

ものである。肝臓や血液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. 我々がこれまでに独自に樹立した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を用いて、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をおこなったところ、通常の培養皿を用いた場合に比較して細胞内の HCV-RNA 量が 100 倍程度増加することがわかった。
2. 種々の患者血清を用いて HCV の感染実験をおこなうと感染 10 日目まで徐々に細胞内 HCV-RNA が上昇するものや 7 日目までは増加するが 10 日目には低下するものなど種々の増殖パターンが観察された。
3. いくつかの血清の場合、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の二次感染性を示した培養上清を濃縮し浮遊密度勾配遠心法で分画すると HCV RNA、コアタンパク質、感染性のすべてが浮遊密度 1.12 画分に存在することが確認された。またこの画分を濃縮し、ネガティブ染色による電子顕微鏡観察をおこなうと約 7nm 長のスパイク様構造を有する直径約 40nm のウイルス様粒子が観察された。
4. マイクロアレイ法を用いて、不死化肝細胞を中空糸立体培養した場合、通常の培養皿により培養した場合に比較してどのような遺伝子発現が変化しているかを解析したところ、脂肪酸結合タンパク質群やアシル CoA オキシダーゼなど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。
5. PPARalpha に対するアゴニストであるフェノフィブ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して HCV 感染実験をおこなったところ、HCV の増殖をそれぞれ亢進そして抑制することがわかった。

### D. 考察

1. 中空糸を用いてヒト不死化肝細胞を立体培養する新

たな培養細胞系を用いた感染実験によって、種々の遺伝子型や株を含む多様な HCV の感染増殖とそれともなう種々の細胞側応答を観察することが可能になった。

2. この実験系では感染性粒子の産生も認められ、患者血液由来の HCV の生活環を再現することが可能であることが考えられた。
3. 立体培養によって活性上昇が認められた PPARalpha シグナルは HCV の遺伝子複製に重要なシグナルであることが考えられた。しかしながら、PPARalpha の活性化及び不活性化による影響は限定的であるため、立体培養による HCV 複製の上昇には別の要因も関連していることが考えられた。

### E. 結論

1. 独自に樹立したヒト不死化肝細胞を立体培養する新たな培養細胞系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。
2. この細胞の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、この細胞の変化を解析することにより 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。

### F. 研究発表

#### 1. 論文

- 1) Hussein H Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379: 330-334, 2009
- 2) 土方 誠: HCV と肝発癌 *医学のあゆみ* 224 (9), 693-698 2008
- 3) 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
- 4) 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

## 2. 学会発表

1) アリ フセイン, 齊月, 山口達哉, 下遠野邦 忠, 土方誠

不死化肝細胞の中空糸培養によって再現した患者血清由来天然HCVの感染増殖」(第56回日本ウイルス学会学術集会 2008. 10. 26岡山コンベンションセンター)

2) Hussein H Aly, Yue Qi, Kunitada Shimotohno, Makoto Hi jikata: A prolonged culture system for the study of the entire life cycle and the pathogenesis of natural HCV infection (第67回日本癌学会学術総会 2008. 10. 29名古屋国際会議場)

3) Hussein H Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hi jikata: Serum derived HCV infection, replication and particle production in immortalized primary human hepatocytes (XIVth International Congress of Virology 2008. 8. 12 Istanbul)

4) Hussein H Aly, Tatsuya Yamaguchi, Yue Qi, Kunitada Shimotohno, Makoto Hi jikata: Development of the novel in vitro system supporting the entire life cycle of natural HCV (15th International Symposium Hepatitis C Virus & Related Viruses 2008. 10. 7 San Antonio,)

3. その他 特になし。

## G. 知的所有権取得状況

### 1. 特許取得

1) 感染性C型肝炎ウイルス粒子の製造方法、およびその利用」

発明者/出願者: 山口達哉、土方誠、アリ ハッサン フセイン

2008年6月26日出願 出願番号 特願2008-167942

2) 「C型肝炎ウイルスの感染増殖性の評価方法、およびその利用」

発明者/出願者: 山口達哉、土方誠、アリ ハッサン フセイン

2008年6月26日出願 出願番号 特願2008-167943

2. 実用新案登録 特になし。

## 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～

分担研究者 名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学 田中靖人

研究要旨 中空系に不死化ヒト肝細胞を充填することにより、3次元培養系を作成した。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、感染初期から経時的に培養上清中のHBV-DNAの増加を確認した。更に長期培養を行ったところ、約1ヶ月間に渡って培養上清中のHBV-DNA量は $10^5$  copies/mL以上で検出された。細胞内cccDNAを検出し、更にSouthern blot analysisで細胞内HBV-DNAの発現を認めたことで、この系におけるHBV感染・複製を確認した。HBIGあるいは抗PreS2抗体を用いた感染防御実験の可能性についても検討した。不死化ヒト肝細胞を用いた3次元培養系は1ヶ月程度の長期培養が可能であった。更に感染防御実験、各種変異体の感染効率の違いやHBV感染・複製様式の解析などに対する可能性が示唆された。以上よりこの3次元培養系は安価・簡便で非常に有用なHBV感染モデルと思われた。

共同研究者氏名

溝上雅史、杉山真也、日下部篤宣

### A. 研究目的

前年度に中空系に不死化ヒト肝細胞を充填した3次元培養系におけるB型肝炎ウイルス(HBV)の感染・複製の可能性について報告した。今回、この不死化ヒト肝細胞を用いた3次元培養系におけるHBV感染・複製についての更なる検討とHBV感染防御実験の可能性について検討した。

### B. 研究方法

- 1) 中空系に不死化ヒト肝細胞を充填した3次元培養系を作成した。
- 2) 3次元培養系に対する感染源としては、1.24倍長HBVゲノム(HBV/Ce wild)を組み込んだプラスミドをHuh7細胞にtransfectionさせることによって得られたウイルス粒子を含む培養上清を用いた。
- 3) 3次元培養系にこのウイルス粒子(HBV/Ce wild

type)を含む培養上清を投与することで感染を成立させ、その後3次元培養上清中のHBV-DNA、HBs抗原、細胞内cccDNA(複製中間体)を測定し、HBV感染・複製を確認した。

4) HBV感染防御実験に関しては、2)で得られたウイルス粒子を含む培養上清と各濃度に調整した抗体(抗HBs人免疫グロブリン(HBIG)あるいは抗PreS2抗体)を37°C 2時間接触させたのちに、3次元培養系に感染させ、その後、3日毎に培養上清中のHBV-DNA量をReal time PCR法で測定した。なお3次元培養中、3日毎にmedium changeを行ったが、medium changeと同時に各種抗体も再度投与した。

### C. 研究結果

1) 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。

2) 3次元培養系において細胞内cccDNAを検出し、更にSouthern blot analysisでもHBV-DNAの発現を確認したことで、感染・複製を確認した。3) 3次元培養系に対してtransfectionによって得られたウイルス粒子を含む培養上清(HBV/Ce wild type (約1000copies/mL))と各濃度のHBIGを投与したところ、HBIG 30mIU/mL(抗体量約27.5µg/mL)以上の投与で培養上清中にHBV-DNAが検出されなくなった。一方、コントロールとして投与したIgG 27.5µg/mL投与群では培養上清中にHBV-DNAを検出した。抗PreS2抗体においても同様に20~40µg/mLを投与した結果、培養上清中にHBV-DNAが検出されなくなった。

#### D. 考察

不死化ヒト肝細胞を用いた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、この系を用いた感染防御実験(特にワクチンエスケープミュータントに関して)、標的分子薬剤の探索研究や新規治療法の開発研究の可能性を検討していきたい。

#### E. 結語

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。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

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.

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.

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.

##### 学会発表

Kusakabe A, Tanaka Y, Yamaguchi T, Segawa M, Kurbanov F, Sugiyama M, Hijikata M, Shimotohno K, Mizokami M.

A novel three-dimensional culture system of immortalized hepatocytes; Assessment on HBV vaccine escape mutant strain infectivity and on ability of anti-PreS2 to prevent the infection. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. March 2009. Washington DC.

Kusakabe A, Tanaka Y, Yamaguchi T, Segawa M, Kurbanov F, Sugiyama M, Hijikata M, Shimotohno K, Mizokami M. A novel three-dimensional culture system of immortalized hepatocytes; Assessment on HBV vaccine escape mutant strain infectivity and on ability of anti-PreS2 to prevent the infection.

59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 2008. San Francisco.

日下部篤宣、田中靖人、杉山真也ら

新規3次元培養系を用いたHBV感染防御実験の試み。第12回日本肝臓学会大会。2008.10月。東京

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

肝炎ウイルスの増殖方法、及び肝炎ウイルス感染増殖細胞を培養するための中空糸並びにその利用。

山口達哉、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人、土方誠、  
下遠野邦忠。

2006年10月4日、特願2006-260088。

東洋紡績株式会社、京都大学。

(国際出願番号 PCT/JP2007/068611)

## 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

分担研究者 森石恆司 大阪大学微生物病研究所 准教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)のキャプシド蛋白質であるコア蛋白質は、シグナルペプチダーゼによってE1から切り離され、その直後の膜貫通領域が更にシグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)によって切断され、キャプシド蛋白質として機能する。また、成熟したコア蛋白質は、宿主蛋白質PA28 $\gamma$ と相互作用し、肝臓、脂肪化、インスリン抵抗性を誘導する。本研究では、SPPおよびPA28 $\gamma$ によるHCV感染への影響を解析した。SPP耐性となる変異をコア蛋白質遺伝子に導入し、ウイルス感染価を定量したところ感染ウイルス価は著しく低下した。また、感染前あるいは後24時間に、PA28 $\gamma$ 遺伝子発現をRNA干渉によって抑制したところ、培養上清中のウイルス感染価は有為に低下した。以上の結果からSPPによるコア蛋白質の切断およびPA28 $\gamma$ とコア蛋白質の相互作用はウイルス粒子産生に重要であることが示唆された。

### A. 研究目的

国内に約200万人もの感染者が推定されているC型肝炎ウイルス(HCV)感染症は主に血液を介して感染し、高率に持続感染に移行する。感染者の病態は、慢性肝炎・肝硬変を経て肝細胞癌に至ることが知られており、本邦の約8割の肝臓はHCV感染に起因するものと考えられている。現行のインターフェロン/リバビリンによる抗ウイルス療法は、先進国に多いウイルス遺伝子型1のHCV感染者に対しては約50%程度の著効率であり、より有効な治療法の開発が求められている。

HCVはフラビウイルス科に属するプラス鎖RNAゲノムを持つウイルスである。そのプラス鎖RNAゲノムは単一のポリプロテイン前駆体をコードしており、そのポリプロテインは宿主およびウイルスプロテアーゼによって切断を受け、約10個のウイルス蛋白質

に成熟する。キャプシド蛋白質であるHCVコア蛋白質はポリプロテインのアミノ末端に位置し、始めにシグナルペプチダーゼによる切断を受け、その直後のC末端膜貫通領域がSPPによって更に切断を受けて成熟する。また、宿主蛋白質PA28 $\gamma$ 存在下で、コア蛋白質は肝脂肪化、肝臓などの病原性発現を誘導し、PA28 $\gamma$ 遺伝子を欠損させるとその病原性は失われることを我々は報告しており、PA28 $\gamma$ がC型肝炎の病態に関わっていることを明らかにしてきた。しかしながら、SPPによる膜内切断やPA28 $\gamma$ とコア蛋白質との相互作用の感染粒子産生における意義は明確になっていない。

本研究ではSPPによるコア蛋白質切断およびPA28 $\gamma$ とコア蛋白質の相互作用の感染粒子産生における意義を明らかにする目的で、SPP耐性ウイルスを作製し、その感染量を測定すると共に、PA28 $\gamma$ ノック

ダウンによるウイルス産生の変化を解析し、感染における SPP と PA28 $\gamma$  の役割を評価した。

## B. 研究方法

HCV コア蛋白質の野性型および 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 を培養上清中に加えて、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 が転写されるプラスミド pHH21/JFH1 およびコア蛋白質 AL 変異をもつ pHH21JFH1 (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 real-time RT-PCR および ELISA でそれぞれ測定した。

感染 24 時間前あるいは感染 24 時間後に、RNA 干渉によって PA28 $\gamma$  発現を抑制し JFH1 ウイルス感染 Huh7 OK1 細胞の細胞内外のウイルス RNA 量、コア蛋白質量、上清中の感染ウイルス粒子量を測定した。CFSE 染色および血球計算板により細胞数を測定した。

### (倫理面への配慮)

本研究にあたっては、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を必要とする材料は含まれない。

## C. 研究結果

平成 19 年度に成熟コア蛋白質の C 末端は 177 番目の Phe であることを明らかにした。この結果から、SPP によって切断される近傍の残基 Ile176 と Phe177 を変異させたコア蛋白質 (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。しかしながら、コア蛋白質 AL のほとんどが未成熟状態になり、DRM に分画されなくなった。持続感染している Huh7 細胞を SPP 抑制剤で処理するとコア蛋白質は未切断のものが多くなり、全く 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し培養上清中のウイルス産生量を野性型と比較すると、SPP 耐性変異によってウイルス産生が著しく低下した。しかしながら、レプリコン細胞内の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 $\gamma$  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 $\gamma$  をノックダウンし、上清中のウイルス量を測定すると、PA28 $\gamma$  ノックダウンによって著しく低下した。また、PA28 $\gamma$  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。

## D. 考察

本研究により、コア蛋白質の DRM 画分移行に、SPP 切断が必要なることが明らかになった。また、SPP 活性がウイルス増殖に必須であることが明確になり、既存のプレセニンおよび SPP 抑制剤が抗ウイルス剤として有効であることが示唆された。ラフト様の DRM 画分はコレステロールやスフィンゴ脂質が多く含まれていると考えられる。コレステロールはウイルス粒子形成の必須成分として報告されている。従って、コア蛋白質が SPP で切断されたあと、コレステロールを多く含む膜領域から出芽する事が考察された。また、in vivo における肝臓の PA28 $\gamma$  の発現はコア蛋白質に依存した病原性発現に必須であることを我々は明らかにしてきた。本研究により、ウイルス感染にも PA28 $\gamma$  発現が必須であることが分かった。しかしながら、siRNA による短期的な PA28 $\gamma$  ノ

ックダウンでは僅かであるが細胞増殖に影響することがから、細胞増殖低下によるウイルス複製低下のみが原因で、ウイルス産生が抑制されるのかを明確にすることが今後必要である。また、SPP 抑制剤をさらに検討し、ウイルス産生抑制における PA28 $\gamma$  発現抑制との相乗効果を検討することを次年度の課題の一つとしたい。

#### E. 結論

以上の結果から、SPP によるコア蛋白質の切断および PA28 $\gamma$  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 $\gamma$  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。PA28 $\gamma$  はノックアウトマウスで顕著な表現型が認められず、かつ C 型肝炎の病原性発現に関与することから、症状の軽減とウイルス排除を同時に期待出来る標的因子であることが考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mori, Y., K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2008.

Hepatitis C virus core protein: its coordinate roles with PA28 $\gamma$  in metabolic abnormality and carcinogenicity in the liver. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:1437-1442.

2. 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.

3. 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.

4. Taguwa, 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.

##### 2. 学会発表

1 森石恆司、松浦善治、C 型肝炎ウイルス感染と肝発癌、第 82 回日本感染症学会総会、教育講演、松江、2008 年 4 月

2 阿部隆之、要祐喜、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、松浦善治、第 56 回日本ウイルス学会総会（ワークショップ）、岡山 2008 年 10 月

3 山下哲生、宮崎直之、森嘉生、森石恆司、李天成、宮村達男、武田直和、吉村政人、月原富武、松浦善治、分解能 3.5 Å の E 型肝炎ウイルス様粒子の X 線結晶構造解析、第 56 回日本ウイルス学会総会（ワークショップ）、岡山 2008 年 10 月

4 谷英樹、泉貴之、寒原裕登、要祐喜、森嘉生、森石恆司、松浦善治、日本脳炎ウイルスの細胞侵入におけるセラミドの関与、第 56 回日本ウイルス学会総会（一般口演）、岡山 2008 年 10 月

5 田鯨修平、阿部隆之、森嘉生、森石恆司、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの複製における hB-ind1 のコシャペロン活性、第 56 回日本ウイルス学会総会（一般口演）、岡山 2008 年 10 月



- 6 森石恆司、松浦善治、C型肝炎ウイルス感染におけるプロテアソーム活性化蛋白質 PA28 $\gamma$ の役割、第56回日本ウイルス学会総会（一般口演）、岡山2008年10月
- 7 久木原博、森石恆司、松浦善治、ヒトVAP-CはC型肝炎ウイルスの複製を抑制する。第56回日本ウイルス学会総会（一般口演）、岡山2008年10月
- 8 田中佳典、森嘉生、谷英樹、阿部隆之、森石恆司、巽正志、松浦善治、患者血清中に存在するC型肝炎ウイルスの感染複製を検出可能な指示細胞の樹立、第56回日本ウイルス学会総会（一般口演）、岡山2008年10月
- 9 森嘉生、山下哲生、嶋亮一、森石恆司、李天成、武田直和、松浦善治、E型肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製、第56回日本ウイルス学会総会（一般口演）、岡山2008年10月
- 10 Tani, H, Izumi, T., Kanbara, H., Kaname, Y., Mori, Y., Moriishi, K., Matsuura, Y., Ceramide plays a crucial role on the entry of Japanese encephalitis virus, 15<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C virus & related viruses, San Antonio, USA, 2008, October.
- 11 Abe, T., Kaname, Y., Moriishi, K., Kanto, T., Hayashi, N., Matsuura, Y. HCV infection induces IP-10 production through the TLR signaling pathway. 15<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C virus & related viruses, San Antonio, USA, 2008, October.
- 12 Kukiwara, H., Moriishi, K., Matsuura, Y., Human vesicle-associated membrane protein-associated protein subtype C inhibits HCV replication. 15<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C virus & related viruses, San Antonio, USA, 2008, October.
- 13 Tanaka, Y., Mori, Y., Tani, H., Abe, T., Moriishi, K., Matsuura, Y. Establishment of an indicator cell line that detects the replication of HCV inserta from hepatitis C patients. 15<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C virus & related viruses, San Antonio, USA, 2008, October.
- 14 Moriishi, K., Matsuura, Y. Proteasome activator PA28 $\gamma$  is required for efficient growth of hepatitis C virus. 15<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C virus & related viruses, San Antonio, USA, 2008, October.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許出願
- 特願(2008-221980) PA28 $\gamma$ 遺伝子の発現又は機能を抑制する物質を含む抗C型肝炎ウイルス組成物
2. 実用登録新案、3. その他  
特になし。

## HCV タンパク翻訳に関わる宿主因子と HCV 複製制御

研究分担者 金沢大学医学部先端医療技術学 教授 本多 政夫

**研究要旨:** C型慢性肝炎に対するインターフェロン/リバビリン併用治療が広く行われているが、依然として存在するインターフェロン治療抵抗性例に対して新たな治療法の開発が望まれる。我々はこれまでに、C型肝炎ウイルス (HCV) の蛋白翻訳は宿主因子の発現に強く依存していることを報告した (Gastroenterology, 128: p449, 2005)。今回、完全長 HCV 感染クローン JFH-1 株を用いて HCV の蛋白翻訳抑制と複製制御について検討した。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。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。興味深いことに La protein の発現上昇はテロメラーゼ活性を上昇させ、hTR の発現上昇がその一因と考えられた。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 La protein の発現を抑制することによって HCV の複製が制御された。以上より 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。

### A. 研究目的

C型慢性肝炎に対するインターフェロン/リバビリン併用治療が広く行われているが、依然として存在するインターフェロン治療抵抗性例に対して新たな治療法の開発が望まれる。我々はこれまでに、C型肝炎ウイルス (HCV) の蛋白翻訳は宿主因子の発現に強く依存していることを報告した (Gastroenterology, 128: p449, 2005)。今回、完全長 HCV 感染クローン JFH-1 株を用いて HCV の蛋白翻訳抑制と複製制御について検討した。

### B. 研究方法

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。

### C. 研究結果

Huh7.5 細胞に JFH-1 RNA, JFH-1 339U RNA をエレクトロポレーション法によりトランスフェクションした。RTD-PCR 法にて JFH-1-RNA は 72 時間でピークを迎えたが、JFH-1 339U-RNA の発

現はほぼ抑制されていた。ウエスタンブロットによる core 蛋白の発現においても JFH-1 339U で完全に抑制された。従って、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。

HCV の複製と La protein の発現の関連性について検討した。JFH-1 をトランスフェクションした Huh7.5 細胞の 12 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間での HCV-RNA は 72 時間後でピークを迎え、96 時間後では減弱した。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。HCV による La protein の発現誘導を確認するため、ウイルス粒子を含む培養上澄を用いて HCV 感染実験を行った。Huh7.5 細胞に感染 3 日後に細胞を採取した。HCV 感染実験においても La protein の発現は、感染 HCV ウイルス量依存的に増強した。一方、コントロールとして用いた JFH-1 339U では HCV 感染は起こらず、La protein の発現増強も認められなかった。

La protein 同様に、他の翻訳宿主因子である PTB、PSMA7、eIF2gamma、PCBP2 も JFH-1 の複製に伴って、発現の増強が認められた。また興味深いことにそれらの

C型慢性肝炎症例の肝組織における発現と

HCV-RNA 量は有意に相関していた。

HCV 感染に伴って誘導されるこれらの宿主因子の宿主細胞に与える影響について検討した。Huh7 細胞に La protein をトランスフェクションし 48 時間後のテロメラーゼ活性を TRAP assay で評価した。La protein を強発現させることにより、テロメラーゼ活性の増強が認められた。また、ヒトテロメラーゼ RNA (hTR) の発現も増強した。HCV 感染実験においても同様の結果が認められた。以上の結果より、HCV 感染により誘導された La protein がテロメラーゼ活性を増強させていることが明らかとなった。

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。

#### D. 考察

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。興味深いことに La protein の発現上昇はテロメラーゼ活性を上昇させた。hTR の発現上昇がその一因と考えられ、HCV 感染が肝細胞の不死化と関連している可能性も示唆された。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。

健康危険情報

なし

#### E. 研究発表

1. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. *Hepatology*. 2008 Nov 19.
2. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. 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. *Gastroenterology*. 2009 Mar;136(3):1012-24.
3. Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory

cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients.

Sakai Y, Honda M, Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S.

*Cancer Res*. 2008 Dec 15;68(24):10267-79.

4. Comparative analysis of proteome and transcriptome in human hepatocellular carcinoma using 2D-DIGE and SAGE.

Minagawa H, Yamashita T, Honda M, Tabuse Y, Kamijo K, Tsugita A, Kaneko S.

*Protein J*. 2008 Dec;27(7-8):409-19.

5. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma.

Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T, Kaneko S.

*J Hepatol*. 2009 Jan;50(1):100-10. Epub 2008 Oct 12.

6. Application of Serial Analysis of Gene Expression in cancer research.

Yamashita T, Honda M, Kaneko S.

*Curr Pharm Biotechnol*. 2008 Oct;9(5):375-82. Review.

7. Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma.

Mizukoshi E, Honda M, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S.

*J Hepatol*. 2008 Dec;49(6):946-54. Epub 2008 Jun 5.

8. Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma.

Nishino R, Honda M, Yamashita T, Takatori H, Minato H, Zen Y, Sasaki M, Takamura H,

Horimoto K, Ohta T, Nakanuma Y, Kaneko S.

*J Hepatol*. 2008 Aug;49(2):207-16. Epub 2008 May 5.

9. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the human hepatocellular carcinoma.

Minagawa H, Honda M, Miyazaki K, Tabuse Y, Teramoto R, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Ueda T, Kamijo K, Kaneko S.

*Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Feb 1;366(1):186-92. Epub 2007 Dec 4.

10. Obesity Upregulates Genes Involved in Oxidative Phosphorylation in Livers of Diabetic Patients.

Takamura T, Misu H, Matsuzawa-Nagata N,

Sakurai M, Ota T, Shimizu A, Kurita S,  
Takeshita Y, Ando H, Honda M, Kaneko S.  
Obesity (Silver Spring). 2008 Oct 9.

D. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 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

分担研究者 原田 和雄 東京学芸大学 准教授

**研究要旨** 本分担研究では、HCVゲノムRNAの5'-および3'-UTR中のRNA構造に強く結合するペプチドを同定し、HCV治療薬に応用することを目的としている。前研究期間は3'-UTR X-tailのSL2に結合する#3d001ペプチドを同定したが、期待された複製阻害活性は見られなかった。そこで、本研究では、まず、SL2結合ペプチドによる複製阻害活性の改善を目的として、SL2が#3d001に結合する上での塩基の要求性を解析した。その結果、SL2がフェージスやP22のboxBに代表されるGNRA-likeモチーフと類似していることを見出した。このことから、GNRA-likeなRNAを標的とすることにより、より確実にRNA結合ペプチドが同定できることが示唆された。そこで、このことを踏まえて、HCV IRESの中で翻訳開始において重要な役割を果たしているドメインIIIの中で、GNRA-likeな構造をとりうるステム・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。現在、陽性クローンの濃縮率が高かったステム・ループIIIe結合ペプチドのセレクションについて、結合特異性テストを行っている。ステム・ループIIIeに対する結合特異性がみられた場合、IRESによる翻訳阻害活性の評価を行う。

### A. 研究目的

本分担研究では、HCVゲノムRNA 5'-UTRのIRESおよび3'-UTR中のRNA構造に強く結合するペプチドを同定し、HCV治療薬に応用することを目的としている。これまでに、本研究グループで開発したεNタンパク質のアンチターミネーション活性を利用したRNA結合性ペプチド検出系（Peled-Zehavi et al., *RNA* 2003, 9:252-261）を用いて、3'-UTRのX tail スタム・ループ2（SL2）に結合する#5ペプチド、および、#5ペプチドを進化的改変し、より強くSL2に結合する#3d001ペプチドを同定した。前研究期間は、これらのペプチドによるHCV RNA複製の抑制について、HCV subgenomic replicon RNAを用いた解析を行った。しかしながら、期

待されたような複製の抑制は見られなかった。

本研究期間は、これまでに同定した#3d001ペプチドによるSL2 RNAとの結合様式の解析を行うことにより、SL2を標的としたペプチドによる複製阻害の問題点を明らかにすることを第一の目的とした。その結果、SL2 RNAは代表的なペプチド結合モチーフの一つであるGNRA-likeモチーフと類似していることが示唆された。そこで、第二の目的として、HCV IRESドメインIIIの中で、GNRA-likeな構造を取りうるステム・ループIIIeおよびIIIfに結合するペプチドの同定を試みた。ステム・ループIIIeおよびIIIfは40Sリボソームとの結合において重要であり、IIIefに相当するデコイRNAによりIRESによる翻訳を阻害できることが報告されている。その

ため、IIIe もしくは IIIf 結合ペプチドは HCV IRES による翻訳を阻害することが期待される。

## B. 研究方法

### 1) #3d001 ペプチドによる SL2 RNA との結合様式の解析

SL2 RNA が #3d001 ペプチドと結合する上で重要な塩基を同定するため、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。これは、SL2 RNA を持つ pAC レポータープラスミド、および、#3d001 ペプチドを発現する pBR プラスミドを大腸菌 N567 株に導入し、X-gal を含む寒天培地上で培養して、コロニーの青色の強さを標準かされたコントロールと比較することにより行った。また、代表的なペプチド結合モチーフであるファージスおよび P22 boxB にも種々の変異を導入し、その塩基の要求性を SL2 の活性と比較した。表面プラズモン共鳴による SL2 RNA と #5 ペプチドとの相互作用の解析は、#5 ペプチドを C 末端のシステイン残基を介して基盤に固定し、SL2 RNA (6.3 - 200 nM) の PBS 溶液をアナライトとして用いて表面プラズモン共鳴測定装置 (BiacoreX) を用いて測定した。

### 2) 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 結合ペプチドのスクリーニング。

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・プラスミドを作製し、N567 細胞に導入してエレクトロコンベレント細胞とした。ペプチド・ライブラリーは、ポリアルギニン 15 残基の各残基を「VVK コドン」(V=C, A, G; K=G, T) を用いてコドン単位で 50% の割合でドーピン

グした arginine-rich peptide library 2 (ARPL2) を pBR プラスミドに導入した。スクリーニングは、次の 5 段階で行った。(1) 一次セクション: pACK レポーター・プラスミドを含む N567 細胞にペプチド・ライブラリーをエレクトロポレーション法により導入し、得られた  $10^7$  の形質転換体の中からカナマイシンを含むプレート上で生存した大腸菌を集菌し、ライブラリー・プラスミドを単離した。(2)、(3) 二次・三次セクション: 単離したライブラリーを再びレポーター細胞に導入し、カナマイシンを含むプレート上で生存するコロニーからライブラリー・プラスミドを単離した。(4) 四次スクリーニング: 単離したライブラリーを pAC(LacZ) レポーター細胞に導入し、X-gal を含むプレート上で青いコロニーからライブラリー・プラスミドを個別に単離した。(5) 特異性チェック: 四次スクリーニングにおいて陽性だったクローンの RNA 特異性を X-gal プレート上で  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性によって個別にテストした。

## C. 研究結果

### 1) #3d001 ペプチドによる SL2 RNA との結合様式の解析

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。その結果、ループの 1 番目、および 4 - 6 番目の塩基は、他の 3 つの塩基に置換することができないこと、また、ループの 3 番目の塩基はプリン塩基であることが重要とわかった。ステムの塩基に関しては、最上部の closing base-pair の U 残基が重要であることがわかった。一方、代表的なペプチド結合モチーフであるファージスおよび P22 boxB がそれぞれペプチドと結合する上で重要な塩基を同定し、SL2 の場合と比較した結果、類似性が

見られた。そのため、SL2はGNRA-likeな構造を形成する可能性が示唆された。

## 2) 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結合ペプチドのスクリーニング。

HCV IRESのIIIe、IIIf、およびIIIefを標的とした3種のセクションを行ったところ、IIIeおよびIIIefの場合、陽性クローンの濃縮が見られた。IIIeを標的としたセクションの場合、一次〜三次セクション、および四次スクリーニング後の形質転換体の生存率および青いコロニーの割合は、それぞれ、0.27、0.30、0.80、および64%だった。同様に、IIIefを標的としたセクションの場合、一次〜三次セクション、および四次スクリーニング後の形質転換体の生存率および青いコロニーの割合は、それぞれ、0.11、0.24、0.21、および6.1%だった。しかしながら、第5段階の特異性テストを行ったところ、IIIefを標的として得られたクローンの場合、IIIef以外のRNAを持つレポーターの場合にも活性が見られ、特異性を示さなかった。現在は、セクションによる陽性クローン濃縮率が特に高かったIIIeの場合について解析を進めている。

## E. 結論

本研究で、まず、3'-UTR X-tailのSL2が#3d001に結合する上での塩基の要求性が、ファージスやP22のboxBに代表されるGNRA-likeモチーフと類似していることを見いだした。このことから、GNRA-likeなRNAを標的とすることにより、より確実にRNA結合ペプチドが同定できることが示唆された。そこで、このことを踏まえて、本研究期間中は、HCV IRESの中で翻訳開始において重要な役割を果たしているドメインIIIの中で、GNRA-likeな構造をとりうるステ

ム・ループIIIeおよびIIIfを標的とした結合ペプチドのセクションを行った。現在、陽性クローンの濃縮率が高かったステム・ループIIIe結合ペプチドのセクションについて、結合特異性テストを行っている。ステム・ループIIIeに対する結合特異性がみられた場合、IRESによる翻訳阻害活性の評価を行う。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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).
- 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).
- 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).
- 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)
- 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)

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).

G. 知的財産の出願・登録状況

不活性化遺伝子再活性化ペプチド

発明者：鈴木敏和、原田和雄、鈴木信夫、  
喜多和子

出願者：国立大学法人 千葉大学

出願日：平成 20 年 12 月 9 日

特願 2008-522343



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

研究分担者 坂本 直哉 東京医科歯科大学・分子肝炎制御学講座・准教授

**研究要旨** 我々は、独自に開発したHCV増殖モデル、及びHCV-JFH1感染細胞を用い、抗ウイルス活性を持つ化合物・宿主蛋白などの探索、機能解析を遂行し、以下の結果を得た。(1)8,000種の合成化合物のスクリーニングにより、HCV増殖を抑制する41種の化合物が同定され、IC50の優れた5個のepoxide誘導体を同定した。(2)HCV複製増殖に関する代謝・シグナルネットワークの網羅的解析により、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。本研究で同定された化合物の作用機構の解析、小動物モデルを用いた効果・安全性の検証を進めることにより新たな抗ウイルス薬剤の開発につながると思われる。

A. 研究目的

HCVレプリコンシステムは、HCV生活環のなかの細胞内HCVゲノム複製のみを再現するシステムではあるが、複製効率が高く安定していること、またレポーターアッセイベースの簡便な増殖定量系が確立しているため、抗ウイルス薬剤・化合物の一次スクリーニングに大きな威力を発揮する。

本研究において分担者は、独自に開発したHCV増殖モデル、及びHCV-JFH1感染細胞を用い、抗ウイルス活性を持つ化合物・宿主蛋白などの探索、機能解析を進め、新たな抗ウイルス療法を開発することを目的として研究を遂行する。

B. 研究方法

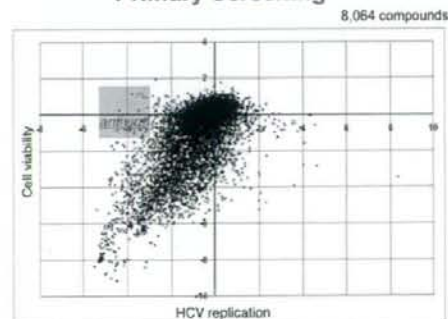
HCVレプリコン系を用いたHigh-Throughput Screening (HTS)により、HCV増殖を制御する薬剤・化合物の網羅的スクリーニングを進める。対象化合物として、生理活性物質ライブラリー、及びDiversity-oriented synthesis化合物ライブラリー、漢方生薬・抽出精製化合物を使用する。

C. 研究結果

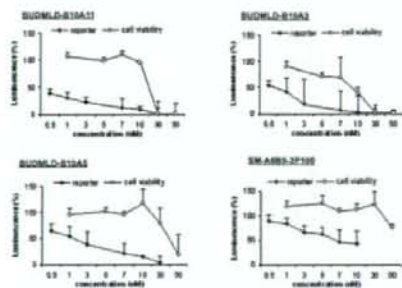
1. 多様性指向性合成化合物(DOS)ライブラリー・スクリーニング:

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。

Diversity-Oriented Synthesis Library:  
Primary Screening



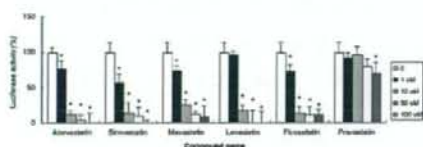
Secondary Screening of Antiviral Compounds  
(Antimicrob Agents Chem 2007;51:3756-3759)



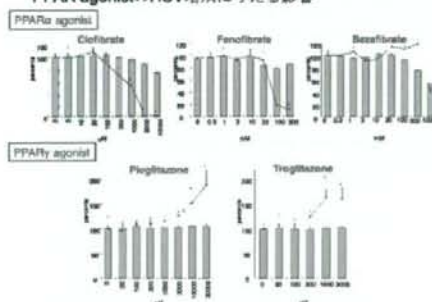
2. HCV複製増殖に関与する代謝・シグナルネットワークの網羅的解析:

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。

Statin製剤によるHCV増殖抑制効果



PPAR agonistのHCV増殖に与える影響



E. 結論

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得た。本研究で同定された化合物の作用機構の解析・小動物モデルを用いた効果・安全性の検証を進めることにより HCV の新規治

療法開発に結びつくものとする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

<原著>

- Andrew W. Tai, Yair Benita, Lee F. Peng, Sun-Suk Kim, Naoya Sakamoto, Ramnik J. Xavier, Raymond T. Chung: A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host & Microbe*, in press.
- 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.
- Satoshi Toma, Tsuyoshi Yamashiro, Shingo Arakaki, Joji Shiroma, Tatsuji Maeshiro, Kenji Hibiya, Naoya Sakamoto, Fukunori Kinjo, Masao Tateyama, Jiro Fujita: Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by nelfinavir and interferon- $\alpha$ . *Journal of Viral Hepatitis*, in press.
- 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.
- 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.
6. 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.
  7. 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.
  8. 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.
  9. 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.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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 2008; 38(5):1275-1286.
  13. 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.
  14. 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.
  15. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N (equal contribution), 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.
- <総説>
1. 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.
  2. 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. 3. 坂本直哉: 抗ウイルス薬臨床試験の現況 overview. 肝胆膵 2008 in press.
  3. 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.

4. 箆島裕子、坂本直哉、渡辺守：細胞障害性 HCV：  
肝胆膵 2008 in press.
5. 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 in press.
6. 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.
7. 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.

〈学会発表〉

1. Naoya Sakamoto, Kako Mishima, Yuko Sekine-Osajima, Mina Nakagawa, Megumi Tasaka, et al. : Establishment and genetic analyses of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by plaque-forming assay. 15th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Oct-4-2008, San Antonio, TX.
2. Kako Mishima, Naoya Sakamoto, Yuko Sekine-Osajima, et al. : Establishment and genetic analyses of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by plaque-forming assay. Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-1-2008, San Francisco, CA.
3. M. Tasaka, N. Sakamoto, M. Nakagawa, Y. Itsui, Y. Nishimura-Sakurai, et al. : Suppression of interferon induction and response pathway by Hepatitis C virus NS4B. Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-1-2008, San Francisco, CA.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)