

## 研究成果と今後のスケジュール

### 1. 網羅的ウイルス検出PCR Primer設計システムの開発

HBV, HCV, HIVの全てのGenotype/Subtype/Recombinant Variantを網羅的に捕捉するPCRプライマー設計法を確立した

### 2. 高感度にウイルスゲノムを検出するアレイシステムの開発

網羅的PCR Primerで増幅されたHBV, HCV, HIV断片を高感度に検出することに成功し、**NAT以上の感度を達成した。**

平成19-20年度

### 3. NAT-Arrayのバリデーション

日本赤十字社と協力して陽性・陰性血漿等、多様なサンプルを検出し、再現性、靈敏性等の精度を向上する

### 4. 完全自動化を目指した研究開発

横河電機との共同開発を押し進め、病院や検査室でも実施可能な一体型のシステムを開発する

### 5. 病原体の追加/更なる感度向上を目指した核酸増幅技術の改良

輸血血液以外の製剤血や細菌治療におけるリスク病原体の追加

平成21年度

## 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：肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発

課題番号：H19-肝炎一般-004

研究代表者：脇田 隆宇

## I. 研究の意義

申請者はC型肝炎ウイルス (HCV) のウイルス培養系を確立した。また、B型肝炎ウイルス (HBV) の場合、複製増殖実験は可能だが、培養細胞による感染実験系は確立されていない。両肝炎ウイルスに対する新たな治療法の開発が望まれている。そこで、本研究ではHBVやHCVのウイルス培養系や増殖系を用いて新規肝炎治療法の開発を目的とする。

## II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 肝炎ウイルスの新規感染モデルの開発
- (2) HCV増殖機構の解析と新規治療法の開発
- (3) HCV生活環に関する宿主側因子の探索と新規治療法の開発
- (4) HBV増殖機構の解析と新規治療法の開発
- (5) 肝炎ウイルス培養系および増殖系を用いた抗ウイルス薬のスクリーニング

## III. 2年間の研究成果

- ・主任研究者(脇田 隆宇)：JFH-1株以外のHCV株によるウイルス培養系の構築を行った。すでに既報のウイルス株とともに、新規にHCV感染患者からウイルスを分離しウイルス遺伝子をクローニングした。レプリコンによる複製実験では一部のウイルス株による複製を確認した。培養細胞におけるレプリコン複製には適合変異が必要であった。適合変異を導入したウイルス株によるウイルス増殖、ウイルス粒子産生、感染を確認した。JFH-1株以外のウイルス株によるウイルス培養が可能となった。
- ・分担研究者(土方 誠)：小規模中空糸培養系をもちいて不死化肝細胞HuS-E/2細胞の立体培養系を完成させた。この系では従来の系に比較して、種々の患者血液由来天然型HCVの感染増殖が著しく高い効率で観察することが可能であり、また天然型HCV由来の感染性粒子産生が再現された(特許出願中)。この系を用いることにより天然型HCVには感染細胞にアポトーシスを誘導するもの、また感染によりインターフェロンを誘導するものとしめないものがあること患者毎のHCVに関するウイルス学的な研究が可能であることがわかった。
- ・分担研究者(田中靖人)：不死化ヒト肝細胞を3次元培養により培養しHBV感染実験を行った。薬剤感受性試験および感染中和試験をおこなった。また、HBV Genotype Gの複製様式を培養細胞およびキメラマウスを用いて明らかにした。HBV/Gは共感染相手のCore蛋白を利用して複製効率を上昇させる可能性がある。
- ・分担研究者(森石恒司)：HCV感染系におけるシグナルペプチドペプチダーゼによるHCVコア蛋白質の膜貫通領域の切断を抑制するとコア蛋白質は界面活性剤不溶化画分へは移行せず、ウイルス産生が低下する。コア蛋白質の膜貫通領域内の切断は抗ウイルス剤開発の標的になり得る。
- ・分担研究者(本多政夫)：肝組織において、HCV蛋白翻訳因子は正常肝よりC型慢性肝炎肝組織で発現が誘導され、肝組織のHCV-RNAと有意な相関を示した。La蛋白はstemloop IVに結合し、翻訳効率を上げている。La蛋白はJFH-1の感染により誘導されており、HCVは宿主翻訳因子を自ら誘導し複製に利用している。興味深いことにHCVのNS5AがLa蛋白の発現を上げていることが明らかとなった。
- ・分担研究者(原田和雄)：KAN システムを用いた3' X SL2 結合ペプチドの最適化を行い、HCV 3' X SL2 結合最適化ペプチドによる複製への影響についてレプリコンを用いて検証した。また、SL2 結合最適化ペプチドによるSL2 RNA認識様式について生化学的・構造科学的な解析を行った。
- ・分担研究者(坂本直哉)：8,000種の化合物のscreeningを施行し、HCV増殖を抑制する41種の化合物を同定した。さらに構造活性相関(SAR)解析により、1000の優れた3種のepistatic誘導体を同定した。また、生薬成分化合物の細胞内HCV増殖に対する効果を解析し、甘草由来の2種の化合物にHCV増殖抑制作用を見出し、細胞内解析によりこれらの薬物がeIF2α arrestに関連していることを明らかにした。また、肝コレステロール合成抑制薬 (statin)、肝脂肪化阻害薬 (fibrate) 誘導によりそれぞれ HCV複製 発現が抑制、および促進され、物質代謝関連蛋白が新規阻害の標的因子となる可能性が示唆された。
- ・分担研究者(武部 豊)：HCV感染系によるスクリーニングにより、低分子化合物ライブラリー (n=8,000) から4種のヒット化合物 (A, A0, B, C, D) を同定した。selective indexの高い (>100) 化合物 A, BはHCV初期感染過程を阻害すること、化合物Aはgenotype 2aに有効だが、1bに対しては効果がないこと、化合物



Bは2a, 1b共に有効であることが明らかになった。さらに化合物AはHCV受容体のCD81を直接の標的とする可能性が示唆された。

・分担研究者(池田正徳): ビタミン、アミノ酸、脂肪酸、およびミネラル類のHCV RNA複製に対する効果を網羅的に解析した。46種類の栄養成分中、 $\beta$ -カロテン、ビタミンD2、リノール酸の3成分が、それぞれ細胞増殖に影響を与えない濃度で、濃度依存的に全長HCV RNAの複製を抑制することを明らかにした。この抗HCV活性は酸化剤でキャンセルされることから、酸化ストレスが抗HCV活性に重要であり、その機構として酸化ストレスによるMEK/ERKシグナル系の活性化が重要なことを明らかにした。

・分担研究者(竹原徹郎): ラミブジン耐性変異(YMDD変異)を示す44例の血清で、プレコア領域のA1896変異とpreS領域の欠失がrL180M変異を有しない症例に高頻度に認められた。この変異と欠失は変異ウイルスの増殖を上昇させ、ポリメラーゼ以外の領域にもラミブジン耐性を担保する領域が存在した。さらにアデホビル感受性を規定する因子について解析した。

・分担研究者(加藤孝宣): レポーター遺伝子をNS5aヤコア領域の直前に挿入し、さらにHCV全長のレプリコンを用い、増殖能を比較した。J6/JFH-1キメラ株の全長のレプリコンが最も強い増殖能を示した。しかし長期培養によりGFPを欠失したウイルスを多く認めた。

・分担研究者(上田啓次): HBV pseudotype virus (HBVp) を作製し、ヒト肝臓cDNAのレトロウイルス発現ベクターライブラリーを導入した培養細胞によりスクリーニング中である。

#### IV. 21年度の課題

1. 不死化ヒト肝細胞を3次元培養により待望のHBV感染系およびHCV臨床株感染系が確立されつつある。本実験系を最適化し、レセプターの探索、感染・複製過程の解明を目指す。

2. HCV治療薬の開発を目指して、さらに最適化したペプチドを探索しHCV複製阻害能の最適化を進める。また、HCVの増殖を制御する宿主因子の機能的解析を進める。

3. 細胞内脂質、および脂質関連分子がHCVの生活環に重要であることが明らかとなってきたので、さらに詳細な機能解析を進める。アラキドン酸による抗HCV活性に関して解析を進める。

4. 複数のHBV遺伝子型複製クローンを用いてウイルス複製を制御する領域を特定する。ヒト肝臓キメラウイルスによるHBV感染実験による解析を進める。HBVの新たな複製制御機構あるいは制御領域を解明する。

5. さらに抗ウイルス薬候補のスクリーニングを進める。ヒット化合物に関しては作用機序、標的因子を解析するとともに、化合物の最適化を進める。また動物レベルでの有効性、毒性を確認する。

#### V. 行政施策への貢献の可能性

肝炎ウイルスに対する新たな治療法の開発は患者の予後を改善し、肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らし、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与する。また、ウイルス肝炎患者を広く検診で拾い上げ、適切な治療を行うことが社会的な要請である。この要請に応えるためにはより効果の高い治療法を低コストで実施できるように開発していく必要がある。

#### VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

Aly H.H., Watashi K., Hijikata M., Kaneko H., Takada Y., Egawa H., Uemoto S., Shimotohno K. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J. Hepatol.*, 46, 26-36, 2007.

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 82:7964-76.

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 82:5715-24.

Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Maruyama I, Shimada T, Takahashi S, Shirai T, Hino K, Sakaida I, Mizokami M. Direct Cytopathic Effects of Particular Hepatitis B Virus Genotypes in uPA/SCID Mouse with Human Hepatocytes. *Gastroenterology* 2008, in press.

Kurbanov F, Tanaka Y, Kramvis A, Simmonds P, Mizokami M. When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol.* 2008. 82:8241-8242.

Miyazawa 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. *Nature Cell Biology* 2007 9(9):1089-97.

Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol* 2007 81(15):8030-40.

Moriishi K, and Y. Matsuura, Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev. Med. Virol.*, 2007. 17(5): p. 343-354.

Abe, T., Y. Kaname, I. Hamamoto, Y. Tsuda, X. Wen, S. Taguwa, K. Moriishi, O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kanto, N. Hayashi, S. Akira, and Y. Matsuura, Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *J. Virol.*, 2007. 81(17): p. 8953-8966.

Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Sakamoto N, Enomoto N; Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C. *J Infect Dis.* in press.

Peng LF, Kim SS, Matchacheep S, Lei X, Su S, Lin W, Runguphan W, Choe WH, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Beeler AB, Porco JA Jr, Schreiber SL, and Chung RT. Identification of novel epoxide inhibitors of HCV replication: a high-throughput screen. *Antimicrob Agent Chemother* 2007; 51 (10):3756-3759.

Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastro Hepatol* 2007; Epub ahead of print.

Ariumi Y, Kuroki M, Abe KI, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus (HCV) RNA replication. *J Virol.* (2007) in press

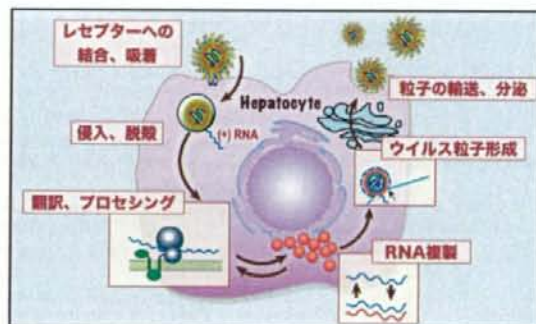
Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

1. 新規ウイルス培養系の開発



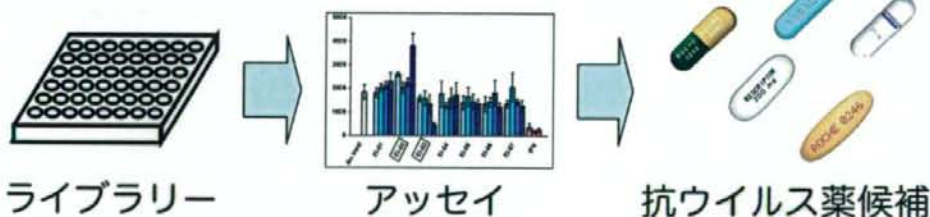
初代培養肝細胞や肝癌細胞など肝炎ウイルス培養に適した細胞の探索と開発

2. ウイルスの感染増殖機構の解析と治療標的の探索



肝炎ウイルスの感染、複製機構を解明して関与するウイルス側因子、宿主因子を同定、治療標的を探索

3. 抗ウイルス薬のスクリーニング



肝炎ウイルス培養系を用いて新規抗ウイルス薬を探索



## ○主任研究者 (脇田 隆字) の研究歴等

## ・過去に所属した研究機関の履歴

昭和63年～平成4年 名古屋大学大学院医学研究科  
 平成4年～7年 ハーバード大学医学部およびマサチューセッツ総合病院癌センター・客員研究員  
 平成7年～10年 東京都臨床医学総合研究所・主任研究員  
 平成10年～18年 東京都神経科学総合研究所・副参事研究員  
 平成18年～現在 国立感染症研究所・ウイルス第二部・部長

## ・主な指導を受けた研究者

名古屋大学大学院医学研究科：坂本信夫教授および各務伸一講師 (前愛知医大消化器内科教授)  
 米国ハーバード大学医学部およびマサチューセッツ総合病院癌センター：Jack Wands 准教授  
 東京都臨床医学総合研究所：小原道法室長

## ・主な研究課題

C型肝炎ウイルス感染複製機構の解析  
 肝炎ウイルスの病原性発現機構の解析  
 肝炎ウイルス感染症の新たな治療法の開発  
 下痢症ウイルスおよびエンテロウイルスのウイルス学

## ・これまでの研究実績

- 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 82:7964-76.
- 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 82:5715-24.
- Miyazawa 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. *Nature Cell Biology* 2007 9(9):1089-97.
- Kim CS, Jung JH, Wakita T, et al. Monitoring the antiviral effect of alpha interferon on individual cells. *J Virol* 2007 81(16):8814-20.
- Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol* 2007 81(15):8030-40.
- Morikawa K, Zhao Z, Date T, Miyamoto M, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S, Wakita T. The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *Journal of Medical Virology* 2007 79(6):714-23.
- Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nature Protocols*. 2006;1(5):2334-9.
- Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Miyamoto M, Kaga M, Barth H, Baumert TF, Dubuisson J, Wakita T. CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *J Virol* 2007 81(10):5036-45.
- Kato T, Matsumura T, Heller T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J Virol* 2007 81(9):4405-11.
- SL Uprichard, J Chung, FV Chisari, T Wakita. Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse cells. *Virology J* 2006, 3:89
- E Blanchard, S Belouzard, L Goueslain, T Wakita, J Dubuisson, C Wychowski, Y Rouil. Hepatitis C virus entry depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal of Virology*, 2006. 80(14):6964-72.
- T Kanda, A Basu, R Steele, T Wakita, JS. Ryerse, R Ray, RB Ray. Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. *Journal of Virology*, 2006. 80(9):4633-9.
- N Ishii, K Watashi, T Hishiki, K Goto, D Inoue, M Hijikata, T Wakita, N Kato, K Shimotohno. Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus *Journal of Virology*, 2006. 80(9):4510-20.
- Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinsonstrain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(7):2310-5, 2006.
- T Kato, T Date, M Miyamoto, M Sugiyama, Y Tanaka, E Orito, T Ohno, K Sugihara, I Hasegawa, K Fujiwara, K Ito, A Ozasa, M Mizokami, T Wakita. Detection of Anti-Hepatitis C Virus Effects of Interferon and Ribavirin by a Sensitive Replicon System. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43:5679-84
- J Zhong, P Gastaminza, G Cheng, S Kapadia, T Kato, DR Burton, SF Wieland, S Uprichard, T Wakita, FV Chisari. Robust Hepatitis C Virus Infection in Vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, 102:9294-9299.
- T Wakita, T Pietschmann, T Kato, T Date, M Miyamoto, Z Zhao, K Murthy, A Habermann, H-G Krasslich, M Mizokami, et al. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome. *Nature Medicine*. 2005 11:791-796.
- T Kato, T Date, M Miyamoto, Z Zhao, M Mizokami, T Wakita. Non-Hepatic Cell Lines HeLa and 293 Cells Support Efficient Replication of Hepatitis C Virus Genotype 2a Subgenomic Replicon. *Journal of Virology* 2005 79:592-596.
- Kato T and Wakita T. Development of an Infectious HCV Cell Culture System. In: *Hepatitis C Viruses Genomes and Molecular Biology* (ed. by Tan, S-L.) Horizon Bioscience, 2006, pp451-464.

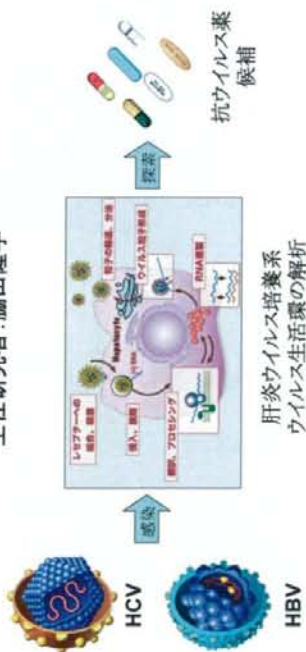
## &lt;特許&gt;

- 特願 2000-367365 劇症C型肝炎ウイルス株の遺伝子  
 特願 2003-148242 遺伝子型 2a のC型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム由来の核酸を含む核酸構築物、及び該核酸構築物を導入した細胞  
 特願 2004-045489 ヒトC型肝炎ウイルスの全長ゲノムを含む核酸構築物及び該核酸構築物を導入した組換え全長ウイルスゲノム複製細胞、並びにヒトC型肝炎ウイルス粒子の作成方法  
 特願 2004-243975 自律複製能を有する改変されたヒトC型肝炎ウイルスゲノム RNA

## 肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発

(H19-肝炎一般-004)

主任研究者: 脇田隆宇



## 研究課題と分担研究者

1. 肝炎ウイルスの新規感染モデルの開発  
(京大ウイルス研・土方、感染研・脇田、名市大・田中)
2. HCV増殖機構の解析と新規治療法の開発  
(阪大微研・森石、金沢大・本多、学芸大・原田)
3. HCV生活環に関する宿主因子探索と新規治療法開発  
(感染研・脇田、東医歯大・坂本、感染研・加藤)
4. HBV増殖機構の解析と新規治療法の開発  
(名市大・田中、阪大・竹原、浜医大・上田)
5. 肝炎ウイルス培養系を用いた抗ウイルス薬スクリーニング  
(感染研・武部、岡大・池田、東医歯大・坂本、感染研・脇田)

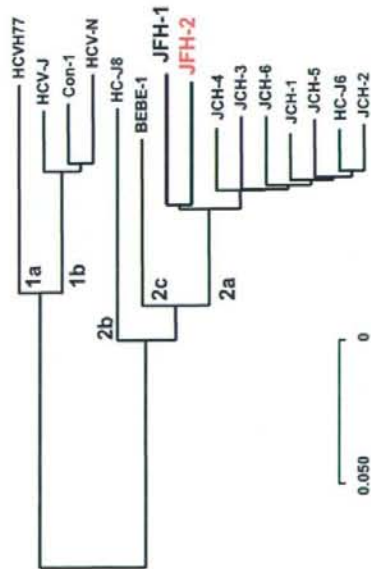
## 目的

- ・ HCVおよびHBVのウイルスキャリアが合計200万人以上存在する
- ・ 両ウイルスに対する抗ウイルス療法は充分ではなく、新たな治療法の開発が望まれる
- ・ 研究代表者はHCV培養系を開発した。また、HBVは複製増殖実験は可能だが、培養細胞による感染実験系は確立されていない
- ・ そこで、ウイルス培養系の開発・解析・改良と、ウイルス培養系を用いた新規肝炎治療法の開発を目的とする

## 新規C型肝炎ウイルス感染性クローン

- ・ JFH-1株以外のHCV株を培養細胞で複製増殖は可能か？
- ・ 劇症肝炎および急性肝炎症例からのHCV株分離
- ・ シアリコンの解析により同定した適合変異により感染増殖可能となるか？

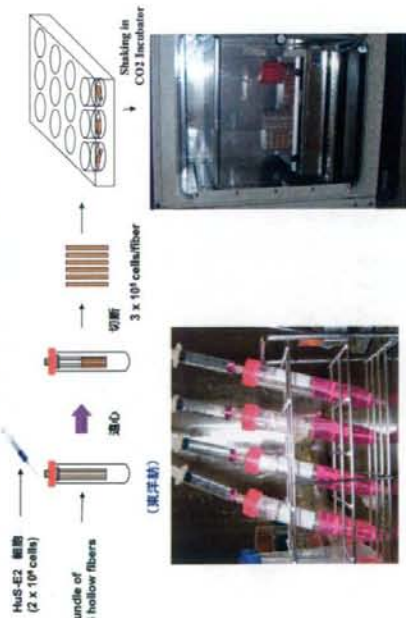
### 劇症肝炎患者から新たに分離したJFH-2株



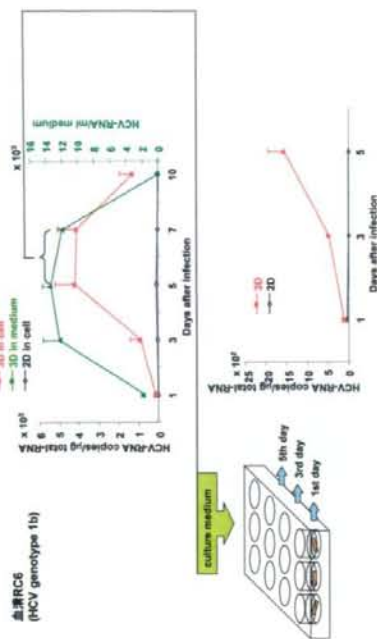
### 3次元細胞培養系によるHCV・HBV培養系

- HCVの臨床分離株を培養細胞で複製増殖可能か？
- 3次元細胞培養系の応用
- HBVの感染増殖が可能か？

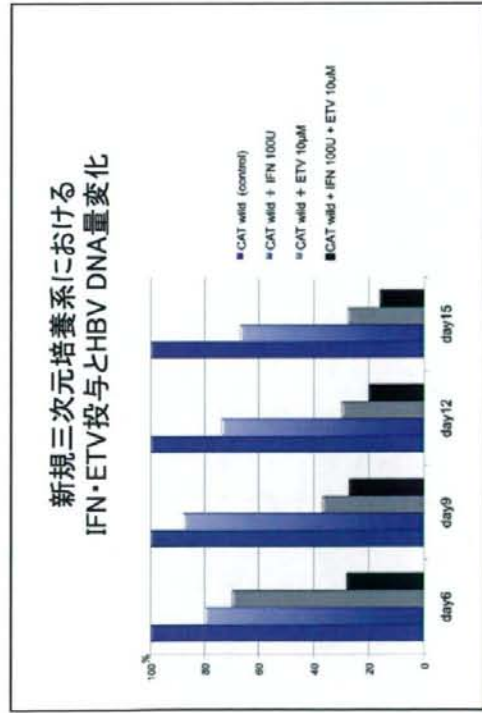
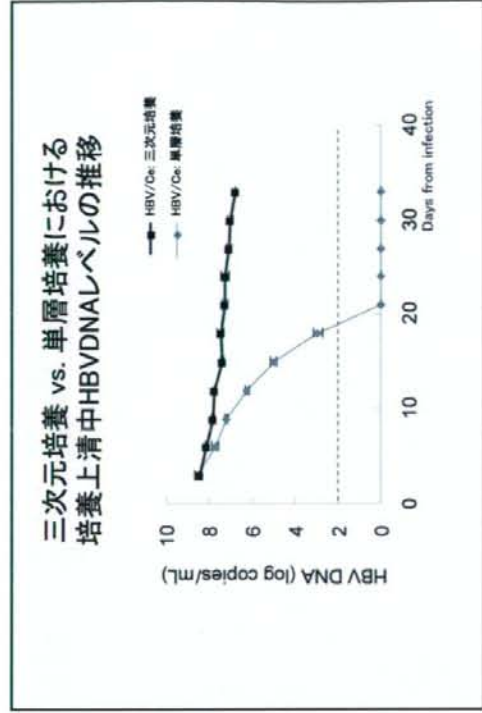
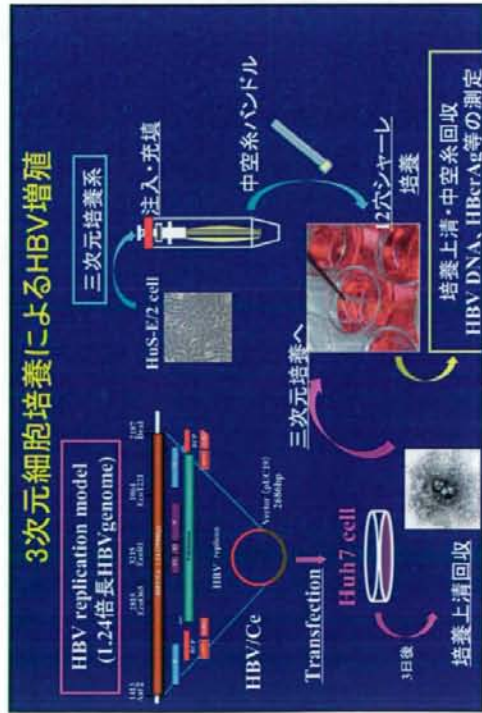
### Hollow Fiber(中空糸)を用いた細胞の立体培養系



### 中空糸培養Hu6-E2細胞に対する血清由来HCVの感染増殖



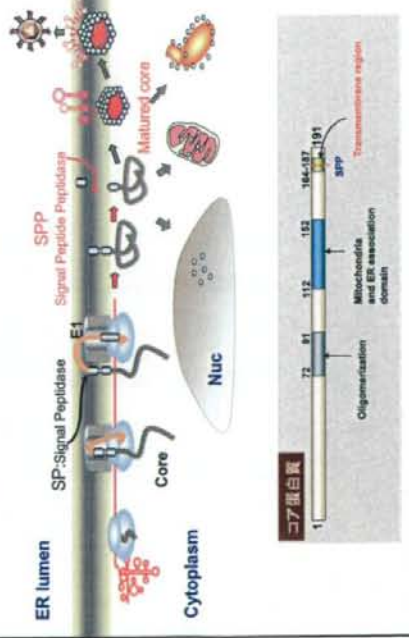




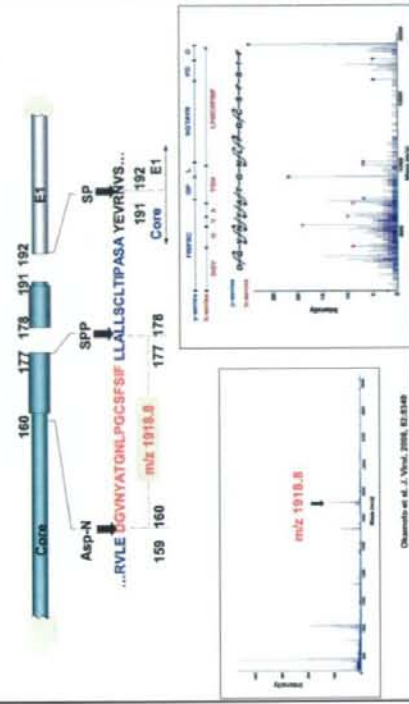
### HCV増殖機構の解析と新規治療法の開発

### HCV生活環に関する宿主因子探索と新規治療法開発

### HCV生活環の解析: HCVコア蛋白質のプロセッシング



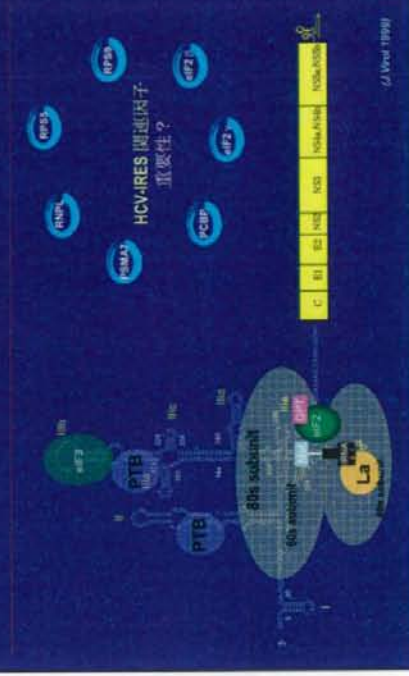
### SPPによるHCVコア蛋白質の切断部位



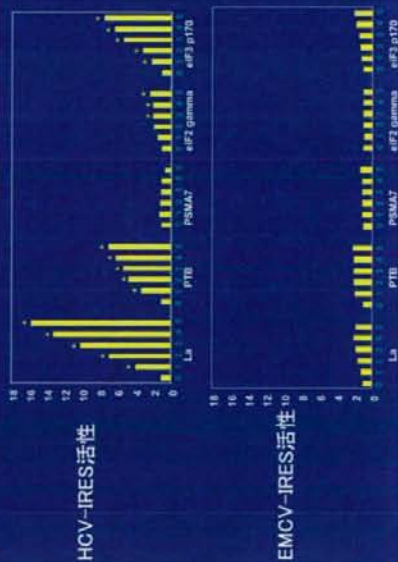
### SPPによるHCVコア蛋白質の切断

- SPPはコア蛋白質のPhe-177とLeu-178の間を切断する。
- SPPの切断によってコア蛋白質の一部はDRM画分へ移動する。
- SPP切断が抑制されるとコア蛋白質はDRM画分へ移動できなくなる。
- SPP活性の抑制によって複製には影響しないが、ウイルス産生は低下する。

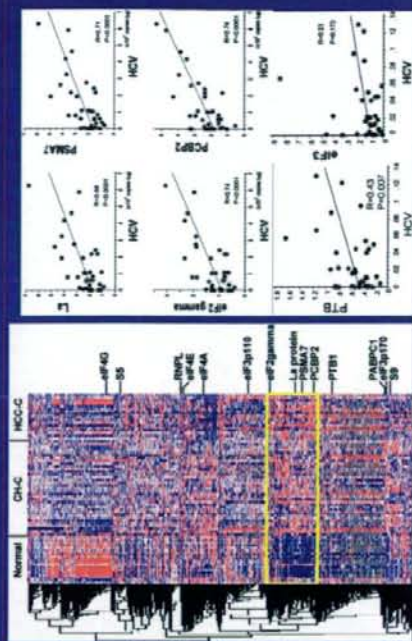
### HCV生活環の解析: HCV-IRES依存性タンパク翻訳と宿主因子



ウナギ網状赤血球溶解液における翻訳関連因子と  
HCV及EMCV-IRES活性の変化

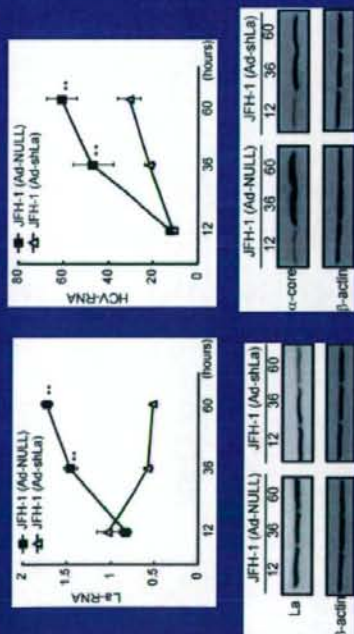


C型肝炎肝炎・肝癌組織でHCV-IRES関連因子の発現



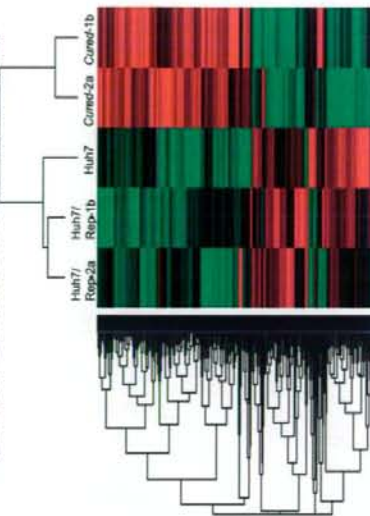
La蛋白の抑制とJFH-1複製抑制

La蛋白に対するショートヘアピンRNA-組み替えアデノウイルスの作成



遺伝子発現プロファイルのクラスター解析

(Huh7, Rep-1b-2a, Cured-1b-2a, FC>1.2, 2701genes)





Huh7-Cured細胞間で  
変動を示したpathway  
(KEGG pathway)

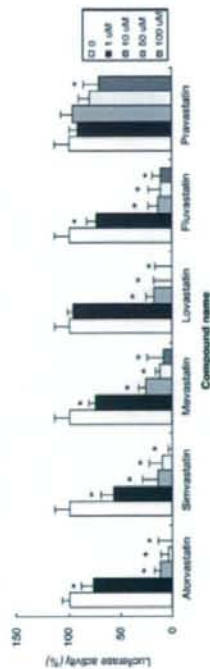
脂質代謝

細胞周期

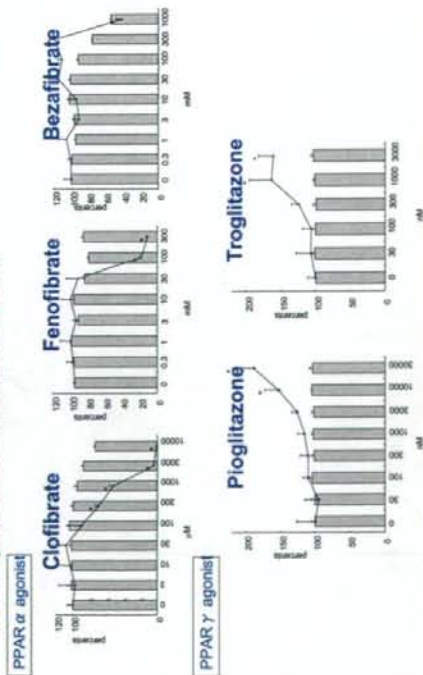
インスリンレセプターシグナル

Description	p-value
Allopathic medicinal products	6.19E-11
Biosynthesis of sterols	4.21E-08
Glucocorticoid biosynthesis	5.94E-05
Insulin signaling pathway	1.14E-04
Cell cycle	1.08E-03
Biphenyl A degradation	2.41E-03
Arachnoid junction	4.58E-03
<b>Androgen and estrogen metabolism</b>	<b>7.48E-03</b>
<b>Taurine and hypoxanthine metabolism</b>	<b>7.87E-03</b>
TGF-beta signaling pathway	9.42E-03
Fructose and mannose metabolism	9.47E-03
VEGF signaling pathway	1.38E-02
1,5-diphosphoglycerate metabolism	1.42E-02
N-Glycan degradation	1.64E-02
MAPK signaling pathway	1.65E-02
Regulation of actin cytoskeleton	1.73E-02
Cell adhesion molecules (CAMs)	1.73E-02
Focal adhesion	2.17E-02
Tight junction	2.28E-02
mtDNA signaling pathway	2.38E-02
<b>Superoxide dismutase activity biosynthesis</b>	<b>3.08E-02</b>
Glutathione-S-transferase 1	3.18E-02
Sulfur metabolism	2.69E-02
Acetoxons	2.92E-02
Porphyrin and chlorophyll metabolism	3.11E-02
Dentatorubralpallidum atrophy (DRPLA)	3.41E-02
RNA polymerase	3.43E-02
Folate biosynthesis	3.48E-02
Insulin signaling pathway	3.51E-02
Histidine metabolism	4.39E-02
Wnt signaling pathway	4.45E-02
	4.75E-02

Statin製剤によるHCV増殖抑制効果

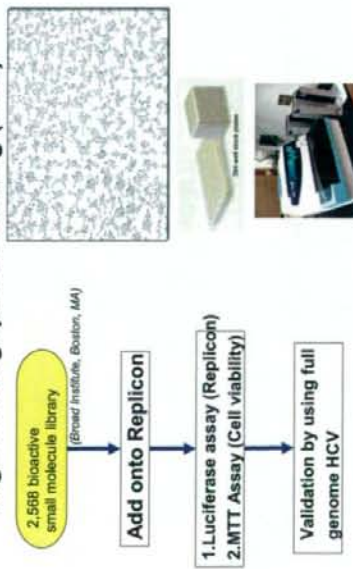


PPAR agonistのHCV増殖に与える影響

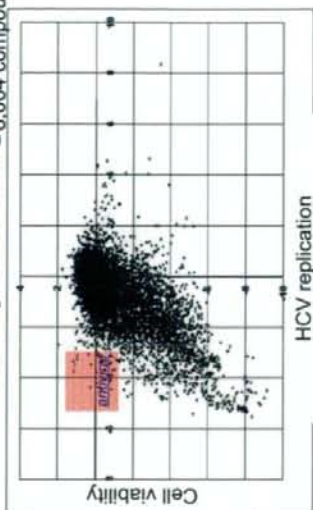


肝炎ウイルス培養系を用いた抗ウイルス薬  
スクリーニング

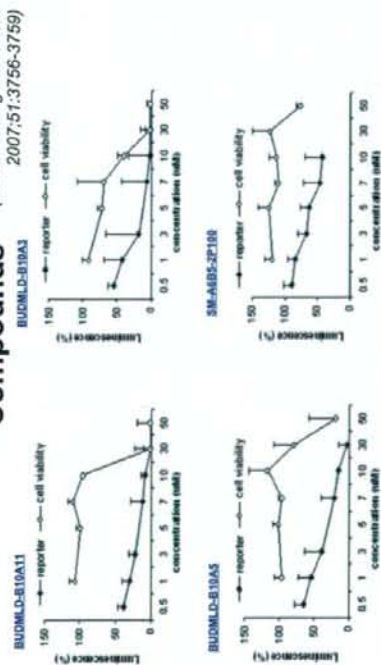
レプリコンによる抗ウイルス薬スクリーニング:  
High-Throughput Screening (HTS)



Diversity-Oriented Synthesis Library:  
Primary Screening 8,064 compounds



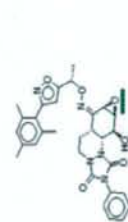
Secondary Screening of Antiviral  
Compounds (Antimicrob Agents Chem  
2007;51:3756-3759)



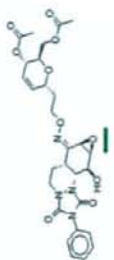
Antiviral Hit Compounds: epoxide

(Antimicrob Agents Chem  
2007;51:3756-3759)

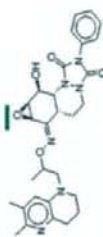
BU0MLD-B10A11



BU0MLD-B10A3



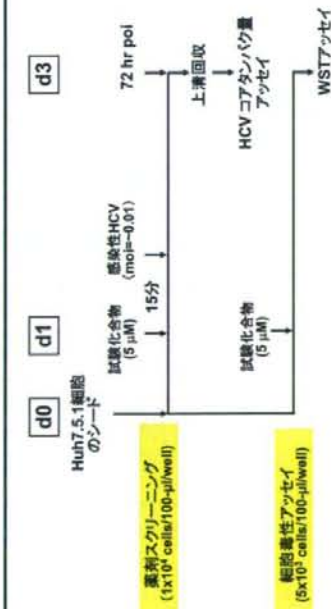
BU0MLD-B10A5



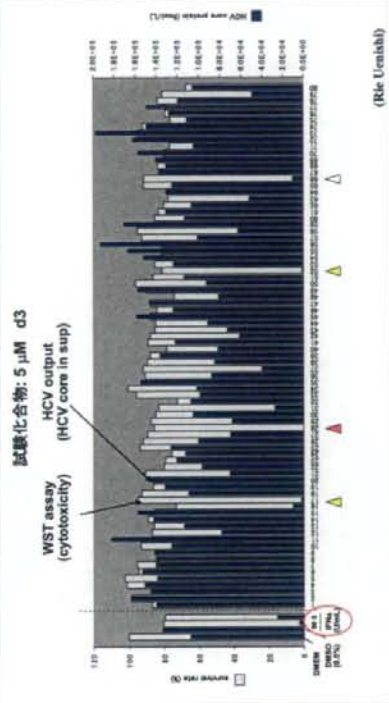
SIM-ABBS-2P100



### HCV感染系による抗ウイルス薬スクリーニング: HCV阻害剤スクリーニング法



### 低分子化合物ライブラリーを用いた阻害剤スクリーニングの一例



### まとめと来年度の課題

1. 新規感染性HCV株を確立した。さらに新たな感染性HCV株(特に遺伝子型1b)の確立を目指す。
2. 不死化ヒト肝細胞の3次元培養によりHBV感染系およびHCV臨床株感染系が確立された。本実験系を至適化し、レセプターの探索、感染・複製過程の解明を目指す。
3. HCVの生活環において細胞内脂質、および脂質関連分子が重要なことが明らかとなってきた。ウイルス培養系を用いて、HBVとHCVの感染増殖機構の解明を進め、関与する宿主因子を解析する。
4. ウイルス培養系を用いた抗ウイルス薬候補のスクリーニングを進める。ヒット化合物に関しては作用機序、種別因子を解析するとともに、化合物の至適化を進める。また動物レベルでの有効性、毒性を確認する。



## 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： 肝炎ウイルス感染防御を目指したワクチン接種の基盤構築課題番号：H19-肝炎-一般-005研究代表者：水落 利明**I. 研究の意義**

- (1) 従来の HBV 母子感染 (垂直感染) 防御に重点をおいた HB ワクチン接種施策から、その急激な増加傾向が懸念されている HBV 水平感染 (性感染) 防御も視野に入れた施策の必要性を検討する。
- (2) HB ワクチン (使用抗原の serotype/genotype の違いも考慮して) 接種効果検証に必須である抗 HBs 抗体価測定法の標準化を目指す。
- (3) HBV 感染防御に最小限必要な抗 HBs 抗体価を検証し、HB ワクチン接種効果判定の指標とする。

**II. 研究の目的、期待される成果**

- (1) HBV 感染防御に必要な抗体価の国内基準設定に資するため抗 HBs 抗体価測定法の標準化を行う。
- (2) マウス実験モデルを用いて、HBV 感染防御に必要な抗体価の定量についての知見を得る。
- (3) 医療現場 (産科および小児科) における HB ワクチン接種効果の検証を行い、その有効性について考察し今後の HB ワクチン接種の方策整備の一環とする。
- (4) HBV 感染経路について、その変遷を追跡調査することにより今後の HB ワクチン接種の対象について考察を加える。

**III. 2年間の研究成果**

研究代表者 (水落)：国内の臨床検査現場で用いられている抗 HBs 抗体価測定キットの性能検査を行い、いくつかのキットについては改善を指導し、HBs 抗体価測定キットの標準化を進めることができた。

- ・ 研究分担者 (田中)：新潟県内分娩取り扱い産婦人科および小児科医療機関に対するアンケート調査 (HBV キャリアー妊婦の実数及び全妊婦における割合、検査時期および検査方法、出生児キャリアー化予防的治療の実際、その後の児の管理等) を行い、それらの結果解析を行った。
- ・ 研究分担者 (小方)：国産 HB ワクチン接種完了者が示す血清 HBs 抗体濃度の国産測定キット (PHA 法、国際単位表示法) と WHO 基準測定キットとの乖離状況や相関関係の検討を終えた。
- ・ 研究分担者 (岡部、多屋)：これまでのサーベイランスデータからは、現在のわが国における B 型肝炎は、比較的若い成人を中心に性的接触により感染が起きていると考えられる状況にあり、今後は性的活動の始まる小児期でのワクチン接種が必要という結論を導いた。
- ・ 研究分担者 (片山)：HBV 感染に感受性があるヒト肝細胞置換キメラマウスを用いて、HBIG を充分量投与した後に、感染価の明らかな HBV genotype A の絶対量  $10^5$  コピーを接種し、感染が防御されることを明らかにした。

**IV. 21年度の課題**

- (1) 海外においてHBV感染防御に必要な最小抗体価とされている10mIU/mLという値について国内での検証を行う。米国FDA認可のHBワクチン接種者が獲得するHBs抗体価を国内で汎用されているキットで測定し比較検討する。
- (2) 20年度に実施/回収した小児科医療施設におけるHBV母子感染防止対策についてのアンケート結果を解析する。
- (3) 感染症発生动向調査データからHBワクチン接種の必要性について考察を行う。特に保育施設におけるHBV感染の実態把握および意識調査を実施し、今後のHBワクチン接種を含めB型肝炎対策戦略策定の基礎とする。
- (4) ヒト肝細胞移植キメラマウスによるHBV感染実験から、抗HBs抗体価と感染防御能との関係を明らかにする。
- (5) HBV escape mutant clone を作製し、それらの感染効率の検討およびモノクローナル抗体を用いての感染阻止実験を行う。これにより mutantHBV の感染に対応できるHBiGおよびワクチンの有効性を検討することが可能になる。

**V. 行政施策への貢献の可能性**

従来の、主に母子間（垂直感染）及びハイリスク群（医療従事者等）でのHBV感染防御を目的としたHBワクチン接種施策の基本概念に見直しを加え、既に増加傾向にあるHBV水平感染の防御をも念頭においたHBワクチン接種推進施策を提言できる可能性がある。

**VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)**

1. 水落利明、小高千加子、山口一成：国内で販売されている抗HBs抗体定量用体外診断用医薬品の評価：国内標準品を用いた検討「臨床検査」2008;52:111-115.
2. Mizuochi, T., Y. Okada, K. Umemori, S. Mizusawa, S. and K. Yamaguchi: Evaluation of 10 commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV) surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H. J. Virol. Methods 2006;136:254-256.
3. 芹川武大・田中憲一。新潟県内におけるB型肝炎母子感染防止対策の実績。日本産科婦人科学会新潟地方部会誌。2008年 第39巻 15-18頁
4. 小方則夫。医療従事者におけるB型肝炎ウイルス(HBV)・C型肝炎ウイルス(HCV)陽性血液曝露事故後の感染予防対策：国際標準との整合性確立に向けて。病院機能向上研究結果報告集。伊藤庄平(編集)、独立行政法人労働者健康福祉機構(川崎)2008年(印刷中)
5. 多屋馨子：保育園での感染症とその対策；保育園で推奨される予防接種。第14回日本保育園保健学会。平成20年10月26日。日本教育会館
6. Ayako Tabuchi, Junko Tanaka, Keiko Katayama, Masaaki Mizui, Harumichi Matsukura, Hisao Yugi, Takashi Shimada, Yuzo Miyakawa, Hiroshi Yoshizawa: Titration of hepatitis B virus infectivity in the sera of pre-acute and late acute phases of HBV infection: Transmission experiments to chimeric mice with human liver repopulated hepatocytes. Journal of Medical Virology. 2008;80(12):2064-2068.
7. Yasuhiro Tanaka, Masaya Sugiyama, Fuat Kurbanov, Atsunori Kusakabe, Fuminaka Sugauchi, Kanako Tatematsu, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno, Harvey J. Alter, Masashi Mizokami. A novel three-dimensional long-term culture system of human hepatocytes for hepatitis B virus infection. (Submitted)

VII. III (2年間の研究成果)の概要図等

国内で使用されているキットによる抗HBs抗体価測定値の標準化

平成20年度に終了

HBワクチンの臨床的効果の検証(アンケート調査)



医療機関(産婦人科・小児科)へのアンケート依頼



- HBVキャリアー妊婦の実数及び全妊婦における割合
- HBsAb検査時期および方法
- 出生児キャリアー化予防治療の実態および児の管理



結果の解析

ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いたHBV感染実験

ヒト肝細胞移植



肝障害免疫不全マウス

HBIG接種



ヒト肝細胞移植キメラマウス

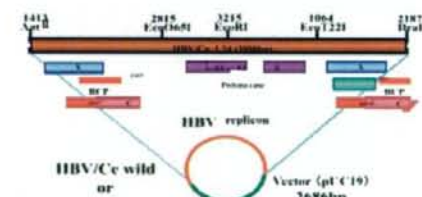
HBV接種



HBV感染防御に必要なHBsAb抗体価の検討

HBV mutant clone の作成

HBV複製系



HBV/Ce wild or mutant  
HBV/Ce G145R

遺伝子導入

Huh7 cell

3日後

培養上清回収



三次元培養系

HuS-E/2 cell



注入・充填



中空系バンドル

三次元培養へ



12穴シャーレ培養

培養上清・中空系回収  
HBV DNA、HBerAg等の測定



## ○研究代表者の研究歴等

## ・過去に所属した研究機関の履歴

- 1980-1985 大阪大学医学部癌研腫瘍発生学教室 助手  
 1983-1987 米国国立予防衛生研究所(NIH)Visiting Fellow/Associate  
 1987-1988 国立予防衛生研究所血液製剤部主任研究官  
 1989-1992 国立予防衛生研究所血液製剤部 HB 抗原室長  
 1992-2002 国立予防衛生研究所細菌・血液製剤部輸血病態室長  
 2002-現在 国立感染症研究所血液・安全性研究部第2室長

## ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- 1976-1985 (故)北川正保教授、浜岡利之教授(大阪大学医学部)  
 1983-1987 Dr. Alfred Singer (National Cancer Institute, NIH)  
 1987-2004 小室勝利部長(国立予防衛生研究所/感染症研究所 血液製剤部)  
 2004-現在 山口一成部長(国立感染症研究所 血液・安全性研究部)

## ・主な研究課題

- (1) レトロウイルスを用いたマウスエイズモデルの研究
- (2) 胸腺由来細胞株を用いた抗原提示機構の研究
- (3) 肝炎関連体外診断薬の性能評価に関わる研究
- (4) HCV 感染による肝臓病変、特にBリンホーマ発症との関連についての研究

## ・これまでの研究実績

1. Evaluation of 10 commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV) surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H. *J Virol Methods* (2006)
2. Reactivity of genotypically distinct hepatitis B virus surface antigens in 10 commercial diagnostic kits available in Japan. *Jpn J Infect Dis.* (2005)
3. Re-evaluation of HCV Ab detection kits approved for marketing in Japan. *Jpn. J Infect Dis* (2002)
4. Re-evaluation of HBsAg detection kits approved for marketing in Japan. *Jpn. J Infect Dis* (2001)
5. CLIP-derived peptides bound to class II MHC molecules of medullary thymic epithelial cells differ from those of cortical thymic epithelial cells in their diversity, length, and carboxyl terminal processing. *Eur J Immunol* (2000)
6. Heterosexual transmission of murine AIDS virus. *J Virol* (1998)
7. Delayed progression of a murine retrovirus-induced acquired immunodeficiency syndrome, MAIDS, in X-linked immunodeficiency mice. *J Exp Med* (1993)
8. Medullary but not cortical thymic epithelial cells present soluble antigens to helper T cells. *J Exp Med* (1992)
9. Analysis of T-cell subsets in rejection of K<sup>b</sup> mutant skin allografts differing at class I MHC. *Nature* (1986)

厚生労働科学研究 肝炎等克服緊急対策研究事業  
「肝炎ウイルス感染防衛を旨としたワクチン接種の基盤構築」

平成19年度-21年度

### 研究班構成員

- 主任研究者: 水澤利明(感染症 血液・安全性研究部)
- 分担研究者: 田中 暉一(新潟大学 産婦人科)
- 暁谷ゆり(大阪府立急性期・総合医療センター)
- 多摩 麗子(感染症 感染症情報センター)
- 岡部 健彦(感染症 感染症情報センター)
- 小方 剛夫(鹿児島病院)
- 片山 恵子(広島大学 医学・疾病制御学)
- 菅内 文中(名古屋市立大 消化器・代謝内科学)



## A "naïve" Question

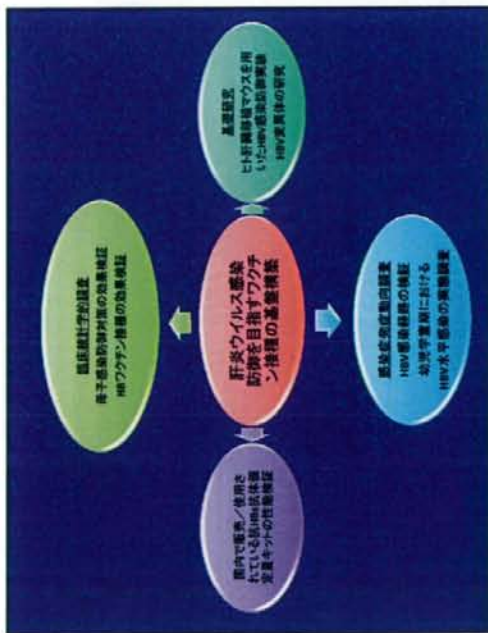
Why is Japan not willing to launch the

universal HB vaccination program?

## 研究目的

- 国内では現在、医療従事者などの「感染予防」および「感染予防」を目的とした接種は行われていない。
- しかし近年のHBV感染率の変化に伴い、我が国のHBVワクチン接種率を向上させる必要があるのではないか？
- しかし「なぜ必要か」といふ疑問が……
- 感染予防に必要なHBV抗体価の基準が不明確(10mIU/ml)
- HBV抗体価測定法の間での性能比較がなされていない
- ワクチン投与後の抗体価推移のフォローアップが不十分
- HBV変異体の出現
- 投与ワクチンの選択

本研究では以上の問題点についての検討を軸として今後の日本での「感染予防」接種を目的とする

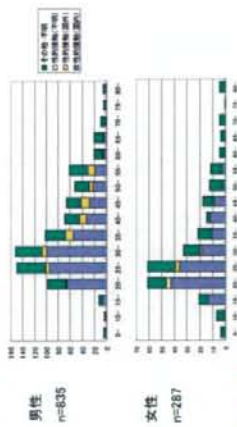


## B型肝炎のサーベイランス

- 1987年1月～ ウイルス性肝炎(A型、B型、非A非B型)として  
全国約500ヶ所の病院定点から月毎に届出  
※キャリアの急性増悪を含む
- 1989年4月～ 感染症法施行に伴い、4類感染症の急性ウイルス性肝炎  
(A型、B型、C型、D型、E型、その他、不明)として全数把握に変更。  
診断から7日以内に届出。  
※キャリアの急性増悪は含まない。
- 2003年11月5日～ 感染症法改正により、5類感染症のウイルス性肝炎  
(B型、C型、D型、その他、不明)に類型変更。
- 2006年4月1日～ 届出基準・届出様式変更。  
➢ 届出基準:「IgM・HBe抗体の検出」が必須の検査法として明示。  
➢ 届出様式: 症状が、自由記載から主要症状は選択式になる。  
➢ 感染地域が、国々までから都道府県や詳細地域までに拡大。

## サーベイランスにより見えてきたHBV感染経路

- 2003-2007年: 1,122例
- 性的接触 677例(60%); 男性 62%, 女性 55%
- その他・不明 445例(40%)



● 母子感染 (4例)

## HBV母子感染防止対策の実態調査

- HBキャリア成立の主要な原因は母子感染である。
- 妊婦健診におけるHBs抗原は公費により検査が実施されるため、母子感染ハイリスク事例の抽出は効率的に行われている。
  - B型肝炎母子感染事業普及による母子感染の激減
  - 未受診妊婦等の問題
- 東南アジア地域などからの出稼ぎや移民の増加
  - HBV母子感染予防事業から漏れる児
- 公費でなく保険診療に変更されたための受診控え

### アンケート調査

- 産婦人科対象、新潟県内における分娩取り扱い施設(診療所、病院)
- 病院28施設、診療所27施設 (回収率100%)
- HBキャリアー妊婦の実数及び全妊婦に占める割合
  - HB抗原の種類
  - 予防的治療の実態(事業で推奨している方法との相違、各施設による工夫)
  - キャリア化した児への治療の実態
  - 児のフォロー期間、フォロー方法の実態