

## 平成 20 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題： C 型肝炎ウイルスキャリア成立の分子基盤と新規治療薬開発のための基礎的研究

課題番号： H20-肝炎一般-011

主任研究者： 鈴木哲朗

### I. 研究の意義

- (1) HCV キャリアは我が国で 150～190 万人、世界には 17000 万人存在すると推計される。
- (2) HCV 感染は、慢性肝炎、肝硬変、肝がんの主要因である。
- (3) 現在の治療法の有効率は約 50%であり、新たな発症予防、治療法の確立が待望されている。

### II. 研究の目的、期待される成果

- (1) ウイルス側及び細胞側因子の関与を含め、HCV 生活環の制御機構を明らかにする。
- (2) HCV の持続感染、病原性発現の制御機構を明らかにする。
- (3) 新たな実験モデルの開発と創薬シーズの探索。

### III. 1 年間の研究成果

研究代表者

- (1) ATP 産生酵素 CKB が HCV NS4A と会合し複製複合体へ運ばれエネルギー供給に働くことを示した。
- (2) HCV NS2 が感染粒子産生に必要であり、特にその C 末端領域が重要であることを明らかにした。

分担研究者（下遠野、松浦、深澤（征））

- (1) VLDL 産生に必要な MTP の機能、またアポ E の産生が HCV 粒子産生に重要であることを示した。
- (2) 小胞輸送関連分子 VAP-B のバリエーション VAP-C が HCV 産生を負に調節することを明らかにした。
- (3) ビメンチンが HCV Core の翻訳後修飾に介入しウイルス産生を抑制することを見出した。
- (4) 既知の HCV 受容体候補分子は発現し HCV 非感受性の Huh7 細胞株を取得した。感染初期過程の分子機構の解析に有用と考えられる。

分担研究者（堀田、小池）

- (1) HCV 感染により糖輸送体 GLUT2 発現と糖取り込みの低下を見出し、GLUT2 発現低下に関わる転写調節機構を明らかにした。
- (2) HCV 感染初期における細胞内中性脂肪量の減少とウイルス増殖に伴う脂質量及び 1 価不飽和脂肪酸の増加を明らかにした。

分担研究者（瀬谷）

- (1) ウイルス RNA の初期認識に関与する宿主因子を同定し、HCV Core 結合因子 DDX3 が IPS-1 と結合し RNA の初期認識に関与することを示した。

分担研究者（小原、加藤、深澤（秀））

- (1) HCV 感染キメラマウスモデルでリボソーム製剤 NS9 が抗ウイルス活性を示すことを見出した。
- (2) HCV 全生活環を標的とする。抗 HCV 薬スクリーニング系で 1500 化合物を評価し、活性物質数種類を得た。感染初期過程を選択的に阻害する化合物などを取得した。
- (3) 新規ヒト肝癌細胞株 Li23 を樹立し、HCV レプリコン、全長 HCV RNA 複製細胞およびそのレポーターアッセイシステム、さらに HCV 持続感染システムの開発に至った。

### IV. 21～22 年度の課題

- (1) HCV 感染、複製、粒子形成機構、病原性発現機構、持続感染機構の解析を進展させ、新たな創薬標的を提示する。
- (2) 培養細胞系での抗 HCV 薬スクリーニングで得られたヒット化合物について、動物モデルでの二次評価を積極的に実施し創薬シーズの同定、特許取得を進める。

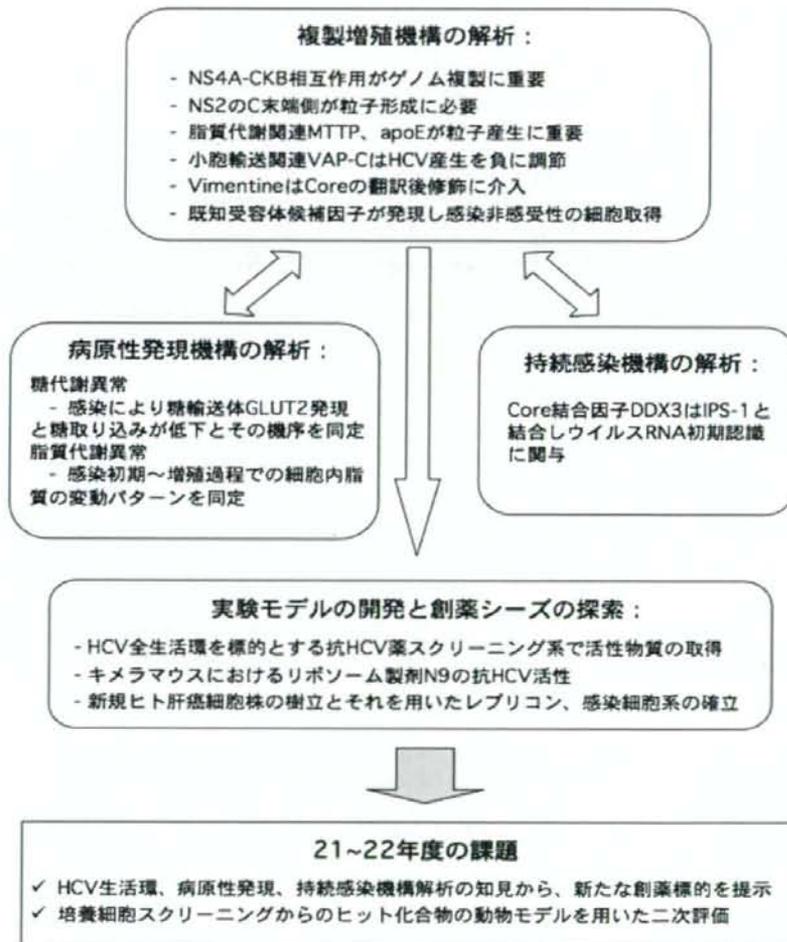
### V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) HCV キャリアからの発症予防対策、新たな治療薬開発へ寄与することにより、保健、医療、福祉の向上に直結するとともに、高齢者医療費の低減に貢献する。
- (2) 多様性を示す HCV キャリアからの発症阻止のための個別治療への道が拓かれる。

## VI. 本研究の成果 (発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., Suzuki, T. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *J. Virol.* (in press).
- 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 production. *J. Virol.* 82: 7964-7976 (2008).
- Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Wakita, T., Shoji, I. Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J. Gen. Virol.* 89: 1587-1592 (2008).
- Ishii, K., Murakami, K., Hmwe, S.S., Bin, Z., 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.* 371: 446-450 (2008).
- Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Saito, K., Nishijima, M., Hanada, K., Matsuura, Y., Lai, M.M., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* 82: 5715-5724 (2008).
- Zhang J, Yamada O, Kawagishi K, Araki H, Yamaoka S, Hattori T, Shimotohno K. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax modulates interferon-alpha signal transduction through competitive usage of the coactivator CBP/p300. *Virology.* 379:306-313 (2008).
- Noguchi T, Otsubaki T, Ando I, Ogura N, Ikeda S, Shimotohno K. Isolation and gene analysis of interferon alpha-resistant cell clones of the hepatitis C virus subgenome. *Virology.* 375:424-432, (2008)
- Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, Hotta H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondria-mediated, caspase-3-dependent pathway. *J Virol.* 82:10375-10385 (2008).
- Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya H, Kohara M. Sada K, Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J Gen Virol.* 89:1231-1242 (2008).
- El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Sequence variation in the hepatitis C virus NS5A protein predicts clinical outcome of pegylated interferon/ ribavirin combination therapy. *Hepatology.* 48:38-47 (2008).
- Matsuo, A., H. Oshiumi, T. Tsujita, H. Mitani, M. Matsumoto, and T. Seya. Toll-like receptor 22 confers a novel IFN-inducing signal for extrinsic double-stranded RNA recognition on teleost fish. *J. Immunol.* 181: 3474-3485 (2008).
- Ebihara, T., M. Shingai, M. Matsumoto, K. Shimotohno, T. Wakita, and T. Seya. Hepatitis C virus (HCV)-infected apoptotic cells extrinsically modulate dendritic cell function to activate T cells and NK cells. *Hepatology.* 48: 48-58 (2008).
- Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, N. Kato, K. Shimotohno, and T. Seya. Asp-Glu-Ala-Asp/His (DEAD/H) BOX 3 (DDX3) helicase assembles in the IFN- $\beta$  promoter stimulator-1 (IPS-1) pathway to enhance IFN- $\beta$  induction. *J. Immunol.* (in press).
- Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Satoh K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Cheng-Hsin C, Yano Y, 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* 23:1437-47 (2008).
- T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, K. Tsukiyama-Kohara. Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and picornavirus RNAs. *Compara. Immu. Microbio. Infect. Dis.* 31: 435-448 (2008).
- 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* 82:9639-9646 (2008).
- Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Takemoto K, Ariumi Y, Kato N. A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res* 137:72-79 (2008).
- Mori K, Abe KI, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun* 371:104-109 (2008).
- Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 22:124-131 (2008).
- Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR- $\alpha$  is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. *J Clin Invest* 118:683-694 (2008).
- Koike K. Steatosis, Liver Injury and Hepatocarcinogenesis in Hepatitis C Viral Infection. *J Gastroenterol* (in press).
- Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of

- hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 82: 8349-8361 (2008).
- Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol.* 82: 3480-3489 (2008).
- Tagawa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.* 82: 2631-2641 (2008).
- Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Lett.* (in press).
- Urano E, Shimizu S, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Takahashi N, Fukazawa H, Yamamoto N, Komano J. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/positive transcription elongation factor b-dependent long terminal repeat transcription. *AIDS.* 22:1081-3. (2008)
- 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* (in press)
- VII. III (1年間の研究成果)の概要図等



## ○研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

万有製薬探索研究所	研究員	昭和58年～平成3年
国立予防衛生研究所	研究員	平成3年～8年
カリフォルニア工科大学	Research fellow	平成5年～8年
国立感染症研究所	主任研究官	平成7年～12年
同上	室長	平成12年～現在

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

万有製薬探索研究所	所長：岡西昌則
国立予防衛生研究所	部長：宮村達男，室長：松浦善治
カリフォルニア工科大学	Professor：Alexander Varshavsky
国立感染症研究所	部長：脇田隆宇

### ・主な研究課題

#### C型肝炎ウイルス(HCV)の研究

- HCV 蛋白プロセッシング機構に関する研究
- HCV コア蛋白の成熟化、粒子形成機構に関する研究
- HCV 増殖細胞系の開発と複製調節機構に関する研究
- HCV コア蛋白による病原性発現機構に関する研究

#### B型肝炎ウイルス(HBV)の研究

- HBV の RNA プロセッシングに関する研究
- ユビキチン化蛋白の選択的分解機構に関する研究
- 細胞分化誘導物質による抗癌剤開発

### ・これまでの研究実績

1. *Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent.* **J. Virol.** (in press).
2. *Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus production.* **J. Virol.** 82: 7964-7976 (2008).
3. *A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection.* **J. Virol.** 82: 5715-5724 (2008).
4. *Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop IIIId domain of IRES and the viral core protein.* **Virology** (2006).
5. *Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b.* **Virology** (2006).
6. *All-trans retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBPbeta-LIP.* **Biochem. J.** (2006).
7. *Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein.* **J. Virol.** (2005).
8. *Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome.* **J. Virol.** 78: 10820-10824 (2004).
9. *Anti-apoptotic regulation by hepatitis C virus core protein through up-regulation of inhibitor of caspase-activated DNase.* **Virology** (2003).
10. *CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver.* **Hepatology** (2003).
11. *Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor.* **Virology** (2003).
12. *Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice.* **Hepatology** (2003).
13. *Expression profiling of liver cell lines expressing entire or parts of hepatitis C virus open reading frame.* **Hepatology** (2002).
14. *Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus.* **Virology** (2001).
15. *Degradation signals in the lysine-asparagine sequence space.* **EMBO J.** (1999).
16. *In vivo and in vitro trans-cleavage activity of hepatitis C virus serine proteinase expressed by recombinant baculoviruses.* **J. Gen. Virol.** (1995).
17. *Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells.* **J. Virol.** (1991).
18. *Alternative splicing of hepatitis B virus RNAs in HepG2 cells transfected with the viral DNA.* **Virology** (1990).
19. *Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with the hepatitis B virus genome.* **Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.** (1989).
20. 感染性C型肝炎ウイルス粒子高産生系 PCT/2006/JP319572
21. 新規RNA結合ペプチド PCT/JP2006/320991
22. C型肝炎ウイルス粒子及びその増殖法 PCT/JP2006/304223

## 平成 20 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：Claudin-1 を標的とした C 型肝炎ウイルス感染阻害法の開発とその臨床応用に向けた疫学調査

課題番号：H20-肝炎-若手-012

研究代表者：磯田 勝広

### I. 研究の意義

本研究は、最近新規同定された C 型肝炎ウイルス (HCV) 受容体、claudin-1 (CL-1) に着目し、独自の CL binder [アンタゴニスト] 創出技術を用いて HCV 感染阻害薬を開発すると共に、疫学的に C 型肝炎の炎症・悪化と CL-1 の発現パターンとの関連解析を行うことにより、近未来に臨床応用可能な C 型肝炎の画期的予防・治療薬の創製を試みるものであり、国民の健康増進、バイオ製薬メーカーの育成、我が国の知的財産の確保に大きく貢献できる。

### II. 研究の目的、期待される成果

本研究は、独自の CL-4 アンタゴニスト、C-CPE を用いた CL binder 技術と人工機能性蛋白質迅速創製技術を有効活用し、世界初の『CL-1 を介した HCV 感染阻害法』を開発することを目的とする。

HCV 治療では耐性ウイルスの出現が大きな課題となっており、インターフェロン、リバビリン療法では高ウイルスキャリアに対する著効率は著しく低い。現在までに HCV 感染受容体として CD81、SR-BI、LDL-R 等が同定され、これら宿主因子を標的とした HCV 感染阻害法の構築が試みられてきたものの、未だ有効な阻害法は確立されていない。本研究で開発する CL-1 binder は、既存の感染阻害法との組み合わせにより耐性ウイルス出現の抑制、高ウイルスキャリアに対する治療効果が期待され、国民の健康増進、我が国の医療費の抑制、バイオ製薬メーカーの育成、我が国の知的財産の確保等に多大な貢献が期待される。

### III. 1 年間の研究成果

・研究代表者 (磯田勝広)

CL-1 アンタゴニスト探索系として 5 種類の CL 発現細胞、2 種類の CL 蛋白質発現系を構築し、阪大微研松浦善治教授、阪大医竹原徹郎准教授、感染研脇田隆字部長との共同研究体制を整備した。

・研究分担者 (角田慎一)

C-CPE を prototype として用いた CL-1 アンタゴニスト創出に資する C-CPE 構造変異体ライブラリを 2 種類構築した。

### IV. 21~22 年度の課題

初年度の成果を踏まえ、残り 2 年間に、課題 1 : CL-1 binder のスクリーニング、課題 2 : CL-1 binder の HCV 感染阻害活性評価、課題 3 : CL-1 発現量と C 型肝炎悪化度の関連解析、を実施することにより、CL-1 binder の創製および C 型肝炎と CL-1 発現の関連解析に関する疫学調査を遂行し、HCV 受容体とした新規同定された CL-1 を創薬ターゲットにした C 型肝炎治療薬の創製を試みる。

### V. 行政施策への貢献の可能性

周知のように、インターフェロン療法は、耐性ウイルスの出現、間質性肺炎等の副作用発現により投与の中断を余儀なくされる患者がいること、依然として高ウイルス量患者には効かないことが臨床上の課題となっている。CL-1 binder を利用した HCV 感染阻害法の確立により、既存の治療法との併用による相加的・相乗的治療効果が期待されること、副作用に伴うインターフェロン療法中断患者、高ウイルス量患者に対する治療効果が期待されることから、国民の健康寿命の増進、完治に伴う医療費の削減等において厚生労働行政に多大な貢献が期待される。

## VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

## 研究代表者(磯田勝広)

1. Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii M, Horiguchi, Y., Mizuguchi H, Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Koizumi, N., Isoda, K., Yagi, K., Watanabe, Y. and Kondoh, M., Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.*, 75, 1639-1648, 2008.
2. Isoda, K., Kagaya, N., Akamatsu, S., Hayashi, S., Tamesada, M., Watanabe, A., Kobayashi, M., Tagawa, Y., Kondoh, M., Kawase, M., Yagi, K., Hepatoprotective effect of vitamin B12 on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Bio. Pharm. Bull.*, 31, 309-311, 2008.
3. 佐伯理恵, 角谷秀樹, 吉田孟史, 深坂昌弘, 磯田勝広, 鈴木亮, 近藤昌夫, 渡邊善照, 丸山一雄, 八木清仁: ウエルシュ菌エンテロトキシン断片を利用した claudin-4 ターゲッティング法の開発, 日本薬学会第128年会, 横浜, 2008年3月.

## 研究分担者(角田慎一)

1. Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii M, Horiguchi, Y., Mizuguchi H, Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Koizumi, N., Isoda, K., Yagi, K., Watanabe, Y. and Kondoh, M., Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.*, 75, 1639-1648, 2008.
2. Shibata, H., Yoshioka, Y., Ohkawa, A., Minowa, K., Mukai, Y., Abe, Y., Taniai, M., Nomura, T., Kayamuro, H., Nabeshi, H., Sugita, T., Imai, S., Nagano, K., Yoshikawa, T., Fujita, T., Nakagawa, S., Yamamoto, A., Ohta, T., Hayakawa, T., Mayumi, T., Vandeenabeele, P., Aggarwal, BB., Nakamura, T., Yamagata, Y., Tsunoda S., Kamada, H., Tsutsumi, Y. Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist. *J. Biol. Chem.*, 283:998-1007, 2008.
3. Sugita, T., Yoshikawa, T., Mukai, Y., Yamanada, N., Imai, S., Nagano, K., Yoshida, Y., Shibata, H., Yoshioka, Y., Nakagawa, S., Kamada, H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Comparative study of the protein transduction domains-mediated molecular transduction. *Br. J. Pharmacol.*, 153, 1143-1152, 2008.
4. Yoshikawa, T., Sugita, T., Mukai, Y., Yamanada, N., Nagano, K., Nabeshi, H., Yoshioka, Y., Nakagawa, S., Abe, Y., Kamada, H., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y., Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus. *J. Mol. Biol.*, 380, 777-782, 2008.
5. Mukai, Y., Shibata, H., Nakamura, T., Yoshioka, Y., Abe, Y., Nomura, T., Taniai, M., Ohta, T., Ikemizu, S., Nakagawa, S., Tsunoda, S., Kamada, H., Yamagata Y., Tsutsumi Y. Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant. *J. Mol. Biol.*, in press.
6. 野村鉄也, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 養輪恭子, 萱室裕之, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央: アンタゴニスト活性を有するI型受容体指向性TNF変異体の評価: 関節リウマチモデルに対する治療効果および安全性の検討, 第24回DDS学会, 東京 2008年6月.
7. 渡辺 光, 吉岡靖雄, 森重智弘, 鎌田春彦, 向 洋平, 角田慎一, 堤 康央, 岡田直貴, 中川晋作: ファージ表面提示法を用いた活性増強型リンフォトキシン・の創製とその特性評価, 第8回 日本蛋白質科学会年会, 東京, 2008年6月.

## 研究協力者(近藤昌夫)

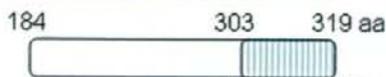
1. Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii, M, Horiguchi, Y., Mizuguchi H, Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Koizumi, N., Isoda, K., Yagi, K., Watanabe, Y. and Kondoh, M. Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.*, 75, 1639-1648, 2008.
2. Kondoh, M., Yoshida, T., Kakutani, H., and Yagi, K. Targeting tight junction proteins-significance for drug development. *Drug Discov. Today*, 13, 180-186, 2008.

## VII. III (1年間の研究成果)の概要図等

## 平成20年度研究成果の概要

Claudin-1 binder探索系構築のため、①C-CPE構造変異体ライブラリ、②claudin-1スクリーニング系の構築などを行った。

## ①C-CPE構造変異体ライブラリの作製



Ser Ser<sup>305</sup> Tyr Ser Gly Asn Tyr<sup>310</sup> Pro Tyr Ser Ile Leu<sup>315</sup> Phe Gln Lys Phe<sup>319</sup>

## ①-1 ライブラリ1の作製:

アラニン置換によりClaudin-4結合性が低下したTyr<sup>306</sup>, Tyr<sup>310</sup>, Tyr<sup>312</sup>, Leu<sup>315</sup>などをランダムなアミノ酸に置換したC-CPE誘導体提示ファージライブラリを作製した。

## ①-2 ライブラリ2の作製:

アラニン置換によりClaudin-4結合性が上昇したSer<sup>304</sup>, Ser<sup>305</sup>, Ser<sup>307</sup>, Asn<sup>309</sup>, Ser<sup>313</sup>, Lys<sup>318</sup>などをランダムなアミノ酸に置換したC-CPE誘導体提示ファージライブラリを作製した。

## ②Claudin-1スクリーニング系の構築

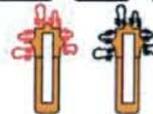
## ②-1 Claudin発現細胞の作製:

Claudin-1, -2, -3, -4, -5発現細胞を作製した。



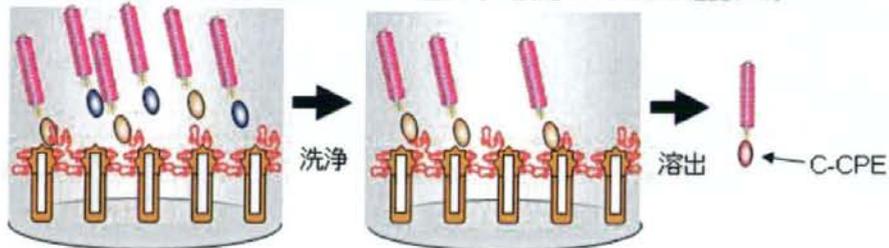
## ②-2 Claudin発現バキュロウイルスの作製:

Claudin-1, -4発現バキュロウイルスを作製した。



## ②-3 Claudin-4 binderを利用したスクリーニング系の評価:

Claudin-4 binder (C-CPE) 提示ファージ, claudin-4発現細胞, claudin-4発現バキュロウイルスを用いて, claudin-4 binder提示ファージが選択的に濃縮されることを確認した。



## ③研究体制の強化

当ラボ(八木研究室)と、阪大微研松浦善治教授、阪大医竹原徹郎准教授、感染研脇田隆字部長との共同研究体制を整備した。

## ○研究代表者の研究歴等

## ・過去に所属した研究機関の履歴

平成 17 年 3 月：大阪大学大学院 薬学研究科 博士課程修了  
 平成 17 年 4 月～10 月：国立循環器病センター研究所 流動研究員  
 平成 17 年 10 月～平成 19 年 3 月：大阪大学 薬学研究科 助手  
 平成 19 年 4 月～現在：大阪大学大学院 薬学研究科 助教  
 平成 19 年 4 月～現在：医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト（堤康央プロジェクトリーダー）協力研究員

## ・主な共同研究者（又は指導を受けた研究者）

国立循環器病センター研究所在職中は、岩井直温部長、宮田敏行部長の下、肝炎時に変動する遺伝子群の解析を行った。大阪大学大学院薬学研究科に異動後、八木清仁教授の下、C型肝炎研究、近藤昌夫准教授および医薬基盤研堤康央プロジェクトリーダー（現阪大院薬教授、医薬基盤研リーダー併任）の下、claudin binder 研究に着手した。当該申請課題は、上述した先生に加え、阪大医竹原徹郎准教授、阪大微研松浦善治教授、国立感染研脇田隆字部長にご指導を仰ぎつつ、C型肝炎ウイルス感染阻害法の開発を試みるものである。

## ・主な研究課題

- (1) Claudin-1 を標的とした C 型肝炎阻害薬の開発
- (2) Claudin-4 を標的とした粘膜ワクチンの開発
- (3) 肝臓に対するナノマテリアルの安全性評価

## ・これまでの研究実績

1. Yoshida, K., Inoue, K., Takahashi, Y., Ueda, S., **Isoda, K.**, Yagi, K., Maeda, I., Novel carotenoid-based biosensor for simple visual detection of arsenite: characterization and preliminary evaluation for environmental application. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 6730-6738, 2008.
2. Arita, E., Kondoh, M., **Isoda, K.**, Nishimori, H., Yoshida, T., Mizuguchi, H., Yagi, K., Evaluation of promoter strength in mouse and rat primary hepatocytes using adenovirus vectors. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 70, 1-6, 2008.
3. Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii, M., Horiguchi, Y., Mizuguchi, H., Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Koizumi, N., **Isoda, K.**, Yagi, K., Watanabe, Y., Kondoh, M., Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.*, 75, 1639-1648, 2008.
4. **Isoda, K.**, Kagaya, N., Akamatsu, S., Hayashi, S., Tamesada, M., Watanabe, A., Kobayashi, M., Tagawa, Y., Kondoh, M., Kawase, M., Yagi, K., Hepatoprotective effect of vitamin B12 on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 309-311, 2008.
5. Ikeda, E., Yagi, K., Kojima, M., Yagyuu, T., Ohshima, A., Sobajima, S., Tadokoro, M., Katsube, Y., **Isoda, K.**, Kondoh, M., Kawase, M., Go, M.J., Adachi, H., Yokota, Y., Kirita, T., Ohgushi, H., Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*, 76, 495-505, 2008.
6. Hayashi, S., Itoh, A., **Isoda, K.**, Kondoh, M., Kawase, M., Yagi, K., Fucoidan partly prevents CCl4-induced liver fibrosis. *Eur. J. Pharmacol.*, 580, 380-384, 2008.
7. Fujimoto, H., Wakabayashi, M., Yamashiro, H., Maeda, I., **Isoda, K.**, Kondoh, M., Kawase, M., Miyasaka, H., Yagi, K., Whole-cell arsenite biosensor using photosynthetic bacterium Rhodovulum sulfidophilum. Rhodovulum sulfidophilum as an arsenite biosensor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 332-338, 2006.
8. **Isoda, K.**, Arita, E., Kojima, M., Ikkaku, M., Tashiro, F., Yamato, E., Miyazaki, J., Kawase, M., Kondoh, M., Yagi, K., Protection against CCl4-induced injury in liver by adenovirally introduced thioredoxin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 350, 157-161, 2006.
9. Takeda, M., Yamamoto, M., **Isoda, K.**, Higashiyama, S., Hirose, M., Ohgushi, H., Kawase, M., Yagi, K., Availability of bone marrow stromal cells in three-dimensional coculture with hepatocytes and transplantation into liver-damaged mice. *J. Biosci. Bioeng.*, 100, 77-81, 2005.
10. **Isoda, K.**, Koide, H., Kojima, M., Arita, E., Ikkaku, M., Higashiyama, S., Tashiro, F., Yamato, E., Miyazaki, J., Kawase, M., Yagi, K., Stimulation of hepatocyte survival and suppression of CCl4-induced liver injury by the adenovirally introduced C/EBPbeta gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 329, 182-187, 2005.
11. **Isoda, K.**, Kojima, M., Takeda, M., Higashiyama, S., Kawase, M., Yagi, K., Maintenance of hepatocyte functions by coculture with bone marrow stromal cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 97, 343-346, 2004.
12. Tsutsui, T., Koide, H., Fukahori, H., **Isoda, K.**, Higashiyama, S., Maeda, I., Tashiro, F., Yamato, E., Miyazaki, J., Yodoi, J., Kawase, M., Yagi, K., Adenoviral transfection of hepatocytes with the thioredoxin gene confers protection against apoptosis and necrosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307, 765-770, 2003.

上記を含め、現在までに22報の原著論文、総説、特許等を公表済みである（印刷中を含む）。



## 平成 20 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：肝炎の予防および治療対策に関する費用対効果分析課題番号：H20-肝炎-一般-013研究代表者：井出 博生**I. 研究の意義**

- (1) わが国には B 型、C 型を合わせて 250 万人のウィルスキャリアがいると推計されている。
- (2) WHO によると、わが国は B 型肝炎ウィルスワクチンの universal vaccination が導入されていない世界 29 カ国の内の 1 カ国である。
- (3) 多くの先進国ではワクチン接種をはじめとした B 型肝炎の予防、肝炎～肝がんの治療に関する費用対効果分析が行われているが、わが国ではごく一部を対象とした分析しか行われていない。

**II. 研究の目的、期待される成果**

- (1) B 型肝炎ウィルスの母子感染、輸血・血液製剤による感染の防止については考えうる対策が実施されており、現在の社会的問題は①性交渉による感染の予防、②キャリアに適切な治療を提供することである。
- (2) 本研究では、上記の①および②について考えられる対策（ワクチン接種、ステージに応じた諸々の検査法や治療法）に関する費用対効果分析を行う。
- (3) ワクチン接種、検査法、治療法の費用対効果が明らかになれば、特に経済的な側面から望ましい肝炎対策への資源配分のあり方を検討することができる。
- (4) 直接的に本研究の結果を予防対策等の政策、治療のガイドラインに反映することができなくても、結果を肝炎に対する国民の意識啓発に利用することができる。

**III. 1 年間の研究成果**

・研究代表者

- (1) 主として 1990 年代以降に実施された B 型肝炎の予防および治療対策に関連した費用対効果分析のレビューを行った。レビューの結果、日本と同程度かそれ以下の感染率の国では universal vaccination の費用対効果が高いということ、感度分析の結果からは接種コストの影響が大きいことがわかった。予防に関してワクチン接種以外の方法（教育等）に関する費用対効果分析を行った研究もあったが、ごく少数であった。一方で分析モデルに関しては十分にその質が担保された研究ばかりではないことが明らかとなった。

(2)本研究では、B型肝炎ワクチンの接種による予防対策と治療を軸とした費用対効果分析を行うこととし、できるだけ精度が確保される手法を導入することとした。

(3)原型とするモデルを用いて検証作業を行った。

(4)わが国における疫学および臨床データの蓄積が乏しいために、シミュレーションに必要なデータの確保に関しては問題があることがわかった。そのため、シミュレーションの実施にあたっては、流行しているウィルスの遺伝子型が同様の国等におけるデータ、専門家への聞き取り調査およびアンケート調査によって追加的に値を準備する必要があると判断した。

#### **IV. 21～22年度の課題**

(1)シミュレーションに投入する予防および治療に関するデータ（例えば、ワクチン接種やインターフェロン治療に関する費用、universal vaccinationを行った場合に必要な回数を接種する人の分布など）を文献や実際の現場から収集する。

(2)上記の方法で収集しきれないデータがあった場合には、専門家に対して聞き取り調査やアンケート調査を実施し、値を設定する。

(3)収集したデータを用いてシミュレーションを行い、いくつかのパターンを設定した上で感度分析を行う。

(4)結果の妥当性について外部評価等を行い、シミュレーションの精度を向上させる。

#### **V. 行政施策への貢献の可能性**

(1)1年目の研究からもB型肝炎の予防および治療に関しては、ワクチン接種が最も費用対効果が高い方法であるということが確認できたが、わが国の環境下でこのことは検証されていない。したがって、今後 universal vaccination を政策として導入しようとした場合に、少なくとも費用対効果（経済性）の観点からこの対策が検討に値するものであるということを示すことができる。

(2)ワクチン接種に対する不安感を本研究の結果から払拭することは難しいかもしれないが、本研究の結果および諸外国における対策の実施状況を紹介することで、universal vaccination が国民に受け入れられる土壌を形成することができる。

#### **VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)**

平成20年度は特になし

## VII. III (1年間の研究成果)の概要図等

## 肝炎の予防および治療に関する費用対効果分析のレビュー

## 主な結論

- (1) 日本と同程度かそれ以下の感染率の国ではuniversal vaccinationの費用対効果が高い
- (2) 感度分析には他の因子と比較して接種コストが与えるの影響が大きい
- (3) 予防に関しては、ワクチン接種以外の方法（教育等）はごく少数
- (4) 分析モデルに関しては、十分にその質が担保された研究ばかりではない

## 研究の基本方針の決定

本研究では、

- (1) B型肝炎ワクチンの接種による予防対策と治療を軸とした費用対効果分析を実施
- (2) 分析にあたっては、精度が確保される手法を導入

原型のモデルによる検証作業

## 課題

必要な疫学および臨床データの確保

来年度以降の作業

## 対策

- (1) 流行しているウイルスの遺伝子型がd同様の国等におけるデータの参照
- (2) 専門家への聞き取り調査およびアンケート調査の実施

## ○研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

東京大学医学部附属病院

Harvard School of Public Health

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

大江和彦 東京大学大学院医学系研究科 教授

今村知明 奈良県立医科大学 教授

康永秀生 東京大学大学院医学系研究科 特任准教授

小池創一 東京大学医学部附属病院 准教授

苦瀬博仁 東京海洋大学 教授、東京大学大学院医学系研究科 特任教授

Margarita Estevez Abe Harvard University

Salih Mollahaliloglu Turkish Institute of Health

### ・主な研究課題

費用効果分析、仮想評価法等を用いた医療経済研究

医療材料の内外価格差の実態把握及びその発生要因に関する研究

医師などの医療人材のキャリア形成に関する研究

### ・これまでの研究実績

1. Ide H, Yasunaga H, Kodama T, Koike S, Taketani Y, Imamura T. The Dynamics of Obstetricians and Gynaecologists in Japan: A Retrospective Cohort Model using the Nationwide Survey of Physicians data. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* in press
2. 小池創一、勝村裕一、児玉知子、井出博生、康永秀生、松本伸哉、今村知明. : 診療所勤務医の状況の変化と多相生命表の原理を用いた医師数の将来推計について. *厚生*の指標. 2008;55(11), 22-28.
3. Ide H, Yasunaga H, Imamura T, Ohe K. Price differences between Japan and the US for medical materials and how to reduce them. *Health Policy* 2007;82(1):71-77.
4. Imamura T, Ide H, Yasunaga H: History of public health crises in Japan. *Journal of Public Health Policy*. 2007;28(2):221-37.
5. Yasunaga H, Ide H, Imamura T, Ohe K. Accuracy of economic studies on surgical site infection. *Journal of Hospital Infection* 2007;65(2):102-107.
6. Yasunaga H, Ide H, Imamura T, Ohe K. Women's anxieties caused by false positives in mammography screening: a contingent valuation survey. *Breast Cancer Research and Treatment* 2007;101 (1): 59-64.

## 平成20年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：リツキシマブ+ステロイド併用悪性リンパ腫治療中のB型肝炎ウイルス再活性化への対策に関する研究

課題番号：H20-肝炎-若手-014

研究代表者：楠本 茂

### I. 研究の意義

(1) 本研究が対象とする、リツキシマブ+ステロイド併用化学療法による治療を行うB細胞性非ホジキンリンパ腫のうち20-25%がHBs抗原陰性ハイリスク群に相当し、それらハイリスク群のHBV再活性化のデータは限られており、その対策方法は確立されていない。

(2) 本研究は世界で初めてのHBV-DNAモニタリングによる多施設共同前方視的臨床研究となる。本研究を通してHBV-DNAモニタリングによる標準的対策法が確立できれば、世界に発信できる極めて重要な臨床研究となりうる。

### II. 研究の目的、期待される成果

<目的> HBV-DNAモニタリングによる多施設共同前方視的研究では、HBs抗原陰性ハイリスク群悪性リンパ腫に対するリツキシマブ+ステロイド併用化学療法治療中のHBV再活性化の頻度を明らかにすることおよびHBV-DNAを早期に検出し抗ウイルス薬を投与する対策法("preemptive therapy")を確立するためのデータを集積する。保存検体を用いた付随研究では、1) 超高感度 real-time detection PCR法により微量のHBV-DNA検出を試み、早期診断の臨床的有用性を検証する。2) HBV再活性化した症例に関しては、HBV-DNAの遺伝子配列を決定することで、輸血後肝炎との鑑別のみならず、再活性化ハイリスク群および劇症化に寄与する遺伝子型や遺伝子変異の同定を試みる。

#### <期待される成果>

(1) HBV-DNAモニタリングによるHBV再活性化対策が確立できれば、肝炎・肝障害による入院、劇症肝炎による死亡、リンパ腫治療中止による再発・再燃を最小化することができる。また、ウイルス耐性化や医療経済への負担を軽減できる。

(3) HBV再活性化の問題は、リツキシマブ+ステロイド併用化学療法だけでなく、長期の免疫抑制を要する自己免疫疾患例や臓器移植の領域においても問題となっており、本研究における対策は“モデルケース”となることが期待できる。

### III. 1年間の研究成果

- 1) HBV-DNAモニタリングに関する前方視的臨床研究の実施計画書作成
- 2) 多施設共同臨床研究スタートアップミーティングの開催
- 3) 症例登録開始

- ・研究代表者：(1) HBV-DNA モニタリングに関する臨床研究実施計画書作成、(2) 症例登録、(3) 研究事務局 (参加施設およびデータセンターとの連絡、試験進捗状況の把握)
- ・研究分担者(上田龍三)：多施設共同臨床研究の計画・立案、実行にいたる全過程のマネージメント
- ・研究分担者(溝上雅史、田中榮司、田中靖人)：(1) HBV-DNA モニタリングに関する臨床研究実施計画書作成、(2) スタートアップミーティングでの発表：HBV 再活性化に関する知見のまとめ
- ・研究分担者(小椋美知則・木下朝博・鈴木孝世・渡辺隆)：(1) HBV-DNA モニタリングに関する臨床研究実施計画書作成、(2) 症例登録
- ・研究分担者(鈴木律朗)：(1) HBV-DNA モニタリングに関する臨床研究実施計画書作成、(2) データセンターの統括 (症例登録、HBV-DNA モニタリングの精度管理、HBV-DNA 測定結果の管理など)

#### **IV. 21～22 年度の課題**

- (1) HBV-DNA モニタリングに関する多施設共同臨床研究の遂行 (着実な症例登録、再活性化例に対する対応など)、目標症例数 321 例を 21, 22 年度中に達成する。
- (2) 保存検体 (血清および残余検体) を用いた後方視的研究: 超高感度 real-time PCR 法による HBV-DNA 定量検査、再活性化に関連する悪性リンパ腫側因子及びウイルス側因子の同定および再活性化した症例における HBV の遺伝子配列および遺伝子変異の同定

#### **V. 行政施策への貢献の可能性**

- (1) HBV-DNA モニタリングによる HBV 再活性化対策が確立できれば、肝炎・肝障害による入院、劇症肝炎による死亡、リンパ腫治療中止による再発・再燃を最小化することに加えて、ウイルス耐性化や医療経済への負担を軽減できる。
- (2) HBV 再活性化の問題は、リツキシマブ+ステロイド併用化学療法だけでなく、長期の免疫抑制を要する自己免疫疾患例や臓器移植の領域においても問題となっており、本研究における対策は“モデルケース”となることが期待できる。

#### **VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)**

- Umemura T, Tanaka E, Kiyosawa K, Kumada H, Japan de novo Hepatitis B Research Group. Mortality secondary to fulminant hepatic failure in patients with prior resolution of hepatitis B virus infection in Japan. Clin Infect Dis 2008; 47: e52-6.
- 姜貞憲, 矢根 圭, 松居剛志, 田中靖人, 溝上雅史. HBV 再活性化症例における血中 HBV marker の経時的検討. 第 44 回日本肝臓学会総会. 平成 20 年 6 月 5-6 日. 愛媛. A41
- 楠本茂, 田中靖人. 悪性リンパ腫治療中の B 型肝炎ウイルス再活性化とその対策 よくわかる悪性リンパ腫のすべて (飛内賢正編集) 永井書店 2008 年 9 月
- 楠本茂, 田中靖人. 肝炎ウイルスキャリアへの対策 悪性リンパ腫治療マニュアル改訂第 3 版 南江堂 in press.

### Ⅶ. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図等

1) 平成20年6月9日、名古屋市立大学病院医薬品等臨床試験審査委員会にて『リツキシマブ+ステロイド併用悪性リンパ腫治療中のB型肝炎ウイルス再活性化への対策に関する多施設共同臨床研究～HBV-DNAモニタリング～』につき、承認を得た。

班員である複数の血液内科および肝臓内科専門医が共同で実施計画書を作成し、最新の基礎および臨床研究のエビデンスを取り入れた研究デザインとした。

2) 平成20年8月9日、多施設共同臨床研究スタートアップミーティング開催

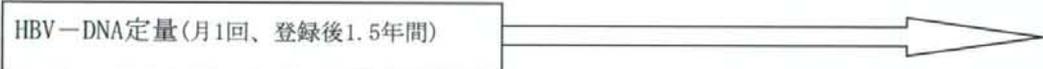
木下班との合同班会議という設定（名古屋大学）にて、多施設共同臨床研究のスタートアップミーティングを開催、全国53施設より参加。

3) 平成20年8月11日より症例登録開始。

HBs抗原陰性ハイリスク群、リツキシマブ+ステロイド併用化学療法例、目標症例数321例  
HBV-DNAモニタリング（多施設共同前方視的臨床研究）

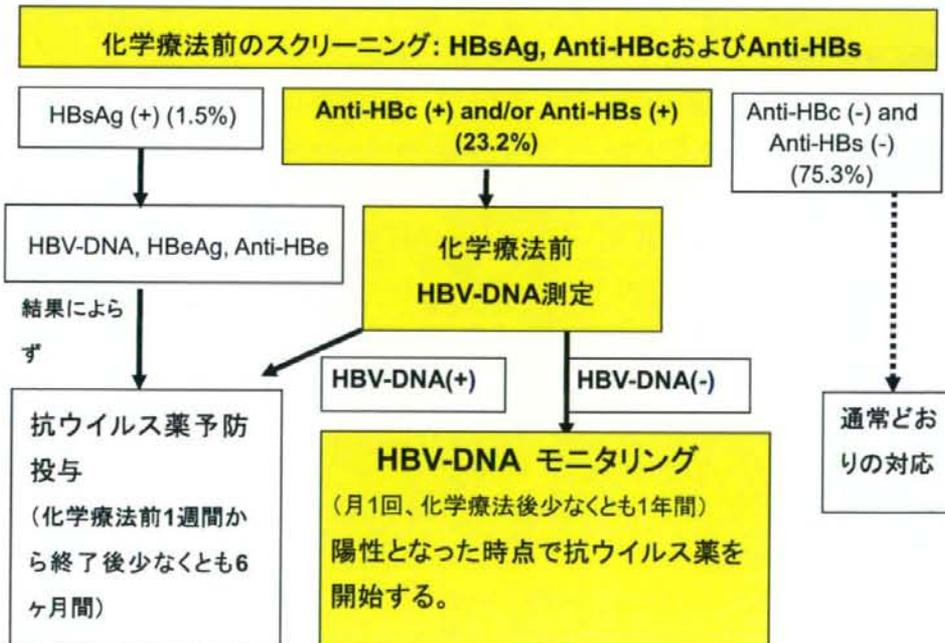
治療中

治療後



平成20年12月12日時点で、参加予定53施設中42施設でのIRB承認を得て、合計22例の症例登録を得ている。

<全身化学療法中のHBV再活性化への対策（案）血液・腫瘍科2007(54)737-742> 本研究では下記フローチャートの黄色部分(HBV-DNAモニタリングの有効性・安全性)につき、プロスペクティブに検証している。



## ○研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

平成9年4月から平成11年3月まで：名古屋市立大学病院臨床研修医

平成11年4月から平成14年5月まで：静岡済生会総合病院血液内科医

平成14年6月から平成17年3月まで：国立がんセンター中央病院内科レジデント

平成17年4月から平成18年3月まで：名古屋市立大学病院 血液・膠原病内科 臨床研究医

平成18年4月から平成19年6月まで：名古屋市立大学病院 血液・膠原病内科 チーフレジデント

平成19年7月から現在：名古屋市立大学大学院医学研究科 腫瘍・免疫内科学 助教

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

○上田龍三 (名古屋市立大学大学院医学研究科 腫瘍免疫内科学 教授)

○溝上雅史 (国立国際医療センター国府台病院 肝炎・免疫研究センター長)

○田中靖人 (名古屋市立大学大学院医学研究科 臨床分子情報医学 准教授)

○飛内賢正 (国立がんセンター中央病院 内科第一領域外来部長)

### ・主な研究課題

○全身化学療法および免疫抑制療法中のB型肝炎ウイルス再活性化への対策の確立

○悪性リンパ腫および多発性骨髄腫の新規薬物療法および造血細胞移植療法の開発

### ・これまでの研究実績

1. Kusumoto S, Mori S, Nosaka K, Morita-Hoshi Y, Onishi Y, Kim SW, Watanabe T, Heike Y, Tanosaki R, Takaue Y, Tobinai K. T-cell large granular lymphocyte leukemia of donor origin after cord blood transplantation. Clin Lymphoma Myeloma. 2007;(7):475-9.
2. Kusumoto S, Kobayashi Y, Sekiguchi N, Tanimoto K, Onishi Y, Yokota Y, Watanabe T, Maeshima AM, Ishida T, Inagaki H, Matsuno Y, Ueda R, Tobinai K.  
Diffuse large B-cell lymphoma with extra Bcl-2 gene signals detected by FISH analysis is associated with a "non-germinal center phenotype". Am J Surg Pathol. 2005; (29):1067-73.
3. Kusumoto S, Kobayashi Y, Tanimoto TE, Hasegawa T, Yokota Y, Tanimoto K, Sekiguchi N, Narabayashi M, Watanabe T, Matsuno Y, Tobinai K.  
T(11:18)-bearing pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma responding to cladribine. Int J Hematol. 2004 ;(80):70-4.



## 2 年目研究課題

## 平成20年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：肝炎ウイルスにより惹起される炎症性誘発要因及びウイルス増殖に対する人為的制御による肝炎征圧

課題番号：H19-肝炎一般-001

主任研究者：下遠野 邦忠

### I. 研究の意義

- (1) HCV 感染によるヒト慢性疾患の病態形成の分子機構が不明である。
- (2) HCV 複製増殖を確実に抑制できる人的制御法が開発されていない。
- (3) HCV 感染による細胞の変化を病態変化との関連で評価出来る系がない。

### II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HCV 感染による細胞障害および異常増殖性など細胞に与える要因の解明。
- (2) HCV の複製を制御する宿主主要因の解明を通じた、感染予防と疾患治療に向けた方法論の確立。
- (3) 生理条件下で HCV 増殖複製系を樹立、それを人為的に制御が可能な方法を明らかにする。

### III. 2年間の研究成果

#### ・ 分担代表者

- (1) HCV は脂肪滴を利用して増殖する事を明らかにした。
- (2) HCV は細胞内の脂肪滴を増やす事を明らかにした。
- (3) Apolipoprotein E が HCV 産生に重要である事を明らかにした。

#### ・ 研究分担者(堀田 博)

- (1) HCV による細胞死の分子機構の理解が進んだ。
- (2) HCV による細胞死とウイルス増殖の程度の逆相関及び関与する変異を同定した。
- (3) HCV による持続感染の分子機構の一部を明らかにした。

#### ・ 分担研究者(加藤 宣之)

- (1) HCV ゲノムの複製に必要な新規宿主因子として DDX3、ATM および Chk2 を見出した。
- (2) HCV ゲノム複製細胞ではメタロチオネインが発現誘導されることを見いだした。

#### ・ 研究分担者(西口修平)

- (1) C型慢性肝炎の肝組織では IFN により HCV が消失してもミトコンドリア DNA の変異数が減少することを明らかにした。
- (2) IFN 治療後に HCV が消失しその後癌が発症した症例において、ミトコンドリアの増生と粗面小胞体の膨化が認められ、発癌との関連が示唆された。

#### ・ 研究分担者(小原 恭子)

- (1) HCV により発現誘導される増殖制御遺伝子、DHCR24のプロモーター内にHCV応答配列を見いだした。
- (2) DHCR24の発現がp53を抑制してアポトーシス耐性を肝細胞に賦与する事を明らかにした。

#### ・ 研究分担者(落谷 孝広)

- (1) ヒト間葉系幹細胞から分化誘導させた肝細胞を HCV 感染実験に供する準備ができた。
- (2) 肝発がんと相関する複数の microRNA を見いだした。

#### ・ 研究分担者(杉山和夫)

- (1) HCV 患者血清内に存在する欠失ゲノムはウイルス粒子として放出されることを見いだした。

#### ・ 研究分担者(丸澤宏之)

- (1) HCV のコアが転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を介して、遺伝子編集酵素 AID を発現誘導することを同定。
- (2) AID を発現したヒト肝細胞にはさまざまな遺伝子変化や遺伝子異常が発生することを確認。

### IV. 21年度の課題

- (1) HCV 感染がウイルス増殖のために脂肪代謝を変化させる事が明らかになったので、脂肪代謝変化を引き起こす分子機構を明らかにして、創薬の標的を求める。
- (2) これまでに見いだした新規宿主因子が HCV 複製をどのような機構で制御しているかを明らかにし、創薬の標的を求める。
- (3) アポリポ蛋白質と HCV 産生との関連を明らかにし、ウイルス産生を制御する本蛋白質の分子機構を解明し、抗 HCV 剤開発に役立てる。
- (4) メタロチオネイン、AID、DHCR24 等の遺伝子発現の活性化と HCV 複製との関連を明らかにする。
- (5) ミトコンドリア異常と肝疾患、肝発がんとの関連性を明確にさせる。
- (6) 分化誘導させた肝細胞を用いて HCV 感染、感染評価、疾患解析を行う。
- (7) 欠失 HCV ウイルスとウイルス複製および病態との関連を臨床資料を活用して明らかにする。

### V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) HCV 肝炎症におけるウイルス増殖と遺伝子異常の分子基盤が理解できるようになり、疾患の定量的な診断が可能になる。
- (2) 新規の抗 HCV 剤の開発に貢献できる可能性がある。
- (3) HCV 複製と疾患との関連性を分子レベルで説明可能になる結果、発症予防の方策が構築出来る可能性がある。
- (4) HCV 感染による慢性肝疾患の病態形成の原因を明らかにすることで、新しい治療法開発への道を開くと期待される。

## VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

下遠野 邦忠

- Noguchi T, Otsubaki T, Ando I, Ogura N, Ikeda S, Shimotohno K. Isolation and gene analysis of interferon alpha-resistant cell clones of the hepatitis C virus subgenome. *Virology*. 375:424-432, 2008
- Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*. 9:1089-1097, 2007
- Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K. Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. *J Biol Chem*. 282:32765-32772, 2007

高久 洋

- Suzuki H, Tamai N, Habu Y, Chang MO, Takaku H. Suppression of hepatitis C virus replication by baculovirus vector-mediated short-hairpin RNA expression. *FEBS Lett*. 58:3085-3089, 2008.
- Nishibe Y, Kaneko H., Suzuki H., Abe T., Matsuura Y., Takaku H. Baculovirus-mediated interferon alleviates dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis symptoms in a murine model. *Gene Therapy*, 15: 990-997, 2008.

堀田 博

- Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, Hotta H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase-3-dependent pathway. *J Virol*, 82(21):10375-10385, 2008.
- Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya H, Kohara M, Sada K, Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J Gen Virol*, 89(5):1231-1242, 2008.

加藤 宣之

- 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* 82:9639-9646, 2008
- Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus (HCV) RNA replication. *J Virol* 81:13922-13926, 2007

西口 修平

- Kumada T, Tanaka E, Nishiguchi S, et al. Guidelines for the antiviral therapy of hepatitis C virus carriers with normal serum aminotransferase based on platelet counts. *Hepatol Res*. 38: 27-36, 2008
- Tamori A, Shiomi S, Nishiguchi S, et al. Serial changes in expression of functionally clustered genes in progression of liver fibrosis in hepatitis C patients. *World J. Gastroenterol*. 7: 2010-2022, 2008
- Uenishi T, Nishiguchi S, Tanaka S, et al. Response to interferon therapy affects risk factors for postoperative recurrence of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J. Surg. Oncol*. Jul 21, in press, 2008

小原 恭子

- T.Nishimura, M.Saito, T.Takano, A. Nomoto, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Comparative Aspects on the Role of Polypyrimidine Tract Binding Protein in Internal Initiation of Hepatitis C Virus and Picornavirus RNAs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*. 5:435-448, 2008
- S. Yamaguchi, H. Ishihara, T. Yamada, A. Tamura, M. Usui, R. Tominaga, Y. Munakata, C. Satake, H. Katagiri, F. Tashiro, H. Aburatani, K. Tsukiyama-Kohara, J. Miyazaki, N. Sonenberg and Y. Oka. ATF4-Mediated Induction of 4E-BP1 Contributes to Pancreatic  $\beta$  Cell Survival under Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Metabolism* 7(3):269-276, 2008

落谷 孝広

- Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kawamata M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. In Vivo Therapeutic Potential of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells After Transplantation into Mice with Liver Injury. *Stem Cells*, 26: 2705-2712, 2008
- Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol*, in press, 2008
- Kosaka N, Sakamoto H, terada M, Ochiya T. Pleiotropic function of FGF-4: Its role in development and stem cells. *Dev Dyn*, in press, 2008
- Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol*, in press, 2008

杉山 和夫

- H. Duan, K. Yoshimura, N. Kobayashi, A. Takagi, M. Matsui, S. Ohno, K. Sugiyama, C. Morisseau, B.D. Hammock, and T. Akatsuka, Analysis of the topology of the microsomal epoxide hydrolase on the cell surface with monoclonal antibodies with different epitope specificities. *FASEB J*. 22 : 479-431, 2008.

丸澤 宏之

- Marusawa H. Aberrant AID expression and human cancer development. *Int J Biochem Cell Biol*. 40: 1399-1404: 2008.
- Morisawa T, Marusawa H, Ueda Y, Iwai A, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T. Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression. *Int J Cancer*. 123: 2735-2740: 2008.

VII. III (2年間の研究成果)の概要図等

