

- (2009, 10. 3-7)
25. I Shoji, K Abe, K Murakami, K Ishii, T Suzuki, T Wakita, T Miyamura, K Koike, H Hotta, The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein, Nice, France (2009, 10. 3-7)
 26. N Watanabe, H Aizaki, T Matsuura, T Wakita, T Suzuki, HCV subgenomic replicon replication in human hepatic stellate cell lines, Nice, France (2009, 10. 3-7)
 27. A CARPENTIER, P PODEVIN, V PENE, L AOUDJEHANE, M CARRIERE, S ZAIDI, C HERNANDEZ, JF MERITET, O SCATTON, M DREUX, F COSSET, R BARTENSCHLAGER, T WAKITA, F CONTI, Y CALMUS, AR ROSENBERG, HCV GROWN IN PRIMARY HUMAN HEPATOCYTES HAS HIGHER SPECIFIC INFECTIVITY AND LOWER BUOYANT DENSITY THAN HCV GROWN IN HUH-7 CELL LINE, 16th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Nice, France (2009, 10. 3-7)
 28. M FUKASAWA, Y SHIRASAGO, K HANADA, T SUZUKI, T WAKITA, M NISHIJIMA, ISOLATION OF HUH7.5.1 CELL MUTANTS RESISTANT TO HEPATITIS C VIRUS INFECTION, Nice, France (2009, 10. 3-7)
 29. K MACHIDA, I LIU, L DUAN, Y KONDO, S FOUNG, T WAKITA, JH OU, M LAI, LYMPHOTROPISM OF HEPATITIS C VIRUS IS GENETICALLY DETERMINED WITH IDENTIFICATION OF IMMUNE CELL-SPECIFIC BINDING FACTOR, Nice, France (2009, 10. 3-7)
 30. T MASAKI, S MATSUNAGA, H TAKAHASHI, T KATO, T MIYAMURA, Y ENDO, T SAWASAKI, T WAKITA, T SUZUKI, IDENTIFICATION OF NOVEL SERINE/THREONINE PROTEIN KINASES RESPONSIBLE FOR HCV NSSA PHOSPHORYLATION, Nice, France (2009, 10. 3-7)
 31. M SAEED, T KATO, Y CHOI, K KRAWCZYNSKI, J LIANG, T WAKITA, IN VITRO BEHAVIOR OF HEPATITIS C VIRUS JFH-1 STRAINS WITH MUTATIONS EMERGED AFTER PASSAGE IN CHIMPANZEES, Nice, France (2009, 10. 3-7)
 32. A SAULNIER, G GROULT, D GHIBAUDDO, T WAKITA, L COHEN, C MARNATA, A MARTIN, ANALYSIS OF PARTICLE ASSEMBLY FROM CHIMERIC HCV JFH-1 GENOMES EXPRESSING E1-E2- p13 OF GB VIRUS B, Nice, France (2009, 10. 3-7)
 33. R SUZUKI, K SAITO, T ANDO, K ISHII, Y MATSUURA, T MIYAMURA, T WAKITA, T SUZUKI, PLASMID-BASED PRODUCTION OF TRANSCOMPLEMENTED HCV PARTICLES: ITS USE FOR FUNCTIONAL ANALYSIS OF NS2, Nice, France (2009, 10. 3-7)
 34. N ARNAUD, S DABO, P MAILLARD, A BUDKOWSKA, D GARCIN, A GATIGNOL, T WAKITA, E MEURS, HCV INDUCES IFN AT THE EARLY STEPS OF INFECTION, Nice, France (2009, 10. 3-7)
 35. AG ANGUS, D DALRYMPLE, S BOULANT, D MCGIVERN, R ADAIR, AM OWSIANKA, P TARGETT-ADAM, T WAKITA, J MCLAUCHLAN, SM LEMON, AH PATEL, THE REQUIREMENT OF DDX3 FOR HCV REPLICATION IS UNRELATED TO ITS INTERACTION WITH THE VIRAL CORE PROTEIN, Nice, France (2009, 10. 3-7)
 36. S SERONELLO, C ITO, T WAKITA, J CHOI, ETHANOL ENHANCES HEPATITIS CVIRUS REPLICATION THROUGH ACETALDEHYDE, NADH/NAD+, AND HOST LIPID METABOLISM, Nice, France (2009, 10. 3-7)
 37. 久島透嘉、脇田隆宇、土方 誠 : core の変異体を用いた C 型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析、第 57 回日本ウイルス学会学術総会、平成 21 年 10 月 26 日、東京 2009
 38. 阿部雄一、脇田隆宇、土方 誠 : ケミカルバイオロジー手法を用いた C 型肝炎ウイルス感染性粒子形成機構解明の試み、第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月 9-12 日、横浜 2009
 39. 筒井智恵子、アリ・ハッサン・フセイン・久島透嘉、土方誠 : C 型肝炎ウイルスを抑制する転写因子 IRF7 の肝特異的発現制御機構の解析、第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月 9-12 日、横浜 2009
 40. 招待講演) 土方 誠 : 血液由来 HCV の感染増殖を再現する新しい培養細胞系の構築第 18 回広島肝臓研究会 平成 21 年 11 月 6 日、広島

2009

41. 森石恆司、勝二郁夫、鈴木亮介、鈴木哲朗、松浦善治、HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25-27 日、東京
42. 阿部隆之、要祐喜、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、松浦善治、ヒラルロン酸による炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生と C 型肝炎の慢性化、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25-27 日、東京
43. 加藤孝宣、伊達朋子、脇田隆宇、C 型肝炎ウイルスの生体内での感染様式と培養細胞での増殖能、第 45 回日本肝臓学会総会、神戸、2009 年 6 月
44. 村山麻子、加藤孝宣、脇田隆宇、C 型肝炎ウイルスの複製増殖に関与するウイルス遺伝子領域の検討、第 45 回日本肝臓学会総会、神戸、2009 年 6 月
45. 河合良成、池田正徳、森 京子、阿部健一、矢野雅彦、池田房雄、有海康雄、團迫浩方、山本和秀、加藤宣之 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略 -Teprenone (Selbex[®]) と Plaunotol (Kelnac[®]) の HCV 複製抑制効果- 第 45 回日本肝臓学会総会、神戸、平成 21 年 6 月
46. 中村光康、斎藤英胤、池田正徳、高木俊介、穂刈量太、加藤宣之、日比紀文、三浦総一郎 抗酸化剤 Resveratrol の C 型肝炎ウイルス複製についての検討 第 45 回日本肝臓学会総会、神戸、平成 21 年 6 月
47. 森 京子、阿部健一、團迫浩方、有海康雄、池田正徳、加藤宣之 C 型急性肝炎患者由来の全長 HCV-RNA 複製細胞株の樹立とその応用 第 24 回中国四国ウイルス研究会、岡山、平成 21 年 7 月
48. 黒木美沙緒、有海康雄、池田正徳、團迫浩方、脇田隆宇、加藤 宣之 亜ヒ酸は酸化ストレスとグルタチオンレドックスシステムを介して C 型肝炎ウイルス (HCV) RNA 複製を抑制する 第 24 回中国四国ウイルス研究会、岡山、平成 21 年 7 月
49. 河合良成、池田正徳、矢野雅彦、阿部健一、團迫浩方、有海康雄、山本和秀、加藤宣之 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略 -Teprenone (Selbex[®]) と Plaunotol (Kelnac[®]) の HCV RNA 複製抑制効果- 第 24 回中国四国ウイルス研究会、岡山、平成 21 年 7 月
50. 河合良成、池田正徳、加藤宣之 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略-Teprenone は Statin のゲラニルゲラニル化阻害を増強し HCV 複製抑制効果を増強する- 第 17 回日本消化器関連学会週間 (JDDW)、第 13 回日本肝臓学会大会 京都、平成 21 年 10 月
51. 池田房雄、團迫浩方、西村 剛、河合良成、有海康雄、池田正徳、高木章乃夫、岩崎良章、加藤宣之、山本和秀 HCV コア蛋白質のアミノ酸の違いと IFN 応答性との関係についての培養細胞を用いた解析 第 17 回日本消化器関連学会週間 (JDDW)、第 13 回日本肝臓学会大会 京都、平成 21 年 10 月
52. 中村光康、斎藤英胤、池田正徳、穂刈量太、加藤宣之、日比紀文 各種抗酸化剤の C 型肝炎ウイルス複製についての影響 第 17 回日本消化器関連学会週間 (JDDW)、第 13 回日本肝臓学会大会 京都、平成 21 年 10 月
53. 野崎昭人、近藤正晃、森本 学、沼田和司、池田正徳、加藤宣之、田中克明 C 型肝炎治療薬としての Hydroxyurea の可能性 第 17 回日本消化器関連学会週間 (JDDW)、第 13 回日本肝臓学会大会 京都、平成 21 年 10 月
54. 齋藤 誠、池田正徳、加藤宣之、田中寅彦 C 型肝炎ウイルス非構造タンパク質 NS3 と NS4B の相互作用における責任部位の解析 第 82 回日本生化学会大会、神戸、平成 21 年 10 月
55. 森 京子、池田正徳、有海康雄、團迫浩方、加藤宣之 リバビリンの抗 HCV 活性を解析評価できる Li23 細胞由来の HCV-RNA 複製システム 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成 21 年 10 月
56. 池田正徳、森 京子、有海康雄、團迫浩方、加藤宣之 オンコスタチン M はインターフェロンの抗 HCV 活性を相乗的に増強する 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成 21 年 10 月
57. 河合良成、池田正徳、矢野雅彦、阿部健一、西村 剛、團迫浩方、有海康雄、脇田隆宇、山本和秀、加藤宣之 抗潰瘍剤による C 型慢性

- 肝炎の新たな治療戦略-Teprenone は Statin のゲラニルゲラニル化阻害を増強し HCV 複製抑制効果を増強する- 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成 21 年 10 月
58. 有海康雄、黒木美沙緒、牧 正敏、池田正徳、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宣之 ESCRT 小胞輸送系の HCV 産生への関与 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成 21 年 10 月
 59. 黒木美沙緒、有海康雄、池田正徳、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宣之 癌抑制因子 PML は HCV 粒子産生に必要である 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成 21 年 10 月
 60. 齋藤 誠、池田正徳、加藤宣之、田中寅彦 1b 型 C 型肝炎ウイルス非構造タンパク質 NS3 と NS4B の相互作用の解析 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成 21 年 10 月
 61. 齋藤 誠、池田正徳、加藤宣之、田中寅彦 C 型肝炎ウイルス由来非構造タンパク質 NS3-NS4B 間の相互作用 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、平成 21 年 12 月
 62. 武部 豊、C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する新しいクラスのエントリー阻害剤の探索とその同定. 第 25 回白金シンポジウム「独創的評価系が拓く創薬研究の新たな展開」(2009.2.13, 東京)
 63. 武部 豊、上西理恵、長谷彩希、廖華南、Kirk Gustafson, James B Macmahon, Barry G O'Keefe. 新規マンノース特異糖鎖結合タンパク質による nM オーダーの強力な HCV/HIV-1 エントリー阻害. 第 57 回日本ウイルス学会 (2009.10.25-10.27. 東京)
 64. 脇田隆宇, HCV の複製と粒子形成、平成 21 年度 遺伝子病制御研究所 研究集会、北海道大学遺伝子病制御研究所 (2010, 1.18-19)
 65. 相崎英樹、脇田隆宇、感染性 HCV 粒子形成における宿主生体膜の役割、第 45 回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、(2009, 6.4-5)、シンポジウム 1「C 型慢性肝炎における宿主とウイルスの interaction」
 66. 三島果子、坂本直哉、箆島裕子、中川美奈、田坂めぐみ、櫻井幸、須田剛生、小貫優子、山本満千、渡辺貴子、船岡祐介、井津井康浩、陳正新、脇田隆宇、渡辺守、細胞障害性 HCV-JFH1 subclone の単離と機能解析、第 45 回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、(2009, 6.4-5)、ワークショップ 3「C 型肝炎の基礎と臨床」
 67. 脇田隆宇、肝炎ウイルス基礎研究、第 45 回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、(2009, 6.4-5)、ハイライトレクチャー
 68. 鈴木哲朗、脇田隆宇、C 型肝炎ウイルスの感染粒子形成機構、第 13 回日本肝臓学会大会、国立京都国際会館、(2009, 10.14-16)、パネルディスカッション 13「肝炎ウイルス研究の新展開-新しい治療戦略を目指して」
 69. 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV 粒子形成に関する脂肪滴周辺膜蛋白の同定、日本ウイルス学会第 57 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)、ワークショップ 7 ウイルス粒子形成
 70. 石橋真理子、鶴田浩一、山口裕美、藤田順一、田中輝明、清水洋子、脇田隆宇、鈴木操、江角真理子、肝臓類洞内皮 C 型レクチン L-SIGN 発現系を用いた C 型肝炎ウイルス粒子 JFH1 の感染実験、日本ウイルス学会第 57 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
 71. 鈴木亮介、齋藤憲司、安東友美、石井孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 系を用いた NS2 蛋白質の感染性粒子形成における機能解析、日本ウイルス学会第 57 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
 72. 村上裕子、鈴木哲朗、脇田隆宇、深澤秀輔、C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) の作用、日本ウイルス学会第 57 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
 73. 勝二郁夫、阿部克俊、村上恭子、鈴木哲朗、脇田隆宇、宮村達男、小池和彦、堀田博、C 型肝炎ウイルス増殖における宿主因子 hnRNP H1/H2/F の役割、日本ウイルス学会第 57 回学術集会、都市センターホテル(2008, 10.25-27)
 74. 村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、加藤孝宣、鈴木哲朗、豊田哲也、脇田隆宇、C 型肝炎ウイルスの複製増殖に関するウイルス遺伝子変異および遺伝子構造の解析、日本ウイルス学

- 会第57回学術集会、都市センターホテル (2008, 10.25-27)
75. 山本真民、相崎英樹、宮村達男、濱野國勝、脇田隆宇、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルス粒子形成、感染性に重要なコレステロール構造の解析、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
76. 勝二郁夫、阿部克俊、村上恭子、鈴木哲朗、脇田隆宇、宮村達男、小池和彦、堀田博、C型肝炎ウイルス増殖における宿主因子 hnRNP H1/H2/F の役割、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
77. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、宮村達男、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV NS5A 蛋白のリン酸化に關与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
78. 村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、加藤孝宣、鈴木哲朗、豊田哲也、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの複製増殖に關与するウイルス遺伝子変異および遺伝子構造の解析、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル (2009, 10.25-27)
79. Mohsan Saeed、加藤孝宣、脇田隆宇、In vitro behavior of hepatitis C virus JFH-1 strain with mutations emerged after passage in chimpanzees、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
80. 渡邊則幸、相崎英樹、松浦知和、脇田隆宇、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルス subgenomic replicon RNA を複製するヒト星細胞株の樹立、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
81. 谷田以誠、深澤征義、脇田隆宇、花田賢太郎、オートファジーは HCV 粒子産生に關与している、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
82. 木村敬郎、鈴木亮介、山越智、鈴木健裕、堂前直、勝二郁夫、松浦善治、千葉丈、脇田隆宇、鈴木哲朗、Prohibitin2 はC型肝炎ウイルス (HCV) NS5A 蛋白と相互作用し HCV 複製調節に働く、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
83. 村上裕子、赤澤大輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、深澤秀輔、C型肝炎ウイルス (HCV) に対する SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) の作用、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル (2009, 10.25-27)
84. ススムエー、伊達朋子、朝長充則、脇田隆宇、鈴木哲朗、Generation of Hepatitis C virus NS3 mutations conferring resistance to the viral protease inhibitor by serial virus passage、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)

G. 知的所有権の出願・登録状況

特許出願

1. 「新規アンチセンス RNA ステム・ループ」
発明者：原田和雄、鈴木哲朗、脇田隆宇、平尾一郎、野澤 巖
出願者：タグシクスバイオ
平成22年2月5日 (特願2010-023781)
2. 「HBs ペプチド融合体」上田啓次 (申請中)
(特願2008-063642)
3. 「C型肝炎ウイルスの宿主細胞への侵入阻害剤およびこれを含有する医薬組成物」(特願2009-046898、平成21(2009)年2月27日)
4. 「新規 HCV エントリー阻害剤」(特願2008-300937、平成20(2008)年11月26日)
5. 「C型肝炎ウイルス阻害剤」(特願2008-115873、平成20(2008)年4月25日)
6. 「新規 HCV エントリー阻害剤」(特願2008-33598、平成20(2008)年2月14日)

II. 分担研究報告

肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発の総括

研究代表者 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

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法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を開発する。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を探索する。

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。

B. 研究方法

1. HCV 感染力価評価系の構築

poly-D-lysine をコートした 96well plate に Huh7.5.1 細胞を培養し (6.7×10^3 cells/well)、翌日 J6/JFH-1 ウイルスを感染させた。感染4日後にメタノール固定し、抗ウイルス抗体を反応させ、QuantBlu により蛍光強度を検出した。

2. 新規抗 HCV 薬候補の抗ウイルス活性

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。

3. 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。

（倫理面への配慮）

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報等を厳格に管理保存す

る。

C. 研究結果

1. HCV 感染力価評価系の構築

感染力価を薬物のスクリーニングにも使用できる簡便なアッセイで測定できることを目指した。アッセイは 96 well plate に播種した Huh7.5.1 細胞に段階希釈したウイルスを感染させ、感染細胞を検出して TCID50 を算定する。これまで、免疫蛍光染色法により目視で感染細胞を確認してきたが、酵素抗体法により感染細胞が存在する well の同定を試みた。少ない感染細胞を検出するために感度を上げる必要がある。そのため、QuantBlu により蛍光強度を検出した。HCV コア抗原測定キットに付属する標識抗コア抗体と、コア抗原の免疫により取得した 11 種の抗コアモノクローナル抗体を使用した。その結果、HCV コア抗原測定キットに付属する標識抗コア抗体を使用した場合、最も目視に近い感染価が得られた。しかし、モノクローナル抗体も 11 種類中 5 種類はアッセイに使用可能であることが明らかとなった。現在精製モノクローナル抗体を直接標識してアッセイに使用することで、アッセイの簡便化と感度向上を試みている。

ウイルス抗原測定系やウイルスゲノム RNA 測定系と異なり、感染力価測定はバイオアッセイであるため測定方法が複雑であり、時間と人手がかかる。この感染力価評価系により、感染価を指標として抗ウイルス薬のスクリーニングが可能となることが期待できる。

2. 新規抗 HCV 薬候補の抗ウイルス活性

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 μ 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。

3. 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。

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 年に申請者らが世界に先駆けて 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。

今年度は HCV 感染力価評価系の構築を行った。これまで、ウイルス蛋白質の培養上清中への分泌やウイルス複製などをマーカーとして抗ウイルス薬のスクリーニングを進めてきたが、簡便に HCV 感染力価を測定可能となり、感染性そのものを指標としたアッセイが可能となった。また、抗 NS4A 阻害剤の解析により新たな作用標的として NS4A を介した NS3 ヘリカーゼ活性阻害を見いだした。宿主因子である CKB と NS4A の結合を阻害することでこの効果は得られた。現在前臨床および臨床試験が進行している、プロテアーゼ阻害剤やポリメラーゼ阻害剤はウイルス蛋白質を直接標的としているため、薬剤耐性の出現が問題となる可能性が高い。宿主因子とウイルス因子の会合を阻害する薬剤は耐性回避の点からも可能性がある。さらに、新規 HCV 培養系の開発においては遺伝子型 1b の Con1 株を用いて感染性ウイルス粒子の産生に成功したが、ウイルスの産生効率、感染性の点からは改善の余地がある。持続感染可能なウイルス株樹立が求められる。

E. 結論

1. HCV 感染力価評価系を構築し、十分な感度を得ることができた。
2. 抗 NS4A 薬の抗 HCV 活性を確認した。NS4A と CKB の結合を阻害することにより NS3 ヘリカーゼ活性を低下させることが明らかとなった。
3. 新規 HCV 培養系の開発で遺伝子型 1b の感染性ウイルスの作成に成功したが、持続的な感染には至らなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.

3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.

12. 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.
2. 学会発表および講演など
1. 脇田隆宇, HCVの複製と粒子形成、平成21年度 遺伝子病制御研究所 研究集会、北海道大学遺伝子病制御研究所 (2010, 1.18-19)
 2. 相崎英樹、脇田隆宇、感染性HCV粒子形成における宿主生体膜の役割、第45回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、(2009, 6.4-5)、シンポジウム1「C型慢性肝炎における宿主とウイルスのinteraction」
 3. 加藤孝宣、伊達朋子、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの生体内での感染様式と培養細胞での増殖能、第45回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、(2009, 6.4-5)、ワークショップ3「C型肝炎の基礎と臨床」
 4. 三島果子、坂本直哉、箆島裕子、中川美奈、田坂めぐみ、櫻井幸、須田剛生、小貫優子、山本満千、渡辺貴子、船岡祐介、井津井康浩、陳正新、脇田隆宇、渡辺守、細胞障害性HCV-JFH1 subcloneの単離と機能解析、第45回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、(2009, 6.4-5)、ワークショップ3「C型肝炎の基礎と臨床」
 5. 脇田隆宇、肝炎ウイルス基礎研究、第45回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、(2009, 6.4-5)、ハイライトレクチャー
 6. 鈴木哲朗、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの感染粒子形成機構、第13回日本肝臓学会大会、国立京都国際会館、(2009, 10.14-16)、パネルディスカッション13「肝炎ウイルス研究の新展開-新しい治療戦略を目指して」
 7. 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)、ワークショップ7 ウイルス粒子形成
 8. 石橋真理子、鶴田浩一、山口裕美、藤田順一、田中輝明、清水洋子、脇田隆宇、鈴木操、江角真理子、肝臓類洞内皮C型レクチンL-SIGN発現系を用いたC型肝炎ウイルス粒子JFH1の感染実験、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
 9. 鈴木亮介、斎藤憲司、安東友美、石井孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルスのtrans-packaging系を用いたNS2蛋白質の感染性粒子形成における機能解析、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
 10. 村上裕子、鈴木哲朗、脇田隆宇、深澤秀輔、C型肝炎ウイルス(HCV)に対するSERM(Selective Estrogen Receptor Modulator)の作用、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
 11. 勝二郁夫、阿部克俊、村上恭子、鈴木哲朗、脇田隆宇、宮村達男、小池和彦、堀田博、C型肝炎ウイルス増殖における宿主因子hnRNP H1/H2/Fの役割、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2008, 10.25-27)
 12. 村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、加藤孝宣、鈴木哲朗、豊田哲也、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの複製増殖に関与するウイルス遺伝子変異および遺伝子構造の解析、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2008, 10.25-27)
 13. 村山麻子、加藤孝宣、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの複製増殖に関与するウイルス遺伝子領域の検討、第45回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、(2009, 6.4-5)
 14. 山本真民、相崎英樹、宮村達男、濱野國勝、脇田隆宇、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルス粒子形成、感染性に重要なコレステロール構造の解析、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
 15. 勝二郁夫、阿部克俊、村上恭子、鈴木哲朗、脇田隆宇、宮村達男、小池和彦、堀田博、C型肝炎ウイルス増殖における宿主因子hnRNP H1/H2/Fの役割、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
 16. 久島透嘉、脇田隆宇、土方誠、coreの変異体を用いたC型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市セン

- ターホテル(2009, 10. 25-27)
17. 黒木美沙緒、有海康雄、池田正徳、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宜之、癌抑制遺伝子 PML は HCV 粒子産生に必要である、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)
 18. 有海康雄、黒木美沙緒、牧正敏、池田正徳、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宜之、ESCRT 小胞輸送系の HCV 産生への関与、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)
 19. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、宮村達男、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV NS5A 蛋白のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)
 20. 村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、加藤孝宣、鈴木哲朗、豊田哲也、脇田隆宇、C 型肝炎ウイルスの複製増殖に関与するウイルス遺伝子変異および遺伝子構造の解析、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)
 21. Mohsan Saeed、加藤孝宣、脇田隆宇、In vitro behavior of hepatitis C virus JFH-1 strain with mutations emerged after passage in chimpanzees、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)
 22. 渡邊則幸、相崎英樹、松浦知和、脇田隆宇、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルス subgenomic replicon RNA を複製するヒト星細胞株の樹立、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)
 23. 谷田以誠、深澤征義、脇田隆宇、花田賢太郎、オートファジーは HCV 粒子産生に関与している、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)
 24. 木村敬郎、鈴木亮介、山越智、鈴木健裕、堂前直、勝二郁夫、松浦善治、千葉丈、脇田隆宇、鈴木哲朗、Prohibitin2 は C 型肝炎ウイルス (HCV) NS5A 蛋白と相互作用し HCV 複製調節に働く、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)
 25. 河合良成、池田正徳、矢野雅彦、阿部健一、西村剛、團迫浩方、有海康雄、脇田隆宇、山本和秀、加藤宜之、抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略-Teprenone は Statin のグラニルグラニル化阻害を増強し HCV 複製抑制効果を増強する、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)
 26. 村上裕子、赤澤大輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、深澤秀輔、C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) の作用、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)
 27. スムエー、伊達朋子、朝長充則、脇田隆宇、鈴木哲朗、Generation of Hepatitis C virus NS3 mutations conferring resistance to the viral protease inhibitor by serial virus passage、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)
 28. 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)
 29. 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 (2009, 10. 3-7)
 30. I Shoji, K Abe, K Murakami, K Ishii, T Suzuki, T Wakita, T Miyamura, K Koike, H Hotta, The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein, Nice, France (2009, 10. 3-7)
 31. N Watanabe, H Aizaki, T Matsuura, T Wakita, T Suzuki, HCV subgenomic replicon replication in human hepatic stellate cell lines, Nice, France (2009, 10. 3-7)
 32. Y ARIUMI, M KUROKI, M MAKI, M IKEDA, H OANSKO, T Wakita, N KATO, THE ESCRT PATHWAY IS REQUIRED FOR HCV PRODUCTION, Nice, France (2009, 10. 3-7)

33. A CARPENTIER, P PODEVIN, V PENE, L AOUJJEHANE, M CARRIERE, S ZAIDI, C HERNANDEZ, JF MERITET, O SCATTON, M DREUX, F COSSET, R BARTENSCHLAGER, T WAKITA, F CONTI, Y CALMUS, AR ROSENBERG, HCV GROWN IN PRIMARY HUMAN HEPATOCYTES HAS HIGHER SPECIFIC INFECTIVITY AND LOWER BUOYANT DENSITY THAN HCV GROWN IN HUH-7 CELL LINE, 16th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Nice, France (2009, 10. 3-7)
34. M FUKASAWA, Y SHIRASAGO, K HANADA, T SUZUKI, T WAKITA, M NISHIJIMA, ISOLATION OF HUH7. 5. 1 CELL MUTANTS RESISTANT TO HEPATITIS C VIRUS INFECTION, Nice, France (2009, 10. 3-7)
35. K MACHIDA, I LIU, L DUAN, Y KONDO, S FOUNG, T WAKITA, JH OU, M LAI, LYMPHOTROPISM OF HEPATITIS C VIRUS IS GENETICALLY DETERMINED WITH IDENTIFICATION OF IMMUNE CELL-SPECIFIC BINDING FACTOR, Nice, France (2009, 10. 3-7)
36. M KUROKI, Y ARIUMI, M IKEDA, H DANSAKO, T WAKITA, N KATO, THE PML TUMOR SUPPRESSOR PROTEIN IS REQUIRED FOR HCV PRODUCTION, Nice, France (2009, 10. 3-7)
37. T MASAKI, S MATSUNAGA, H TAKAHASHI, T KATO, T MIYAMURA, Y ENDO, T SAWASAKI, T WAKITA, T SUZUKI, IDENTIFICATION OF NOVEL SERINE/THREONINE PROTEIN KINASES RESPONSIBLE FOR HCV NSSA PHOSPHORYLATION, Nice, France (2009, 10. 3-7)
38. M SAEED, T KATO, Y CHOI, K KRAWCZYNSKI, J LIANG, T WAKITA, IN VITRO BEHAVIOR OF HEPATITIS C VIRUS JFH-1 STRAINS WITH MUTATIONS EMERGED AFTER PASSAGE IN CHIMPANZEES, Nice, France (2009, 10. 3-7)
39. A SAULNIER, G GROULT, D GHIBAUDO, T WAKITA, L COHEN, C MARNATA, A MARTIN, ANALYSIS OF PARTICLE ASSEMBLY FROM CHIMERIC HCV JFH-1 GENOMES EXPRESSING E1-E2- p13 OF GB VIRUS B, Nice, France (2009, 10. 3-7)
40. R SUZUKI, K SAITO, T ANDO, K ISHII, Y MATSUURA, T MIYAMURA, T WAKITA, T SUZUKI, PLASMID-BASED PRODUCTION OF TRANS-COMPLEMENTED HCV PARTICLES: ITS USE FOR FUNCTIONAL ANALYSIS OF NS2, Nice, France (2009, 10. 3-7)
41. N ARNAUD, S DABO, P MAILLARD, A BUDKOWSKA, D GARCIN, A GATIGNOL, T WAKITA, E MEURS, HCV INDUCES IFN AT THE EARLY STEPS OF INFECTION, Nice, France (2009, 10. 3-7)
42. Y CHOI, T KATO, T WAKITA, TJ LIANG, K KRAWCZYNSKI, DYNAMIC PROFILE OF GENE EXPRESSION IN THE LIVER DURING HEPATITIS C VIRUS (HCV) JFH1 INFECTION IN CHIMPANZEES, Nice, France (2009, 10. 3-7)
43. Y KAWAI, M IKEDA, M YANO, KI ABE, G NISHIMURA, H DANSAKO, Y ARIUMI, T WAKITA, K YAMAMOTO, N KATO, ANTI-ULCER AGENT, TEPRENONE, ENHANCED STATIN'S ANTI-HCV ACTIVITY BY AUGMENTING THE INHIBITION OF GERANYLGERANYLATION, Nice, France (2009, 10. 3-7)
44. AG ANGUS, D DALRYMPLE, S BOULANT, D MCGIVERN, R ADAIR, AM OWSIANKA, P TARGETT-ADAM, T WAKITA, J MCLAUCHLAN, SM LEMON, AH PATEL, THE REQUIREMENT OF DDX3 FOR HCV REPLICATION IS UNRELATED TO ITS INTERACTION WITH THE VIRAL CORE PROTEIN, Nice, France (2009, 10. 3-7)
45. A MURAYAMA, L WENG, T DATE, D AKAZAWA, T SUZUKI, T KATO, T TOYODA, T WAKITA, SPECIFIC RNA STRUCTURES AND MUTATIONS IMPLICATED FOR HCV RNA REPLICATION AND VIRUS PARTICLE FORMATION IN CULTURED CELLS, Nice, France (2009, 10. 3-7)
46. S SERONELLO, C ITO, T WAKITA, J CHOI, ETHANOL ENHANCES HEPATITIS CVIRUS REPLICATION THROUGH ACETALDEHYDE, NADH/NAD+, AND HOST LIPID METABOLISM, Nice, France (2009, 10. 3-7)

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

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

研究分担者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

研究要旨 ヒト不死化肝細胞を用いて C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染増殖を高効率で再現する培養細胞実験系の開発を独自におこなってきた。いろいろな患者血液由来の天然 HCV の感染、複製、感染性粒子産生といった生活環を中空系による簡便な立体培養法を用いてこの細胞を培養することで再現できるようになった。同じ細胞を平面培養した場合と比較してこの立体培養が細胞に与える影響の相違を調べることで HCV の生活環に機能的な役割を果たす細胞側の因子が明らかになる可能性を考え、立体培養下で発現が変化する遺伝子をマイクロアレイ法によって解析した。その結果、プロスタグランジン D 合成酵素遺伝子の発現が誘導され、逆にプロスタグランジン I 合成酵素遺伝子の発現は抑制される傾向が認められた。そこでこれらプロスタグランジン産生に重要なシクロオキシゲナーゼ (COX) 1 および 2 に対する阻害剤を用いて、組換え体 HCV 複製および粒子産生培養細胞におけるその効果を検討した。誘導型酵素である COX2 の阻害剤は HCV の複製や粒子産生になんの効果も示さなかったが、恒常発現型である COX1 の阻害剤は感染性 HCV 粒子産生に抑制的な効果を示した。各種プロスタグランジンの受容体に対するアゴニストでこの細胞を処理した結果、粒子産生に影響を与えるものがあった。以上の結果から、アラキドン酸カスケードが HCV の感染性粒子産生の制御に関連しており、このカスケード中に抗 HCV 薬の標的になるものが含まれることが示唆された。

A. 研究目的

独自に樹立した不死化肝細胞を用いて、患者血液由来の天然型 C 型肝炎ウイルスが効率良く感染増殖する新たな細胞培養系を構築した。この培養系を用いて HCV の感染増殖機構を解析することにより、このウイルスの感染増殖に関わる細胞側因子の詳細を明らかにして、これを効果的に抑制させることによる抗 HCV 戦略構築を目指した。

B. 研究方法

1. これまでに樹立しているヒト不死化肝細胞は通常の平面培養と比較して、立体培養することにより種々の患者血清由来 HCV の感染増殖を効率良くおこなうことが可能だった。そこでマイクロアレイ法を用いて通常培養を対照として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、立体培養法によってその発現が変化する細胞の遺伝子を検索し、その変化を引き起こす細胞内シグナル系の同定をおこなった。

2. 上記で得られた種々の細胞内シグナルを低分子化合物などで修飾することにより、そのシグナル系と HCV の感染増殖そして粒子産生との関連について検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト初代培養肝細胞は、京都大学附属病院移植外科においておこなわれた先天性代謝異常症患者への生体肝臓移植において切除された患者肝臓組織を用いて作成されたものである。この研究はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認されたものである。肝臓や血液提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

1. マイクロアレイ法を用いて、不死化肝細胞を中空系立体培養した場合、通常の培養皿により培養し

た場合に比較してどのような遺伝子発現が変化しているかを解析したところ、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ていることが見出された。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。

2. マイクロアレイ解析の結果は RT-PCR 法によって確認された。
3. COX1 阻害剤を組換え体 HCV (JFH1) の増殖、感染性粒子産生系に添加してその効果を検討したところ、JFH1 のゲノム複製にはなんら変化を認めなかったが、感染性粒子の産生が抑制されることがわかった。
4. COX2 の阻害剤は JFH1 のゲノム複製と感染性粒子の産生ともになんら変化を与えなかった。
5. アラキドン酸カスケード内で 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。

D. 考察

1. 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。
2. 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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文

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.

2. 学会発表

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. 久島透嘉、脇田隆宇、土方誠：coreの変異体を用いたC型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析、第57回日本ウイルス学会学術総会、平成21年10月26日、東京 2009
4. 阿部雄一、脇田隆宇、土方誠：ケミカルバイオロジー手法を用いたC型肝炎ウイルス感染性粒子形成機構解明の試み、第32回日本分子生物学会年会、平成21年12月9-12日、横浜 2009
5. 筒井智恵子、アリ・ハッサン・フセイン・久島透嘉、土方誠：C型肝炎ウイルスを抑制する転写因子 IRF7 の肝特異的発現制御機構の解析、第32回日本分子生物学会年会、平成21年12月9-12日、横浜 2009
6. 招待講演) 土方 誠：血液由来 HCV の感染増殖を再現する新しい培養細胞系の構築、第18回広島肝臓研究会 平成21年11月6日、広島 2009

G. 知的所有権取得状況

1. 特許取得 特になし。
2. 実用新案登録 特になし。
3. その他 特になし。

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～

研究分担者 田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学

研究要旨 培養細胞株は 3 次元化して培養し組織化させることでその性質が変化することが知られている。近年、ナノレベルの超微細加工が施された培養プレートにより、細胞はスフェロイドを形成し 3 次元化することで組織様の形質を発現するといわれている。我々はこのプレートを利用することで不死化ヒト肝細胞株がスフェロイドを形成することを確認した。次に、このスフェロイドに HBV が感染可能かどうかを検討した。感染源として HBV 感染患者血清と培養細胞から調整した HBV を用い、 10^5 copies/well となるように各ウェルに投与することにより感染実験を行った。投与 9 日目まで観察を行ったところ、HBs、HBc、HBV core 関連抗原の産生が培養上清中に確認でき、感染の成立が伺えた。今後、効率の良い HBV 感染系の確立を目指して、細胞株や培養条件などを検討する。

共同研究者氏名

溝上雅史、杉山真也、日下部篤宣

A. 研究目的

前年度に中空系に不死化ヒト肝細胞を充填した 3 次元培養系における B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染・複製の可能性について報告した。今回、この不死化ヒト肝細胞を用いた新たな 3 次元培養系の検討と HBV 感染・複製実験の可能性について検討した。

B. 研究方法

- 1) 特殊なナノレベルの加工を底面に施した培養プレートを用いて 3 次元培養系を作成した。
- 2) 3 次元培養系に対する感染源としては、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ならびに患者血清を用いた。
- 3) 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。

C. 研究結果

- 1) 本研究で用いた不死化ヒト肝細胞は特殊加工の培養プレートを用いた培養においてスフェロイドを形成し、3 次元化することができた。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。
- 2) スフェロイド形成による 3 次元培養系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。

D. 考察

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。

E. 結語

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。

F. 研究発表

論文発表

1. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol Res.* 2010. 40(1):14-30.
2. 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.
3. 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.

学会発表

1. 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. オーラル.

- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

研究分担者 森石 恆司 大阪大学微生物病研究所 准教授

研究要旨 C型肝炎ウイルス(HCV)のキャプシド蛋白質であるコア蛋白質は、シグナルペプチダーゼによって切断された後、直下の膜貫通領域が更にシグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)によって切断され、成熟蛋白質として機能する。また、成熟したコア蛋白質は、宿主蛋白質 PA28 γ と相互作用し、肝癌、脂肪化、インスリン抵抗性を誘導する。本研究では、宿主蛋白質 PA28 γ による HCV の感染制御を解析した。PA28 γ 遺伝子発現をノックダウンすることによって、培養上清中のウイルス価は有為に低下したが、ウイルス複製には影響しなかった。また、PA28 γ の発現低下によってコア蛋白質のポリユビキチン化は上昇した。以上の結果から PA28 γ は、コア蛋白質のポリユビキチン化によるウイルス産生抑制を減弱させ、ウイルス粒子産生を正に制御していることが示唆された。

A. 研究目的

国内に約 200 万人もの感染者が推定されている C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染症は主に血液を介して感染し、高率に持続感染に移行する。感染者の病態は、慢性肝炎・肝硬変を経て肝細胞癌に至ることが知られており、本邦の約 8 割の肝癌は HCV 感染に起因するものと考えられている。現行のインターフェロン/リバビリンによる抗ウイルス療法は、先進国に多いウイルス遺伝子型 1 の HCV 感染者に対しては約 50% 程度の著効率であり、より有効な治療法の開発が求められている。

HCV はフラビウイルス科に属するプラス鎖 RNA ゲノムを持つウイルスである。そのプラス鎖 RNA ゲノムは単一のポリプロテイン前駆体をコードしており、そのポリプロテインは宿主およびウイルスプロテアーゼによって切断を受け、約 10 個のウイルス蛋白質に成熟する。キャプシド蛋白質である HCV コア蛋白質はポリプロテインのアミノ末端に位置し、始めにシグナルペプチダーゼによる切断を受け、その直後の C 末端膜貫通領域が SPP によって更に切断を受けて成熟する。また、宿主蛋白質 PA28 γ 存在下で、コア蛋白質は肝脂肪化、肝癌などの病原性発現を誘導し、PA28 γ 遺伝子を欠損させるとその病原性は失われることを我々は報告しており、PA28 γ が C 型肝炎の病態に関わっていることを明らかにしてきた。ま

た、前年度まで、SPP によるコア蛋白質膜内切断は、感染粒子産生において必須であることを報告した。また、E6AP によってコア蛋白質はユビキチン化され、プロテアソームによって分解される。E6AP によるコア蛋白質ユビキチン化はウイルス産生能を負に制御している事を既に明らかにしている。

本研究では PA28 γ とコア蛋白質の相互作用の感染粒子産生における意義を明らかにし、抗ウイルス剤標的因子として評価する目的で、PA28 γ ノックダウンによるウイルス産生および複製の変化を解析し、感染における PA28 γ の役割を解析した。

B. 研究方法

感染 24 時間前あるいは感染 24 時間後に、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を測定した。CFSE 染色および血球計算板により細胞数を測定した。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、ウイルス複製量をレプリコン RNA 量で評価した。E6AP 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 5 時間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ェスタンブローディングによって検出した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、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を必要とする材料は含まれない。

C. 研究結果

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 24 時間に、PA28 γ をノックダウンし、上清中のウイルス量を測定した。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 遺伝子型レプリコン細胞内のレプリコン細胞及び 2a 遺伝子型 JFH1 サブゲノムレプリコン細胞では、PA28 γ ノックダウンによってそれらレプリコン RNA 量に変化は全く認められなかった。

コア蛋白質のユビキチン化は、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、コア蛋白質のユビ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。

D. 考察

本研究により、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。

E. 結論

以上の結果から、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いるものと思われる。コア蛋白質との相互作用は、ウイルス感染に必要であることが示された。宿主プロテアソーム活性化蛋白質 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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Taguwa, S., H. Kambara, H. Omori, H. Tani, T. Abe, Y. Mori, T. Suzuki, T. Yoshimori, K. Moriishi, and Y. Matsuura. Chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J. Virol.* 83:10427-10436. 2009.
- 2 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.
- 3 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.

2. 学会発表

- 1 森石恆司、勝二郁夫、鈴木亮介、鈴木哲朗、松浦善治、HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25-27 日、東京
- 2 阿部隆之、要祐喜、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、

松浦善治、ヒアルロン酸による炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生と C 型肝炎の慢性化、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25-27 日、東京

- 3 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.
- 4 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.

- 5 Wen X, Abe T, Tagawa 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.

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

HCV-IRES 依存性タンパク翻訳に関わる宿主因子の同定と HCV 複製制御

研究分担者 本多 政夫 金沢大学医学部先端医療技術学 教授

研究要旨 C 型慢性肝炎に対するインターフェロン/リビリン併用治療が広く行われているが、依然として存在するインターフェロン治療抵抗性例に対して新たな治療法の開発が望まれる。我々はこれまでに、C 型肝炎ウイルス(HCV)の蛋白翻訳は宿主因子の発現に強く依存していることを報告した (Gastroenterology,128: p449. 2005)。今回、それらの宿主因子が HCV 増殖に伴いどのように発現調節されるか、さらには、細胞増殖や不死化とどのように関連するかを検討した。興味深い事に La protein は JFH-1 複製に伴って約 3 倍の発現増加し他の蛋白翻訳因子 PTB, PSMA7, eIF2gamma,PCBP2 に関しても JFH-1 複製により 1.5-5 倍の発現増加が認められた。興味深い事に JFH-1 複製により hTERT 活性の有意な上昇が認められ、shRNA による La protein の発現抑制により JFH-1 の複製と hTERT 活性が有意に抑制された。C 型慢性肝炎 40 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 複製及びテロメレース複合体との密接な関連が示唆された。

A. 研究目的

C 型慢性肝炎に対するインターフェロン/リビリン併用治療が広く行われているが、依然として存在するインターフェロン治療抵抗性例に対して新たな治療法の開発が望まれる。我々はこれまでに、C 型肝炎ウイルス (HCV) の蛋白翻訳は宿主因子の発現に強く依存していることを報告した (Gastroenterology, 128: p449. 2005)。今回、それらの宿主因子が HCV 増殖に伴いどのように発現調節されるか、さらには、細胞増殖や不死化とどのように関連するかを検討した。

B. 研究方法

Huh7.5 細胞に JFH-1 感染クローン、複製不能クローン(JFH-1/GND)、皮膜領域を欠損した感染不能クローン(JFH-1/ Δ E1E2) 及び HCV-IRES の stem-loopIV 変異体 (338 番目 A から U に変異導入) 翻訳不能クローン(JFH-338U)を作成し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。テロメレース活性は TRAP assay にて評価した。テロメレース (hTERT)、テロメレース RNA (hTR) 及びテロメレース複合体を形成する HSP90、p23 の発現を RTD-PCR 法にて評価した。

C. 研究結果

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 は明らかな複製を認めなかった。興味深い事に 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 では明らかな発現増加を認めなかった。他の蛋白翻訳因子 PTB, PSMA7, eIF2gamma, PCBP2 に関しても JFH-1 複製により 1.5-5 倍の発現増加が認められた。興味深い事に JFH-1 複製により hTERT 活性の有意な上昇が認められ、shRNA による La protein の発現抑制により JFH-1 の複製と hTERT 活性が有意に抑制された。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 複製及びテロメレース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。