

研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（肝炎克服緊急対策研究事業）

平成21年度

分担研究報告書

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（H19-肝炎-一般-001）

分担研究者 小原恭子 熊本大学大学院生命科学研究部・特任教授

「DHCR24を介したHCVによる細胞増殖性獲得の分子機構解明」

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)感染は高率に慢性化し、肝硬変、肝癌に移行する。研究分担者らは、HCVの持続発現に伴い肝細胞の腫瘍原性が亢進する事を見いだしており、この制御因子の1つは3 β -HYDROXYSTEROL Δ 24-REDUCTASE (DHCR24)である事を明らかにしてきた。分担研究者らはHCV感染がDHCR24の発現を亢進し、p53の活性低下を通じて酸化ストレス誘導性アポトーシスの反応を低下させる事を見いだした。さらに、p53の活性低下はDHCR24過剰発現に伴ってp53, MDM2相互作用が亢進する事やp53アセチル化が低下する事による可能性を見いだした。また、DHCR24の発現が亢進するとp53, MDM2相互作用が亢進しても分解系が抑制され、p53レベルが高く維持される可能性も明らかとなった。さらに、この様なDHCR24の過剰発現によるp53,MDM2相互作用の亢進は肝臓細胞では生じるが、肺の様な肝臓以外の組織由来細胞では、生じない事も明らかとなり、本経路の肝臓特異性が示唆された。

A. 研究目的

昨年度までに分担研究者らは、HCV感染がDHCR24分子の発現を誘導しこれが酸化ストレス誘導性アポトーシスを抑制する事を見いだした。また、HCVによるDHCR24遺伝子の転写誘導機構の解析も行った。本年度はさらにDHCR24過剰発現によるp53活性抑制機序を検索し、HCVの新たな病原性発現経路やその組織特異性の解明を目的に研究を進行した。

B. 研究方法

HCVの持続発現により発揮される腫瘍原性亢進機序を解明するためHCV発現継代細胞(*J. Biol. Chem.* 279 (15), 14531-14541, 2004)をマウスに免疫して単クローン抗体を樹立した。この中でHCV発現継代細胞やHCV陽性肝癌患者組織で発現が亢進する分子、DHCR24を認識するクローンを得た。

HCVによるDHCR24の発現誘導を細胞で検索したところ、転写レベル

で誘導される事が明らかとなった。HCVが誘導するDHCR24の過剰発現が過酸化水素処理後のアポトーシス感受性に及ぼす影響についてはカスペーゼアッセイで定量的に測定して検索した。p53の活性はp21^{WAF1/CIP1}プロモーターアッセイで検索した。DHCR24の関与の可能性についてはsiRNAを用いて検討を行った。p53の翻訳後修飾等は特異抗体を用いたウェスタンブロット法や免疫沈降法で検索した。また、p53やMDM2の細胞内での局在について検索するため、蛍光抗体法や細胞分画を行って検索した。DHCR24の過剰発現が及ぼす影響も明らかにするため、レンチウイルスベクターやプラスミドベクターでDHCR24を過剰発現する細胞株を樹立した。臓器特異性を検討するため、肝臓由来細胞株であるHepG2細胞に加え、肺由来細胞のWI38（肺2倍体細胞）やA549細胞を用いて実験を行った。

（倫理面への配慮）

ヒト肝臓細胞を用いた宿主遺伝子発現解析については、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針

（H16.12.28）、組換えDNA実験については、組換えDNA実験指針

（H14.1.31）に基づき、実施した。遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、熊本大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会の承認を得ている（H18年6月）。患者検体の使用に関する承認は熊本大学生命科

学研究部等倫理委員会で既に得た（倫理第235号）。動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（H18.6.1）に従った。また、熊本大学本荘・大江地区動物実験委員会の承認を得ている（H18年4月）。

C. 研究結果

HCV発現継代細胞や、DHCR24の過剰発現細胞では過酸化水素誘導性アポトーシスに耐性となる事が明らかとなっているが、これはHCV発現継代細胞やDHCR24過剰発現細胞でp53活性が低下していたためと考えられる。これまでの結果から、DHCR24過剰発現によりp53の活性が抑制される可能性が考えられ、この活性抑制機序を明らかにするため、まずp53の活性化に重要である翻訳後修飾を検討した。P53蛋白質の各種セリン残基のリン酸化についてはほとんど影響がないもののリジン残基(373, 382)の核内でのアセチル化がDHCR24過剰発現により低下している事が明らかとなった。次に、p53の活性制御に重要なMDM2との相互作用を免疫共沈法で解析したところ、DHCR24過剰発現によりこれらの相互作用が亢進する事が明らかとなった。また、細胞を核と細胞質に分画して検討したところ、細胞質においてp53とMDM2の相互作用が亢進している事が明らかとなった。さらに、DHCR24が過剰発現するとp53

のユビキチン化が抑制され、分解が抑えられる事も明らかとなった。その結果E3ユビキチンライゲースであるMDM2とp53の相互作用が亢進しても分解されない可能性も考えられた。p53とMDM2の相互作用を肝臓や肺由来の細胞株で比較すると、DHCR24の発現亢進により、肝臓細胞ではこの相互作用が亢進するのに対し、肺の細胞では、この相互作用の亢進が見られなかった。

D. 考察

HCVがDHCR24遺伝子を転写誘導し、その過剰発現による過酸化水素誘導性アポトーシスへの抵抗性獲得の分子機序はp53の活性抑制による可能性が明らかとなった。DHCR24による詳細なp53翻訳後修飾制御機構については、今後さらなる検討が必要と考えられる。また、DHCR24過剰発現によるp53とMDM2相互作用の亢進の際、p53の分解抑制がどの様に生じるのかをさらに解明する。さらに、DHCR24過剰発現によるp53-MDM2相互作用の肝臓細胞特異的な亢進機序も明らかにする予定である。予備的知見では、肝臓細胞で特異的に作用するキナーゼ経路の関与が示唆されており、さらなる検討を要する。以上の検討からHCVの新たな肝臓細胞での病原性発現のメカニズムが明らかになると期待される。

E. 結論

本年度の研究により、DHCR24過剰発現によるp53の翻訳後修飾、特にp53アセチル化抑制とp53とMDM2の肝臓細胞・細胞質における相互作用亢進によってp53活性が低下する可能性が明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1) M. Satoh, M. Saito, K. Tanaka, S.

Iwanaga, Salem Nagla Elwy Salem

Ali, T. Seki, S. Okada, M. Kohara, S.

Harada, C. Kai, and K.

Tsukiyama-Kohara.

Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse.

Comp. Immunol. Microbiol. Infect.

Dis. in press.

2) Y. Amako, K. Tsukiyama-Kohara, A.

Katsume, Y. Hirata, S. Sekiguchi, Y.

Tobita, Y. Hayashi, T. Hishima, N.

Funata, H. Yonekawa, and M. Kohara.

Pathogenesis of hepatitis C virus

infection in *Tupaia belangeri*.

J. Virology (2010) 84 303-311

[Selected in "Spotlight"].

3) T. Nishimura, M. Kohara, K. Izumi,

Y. Kasama, Y. Hirata, Y. Huang, M.

- Shuda, C. Mukaidani, T. Takano, Y. Tokunaga, H. Nuriya, M. Satoh, M. Saito, C. Kai and K. Tsukiyama-Kohara. HEPATITIS C VIRUS IMPAIRS P53 VIA PERSISTENT OVER-EXPRESSION OF 3 β -HYDROXYSTEROL Δ 24-REDUCTASE
J. Biol. Chem. (2009) 284 36442-36452.
- 4) K. Saitou, K. Mizumoto, T. Nishimura, C. Kai and K. Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus core protein facilitates the degradation of Ku70 and reduces DNA-PK activity in hepatocytes. *Virus Research* (2009) Sep;144(1-2):266-271.
- 5) K. Machida, K. Tsukiyama-Kohara, S. Sekiguch, E. Seike, S. Tone, Y. Hayashi, Y. Tobita, Y. Kasama, M. Shimizu, H. Takahashi, C. Taya, H. Yonekawa, N. Tanaka, and M. Kohara. Hepatitis C virus and disrupted interferon signaling promote lymphoproliferation via type II CD95 and interleukins. *Gastroenterology* (2009) 137: 285–296.
- 6) Y. Inoue, K. Tsukiyama-Kohara, M. Yoneda, H. Sato, and C. Kai. Inhibition of host protein synthesis in B95a cells infected with the HL strain of measles virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* (2009) Jan;32(1):29-41.
- (日本語総説) :
1. 小原恭子・町田圭吾・小原道法「C型肝炎ウイルスとBリンパ腫」「感染・炎症・免疫」第39巻 第2号 p61-63, 2009
2. 学会発表
1) M. Saito, and K. Tsukiyama-Kohara. Molecular mechanism of DHCR24 over-expression induced by hepatitis C virus. 16th International Symposium on Hepatitis C virus & Related Viruses. 2009, Nice, France.
2) M. Satoh, M. Saito, T. Takano, Y. Kasama, T. Nishimura, Y. Nishito, Y. Hirata, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Antibody raised against 3 β -hydroxysterol- Δ 24-reductase (DHCR24) suppresses hepatitis C virus infection through BGT-1. 16th International Symposium on Hepatitis C virus & Related Viruses. 2009. Nice, France.
3) K. Tsukiyama-Kohara. The novel pathway for impairment of p53 and oxidative stress response by hepatitis C virus 4th Medical Biotech Forum. 2009

Dalian, China.

- 4) K. Tsukiyama-Kohara, K. Machida, Y. Kasama, S. Sekiguch, and M.Kohara Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins. ワークショップ 2W11 サイトカイン制御因子による多様な生体調節 第 32 回日本分子生物学会年会 2009年 横浜
- 5) 西村知裕、齊藤誠、小原道法、小原恭子 HCV 誘導性 3β -Hydroxysterol δ -24 reductase 持続発現による p53 転写因子機能の抑制 第 32 回日本分子生物学会年会 2009年 横浜
- 6) 西村知裕、笠間由里、齊藤誠、小原道法、小原恭子 C 型肝炎ウイルス (HCV) が誘導する DHCR24(3β hydroxysterol Δ 24 reductase)過剰発現による p53 機能抑制 ワークショップ 2 ウイルス発癌 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年東京
- 7) 小原恭子、町田圭吾、笠間由里、関口敏、小原道法 C型肝炎ウイルスと B リンパ腫 ワークショップ6 病原性発現とモデルシステム 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年 東京
- 8) 佐藤正明、笠間由里、小原道法、

小原恭子

Betaine/GABA transporter1(BGT-1) の C 型肝炎ウイルス複製における役割 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年 東京

9) 齊藤誠、小原恭子

C 型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御機構の解析

第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年 東京

10) 西村知裕、齊藤誠、小原道法、小原恭子

Hepatitis C virus impairs p53 via persistent overexpression of 3β -hydroxysterol δ 24-reductase. 第68回日本癌学会学術総会 2009年 横浜

H. 知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし (出願準備中 1 件)

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

分担研究報告書

ステム細胞由来肝細胞のウイルス感染研究への応用

分担研究者 落谷孝広 国立がんセンター研究所がん転移研究室・独立室長

研究要旨：本年度は、岡山大学の加藤班員と共同で確立した間葉系幹細胞から分化した肝細胞における HCV ウイルスの複製系において、non-coding-small RNA の microRNA122 の発現の重要性を確認した。方法は microRNA122 のアンタゴニストを培養系に添加し、その発現を 75% 抑制した結果、HCV のウイルス複製が顕著に抑制された。この結果から、ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞から分化誘導した肝細胞様細胞には、HCV ウイルス複製能があり、その性質の一部は microRNA によって制御されていることを証明した。

A. 研究目的

間葉系幹細胞等のステム細胞から in vitro においてヒト肝細胞を分化誘導する系を構築し、この細胞を用いて肝炎ウイルスの感染から増殖機構解明のための基盤技術構築に貢献する。

間葉系幹細胞を母体とするヒト肝細胞が肝炎ウイルスの感染系として有用であることがわかれば、抗ウイルス薬の開発に貢献するばかりでなく、ウイルス感染や増殖のメカニズム開明に大きく寄与する。また肝炎ウイルスを背景とする肝がんに関連する microRNA の発見は、ウイルス性肝発がんのメカニズム解明に重要な知見となる。

B. 研究方法

H20年度までに、岡山大学の加藤班員と共同で、間葉系幹細胞から in vitro で分化した肝細胞に、HCV の RNA を遺伝子導入し、ウイルスの複製系を確立し、さらに抗ウイルス薬のスクリーニング系としての基盤作成に取り組んできた。最終年度は、この間葉系幹細胞から分化した幹細胞の HCV 複製系に、マイクロ RNA の関与があるかどうかの検証を、肝臓に最も豊富に存在し、HCV 複製との関連が培養細胞 Huh7 で指摘されている microRNA122 の p アンタゴニスト(LNA)によって解析した。さらに下野野主任研究員との共同研究で、分化誘導した肝細胞

の不死化細胞株について、microRNA122 の発現解析等を実施した。

（倫理面への配慮）

本報告に関わるヒト組織由来間葉系幹細胞は、インフォームドコンセントのもと、国内の倫理審査を得て採取され、国立がんセンター研究所での倫理審査を経て使用された。

C. 研究結果

（1）microRNA122 の発現解析

間葉系幹細胞から分化誘導した肝細胞に、HCV の複製に必須であると考えられている non-coding-small RNA の microRNA122 が発現している。リアルタイム PCR にて解析したところ、未分化間葉系幹細胞では発現が認められなかったが、分化した肝細胞では microRNA122 の発現が 20 倍ほど上昇しているが、アンタゴニスト LNA を導入することにより、その発現は 75% 抑制された。この状態で複製型 HCV-RNA である JFH-1 株 (2a 型) を細胞にトランスフェクションした結果、HCV のコピー数の上昇は、アンタゴニスト LNA を未導入の幹細胞に比較して顕著に抑制されていた。

（2）HPV の E6E7+hTERT による不死化の試みにおいては、2 株が肝細胞様細胞形態を保持したままの形で増殖してきた。これらの細胞株の microRNA122

の発現をリアルタイム法にて検討した結果、両方の細胞株ともに、その発現を確認することが出来、発現量はヒト初代培養幹細胞の1/3程度であることを明らかにした。

D. 考察

これまでの検討で間葉系幹細胞を2週間ほどの短期間で、肝細胞様の細胞に分化誘導することが可能となった。この細胞が、HCV感染系として有用であるかどうかの検証を開始したが、そのために、まずHCV複製に必要な因子として、microRNA122の発現を分化誘導した肝細胞に見いだした。実際にJFH-1株(2a型)HCVを細胞に導入した実験ではHCVのコピー数の増加を確認できた。microRNA122の発現をアンタゴニストによって阻害する実験では、HCVの複製能も低下したことから、間葉系幹細胞に由来する肝細胞は、HCV複製に適した細胞であることが証明された。さらにこの分化誘導した肝細胞の不死化の系もmicroRNA122を発現していることから、HCV複製系に用いる細胞としての有用性が示唆された。

E. 結論

HCVの感染から肝発がんの経路をより詳細に解析する系として、ヒト脂肪組織に存在する間葉系幹細胞の可塑性に注目して研究を行っている。この幹細胞は、内胚葉系の肝細胞に比較的短期間でtransdifferentiationする能力を持つことが本研究で明らかとなった。今後、この細胞のHCV感染、複製能力、あるいは肝がんへの細胞転換をおこすことが出来れば、肝炎、肝がん発生のメカニズムをmicroRNAレベルで解析することや、あるいは抗ウイルス剤のアッセイ系としても有用であると期待出来る。本年度の研究成果は、班内での共同研究の成果であり、今後も主任研究者の指導のもとに、

間葉系幹細胞から分化誘導した肝細胞のHCV感染、複製系への応用を検討していく。

F. 健康危険情報

本研究では健康を危惧する細胞、方法論などは特にない。

G. 研究発表

1. 論文発表

(欧文)

1. Kosaka N, Sakamoto H, Terada M, Ochiya T. Pleiotropic function of FGF-4: Its role in development and stem cells. *Dev Dyn*, 238: 265-276, 2009
2. 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*, 24: 70-77, 2009
3. Ishikawa T, Banas A, Hagiwara K, Iwaguro H, Ochiya T. Stem Cells for Hepatic Regeneration: the Role of Adipose Tissue derived Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. in press.
4. Ochiya T., Yamamoto Y., Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation*, in press
5. Song X, Guo Y, Duo S, Che J, Wu C, Ochiya T, Ding M, Deng H. A Mouse Model of Inducible Liver Injury Caused by Tet-on Regulated Urokinase for Studies of Hepatocyte Transplantation. *Am J Pathol.*, 75: 1975-1983, 2009

2. 学会発表

(海外)

1. Ochiya T. microRNAi-meeting. *RNAi World*

Congress 2009, Boston, USA. May 12-13

2. Ochiya T. CRS (Controlled Release Society). 36TH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION OF THE CONTROLLED RELEASE SOCIETY, Copenhagen ,Denmark. July 16-24
3. Ochiya T. SRC. 9th Jenner Glycobiology and medicine symposium, Brussels, Belgium. September 12-18

(国内)

4. 「間葉系幹細胞肝細胞による再生医療」、落谷孝広、第 10 回 日本肝臓医生物研究会 (2009.4.18-19 金沢)
5. 「幹細胞由来肝細胞の定義づけに関する勉強会」、落谷孝広、The Okayama 2009 Joint Conference of CTS & JSOPMB 会議 (2009.4.20-21 岡山)
6. 「small RNA の drug delivery system の開発」(先端技術シンポジウム)、落谷孝広、第 82 回日本内分泌学会・招待講演 (2009.4.24 群馬)
7. 「ヒト間葉系幹細胞を用いた薬物の安全性・毒性試験」、落谷孝広、日本薬物動態学会 第 2 回ビジョンシンポジウム (2009.6.5-6 東京大学)
8. 「micro RNA as a Novel Modality for Cancer Therapy」、落谷孝広、第 2 回 DKFZ-NCC Workshop on Cancer Research Tokyo (2009.7.7-9 がんセンター研究所)
9. 「核酸デリバリーが拓く non-coding small RNA による疾患解明」、落谷孝広、遺伝子・デリバリー研究会 第 9 回シンポジウム (2009.7.9-11 大阪)
10. 「microRNA によるがんの診断治療」、落谷孝広、第 1 回日本 RNAi 研究会 (2009.8.28-29 広島大学)
11. 「マイクロ RNA によるがんの診断と治療」、落谷孝広、第 68 回日本癌学会学術総会 (がんにおける microRNA 制御異常シンポジウム/講演) (2009.10.1-3 横浜)
12. 「RPN2 による糖鎖修飾を介した薬剤耐性、浸潤転移の制御機構」、落谷孝広、第 82 回日本生化学会学会 (講演) (2009.10.21-25 神戸)
13. 「RNAi-based oligonucleotides therapy」、落谷孝広、Kashiwa Symposium on Cancer

Biology 2009 (2009.11.13 がんセンター東病院)

14. 「microRNA による Cancer Stem Cell Therapy の可能性」、落谷孝広、第 32 回日本分子生物学会 (講演) (2009.12.9-12 横浜)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
特に無し

分担者研究課題名：「肝炎患者に存在するHCVゲノム多様性の意義」

分担研究者 機関名 所属： 杉山和夫 慶應義塾大学 医学部

研究要旨

これまで C 型肝炎ウイルス (HCV) の欠損ゲノムが C 型慢性肝炎患者血清から検出されることを確認したが、本年度ではさらに症例数を増やし検討した。その結果 16/74 症例(22%)に欠損ゲノムが存在することがわかった。欠損型 HCV では構造領域が広範囲に欠損していたが、コアタンパク領域および非構造タンパク領域は常に保存されていた。本研究で解析した限り全ての欠損クローン(38 クローン)において、欠損は *in-frame* で翻訳可能であると考えられた。また、これらの分子系統樹的解析により欠損型 HCV が独自に複製、進化していることが示された。また、*in vitro* の感染培養実験系で、欠損 HCV ゲノム RNA に構造領域を供給することで、複製可能な欠損 HCV ゲノム感染性ウイルス粒子を産生させることができた。欠損ゲノムからさらにコアタンパク領域を欠失させると感染性ウイルスの産生量が著しく減少することがわかった。今後、コアタンパク領域が欠損ゲノムおよび全長ゲノムの感染性への関与を明らかにする必要がある。

A. 研究目的

近年、C 型肝炎ウイルス (HCV) の欠損ゲノムが C 型肝炎患者血清に存在することが報告されている。これまで、分担研究者らもこれまでの研究において、肝移植後 HCV 再発患者血清に欠損型 HCV ゲノムを検出することができたが、今回、さらに症例数を増やして検討した。また、本研究では欠損型 HCV が翻訳、複製を行っている可能性をその遺伝子解析によって検討する。また、感染培養細胞系を用いて欠損型 HCV ゲノムが *in vitro* で感染、複製を行うことを明らかにする。また、欠損ゲノムでも保存されているコアタンパク領域の意義について検討した。

B. 研究方法

C 型肝炎患者血清の症例（計 74 症例）に対

して、long distance RT-PCR 法による HCV の増幅と検出を行った。long distance RT-PCR は (i)5' 非翻訳領域 (5' UTR) から NS3、(ii)NS3 から NS5B、(iii)5' UTR から NS5B の 3 領域に関して行った。さらに、欠損領域を正確に決定するために、欠損型 HCV の PCR 産物をクローニングし(計 38 クローン)、その塩基配列を分子系統樹当により解析し、遺伝子変異、分子進化などから個体内での欠損ウイルス複製の可能性を検討した。

次に、欠損型ウイルス RNA を合成し培養肝細胞 Huh7 にトランスフェクションし、その複製能を *in vitro* で検討した。また、欠損型ウイルス RNA に構造領域をトランスに発現、供給させることにより Huh7 細胞で欠損型 HCV ウイルス粒子を産生させ、naïve な Huh 細胞へ感染し、複製を行うことの確認を

行った。

また、欠損ゲノムにおけるコアタンパク領域の意義を明らかにするために、欠損ゲノムからさらにコアタンパク質領域を欠失させた欠失変異体を作製しその感染性を検討した。

(倫理面への配慮)

肝疾患患者などからの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮する。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得る。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供試料や個人情報を適正に管理保存する。

C. 研究結果

まず、欠損型 HCV が実際に存在することを確かめるために、74 症例の C 型肝炎患者血清に対して long distance RT-PCR 法による HCV の増幅と検出を行った。その結果、16 症例 (22%) において構造領域のゲノムが広範囲に欠失した HCV が検出された。その欠損幅は約 1.3kb から 2.0kb であった。有意差はなかったが肝炎重症度との関連が認められた。一方、全ての症例において非構造領域における欠失は認められず、この領域が欠損型 HCV の複製において必須であることが示唆された。

さらに、欠損領域を正確に決定するために、欠損型 HCV の PCR 産物をクローニングし塩基配列の解析を行った (計 31 クローン)。3 症例とも構造領域が広範囲 (E1 から p7 または NS2) に欠損していた。欠損領域の型が 1 種類だけの症例 (1 症例) と複数種類の症例 (2 症

例) があった。また、ほとんどのクローンで breakpoint は 1 箇所であったが、breakpoint が 2 箇所 (1 症例 1 クローン)、または、3 箇所あるクローン (1 症例 5 クローン) も存在した。これらも含め、全ての欠損が読み枠のずれを生じない in-frame deletion であった。このことにより肝細胞内で欠損型 HCV から実際にタンパクが翻訳されている可能性が示唆された。また、全ての欠損 HCV クローンにおいてコアタンパク領域が保存されており、コアタンパクが非構造領域と同様にその複製またはウイルス粒子形成 (パッケージング) などに重要な役割を持っている可能性が示唆された。

同一症例における欠損型 HCV において全く同じ塩基配列をもつクローンは存在せず、その遺伝的多様性が認められた。そこで、これら多様なクローンを分子系統樹解析しその分子進化の推定を行った。その結果、同じ欠損領域の型に属するクローンは同じクラスターを形成しており、欠損のないクローンからも独立して分岐していた。すなわち、欠損型 HCV が自然発生したのち、それらが独自に肝細胞内で複製、分子進化してきたことが推察された。

次に、実際の患者血清から得られた欠損型ウイルス cDNA を鋳型に RNA を合成し培養肝細胞 Huh7 にトランスフェクションしその複製能を調べた。その結果、トランスフェクションされた Huh7 細胞で欠損型ウイルスが複製することが明らかになった。

さらに、HCV 欠損ゲノム RNA に、構造領域タンパクをトランスに供給することによって、欠損ゲノムがパッケージされ感染性のウイルスが産生されるかどうかをみた。キャップ構造を付加した mRNA として構造領

域をトランス供給すると、HCV 欠損ゲノム RNA がパッケージされたウイルス粒子が Huh7 細胞へ感染し複製することが確認された。また、構造領域を安定的に発現するパッケージング細胞を樹立し、これに HCV 欠損ゲノム RNA をトランスフェクションすることによっても同様の結果が得られた。これらのことから、患者血清中の HCV 欠損ゲノム RNA は、構造領域が供給されることでパッケージされ感染性ウイルスとして産生されると考えられた。

また、上記欠損ゲノムからコアタンパクを欠失させた変異体 RNA を作製し、構造領域を安定的に発現するパッケージング細胞へトランスフェクションし、上清の感染性を検討したところ、コアタンパクの欠損変異体は、欠損のないものに比較して著しく感染性が低かった。

D. 考察

ウイルスゲノムの欠損は defective interfering (DI) として 1970 年に初めて報告された。DI とは部分的に欠損したゲノムをもつウイルスが、野生型の全長(ヘルパー)ウイルスとの共存によりウイルス粒子を形成し、全長ウイルスの複製を抑制(interfering)する現象である。DI ウイルスは主に培養細胞系において高タイトーのウイルスを持続的に感染させることによって自然発生してくる。近年、欠損型 HCV ゲノムが実際の C 型肝炎患者血清にも存在することが報告された。本研究でも 18 例の C 型肝炎患者症例のうち 4 症例(24%)において構造領域のゲノムが広範囲に欠失した HCV が検出された。DI ウイルスは上述のようにウイルス感染培養系における現象であったが、ヒ

トにおいて検出されたのはこれまでの報告を含め初めてである。

ほとんどのクローンで breakpoint は 1 箇所であったが、breakpoint が 2 箇所、または、3 箇所のクローンも存在した。breakpoint が 2 箇所のもは 1 クローン報告されているが、3 箇所のもは今回が初めての報告である。また、これまでの報告では in-frame の欠損例が多いものの、out-of-frame のものも存在し、実際に欠損ゲノムが翻訳されているかどうかは不明であった。本研究においては、4 症例からクローニングされたすべての欠損型 HCV クローン(計 38 クローン)の欠損が in-frame であり、肝細胞内でこれらの欠損型 HCV から実際にタンパクが翻訳されている可能性を示した。

これまでの報告と同様、欠損型 HCV においては構造領域が広範囲に欠損していた。その範囲は E1 から p7 または NS2 領域に及んでいた。構造領域のタンパクはウイルス粒子の構成成分で、免疫(特に液性免疫)に関わるが、この領域を欠くことによって宿主の免疫監視から逃れている可能性がある。一方、コアタンパク領域と非構造領域はすべての欠損クローンにおいて保存され、これらの領域の RNA もしくはそのタンパクがウイルスのパッケージングや複製など欠損ウイルスのライフサイクルに必須であると考えられた。

実際、コアタンパク領域を欠失させると感染性粒子産生が著しく低下しこの領域が完成性粒子産生における重要なシス因子であると考えられた。この領域がタンパクとして重要なのか RNA 構造として重要なのか明らかにしなければならない。また、今後、この欠損ゲノムにおけるタンパク質領域の全長ゲノムの複製、感染に対する影響を検討しな

ければならない。

今回採取された欠損クローン全てが in-frame deletion であったことから、欠損型 HCV も翻訳を行っていると考えられる。遺伝子配列の多様性、および系統樹解析の結果より、欠損型 HCV は複製し、分子進化も生じている可能性が示唆される。また、ゲノム RNA が単なる RNA の状態で存在しているとは考えにくく、血清試料から欠損型 HCV が検出できるという事実から、欠損型 HCV もウイルス粒子としてパッケージングされて細胞から放出されていると考えられた。また、本研究では実際に欠損型 HCV が複製能、感染能を有することを欠損型 HCV を用いた感染培養細胞実験によって初めて明らかにすることができた。実際の HCV 感染肝細胞では、野生型の HCV がヘルパーとなり構造領域タンパクを供給し感染性の欠損型 HCV を血液中に放出していると考えられた。

現在、臨床的にインターフェロン治療法の選択や効果判定にはアンプリコアなどの HCV RNA の定量検査が用いられている。その際の増幅領域としては 5' 非翻訳領域が用いられるが、この領域が欠損型でも保存されているとすれば、欠損型 HCV と全長 HCV が区別して増幅することは不可能である。したがって、症例によっては測定された血清中 HCV 量が必ずしも全長 HCV 量を反映していないという臨床的に重大な問題が生ずる可能性がある。この後、簡便な欠損型 HCV 検出法を開発し、新たな C 型肝炎の診断、治療に応用すべきである。

E. 結論

欠損型 HCV が C 型肝炎患者血清から比較的高頻度に検出された。欠損型 HCV では構造領域が広範囲に欠損していたが、コアタンパク領域および非構造タンパク領域は常に保存されていた。本研究で調べた限り、全ての欠損クローン(38 クローン)の欠損は in-frame であった。また、分子系統樹的解析により、欠損 HCV が独自に複製、進化していると考えられた。また、*in vitro* の感染培養実験系で、欠損 HCV ゲノム RNA に構造領域が供給されることで、欠損 HCV ゲノムが複製可能な感染性ウイルス粒子として産生されることが明らかになった。欠損ゲノムにおけるコアタンパク領域は感染性ウイルス産生におけるシス因子として重要であると考えられた。

F. 研究発表

1.論文発表

Genetic Analysis of Hepatitis C Virus with Defective Genome and Its Infectivity in Vitro: Sugiyama, K., Suzuki, K., Shimotohno, K et al. J. Virol, 6922-6928, 2009.

G.知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許出願 なし
- 2.特許取得 なし

HCV 感染による宿主遺伝子への変異蓄積の分子機構解析

研究要旨 C型肝炎ウイルス(HCV)の Core タンパク質の作用により、生理的条件下では肝細胞にその発現をほとんど認めない遺伝子編集酵素 AID がヒト肝細胞に誘導され、さまざまな遺伝子を標的として点突然変異や染色体欠失を引き起こすことが明らかとなった。AID の発現の結果、宿主肝細胞に生じる染色体の欠失領域にインターフェロンのシグナル伝達に関与する遺伝子が含まれていることが明らかとなり、HCV の慢性感染後の病態形成やウイルス排除への抵抗性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

癌遺伝子・癌抑制遺伝子への塩基レベル（体細胞変異）や染色体レベル（欠失、増幅、転座など）での多様な遺伝子異常が癌細胞の発生過程において重要な役割を果たしていることが広く知られている。事実、ヒト肝癌組織の臨床検体の解析からは、p53 などさまざまな癌抑制遺伝子・癌遺伝子を含む領域の染色体欠失や遺伝子変異が存在することが示されており、C型肝炎ウイルス(HCV)感染による慢性肝炎から肝硬変を背景に肝癌が発生する過程において、宿主肝細胞にさまざまな遺伝子異常が惹起されているものと想定されている。しかしながら、発癌過程における遺伝子異常生成の分子機序に関しては大部分が不明のままであり、遺伝性非ポリポーシス性大腸癌（Hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC）や一部の消化器癌で認められ

るような DNA 修復遺伝子の異常はヒト肝癌では稀とされている。

遺伝子編集機能をもつ Apolipoprotein B 100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC) family 分子は DNA や RNA といった遺伝子配列に変異を導入する活性を有する cytidine deaminase である。これら APOBEC family の一員である Activation-induced cytidine deaminase (AID) は、生理的条件下では活性化 B 細胞において免疫グロブリン遺伝子に高頻度に体細胞突然変異を引き起こすとともに、DNA 2 本鎖切断を誘発することにより抗体のクラススイッチ組み換えを誘導する機能を有する必須の分子であることが示されている。しかしながら、これまでのわれわれの研究から、肝癌の発生過程における遺伝子異常の生成にこの AID が重要な役割を果たしている可能性が明らかとなってきた。AID は通常は活性化 B 細胞

にのみ発現しており、正常な肝細胞ではその発現をみることはないと言われてきた。しかしながら、我々のこれまでの検討結果から、HCV感染により慢性肝疾患を伴った肝細胞ではAIDが異所性に過剰発現しており、肝細胞へのAID発現の結果、さまざまな発癌関連遺伝子に体細胞変異が生じてくることがわかってきた。また、HCVのコードするウィルスタンパクのひとつであるCoreタンパク質や炎症性サイトカインであるTNF- α 刺激によりヒト肝細胞にAIDが異所性に発現誘導されることが明らかとなった。これらのAID誘導刺激因子は、細胞内で転写因子NF- κ Bを活性化することが共通の特徴であったため、NF- κ B阻害剤、IKK- α 、IKK- β の dominant negative form やIKK- γ に特異的な siRNA を用いて細胞内NF- κ B活性化シグナルを阻害したところ、肝細胞におけるAID発現が減少～消失することが確認された。以上の結果から、HCVのコードするCoreタンパク質によるNF- κ B活性化が肝細胞におけるAID発現に関与している可能性が示唆された。

そこで、このAIDによる遺伝子異常導入活性に着目し、HCV感染によるAID発現により肝細胞にもたらされる遺伝子異常が、HCV感染の結果生じる病態形成に果たす役割を明らかにすることを本研究の目的とした。

B. 研究方法

ヒト肝培養細胞において持続的にAIDを発現した結果生じる遺伝子異常の全体像を明らかにする目的で、AIDを発現した肝培養細胞から抽出した核酸を用いて Comparative genomic hybridization (CGH) 法によるゲノムワイドな遺伝子異常の網羅的解析を行う。従来のCGH法では5-10Mbバンドレベルの

大きな異常しか検出できないため、本研究では数Kbの微細ゲノム異常をゲノムワイドに俯瞰的に分析する目的でCGH microarray法による解析方法を活用する。

引き続き、CGH法により同定された染色体異常領域に含まれる遺伝子群を同定し、慢性肝疾患の病態形成に重要な遺伝子を選別する。これらの遺伝子のコピー数がAID発現の結果、変動するかどうかの検証を定量PCR法により検討するとともに、HCV感染を伴ったヒト慢性肝疾患の肝組織における発現量の評価を行う。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」に準拠し、所属機関の研究倫理委員会に申請し承認を得る。動物実験に関しては、「動物の保護および管理に関する法律」や「実験動物の飼育および保管に関する基準」及び「大学における実験動物について」の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるように配慮する。

C. 研究結果

癌の発生過程において、癌関連遺伝子への点突然変異とともに染色体異常(転座、欠失など)が重要な役割を果たしていることが知られている。興味深いことに、リンパ系腫瘍の発生過程においては、AIDが特定の染色体に発癌に関与すると想定されている染色体転座を誘導する活性を有することが報告されている。したがって、HCV感染からの肝発癌過程において、AIDが体細胞変異の生成のみならず、転座・欠失・増幅といった染色体レベルでの異常の出現に関与している可能性が十分考えられた。そこで、肝細胞におけるAIDの

標的遺伝子領域を同定するとともに、AID 発現によりどのような染色体レベルでの遺伝子異常が生じているかを明らかにするため、CGH 法を用いて AID 発現下のヒト肝細胞における遺伝子異常の生成の網羅的な解析を行った。まず、レンチウイルスベクターを用いて AID を持続的に活性化誘導した肝培養細胞、AID 発現のないコントロール細胞、それぞれからゲノム DNA を抽出し、CGH microarray 法を用いて、AID 活性化の有無により既知の約 43,000 箇所の遺伝子領域において減少や増幅が生じているか否かを解析した。

興味深いことに、AID 発現 8 週間後のヒト肝細胞から抽出したゲノムでは、ほぼすべての染色体領域にわたって散在性に、多様な染色体異常が生じており、その大部分は一定の染色体領域の欠失として生じていることが明らかとなった。次に、CGH microarray 法で検出された染色体レベルでの欠失領域に含まれる遺伝子群をゲノムデータベースから同定したところ、インターフェロン受容体遺伝子を含む遺伝子領域が再現性をもって AID 発現により欠失が誘導されることがわかった。そこで、インターフェロン受容体遺伝子に特異的なプローブを作成し、AID を持続発現したヒト培養肝細胞中のインターフェロン受容体遺伝子のコピー数の変化を、real-time PCR 法により検討した。興味深いことに、インターフェロン受容体遺伝子のコピー数は AID 発現により減少することが確認された。ヒト臨床検体の解析からは、HCV 感染を伴った肝硬変組織中のインターフェロン受容体遺伝子の発現量は、正常肝組織と比較して有意に低下していることがわかった。

D. 考察

HCV 感染を契機とする慢性肝炎から肝発癌に至る過程において、体細胞変異とともに染色体レベルでの遺伝子異常（転座、欠失など）の生成に、肝細胞における AID の異所性発現が深く関与している可能性が示唆された。このように AID は、本来は発現していない臓器でも、炎症や感染症といった発癌と関連した病的状況になると発現誘導され、細胞内でさまざまな遺伝子異常を引き起こすことで、肝疾患の病態形成に重要な役割を果たしているものと推定された。今回の解析からは、肝細胞では AID が選択的にインターフェロン受容体遺伝子を含む染色体領域の欠失を誘導することが明らかとなった。以上より、HCV の持続感染の結果、インターフェロン受容体遺伝子のコピー数が減少することが、ウイルス排除を困難にすることにつながり、HCV 持続感染の成立や、インターフェロン治療抵抗性の出現に深く関与している可能性が示唆された。

E. 結論

HCV のコードする Core タンパク質により肝細胞に NF- κ B が活性化された結果、異所性に AID が発現誘導されることが明らかとなった。AID の遺伝子編集酵素活性により、肝細胞に塩基レベルとともに染色体レベルでの遺伝子異常が生成されることが、HCV の慢性持続感染の成立やインターフェロン治療抵抗性の獲得といった病態形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Takai A, Toyoshima T, Uemura M, Kitawaki Y, Marusawa H, Hiai H,

- Yamada S, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T, Kinoshita K. A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. *Oncogene*, 28(4):469-478,2009.
- (2) Wada M, Marusawa H, Yamada R, Nasu A, Osaki Y, Kudo M, Nabeshima M, Fukuda Y, Chiba T, Matsuda F. Association of genetic polymorphisms with interferon-induced haematologic adverse effects in chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat*,16:388-396,2009.
- (3) Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, Takahashi R, Chiba T. Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers. *Int J cancer*,125:2029-2035,2009.
- (4) Endo Y, Marusawa H, Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase links inflammation to carcinogenesis. *J Gastroenterology*,2010(in press).
- 2.学会発表
- (1)丸澤宏之.炎症発癌における遺伝子異常の分子機構.第68回日本癌学会学術総会.横浜.2009/10/02
- (2)高井淳、丸澤宏之、千葉勉.肝幹/前駆細胞への遺伝子異常蓄積からの肝発癌機序.第51回日本消化器病学会大会・第13回日本肝臓学会大会 合同.京都.2009/10/15
- (3)和田将弥、丸澤宏之、千葉勉.C型肝炎ウイルス感染により惹起されるインターフェロン関連遺伝子異常.第51回日本消化器病学会大会・第13回日本肝臓学会大会 合同.京都.2009/10/15.
- (4)丸澤宏之.消化器癌の発生過程において炎症が遺伝子異常の生成に果たす役割.第51回日本消化器病学会大会・第13回日本肝臓学会大会 合同.京都.2009/10/15.
- (5)千葉勉、丸澤宏之.炎症からの発癌における新しい遺伝子変異導入機構.第82回日本生化学会大会.神戸.2009/10/22.
- (6)丸澤宏之、千葉勉.炎症発癌におけるゲノム不安定性誘導機序の解析とその標的治療.第37回日本臨床免疫学会総会.東京.2009/11/14.
- (7)Chiba T, Marusawa H.Activation-induced cytidine deaminase (AID) plays an important role in induction of gene mutations and genomic instability during inflammation-associated carcinogenesis. THE25TH RADIATION BIOLOGY CENTER INTERNATIONAL.京都.2009/12/01.
- G 知的財産権の出願・登録状況
- 1.特許出願
なし
- 2.特許取得
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okamoto M, Sakai M, Goto Y, Salim MT, Baba C, Goto K, Watashi K, Shimotohno K, Baba M.	Anti-bovine viral diarrhoea virus and hepatitis C virus activity of the cyclooxygenase inhibitor SC-560.	Antivir Chem Chemother.	20(1)	47-54	2009
Ikejiri M, Ohshima T, Fukushima A, Shimotohno K, Maruyama T.	Synthesis and anti-HCV activity of 2',5'-deoxy-5'-phenacyladenosine analogs.	Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).	53	103-104	2009
Goto K, Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Shimotohno K.	Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor.	Cancer Sci.	100(10)	1943-1950	2009
Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K.	Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus.	Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.	85(7)	217-228	2009
Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Mizokami M, Shimotohno K, Hijikata M.	Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus.	Hepatology	50(3)	689-696	2009
Sugiyama K, Suzuki K, Nakazawa T, Funami K, Hishiki T, Ogawa K, Saito S, Shimotohno KW, Suzuki T, Shimizu Y, Tobita R, Hijikata M, Takaku H, Shimotohno K.	Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro.	J Virol.	83(13)	6922-6928	2009

Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H.	Heat-shock Protein 90 is Essential for Stabilization of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS3.	J. Biol. Chem.	284	6841-6846	2009
Furukawa A, Nagata T, Matsugami A, Habu Y, Sugiyama R, Hayashi F, Kobayashi N, Yokoyama S, Takaku H, and Katahira M.	Structure, interaction and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G.	EMBO J.	28,	440-451	2009
Suzuki H, Matsumoto N, Suzuki T, Chang MO, Takaku H.	Stable replication of the EBNA1/OriP-mediated baculovirus vector and its application to anti-HCV gene therapy.	Virol J.	6	156	2009
Mondal NI, Takaku H, Ohkusa Y, Sugawara T, Okabe N.	HIV/AIDS Acquisition and Transmission in Bangladesh: Turning to the Concentrated Epidemic.	Jpn J Infect Dis.	62	111-119	2009
Barnor J. S., Habu Y., Yamamoto N., Miyano-Kurosaki, Nishikawa H., Yamamoto N., Takaku H.	Inhibition of HIV-1 replication by long-term treatment with a chimeric RNA containing shRNA and TAR decoy RNA.	Antiviral Res.	83	156-164	2009
Sugiyama K, Suzuki K, Nakazawa T, Funami K, Hishiki T, Ogawa K, Saito S, Shimotohno KW, Suzuki T, Shimizu Y, Tobita R, Hijikata M, Takaku H, Shimotohno K.	Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro.	J Virol.	83	6922-6928	2009
Mondal NI, Takaku H, Ohkusa Y.	Impact of age at marriage and migration on HIV and AIDS epidemics in Japan.	Int J Equity Health.	8	23	2009

Sugiyama R, Habu Y, Ohnari A, Miyano-Kurosaki N, Takaku H.	RNA interference targeted to the conserved dimerization initiation site (DIS) of HIV-1 restricts virus escape mutation.	J Biochem.	146	481-489	2009
Furukawa A, Nagata T, Matsugami A, Habu Y, Sugiyama R, Hayashi F, Kobayashi N, Yokoyama S, Takaku H, Katahira M.	Structure and real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G which is involved in anti-HIV activity.	Nucleic Acids Symp Ser .	53	87-88	2009
Suzuki H, Saitoh H, Suzuki T, Takaku H.	Baculovirus-mediated bispecific short-hairpin small-interfering RNAs Have remarkable ability to cope with both influenza viruses A and B.	Oligonucleotides	19	307-316	2009
Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, Hotta H.	Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma.	J Gen Virol	90(7)	1681-1691,	2009
Mohd-Ismail NK, Deng L, Sukumaran SK, Yu VC, Hotta H, Tan YJ.	The hepatitis C virus core protein contains a BH3 domain that regulates apoptosis through specific interaction with human MCL-1.	J Virol	83(19)	9993-10006,	2009
Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, Hotta H.	HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters.	J Hepatol	50	883-894,	2009
Amako Y, Sarkeshik A, Hotta H, Yates J 3rd, Siddiqui A.	Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection.	J Virol	83(18)	9237-9246,	2009

Kim S R, Imoto S, Mita K, Taniguchi M, Sasase N, Muramatsu A, Kudo M, Kitai S, El-Shamy A, Hotta H, Hayashi Y.	Pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C with high viral load of serum HCV RNA, genotype 1b, discontinued on attaining sustained virological response in week 16 after onset of acute pancreatitis.	Digestion	79(1)	36-39	2009
Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, Shoji I.	Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation.	J Cell Biochem.	106(6)	1123-1135,	2009
Kim SR, Imoto S, Kudo M, Mita K, Taniguchi M, Kim KI, Sasase N, Shoji I, Nagano-Fujii M, El-Shamy A, Hotta H, Nagai T, Nagata Y, Hayashi Y.	Double-filtration plasmapheresis plus IFN for HCV-1b patients with non-sustained virological response to previous combination therapy: early viral dynamics	Intervirology	53(1)	44-48	2010
Sasase N, Kim SR, Kudo M, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hayashi Y, Shoji I, El-Shamy A, Hotta H	Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b.	Intervirology	53(1)	49-54	2010
<u>Kato N</u> , Mori K, Abe K, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, and Ikeda M.	Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new human hepatoma cell line.	Virus Research	146	41-50	2009
Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, and <u>Kato N</u> .	HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A.	Archives of Virology	154	1671-1677	2009