

200831028A

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

肝炎ウイルスワクチン実用化のための  
基盤的研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石井 孝司

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

肝炎ウイルスワクチン実用化のための  
基盤的研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石井 孝司

平成21(2009)年 3月

## 目次

### I. 総括研究報告

- 肝炎ウイルスワクチン実用化のための基盤的研究 ..... 1  
石井 孝司

### II. 分担研究報告

1. ウイルス抗原産生系、ウイルス粒子大量精製法およびウイルス免疫法の  
開発と感染中和機構の解析 ..... 23  
中村 紀子
2. 感染中和に重要なHCVの初期感染過程の解析 ..... 27  
脇田 隆宇
2. プラスミドトランスフェクションによる効率の良いHCV trans-packaging  
システムの確立 ..... 37  
鈴木 亮介、石井 孝司
4. HCV 大量培養法にむけた JFH-1 株の培養細胞内適応変異の解析 ..... 40  
加藤 孝宣
5. ワクチン評価のための霊長類C型肝炎サロゲートモデル開発の基盤研究 .. 44  
明里 宏文
6. HCV の宿主免疫応答に基拠するワクチン開発 ..... 51  
松本 美佐子

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 53

- IV. 研究成果の刊行物・別冊 ..... 59

## I. 総括研究報告

総括研究報告書

## 肝炎ウイルスワクチン実用化のための基盤的研究

研究代表者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 室長 石井 孝司

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のワクチン開発が進まなかった最大の理由は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかつたことである。我々が分離した JFH-1 株により初めて HCV のウイルス培養が可能となった。本研究では、HCV の予防的及び治療的ワクチンの実用化に向けた研究と共に、ウイルス感染および中和に関する基盤的研究を進める。ワクチン開発により C型肝炎の予防が可能となるだけでなく、HCV の感染過程の解明による新たな治療標的が探索できることも期待できる。

分担研究者 脇田 隆宇

国立感染症研究所ウイルス第二部  
部長

分担研究者 明里 宏文

医薬基盤研究所 薬長類医科学研究  
センター  
室長

分担研究者 加藤 孝宣

国立感染症研究所ウイルス第二部  
室長

分担研究者 中村 紀子

東レ株式会社医薬研究所  
主任研究員

分担研究者 松本 美佐子

北海道大学大学院医学研究科  
准教授

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は持続感染化し肝臓癌に至る重大な感染症であり、現在のウイルス保有者数は世界中で1.7億人（HIV感染者の4倍）にのぼると言われているが、インターフェロン及びビリパピリンの治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少したが、医療従事者などハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。さらに薬物常用者のHCV感染やHIV感染者のHCV重感染の予防が必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待され、HCVのワクチン開発が望まれている。

これまでにHCVのワクチン開発が進まなかった大きな理由の1つは、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかつたためである。LohmannらがCon1株のHCVレプリコンを開発して以来、培養細胞でHCV複製に関する研究が可能となった。しかし、Con1株のHCV全長遺伝子を導入したレプリコンでもウイルス粒子は分泌されなかつた。一方、我々が劇症肝炎患者から分離したJFH-1株は、これまでのHCV株と比較して培養細胞における複製能力が

非常に高く、このJFH-1株の合成全長RNAを培養細胞に導入することにより感染性のウイルス粒子を分泌した。我々はこれまで、このJFH-1株によるウイルス感染系を用いてウイルス感染中和アッセイ系を樹立し、また本ウイルスを精製して小動物に接種し、その血清がHCVの感染中和活性を有することを示してきた。本研究では以上の研究成果を踏まえ、HCVの感染予防ワクチンの実用化に向けた検討を行うと共に、ウイルス感染過程および感染中和機構の解析、さらに動物モデルの開発を進める。

初年度は精製ウイルス粒子の大量生産に必要な技術開発を行う。

1. ウイルス培養系におけるウイルス産生の向上とウイルス精製法の開発
2. ヒト肝臓細胞を持つキメラマウスにはHCVが感染することが示されており、このマウスを用いて、生体における中和抗体の感染防御能を検討する。
3. 中和抗体のエピトープ解析によりHCV表面蛋白質の感染中和に重要なアミノ酸配列を同定する。異なるウイルス株における共通エピトープを探索する。

## B. 研究方法

### 1. HCV エンベロープ蛋白質の作製

E1, E2 蛋白質をコードする遺伝子から、これらの蛋白質の C 末端に存在する膜貫通ドメインをコードする核酸配列を除去し、翻訳された蛋白質を細胞外へ分泌するために必要なシグナルペプチドをコードする配列を付加した。さらに、これらの蛋白質の精製を容易にするために、N 末端に FLAG ペプチドを付加させたベクター、

あるいはC末端にヒト IgG Fc ポリペプチドを付加したベクターを作製した。エンベロープ蛋白質は、遺伝子型 2a の JFH-1 および J6CF、遺伝子型 1b の TH, J1 および Con1、遺伝子型 1a の H77 を使用した。

### 2. HCV 粒子大量精製

HCV 粒子の精製には、限外濾過膜、蔗糖密度勾配超遠心法、ゲル濾過クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた。ウイルス量は定量的 RT-PCR およびコア蛋白質の EIA にて測定した。

### 3. エンベロープ蛋白質およびウイルス粒子の免疫法

J6CF 株由来の E2 蛋白質とヒト IgG の Fc 部分とのキメラ蛋白質(J6E2-Fc)および紫外線照射にて不活化した部分精製 J6/JFH-1 粒子をフロイントの完全アジュバント、Alum など種々のアジュバントを用いて調製し、Balb/c マウスに投与して抗 E2 抗体誘導活性を EIA にて定量した。また、これらの一部のマウスを用いて、モノクローナル抗体を作製した。

### 4. モノクローナル抗体の解析

JFH-1 由来 E2 蛋白質、J6CF 由来 E2 蛋白質、JFH-1 粒子および J6/JFH-1 粒子を免疫したマウスより作製した各種抗 E2 蛋白質モノクローナル抗体のエピトープを解析するために、エンベロープ蛋白質の 10 個の連続するアミノ酸を N 末端から 3 アミノ酸ずつずらして合成したのペプチドを EIA プレートに固相化し、次いで各種モノクローナル抗体を加え、モノクローナル抗体が結合するペプチドをスクリーニングした。

### 5. ウイルス粒子の構造解析

これまで開発した精製法により精製したウイル

ス粒子は夾雑物が多く構造解析、中和活性解析が困難だった、そこで夾雑物を減らす目的でさまざまな濃度で界面活性剤を添加した後に蔗糖密度勾配によりウイルスをさらに精製した。精製ウイルス粒子を電子顕微鏡で観察した。

#### 6. HCV エンベロープ蛋白質の精製

HCV エンベロープ蛋白質 (E1 および E2) は糖鎖による修飾を受けるため、リコンビナント蛋白質による構造解析が進まなかった。そこで、一部の糖鎖修飾酵素が欠損した培養細胞を用いて E1 および E2 蛋白質を精製した。

#### 7. プラスミドトランスフェクションによる効率の良い HCV trans-packaging システムの確立

HCV (JFH1 株) の core から NS2 領域の cDNA を pCAGGS に組み込んだ pCAG C-NS2 および、E2、p7、NS2 にそれぞれ変異 (N417S、N765D、Q1012R) を導入した pCAG C-NS2 mut を作製した。また JFH1 株のレプリコン (構造蛋白質領域を欠損し、EMCV-IRES および F luc 遺伝子を挿入したもの) cDNA を polI promoter/terminator 間に挿入し、pHH JFH1 SGR-Fluc を作製した。これらのプラスミドを Huh-7 細胞へトランスフェクションし、その培養上清をさらに naïve な Huh-7 細胞に感染させ、3 日後の細胞のルシフェラーゼ活性を測定する事により、上清中の感染価を評価した。

#### 8. HCV JFH-1 株の長期培養による細胞内適応変異の同定とその評価

JFH-1 株の全長 RNA を Huh7.5.1 細胞に導入し、長期培養することにより、JFH-1 株の培養細胞内適応変異を誘導し、ダイレクトシーケンス法にてその変異を同定した。さらに同定された変異を JFH-1 株に再導入することにより、それらの

変異が JFH-1 株の培養細胞内での増殖に与える影響を検討した。

#### 9. JFH-1 株チンパンジー接種で認められた適応変異が培養細胞中での増殖に与える影響の評価

培養細胞内で生成された JFH-1 株ウイルスと JFH-1 株が分離された患者血清をチンパンジーに接種し感染実験を行なった。その結果、両方のチンパンジーで感染が確認され、感染しているウイルスの全 ORF をダイレクトシーケンス法で解析したところ、共通の変異が一カ所同定された。この NS2 領域の共通変異を生体中での適応変異と考え、培養細胞中でこの変異の JFH-1 株の増殖に与える影響を検討した。

#### 10. 新世界ザルへの GBV-B 感染実験

pGBB から in vitro transcription により得られたウイルスゲノム RNA をサルに接種後 4 週で全採血した plasma を以後のウイルス接種用ストックとした。ウイルス感染サルよりケタミン麻酔下で定期的に採血し、得られた血液について血清生化学検査、plasma 中ウイルス量及び抗体価測定を行った。血液および組織中のウイルス RNA 量測定はリアルタイム PCR 法を用いた。pGBB よりサブクローニングした Core 発現ベクターを導入した大腸菌からリコンビナント Core 蛋白質を得て、これによる ELISA 系を構築して抗体価測定を行った。plasma 中ウイルスゲノムより作成した cDNA を用いて、ゲノム DNA シークエンスを行ない、接種クローンの核酸及びアミノ酸配列と比較検討した。

#### 11. HCV と GBV-B のキメラウイルス構築

HCV-1b 由来感染性クローンである TPF1 および pGBB を基にキメラ c156-E1/E2 を構築した。同キメラクローンおよび TPF1, pGBB から得たウイルスゲノム RNA を Huh-7 細胞及びマーマセット初代

肝細胞にトランスポフェクションし、細胞及び培養上清中のウイルスコア蛋白を ELISA 法を用いて定量した。

## 12. 外因性dsRNAによる骨髄系樹状細胞を介したNK細胞活性化機構の解析

TLR3 KO, TICAM-1(別名TRIF) KO, WTマウスのBMDCをpoly(I:C)で刺激しgene chip解析を行った。TLR3-TICAM-1依存的に発現が上昇する遺伝子を探索し、NK, CTL 活性化に関与する遺伝子を同定する。また、骨髄系樹状細胞のTLR3-TICAM-1活性化におけるとりこみ機構の関与を阻害剤等により解析した。

### (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. エンベロープ蛋白質の作製

エンベロープ蛋白質のN末端側にFlag蛋白質とC末端にFc蛋白質を付加したキメラ蛋白質を作製した。COS-1細胞での一過的な発現では、Fc蛋白質とのキメラからなるエンベロープ蛋白質

は発現量が高く、1~2mg/Lであった。

本エンベロープ蛋白質発現系は、抗HCV抗体の評価用の抗原として有用であり、本抗原を用いて、HCV抗体検出用EIA系を構築した。

### 2. HCV粒子大量精製

限外濾過膜を用いた濃縮、ゲルろ過クロマトグラフィ、蔗糖密度勾配遠心、陰イオン交換クロマトグラフィなどを用いて粒子を大量精製する手法を検討した。500kDa蛋白質を通過するポアサイズのホローファイバーでの除蛋白、分画範囲が小さいゲル濾過担体の使用により効率的に除蛋白が可能となり、陰イオン交換クロマトによりさらに夾雑蛋白を除くことができた。また、蔗糖密度勾配では感染性及非感染性粒子が分画できる可能性が示された。

### 3. アジュバントの選定

抗HCV抗体を誘導をより促進するアジュバントを検討した結果、その効果が強いアジュバントを2種類選定できた。現在これらについて、誘導される抗体のタイプ、中和活性の強さなどを検討している。

### 4. モノクローナル抗体のエピトープ解析

JFH-1ウイルスを投与したマウスから作製されたHCVの感染を阻害するモノクローナル抗体JF/M1-4(IgM,  $\mu$ )が認識するエピトープを解析した。その結果、WLTPKCLVHYPYRLWHYPCの配列を認識することが判明した。この配列は、JFH-1のE2蛋白質の606番目から624番目に位置し、新たな中和エピトープであることが示唆された。

一方、J6FC由来のE2蛋白質を投与したマウスからもモノクローナル抗体を作製した。モノクローナル抗体8D10-3は遺伝子型1a,1b,2aのE2蛋白質に、モノクローナル抗体4E8-8は遺伝子型1b,2a



の E2 蛋白質に、モノクローナル抗体 1G2-32 又は 2F2-7 は遺伝子型 2a の E2 蛋白質に結合することが判明した。

#### 5. ウイルス粒子の構造解析

JFH-1 および J6/JFH-1 ウイルスの全長 RNA を培養細胞に導入して、培養液中に分泌されたウイルス粒子を限外濾過法により濃縮した。さらに蔗糖密度勾配遠心法で精製したウイルス粒子に NP40 を添加し、4℃でインキュベーションした。そのウイルス粒子をもう一度蔗糖密度勾配遠心法で精製した。このウイルス粒子の総蛋白濃度は非常に低く、電子顕微鏡観察ではバックグラウンドの低い明瞭なウイルス粒子像が得られた。

#### 6. HCV エンベロープ蛋白質の精製

E2 遺伝子の 3' 端の膜貫通領域を欠損し、5' 端に FLAG タグ配列を挿入し、哺乳細胞プロモーターの下流に挿入した発現プラスミドを作成した。293 細胞および GnTI 糖転移酵素が欠損した 293GnTI(-)細胞に E2 発現プラスミドをトランスフェクションし、培養上清中の E2 蛋白質を FLAG 抗体カラムで精製した。293 細胞で発現した E2 蛋白質はブロードな分子量を示したが、GnTI(-)細胞で発現させると単一のシャープな分子量を示した。この精製 E2 蛋白質はリコンビナント CD81 蛋白に結合し、Huh7 細胞の表面にも結合することを確認した。しかし、ウイルス感染実験にこの精製 E2 蛋白質を添加しても感染阻害活性は検出できなかった。

#### 7. プラスミドトランスフェクションによる効率の良い HCV trans-packaging システムの確立

HCV の発現プラスミドおよびレプリコンプラスミドを同時に Huh-7 細胞にトランスフェクシ

ョンした細胞の上清を径時的に回収し、これをさらに naïve な Huh-7 細胞に感染させ、3 日後にルシフェラーゼ活性を測定したところ、陰性コントロール群に比べ顕著に高い活性が認められた。このことから、2つのプラスミドのトランスフェクションにより、HCV のレプリコンゲノムがパッケージングされた感染性粒子が産生されたものと考えられた。また変異型構造蛋白質発現プラスミドを用いた群では、野生型に比べ、より高いルシフェラーゼ活性が認められたことから、これらの変異は感染性粒子の産生効率の向上に寄与するものと考えられた。さらにこの感染は HCV と同様に抗 CD81 抗体により阻害されたことから、この粒子の感染様式は HCV と同様のメカニズムによる事が示唆された。

#### 8. HCV JFH-1 株の長期培養による細胞内適応変異の同定とその評価

JFH-1 株の長期培養により得られたウイルスは、培養細胞に同じ感染力価のウイルスを感染させた場合、通常の JFH-1 株ウイルスと比べ培養上清中・培養細胞内ともに、より高い HCV RNA 量を示し、通常の JFH-1 株よりも高い増殖能を獲得していると考えられた。ダイレクトシーケンスの結果、E2 の Hyper Variable 領域、NS3 領域、NS5b 領域にそれぞれ一つずつ変異を認めた。これらの変異を一つずつ JFH-1 株に導入したコンストラクトを作製し、このコンストラクトから得られた全長 RNA を Huh7.5.1 細胞に導入し変異を持ったウイルスを作製した。そのウイルスを感染力価を合わせ感染させたところ、通常の JFH-1 株に比べやや高い増殖力を示したが、長期培養による適応ウイルスのレベルには達していなかった。さらにこれらの変異をすべてを持ったウイルスを作製し比較して

みたところ、それぞれ単一の変異を持ったウイルスよりは強い増殖能を示したが、やはり長期培養による適応ウイルスのレベルには達していなかった。

#### 9. JFH-1 株チンパンジー接種で認めた適応変異が培養細胞中での増殖に与える影響の評価

JFH-1 株チンパンジー接種で認めた適応変異 G838R を JFH-1 株に導入し、培養細胞中での増殖能を比較検討した。その結果、G838R 変異株は通常の JFH-1 株に比べ、培養上清中、細胞中ともに高い HCV RNA 量を示し、強い増殖能を持つものと考えられた。そこで、この変異が JFH-1 株の培養細胞内でのライフサイクルのどの過程に影響しているかを検討するため、Huh7-25 細胞を用い、シングルラウンドの HCV 生成実験を行った。この細胞は、HCV の増殖は可能であるが、感染に必要な CD81 の発現が欠如しているため再感染ができない。この検討の結果、G838R 変異株は培養細胞中で HCV RNA あたりの感染力価が高く、通常の JFH-1 株に比べ効率的にウイルス粒子が形成されていると考えられた。培養細胞内と細胞外の感染力価の比からは、ウイルス粒子の分泌効率に差がないと考えられた。

さらにこの変異の他の株に与える影響を検討するため、JFH-1 株の構造領域を J6CF 株に置換した J6/JFH-1 キメラ株にこの変異を導入し、培養細胞内でのウイルスの増殖を検討した。その結果、J6/JFH-1 キメラ株ではウイルス粒子形成効率の亢進は認められず、この変異の効果は JFH-1 株の構造領域の配列に特異的なものであると考えられた。

#### 10. 新世界ザルへの GBV-B 感染実験

GBV-B 感染マームセット 4 頭のうち、持続感

染例である Cj05-002, Cj05-004 では、感染初期より現在まで、ウイルスゲノム RNA が間歇的に検出されている。どちらのケースでも、抗 NS3 抗体価はほぼ感染 1 年経過後プラトーに達しその後高いレベルで維持されており、2 例に共通して、抗 NS3 抗体価上昇が遅延すると共にその後高いレベルで維持されている。この抗 NS3 抗体価推移は、GBV-B 持続感染の予測マーカーと捉えることができる。肝炎マーカーである ALT 値を見ると、どちらの持続感染個体においても間歇的な上昇が認められ、また多くの場合この上昇は血中ウイルス RNA 量とほぼ相関していた。従って慢性 HCV 感染と同様に、肝臓でのウイルス増殖に伴う CTL 活性化により肝細胞傷害が生じていることが示唆される。以上の結果より、GBV-B はマームセットにおいて長期持続感染し慢性肝炎を呈することが明らかとなった。

次に持続感染個体におけるウイルスゲノムシーケンスについて経時的に比較解析を行ったところ、RNA レベルでは、どちらの個体由来ウイルスでも変異率は HCV における場合とほぼ同程度であった。遺伝子領域では全般的にはあまり顕著な偏りは見られないのに対し、アミノ酸置換変異について見ると、変異領域に強い偏りを見出した。このことから、ウイルス蛋白領域によって非常に強い選択的なアミノ酸置換を伴う変異が生じていたことが明らかとなった。

33w/45w で見られるアミノ酸変異はほとんどの場合が 2 個体間で共通しており、またそれ以降もほぼそのまま維持されていた。従ってこれらの変異は主としてマームセット個体でのウイルス増殖に有利な機能的適合変異によるものと考えられる。一方 88w/104w および 135w/141w では、1 年目で

見られなかった新たなアミノ酸置換変異を多数獲得していた。特に、復帰変異や連続変異が認められ、このことは GBV-B が長期持続感染において抗ウイルス免疫に対するエスケープ変異を獲得していること、そしてこれら復帰・連続変異を生じたアミノ酸領域は抗ウイルス免疫応答における重要なエピトープであり、この領域への選択的アミノ酸変異がマーマセットにおけるウイルス再顕在化・長期持続感染に重要な役割を担っていることが示唆された。

#### 11. HCV と GBV-B のキメラウイルス構築

HCV-1b 由来感染性クローンである TPF1 および pGBB を基に、Core 領域 C 末端より p6 領域まで GBV-B 由来であるキメラクローン c156-E1/E2 を構築した。同キメラクローンおよび TPF1、pGBB から得たウイルスゲノム RNA を Huh-7 細胞にトランスフェクションし、細胞及び培養上清中のウイルスコア蛋白を ELISA 法を用いて定量した。その結果、c156-E1/E2 は TPF1 より程度は低いものの細胞内及び培養上清中にウイルスコア蛋白が産生されていることが示された。逆に、マーマセット初代肝細胞では c156-E1/E2 の方が TPF1 より高いレベルのウイルスコア蛋白が培養上清中に検出された。以上のことから c156-E1/E2 は少なくとも蛋白合成過程までは機能していることが示された。

#### 12. 外因性 dsRNA による骨髄系樹状細胞を介した NK 細胞活性化機構の解析

(1) WT で優位に発現が上昇しており、かつ TLR3 KO、TICAM1 KO マウスで発現が低下している 519 遺伝子のうち、特に発現誘導が強いもので、膜貫通領域をもつ 9 遺伝子を選択した。GFP を発現するレンチウイルスを用いた BMDC への強

制発現系と、shRNA を発現するレンチウイルスによる候補遺伝子のノックダウンにより、新規 NK 活性化分子を同定した。フローサイトメトリー、免疫染色により、細胞膜に局在することを確認した。この分子を BMDC に過剰発現させ NK 細胞と共培養すると、NK 細胞の細胞傷害活性が上昇し、IFN-g 産生が検出された。更に、BMDC でこの分子をノックダウンすると、poly(I:C) 刺激で NK 活性化が起きなかった。以上より、骨髄系樹状細胞の TLR3-TICAM-1 シグナルにより新規 NK 細胞活性化分子が発現すること、cell-cell contact により NK 細胞を活性化し細胞傷害活性、IFN-g 産生を誘導しうることが明らかとなった。

(2) 種々のエンドサイトーシス阻害剤と dsRNA を用いた実験より、骨髄系樹状細胞の TLR3 活性化は poly(I:C) で誘導されるが、in vitro transcribed dsRNA では誘導されないこと、dsRNA は取り込み段階で選別され TLR3 が局在するエンドソームへ輸送されること、poly(I:C) は受容体を介してクラスリン依存的エンドサイトーシスで取り込まれることが判明した。

#### D. 考察

HCV のワクチン開発が進んでこなかった理由は HCV のウイルス培養系が存在しなかったことである。JFH-1 株を用いた実験系により感染性ウイルスを用いた実験が可能となった。組換え型エンベロープ蛋白質は動物中の抗体価の測定、抗 HCV 抗体のスクリーニング、エピトープ解析、抗体が認識する遺伝子型の特異性解析など HCV のワクチン効果を判定するために必須のツールである。我々の検討で、HCV のエンベロープ蛋白質を動物細胞で効率的に作製するためには、IgG の Fc

部分と融合させたキメラ蛋白質として作製することが良いことが示された。Fc 蛋白質と比較して、Flag 蛋白質は 10 倍以上効率が悪かった。Fc 蛋白質と融合させることで、エンベロープ蛋白質が安定になるのかもしれない。

精製工程については、各工程の精製効率について検討してきた。その結果、各工程の最良な方法が決まりつつある。今後、どのような組合せで精製を行うかについて検討を重ねる必要がある。さらに、HCV ウイルスの純品をどのように定義するかが課題として残る。この問題を解決するために、E2 蛋白質に Flag エピトープを導入して、Flag を指標に HCV 粒子を精製するシステムについても検討しているため、これらの結果と合わせて、HCV の純品について明らかにしていく。

また、10-60%蔗糖密度勾配超遠心法で、感染性粒子と非感染性粒子が存在することを見出した。ウイルスの感染性は脂質が関与していることが報告されている。我々が見出した感染性粒子と非感染性粒子の違いは脂質であるのか、興味ある課題であり、現在さらに検討している。

E2 蛋白質および HCV 粒子を用いてワクチン効果の高いアジュバントについて検討した。E2 蛋白質を認識する抗体の誘導について、効果的なアジュバントが見出されつつある。今後中和活性抗体の誘導について検討する必要がある。

モノクローナル抗体のエピトープ解析から新たな中和抗体のエピトープが見出された。さらに中和活性の強いモノクローナル抗体の取得とそのエピトープ解析を通して、どの遺伝子型の HCV でも中和することの出来る抗体とエピトープを明らかにする。

感染初期過程に重要なウイルス粒子の表面構造およびエンベロープ蛋白質の構造解析に関連する研究をおこなった。ウイルス粒子の構造を解析するためには精製したウイルス粒子のクライオ電子顕微鏡解析あるいは結晶解析が必要である。HCV のウイルス培養の産生量を考えると、まずクライオ電顕解析を目指すことが妥当と考えられる。これまでの精製法に加えて界面活性剤を加えることにより精製度を高めることが可能であった。現在、精製粒子の電子顕微鏡解析を進めている。

また、エンベロープ蛋白質は糖鎖修飾が多いため結晶解析による構造解析が困難だったが、糖鎖転移酵素欠損細胞株を使用することにより単一の分子量を示す E2 蛋白質を得ることができた。現在この蛋白質の結晶化を行うと共に、マウスに免疫して中和抗体誘導能を検討中である。

HCV の構造蛋白質発現プラスミドおよびレプリコンプラスミドを Huh-7 細胞にトランスフェクションする事により、感染性を有する HCV 様粒子の産生が認められた。この粒子は、trans に供給された構造蛋白質に、複製するウイルスゲノムが packaging されたものであると考えられる。従ってこの系を用いれば、他の遺伝子型の粒子形成についても迅速な評価が可能となるものと考えられる。またこのシステムは、HCV の生活環の中でも、HCV のゲノムパッケージングや粒子形成等のステップを解明するのに有用であるばかりでなく、薬剤のスクリーニングにも利用可能であると考えられる。さらに今回の HCV 様粒子作製法の確立は、安全性が高く、CTL の誘導が可能なワクチン開発へ道を拓くものと期待される。

HCV JFH-1 株の培養細胞内、生体内で得られた適応変異の影響を検討し、培養細胞内でこの株の

増殖を強化する変異を同定し得た。培養細胞内で JFH-1 株を長期培養することにより得られた適応変異は、JFH-1 株の増殖能を強化していたが、適応したウイルスの増殖能には及ばず、他の何らかのファクターが関与していると考えられた。一方、生体内で得られた適応変異は JFH-1 株の培養細胞内でのウイルス粒子形成効率を亢進していた。この変異の導入により JFH-1 株の培養細胞での生成効率の増加が期待できるが、この変異の効果は JFH-1 株のみであり、他の株を用いる場合は別の変異が必要であると考えられた。今後、詳細な検討を行うことによりさらに強い増殖能を持ったウイルス株の同定を目指す。

GBV-B はマーモセットにおいて3年という長期に渡り持続感染することが明らかとなった。また本例ではヒトにおける HCV 感染例で見られる間欠的(回帰的)ウイルス血症が認められた。このことは、少なくともマーモセットでは、非常に低レベルの(検出限界以下の)ウイルス複製状態でも完全には排除されず生体内で潜伏感染し、何らかの刺激もしくはウイルスゲノム変異といった要因により再活性化しうることを表わしている。この低レベルでのウイルス変動は抗ウイルス獲得免疫応答によるウイルス増殖抑制作用が原因と考えられる。復帰変異や連続変異が生じた領域は CTL や中和抗体エпитープであり、こうした抗ウイルス免疫応答からのエスケープ変異がウイルス再顕在化・持続感染に重要な役割を担っていることが示唆される。このような現象は、慢性 HCV 感染者の場合に認められており、GBV-B 慢性化は HCV のそれと同様の機序によることが示唆された。これらの結果を踏まえ、今後は中和抗体および CTL エピトープ

の解析を行ないワクチン評価に向けた測定系を確立していくと共に、慢性化を決定する要因について検索を進めていきたい。

HCV に対するワクチンの有用性を動物モデルレベルで検討するに当たり、チンパンジーが使用できない限り、実験用サル類に感染増殖可能な HCV/GBV-B キメラウイルスが最も現実的なモデルであると考えられ、HCV の代用モデルとして GBV-B 研究が進捗することにより、HCV と GBV-B キメラウイルス構築における分子基盤が得られるものと期待される。今回の我々の予備の結果では、GBV-B 由来 E1/E2 を含むキメラクローンは少なくとも蛋白合成までは大きな障害が見られないことが示唆された。今後はさらに多様なキメラクローンを構築していくとともに、より詳細なウイルスライフサイクルにおける解析を進め、最終的にサルに感染性を有するクローンの構築を目指したい。

HCV 感染細胞では、NS3/4A による IPS-1 切断により RIG-I を介した IFN- $\alpha/\beta$  産生経路が遮断されることが報告されている。我々はこれまでに、HCV は樹状細胞に感染しないこと、HCV の dsRNA を含む感染細胞の debris が樹状細胞に取り込まれ TLR3-TICAM-1 経路を活性化し NK, T 細胞を活性化することを明らかにしてきた。HCV ワクチンの開発では、樹状細胞に働き、CTL, NK 活性化や抗体産生を高めるアジュバントの選択が重要である。TLR3-TICAM-1 シグナルは、抗原のクロスプライミングによる CTL 活性化を誘導するが、分子機構は不明である。また、骨髄系樹状細胞の TLR3 を活性化しうる dsRNA の構造や取り込みレセプターも未同定である。今後、CTL 誘導や dsRNA 取り込みの分子機構を明らかにし、アジュバント開発の基礎データを提示する予定である。

## E. 結論

- ① エンベロープ蛋白質発現系を開発し、その系で開発されたエンベロープ蛋白質を用いて、ワクチン効果を判定するためのHCV抗体検出系を作製した。
- ② HCV粒子の大量精製に適した精製法の各工程の精製条件を検討し条件を見出した。
- ③ E2蛋白質およびHCV粒子をマウスに免疫する系で、E2蛋白質に対する抗体の誘導を促進する2種類のアジュバントを見出した。
- ④ モノクローナル抗体のエピトープ解析から、新たな中和エピトープを見出した。
- ⑤ ウイルス粒子の精製法を改良することにより精製度の高いHCV粒子を得ることができた。
- ⑥ HCVの初期感染過程に重要な役割を果たすE2蛋白質の精製に成功した。
- ⑦ 2種類のプラスミドのトランスフェクションにより、single-roundな感染性HCV様粒子の産生に成功した。
- ⑧ JFH-1株の培養細胞内における増殖能に影響を与える遺伝子変異と、その変異がHCVのライフサイクルのどの過程に影響を与えているかの検討を行った。
- ⑨ マーモセットGBV-B感染モデルが慢性C型肝炎のモデル動物確立に向けたブレイクスルーとなる可能性を見出した。GBV-B/HCVキメラウイルスの構築と併せて今後の抗HCV薬・ワクチンの有効性評価系としてのみでなく、C型肝炎慢性化メカニズムを解明する上でも貴重な情報をもたらすものと期待される。
- ⑩ 骨髄系樹状細胞のエンドソームTLR3シグナルによるNK細胞活性化の分子メカニズムを明

らかにした。

## 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 $\gamma$ -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. Suzuki, R., Winkelmann, E.W., Mason P.W. Construction and characterization of a single-cycle chimeric flavivirus vaccine candidate that protects mice against lethal challenge with dengue virus type 2. *J. Virol*. 83: 1870-1880 (2009).
20. Omata, K., Suzuki, R., Masaki, T., Miyamura, T., Satoh, T., Suzuki, T. Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter. *Apoptosis*. 13: 929-937 (2008).
21. Suzuki, R., Fayzulin, R., Frolov, I., Mason P.W. Identification of mutated cyclization sequences that permit efficient replication of West Nile virus genomes: Use in safer propagation of a novel vaccine candidate. *J. Virol*. 82: 6942-6951 (2008).
22. Murakami, K., Inoue, Y., Hmwe, S.S., Omata, K., Hongo, T., Ishii, K., Yoshizaki, S., Aizaki, H., Matsuura, T., Shoji, I., Miyamura, T., Suzuki, T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *J. Virol. Methods*. 148: 174-181 (2008).
23. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Ami Y., Fukushi S., Taguchi F. and Tsunetsugu-Yokota Y. Vaccine-induced neutralizing antibody against SARS-CoV Spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. *Microbiology and Immunology* 53: 75-82 (2009).
24. Shirato H., Ogawa S., Ito H., Sato T., Kameyama A., Narimatsu H., Zheng X., Miyamura T., Wakita T., Ishii K. and Takeda N. Noroviruses distinguish type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *Journal of Virology* 82: 10756-10767 (2008)
25. Nakajima T, Ohtani H, Satta Y, Uno Y, Akari H. Ishida T, Kimura A: Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution. *Immunogenetics* 60, 727-735, 2008.
26. Hohjoh H, Akari H. Fujiwara Y, Hirai H, Wada K: Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene. *Gene* 432, 60-66, 2009.
27. Akari H. Iwasaki Y, Yoshida T, Iijima S: Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection. *Microbiology and Immunology* 53, 53-57, 2009.
28. Seya, T., Matsumoto, M. 2009. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* DOI 10.1007/s00262-008-0652-9
29. Seya, T., Matsumoto, M., Ebihara, T., and Oshiumi, H. 2009. Functional evolution of the TICAM-1 pathway for extrinsic RNA sensing. *Immunol. Reviews* 227: 44-53.
30. Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S., Seya, T. 2009. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- $\beta$  induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* 284: 807-817.



31. Itoh K., Watanabe, A., Funami, K., Seya, T., Matsumoto, M. 2008. The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN- $\beta$  production. *J. Immunol.* 181:5522-5529.
32. Matsuo A., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Seya, T. et al., 2008. Teleost Toll-like receptor 22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from Bimaviruses. *J. Immunol.* 181: 3474-3485.
33. Shingai, M., Ebihara, T., Matsumoto, M., Seya, T. et al., 2008. Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated interferon-beta induction. *Int. Immunol.* 20:1169-1180
34. Oshiumi, H., Matsuo, A., Matsumoto, M., Seya, T. 2008. Pan-Vertebrate Toll-like receptors during evolution. *Current Genomics* 9:488-493.
35. Fukuda, K., Watanabe, T., Seya, T., Matsumoto, M. et al., 2008. Modulation of double-stranded RNA recognition by the N-terminal histidine-rich region of the human Toll-like Receptor 3. *J. Biol. Chem.* 283: 22784-22794.
36. Funami, K., Sasai M., Oshiumi H., Seya T., and Matsumoto M. 2008. Homo-oligomerization is essential for Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 mediated NF- $\kappa$ B and IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* 283: 18283-18291.
37. Nakamura, M., Funami K., Matsumoto M., Seya T. et al., 2008. Increased expression of Toll-like receptor 3 in intrahepatic biliary epithelial cells at sites of ductular reaction in diseased livers. *Hepatol. Int.* 2: 222-230.
38. Shime, H., Yabu M., Akazawa T., Kodama K., Matsumoto M., Seya T. and Inoue N. 2008. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23-IL-17 proinflammatory pathway. *J. Immunol.* 180: 7175-7183.
39. Matsumoto M., and Seya T. 2008. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *ADDD* 60: 805-812.
40. Bas, S., Seya T, Matsumoto M. et al., 2008. The pro-inflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14. *J. Immunol.* 180: 1158-1168.
2. 学会発表
1. Wakita T., HCV replication and virus particle formation, The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, (2008 9/7-11)
2. Wakita T., Development of HCV culture system, Workshop/Hepatitis, The 7<sup>th</sup> Japan-China International Conference of Virology, Tokyo, Japan (June 1-3, 2008)
3. Wakita T., Hepatitis C virus replication and virus particle formation, Symposium: Emerging Viruses and the Control of Viruses, XIVth International Congress of Virology, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey
4. Aizaki H., Morikawa K., Fukasawa M., Hara H., Suzuki R., Tani H., Hanada K., Matsuura Y., Lai MMC., Miyamura T., Wakita T., Suzuki T. Critical

- in the viral infectivity, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey
5. Murakami K, Wakita T, et al. Identification of hnRNPH1 as a binding partner of hepatitis C virus core protein and the IRES III<sub>d</sub> region of viral RNA, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey
  6. Saeed M., Kato T., Wakita T. In vitro replication efficiencies of hepatitis C virus JFH-1 strain with mutations emerged in chimpanzee, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, (2008 9/7-11)
  7. Takahashi H, Omi N, Akazawa D, Nakamura N, Mochizuki H, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with the epitope-tagged envelope, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
  8. Uenishi R, Hakamata W, Nohtomi K, Liao H, Hase S, Suzuki T, Wakita T, Takebe Y. Identification of novel Small molecule HCV entry inhibitor that acts through CD81, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
  9. Munakata T, Wakita T, Nomoto A. Induction of hepatic TLR3 by E2F1 during hepatitis C virus infection, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
  10. Zeisel MB, Hoffmann M, Jilg N, Stoll-Keller F, Wakita T, Barth H, Henneke P, Baumert TF. Sensing of hepatitis C virus core by toll-like receptor 2 is shielded in enveloped viral particles, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
  11. Hamamoto I, Murakami K., Suzuki T., Taya K., Okabe N., Wakita T, Shoji I. ERGIC-53 regulates the HCV RNA replication through interaction with the viral NS3 protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
  12. Fukasawa M, Nakamura S, Nitahara-Kasahara Y, Shimotohno K, Suzuki T, Wakita T, Nishijima M, Mashino T, Anti-HCV activity of novel Fullerene derivatives, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
  13. Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M, A new human hepatoma cell line enabling persistent reproduction of HCV life cycle and assay for anti-HCV reagents, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
  14. Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Wakita T. Production and purification of HCV particles from serum-free culture, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
  15. Machida R, Tong S, Heintges T, Wakita T, Wands JR, Interruption of hepatitis C virus particle formation by an intracellular antibody targeting the viral core protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
  16. Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Li J, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure

- proteins, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
17. Ariumi Y, Kuroki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N, The vacuolar protein sorting pathway is essential for HCV budding, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
18. Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, The C-terminal serine cluster of NS5A is a determinant of NS5A-core protein interaction and HCV production, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
19. Watanabe N, Murayama A, Akazawa D, Tomonaga M, Date T, Kato T, Suzuki T, Wakita T, Purification and structural analysis of HCV E2 protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
20. Angus AGN, Dalrymple DA, Boulant S, McGivern DR, Wakita T, McLauchlan J, Lemon SM, Patel AH, Hepatitis C virus replication does not depend on the interaction between the viral core protein and the cellular RNA helicase DDX3, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
21. Shin K-S, Lim Y-S, Choi S-H, Wakita T, Hwang SB, Regulation of heat shock protein 70 by hepatitis c virus NS5A protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
22. Abe K, Murakami K, Takamiya S, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Shoji I, Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding partners for HCV core protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
23. Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N, Cyclophilins A and B mediate the anti-HCV activity of cyclosporine A in 1b/2a chimeric replicon-harboring cells, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
24. Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N, Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of oxidative stress, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
25. Murayama A, Date T, Akazawa D, Kato T, Suzuki T, Nomoto A, Wakita T, A single amino acid mutation in core region is important for efficient infectious virus particle production in genotype 2b/2a chimeric HCV, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
26. Seronello S, Ito C, Wakita T, Choi J, Ethanol enhances hepatitis c virus replication in human hepatoma cells supporting infectious virus production, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
27. Shoji I, Osaki M, Murakami K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Hotta H, Ubiquitylation signal of hepatitis C virus core protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)

28. Sir D, Chen W-L, Wakita T, Yen TSB, Ou J-HJ, Perturbation of autophagic response by hepatitis c virus, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
29. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Murakami K, Shoji I, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
30. Morikawa K, Akazawa D, Imawari M, Wakita T. The structural analysis of highly purified infectious HCV particles produced in cultured cells. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)
31. Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Suda G, Onuki Y, Yamamoto M, Wakita T, Watanabe M, Establishment and genetic analysis of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by plaque-forming assay. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)
32. Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, T Wakita, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzee is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)
33. Machida R, Tong S, Heintges T, Wakita T, Wands JR, Li J, Interruption of hepatitis C virus particle formation by an intracellular antibody targeting the viral core protein. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)
34. Omi N., Akazawa D., Takahashi H., Morikawa K., Date T., Ishii K., Suzuki T. and Wakita T. Inactivated recombinant HCV particle (JFH1 strain) immunization of mice could induce antibody response. 2nd Vaccine Congress, Boston, December 7-9, 2008
35. Ishii K. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. Novel Strategies for Viral Infection Control. Taipei, Taiwan, November 1, 2008
36. Li T.C., Ishii K. and Takeda N. Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases, Hanoi, Viet Nam, October 6, 2008
37. Ishii K., Hasegawa H., Nagata Y., Ami Y., Fukushi S., Taguchi F. and Tsunetsugu-Yokota Y. SARS-CoV Spike-reactive neutralizing antibody is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27. 2008
38. Ami Y., Ishii K., Tsunetsugu-Yokota Y., Nagata Y., Hasegawa H. and Taguchi F. Fatal exacerbated pneumonia of mice induced by co-infection of respiratory bacterium and SARS-CoV. XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27. 2008