

繰り返し投与群では、IL-12、IgE いずれについても未処置群との間に有意差は認められなかった。

持続的な IFN- γ 発現により、Th1 サイトカイン産生の増大、ならびに IgE 産生の抑制が認められたことから、Th2 サイトカイン、ケモカインの発現変動が予測された。そこで、皮膚の炎症に深く関与することが報告されている種々の Th2 サイトカインおよび Th2 ケモカイン TARC について、脾臓中 mRNA 発現を測定した。その結果、未処置群と比較して pCpG-Mu γ 投与群では、これら Th2 サイトカインおよび TARC 発現の低下が認められ、IFN- γ の持続による Th バランスの正常化が示唆された。

続いて皮膚炎に対する治療効果について検討した。皮膚炎症は、未処置群及び pCMV-Mu γ 投与群では経時的に悪化した。pCpG-Mu γ 投与群では皮膚炎の発症及び進行が顕著に抑制された。また、皮膚病変部の組織学的評価の結果、未処置群及び pCMV-Mu γ 投与群では治療開始 2 週間の時点で表皮組織の肥厚ならびにリンパ球や好酸球、マスト細胞の浸潤といった皮膚炎症に特徴的な所見が認められた。pCpG-Mu γ 投与群ではこうした所見はほとんど認められず、SPF 環境下で飼育した皮膚炎未発症マウスの皮膚組織像との間に顕著な相違は観察されなかった。

アトピー性皮膚炎の代表的な症状には、痒みと皮膚の乾燥が挙げられる。そこで痒みに対する効果について、掻破回数を

測定したところ、pCpG-Mu γ 投与群では掻破回数の著しい減少が認められた。これは IgE 産生が抑制されたことで、マスト細胞表面上の IgE レセプターを介するシグナル伝達が減少し、マスト細胞からのヒスタミン分泌が抑制されたためと推察される。また、炎症性細胞の皮膚への浸潤が抑制されたことによる皮膚組織内での炎症性タンパク質分泌の抑制も関与すると考えられる。また、TEWL も pCpG-Mu γ 投与群では有意に抑制された。これは、掻破行動の減少により表皮の損傷が抑制され、皮膚のバリア機能が保持されたためと推察された。

D. 考察

IFN- γ は、HCV 複製抑制作用を有するが、HCV レプリコン細胞を用いた *in vitro* の系では、I 型 IFN よりも低濃度で効果を有すること、併用により相乗効果が得られることが知られている。また、I 型 IFN とは異なる機構の関与も報告されており、I 型 IFN 抵抗性肝炎の治療に応用できる可能性が考えられる。しかしながら、IFN- γ の血中半減期は非常に短く、タンパク質製剤の投与では効果が持続しないことから、肝炎治療への応用は大きく制限されている。そこで本研究では、長期持続型 IFN- γ 発現ベクターの開発を試みた。

その結果、持続的に IFN- γ を発現可能なプラスミドベクターのマウスへの効率的遺伝子導入により、Th バランスが正常化されることが示唆され、これによりアト

ピー性皮膚炎に対する顕著な治療効果が得られることが明らかとなった。本研究で得られた知見は、持続的インターフェロン遺伝子発現が肝炎の治療へも応用できる可能性を示すものと考えられる。

E. 結論

治療抵抗性肝炎に対する IFN 遺伝子治療を実現するための長期持続型 IFN- γ 発現ベクターの開発を試みた。開発したベクター投与により、IFN- γ の血中濃度を治療域に長期間に渡り維持できること、またアトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて優れた治療効果が得られることが明らかとなった。以上の結果より、本研究で開発した長期持続型 IFN- γ 発現ベクターの治療抵抗性肝炎治療への応用の可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mitsui M, Nishikawa M, Zang L, Ando M, Hattori K, Takahashi Y, Watanabe Y, Takakura Y. Effect of the content of unmethylated CpG dinucleotides in plasmid DNA on sustainability of transgene expression. *J Gene Med*, in press (2009)
2. Nishikawa M, Nakayama A, Takahashi Y, Fukuhara Y, Takakura Y.

Reactivation of Silenced Transgene Expression in Mouse Liver by Rapid, Large-volume Injection of Isotonic Solution. *Human Gene Ther*, in press (2009)

3. Takahashi Y, Yamaoka K, Nishikawa M, Takakura Y. Quantitative and temporal analysis of gene silencing in tumor cells induced by small interfering RNA or short hairpin RNA expressed from plasmid vectors. *J Pharm Sci*, 98(1):74-80 (2009)
 4. Takahashi Y, Nishikawa M, Suehara T, Takiguchi N, Takakura Y. Gene silencing of β -catenin in melanoma cells retards their growth but promotes the formation of pulmonary metastasis in mice. *Int J Cancer*, 123(10):2315-20 (2008)
 5. Takahashi Y, Kaneda H, Takasuka N, Hattori K, Nishikawa M, Watanabe Y, Takakura Y. Enhancement of anti-proliferative activity of interferons by RNAi-mediated silencing of SOCS gene expression in tumor cells. *Cancer Sci*, 99(8):1650-5 (2008)
- ### 2. 学会発表
1. Reactivation of silenced transgene expression in mouse by rapid, large-volume injection of isotonic solution, Makiya Nishikawa, Yuki Takahashi, Ayumi Nakayama, Yasushi

- Fukuhara, Yoshinobu Takakura,
American Society of Gene Therapy 11th
Annual Meeting, Seattle (Boston, MA),
May 28- June 1 (2008)
2. Optimization of Design and Delivery of
Plasmid Vector for Interferon Gene
Therapy, Yoshinobu Takakura (invited)
2008 KCRS Annual Conference:
Research Networking for Future Therapy,
Jeju Island (Korea), September 4-5
(2008)
 3. Interferon Gene Therapy against
Metastatic Cancer, Yoshinobu Takakura
(invited), Makiya Nishikawa, Ehrlich II -
2nd World Conference on Magic Bullets,
Nurnberg, (Germany), October 3-5
(2008)
 4. 効率的な遺伝子デリバリーの際に認
められる非線形遺伝子発現現象の解
析、滝口直美、高橋有己、西川元也、
末原徹也、高倉喜信、遺伝子・デリバ
リー研究会第8回シンポジウム、大阪、
2008年 5 月
 5. 等張溶液の大容量急速投与によるin
vivo遺伝子発現の活性化、福原康史、
西川元也、高橋有己、中山あゆみ、高
倉喜信、遺伝子・デリバリー研究会第
8回シンポジウム、大阪、2008年 5 月
 6. 持続的インターフェロン発現プラス
ミドベクターの開発とそのアトピー
性皮膚炎遺伝子治療への応用、服部香
代子、西川元也、高橋 玲、高倉喜信、
遺伝子・デリバリー研究会第8回シン
ポジウム、大阪、2008年 5 月
 7. インターフェロンによる外来性遺伝
子発現抑制機構の解析とその制御に
よる発現の持続化、臧蓄、西川元也、
町田一哉、高倉喜信、遺伝子・デリバ
リー研究会第8回シンポジウム、大阪、
2008年 5 月
 8. β -catenin遺伝子発現抑制による癌細
胞増殖抑制と肺転移の亢進、末原徹也、
高橋有己、西川元也、滝口直美、高倉
喜信、日本薬学会第23年会、札幌、
2008年 5 月
 9. 持続的インターフェロン遺伝子発現
によるアレルギー疾患治療、服部香代
子、西川元也、高橋 玲、高倉喜信、
第24回日本DDS学会学術集会、東京、
2008年 6 月
 10. ハイドロダイナミクス法による高効
率遺伝子導入時の非線形遺伝子発現
機構の解明、滝口直美、高橋有己、西
川元也、末原徹也、高倉喜信、第24
回日本DDS学会学術集会、東京、2008
年 6 月
 11. 持続的インターフェロン発現プラス
ミドベクターの開発とアレルギー疾
患遺伝子治療への応用、服部香代子、
西川元也、光井 優、臧蓄、高橋 玲、
生駒晃彦、高倉喜信、第18回アンチセ
ンスシンポジウム、岐阜、2008年 11
月
- H. 知的所有権の取得状況
特になし

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）
（分担）研究報告書（平成20年度）
ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いたウイルス排除機構の解析

研究分担者 菅野雅元 広島大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨：

ウイルス性肝炎の予防・診断・治療・疫学などに関する、臨床および基礎研究や対策を考える上で、免疫学の立場からのアプローチを加えることにより、研究班全体の広がりを基礎から臨床、そして疫学、予防医学までと幅を広げることを目指している。

肝炎ウイルス（B型、C型）は免疫系を介した急性・慢性の炎症性肝疾患を引き起こす。ウイルス性肝炎の自然治癒・慢性化を決定する要因の一つとして、宿主側の免疫反応が重要であることは論を待たない。

昨年度までのチンパンジーを用いた、感染初期の免疫担当細胞の動態観察、および解析結果を土台とし、本研究課題では、その結果を「ヒト肝細胞キメラマウス」の実験系に応用するものである。

昨年度までの研究から、(1) 抗体産生・肝障害の出現よりも早く、ウイルス感染後約1週間で樹状細胞の活性化が検出される事が分かった。また、(2) 感染コースの選択（自然治癒コースと持続感染コース）、特定の樹状細胞のHCVゲノムの取り込み・活性化、その後のNK細胞の活性化、末梢血中のI型IFN量の間に相関があることが判明した。このような宿主側の免疫系（特に自然免疫系）の重要性を示すデータをもとに、「どうやって肝炎のマウス病態モデルを作製するか?」、「キメラマウスを用いたウイルス排除機構の解析」を行う研究の基礎を作る事から始めた。このような系が確立すれば、その詳細な解明が予防・治療に貢献出来ると考える。

A. 研究目的

分担研究者らは、2004年度から、HCVが感染可能な唯一の動物であるチンパンジーを用いた解析系で、宿主免疫系の動態等を解析してきた。今までは、主に、獲得免疫系のT細胞、B細胞とHCVに対する感染免疫の関与が多数報告されていた。しかし、より初期の宿主反応、および自然免疫系の反応に関する解析が余りなされていなかった。チンパンジーを用いた我々の解析結果は以下の様にまとめる事が出来る：

- (1) 抗体産生・肝障害の出現よりも早く、ウイルス感染後約1週間で樹状細胞（DC）の活性化が検出される事が分かった。また、
- (2) 感染コースの選択（自然治癒コースと持続感染コース）と、特定の樹状細胞

（DC）のHCVゲノムの取り込み・活性化、及び、その後のNK細胞の活性化、末梢血中のI型IFN量の間に相関があることが判明した。

このように宿主側の免疫系の初期反応（特に自然免疫系）と感染コースの相関性が意味するところは大きく、今後の詳細な解明が予防・治療に貢献出来ると考えられた。しかし、その後、チンパンジーを用いた研究が、日本ではほぼ不可能となり、更なる解析・研究が出来ない状態であった。

最近、免疫不全（SCID）・Alb-uPA Tg マウスにヒト肝細胞を経脾臓に投与し、高いヒト肝細胞置換率を有した人肝細胞キメラマウスを用いる事が可能になり、HCVの感染実験を小動物モデルで行う

事が可能になった。この系を用いた感染実験やリパースジェネティックスを行う事は可能であるが、宿主免疫系の動態解析や炎症を起こす動物モデルとはなっていないのが現状である。

ここで、少し最近の免疫学（特に自然免疫系）の発想法の転換と「炎症」について解説しておく。最近の約10年間の免疫学の発展、特に自然免疫系の理解、および免疫学理論の変遷は、従来型の発想法「免疫系は自己・非自己を認識し、外来非自己を攻撃する」に対する新しい解釈を提供している。つまり現在は、「免疫学のパラダイムシフトが起きている」と考える事も可能である。改めて、「我々の免疫系は、何に対するセンサーシステムであるのか？」という問い掛けが現在もなされている。

このようなきっかけとなったのは、自然免疫系の重要性、Danger 仮説など、によるところが大きいと思われる。

既に良く知られている様に、我々の免疫系は、ウイルスや細菌等の微生物はその構成成分に対するセンサーシステムを備えており、それに対する何らかの免疫反応を起こす事が感染防御の最初の反応である事が知られている。そのような微生物の構成成分を PAMPs (pathogen associated molecular pattern) と総称しており、LPS, Flagellin, CpG DNA, などが代表例である(表1)。PAMPs は PRRs (Pattern recognition receptors) と総称されるセンサー群によって認識される。代表例としては、細胞質膜またはエンドソームに発現している TLRs (Toll-like receptors) や、細胞質内の NLRs (Nod-like receptors)、RLRs (RIG-I like receptors) が知られている。これらの PRRs は微生物の構成成分(産物)を感知し、炎症反応を起こすために必要な細胞質内カスケードを活性化させる。

一方、組織障害や傷ついた細胞(死んでゆく細胞)から放出される物質(因子)で、炎症反応を惹起させる活性を持つものを DAMPs (Damage-associated molecular pattern) と称されるようになってきた(表1)(12)。これらも PRRs に

よって認識されると考えられつつある。

つまり、感染(微生物の存在)無しでも細胞・組織の破壊・障害が起きれば DAMPs が放出され、それによる自然免疫系活性化・炎症が誘導されると考える事ができる。興味深い事に、PAMPs と DAMPs を認識するセンサー(受容体)のいくつかは共通であるという報告がなされている。この事は、感染源由来の炎症反応と、非感染由来の炎症反応経路に共通性があるという事を示唆しているのかもしれない。

上記のような点を踏まえ、チンパンジーを用いた動物実験系と同様に、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、肝炎病態モデル動物の確立を検討する事、およびウイルス排除機構の解析を宿主免疫系の解析を通して行う事を研究の目標としている。未知の領域ではあるが、今までの免疫学理論とは別の観点から、不明な点を多く残しているウイルス性肝炎の病態の基礎を解析していきたい。

B. 研究方法

ヒト以外で RNA ウイルスである HCV 感染に感受性を持つ事が知られている唯一の実験動物(チンパンジー)を用いた感染実験によって得られる感染価(Chimpanzee infectious dose/ml:CID/ml)と、核酸増幅検査(NAT)により *in vitro* で定量値として表示される C 型肝炎ウイルス量(HCV RNA 量、copy/ml)、との関係を明らかにする実験系を用いた。(詳細は以前の厚生科研費報告書を参照)

このような実験系を用い、樹状細胞、T 細胞、NK 細胞、B 細胞の細胞数、活性化した細胞の割合などの変動を Flow Cytometry を用いてその経過を測定する。樹状細胞(CD11c+)の活性化マーカー(CD86+または HLA-DR+)、T 細胞(CD3+)、NK 細胞(CD56+)、B 細胞活性化(CD19+)は、それぞれの Lineage マーカー+活性化マーカー(CD69+など)で測定する。

ヒト肝細胞キメラマウスによる肝炎

病態モデル作成のためには、いくつかのウイルス感染・ヒト型マウスモデル作成研究グループとの情報交換を主体に行った。

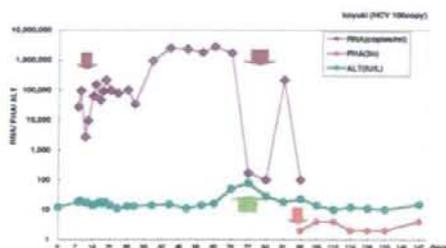
(倫理面への配慮)

過去のチンパンジーを用いた実験は、倫理委員会で審査され、許可されたものであり、倫理面の審査も問題がないとされた。ヒト肝細胞キメラマウスを用いた新しい実験系開発は、現在・広島大学倫理委員会に申請中である。

C. 研究結果

実験 1 :

今まで、HCV を 100copy 接種したチンパンジーを用いた感染実験によって、得られた HCV コピー数の推移と、血清中の抗体価、肝障害マーカーとしての ALT/値、の測定結果は下記の様であった

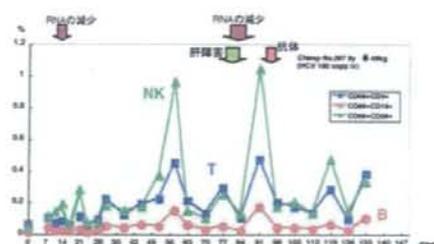


(図 1)。このケースは自然治癒したケースである。

(図 1) HCV RNA コピー数、抗体価、肝障害マーカーの推移。HCV コピー数が 11 日目と 84 日目に減少する。抗体価は 9 8 日目から検出される。

実験 2 : T/B 細胞、NK 細胞の活性化の推移

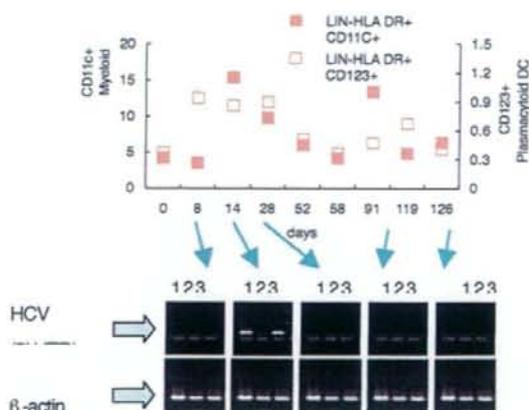
次に、同様に T 細胞、B 細胞、NK 細胞について、同様に活性化マーカーとして CD69 を用いて活性化の推移を検討した。その結果、興味深い事に、肝障害の後や、抗体産生の開始前に NK 細胞や T 細胞の活性化が確認できた。特に NK 細胞の活性化が顕著に確認できた (図 2)。



(図 2) NK 細胞、T 細胞、B 細胞の活性化の推移

実験 3 : 樹状細胞の活性化およびその推移

樹状細胞は myeloid DC (mDC) と plasmacytoid DC (pDC) の大きく 2 種類のサブセットに分類される事が知られている。そこでそれぞれのサブセットの DC の活性化の割合を、自然治癒コース、持続感染コースのチンパンジーの末梢血サンプルを用いて検討したところ図 3 の様になった。



(図 3) 100copy 接種し、自然治癒コースを取った場合。Plasmacytoid DC だけが HCV を取り込んでいる。しかもそれは感染初期の pDC だけであり、その後のどの時期の pDC、mDC ではウイルスゲノムの取り込みを介さずに樹状細胞の活性化が起きている。

- 1: All DC
 - 2: mDC: Lin-, CD11c+
 - 3: pDC: Lin-, CD123+
- 活性化マーカーとして HLA-DR+ を用いている

実験4: ヒト肝細胞キメラマウス実験系の検討
 実験1-3で明らかになった事は、自然免疫系、特にDCやNK細胞の活性化がHCV感染による炎症反応・宿主免疫反応に重要な役割をしている事である。

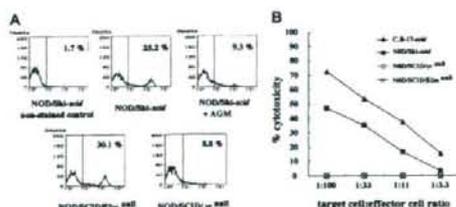
しかしキメラマウスはSCIDであるために、基本的には免疫不全マウスであり、宿主免疫系は機能しないと考えられていた。

その後、我々の研究テーマの一つである「どうやって肝炎状態のマウスモデルを作製するか?」に関して、以下の2つの解決すべき問題が残っている。

- (a) SCIDマウスの残存NK細胞活性
- (b) ヒト肝細胞を攻撃し、炎症を起こすヒト免疫系細胞の必要性

(a) に関して;

scidマウスにNK細胞活性が残存している事が明らかになった。



(図4) NK cells and NK cell activity in NOD/Shi- scid mice with or without anti-asialo GM1 antibody, NOD / SCID / gamma-c null and NOD / SCID / beta 2m null mice.

これからも分かる様に、レシビエントマウスの残存NK細胞活性が移植に障害となる場合、または再構築の成績向上に障害となる場合は、Scidマウスではなく、NOD/Scid/gamma-cマウスに置き換える方が成績が上がる可能性が高いことが分かった。実際、次の(b)で述べる、HIV感染のヒト化マウスモデルでも似たような系を採用して成功している。

(b)に関して;

scidマウスにヒト肝細胞と同時にヒト抹消血等を導入しても上記(a)で述べた様にNK活性によりドナー由来の血球系細胞(免疫系)が拒絶されてしまう。そこで他のヒト型マウスモデルを検討した。一番参考になったのは、Qi Jiangらの報告(Blood 2008)である。New York大学のDr. Lishan Suの研究チームの報告で、humanized Rag2 γ -C γ (DKO-hu HSC)にヒト胎児肝臓(造血細胞)を用いてヒト型免疫系を再構築し、そこにHIVを感染させるモデル系である。彼らの場合はさらにヒト型免疫系のFoxP3+CD4⁺ regulatory T (Treg)と、HIV感染の関係を解析している。Dr. Suと実際にコンタクトを取りアドバイスを頂いた。同様な事を、広島大学のキメラマウスの系で行うには少なくともヒト胎児肝臓、または同様に未熟血球系が存在する臍帯血の利用が考えられた。

そこで、臍帯血を用いた新しい実験系を、現在倫理委員会に申請中である(研究代表は茶山教授)。許可が下りたら、次年度から解析をスタートしたい。

D. 考察

昨年度までの、チンパンジーを用いたHCV研究で、明らかとなった自然治癒コース(急性:100copy接種)と持続感染コース(慢性:8.4x10⁶copy接種)での、宿主初期免疫応答の大きな違いは

- (1) 自然治癒(急性感染)コースでのみ plasmacytoid DC (pDC)がウイルスゲノムを取り込み、感染後1週間で活性化していた。Myeloid DC (mDC)の活性化は2週間目で観察できたが、HCVの取り込みは見られなかった。
- (2) 持続(慢性)感染コースでは、pDC, mDC共に、初期活性化は検出できず、4-5週間後の活性化が観察できた(しかし、HCVの取り込み無し)。
- (3) NK細胞の顕著な活性化が自然治癒コースでのみ検出できた。NK細胞の活性化の有無と感染コースの選択(自然治癒、持続感染)の相関関係の存在が確認できたが、因果関係は不明。
- (4) 特に「pDCのHCV取り込み」、「DCの初

期活性化」、「NK細胞の活性化」、この3つのパラメーターの因果関係は不明であるが、相関していることは明らかである。

以上が主な点である、このように従来以上に自然免疫系の重要性が明らかとなった。特に、DC細胞、NK細胞の重要性が高い。

さらに今年度は、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた新たな実験系において、肝炎、およびウイルス排除機構解析の基礎を固める研究を行った。

E. 結論

HCV感染初期の宿主免疫応答の理解のために行ったチンパンジーを用いた感染実験から、自然免疫系（樹状細胞やNK細胞）の重要性が明らかとなった。

さらに新しい実験系ヒト肝細胞キメラマウス系におけるウイルス排除機構解析を行うためには、「炎症」がきちんと起きるシステムを構築する事が重要であり、「自然免疫系」のアウトプットが「炎症」である事から考えると、やはりヒト型NK細胞、DC細胞をキメラマウス内で再構築する事が最も重要と思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyazaki M, Miyazaki K, Itoi M, Katoh Y, Guo Y, Kanno R, Katoh-Fukui Y, Honda H, Amagai T, van Lohuizen M, Kawamoto H and Kanno M. Pre-T-cell-receptor signaling induced thymocyte proliferation is epigenetically maintained through the Polycomb gene product Bmi-1-mediated cdkn2a repression. **Immunity** 28: 231-245. 2008.

学会発表 など

・Yun Guo, Masaki Miyazaki, Manami Itoi, Takashi Amagai, Masamoto Kanno The function of Bmi-1 in the thymic epithelial cells 第18回Kyoto T cell Conference 京都大学・芝蘭会館 2008年6月13-14日

・宮崎 正輝、宮崎 和子、本田 浩章、菅野 雅元 ポリコム遺伝子群Bmi-1によるInk4a/Arf遺伝子座制御を介するT細胞分化制御機構第70回 日本血液学会総会 2008年10月10-13日 国立京都国際会館

・宮崎 和子、宮崎 正輝、山崎 憲政、菅野 雅元、本田 浩章 bHLH型転写因子Dec1の発現調節はT細胞の胸腺内セレクションと分化に必要である 第70回 日本血液学会総会 2008年10月10-13日 国立京都国際会館

・Harinarayanan janakiraman, Takuhiro Ikeda, Rieko Kanno, Hiroko Inoue, Masamoto Kanno Polycomb group protein regulates tumorigenesis by controlling population of cancer stem cell. 第67回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 2008年10月28-30日

・菅野雅元、井上洋子, JANAKIRAMAN Harinayanaran, 菅野理恵子 DAMPsによるCHS反応の増強と記憶：アトピー性皮膚炎との関連 第58回日本アレルギー学会秋期学術大会 東京国際フォーラム（東京） 2008年11月27-29日

・郭芸、宮崎正輝、糸井マナミ、雨貝孝、河本宏、菅野雅元。胸腺上皮細胞におけるbmi-1の役割 第38回日本免疫学会 京都国際会館（京都） 2008年12月1-3日

・菅野理恵子、井上洋子, JANAKIRAMAN Harinayanaran, 菅野雅元 DAMPsの一つ、尿酸クリスタル、によるCHS反応の増強とメモリー状態解析 第38回日本免疫学会 京都国際会館（京都） 2008年12月1-3日

・Phyo Wei Thon、宮崎正輝、宮崎和子、郭芸、菅野雅元。Hemp 遺伝子は初期T前駆細胞の増殖に

において機能を果たす。第38回日本免疫学会 京都国際会館（京都） 2008年12月1-3日

・宮崎正輝、宮崎和子、加藤裕子、郭 芸、萱野雅元、河本宏、本田浩章 胸腺細胞分化における、bHLH型転写因子 mDec1 の多彩な機能。第38回日本免疫学会 京都国際会館（京都） 2008年12月1-3日

・Masaki Miyazaki, Kazuko Miyazaki, Manami Itoi, Hiroshi Kawamoto, Masamoto Kanno. Thymocyte development and cell death restraint mediated by Polycomb gene.

BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド 2008年12月9-12日 シンポジウム4S16 「血球細胞の分化系譜」

H.知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究協力者

井上洋子（広島大学 大学院医歯薬学総合研究科・助教）

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）

（分担）研究報告書（平成20年度）

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

HCV ゲノム全翻訳領域解析による薬剤感受性領域の同定

研究分担者： 前川 伸哉

山梨大学医学工学総合研究部・肝疾患地域先端医療システム学講座 講師

研究要旨：最新のペグインターフェロン・リバビリン併用療法の導入によってC型肝炎の治療成績は大きく向上したものの、著効は未だ約半数例に留まっているのが現状である。本研究ではより正確な治療効果予測を達成するために、多様な反応性を示した genotype 1b の HCV 全翻訳領域を解析することにより治療効果と関連するウイルス領域を検索した。多数症例における検討の結果、RVR 群と非 RVR 群の違いは、ISDR-PKR-BD を含む NS5A2209-2285 の 77 アミノ酸領域に、non EVR 群と非 non EVR 群においては、Core70 の 1 アミノ酸に顕著な違いが認められることが明らかとなった。この成果は、C型慢性肝炎におけるテーラーメード治療を可能とすると同時に、難治に至るメカニズムの分子生物学的解析における基盤となる重要な情報と考えられる。今後は、上記により明らかとなった HCV ゲノム情報を *in vitro* の HCV 培養細胞システムに導入して、さらに解析を進めてゆく予定である。

共同研究者氏名

榎本信幸

山梨大学医学工学総合研究部 教授

物系は存在していなかった。HCV replicon 系あるいは JFH-1 による粒子産生系においても、培養細胞内で増殖する HCV は特定の遺伝子変異を持つもののみであり、多様な遺伝子変異の機能を検証することは不可能である。

ヒト肝細胞キメラマウスはこれらの問題点を解決し、臨床的に認められる多様な HCV 遺伝子変異の意義を直接的に実験動物において検証可能な画期的システムである。我々はハイスループットの HCV ゲノムワイド解析システムを構築し、各種病像に対応する HCV 全ゲノムの多様性の網羅的解析を行いつつある。本研究では、この成果とヒト肝細胞キメラマウス系による肝炎実験動物モデルでの C型肝炎ウイルスの病原性解析を統合することを目的とする。

A. 研究背景・目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の複製は、複製複 C型肝炎ウイルス遺伝子は変異に富み、患者間で感染している HCV 遺伝子が完全に同一であることはない。また、同一患者内でも個々のウイルスには多様な変異が認められる。一方、C型肝炎の治療反応性、も多様であるが、宿主の多様性も関与しており、このウイルスの多様性と病像の多様性の関連は十分に解明されていない。

これまで、HCV 遺伝子変異の多様性の生物学的意義を直接検証できる、細胞培養系、実験動

平成20年度は、ペグインターフェロン・リバビリン併用療法に対して多様な反応性を示した症例群に対し、治療効果と関連するHCVゲノム領域を検索した。

B. 研究方法（2008年度）

ペグインターフェロン・リバビリン併用療法を施行した症例群において、治療前の血清からHCV-RNAを抽出し、ダイレクトシーケンシング法によりHCV全翻訳領域配列を決定し、治療効果と関連するHCV領域を検索した。

C. 研究成果

(1) ISDR～PKR-BD領域はペグインターフェロン・リバビリン併用療法において早期反応性を決定する最も重要なHCVゲノムエレメントである

ペグインターフェロンペグインターフェロン・リバビリン併用療法を施行症例群において、RVR群と非RVRに分類してサブグループ解析をsliding window解析を併用して検索したところ、2群間で最も異なるHCV領域はISDR～PKR-BD領域を含む77アミノ酸領域であった。

(2) コア番号アミノ酸変異、治療抵抗性を決定しているHCVゲノムエレメントである。

一方、同症例群において、non-EVR群とそれ以外に分類してサブグループ解析を行ったところ、2群にはコア70番のアミノ酸に顕著な違いを認めた。

D. 考察

ペグインターフェロン・リバビリン併用療法の早期反応性と規定するのは、ISDR～PKR-BD領域における変異数の合計であり、一方治療抵抗性を規定するのはコア70番のアミノ酸多

型あることが明らかとなった。この結果は、C型慢性肝炎におけるテーラーメイド治療を可能とすると同時に、難治に至るメカニズムの分子生物学的解析における基盤となる重要な情報と考えられる。

E. 結論

HCVゲノムワイド解析システムによって、HCV治療反応性を規定するHCVのゲノム領域が明らかとなった。

E. 研究発表

1. 論文発表

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 Glycyrrhizae radix inhibit in vitro hepatitis C virus replication.

Hepatol Res. 2008 Jul 20.

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 hepatitis C virus replication in vitro.

Hepatol Res. 2008 Sep;38(9):909-18.

Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita A, Sakamoto N, Itoh M, Enomoto N.

Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection.

J Infect Dis. 2008 Feb 1;197(3):361-70.

Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Satoh K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Cheng-Hsin C, 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 Gastroenterol Hepatol. 2008 Sep;23(9):1437-47

1. 学会発表

前川伸哉、坂本穰、榎本信幸、ワークショップ8: Viral genotyping/sequencing の臨床的意義. Whole HCV genome sequencing による治療感受性規定領域の検索. 第12回 日本肝臓学会大会. 東京. 平成20年10月1日-10月3日.

倫理面への配慮

山梨大学倫理委員会の承認のもと、すべての患者より同意を得た上で、患者の個人的遺伝情報とは直接関連のないHCVゲノム配列の決定を各症例の血清を用いて行っている。また各症例の血清は山梨大学において連結可能匿名化を行っている。

特許権等知的財産権の取得及び申請状況:

なし

C型肝炎ウイルス感染細胞特異的なIFNの誘導による ウイルス排除システムの構築

研究分担者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨： IFNの転写因子であるIRF7のdominant-active変異体(MR3)をレプリコン細胞やJFH1株の感染細胞に導入するとウイルスゲノムの複製が抑制された。また、HCVのプロテアーゼ認識配列と小胞体残留シグナル配列を付加したキメラMR3(cMR3)は、HCVプロテアーゼの発現により活性化され、感染細胞でのみIFNを誘導できることが示された。さらに、cMR3の発現プラスミドをHCV感染キメラマウスの尾静脈から投与したところ、ウイルス価の減少が認められた。HCV感染特異的にIFNを誘導可能なcMR3の発現により、感染細胞の急激な排除や過剰な免疫反応の誘導に伴う劇症化を回避して、HCVを排除できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

HCVに感染すると高率に慢性化し、肝硬変を経て肝細胞癌を発症する。我が国には2百万人ものHCV感染者が存在すると推定され、感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。ペグ化IFNとリバビリンの併用により治療効果に改善が認められているが、遺伝子型1b型の高ウイルス価の患者に対する著効率は50%程度であり、正常細胞への負荷や免疫系への過剰反応等の副作用が大きな問題となっている。本研究では、HCVに感染した細胞特異的にIFNを誘導し、細胞に与える負担をできる限り軽減させて、HCVを排除可能なシステムの確立を目的とする。

B. 研究方法

内在性のIFNをHCV感染細胞特異的に発現させるために、I型IFNの主要な転写因子であるIRF7のdominant-active体として機能する、C末端欠損IRF7変異体(MR3)を作製した。HCVのレプリコン細胞とJFH1ウイルスの感染細胞にMR3遺伝子を導入し、免疫プロットとRT-PCR法によりMR3の抗HCV活性を評価した。また、HCVに感染した細胞だけにIFNを誘導するために、HCVのプロテアーゼ認識配列と小胞体残留シグナル配列を付加したキメラMR3(cMR3)を構築した。感染細胞に導入されたcMR3

はHCVプロテアーゼにより切断されて活性化され、IFNを誘導してウイルスを排除できることが期待される。さらに、cMR3の活性をin vivoで評価するために、ヒト肝細胞を移植したキメラマウスにC型肝炎の患者血清を接種して作出した、HCV感染モデルマウスにcMR3の発現プラスミドをハイドロダイナミックス法で投与し、その活性を評価した。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施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、また提供試料、個人情報等を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

MR3はHCVレプリコン細胞やJFH1ウイルス感染細胞において、野生型IRF7よりも高いIFNの誘導活性を示し、HCVの複製を阻害した。MR3の抗HCV活性は、IFNの発現誘導に依存していることがレポーターアッセイにより確認された。また、cMR3はHCVプロテアーゼの発現により活性化

され、レプリコン細胞や JFH1 ウイルスの感染細胞でのみ、IFN を誘導できることがレポーターアッセイにより示された。さらに、プラスミドを HCV 感染キメラマウスの尾静脈から投与したところ、空ベクターを投与したマウスでは投与後 4 日目にはウイルス価の上昇が観察されたが、cMR3 の発現プラスミドを投与したマウスでは、ウイルス価の減少が認められた。

D. 考察

原発性肝癌の約 8 割は HCV 感染を基礎に発症する。しかしながら、臨床サンプルから HCV を効率よく分離増殖できる細胞培養系はなく、しかも感受性を示す実験動物はチンパンジー以外にいないことから、C 型肝炎治療法の開発は困難を極めている。本研究により、HCV 感染細胞特異的に IFN を誘導させることにより、感染細胞の急激な排除や過剰な免疫反応の誘導に伴う劇症化を回避して、HCV を排除できる可能性が示唆された。

E. 結論

- 1 IRF7 の dominant-active 変異体 (MR3) の発現により HCV ゲノムの複製が抑制された。
- 2 HCV のプロテアーゼ認識配列と小胞体残留シグナル配列を付加したキメラ MR3 (cMR3) は HCV 感染細胞でのみ IFN を誘導できた。
- 3 cMR3 の導入により HCV 感染キメラマウスでウイルス価の減少が観察された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 8349-8361 (2008).
- 2 Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core

protein is critical for the production of infectious virus particles. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 7964-7976 (2008).

- 3 A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. Aizaki H., Morikawa K., Fukasawa M., Hara H., Inoue Y., Tani H., Saito K., Hanada K., Matsuura Y., Lai M. M. C., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 5715-5724 (2008).
 - 4 A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 3480-3489 (2008).
 - 5 Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. Tagawa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 2631-2641 (2008).
 - 6 Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. 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. *J. Gen. Virol.*, 89, 2108-2113 (2008).
- ##### 2. 学会発表
- 1 Hiroshi Kukiwara, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human vesicle-associated membrane protein-associated protein subtype C inhibits HCV replication. 15th

- International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, October 5-9, 2008.
- 2 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: HCV infection induces IP-10 production through the TLR signaling pathway. 同上。
 - 3 Hideki Tani, Takayuki Izumi, Hiroto Kanbara, Yuuki Kaname, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Ceramide plays a crucial role on the entry of Japanese encephalitis virus. 同上。
 - 4 Yoshinori Tanaka, Yoshio Mori, Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of an indicator cell line that detects the replication of HCV in sera from hepatitis C patients. 同上。
 - 5 Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Proteasome activator PA28g is required for efficient growth of hepatitis C virus. 同上。
 - 6 松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製および病原性発現における Rip の役割: 第 31 回日本神経科学大会ワークショップ、東京、7 月 9-11 日、2008。
 - 7 Xiaoyu Wen, 阿部隆之、森石恆司、松浦善治: IRF7 dominant active 変異体による HCV 感染細胞における I 型 IFN の発現増強効果: 第 14 回日本遺伝子治療学会、札幌、10 月 21 日-23 日、2008。
 - 8 山下哲生、宮崎直幸、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、岡山、10 月 26 日-28 日、2008。
 - 9 田鍬修平、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、同上。
 - 10 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 γ の役割、同上。
 - 11 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の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製、同上。
 - 12 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、同上。
 - 13 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、同上。
 - 14 阿部隆之、温小玉、田中佳典、寒原裕登、谷英樹、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染細胞特異的な IFN の誘導によるウイルス排除システムの構築、同上。
 - 15 阿部隆之、要祐喜、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染による TLR 経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上。
 - 16 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、同上。
 - 17 松浦善治: C 型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に關与する宿主因子: 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、シンポジウム、神戸、12 月 9 日-12 日、2008。

H. 知的所有權の出願・登録状況 特になし。

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）

（分担）研究報告書（平成20年度）

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

クローンによるHCV感染マウスを用いた抗ウイルス剤の検討

研究分担者 今村道雄 広島大学病院消化器・代謝内科 助教

研究要旨：Genotype 1b型の急性重症C型肝炎患者の血清よりHCV全長（HCV KT9）をクローニングした。このHCV KT9はコア領域のaa 70およびaa 91にそれぞれR70QおよびL91Mのアミノ酸変異を認めた(Core-Mutant)。このクローンのコア領域のaa 70およびaa 91を野生型にもどしたクローン(Core-Wild)を作製し、ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓内に投与し、HCV感染を惹起した。Core-MutantとCore-WildではHCV感染成立率、マウス血中HCV RNA量およびインターフェロン投与後の血中HCV RNA減少量は同程度であった。KT9クローンおよびKT9のNS3領域にprotease inhibitor (telaprevir) 耐性変異であるA156S変異を挿入したクローン(KT9-NS3-A156S)を肝臓内に注入したところKT9-NS3-A156Sクローン感染マウスの血中HCV RNAはKT9感染マウスに比べ低値であった。Telaprevirの経口投与によりNS3-A156S変異は明かにtelaprevir耐性であり、本システムを用いて変異株の薬剤耐性能の検討が可能であると思われた。

A. 研究目的

HCVクローンの投与により、モノクローナルなHCVを感染させたマウスモデルを用いて、HCVのアミノ酸変異の生物学的意義を明らかにすることを目的とする。

(1) HCVのコア領域70および91番目のアミノ酸変異の特徴およびインターフェロン(IFN)感受性の検討

(2) 変異型HCVのprotease inhibitor感受性および耐性株出現の検討を行った。

B. 研究方法

Genotype 1b型の急性重症C型肝炎患者の血清よりHCV全長（HCV KT9）をクローニングした。このHCV KT9はコア領域のaa 70およびaa 91にそれぞれR70Q

およびL91Mのアミノ酸変異を認めた。一方、NS5AのISDR領域には変異を認めなかった。KT9クローン(Core-Mutant)あるいはコア領域のaa 70およびaa 91のアミノ酸変異を野生型のもどしたクローン(Core-Wild)を作製した。全長cDNAを挿入したplasmidより、in vitro transcription法によりRNAを合成し、30 ugのRNAをヒト肝細胞キメラマウスの肝臓内に直接注入し、感染成立率、血中HCV RNA量、さらに1000 IU/gのIFN- α を2週間連日投与し、HCV RNAの減少量を比較検討した。

さらに、KT9クローンのNS3領域にprotease inhibitor耐性であるA156S変異を挿入したクローン(KT9-NS3-A156S)も同様に作成し、マウス肝臓内に投与した。

C. 結果

Core-Mutant および Core-Wild の投与による感染成立 (real-time PCR にて血中 HCV RNA が定量可能) 率は 93% (26 頭/28 頭) vs 94% (16 頭/17 頭) であり同程度であった。感染が成立したマウスでの血中 HCV RNA も同程度であった。Core-Mutant 感染マウスおよび Core-Wild 感染マウスでの IFN- α の 2 週間投与による血中 HCV RNA 低下量は、 $-1.9 \log$ vs $-1.8 \log$ (ヒト肝細胞 A 移植マウス) および $-0.8 \log$ vs $-0.9 \log$ (ヒト肝細胞 B 移植マウス) であり、同程度の IFN 感受性を示した。

KT9-NS3-A156S 変異クローンを用いた感染マウスは、KT9 クローンを投与したマウスに比べ、血中 HCV RNA は明らかに低値であり、protease inhibitor 耐性クローンは複製効率が低下していることが示唆された。これらのマウスに 400-600 mg/kg/日の telaprevir を 2-4 週間連日経口投与したところ、KT9 クローン感染マウスでは血中 HCV RNA は著明に低下したが、NS3-A156S 変異感染マウスでの HCV RNA 低下量は軽度であり、A156S 変異は明らかに telaprevir 耐性を示した。KT9 クローン感染マウスでは、telaprevir 投与中、V36A 変異の出現により、telaprevir の効果が減弱するマウスが存在した。

D. 考察

Peg-IFN- α + リバビリン併用療法あるいは IFN- α + リバビリン併用療法において、HCV の core 領域の aa70 および 91 番のアミノ酸変異は、治療抵抗性であることが報告されている。しかし今回のわれわれの検討では Core の野生型および変異型では感染成立、ウイルス複製、IFN 感受性において同程度であった。これらの結果から、Core 変異と治療効果の違いにはリバビリンの関与も考えられ今後検討が必要である。Protease inhibitor は今後 C 型肝炎患者に対する治療薬として期待されているが、単独投与では効率的に耐性株が出現する。投与中、新たな変異株が出現した場合、本システムを用いて変異型ウイルスの薬剤耐性の検討が可能になると思われた。

E. 結論

種々の変異を挿入した変異クローンを用いて、変異 HCV 感染マウスの作成が可能であり、これらのシステムを用いて、変異ウイルスの生物学的特徴および抗ウイルス剤の治療効果の検討が可能である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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;89:2108-13.

- Mori N, Imamura M, Kawakami Y, Saneto H, Kawaoka T, Takaki S, Aikata H, Takahashi S, Chayama K.

A randomized trial of high-dose interferon- α -2b combined with ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2009, 81:640-649.

- Noguchi C, Imamura M, Tsuge M, Hiraga N, Mori N, Miki D, Kimura T, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. G to A

hypermutation in hepatitis B virus and clinical course of patients with chronic hepatitis B. *J Infectious Dis.* 2009, in press.

2. 学会発表

- 今村道雄, 岩尾英治, 茶山一彰. HCV 感染モデルマウスを用いた VX-950 の治療効果および耐性株出現の検討. 第 44 回日本肝臓学会総会 松山 平成 20 年 6 月 5 日.
- 木村俊之, 今村道雄, 平賀信彦ら. HCV クローンを用いた genotype 1b 型 HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウス. 44 回日本肝臓学会総会 松山 平成 20 年 6 月 5 日.
- 三木大樹, 今村道雄, 木村俊之ら. HCV 感染モデルマウスを用いた HCV Core および ISDR 領域のアミノ酸変異とウイルス感染性の検討. 44 回日本肝臓学会総会 松山 平成 20 年 6 月 5 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況
今回の研究内容については特になし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, <u>Chayama K.</u>	Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice.	J Gen Virol	89	2108-13	2008
Mori N, Imamura M, Kawakami Y, Saneto H, Kawaoka T, Takaki S, Aikata H, Takahashi S, <u>Chayama K.</u>	A randomized trial of high-dose interferon- α -2b combined with ribavirin in patients with chronic hepatitis C.	J Med Virol.	81 (6)	640-9	2009
Noguchi C, Imamura M, Tsuge M, Hiraga N, Mori N, Miki D, Kimura T, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato K, <u>Chayama K.</u>	G to A hypermutation in hepatitis B virus and clinical course of patients with chronic hepatitis B.	J Infectious Dis	In press		
Tsukada H, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Fujimoto Y, Tsuge M, Takahashi H, Kumada H, Kamatani N, Nakamura Y, <u>Chayama K.</u> Hiroshima Liver Study Group; Toranomon Hospital	A Polymorphism in MAPKAPK3 Affects Response to Interferon Therapy for Chronic Hepatitis C	Gastroenterology	In press		2009
Kawaoka T, Kawakami Y, Tsuji K, Ito H, Kitamoto M, Aimitsu S, Kawakami H, Jeong SC, Imamura M, Aikata H, Takahashi S, <u>Chayama K.</u>	Dose comparison study of pegylated Interferon- α -2b plus ribavirin in naïve Japanese patients with hepatitis C virus genotype 2: A randomized clinical trial.	J Gastroenterol	19		2008