

200933004A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルスの培養系を用いた 新規肝炎治療法の開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成22（2010）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルスの培養系を用いた 新規肝炎治療法の開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成22（2010）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発 1
脇田 隆字

II. 分担研究報告

1. 肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発の総括 23
脇田 隆字
2. 不死化肝細胞の改変による HCV の高効率感染増殖実験系の開発とこれを用いた新規抗 HCV 薬剤標的分子の同定 31
土方 誠
3. 不死化ヒト肝細胞を用いた3次元培養系の試み～HBV感染モデル～ 35
田中 靖人
4. HCV コア蛋白質に相互作用する宿主蛋白質の感染における役割 37
森石 恆司
5. HCV-IRES 依存性タンパク翻訳に関わる宿主因子の同定と HCV 複製 41
本多 政夫
6. HCV ゲノム RNA 結合分子の探索とその HCV 治療薬への応用 43
原田 和雄
7. 肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発：
HCV 増殖・感染細胞モデルを用いた抗ウイルス化合物・宿主因子の探 49
坂本 直哉
8. 強力な HCV エントリー阻害作用をもつ新規マンノース特異糖鎖結合
タンパク質 51
武部 豊
9. 栄養成分の HCV に及ぼす効果の検討 57
池田 正徳

10. 分岐鎖アミノ酸の HCV 増殖に与える影響	61
竹原 徹郎	
11. GFP 挿入ウイルスを用いた HCV 感染細胞検出系の確立	65
加藤 孝宣	
12. HBVpseudotype 作製の試みとレセプターの分離・同定に関する研究	69
上田 啓次	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	71
IV. 研究成果の刊行物・別冊	79

I . 総括研究報告

肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発

研究代表者 脇田 隆字 国立感染症研究所 ウイルス第二部 部長

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のウイルス培養系が確立された。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。HCV感染に対する治療はインターフェロンとリバビリンの併用により改善してきたが、未だに不十分である。HBV感染では最近の研究によりウイルスの遺伝子型による病態の差が明らかとなり、ラミブジンなど抗ウイルス療法の導入により治療も大きく変わりつつあるとともに、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。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試みた。HBVの感染系を含めて新たな実験系の開発も行うことで、治療法開発のための新たな標的の探索をおこなった。

研究分担者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授	東京医科歯科大学 准教授
研究分担者 田中靖人 名古屋市立大学大学院 教授	研究分担者 武部 豊 国立感染症研究所 室長
研究分担者 森石恒司 大阪大学微生物研究所 准教授	研究分担者 池田正徳 岡山大学大学院 准教授
研究分担者 本多政夫 金沢大学大学院 教授	研究分担者 竹原徹郎 大阪大学大学院 准教授
研究分担者 原田和雄 東京学芸大学 准教授	研究分担者 加藤孝宣 国立感染症研究所 室長
研究分担者 坂本直哉	研究分担者 上田啓次 浜松大学医学部 教授

A. 研究目的

肝炎ウイルスによる慢性肝炎は我が国の国民病とも呼ばれている。新規感染者は激減したものの、その原因ウイルスであるHBVのキャリアは約130万人、HCVキャリアも約200万人がいまだに存在すると推定されている。その多くが肝硬変から肝臓癌へ移行し、肝臓癌による年間死亡者は3万人におよぶ。HBV感染にはラミブジンによる化学療法が導入されたが、長期に投与する必要があり、耐性ウイルスの問題が生じている。また、HCV感染に対する治療法はインターフェロンとリバビリンの併用療法が行われているが、その有効率は40-50%程度である。従って、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するのみならず、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

者数を減らすことにより、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与することが可能である。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した。HBVの感染系を含めて新たな実験系の開発も行い、治療法開発のための新たな標的の探索をおこなった。

B. 研究方法

1. 肝炎ウイルスの新規感染モデルの開発

1) 新規HCV培養系の開発

これまで感染性のウイルスを産生することができなかったウイルス株の全長cDNAに変異を導入することで培養細胞におけるウイルスゲノムの複製増殖とウイルス粒子産生を検討した。

2) ヒト不死化肝細胞の中空系立体培養により種々の患者血清由来 HCV の感染増殖を試みた。さらに、種々の患者血液由来 HCV の感染増殖ならびに細胞との相互作用の解析をおこなった。マイクロアレイ法を用いて通常培養と立体培養によって変化する遺伝子発現パターンを解析した。さらに同定した細胞内シグナルを就職し、HCV 感染増殖への影響を検討した。

3) 特殊ナノレベル加工を施した培養プレートを用いて HBV の 3 次元培養系を作成した。感染源としては、1.24 倍長 HBV ゲノム (HBV/Ce wild) を組み込んだプラスミドを Huh7 細胞に transfection させることによって得られたウイルス粒子を含む培養上清と患者血清を用いた。3 次元培養系にこのウイルス粒子 (HBV/Ce wild type) を含む培養上清または患者血清を 10^5 copies/well となるように投与することで感染を成立させ、その後 3 次元培養上清中の HBs 抗原、細胞内 HBV core 関連抗原を測定し、HBV 感染・複製を確認した。

2. HCV 増殖機構の解析と新規治療法の開発

1) RNA 干渉によって PA28 γ 発現を抑制し JFH1 ウイルス感染 Huh7 OK1 細胞の細胞内外のウイルス RNA 量、コア蛋白質量、上清中の感染ウイルス粒子量、細胞数を測定した。PA28 γ をノックダウン後に、in vitro で合成した JFH1 株 RNA を、トランスフェクションし、上清中のウイルス価を測定した。また、サブゲノムレプリコン細胞の PA28 γ をノックダウンし、レプリコン RNA 量を測定した。EGAP および PA28 γ をノックダウンした後、ウイルスを感染させ、回収前にプロテアソーム抑制剤を加えて、細胞溶解液を調整した。抗コア蛋白質抗体によって免疫沈降し、抗ユビキチン抗体によってユビキチン化コア蛋白質をウエスタンブローディングによって検出した。

2) Huh7.5 細胞に JFH-1 の全長 RNA、JFH-1/GND RNA、JFH-1/ Δ E1E2 RNA 及び HCV-IRES の stem-loopIV 変異体/翻訳不能クローン (JFH-338U) の RNA をトランスフェクションした。JFH-1 及び変異体の複製、及び HCV 蛋白翻訳因子である La protein, PTB, eIF3 p170, PSMA7, eIF2gamma の発現変化は RTD-PCR 法及び各種 western blotting によって行った。テロメラーゼ活性は TRAP assay にて評価した。

3) アンチターミネーション・システムを用いて HCV IRES IIIe および IIIf 結合ペプチドをスクリーニン

グした。HCV IRES IIIe および IIIf 結合に結合するアンチセンス RNA ステム・ループをデザインした。デザインしたアンチセンス RNA ステム・ループを作製し、この RNA ステム・ループの HCV IRES IIIf との結合を解析した。アンチセンス RNA ステム・ループによる HCV 産生阻害効果を評価した。

4) HCV サブゲノムレプリコン細胞 Huh-RepSI、HCV フルゲノムレプリコン細胞 2-3、HCVcc 感染 Huh7 細胞を使用した。細胞培養液としては、アミノ酸のうち BCAA のみを含まない DMEM を使い、BCAA を個別にもしくは BCAA 混合液 (Val : Leu : Ile=1.2 : 2 : 1) として添加して、ウイルス蛋白量をウエスタンブロットにて、RNA 量をリアルタイム PCR 法にて測定した。mTOR の活性阻害にはラパマイシンを 100 nM の濃度で BCAA (-) 培地へ BCAA 添加直前に添加した。HCV IRES 活性は CMV-Renilla luciferase をコントロールとする dicistronic vector を用いたデュアルレポーターアッセイにて評価した。

3. HCV 生活環に関与する宿主側因子の探索と新規治療法の開発

1) HCV 複製増殖に関与する代謝・シグナルネットワークを網羅的に解析した。

2) 全長レプリコンの薬剤耐性遺伝子部分を GFP に置換した GFP 全長レプリコンの RNA を Huh7.5.1 細胞に導入し、得られたウイルスを濃縮した後に HCV RNA 量と感染力価を測定した。ヒト肝細胞移植マウスには 1×10^6 copy / head のウイルスを接種した。また、HCV の細胞内増殖能に依存せず HCV 感染が検出可能なレポーター細胞の構築のため、CAG プロモータの下流に loxP 配列で挟まれたネオマイシン耐性遺伝子および polyA 配列と、さらにその下流に GFP 遺伝子配列を持つコンストラクトを作製した。Cre 酵素を持ったウイルス作製のためコア領域 N 末端に Cre 遺伝子を挿入した J6/JFH1 ウイルス (Genotype 2a) と CG1b ウイルス (Genotype 1b) を作製した。さらに Cre を持たないウイルスの感染の検出のため、HCV の NS3 で切断される IPS-1 の膜結合領域と切断部位の配列を Cre 遺伝子と結合したコンストラクトも準備した

4. HBV 増殖機構の解析と新規治療法の開発

1) Gfp-hygR を含むレトロウイルスコア粒子を HBV 膜粒子で覆った HBVp の作製を試みた。本 HBVp

を用いてヒト肝細胞 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。

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

1) 抗 HCV 薬のスクリーニング

HCV キメラルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現する HCV-Feo replicon 細胞、および HCV-JFH1 培養系を用いて、HCV 増殖を制御する薬剤・化合物の網羅的スクリーニングを進める。生理活性物質ライブラリー、及び Diversity-oriented synthesis 化合物ライブラリー、林産加工阻害加工物ライブラリー、漢方生薬・抽出精製化合物の抗 HCV 活性を high-throughput screening (HTS) にて探索をおこなった。

2) OR6 アッセイシステム (全長 HCV RNA 複製細胞) を用いてアラキドン酸代謝産物の抗 HCV 活性を検討した。アラキドン酸に COX 阻害剤のインドメタシンあるいは LOX 阻害剤の NDGA を併用し HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討した。アラキドン酸の LOX 代謝産物である 5-HETE, 8-HETE, 12-HETE, 15-HETE を OR6 細胞に添加した時の HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討した。また、各 HETE の異性体 (R-, S-) の HCV RNA 複製に及ぼす効果についても検討した。OR6 細胞に 5R-HETE あるいは 12R-HETE を処理した時の遺伝子発現の変化についてマイクロアレイ解析 (Affymetrix GeneChip; Human Genome U133 Plus 2.0 array) を行った。

3) 新規抗 HCV 薬候補の抗ウイルス活性について解析する。NS3 プロテアーゼ、NS4A、NS5B RNA ポリメラーゼなどに対する抗ウイルス薬の開発が企業において進行している。新規抗 HCV 薬候補の提供を受け、その抗ウイルス活性、細胞障害性、薬剤耐性に関して解析した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通

知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 肝炎ウイルスの新規感染モデルの開発

1) 新規 HCV 培養系の開発

遺伝子型 Con1 株の全長遺伝子に NS3 領域に 2 カ所 (1202EG, 1280TI) および NS5A 領域に 1 カ所 (2197SP) の変異を単独あるいは組み合わせて導入した。3 つの変異をすべて持つ、いわゆる NK5.1 と呼ばれる高適合変異株は細胞内複製能が最も高いものの、細胞外へウイルス分泌はみられない。一方、2197SP 変異のみを導入した場合、細胞内ウイルス増殖は低いがウイルスの分泌が観察された。さらに、1202EG と 2197SP の 2 カ所の変異を導入した場合 (EGSP 変異株)、細胞内増殖は NK5.1 に次いで高く、ウイルスの分泌も 2197SP 変異のみよりも増加した。EGSP 変異株の全長ウイルス RNA 導入細胞は感染性 HCV を産生することが可能であったが、その感染性は低く、細胞を経代培養すると細胞増殖がウイルス増殖を徐々に上回り、最終的にはウイルス増殖は検出不能に至った。

2) HCV: マイクロアレイ法を用いて、不死化肝細胞を中空糸立体培養した場合、通常の培養皿により培養した場合に比較して、アラキドン酸カスケードに存在する酵素の一部が変動した。シクロオキシゲナーゼ 1 (COX1) とプロスタグランジン D 合成酵素 mRNA 量が立体培養時に上昇し、プロスタグランジン I と E の合成酵素 mRNA 量が減少していた。COX1 阻害剤を HCV (JFH1) の増殖、感染性粒子産生系に添加したところ、JFH1 のゲノム複製には変化を認めなかったが、感染性粒子の産生が抑制された。アラキドン酸カスケード内 COX1 下流のプロスタグランジンと HCV 増殖との関連を検討するため、各種プロスタグランジン受容体に対するアゴニストを JFH1 増殖、感染性粒子産生系に加えたところ、各プロスタグランジン間で異なる反応が認められた

3) HBV: 不死化ヒト肝細胞は特殊加工の培養プレートをを用いた培養においてスフェロイドを形成し、3 次元化できた。また、長期培養の検討では、少なくとも 10 日間はスフェロイド形成が持続することを確認した。スフェロイド形成による 3 次元培養系に

において培養上清中に HBs 抗原やコア関連抗原が検出された。

2. HCV 増殖機構の解析と新規治療法の開発

1) コア蛋白質は宿主蛋白質 PA28 γ と結合し、プロテアソームによって分解される。感染後および感染前の PA28 γ ノックダウンによって上清中のウイルス量は著しく低下した。また、PA28 γ ノックダウンによって細胞増殖の有為な変化は認められず、1b および 2a 遺伝子型レプリコン細胞では、PA28 γ ノックダウンによってレプリコン RNA 量に変化は認められなかった。

コア蛋白質のコピキチン化は、E6AP ノックダウンによって減少し、PA28 γ ノックダウンによって、上昇した。両者のノックダウンによって、コントロールとは有為な差を認めなかった。細胞培養上清中のウイルス価は、コア蛋白質のコピキチン化と相反しており、E6AP のノックダウンで上昇し、PA28 γ ノックダウンに減少し、両者のノックダウンでは変化が認められなかった。

2) JFH-1 の複製は 72 時間で最大となり、以後漸減した。JFH-1/ Δ E1E2 は JFH-1 の半数程度の複製を示し、JFH-1/GND 及び JFH-338U は複製しなかった。La protein は JFH-1 複製に伴って約 3 倍の発現増加し、JFH-1/ Δ E1E2 では 1.5 倍程度、JFH-1/GND 及び JFH-338U では発現増加しなかった。他の蛋白翻訳因子である PTB, PSMA7, eIF2 gamma, PCBP2 も JFH-1 複製により 1.5-5 倍の発現増加した。また、JFH-1 複製により hTERT 活性が上昇し、shRNA による La protein の発現抑制により JFH-1 の複製と hTERT 活性が抑制された。JFH-1 複製により hTERT 自身の発現は変動せず、hTR が有意に上昇し、hTERT 活性亢進の一因と考えられた。CH-C40 例の肝組織に於いて、La protein の発現は HCV-RNA、hTR、p23、HSP90 と有意に相関し、HCV 複製及びテロメラーゼ複合体との密接な関連が示唆された。

C 型慢性肝炎肝組織を HPLC ÄKTA Explore system を用いてゲルろ過にて精製すると、分子量 350kDa 以上の大分子量分画に HCV 蛋白及び La protein が存在し、ウイルス生成に La protein が直接関与することが示唆された。

3) アンチターミネーション・システムを用いて HCV IRES の IIIe、IIIf、および IIIef を標的とした 3 種のセレクションを行ったところ、IIIe および IIIef

の場合、陽性クローンの濃縮が見られた。セレクションによる陽性クローン濃縮率が特に高かった IIIe について解析を進めた結果、結合活性は見られたものの、RNA 特異性は見られなかった。標的 RNA IIIf とアンチセンス RNA を組み合わせてゲルシフトを行い、バンドのシフトがみられたことから、デザインしたアンチセンス RNA ステム・ループは標的に結合した。アンチセンス RNA ステム・ループによる HCV 産生阻害効果を評価した。IIIf-a1 の場合、HCV RNA 量の 70% 程度の低下、IIIf-a2 の場合は 30% 程度の低下が見られ、試験管内アッセイでの標的 RNA との結合活性に対応する結果が見られた。

4) Huh-RepSI の培養では、培養液中の BCAA の濃度が 0.05 mM 以上において濃度依存的に HCV 蛋白および RNA 量の低下が認められた。個別に BCAA を添加した場合、Val を添加した場合において最も強い HCV 抑制効果が得られ、次に Ile に効果が認められたが、Leu 単独では抑制は見られなかった。しかし、Val と Ile を含む培地に Leu を追加した場合には、HCV のさらなる抑制効果は認められ、結果として 3 種の BCAA すべてを含む場合に最も強い効果が示された。また、cap 依存的な翻訳は BCAA の有無にて有意な変化を認めなかったが、HCV IRES 活性は BCAA の濃度依存的な低下がみられた。さらに HCVcc 感染 Huh7 細胞にて同様の検討を行ったところ、レプリコン細胞の場合とは逆に、BCAA の濃度依存的に HCV 蛋白および RNA 量の増加が認められた。そこで、ウイルス粒子を形成する HCV 株と、その株から 2 アミノ酸置換があるため粒子形成のない HCV 株を作成し、BCAA の影響を比較検討した。HCV 粒子を形成する株では 1 mM の BCAA の添加によりウイルス増殖の増加が見られたが、粒子形成のない株では BCAA によりウイルス増殖が抑制された

3. HCV 生活環に関与する宿主側因子の探索と新規治療法の開発

1) HCV 複製増殖に関与する代謝・シグナルネットワークの網羅的解析:

HCV 複製増殖に関与する代謝・シグナルネットワークの網羅的解析。脂質・コレステロール代謝に関わる代謝・シグナルネットワークの関与、関連薬剤の効果を確認した。

2) GFP 全長レプリコンウイルス 1×10^6 copy をヒト肝細胞移植マウスへ接種した。投与二週後にマ

ウス血中のウイルス量が 1.1×10^7 copy/mL まで上昇し、接種したウイルスの感染が確認された。しかし血清中に存在している HCV の RNA を抽出し、GFP 領域に設定したプライマーを用い RT-PCR 法で検出を行ったところ、GFP 領域のフラグメントの増幅は認められなかった。さらに、感染肝細胞のパラフィンブロック包埋標本を蛍光顕微鏡で観察したが、GFP の蛍光は確認できなかった。また GFP の蛍光観察よりもさらに高感度な GFP の免疫染色も試みたが、GFP 陽性所見は得られなかった。

現在、培養細胞への感染が確認されているのは Genotype 2a の JFH-1 株と Genotype 1b の H77S 株のみである。他の genotype の他の株では感染細胞で検出可能なレベルの HCV 蛋白の発現を認めないため感染を確認できないと考えられる。そこで、Cre-loxP システムを用い、感染細胞内での複製に依存せず HCV 感染の検出が可能なシステムの構築を試みた。まず、loxP-GFP コンストラクトを Huh7.5.1 細胞に導入しレポーター細胞を作製した。その後コア領域 N 末端に Cre 遺伝子を挿入した J6/JFH1 キメラウイルスと CG1b ウイルスを作製し感染させたところ、J6/JFH1 キメラウイルスでは GFP 陽性細胞を認め感染が確認された。CG1b ウイルスの感染では、ごく少数の GFP 陽性細胞を認め感染が起こっていると考えられたが、その感染効率は J6/JFH1 キメラウイルスに比べかなり低いと考えられた。さらに Cre-IPS-1 コンストラクトを loxP-GFP コンストラクトと共に Huh7.5.1 細胞に導入し、Cre を持たない HCV 感染の検出を試みたが、これはこの二つのプラスミドの導入のみで GFP の発現を認め、バックグラウンドが高く HCV 感染の検出は不可能であった。

4. HBV 増殖機構の解析と新規治療法の開発

1) 培養上清中に出現すると想定される HBVp を抗 HBs 抗体による免疫沈降し RNA 抽出、GFP 遺伝子を標的とした RT-PCR から HBVp 産生されたと考えられた。また超遠心法による物理化学的性質も HBVp の産生を示唆した。本 HBVp を用いてヒト肝細胞 cDNA ライブラリーのスクリーニング中にある処理で感染性が向上することが観察された。

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

1) 多様性指向性合成により作成された 8,064 種

の化合物のスクリーニングを施行したところ、replicon 増殖を抑制する 41 種の化合物が同定された。構造活性相関(SAR)解析によりさらに IC50 の優れた 5 個の epoxide 誘導体を同定した。

2) アラキドン酸 (50 μ M) の抗 HCV 活性はインドメタシン (20 μ M) ではキャンセルされなかったが、NDGA (20 μ M) によりキャンセルされた。この結果はアラキドン酸の LOX 代謝産物が抗 HCV 活性に重要な役割を果たすことを示している。アラキドン酸の LOX 代謝産物である 5-HETE, 8-HETE, 12-HETE, 15-HETE の HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討した。20 μ M の 5-HETE は HCV RNA 複製を 80%抑制したが、20 μ M の 8-HETE, 12-HETE は HCV RNA 複製をそれぞれ 40%増強した。15-HETE は HCV RNA 複製に影響を与えなかった。各 HETE の異性体 (R-, S-), 5S-, 8S-, 12S-, 15S-HETE (各 10 μ M) はそれぞれ、80%抑制、80%増強、不変、不変であった。5R-, 8R-, 12R-, 15R-HETE (各 10 μ M) はそれぞれ、95%抑制、50%増強、120%増強、不変であった。最も強い抗 HCV 活性を示した 5R-HETE の EC₅₀、EC₉₀ はそれぞれ 1.8 μ M、7.4 μ M であった。これらの結果は HETE の異性体では HCV RNA 複製に対する効果が異なることを示している。最も強い抑制効果と増強効果を示した 5R-HETE と 12R-HETE、また、HCV RNA 複製に影響を及ぼさなかった 12S-HETE を OR6 細胞に添加してマイクロアレイ解析をおこなった。5R-HETE で特異的に変化をする遺伝子はなかったが、12R-HETE 処理により Metallothionein の発現が増強した。一方、12S-HETE では MT 遺伝子の発現は変化しなかった。

3) 新規抗 HCV 薬候補の抗ウイルス活性

糖鎖結合性タンパク質 (CBP) (SVN, GRFT) の抗 HCV 活性 (HCV JFH-1 株/Huh7.5.1 細胞) を解析した。いずれの CBP も 50%有効濃度 (EC50) が low nM から sub nM の極めて高い抗 HCV 活性を示した。これら CBP の抗 HIV-1 活性の強度は、抗 HCV 活性のそれと併行関係があった。HCVpp アッセイによって、SVN, GRFT は共に、HCVpp の感染を阻害することから、実際にその作用点がエントリー過程にあることが明らかとなった。この阻害効果は HCV エンベロープタンパク質 E1/E2 に特異的で、VSV-G pseudotype の感染には影響しない。また SVN, GRFT は JFH-1 株 (genotype 2a) だけでなく、J6 株 (2a) および TH 株 (1b) の HCVpp 感染も同程度に阻害した。また、

time-of-addition 実験によって SVN, GRFT の抗 HCV 効果が、ウイルス感染 (エンタリー) のステップにあることを示した。SVN および GRFT は E2 にそれぞれ 500 ng/100 ul ($\sim 0.5 \mu\text{M}$)、10 ng/well ($\sim 8 \text{nM}$) で結合した。GRFT は、SVN に比較して数 10 倍高い E2 結合能を示した。

4) 抗 NS4A 阻害剤の抗 HCV 効果および作用機序の解析を行った。IC50 は $1 \mu\text{M}$ 弱であり、細胞障害性はその濃度では認められなかった。興味深いことに、抗 NS4A 阻害剤は遺伝子型 1 および 2 の NS4A と結合することが培養細胞による検討で明らかとなった。さらに、抗 NS4A 阻害剤は NS3 のプロテアーゼ活性に重要なクレアチニンカイネース B (CKB) と NS4A の結合を阻害した。CKB と NS4A の結合は NS3 ヘリカーゼ活性に重要であることから、抗 NS4A 阻害剤は NS3 ヘリカーゼ活性を阻害することにより抗 HCV 活性を発揮することがわかった。

D. 考察

HCV は 1989 年に遺伝子がクローニングされたが、ウイルス培養が困難であり、ウイルス学的研究や抗ウイルス薬の開発が進んでこなかった。1999 年に RNA レプリコンが開発され (Lohmann, 1999 Science)、培養細胞におけるウイルスゲノム複製が可能となった。さらに、2005 年に申請者が世界に先駆けて HCV のウイルス培養系を開発した (Wakita, 2005 Nat Med)。これら HCV のウイルス培養系やレプリコン実験系を用いてウイルスの生活環をより詳細に解析し、その成果を新たな抗ウイルス治療法の開発につなげることが重要である。しかし、ウイルスの培養系は未だに単一のウイルス株でのみ可能であり、患者血清からウイルスを分離培養することはできない。日本や他の国で感染者が多く、インターフェロンの効きにくい遺伝子型 1 のウイルスの培養系の確立が急務である。そのために、より効率の良いウイルス複製系の開発が望まれる。一方、HBV もウイルス培養は困難だが、ウイルスゲノムの培養細胞への導入により、ウイルスの複製増殖が可能であり、この実験系を使用してウイルスゲノムの機能的解析が行われてきた。最近、HBV の遺伝子型の研究が進展し、遺伝子型と病態の関連が報告されている。ラミブジンなどの抗ウイルス薬が HBV 感染症の治療に臨床導入され、B 型肝炎の治療は

変革しようとしている。しかし、耐性ウイルスの出現が問題となり、HIV ウイルスの化学療法導入初期と同様の問題が生じている。このため、HBV に対して作用機序の異なる複数の抗ウイルス薬の開発が望まれる。

今年度得られた研究成果を以下に考察する。ヒト不死化肝細胞の立体培養によって変化が認められたアラキドン酸カスケードは HCV のゲノム複製とは関連性が低いが感染性粒子産生に重要なシグナルであることが考えられた。各プロスタグランジン受容体アゴニストは濃度依存的に HCV 感染性粒子産生に対して異なる影響を与えることが分かったため、各プロスタグランジンの種類とバランスによって感染性粒子産生が制御されている可能性が考えられた。

不死化ヒト肝細胞を用いた 3 次元培養系は少なくとも 10 日間はスフェロイド状での培養が可能であり、各種変異体の感染効率の違いや HBV 感染・複製様式の解明、特にレセプターの探索や粒子放出過程などを解析できる。今後、この系を用いた感染防御実験 (特にワクチンエスケープミュータントに関して)、標的分子薬剤の探索研究や新規治療法の開発研究の可能性を検討していきたい。

ウイルス増殖に、PA28 γ 発現が必須であることが分かった。ウイルス複製に変化が無いことから、PA28 γ はウイルス複製に機能していないものと思われる。また、ウイルス RNA を直接トランスフェクションしたとき、PA28 γ ノックダウンにより上清中のウイルス価が低下したことから、複製以降の過程で PA28 γ が機能している事が想像された。また、コア蛋白質のユビキチン化と上清中のウイルス価の量は相反しており、PA28 γ は E6AP によるコア蛋白質のユビキチン化を負に制御する事によって、ウイルス産生能を維持しているものと思われる。

La protein は HCV 増殖及びテロメラーゼ活性と密接に関連していることが明らかとなった。C 型慢性肝炎肝組織では La protein は HCV 及びテロメラーゼ関連分子と複合体を形成している可能性が示唆され、細胞内局在に興味をもたれる。

本研究でデザインしたアンチセンス RNA ステム・ループの最大の特徴は、HCV IRES の二次構造を標的とする点である。一般的な一本鎖 RNA からなるアンチセンス分子や siRNA は RNA 二次構造を標的としにくいとされている。RNA 二次構造を標的とするメリットとして二つ考えられる。まず、HCV の翻訳にお

いて重要な役割を果たす宿主やウイルス因子の働きを直接阻害するため、効果的な翻訳の抑制が期待される。次に、このような翻訳において重要な役割を果たす宿主やウイルス因子が結合する二次構造は高い配列保存性を有し、耐性変異が生じ難いことが考えられることである。

GFP を挿入したウイルスは培養細胞中のみならず生体中でも不安定であり、感染成立時には高頻度に GFP の欠失が起きた。従って、生体での HCV の感染をリアルタイムでモニターするためには他の方法でのレポーター遺伝子挿入が必要である。また Cre-loxP システムを用い、HCV の複製に依存しない感染検出システムの構築を試みた。このシステムにおいて、Cre 遺伝子をゲノム内に挿入した HCV の感染検出は可能であったが、Cre-IPS-1 コンストラクトを用いた通常の HCV 株の感染検出は不可能であった。

BCAA は HCV の感染・増殖の過程で少なくとも 2 カ所の作用点を持つ可能性が示唆された。レプリコン細胞においては、BCAA は IRES 活性の抑制を介して HCV 増殖を負に制御している。HCV 感染系では、逆にその促進がみられた。よってウイルス粒子形成から粒子の放出、再感染にわたる過程においては、BCAA は逆にそれを促進する働きを持つことが示唆される。BCAA は mTOR を活性化すると報告があり、それが HCV ゲノム複製を抑制している可能性も考えられたが、mTOR の阻害剤であるラパマイシンを作用させても BCAA は抗 HCV 活性を示したことから、mTOR 経路非依存的な作用機序が存在すると考えられた。ウイルス粒子形成～再感染の過程における BCAA による促進作用は今のところ詳細なメカニズムは不明である。培養肝癌細胞内では JFH-1 株を除く HCV の増殖能はきわめて低く、実際に生体内での肝細胞においてどのような影響を持つかを含め、BCAA の作用を詳細に解明することが、HCV の増殖に携わる細胞内因子の同定につながると考えられ、さらには将来的な抗 HCV 療法へと発展していく可能性が考えられた。

HBVp の作製は可能であり、本ウイルスを用いて HBV レセプターの分離・同定に生物学的アッセイが可能になった。ある処理で感染性が向上することは HBV レセプターの性情を示唆すると思われた

アラキドン酸代謝産物の中で COX ではなく LOX の代謝産物が抗 HCV 活性に重要であることを明らかにした。5R-HETE と 12R-HETE で OR6 細胞を処理すると、

5R-HETE では特異的な遺伝子の変動はなかったが、12R-HETE では MT の増強が認められた。興味深いことに、HCV RNA 複製に影響を及ぼさない、12S-HETE 処理では MT 遺伝子は変動しなかった。MT は細胞内で抗酸化作用を有する宿主因子として知られている。酸化ストレスが HCV RNA 複製を抑制すること、そして、これらの抗 HCV 活性は抗酸化剤でキャンセルされることをすでに報告した。ビタミン E、C やセレンウムなどの抗酸化剤は HCV RNA 複製増強効果を有しているため 12R-HETE も MT を誘導し HCV RNA 複製を増強している可能性が示唆された。

高マンノース型 N-グリカンに対して特異的に結合する能力をもつ新規の生物由来の天然物質である CBP (SVN および GRFT) が、高い抗 HCV 活性を有することを、はじめて明らかにした。中でも GRFT は最も強力な活性を示し、エントリー段階に作用点があると考えられる。CBA はウイルスエンベロープタンパク質を被覆する N-グリカンに結合することで、ウイルス粒子の細胞表面への非特異吸着を阻害し、その結果、ウイルス粒子の受容体群への結合が妨げられ、ウイルス感染を阻害するものと考えられる。

E. 結論

1. ヒト不死化肝細胞の立体培養により患者血液由来の多様な HCV の生活環を再現することが可能になり、各種抗 HCV 薬剤の検証系となることが期待される。アラキドン酸カスケード、あるいはプロスタグランジンの効果を修飾することで HCV の感染性粒子産生を制御することが可能になると考えられた。したがって、この細胞内シグナルは抗 HCV 薬剤開発の新たな標的となることが期待された。
2. 不死化ヒト肝細胞を用いた 3 次元培養系は、安価・簡便で非常に有用な HBV 感染モデルとなりうる。
3. 宿主プロテアソーム活性化蛋白質 PA28 γ はウイルスコア蛋白質のユビキチン化を制御することによって、ウイルス産生能を負に制御しており、コア蛋白質との相互作用は、ウイルス感染に必要である。PA28 γ 自身の量あるいは機能を制御する事によって、新規の C 型肝炎治療法の開発が期待できる。PA28 γ はノックアウトマウスで顕著な表現型が認められず、かつ C 型肝炎の病原性発現に関与することから、症状の軽減とウイルス排除を同時に期待出来る標的因子であることが示唆された
4. La protein は HCV 増殖及びテロメラーゼ活性と

密接に関連していることが明らかとなった。以上より La protein は HCV 増殖に対するターゲットになり得ることが示唆された。

5. アンチセンス RNA ステム・ループは、HCV IRES のドメイン III に存在する SL III_f に結合することにより、HCV IRES によるウイルス RNA の翻訳を阻害し、HCV ウイルスの複製を抑制することが示唆された。このアンチセンス RNA ステム・ループは、RNA ウイルス性疾患等に対する医薬として有用であることが期待される。

6. HCV キメラリポーターレプリコン系を用いて薬剤・化合物の大規模スクリーニングを行い、HCV 発現・増殖を抑制する複数の化合物を同定し、HCV 培養系にて効果を確認し得た。本研究で同定された化合物の作用機構の解析・小動物モデルを用いた効果・安全性の検証を進めることにより HCV の新規治療法開発に結びつくものと考えられる。

7. これまでの研究により、GFP 遺伝子を HCV のゲノムに挿入したレポーターウイルスは、培養細胞中生体中ともに非常に不安定であり、このシステムにより安定して HCV 感染を検出することは難しいと考えられた。今後は Cre-loxP システムを用いた感染検出システムなど、細胞側にレポーター遺伝子を導入することで、培養細胞中での複製能が低い HCV 株でも感染が検出できるようなシステムの構築を目指したい。

8. HCV の増殖は、サイトカインなど様々な外的刺激から細胞内シグナルを介して制御を受けていることが多数報告されている。BCAA は肝疾患においてもしばしば使用されるとともに生理活性物質としての働きも持っており、HCV の増殖にも影響を与えることが明らかとなった。

9. HBVp を用いて感染性を指標に HBV レセプターの分離・同定を促進させ得る。

10. 感染性 HCV クローンを用いた新規阻害剤探索系は、これまでレプリコン・アッセイではできなかった新しいカテゴリーの阻害剤を探索するツールとして有効と考えられる。化合物ライブラリーからの HCV_{cc} assay を用いたランダムスクリーニングの結果、数種の HCV 阻害剤候補が同定された。エントリー阻害剤候補、粒子形成阻害剤が含まれる。

11. アラキドン酸の LOX 代謝産物である 5-HETE の抗 HCV 活性を見出した。新たに抗 HCV 活性を見出した 5-HETE は抗 HCV 剤開発の新しい分子標的となるも

のと思われる。

12. 強力な抗 HCV 活性をもつ生体由来のタンパク質性の糖鎖結合タンパク質 (SVN, GRFT) を同定した。極めて強力な抗ウイルス作用から、新規の感染阻害剤としての可能性が期待される。また HCV エントリー機構を解明する上での有用な試薬としての利用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hussein H. Aly, Yue Qi, Kimie Atsuzawa, Noobuteru Usuda, Yasutsugu Takada, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizogami. Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Strain-dependent viral dynamics and virus cell interactions observed in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood borne HCV. *Hepatology*, 50(3), 689-696, 2009
2. Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379: 330-334, 2009
3. Takayuki Murata, Yoshitaka Sato, Sanae Nakayama, Ayumi Kudoh, Satoko Iwahori, Hiroki Isomura, Masako Tajima, Takayuki Hishiki, Takayuki Ohshima, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno, and Tatsuya Tsurumi: TORC 2, a coactivator of CREB, promotes Epstein-Barr virus reactivation from latency through interaction with viral BZLF1 protein, *J. Biol. Chem.* 284, 8033-8041, 2009
4. Kazuo Sugiyama, Kenji Suzuki, Takahide Nakazawa, Kenji Funami, Takayuki Hishiki, Kazuya Ogawa, Satoru Saito, Kumiko W. Shimotohno, Takeshi Suzuki, Yuko Shimizu, Seiri Tobita, Makoto Hijikata, Hiroshi Takaku, Kunitada Shimotohno: Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro. *J. Virol.*, 83(13), 6922-6928, 2009.
5. Kaku Goto, Koichi Watashi, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno:

- Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. *Cancer Science*, 100 (10), 1943-1950, 2009.
6. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol Res*. 2010. 40(1):14-30.
 7. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*. 2009. 83(20):10538-47.
 8. Kusakabe A, Tanaka Y, Mochida S, Nakayama N, Inoue K, Sata M, Isoda N, Kang JH, Sumino Y, Yatsuhashi H, Takikawa Y, Kaneko S, Yamada G, Karino Y, Tanaka E, Kato J, Sakaida I, Izumi N, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, Mizokami M. Case-control study for the identification of virological factors associated with fulminant hepatitis B. *Hepatol Res*. 2009. 39(7):648-56.
 9. Taguwa, S., H. Kambara, H. Omori, H. Tani, T. Abe, Y. Mori, T. Suzuki, T. Yoshimori, K. Moriishi, and Y. Matsuura. Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J. Virol*. 83:10427-10436. 2009.
 10. Moriya, K., H. Miyoshi, T. Tsutsumi, S. Shinzawa, H. Fujie, Y. Shintani, H. Yotsuyanagi, K. Moriishi, Y. Matsuura, T. Suzuki, T. Miyamura, and K. Koike. Tacrolimus Ameliorates Metabolic Disturbance and Oxidative Stress Caused by Hepatitis C Virus Core Protein. Analysis Using Mouse Model and Cultured Cells. *Am. J. Pathol*. 175:1515-1524. 2009
 11. Kukihara, H., K. Moriishi, S. Taguwa, H. Tani, T. Abe, Y. Mori, T. Suzuki, T. Fukuhara, A. Taketomi, Y. Maehara, and Y. Matsuura. Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J. Virol*. 83:7959-7969. 2009
 12. Hodo Y, Hashimoto SI, Honda M, Yamashita T, Suzuki Y, Sugano S, Kaneko S, Matsushima K. Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. *Genomics*. 2010 Jan 21. [Epub ahead of print]
 13. Takatori H, Yamashita T, Honda M, Nishino R, Arai K, Yamashita T, Takamura H, Ohta T, Zen Y, Kaneko S. dUTP pyrophosphatase expression correlates with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2009 Nov 30. [Epub ahead of print]
 14. Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Matsushima K, Kaneko S. CD14+monocytes are vulnerable and functionally impaired under ER stress in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2009 Dec 3. [Epub ahead of print]
 15. Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009 49(4):1098-112
 16. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*. 2009 136(3):1012-24.
 17. Ootsuji H, Honda H, Kaneko S, Usui S, Okajima M, Okada H, Sakai Y, Takamura T, Horimoto K, Takamura M. Altered Hepatic Gene Expression Profiles Associated with Myocardial Ischemia. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 Feb 1;3(1):68-77.
 18. Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. La protein required for IRES-directed translation is a potential

- therapeutic target for hepatitis C virus replication. *Journal of Infectious Diseases* 2010 in press
19. M. Zahed, T. Suzuki, A. Suganami, H. Sugiyama, K. Harada, M. Takiguchi, Y. Tamura, N. Suzuki "Screening of SMG7-binding peptides by combination of phage display and docking simulation analysis" *Protein & Peptide Letters*, 16, 301-305 (2009)
 20. Horiya, M. Inaba, C.-S. Kou, H. Uehara, N. Masui, M. Mizuguchi, M. Ishibashi, S. Matsufuji and K. Harada* "Replacement of the 1 boxB RNA-N peptide with heterologous RNA-peptide interactions relaxes the strict spacial requirements for the formation of a transcription antitermination complex" *Molecular Microbiology*, 74, 85-97 (2009)
 21. A. Yano, S. Horiya, T. Minami, E. Haneda, M. Ikeda, and K. Harada* "Identification of antisense RNA stem-loops that inhibit RNA-protein interactions using a bacterial reporter system" *Nucleic Acids Research*, Feb. 15 (Epub ahead of print) (2010)
 22. KK, Kook H Kim, HY Kim, HK Cho, N Sakamoto, JH Cheong: Curcumin inhibits hepatitis C virus replication via suppressing the Akt-SREBP-1 pathway. *FEBS Letter* 2010; *Epub*
 23. M Nakagawa, N Sakamoto, M Ueyama, K Mogushi, S Nagaie, Y Itsui, S Azuma, S Kakinuma, H Tanaka, N Enomoto, M Watanabe: Mutations in the Interferon Sensitivity Determining Region and virological response to combination therapy with Pegylated-interferon alpha2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b infection. *J Gastroenterol*, in press
 24. Y Nishimura-Sakurai, N Sakamoto, K Mogushi, S Nagaie, M Nakagawa, Y Itsui, et al.: Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells. *J Gastroenterol Epub*
 25. T Mizui, S Yamashina, I Tanida, M Takashima, Y Takei, T Ueno, N Sakamoto, K Ikejima, T Kitamura, N Enomoto, T Sakai, E Kominami, S Watanabe: Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J Gastroenterol, Epub*
 26. Y Itsui, N Sakamoto, S Kakinuma, M Nakagawa, Y Sekine-Osajima, M Tasaka-Fujita, Y Nishimura-Sakurai, et al.: Antiviral effects of the interferon-induced protein GBP-1 and its interaction with the hepatitis C virus NS5B protein. *Hepatology* 2009; 50:1727-1737
 27. Y Tanaka, N Nishida, M Sugiyama, M Kurosaki, K Matsuura, N Sakamoto, M Nakagawa, et al.: Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genetics* 2009; 41 (10):1105-1109
 28. K Kim, KH Kim, E Ha, JY Park, N Sakamoto, JH Cheong: Hepatitis C virus NS5A protein increases hepatic lipid accumulation via induction of activation and expression of PPARgamma. *FEBS Letter* 2009;583 (17):2720-2726
 29. Tomita T, Kanai T, Totsuka T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, et al.: IL-7 Is Essential for Lymphopenia-driven Turnover of Colitogenic CD4+ Memory T Cells in Chronic Colitis. *Eur J Immunol* 2009;38 (10):2737-2747
 30. Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Shinohara T, Sakamoto N, et al.: Long-lived Colitogenic CD4+ Memory T Cells Residing Outside the Intestine Participate in the Perpetuation of Chronic Colitis. *J Immunol* 2009;183 (8):5059-5068
 31. M Ohira, K Ishiyama, Y Tanaka, M Doskali, Y Igarashi, H Tashiro, N Hiraga, M Imamura, N Sakamoto, et al.: Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *J Clin Invest.* 2009;119:3226-3235
 32. S-Y Wang, C-P Tseng, K-C Tsai, C-F Lin, C-Y

- Wen, H-S Tsay, N Sakamoto, C-H Tseng, J-C Cheng: Bioactivity-guided screening identifies pheophytin a as a potent anti-hepatitis C virus compound from *Lonicera hypoglauca* Miq. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385(2):230-235
33. Chatterji U, Bobardt M, Selvarajah S, Yang F, Tang H, Sakamoto N, et al.: The isomerase active site of cyclophilin a is critical for HCV replication. *J Biol Chem* 2009; 284(25):16998-17005
34. T Totsuka, T Kanai, Y Nemoto, T Tomita, R Okamoto, K Tsuchiya, T Nakamura, N Sakamoto, et al.: RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function of CD4+ CD25+ regulatory T cells in chronic colitis. *J Immunol* 2009; 182(19):6079-6087
35. S Toma, T Yamashiro, S Arakaki, J Shiroma, T Maeshiro, K Hibiya, N Sakamoto, et al.: Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by nelfinavir and synergistic effect with interferon- α . *Journal of Viral Hepatitis* 2009; 16(7):506-512
36. Onizawa, Kanai T, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Nagaishi T, Sakamoto N, Watanabe M: Signaling pathway via TNF- α /NF- κ B in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296(4):G850-859
37. AW. Tai, Y Benita, LF. Peng, S-S Kim, N Sakamoto, RJ. Xavier, RT. Chung: A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* 2009; 5(3):298-307
38. Murayama M, Okamoto R, Tsuchiya K, Akiyama J, Nakamura T, Sakamoto N, et al.: Musashi-1 suppresses expression of Paneth cell-specific genes in human intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol* 2009;44(3):173-82
39. Y. Sekine-Osajima, N. Sakamoto, M. Nakagawa, Y. et al.: Two flavonoids extracts from *Glycyrrhizae radix* inhibit in vitro hepatitis C virus replication. *Hepatol Res* 2009;39:60-69
40. Ohkawa K, Takehara T, Kato M, Kanada A, Deguchi M, Kagita M, Hikita H, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Yamaguchi S, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Hayashi N. Mutations associated with the therapeutic efficacy of adefovir dipivoxil added to lamivudine in patients resistant to lamivudine with type B chronic hepatitis. *J Med Virol* 81: 798-806, 2009
41. Ohkawa K, Takehara T, Ishida H, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Yamamoto M, Kohga K, Sasakawa A, Uemura A, Sakamori R, Yamaguchi S, Li W, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Katayama K, Hayashi N. Fatal exacerbation of type B chronic hepatitis triggered by changes in relaxed circular viral DNA synthesis and virion secretion. *Biochem Biophys Res Commun* (in press)
42. Matsumoto A, Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Hirano K, Fujimoto M, Akiyama M, Miuma S, Ozawa E, Shibata H, Takeshita S, Yamasaki H, Ikeda M, Kato N, and Eguchi K. Interferon-alpha-induced mTOR activation is an anti-hepatitis C virus signal via the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-independent pathway. *J. Gastroenterol.* 44:856-863, 2009.
43. Nishimura G, Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, and Kato N. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. *Antiviral Res.*, 82:42-50, 2009.
44. Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, and Kato N. Arsenic trioxide inhibits hepatitis C virus RNA replication through modulation of the glutathione redox system and oxidative stress. *J. Virol.*, 83:2338-2348, 2009.
45. Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H,

- and Ikeda M. Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture. *Arch. Virol.* 154:77-85, 2009.
46. 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.
47. Kawai Y, Ikeda M, Abe K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, and Kato N. Development of an HCV relapse model using genome-length HCV RNA-harboring cells possessing the IFN- α -resistance phenotype. *Hepatol. Res.*, 39:898-909, 2009.
48. Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, and Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- α . *FEBS Letters*, 583:1434-1438, 2009.
49. Yano M, Ikeda M, Abe K, Kawai Y, Kuroki M, Mori K, Dansako H, Ariumi Y, Ohkoshi S, Aoyagi Y, and Kato N. Oxidative stress induces anti-hepatitis C virus status via the activation of extracellular signal-regulated kinase. *Hepatology*, 50:678-688, 2009.
50. Kato N, 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 hepatoma cell line. *Virus Res.*, 146:41-50, 2009.
51. ANakamura M, Saito H, Ikeda M, Hokari R, Kato N, Hibi T, Miura S. An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus. *World J Gastroenterol.*, in press, 2010
52. Tanaka, N., Mamemura, T., Abe, S., Imabayashi, K., Kashiwada, Y., Takaishi, Y., Suzuki, T., Takebe, Y., Kubota, T., and Kobayashi, J. (2009). Bixoxanthones A-D, prenylated xanthones from roots of hypericum chinense. (in press)
53. Hassan, R., Suzu, S., Hiyoshi, M., Takahashi-Makise, N., Ueno, T., Agatsuma, T., Akari, H., Komano, J., Takebe, Y., Motoyoshi, K., Okada, S. (2009). Dys-regulated activation of a src tyrosine kinase Hck at the golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *J Cell Physiol.* 221(2): 458-468.
54. Delviks-Frankenberry, KA., Nikolenko, GN., Maldarelli, F., Hase, S., Takebe, Y., Pathak, VK. (2009). Subtype-specific differences in the HIV-1 reverse transcriptase connection subdomain of CRF01_AE are associated with higher levels of resistance to 3' -azido-3' -deoxythymidine. *J. Virol.* 83(17): 8502-8513.
55. Tanaka, R., Tsujii, H., Yamada, T., Kajimoto T., Amano, F., Hasegawa, J., Hamashima Y., Node, M., Katoh, K., Takebe, Y. (2009). Novel 3 α -methoxyserrat-14-en-21 β -ol (PJ-1) and 3 β -methoxyserrat-14-en-21 β -ol (PJ-2)-curcumin, kojic acid, quercetin, and baicalein conjugates as HIV agents. *Bioorg Med. Chem.* 17(14): 5238-46.
56. Hazari S, Chandra PK, Poat B, Datta S, Garry RF, Foster TP, Kousoulas G, Wakita T, Dash S. Impaired antiviral activity of interferon alpha against hepatitis C virus 2a in Huh-7 cells with a defective Jak-Stat pathway. *Virol J.* 2010 7(1):36.
57. Ishibashi M, Wakita T, Esumi M. 2',5'-Oligoadenylate synthetase-like gene highly induced by hepatitis C virus infection in human liver is inhibitory to viral replication in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 392(3):397-402.
58. Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res.* 2010 85(3):520-524.

59. Angus AG, Dalrymple D, Boulant S, McGivern DR, Clayton RF, Scott MJ, Adair R, Graham S, Owsianka AM, Targett-Adams P, Li K, Wakita T, McLauchlan J, Lemon SM, Patel AH. Requirement of cellular DDX3 for hepatitis C virus replication is unrelated to its interaction with the viral core protein. *J Gen Virol*. 2010 91(1):122-32.
60. Seronello S, Ito C, Wakita T, Choi J. Ethanol enhances hepatitis C virus replication through lipid metabolism and elevated NADH/NAD⁺. *J Biol Chem*. 2010, 285(2):845-54.
61. Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A. *Arch Virol*. 2009;154(10):1671-7.
62. Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T. Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. *J Clin Microbiol*. 2009 Dec;47(12):4141-3.
63. Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Res*. 2009 83(2):112-7.
64. Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Double-stranded RNA-induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. *Arch Virol*. 2009;154(5):801-10.
65. Weng L, Du J, Zhou J, Ding J, Wakita T, Kohara M, Toyoda T. Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain. *Arch Virol*. 2009;154(5):765-73.
66. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol*. 2009 83(10):5137-47.
67. Park CY, Jun HJ, Wakita T, Cheong JH, Hwang SB. Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *J Biol Chem*. 2009 284(14):9237-46.

著書

1. 坂本直哉、横田隆徳: siRNAによるC型肝炎遺伝子治療. バイオ医薬品の開発技術とシーズ 2009年3月、シーエムシー出版 p246-251

総説

1. Sakamoto N, Wu GY: Prospects for future therapy of hepatitis C virus infection. *Future Virology* 2009; 4(5):453-462
2. Sakamoto N, Watanabe M: New therapeutic approaches to HCV. *J Gastroenterol* 2009; 44(7):643-649
3. 櫻井幸、坂本直哉、渡辺守: HCV増殖に関連する糖脂質代謝遺伝子ネットワーク. *肝胆膵* 2009; 59(6):1163-1172
4. 坂本直哉: HCV増殖・培養系を用いた抗ウイルス化合物の同定. *医学のあゆみ* 2009; 229(1):107-110
5. 上西理恵、長谷彩希、武部 豊. 肝炎治療薬. 「C型肝炎治療:新規抗HCV薬の開発」46(2):109-123. 特集・抗ウイルス薬物療法の現状と今後の展望 医薬ジャーナル社. 東京. 2010.
6. 武部 豊、上西理恵. HCVエントリー・粒子形成阻害剤:新規クラス薬剤スクリーニング. 「C型肝炎のすべて 2009」新規治療法. *肝胆膵* 57(5):1047-1056, アークメディア社 2008

2. 学会発表および講演など

1. Hussein H. Aly, Chieko Tsutsui, Yue Qi, Yukihiro Kushima, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: TLR8 induces RIG-I gene expression and efficient

- interferon response against HCV infection in human hepatocytes. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Nice, France, Oct 3-7 2009-
2. Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Drug screening of blood-borne HCV using 3D cultured immortalized human hepatocytes. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Nice, France, Oct 3-7 2009-
 3. Kusakabe A, Tanaka Y, Yamaguchi T, Segawa M, Kurbanov F, Sugiyama M, Hijikata M, Shimotohno K, Mizokami M. A novel three-dimensional culture system of immortalized hepatocytes; Assessment on HBV vaccine escape mutant strain infectivity and on ability of anti-PreS2 to prevent the infection. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. 2009.
 4. Moriishi K, Shoji I, Suzuki R, Suzuki T, Matsuura Y, Involvement of PA28gamma and E6AP in the Degradation of HCV Core Protein and the Viral Production. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, October 3-7, 2009, Nice, France
 5. Abe T, Kaname Y, Moriishi K, Kanto T, Hayashi N, Matsuura Y. Hyaluronan Participates in the IP-10 Induction in Cells Infected with HCV through an Engagement of TLR2 and CD44. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, October 3-7, 2009, Nice, France
 6. Wen X, Abe T, Taguwa S, Mori Y, Moriishi K, Matsuura Y. Suppression of HCV Replication in Hepatocytes through a Selective Induction of IRF7. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, October 3-7, 2009, Nice, France
 7. Y Funaoka, N Sakamoto, G Suda, Y Itsui, M Nakagawa, K Mishima, Y Karakama, M Yamamoto, et al. : In-vitro replication and interferon sensitivity of core aa 70 and 91 mutant HCV cell culture. 60th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Oct-30-2009, Boston, MA
 8. G Suda, N Sakamoto, Y Itsui, M Nakagawa, et al. : In-vitro and in-vivo Characterization of a new genotype 2b HCV clone and 2b/JFH1 intergenotypic chimera and analyses of the factor that regulate interferon sensitivity. 60th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Oct-30-2009, Boston, MA.
 9. Y Itsui, N Sakamoto, M Nakagawa, Y Sekine-Osajima, M Tasaka-Fujita, et al. : Antiviral effects of interferon-induced proteins GBP-1 and its interactions with hepatitis C virus NS5B protein. 60th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Oct-30-2009, Boston, MA
 10. K Mishima, N Sakamoto, Y Sekine-Osajima, M Nakagawa, et al. : Establishment and genetic analyses of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by plaque-forming assay. 16th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Oct-3-2009, Nice, France
 11. Mohsan Saeed, Kato T, Choi YK, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T. In vivo behavior of hepatitis C virus JFH-1 strain with mutations emerged after passage in chimpanzees. The 16th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Nice, France. (2009, Oct. 3 - 7).
 12. Choi YK, Kato T, Wakita T, Liang TJ, Krawczynski K. Dynamic Profile of gene expression in the liver during hepatitis C virus (HCV) JFH1 infection in chimpanzees. The 16th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Nice, France. (2009, Oct. 3 - 7)
 13. Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Suzuki T, Kato T, Toyoda T, Wakita T. Specific RNA structures and mutations

- implicated for HCV RNA replication and virus particle formation in culture cells. The 16th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Nice, France. (2009, Oct. 3 - 7).
14. Kyoko Mori, Masanori Ikeda, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, and Nobuyuki Kato. Li23 cell-derived HCV-RNA replicating systems enabling analysis for anti-HCV mechanism of ribavirin. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
 15. Masanori Ikeda, Kyoko Mori, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, and Nobuyuki Kato. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- α . 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
 16. Yoshinari Kawai, Masanori Ikeda, Masahiko Yano, Ken-ichi Abe, Go Nishimura, Hiromichi Dansako, Yasuo Ariumi, Takaji Wakita, Kazuhide Yamamoto, and Nobuyuki Kato. Anti-ulcer agent, teprenone, enhanced statin's anti-HCV activity by augmenting the inhibition of geranylgeranylation. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
 17. Yasuo Ariumi, Misao Kuroki, Masatoshi Maki, Masanori Ikeda, Hiromichi Dansako, Takaji Wakita, and Nobuyuki Kato. The ESCRT pathway is required for HCV production. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
 18. Misao Kuroki, Yasuo Ariumi, Masanori Ikeda, Hiromichi Dansako, Takaji Wakita, and Nobuyuki Kato. The PML tumor suppressor protein is required for HCV production. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
 19. Go Nishimura, Masanori Ikeda, Kyoko Mori, Takahide Takazawa, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, and Nobuyuki Kato. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
 20. Masahiko Yano, Masanori Ikeda, Ken-ichi Abe, Yoshinari Kawai, Misao Kuroki, Kyoko Mori, Hiromichi Dansako, Yasuo Ariumi, Yasunobu Matsuda, Shougo Ohkoshi, Yutaka Aoyagi, and Nobuyuki Kato. Involvement of the MEK-ERK1/2 Signaling Pathway in the Anti-HCV Mechanism of Oxidative Stress. The Liver Meeting 2009, AASLD Boston, Massachusetts, USA, October. 30-November. 3, 2009
 21. Takebe, Y., Uenishi, R., Hase, H., Liao, H., Gustafson, K., McMahon, JB., and O'Keefe, BG. Potent Inhibition of HCV Entry by Newly Identified Carbohydrate Binding Proteins. 6th international symposium on hepatitis C virus and related viruses (October 3-7, 2009, Nice, France)
 22. Uenishi, R., Hase, S., Li, Y., Liao, H., Gustafson, K., McMahon, JB., O'Keefe, BG., Suzuki, T., Wakita, T., and Takebe, Y. Identification of novel HCV entry inhibitors using HCVcc assay as a primary screening platform. HepDART 2009 (Dec. 6-10, 2009, Hawaii, USA)
 23. M Yamamoto, H Aizaki, K Goto, K Hamano, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki, Structural requirements of virion-associated cholesterol for HCV morphogenesis and infectivity, 16th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Nice, France (2009, 10. 3-7)
 24. H Aizaki, M Yamamoto, K Goto, M Fukasawa, K Hanada, S Sato, N Takahashi, Y Matsuura, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki, Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, Nice, France