋白質は未切断が多くなり、DRM に分画されなかった。この変異をウイルス遺伝子に導入すると培養上清中のウイルス産生が野生型と比べ著しく低下した。しかし、細胞内ウイルス複製への影響は認められなかった。

コア蛋白質は宿主蛋白質 PA28 γ と結合し、プロテアソームによって分解される。感染後および感染前 24 時間に、PA28 γ をノックダウンすると上清中のウイルス量が著しく低下した。また、PA28 γ ノックダウンによって細胞増殖が僅かではあるが抑制され、レプリコン細胞内のレプリコン RNA 量も低下した。

2) Huh7.5 細胞において JFH-1 339U は蛋白翻訳、複製 incompetent なクローンであり、JFH-1 のコントロールとして有用と考えられた。培養細胞における HCV の複製と La protein の発現の関連性について検討した。HCV-RNA の発現と La protein の発現は相関しており、HCV の発現増強に伴い、La protein の発現は RNA レベル、蛋白レベルで増強した。La protein 同様に、他の翻訳宿主因子である PTB、PSMA7、eIF2 γ 、PCBP2 も JFH-1 の複製に伴って、発現の増強が認められた。また C 型

慢性肝炎症例の肝組織におけるこれらの翻訳宿主因子発現と HCV-RNA 量は有意に相関していた。La protein に対するショートヘアピン RNA (shRNA) をデザインし、shRNA 組み替えアデノウイルス (Ad-shLa) を作成した。JFH-1 トランスフェクション後、Ad-shLa を用いて La protein の発現を抑制させると、JFH-1 発現は RNA レベル (50%)、蛋白レベル (30%) でともに減弱した。

3) 3' UTR X-tail の SL2 RNA が #3d001 ペプチドと結合する上で重要な塩基を同定した。ループの 1 番目と 4-6 番目の塩基は、他の塩基に置換できないこと、また、3 番目はプリン塩基であることが重要とわかった。ステムの中では最上部の closing base-pair の U 残基が重要であった。さらに SL2 は GNRA-like な構造を形成する可能性が示唆された。また、HCV IRES の IIIe、III f、および IIIef を標的とした 3 種のセクションにより陽性クローンを濃縮した。

3. HCV 生活環に関与する宿主側因子の探索と新規治療法の開発

1) HCV 複製増殖に関与する代謝・シグナルネットワークの網羅的解析:

脂質・コレステロール代謝に関わる代謝・シグナルネットワークの関与、関連薬剤の効果を確認した。

2) JFH-1 株の NS5a 領域 C 末端に GFP を挿入したコンストラクトの全長 RNA を Huh7.5.1 細胞に導入し、約四週間の培養を行なった。培養上清の感染力価の上昇が観察された。しかし HCV コアが陽性の細胞の増加は認めるものの GFP が陰性の細胞の比率が徐々に増加し、Day 28 (Passage 7) では HCV コア陽性細胞中の GFP 陽性細胞の数は陰性細胞の数を下回っていた。ウイルスゲノム配列をダイレクトシーケンス法により検討すると GFP 挿入部位が欠失したウイルス株が出現していた。欠失部分は GFP のみでなく HCV ゲノムの NS5a の一部領域を含み欠失が起こっていた。

GFP 挿入ウイルスの長期培養では、細胞内適応変異を持ったウイルスが得られなかったため、

JFH-1 株の長期培養により得られた適応変異を GFP 挿入ウイルスに導入することにより、このウイルスの生成効率と感染性に与える影響を検討した。JFH-1 株を約四週間培養することにより JFH-1 株よりも高い生成効率をもつウイルスが得られた。このウイルス株の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定したところ、E2・NS3・NS5b 領域にそれぞれ変異が同定された。これらの変異を一つずつ JFH-1 株に導入したところ、培養上清中の HCV RNA 量の増加が認められた。さらにすべての変異を導入すると、培養上清中の HCV RNA 量は 1 log 以上増加した。そこでこれらの変異を GFP 挿入 JFH-1 ウイルスに導入し、生成されたウイルスを感染させることにより GFP 陽性の HCV 感染細胞を比較したところ、変異を持ったウイルスではより多くの GFP 陽性細胞を認め、これらの変異の導入により GFP 挿入 JFH-1 ウイルスの生成能と感染能が増強されていると考えられた。

4. HBV 増殖機構の解析と新規治療法の開発

1) 2 カ所の HBV 変異が ADV 治療効果と有意な関連を有していた。コアプロモーター領域に存在する V1753 変異 (V = C/G/A) とコア遺伝子内に存在する C2189 変異を有する症例において、有さない症例に比して累積 HBV DNA 消失率が有意に高値であり、これらの変異を有する症例では ADV 治療効果がより良好であることが明らかとなった。これらの変異 HBV の ADV 感受性を *in vitro* 増殖系を用いて検討した結果、C1753 変異、C2189 変異を有する HBV と wild-type HBV との間には LAM、ADV とも薬剤感受性に差を認めなかった。

2) 培養上清中に出現すると想定される HBVp を抗 HBs 抗体による免疫沈降し RNA 抽出、GFP 遺伝子を標的とした RT-PCR から HBVp 産生されたと考えられた。本 HBVp を用いてヒト肝細胞 cDNA ライブラリーのスクリーニング中にある処理で感染性が向上することが観察された。

5. 肝炎ウイルス培養系および増殖系を用いた抗ウイルス薬のスクリーニング

1) 薬剤ライブラリーによる抗 HCV 薬の探索をおこなった。LOPAC ライブラリーの 1268 の化合物を検討した。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。スクリーニング試験に用いる化合物濃度を $1 \mu\text{M}$ から $10 \mu\text{M}$ に変更して抗 HCV 作用を再度検討している。

多様性指向性合成化合物 (DOS) ライブラリー・スクリーニング: 多様性指向性合成により作成された 8,064 種の化合物のスクリーニングを施行したところ、replicon 増殖を抑制する 41 種の化合物が同定された。構造活性相関 (SAR) 解析によりさらに IC₅₀ の優れた 5 個の epoxide 誘導体を同定した。

天然物誘導体ライブラリーからの探索では一次スクリーニングによって、3,000 化合物より、強い抗ウイルス効果があり細胞傷害性が低い 53 化合物を選択した。ついで、selectivity index が 10 以上の 14 化合物を選択しヒット化合物とした。alpha-グリコシラーゼ阻害剤は、タンパク質の正常な糖鎖修飾を阻害して正常な folding, assembly を阻害する。alpha-グリコシラーゼの活性中心領域に結合する可能性のある化合物を Virtual library より molecular dynamics simulation によって選択し、その抗 HCV 活性を HCVcc アッセイによって評価し、うち 2 個のヒット化合物 (NU01, NU02) を得た (日大生物資源部 袴田航博士との共同研究)。また、昨年度、多様性指向 低分子化合物ライブラリー (8,000 化合物) から得た 5 個のヒット化合物 (A, A0, B, C, D) を得ているが、この中で、A, A0 が相互に近縁の化学構造をもつことを除き、いずれの化合物も既知の HCV 阻害剤と構造的類縁性は認めない。

2) BC ($10 \mu\text{M}$)、VD2 ($5 \mu\text{M}$)、LA ($50 \mu\text{M}$) を単独、あるいは MEK 阻害剤の U0126 ($5, 10 \mu\text{M}$) と併用で OR6 細胞に添加して 72 時間培養しレニンラシフェラーゼ活性を測定した。BC、VD2、LA 単独で

はそれぞれ HCV RNA 複製を約 50%抑制したが U0126 を併用するとこれらの栄養成分の抗 HCV 活性はキャンセルされた。この結果は BC、VD2、LA の抗 HCV 活性には ERK の活性化が必要であることを示している。LA 以外の多価不飽和脂肪酸 (AA、EPA、DHA) でも U0126 の併用がこれらの栄養成分の抗 HCV 活性はキャンセルした。この結果は LA の多価不飽和脂肪酸の抗 HCV 活性にも ERK の活性化が必要であることを示している。

さらに U0126 を併用すると CsA、IFN- γ の抗 HCV 活性はキャンセルされたが、FLV、PTV の抗 HCV 活性は U0126 によりキャンセルされなかった。CsA、IFN- γ の抗 HCV 活性にも ERK の活性化が必要であるが、スタチン剤の抗 HCV 活性には ERK の活性化は必要でないことを示した。

3) 新規抗 HCV 薬候補の抗ウイルス活性

NS3 プロテアーゼ阻害剤 BILN2061 の JFH-1 感染細胞に対する抗ウイルス作用を解析した。今年度は BILN2061 耐性ウイルスを分離した。BILN2061 耐性ウイルスのゲノムをシーケンズ解析すると NS3 プロテアーゼ領域に 2カ所の変異を認めた。この変異をリバースジェネティクス法により導入したウイルスは BILN2061 耐性であることを確認した。また、新規 NS5B ポリメラーゼ阻害剤の複製阻害作用を検討したところ、その抗ウイルス作用は弱く、細胞障害性が認められた。

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。

昨年度に引き続き、今年度の研究では分担研究者により多くの成果が得られた。まず、不死化肝細胞の中空糸による立体培養により、C 型肝炎ウイルスの臨床株のウイルス培養が可能となった。さらに B 型肝炎ウイルスの培養も可能であることが示された。薬剤のスクリーニングにも使用できる可能性がある。C 型肝炎ウイルスの増殖複製機構の解析が進み、関与する宿主因子に関する研究も進んだ。これらの宿主因子は抗ウイルス療法の新たな標的となる。また、HCV RNA と RNA 結合ペプチドが特異的に結合するための塩基配列の要求性が明らかとなり、さらなるスクリーニングにより、多くの HCV RNA 結合ペプチドを得られる可能性が示された。B 型肝炎ウイルスの感染増殖機構の解析も進んだ。シュードタイプウイルスを用いたレセプター探索が進んでおり、来年度の成果が期待できる。抗ウイルス薬のスクリーニングがさらに進んだ。さまざまなライブラリーから、C 型肝炎ウイルスの感染複製増殖を阻害する候補分子が同定された。これらの候補を展開し次のステージにいかに進めていくかが大きな課題である。また、新たな抗ウイルス標的をねらったスクリーニングも進め

ていく必要がある。

E. 結論

本研究により下記に記した成果をあげた。来年度の研究により、さらに研究を進展させていく。

1. ヒト不死化肝細胞の立体培養により患者血液由来の多様な HCV の生活環を再現することが可能になり、各種抗 HCV 薬剤の検証系となることが期待される。立体培養によって著しく HCV の感染増殖が亢進することから、この細胞の遺伝子発現変化を解析して HCV の感染増殖に関わる新たな細胞因子を見だし、これを標的とする抗 HCV 薬剤開発が期待される。
2. 不死化ヒト肝細胞を用いた 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。
3. SPP によるコア蛋白質の切断および PA28 γ とコア蛋白質との相互作用は、ウイルス感染に必要であることが示された。宿主膜内蛋白質分解酵素 SPP およびプロテアソーム活性化蛋白質 PA28 γ は、新規 C 型肝炎治療法開発の標的蛋白質として期待できる。
4. 3' -UTR X-tail の SL2 が #3d001 に結合する上での塩基の要求性が、GNRA-like モチーフと類似していることを見出した。HCV IRES のステム・ループ IIIe および IIIf を標的とした結合ペプチドのセレクションを行った。
5. JFH-1 の感染により La protein の発現誘導が認められ、HCV 自身が翻訳関連因子を誘導していることが明らかとなった。La protein の発現を抑制することによって HCV の複製制御が可能であり、La protein を含む宿主因子をターゲットとした治療法の可能性が示唆された。
6. HCV キメラリポーターレプリコン系を用いて薬剤・化合物の大規模スクリーニングを行い、HCV 発現・増殖を抑制する複数の化合物を同定し、HCV 培養系にて効果を確認した。
7. NS5A 領域に GFP 遺伝子を挿入した JFH-1 ウイルスは、培養細胞中では非常に不安定であった。高力価の GFP 挿入ウイルスを得るためには、効率的に

GFP 挿入ウイルスが生成できる挿入部位と方法を選択するとともに、ウイルスゲノムに増殖感染を増強するような変異の導入が必要であると考えられた。

8. B 型肝炎ウイルスの V1753 変異と C2189 変異は、LAM 耐性 B 型慢性肝炎に対する ADV 追加治療における抗ウイルス効果に影響を与える HBV 変異であることが示唆された。

9. HBV シュードタイプウイルスを用いて感染性を指標に HBV レセプターの分離・同定を促進させ得る。

10. 感染性 HCV クローンを用いた新規阻害剤探索系は、これまでレプリコン・アッセイではできなかった新しいカテゴリーの阻害剤を探索するツールとして有効と考えられる。化合物ライブラリーからの HCVcc assay を用いたランダムスクリーニングの結果、数種の HCV 阻害剤候補が同定された。エントリー阻害剤候補、粒子形成阻害剤が含まれる。

11. BC(β -カロテン)、VD2(ビタミン D2)、LA(リノール酸)を含む多くの抗 HCV 剤において酸化ストレスによる MEK-ERK1/2 のリン酸化が抗 HCV 活性に重要であることが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kondo Y, Machida K, Liu HM, Ueno Y, Kobayashi K, Wakita T, Shimosegawa T, Lai MM. Hepatitis C Virus Infection of T Cells Inhibits Proliferation and Enhances Fas-Mediated Apoptosis by Down-Regulating the Expression of CD44 Splicing Variant 6. *J Infect Dis.* 2009 199(5):726-736.
2. Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic Trioxide Inhibits Hepatitis C Virus RNA Replication through Modulation of the Glutathione Redox System and Oxidative Stress. *J Virol.* 2009 83(5):2338-2348.

3. Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, Wakita T, Miyamura T, Matsuura Y, Suzuki T. Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28(γ)-Dependent Mechanism. *J Virol*. 2009 83(5):2389-2392.
4. Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M. Cellular vimentin content regulates the protein level of hepatitis C virus core protein and the hepatitis C virus production in cultured cells. *Virology*. 2009 383(2):319-27.
5. Wakita T. Isolation of JFH-1 strain and development of an HCV infection system. *Methods Mol Biol*. 2009;510:305-27.
6. Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 377(3):747-51.
7. Lan L, Gorke S, Rau SJ, Zeisel MB, Hildt E, Himmelsbach K, Carvajal-Yepes M, Huber R, Wakita T, Schmitt-Graeff A, Royer C, Blum HE, Fischer R, Baumert TF. Hepatitis C virus infection sensitizes human hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis in a caspase 9-dependent manner. *J Immunol*. 2008 181(7):4926-35.
8. Kimura T, Imamura M, Hiraga N, Hatakeyama T, Miki D, Noguchi C, Mori N, Tsuge M, Takahashi S, Fujimoto Y, Iwao E, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Arataki K, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Okamoto T, Matsuura Y, Chayama K. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*. 2008 89(9):2108-13.
9. Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology*. 2008 48(3):732-40.
10. Sir D, Chen WL, Choi J, Wakita T, Yen TS, Ou JH. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology*. 2008 48(4):1054-61.
11. Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors ataxia-telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 2008 82(19):9639-46.
12. Murakami K, Kimura T, Osaki M, Ishii K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T, Shoji I. Virological characterization of the hepatitis C virus JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J Gen Virol*. 2008 89(7):1587-92.
13. Ebihara T, Shingai M, Matsumoto M, Wakita T, Seya T. Hepatitis C virus-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology*. 2008 48(1):48-58.
14. Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol*. 2008 82(16):7964-76.
15. Mateu G, Donis RO, Wakita T, Bukh J, Grakoui A. Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death. *Virology*. 2008 376(2):397-407.

16. Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Zhang B, Li J, Shirakura M, Morikawa K, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 371(3):446-50.
17. Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, van Poll D, Wakita T, Chung RT, Yarmush ML. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology.* 2008 47(5):1437-45.
18. Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2008 82(12):5715-24.
19. HH Aly, K Shimotohno, M Hijikata: 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *BBRC*, 379: 330-334, 2009
20. 土方 誠:HCVと肝発癌 医学のあゆみ 224 (9), 693-698 2008
21. 宮成 悠介, 白田 信光, 土方 誠, 下遠野邦忠: C型肝炎ウイルスの生活環と発がん 化学と生物 46 (12) 826-831 2008
22. 土方 誠, アリ・ハッサン・フセイン, 下遠野邦忠: 3D細胞培養系を用いた患者血液由来HCV培養、肝・胆・膵 57 (5), 679-687 2008
23. Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Maruyama I, Shimada T, Takahashi S, Shirai T, Hino K, Sakaida I, Mizokami M. Direct Cytopathic Effects of Particular Hepatitis B Virus Genotypes in uPA/SCID Mouse with Human Hepatocytes. *Gastroenterology.* 2009. 136(2):652-662.
24. Kurbanov F, Tanaka Y, Kramvis A, Simmonds P, Mizokami M. When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol.* 2008. 82(16):8241-8242.
25. Tanaka Y, Sanchez LV, Sugiyama M, Sakamoto T, Kurbanov F, Tatematsu K, Roman S, Takahashi S, Shirai T, Panduro A, Mizokami M. Characteristics of hepatitis B virus genotype G coinfecting with genotype H in Chimeric Mice Carrying Human Hepatocytes. *Virology.* 2008. 376(2):408-415.
26. Mori, Y., K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2008. Hepatitis C virus core protein: its coordinate roles with PA28gamma in metabolic abnormality and carcinogenicity in the liver. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:1437-1442.
27. Okamoto, K., Y. Mori, Y. Komoda, T. Okamoto, M. Okochi, M. Takeda, T. Suzuki, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2008. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 82:8349-8361.
28. Okamoto, T., H. Omori, Y. Kaname, T. Abe, Y. Nishimura, T. Suzuki, T. Miyamura, T. Yoshimori, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2008. A single-amino-acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol.* 82:3480-3489.
29. Tagawa, S., T. Okamoto, T. Abe, Y. Mori, T. Suzuki, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2008. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.* 82:2631-2641.
30. M. Sugaya, R. Saito, Y. Matsumura, K. Harada and A. Katoh "A facile method for the detection of specific RNA-polypeptide interactions using MULDI-ToF MS spectrometry" *J. Peptide Science*, 14: 978-983 (2008).
31. M. Sugaya, N. Nishino, A. Katoh and K. Harada "Amino acid requirement for the high affinity binding of a selected arginine-rich

- peptide with the HIV Rev-response element RNA" *J. Peptide Science*, **14**: 924-935 (2008).
32. M. Sugaya, F. Nishimura, A. Katoh and K. Harada "Tailoring the peptide-binding specificity of an RNA by combinations of specificity-altering mutations" *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, **27**: 534-545 (2008).
33. K. Harada, M. Sugaya, F. Nishimura, A. Katoh "Manipulation of the peptide-binding specificity of an RNA in a rational manner by combinations of specificity-altering mutations" *Nucleic Acids Symposium Series*, **52**, 13-14 (2008)
34. S. Horiya, C. - S. Koh, S. Matsufuji, and K. Harada "Analysis of the interaction between selected RNA-binding peptides and a target RNA containing a bulge and a GNRA-type tetraloop" *Nucleic Acids Symposium Series*, **52**, 209-210 (2008)
35. S. Machida, K. Usuba, M. A. Blaskovich, A. Yano, K. Harada, S. M. Sebti, N. Kato, and J. Ohkanda "Module Assembly for Protein Surface Recognition: Bivalent Type-I Geranylgeranyltransferase Inhibitors for Simultaneous Targeting of Interior and Exterior Protein Surfaces" *Chemistry*, **14**, 1392-1401 (2008).
36. Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008 Nov 19.
37. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*. 2009 136(3):1012-24.
38. Sakai Y, Honda M, Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S. Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res*. 2008 68(24):10267-79.
39. Minagawa H, Yamashita T, Honda M, Tabuse Y, Kamiyo K, Tsugita A, Kaneko S. Comparative analysis of proteome and transcriptome in human hepatocellular carcinoma using 2D-DIGE and SAGE. *Protein J*. 2008 Dec;27(7-8):409-19.
40. Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T, Kaneko S. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2009 50(1):100-10.
41. Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Application of Serial Analysis of Gene Expression in cancer research. *Curr Pharm Biotechnol*. 2008 9(5):375-82. Review.
42. Mizukoshi E, Honda M, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S. Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2008 49(6):946-54.
43. Nishino R, Honda M, Yamashita T, Takatori H, Minato H, Zen Y, Sasaki M, Takamura H, Horimoto K, Ohta T, Nakanuma Y, Kaneko S. Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol*. 2008 49(2):207-16.
44. Minagawa H, Honda M, Miyazaki K, Tabuse Y, Teramoto R, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Ueda T, Kamiyo K, Kaneko S. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the

- human hepatocellular carcinoma. *BBRC*. 2008 366(1):186-92.
45. Takamura T, Misu H, Matsuzawa-Nagata N, Sakurai M, Ota T, Shimizu A, Kurita S, Takeshita Y, Ando H, Honda M, Kaneko S. Obesity Upregulates Genes Involved in Oxidative Phosphorylation in Livers of Diabetic Patients. *Obesity* (Silver Spring). 2008 Oct 9.
46. AW. Tai, Y Benita, LF. Peng, S-S Kim, N Sakamoto, RJ. Xavier, RT. Chung: A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host & Microbe*, in press.
47. Onizawa, Kanai T, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Nagaishi T, Sakamoto N, Watanabe M: Signaling pathway via $TNF\alpha/NF\kappa B$ in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* in press.
48. S Toma, T Yamashiro, S Arakaki, J Shiroma, T Maeshiro, K Hibiya, N Sakamoto, F Kinjo, M Tateyama, J Fujita: Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by nelfinavir and interferon- α . *J Viral Hepatitis*, in press.
49. Fujii T, Kanai T, Tomita T, Nemoto Y, Totsuka T, Sakamoto N, Nakamura T, Tsuchiya K, Okamoto R, Watanabe M: FTY720 suppresses the development of colitis in lymphoid-null mice by modulating the trafficking of colitogenic CD4+ T cells in bone marrow. *Eur J Immunol*, 38(12):3290-3303.
50. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Suda G, Mishima K, Onuki Y, Yamamoto M, Maekawa S, Enomoto N, Kanai T, Tsuchiya K, Watanabe M: Two flavonoids extracts from a herb, *Glycyrrhizae radix*, inhibit in-vitro hepatitis C virus replication. *Hepatology Res* 2009; 39(1):60-69.
51. Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M: Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastro Hepatol* 2008; 23 (9) :1437-1447.
52. Nanmoku K, Imaizumi R, Tojimbara T, Nakajima I, Fuchinoue S, Sakamoto N, Watanabe M, Teraoka S: Effects of immunosuppressants on the progression of hepatitis C in hepatitis C virus-positive renal transplantation and the usefulness of interferon therapy. *Transplant Proc* 2008; 40 (7):2382-2385.
53. Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N, Ito M: Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses HCV replication in vitro. *Hepatology Res* 2008; 38(9):909-918.
54. Tomita T, Kanai T, Fujii T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Sakamoto N, Watanabe M: Continuous generation of colitogenic CD4+ T cells may be one of the mechanisms to persist colitis. *Eur J Immunol* 2008; 38(5):1264-1274.
55. Tomita T, Kanai T, Fujii T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Sakamoto N, Akira S, Watanabe M: MyD88-dependent Pathway in T Cells Directly Modulates the Expansion of Colitogenic CD4+ T Cells in Chronic Colitis. *J Immunol* 2008; 180(8):5291-5299.
56. Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S: Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response.

Gastroenterology 2008; 134(5):1396-1405.

57. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Tsuchiya K, Sakamoto N, Okamoto R, Watanabe M: Immunosenescent colitogenic CD4+ T cells convert to regulatory cells and suppress colitis. *Eur J Immunol* 2008; 38(5):1275-1286.
58. Aragaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Yoshioka S, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M: Proteasomal degradation of Atohl by aberrant Wnt signaling maintains the undifferentiated state of colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368(4):923-929.
59. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Sakamoto N, Enomoto N: Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C. *J Infect Dis* 2008; 197(3):361-370.
60. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Kanai T, Tsuchiya K, Wakita T, Enomoto N and Watanabe M: Development of plaque assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology* 2008:371:71-85.
61. 坂本直哉: HCV 増殖・培養系を用いた抗ウイルス化合物の同定. 医学のあゆみ 2009 in press.
62. 坂本直哉, 横田隆徳: siRNA による C 型肝炎遺伝子治療. バイオ医薬品の開発技術とシーズ 2009 in press.
63. 坂本直哉: 抗ウイルス薬臨床試験の現況 overview. 肝胆膵 2008 in press.
64. 村松正明, 坂本直哉, 斉藤貴史, 河田純男: C 型肝炎の経過に影響を与える SNP 探索と創薬. 肝胆膵 2008 in press.
65. 箆島裕子, 坂本直哉, 渡辺守: 細胞障害性 HCV: 肝胆膵 2008 in press.
66. 田坂めぐみ, 坂本直哉: HCV による自然免疫系の抑制. 肝胆膵 2008.
67. 坂本直哉: テラプレビル、すべてを解決する夢の新薬か. *Medical Practice* 2008; 25(19):1829-1832.
68. 井津井康浩, 坂本直哉, 渡辺守: C 型肝炎ウイルスと肝細胞アポトーシスはどのようにかわるのか? *分子消化器病* 2008; 5(2):163-169.
69. Kondo M, Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Takebe Y, Imai M, Kato S. Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. *J Virol Methods*. 2009 Jan 3. [Epub ahead of print]
70. Tee KK, Takebe Y, Kamarulzaman A. Emerging and re-emerging viruses in Malaysia, 1997-2007. *Int J Infect Dis*. 2008 Nov 13. [Epub ahead of print]
71. Xia, X., Lu, L., Tee, K. K., Zhao, W., Wu, J., Yu, J., Li, X., Lin, Y., Mukhtar, MM., Hagedorn, CH., Takebe, Y. (2008). The unique HCV genotype distribution and the discovery of a novel subtype 6u among IDUs co-infected with HIV-1 in Yunnan, China. *J. Med Virol.* 80 (7): 1142-52.
72. Tee, K. K., Pybus, OG., X-J, Li., Han, X., Shang, H., Kamarulzaman, A., Takebe, Y. (2008). Temporal and spatial dynamics of human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms 08_BC and 07_BC in Asia. *J. Virol* 82: 9206-9215.
73. Shimizu, N., Tanaka, A., Mori, T., Ohtsuki, T., Hoque, A., Jinno-Oue, A., Apichartpiyakul, C., Kusagawa, S., Takebe, Y., Hoshino, H. (2008). A formylpeptide receptor, FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus. *Retrovirology* 5: 52
74. Xia X, Lu L, Tee KK, Zhao W, Wu J, Yu J, Li X, Lin Y, Mukhtar MM, Hagedorn CH, Takebe Y. (2008). The unique HCV genotype distribution and the discovery of a novel subtype 6u among IDUs co-infected with HIV-1 in Yunnan, China.

J Med Virol. 2008 Jul;80(7):1142-52.

75. Liu P, Xiang K, Tang H, Zhang W, Wang X, Tong X, Takebe Y, Yang R. (2008). Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus in former blood donors in central China. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 Jan;24(1):1-6.
76. Louisirirothanakul S, Sutthent R, Wasi C, Chuenchitra T, Nitayaphan S, Brown AE, Polonis VR, Nakayama EE, Shioda T, Liu H, Takebe Y. (2008). Host genetic analysis of HIV type 1 subtype CRF01_AE (E)-infected Thai patients with different rates of disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 Dec;23(12):1605-8.
77. Tee, K. K., Pybus, OG., Liao, H., Uenishi, R., Hase, S., Kamarulzaman, A., Li, X-J., and Takebe, Y. (2008). Chronology of the HIV-1 CRF07_BC expansion in East-Asia. *AIDS* 22: 156-158, 2008.
78. Takebe, Y, Uenishi, R., and Li, X-J. (2008). Global molecular epidemiology of HIV: Understanding the genesis of AIDS pandemic. "HIV-1: Molecular biology and pathogenesis" (ed. Kuan Teh Jeang). *Advances in Pharmacology* vol. 56: 1-25, 2008.
79. 武部 豊 (2009). エイズワクチンの開発動向: アデノウイルスワクチン国際臨床試験頓挫の波紋とその意味 (特集: 各医療機関における国際共同試験の取り組み) *PHARM STAGE* Vol. 8, No. 10: 1-6, 2009
80. 武部 豊, 上西理恵 (2008). HCV エントリー・粒子形成阻害剤: 新規クラス薬剤スクリーニング. C型肝炎のすべて・2009 新規治療法. *肝胆膵* 57(5): 1047-1056, 2008.
81. 武部 豊. 「エイズワクチン開発の最新動向」 Challenges to AIDS vaccine development *細胞*, Sept. 2008.
82. 武部 豊, 長谷彩希, 廖 華南, 上西理恵. (2008). アジアにおけるエイズ危機と日本: 危険水域に入った我が国. *感染・炎症・免疫* 2008 Vol. 38 (3): 182-193, 2008.
83. 廖 華南、長谷彩希、上西理恵、武部 豊 (2008), エイズに対する新規治療薬の開発動向. *Pharmastage ファームステージ* 2008年8月号
84. 武部 豊, 山本直樹. 「エイズワクチン (メルク・アデノウイルスワクチン)・トライアルの失敗の意味すること」. 病原微生物検出情報 *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* [<http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html>] June, 2008.
85. 上西理恵, 長谷彩希, Liao Huanan, 武部豊. (2008). C型肝炎ウイルスに対する新規治療薬の開発動向. *PHARM STAGE* Vol. 8, No. 3: 1-5, 2008.
86. G. Nishimura, M Ikeda, K. Mori, T. Nakazawa, Y. Ariumi, H. Dansako and N. Kato. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. *Antiviral Res*. In press (2009).
87. N. Kato, K. Abe, K. Mori, Y. Ariumi, H. Dansako, T. Wakita, and M. Ikeda. Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture. *Arch Virol*. 154, 77-85 (2009).
88. M. Kuroki, Y. Ariumi, M. Ikeda, H. Dansako, T. Wakita, and N. Kato. Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of the glutathione redox system and oxidative stress. *J. Virol*. 83, 2338-2348 (2009).
89. Y. Ariumi, M. Kuroki, H. Dansako, K. Abe, M. Ikeda, T. Wakita, and N. Kato: ATM, a DNA damage sensor, is required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol*. 82, 9639-9646 (2008).
90. H. Dansako, M. Ikeda, K. Abe, K. Mori, K. Takemoto, Y. Ariumi, and N. Kato: A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA

replication. *Virus Res.* 137, 72-79(2008)

91. K. Mori, K. Abe, H. Dansako, Y. Ariumi, M. Ikeda, and N. Kato. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun.* 371, 104-109(2008).

92. K. Hirano, T. Ichikawa, K. Nakao, A. Matsumoto, H. Miyaaki, H. Shibata, S. Eguchi, M. Takatsuki, M. Ikeda, H. Yamasaki, N. Kato, T. Kanematsu, N. Ishii, K. Eguchi. Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporin A, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells. *Liver. Transpl.*, 14:292-8 (2008).

93. M. Nakamura, H. Saito, M. Ikeda, S. Tada, N. Kumagai, N. Kato, K. Shimotohno, T. Hibi. Possible molecular mechanism of the relationship between NS5B polymorphisms and early clearance of hepatitis C virus during interferon plus ribavirin treatment. *J. Med. Virol.*, 80:632-639 (2008).

94. M. Ando, M. Korenaga, K. Hino, M. Ikeda, N. Kato, S. Nishida, I. Hidaka, I. Sakaida. Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication *Liver Int.* 28:1158-66 (2008)

95. Kurashige N, Hiramatsu N, Ohkawa K, Oze T, Inoue Y, Kurokawa M, Yakushijin T, Igura T, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Tamura S, Kasahara A, Oshita M, Hijioka T, Katayama K, Yoshihara H, Hayashi E, Imai Y, Kato M, Hayashi N. Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine. *Hepatology Res* 38: 450-456, 2008.

96. Kanada A, Takehara T, Ohkawa K, Kato M, Tatsumi T, Miyagi T, Sakamori R, Yamaguchi S, Uemura A, Kohga K, Sasakawa A, Hikita H, Kawamura K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N.

Early emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus in a patient with hepatitis B virus/human immunodeficiency virus coinfection. *Hepatology Res* 38: 622-628, 2008.

97. Ohkawa K, Takehara T, Kato M, Deguchi M, Kagita M, Hikita H, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Yamaguchi S, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Hayashi N. Supportive role of precore and preS2 genomic changes on establishment of lamivudine-resistance hepatitis B virus. *J Infect Dis* 198: 1150-1158, 2008.

98. Ohkawa K, Takehara T, Kato M, Kanada A, Deguchi M, Kagita M, Hikita H, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Yamaguchi S, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Hayashi N. Mutations associated with the therapeutic efficacy of adefovir dipivoxil added to lamivudine in patients resistant to lamivudine with type B chronic hepatitis. *J Med Virol* (in press)

2. 学会発表および講演など

1) 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルス研究の進展: ウイルス増殖からワクチン開発へ」、第134回日本医学会シンポジウム「感染症をめぐる最近の話題」、日本医師会館、(2008, 7. 17)

2) 森川賢一、脇田隆字、培養細胞で作製した感染性C型肝炎ウイルス粒子の免疫原性の解析およびワクチン応用への可能性、第44回日本肝臓学会総会、愛媛県民文化会館、(2008, 6. 5-6)、ワークショップ7「肝炎ウイルスの感染・複製・排除のメカニズム」

3) 加藤孝宣、三代俊治、脇田隆字、HCV JFH-1株のチンパンジーへの感染実験: in vivo 適応変異の機能的解析、第44回日本肝臓学会総会、愛媛県民文化会館、(2008, 6. 5-6)、ワークショップ7「肝炎ウイルスの感染・複製・排除のメカニズム」

4) 脇田隆字、C型肝炎ウイルス研究の最先端、第12回日本肝臓学会大会、グランドプリンスホテ

ル新高輪、(2008, 10. 1)、シンポジウム1「肝炎ウイルス研究のカッティングエッジ：基礎から臨床への贈り物」

5) 脇田隆宇、ウイルス培養系を用いたC型肝炎ウイルス研究、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10. 26-28)、シンポジウム4 C型肝炎

7) 原弘道、相崎英樹、松田麻美、村上恭子、勝二郁夫、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、creatine kinase BはC型肝炎ウイルスNS4Aとの相互作用によりウイルスゲノム複製複合体へ運ばれエネルギー供給に働く、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10. 26-28)、ワークショップ2 ウイルス複製機構

8) 政木隆博、鈴木亮介、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、村山麻子、伊達朋子、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV粒子形成におけるNS5A蛋白の役割、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10. 26-28)、ワークショップ6 ウイルス侵入・粒子機構

9) 山下篤哉、松本武久、高谷大輔、上條加寿恵、前川伸哉、雨宮史武、坂本直哉、脇田隆宇、梅山秀明、横山茂之、榎本信幸、伊藤正彦、In silico screeningによるHCV NS3プロテアーゼ阻害化合物の検索、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10. 26-28)、ワークショップ8 ウイルス感染症の診断と治療

10) 脇田隆宇、C型肝炎ウイルスのウイルス培養とワクチン開発、第67回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場(2008, 10. 28-30)、シンポジウム4 ウイルス発癌

11) 有海康雄、黒木美沙緒、團迫浩方、阿部健一、池田正徳、脇田隆宇、加藤宜之、ATM DNA損傷センサーはC型肝炎ウイルスのRNA複製に必要である、第67回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場(2008, 10. 28-30)、ワークショップ3-4 HCV

12) 政木隆博、鈴木亮介、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCVの粒子形成におけるNS5A蛋白の役割、第44回日本

肝臓学会総会、愛媛県県民文化会館、(2008, 6. 5-6)

13) 平賀伸彦、今村道雄、木村俊之、畠山剛、光井富喜子、三木大樹、森奈美、柘植雅貴、高橋祥一、脇田隆宇、茶山一彰、HBVとHCVはインターフェロン感受性が異なる-ウイルス複製培養細胞および動物モデルを用いた検討-、第44回日本肝臓学会総会、愛媛県県民文化会館、(2008, 6. 5-6)

14) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの細胞内粒子形成過程の解析」「感染現象のマトリックス」横系の会、東京大学医科学研究所(2008, 5. 29-30)

15) 相崎英樹、脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの生活環における脂質の役割に関する研究」「感染現象のマトリックス」横系の会、兵庫医科大学(2008, 6. 28-29)

16) 加藤宜之、森京子、阿部健一、團迫浩方、有海康雄、脇田隆宇、池田正徳、新しいヒト肝癌細胞株Li23を用いたHCV生活環再現システム、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10. 26-28)

17) 下池貴志、SA McKenna、DA Lindhout、脇田隆宇、JD. Puglisi、HCV IRES依存的翻訳はeIF2のリン酸化耐性である、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10. 26-28)

18) 有海康雄、黒木美沙緒、團迫浩方、阿部健一、池田正徳、脇田隆宇、加藤宜之、DNA損傷センサーATMおよびChk2とHCV NS5Bとの相互作用、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10. 26-28)

19) 石井孝司、村上恭子、ススムエー、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、C型肝炎ウイルスのsubgenomic repliconを持つウイルス用粒子の形成と感染性、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10. 26-28)

20) 棟方翼、脇田隆宇、野本明男、TLR3はC型肝炎ウイルス感染を抑制する、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10. 26-28)