

200933004B

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19～21年度 総合研究報告書

研究代表者 脇田 隆宇

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19～21年度 総合研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成22(2010)年 3月

目 次

I. 総合研究報告

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
協田 隆宇	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	55
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別冊	75
------------------------	----

I . 総合研究報告

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 隆宇 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。本研究によりHCVとHBVの実験系の開発、ウイルス生活環の解明による新たな治療標的の同定、抗ウイルス薬候補のスクリーニングが進んだ。本研究をさらに進めるとともに、新規抗ウイルス候補薬の前臨床試験および臨床開発へ導入する枠組みを構築することが重要と考えられる。

研究分担者 土方 誠
京都大学ウイルス研究所 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 森石恒司
大阪大学微生物研究所 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 原田和雄
東京学芸大学 准教授

研究分担者 坂本直哉
東京医科歯科大学 准教授

研究分担者 武部 豊
国立感染症研究所 室長

研究分担者 池田正徳
岡山大学大学院 准教授

研究分担者 竹原徹郎
大阪大学大学院 准教授

研究分担者 加藤孝宣
国立感染症研究所 室長

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る、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。3年間の研究により、HBVおよびHC

Vの新たな実験方法が確立され、ウイルスの生活環が詳細に解明された。その結果、新たな抗ウイルス療法の標的が同定された。さらに、抗ウイルス薬のスクリーニングも行われ、多くの候補化合物が同定された。今後は本研究で進行中の研究をさらに進めるとともに、同定した治療標的に対する薬物スクリーニングの実施、新規抗ウイルス薬候補の前臨床試験および臨床開発への導入を進める必要がある。

B. 研究方法

1. 肝炎ウイルスの新規感染モデルの開発

1) ヒト不死化肝細胞の培養用中空糸中による立体培養。HCV 感染性の評価。マイクロアレイ法による遺伝子発現解析。

2) 中空糸に初代肝細胞や不死化細胞を詰めた3次元培養系の作成。培養上清中のHBV-DNA, HBs 抗原、細胞内 cccDNA (複製中間体) を測定し、HBV 感染・複製を確認した。抗体による感染防御実験。

3) 特殊ナノレベル加工培養プレートによるHBV3次元培養系。

2. HCV増殖機構の解析と新規治療法の開発

1) HCV コア蛋白質を付加し、293T 細胞に発現して精製し、SDS-PAGE で泳動後、ゲル内消化物をMALDI TOF-MS/MS にかけて、ペプチドのアミノ酸配列を決定した。SPP 抑制剤によるコア蛋白質の細胞画分およびSPPによる切断への影響を持続感染している細胞を用いて解析した。

2) コア蛋白質の野性型およびI1e176, Phe177をAla、Leuに置換した変異体(コア蛋白質AL)のアミノ末端にFLAG エピトープタグを付加し、293T 細胞に発現して、Triton X-100 で溶解した後、密度勾配遠心法によってコア蛋白質を分画した。また、JFH1 が持続感染しているHuh7.5.1 細胞にSPP 抑制剤L685458 を培養上清中に加えて、感染持続細胞におけるコア蛋白質の画分を上記方法で解析した。RNA polymerase I 制御下で全長JFH1 RNA が転写されるpHH21/JFH1 およびコア蛋白質AL 変異をもつpHH21/JFH1/AL をHuh7.5.1 に導入し、上清中のウイルスRNA 量およびコア蛋白質量を測定した。さらに、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、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。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。

3) HCV の蛋白翻訳因子であるLa protein, PTB, eIF3 p170, PSMA7, eIF2gamma 及びHCV 蛋白翻訳を制御するinternal ribosome entry site (IRES) に対するsiRNA を用い、Subgenomic HCV replicon の複製をRTD-PCR 法にて検討した。さらにJFH-1 の複製をRTD-PCR 法及びコア蛋白の発現にて評価した。また肝組織におけるHCV 蛋白翻訳因子の発現を正常肝9例、C型慢性肝炎40例の肝組織を用いて検討した。

4) JFH-1 のIRES 構造のstem-loop IV に一塩基置換(339A \rightarrow U)を導入し蛋白翻訳を阻害するクローンJFH-1 339U を作成した。La protein の発現抑制を目的として、La protein に対するショートヘアピンRNA(shRNA)をデザインし、shRNA 組み替えアデノウイルスを作成した。JFH-1 感染に伴うLa protein の発現変動はリアルタイムPCR (RTD-PCR) 及びウエスタンブロット法にて行った。

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。テロメレース活性はTRAP assay にて評価した。

5) SL2 結合ペプチドによるレプリコンRNA 複製阻害の評価。アンチターミネーション・システムを用いたSL2 RNA とペプチドとの相互作用の解析。蛍光偏光度測定によるSL2 RNA と#3d001 ペプチドとの相互作用の解析。ゲルシフト法によるSL2 と5BSL3.2 RNA との相互作用の解析。RNA ステム・ループによるレプリコンRNA 複製阻害の評価。

SL2 RNA と#3d001 ペプチドの結合様式を、SL2 RNA のループおよびステム上部の塩基を種々置換した変異体を作成し、アンチターミネーション・システム

を用いて解析した。標的 RNA である HCV IRES の IIIe、IIIIf、および IIIef を持つカナマイシン耐性 pACK レポーター・プラズミドを作製し、アンチターミネーション・システムを用いた HCV IRES IIIe および IIIIf 結合ペプチドをスクリーニングした。HCV IRES IIIe および IIIIf 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 IIIIf 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。

6) 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) シクロスポリン A の HCV 増殖抑制効果の解析から特定された分子シャペロン蛋白であるシクロフィリン蛋白の機能・HCV 複製増殖への関与を解明するため、シクロフィリン A、B および C に結合するウイルス・宿主蛋白を mammalian two-hybrid 法、及び bacterial two-hybrid 法にてスクリーニングをおこなった。

2) 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。

3) JFH-1 株感染クローンをを用いた GFP 挿入ウイルスを作製した。サブジェノミックレプリコンシステムによる GFP 挿入可能部位を同定し、効率の良い GFP 挿入ウイルス作製のためのコンストラクトを検討した。NS5a 領域に GFP を挿入したコンストラクトの RNA を Huh7.5.1 細胞に導入し、長期に培養することにより、そのウイルス増殖能と GFP をもったウイルスの安定性を検討した。GFP 挿入ウイルス感染増殖細胞の比率は FACS を用いた解析により同定した。

また野生型 JFH-1 株を Huh7.5.1 細胞に導入し、長期培養することにより得られた適応変異を GFP 挿入ウイルスに導入し、そのウイルス生成効率と感染性に与える影響を検討した。

全長レプリコン型 JFH-1 構築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) HBV genotype による感染・複製の違いを検討した。

2) ラミブジン (LAM) 投与中に耐性変異が出現した 44 例の耐性出現後の血清を解析した。LAM 耐性をきたし ADV 追加投与を施行した B 型慢性肝炎 30 例を対象として、ADV 投与前に採取した血清サンプルを用いて、直接シーケンス法にて HBV 全長の塩基配列解析を行い、ADV 治療感受性に影響を与える HBV 変異を網羅的に検討した。

3) HBV pseudotype 作製の試みとレセプターの分離・同定 : 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) 薬剤ライブラリーによる抗 HCV 薬を探索した。HCV レプリコン系・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た。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、漢方生薬・抽出精製化合物の抗 HCV 活性を high-throughput screening にて検索した。

さらに、多様性指向低分子化合物ライブラリー (8,000 化合物)、天然物誘導体ライブラリー (3,000 化合物) を用いて HCV 阻害剤のスクリーニングを行った。また、alpha-グリコシダーゼの活性中心の構造情報を利用した molecular docking 法によって virtual library から選択された約 30 種の化合物の HCV 阻害効果を評価した。Huh7.5.1 細胞 (1×10^4 細胞/well) を培養し、およそ 24 時間後、試験化合物を添加し、HCV を感染させた。感染から 72 時間後の培養上清中の HCV コアタンパク質量を定量した。

2) HCV-0 株 (遺伝子型 1b) 由来の全長 HCV RNA 複製細胞 (OR6 細胞) を用いて栄養成分の HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討した。本年度は β -カロテン (BC)、ビタミン D2 (VD2)、多価不飽和脂肪酸 (LA)、アラキドン酸 (AA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、CsA、IFN- γ 、フルバスタチン (FLV)、ピタバスタチン (PTV) を単独あるいは MEK 阻害剤である U0126 と併用して 24 時間前に 2×10^4 個の OR6 細胞を播種した 24 well plate に処理し、72 時間培養した。細胞を回収してレニラルシフェラーゼ活性を測定した。

3) 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。

4) 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) ヒト不死化肝細胞を中空糸培養法により培養すると、天然型 HCV の感染は簡便に解析可能であった。インターフェロンなどの抗 HCV 作用も簡便に評価できた。感染後培養液を濃縮し、非感染細胞に加えることで二次感染が成立する患者血清もあった。中空糸立体培養による遺伝子発現を解析すると、PPARalpha シグナルの下流遺伝子群の発現上昇が認められた。PPARalpha に対するアゴニストであるフェノフィブレートやアンタゴニストである MK886 で中空糸立体培養不死化肝細胞を処理すると、HCV の増殖をそれぞれ亢進そして抑制した。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

2) 初代肝細胞及び不死化細胞の 3 次元培養系で組織形成が見られた。アルブミン産生は、1 ヶ月以

上保たれた。この細胞に HBV を感染させると培養上清中の HBV-DNA 量は 10^7 copies/mL 以上検出され、約 1 ヶ月は持続した。培養上清中に HBs 抗原やコア蛋白が検出された。さらに細胞内 cccDNA が検出され、感染・複製が確認された。免疫染色により細胞内 HBs 抗原の発現を確認した。再感染実験により感染が確認され、培養上清中に感染性 HBV 完全粒子の存在が示唆された。

感染初期のウイルス動態の検討では、感染後経時的に培養上清中の HBV-DNA 量の増加を確認し、感染 3-6 時間後に peak に達し、そのまま 24 時間後まで plateau となった。長期培養の検討では、培養上清中の HBV-DNA 量は 10^5 copies/mL 以上検出され、約 1 ヶ月は持続した。培養上清中に HBs 抗原やコア関連抗原が検出された。細胞内の cccDNA を検出したことで、感染・複製を確認した。HBV ウイルス粒子を含む培養上清は 30mIU/mL (抗体量 約 $27.5 \mu\text{g/mL}$) 以上の HBIG 添加によりで培養上清中に HBV-DNA が検出されなくなった。

3) 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) コア蛋白質の C 末端同定を試みた。HCV コア蛋白質の Asp-N で消化される 160 番目 Asp から検出された断片は、DGVNYATGNLPGCSFSIF であった。従って、成熟コア蛋白質の C 末端は 177 番目の Phe であり、それより大きい断片は検出されなかった。この結果から、SPP によって切断される箇所は 177 番目の Phe と 178 番目の Leu の間であることが明らかとなった。SPP 活性を SPP 抑制剤で抑制した場合、コア蛋白質のほとんどが未成熟状態になり、界面活性剤抵抗性膜画分 (DRM) に分画されなくなった。持続感染している Huh7 細胞を SPP 抑制剤で処理するとコア蛋白質は未切断のものが多くなり、全く DRM に分画されなかった。

2) 成熟コア蛋白質の C 末端は 177 番目の Phe で

ある。Ile176 と Phe177 を変異させたコア蛋白質 AL は SPP によって切断を受けなくなる。コア蛋白質は SPP 切断を受けると、一部のコア蛋白質は界面活性剤抵抗性膜画分 (DRM) に分画された。しかし、コア蛋白質 AL は DRM に分画されなかった。HCV 持続感染細胞を SPP 抑制剤で処理するとコア蛋白質は未切断が多くなり、DRM に分画されなかった。この変異をウイルス遺伝子に導入すると培養上清中のウイルス産生が野生型と比べ著しく低下した。しかし、細胞内ウイルス複製への影響は認められなかった。

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 をノックダウンすると上清中のウイルス量が著しく低下した。また、PA28 γ ノックダウンによって細胞増殖が僅かではあるが抑制され、レプリコン細胞内のレプリコン RNA 量も低下した。

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。

3) *in vitro* HCV 蛋白翻訳は La protein, PTB, eIF3 p170, eIF2 γ の発現量依存性に増加したが、同じ IRES 依存性蛋白翻訳を有する EMCV 蛋白翻訳には変化は認められなかった。HCV replicon では、La protein, PTB, PSMA7, eIF2 γ の発現抑制は、薬剤耐性遺伝子と NS3 が EMCV-IRES で繋がれた定型レプリコン (MH14B) の複製には影響しなかったが、EMCV-IRES を HCV-IRES で置き換えたレプリコンの複製を著明に抑制した。したがって、HCV レプリコン複製は HCV 蛋白翻訳に強く依存していた。

JFH-1 用いた検討でも、La protein, PTB, PSMA7,

eIF2gamma の発現抑制により HCV の有意な複製抑制が認められた。また興味深いことに、JFH-1 の複製により La protein の有意な発現上昇が認められた。

一方、C 型慢性肝炎肝組織におけるこれらの宿主因子の発現を検討すると La protein, PSMA7, eIF2gamma は正常肝より C 型慢性肝炎肝組織で発現が誘導されており、肝組織の HCV-RNA と有意な相関を示した。

4) Huh7.5 細胞において JFH-1 339U は蛋白翻訳、複製 incompetent なクローンであり、JFH-1 のコントロールとして有用と考えられた。培養細胞における HCV の複製と La protein の発現の関連性について検討した。HCV-RNA の発現と La protein の発現は相関しており、HCV の発現増強に伴い、La protein の発現は RNA レベル、蛋白レベルで増強した。La protein 同様に、他の翻訳宿主因子である PTB, PSMA7, eIF2gamma, PCBP2 も JFH-1 の複製に伴って、発現の増強が認められた。また C 型慢性肝炎症例の肝組織におけるこれらの翻訳宿主因子発現と HCV-RNA 量は有意に相関していた。La protein に対するショートヘアピン RNA (shRNA) をデザインし、shRNA 組み替えアデノウイルス (Ad-shLa) を作成した。JFH-1 トランスフェクション後、Ad-shLa を用いて La protein の発現を抑制させると、JFH-1 発現は RNA レベル (50%)、蛋白レベル (30%) でともに減弱した。

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 倍に発現が増加した。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。

5) SL2 結合ペプチドのレプリコン RNA 複製阻害能を検討したが、#3d001 ペプチドによる HCV RNA の複製阻害効果は認められなかった。アンチターミネーション・システムにより SL2 RNA-#3d001 ペプチド相互作用を解析すると、#3d001 ペプチドと野生型 SL2 RNA との結合活性は +1 以下と大幅な低下が見られた。さらに蛍光偏光度測定による SL2 RNA と #3d001 ペプチドとの相互作用を解析すると、既知の HIV Rev ペプチドと RRE RNA との特異的な相互作用を観察することができたが、改変型の SL2T RNA と #3d001 ペプチドとの相互作用は検出できなかった。ゲルシフト法で SL2 と 5BSL3.2 RNA との相互作用を解析すると JFH-5BSL3, Con1-5BSL3 と野生型の SL2 の相互作用は特異的なものであった。しかし、RNA ステム・ループによるレプリコン RNA 複製阻害を評価したが、RNA ステム・ループのレプリコン RNA への特異的な結合による複製阻害は検出できなかった。

3' UTR X-tail の SL2 RNA が #3d001 ペプチドと結合する上で重要な塩基を同定した。ループの 1 番目と 4~6 番目の塩基は、他の塩基に置換できないこと、また、3 番目はプリン塩基であることが重要とわかった。ステムの中では最上部の closing base-pair の U 残基が重要であった。さらに SL2 は GNRA-like な構造を形成する可能性が示唆された。

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。

6) 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 単独では抑制が見られなかった。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) シクロフィリン A, B 及び C と HCV 構造・非行蛋白との分子間結合は確認されなかった。しかし、Bacterial two-hybrid 法によりシクロフィリンに結合する肝細胞内蛋白を網羅的に解析したところ、7 種の宿主蛋白が同定された。これらのうち Fumarylacetate hydroxylase の発現を siRNA により knock down したところ HCV レプリコンの発現が有意に低下した。

2) 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。

3) JFH-1 株感染クローンを用いた GFP 挿入ウイルスの作製を試みた。NS5a 領域 C 末端の遺伝子型 1b のレプリコンシステムで報告されている GFP 挿入可能部位二カ所と、さらにその C 末側一カ所の計三カ所に GFP を挿入したレポーターレプリコンを作製した。その結果、最も N 末側に GFP を挿入したレプリコンではほとんど増殖が認められなかった。他の

二つのコンストラクトでは増殖が可能であった。増殖可能であった二カ所の部位に GFP を挿入した JFH-1 株感染性クローンを作製し、Huh7.5.1 細胞に遺伝子導入し、GFP 挿入ウイルスの生成を検討した。その結果、遺伝子導入細胞中で GFP の発現を認め、GFP を持った HCV が増殖していると考えられた。さらにその培養上清を新たな Huh7.5.1 細胞に感染させたところ、感染細胞で HCV コア蛋白と GFP の発現を認め、GFP 遺伝子を持った HCV が培養上清中に分泌された。

JFH-1 株の NS5a 領域 C 末端に GFP を挿入したコンストラクトの全長 RNA を Huh7.5.1 細胞に導入し、約四週間の培養を行なった。培養上清の感染力価の上昇が観察された。しかし HCV コアが陽性の細胞の増加は認めるものの GFP が陰性の細胞の比率が徐々に増加し、Day 28 (Passage 7) では HCV コア陽性細胞中の GFP 陽性細胞の数は陰性細胞の数を下回っていた。ウイルスゲノム配列をダイレクトシーケンス法により検討すると GFP 挿入部位が欠失したウイルス株が出現していた。欠失部分は GFP のみでなく HCV ゲノムの NS5a の一部領域を含み欠失が起こっていた。

GFP 挿入ウイルスの長期培養では、細胞内適応変異を持ったウイルスが得られなかったため、JFH-1 株の長期培養により得られた適応変異を GFP 挿入ウイルスに導入することにより、このウイルスの生成効率と感染性に与える影響を検討した。JFH-1 株を約四週間培養することにより JFH-1 株よりも高い生成効率をもつウイルスが得られた。このウイルス株の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定したところ、E2・NS3・NS5b 領域にそれぞれ変異が同定された。これらの変異を一つずつ JFH-1 株に導入したところ、培養上清中の HCV RNA 量の増加が認められた。さらにすべての変異を導入すると、培養上清中の HCV RNA 量は 1 log 以上増加した。そこでこれらの変異を GFP 挿入 JFH-1 ウイルスに導入し、生成されたウイルスを感染させることにより GFP 陽性の HCV 感染細胞を比較したところ、変異を持ったウイルスではより多くの GFP 陽性細胞を認め、これらの変異の導入により GFP 挿入 JFH-1 ウイルスの生成能と感染能が増強されていると考えられた。

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) 上記の研究で確立した HBV の感染実験系で Genotype による複製効率の差を検討すると、遺伝子導入実験と類似の傾向であった (C>Ae)。

2) ラミブジン耐性ウイルスを解析した。44 例から抽出された HBV 株を分子系統樹解析を行ったところ、全株が Genotype C2 に分類された。L180M 変異を有するものが 30 例、L180M を有しないものが 14 例であった。HBV DNA の全遺伝子配列の比較を行ったところ、L180M を有しない株は全例 M204I 変異を有しており、M204V 変異を有する例はみられなかった。Genotype C の発現プラスミドをバックボーンと

して pre Core 変異、pre S2 欠失をもつプラスミドを作成し、さらにこれらのプラスミドに M204V/I 変異および L180M 変異を挿入した。これらのプラスミドを Huh7 細胞に導入し、ウイルス増殖をサザン法で検討したところ、pre Core 変異、pre S2 欠失を有するウイルスは野生型に比し、全般的に高いウイルス増殖がみられた。また、M204V/I 変異を挿入するとすべての型で増殖が低下した。L180M 変異を導入することにより、M204I による増殖低下はやや改善した。しかし、pre Core あるいは pre S2 変異は L180M 変異より強力にウイルス増殖を増強した。

さらに 2 カ所の HBV 変異が ADV 治療効果と有意な関連を有していた。コアプロモーター領域に存在する V1753 変異 (V = C/G/A) とコア遺伝子内に存在する C2189 変異を有する症例において、有さない症例に比して累積 HBV DNA 消失率が有意に高値であり、これらの変異を有する症例では ADV 治療効果がより良好であることが明らかとなった。これらの変異 HBV の ADV 感受性を *in vitro* 増殖系を用いて検討した結果、C1753 変異、C2189 変異を有する HBV と wild-type HBV との間には LAM、ADV とも薬剤感受性に差を認めなかった。

3) レトロウイルスゲノム供給ベクターを構築し、肝がん由来培養細胞 Huh7 及びヒト腎実質細胞 293GP2 で安定発現株 GFP/H7、GFP/GP2 をそれぞれ樹立した。GFP/H7 細胞にレトロウイルス gag-pol (gp) を導入し gp/GFP/H7 細胞を樹立した。VSV-G pseudotype の実験から gp/GFP/H7 細胞、GFP/GP2 細胞がともに packaging 細胞として機能することを確認した。HBV の large S (LS)、middle S (MS)、small S (SS) の三つの膜蛋白を発現する発現ベクター、pCEP4-LS、pREP8-LS、pHBg を構築し、gp/GFP/H7 細胞、GFP/GP2 ヘトランスフェクションし培養上清中に目的の pseudotype HBV が形成されているかを、粒子を分離し、粒子内ゲノムを標的とした RT-PCR により検討した。

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) 薬剤ライブラリーによる抗 HCV 薬の探索をおこなった。LOPAC ライブラリーの 1268 の化合物を検討した。その結果、3 化合物がウイルス分泌を増加、4 化合物がウイルス分泌を抑制した。抗ウイルス作用を示した化合物の一つはサイクロスポリンであり、細胞毒性を示さなかったが、他の抗ウイルス作用を示した 3 化合物はいずれも細胞障害性が強く、抗ウイルス作用は主として細胞障害性によると考えられた。スクリーニング試験に用いる化合物濃度を $1\ \mu\text{M}$ から $10\ \mu\text{M}$ に変更して抗 HCV 作用を再度検討した。

また、多様性指向性合成化合物 (DOS) ライブラリー・スクリーニング: 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。

漢方生薬成分化合物の細胞内 HCV 増殖に対する効果を HCV レプリコンシステムにより解析を行い、甘草由来の 2 種の化合物、isoliquiritigenin、及び glycycomarin に HCV replicon 増殖抑制作用を見出した。これらの薬剤は、HCV-JFH1 培養系においてもウイルス感染増殖を抑制することを確認した。

さらに異なる化合物ライブラリー (分子量 300-550) (8,000 化合物) より 4 個のヒット (化合物 A-D) を得た。中でも化合物 A の EC50 \sim 70 nM, CC50 \sim 35 mM (Selective index \sim 500) で、現在最も期待されている抗 HCV 治療薬候補である VX-950 (Telaprevir: NS3/NS4A プロテアーゼ阻害剤) の replicon EC50 (354nM) に匹敵する。しかしながら、非常に興味深いことに、化合物 A は、genotype 1b, 2a の双方ともレプリコン・アッセイによっては活性を示さない。化合物 A は HCV pseudoparticle assay において HCV E1/E2 発現 pseudoparticle (HCVpp) の感染を用量依存的に阻害した。阻害の EC50 は infectivity assay のそれにほぼ一致する (数十 nM レベル)。また Time of addition 実験によれば、化合物 A が抗 HCV 作用を発揮するには、HCV 感染前から直後の HCV ライフサイクルの極早期に添加する必要があることが明らかになった。

天然物誘導体ライブラリーからの探索では一次スクリーニングによって、3,000 化合物より、強い抗

ウイルス効果があり細胞傷害性が低い 53 化合物を選択した。ついで、selectivity index が 10 以上の 14 化合物を選択しヒット化合物とした。alpha-グリコシラーゼ阻害剤は、タンパク質の正常な folding, assembly を阻害する。alpha-グリコシラーゼの活性中心領域に結合する可能性のある化合物を Virtual library より molecular dynamics simulation によって選択し、その抗 HCV 活性を HCVcc アッセイによって評価し、うち 2 個のヒット化合物 (NU01, NU02) を得た (日大生物資源部 袴田航博士との共同研究)。また、昨年度、多様性指向 低分子化合物ライブラリー (8,000 化合物) から得た 5 個のヒット化合物 (A, A0, B, C, D) を得ているが、この中で、A, A0 が相互に近縁の化学構造をもつことを除き、いずれの化合物も既知の HCV 阻害剤と構造的類縁性は認めなかった。

2) 46 種類の栄養成分について HCV RNA の複製に及ぼす効果を検討した。HCV RNA 複製に対して抑制効果を示したのは、 β -カロテン、ビタミン D2、リノール酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、Fe(II)SO₄、Fe(III)(NO₃)₂、ZnCl₂ の 9 種類であった。一方、HCV RNA 複製に対して増強効果があったのは、ビタミン A、C、E、K1、K2、K3、トリプトファン、Na₂SeO₄ の 8 種類であった。残りの 29 種類の栄養成分は HCV RNA 複製に対して影響を与えなかった。 β -カロテン、ビタミン D2、リノール酸をこれまでに抗 HCV 効果の報告がされている IFN- α 、フルバスタチン、サイクロスポリン A と併用した時の効果について検討した。IFN- α に各栄養成分を併用した時相加効果が認められた。フルバスタチンに各栄養成分を併用した時にも相加効果が認められた。一方、サイクロスポリン A に各栄養成分を併用した時には、相乗効果が認められた。これらの結果は β -カロテン、ビタミン D2、リノール酸は、既存の抗 HCV 効果の認められている薬剤の効果を補助し増強させる可能性を示唆した。

そこで BC ($10\ \mu\text{M}$)、VD2 ($5\ \mu\text{M}$)、LA ($50\ \mu\text{M}$) を単独、あるいは MEK 阻害剤の U0126 (5, $10\ \mu\text{M}$) と併用で OR6 細胞に添加して 72 時間培養しレニラルシフェラーゼ活性を測定した。BC、VD2、LA 単独ではそれぞれ HCV RNA 複製を約 50%抑制したが U0126 を併用するとこれらの栄養成分の抗 HCV 活性はキャンセルされた。この結果は BC、VD2、LA の抗 HCV 活性には

ERK の活性化が必要であることを示している。LA 以外の多価不飽和脂肪酸 (AA, EPA, DHA) でも U0126 の併用がこれらの栄養成分の抗 HCV 活性はキャンセルした。この結果は LA の多価不飽和脂肪酸の抗 HCV 活性にも ERK の活性化が必要であることを示している。

さらに U0126 を併用すると CsA、IFN- γ の抗 HCV 活性はキャンセルされたが、FLV、PTV の抗 HCV 活性は U0126 によりキャンセルされなかった。CsA、IFN- γ の抗 HCV 活性にも ERK の活性化が必要であるが、スタチン剤の抗 HCV 活性には ERK の活性化は必要でないことを示した。

3) 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。

4) 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 (エントリー) 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 μ l (\sim 0.5 μ M)、10 ng/well (\sim 8 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。

また、ベーリンガー社から分与された、NS3 プロテアーゼ阻害剤 BILN2061 の JFH-1 感染細胞に対する高ウイルス作用を解析した。HCV 持続感染細胞を用いて、薬剤を添加し培養上清中のウイルスコア蛋白濃度を測定した。BILN2061 添加 0.1 μ M 以上の濃度で 80%以上の阻害活性を示した。また、1 μ M 以下の濃度で細胞障害性はほとんど示さなかった。

また本実験で BILN2061 耐性ウイルスを分離した。BILN2061 耐性ウイルスのゲノムをシーケンズ解析すると NS3 プロテアーゼ領域に 2 カ所の変異を認められた。この変異をリバーシジェネティクス法により導入したウイルスは BILN2061 耐性であることを確認した。また、新規 NS5B ポリメラーゼ阻害剤の複製阻害作用を検討したところ、その抗ウイルス作用は弱く、細胞障害性が認められた。

新規抗 NS4A 阻害剤の抗 HCV 効果および作用機序の解析を行ったところ、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。

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。19

99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。

本研究による研究成果について述べる。まず、初代肝細胞や不死化肝細胞の立体培養により、B型肝炎ウイルスの培養系にも一定の用途が付き、薬剤のスクリーニングにも使用できる可能性がある。この培養システムはC型肝炎ウイルスの培養にも有効であることが示された。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。

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。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。

ウイルス増殖に、PA28 γ 発現が必須であることが明らかとなった。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型肝炎肝炎肝組織では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。

RNA結合ペプチドの探索によりHCV RNAに特異的に結合するペプチドが得られた。HCV RNAとRNA結合ペプチドが特異的に結合するための塩基配列の要求性が明らかとなり、さらなるスクリーニングにより、多くのHCV RNA結合ペプチドを得られる可能性が示された。

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

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 JHF-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。

抗ウイルス薬のスクリーニングにおいては大きな成果が得られた。低分子ライブラリーから、C 型肝炎ウイルスの感染初期過程を阻害する候補分子が同定された。その効果も既存の抗ウイルス薬とすでに遜色無いことが示された。さまざまなライブラリーから、C 型肝炎ウイルスの感染複製増殖を阻害する候補分子が同定された。興味深いことに、感染実験系を用いたスクリーニングでは感染初期過程を阻害する化合物が複数得られた。細胞内に取り込まれる必要が無いことを考えると、これらのエントリー阻害剤候補が新たな抗 HCV 薬として開発が進むことが期待できる。これらの候補を展開し次のステージにいかに進めていくかが大きな課題である。また、新たな抗ウイルス標的をねらったスクリーニングも進めていく必要がある。

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目的とし、研究を進めた。HBV の感染系を含めて新たな実験系を開発し、治療法開発のための新たな標的の探索をおこなった。3 年間の研究により、HBV および HCV の新たな実験方法が確立され、ウイルスの生活環が詳細に解明された。その結果、ウイルスの複製増殖に関わる宿主因子が同定され、新たな抗ウイルス療法の標的としての可能性が示された。さらに、抗ウイルス薬のスクリーニングも行われ、多くの候補化合物が同定された。今後は本研究で進行中の研究をさらに進めるとともに、同定した治療標的に対する薬物スクリーニングの実施、新規抗ウイルス薬候補の前臨床試験および臨床開発への導入を進める必要がある。特に、化合物の展開研究は製薬企業との共同研究を積極的に行い開発を進める。

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。立体培養によって著しく HCV の感染増殖が亢進することから、この細胞の遺伝子発現変化を解析したところ、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と思われた。

3. SPP によるコア蛋白質の切断は、ウイルス産生機構にとって必要である。宿主膜内蛋白質分解酵素 SPP は、新規 C 型肝炎治療法開発の標的蛋白質として期待できる。

4. 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コピ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

5. HCV の複製は HCV の蛋白翻訳に強く依存していた。JFH-1 の感染により La protein の発現誘導が認められ、HCV 自身が翻訳関連因子を誘導していることが明らかとなった。La protein の発現を抑制することによって HCV の複製制御が可能であり、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。

6. 3' -UTR X-tail の SL2 が#3d001 に結合する上での塩基の要求性が、GNRA-like モチーフと類似していることを見いだした。HCV IRES のステム・ループ IIIe および IIIf を標的とした結合ペプチドのセレクションを行った。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 IIIf 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。

7. 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する。

8. 効率的に GFP 遺伝子を持った HCV を作製した。しかし、NS5A 領域に GFP 遺伝子を挿入した JFH-1 ウイルスは、培養細胞中では非常に不安定であった。高力価の GFP 挿入ウイルスを得るためには、効率的に GFP 挿入ウイルスが生成できる挿入部位と方法を選択するとともに、ウイルスゲノムに増殖感染を増強するような変異の導入が必要であると思われた。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。

9. B 型肝炎ウイルスの V1753 変異と C2189 変異は、LAM 耐性 B 型慢性肝炎に対する ADV 追加治療における抗ウイルス効果に影響を与える HBV 変異であることが示唆された。B 型肝炎ウイルスの核酸アナログ耐性の獲得にはポリメラーゼ遺伝子の RT ドメインの変異とともに、それ以外の領域の変異が補助的に影響している可能性がある。このような変異の検討を行うことは、核酸アナログ耐性を起こしやすい株を同定する上で重要である。

10. 栄養成分である β -カロテン、ビタミン D2、リノール酸が HCV RNA の複製を抑制することを明らかにした。この抗 HCV 活性において酸化ストレスによる MEK-ERK1/2 のリン酸化が重要であることを明らかにした。

11. 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。

12. 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。

13. HBV シュードタイプウイルス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。

14. 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 HCVcc assay を用いたランダムスクリーニングの結果、複数の 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。その一つは、これまでに報告のない低分子性の HCV エントリー阻害剤である可能性が高い。

15. 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、新規の感染阻止薬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. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doffoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology*. 2007 46(6):1722-1731.
2. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*. 2007 Sep;9(9): 1089-97.
3. Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouillé Y, Dubuisson J, Wakita T, Duverlie G, Wychowski C. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol*. 2007 88(Pt 9):2495-503.
4. Kim CS, Jung JH, Wakita T, Yoon SK, Jang SK. Monitoring the antiviral effect of alpha interferon on individual cells. *J Virol*. 2007 81(16):8814-20.
5. Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol*. 2007 81(15):8030-40.
6. Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Sakai A, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Wakita T, Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett*. 2007 581(10):1983-7.
7. Hussein H. Aly, Koichi Watashi, Makoto Hijikata, Hiroyasu Kaneko, Yasutugu Takada, Hiroto Egawa, Shinji Uemoto, Kunitada Shimotohno: Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J. Hepatol*. 46:26-36, 2007
8. Mohamed A. El-Farrash, Hussein H. Aly, Koichi Watashi, Makoto Hijikata, Hiroto Egawa, Kunitada Shimotohno: In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporine. *Microbiol. Immunol*. 51(1):127-133, 2007
9. Koichi Watashi, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Kaku Goto, Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno: Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptors with viral RNA polymerase NS5B. *J. Biol. Chem.*, 282, 32765-32772, 2007
10. Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Nakayama N, Mochida S, Mizokami M. Influences on hepatitis B virus replication by a naturally occurring mutation in the core gene. *Virology*. 365(2):285-91. 2007.
11. Moriishi K, Mochizuki R, Moriya, Miyamoto H,

- Mori Y, Abe T, Murata ., Tanaka K, Miyamura T, Suzuki T, Koike K, and Matsuura Y. Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2007, 104, 1661-1666.
12. Abe T, Shyuhei Taguwa Kaname Y, Hamamoto I, Tsuda Y, Wen X, Taguwa S, Moriishi K, Takeuchi O, Kawai T, Kanto T, Hayashi N, Akira S, and Matsuura Y. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. *J. Virol.* 2007, 81, 8953-8966.
 13. Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells. *J. Virol.* 2007, 81, 8477-8487.
 14. Tani H, Komoda Y, Matsuo E, Suzuki K, Hamamoto I, Yamashita T, Moriishi K, Eiko Matsuo, Kensuke Suzuki, Yoshimi Tsuda, Kohji Moriishi, Rie Tanigawa, Fujiyama K, Kanto T., Hayashi N, Owsianka A, Patel AH, Whitt MA, Matsuura Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.* 2007, 81, 8601-8612.
 15. Moriishi K., and Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev. Med. Virol.* 2007, 17, 343-354.
 16. Moriishi K., and Matsuura Y. Evaluation systems for anti HCV drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, 59, 1213-1221.
 17. Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Involvement of the PA28 gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 2007, 81, 1727-1735.
 18. Honda M, Shimazaki T, Kaneko S. La protein is a potent regulator of replication of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C through internal ribosomal entry site-directed translation. *Gastroenterol.* 2005 128(2):449-62.
 19. M. Sugaya, R. Saito, Y. Matsumura, K. Harada and A. Katoh "A facile method for the detection of specific RNA-polypeptide interactions using MULDI-ToF MS spectrometry" *J. Peptide Science*, 14: in press (2008).
 20. M. Sugaya, N. Nishino, A. Katoh and K. Harada* "Combinatorial analysis of the amino acid requirements for the high affinity arginine-rich peptide-RNA interaction" *J. Peptide Science*, 14: in press (2008).
 21. M. Sugaya, F. Nishimura, A. Katoh and K. Harada* "Tailoring the peptide-binding specificity of an RNA by combinations of specificity-altering mutations" *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, in press (2008).
 22. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Suda G, Mishima K, Onuki Y, Yamamoto M, Maekawa S, Enomoto N, Kanai T, Tsuchiya K, Watanabe M: Two flavonoids extracts from a herb, *Glycyrrhizae radix*, inhibit in-vitro hepatitis C virus replication. *Hepatology Res*, in press
 23. Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N, Ito M: Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses HCV replication in vitro. *Hepatology Res*, in press.
 24. Aragaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Yoshioka S, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M: Proteasomal degradation of Atoh1 by aberrant Wnt signaling maintains the undifferentiated state of colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, in press.
 25. Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S: Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators

- involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology*, in press.
26. Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M: Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastro Hepatol* 2007; Epub.
 27. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Sakamoto N, Enomoto N: Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C. *J Infect Dis* 2008; 197(3):361-370.
 28. Peng LF, Kim SS, Matchacheep S, Lei X, Su S, Lin W, Runguphan W, Choe WH, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Beeler AB, Porco JA Jr, Schreiber SL and Chung RT: Identification of novel epoxide inhibitors of HCV replication, a high-throughput screen. *Antimicrob Agent Chemother* 2007; 51 (10):3756-3759.
 29. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Kanai T, Tsuchiya K, Wakita T, Enomoto N and Watanabe M: Development of plaque assays for hepatitis C virus-JFH1 strain and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology* 2008:371:71-85.
 30. Tasaka M, Sakamoto N, Itakura Y, Nakagawa M, Itusi Y, Sekine-Osajima Y, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Yoneyama M, Fujita T, Wakita T, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M: HCV nonstructural proteins responsible for suppression of RIG-I/Cardif -induced interferon response. *J Gen Virol* 2007; 88:3323-3333.
 31. Sakamoto N, Yoshimura M, Kimura T, Toyama K, Sekine-Osajima Y, Watanabe M, Muramatsu M: Suppression of hepatitis C virus replication by bone morphogenetic protein-7 and synergistic action with interferon-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357:467-473.
 32. Kim SS, Peng LF, Lin W, Choe WH, Sakamoto N, Schreiber SL, Ikeda M, Kato N, Chung RT: A cell-based, high-throughput screen for small molecule regulators of HCV replication, *Gastroenterology* 2007; 132:311-320.
 33. Takebe, Y. Uenishi, R., and Li. X-J. Global molecular epidemiology of HIV: Understanding the genesis of AIDS pandemic. "HIV-1: Molecular biology and pathogenesis" (ed. Kuan Teh Jeang). *Advances in Pharmacology* vol. 56: 1-25, 2008.
 34. Tee, K. K., Pybus, OG., Liao, H., Uenishi, R., Hase, S., Kamarulzaman, A., Li, X-J., and Takebe, Y. Chronology of the HIV-1 CRF07_BC expansion in East-Asia. *AIDS* 22: 156-158, 2007.
 35. Li, X-J., Uenishi, R., Hase, S., Liao, H., Tee, K. K., Kusagawa, S., and Takebe, Y. HIV/AIDS in Asia: The shape of epidemics and their molecular epidemiology. *Virologica Sinica* 22(6): 426-433, 2007.
 36. Han, X., Zhang, M., Dai, D., Wang, Y., Zhang, Z., Liu, J., Geng, W., Jiang, Y., Takebe, Y., and Shang, H. Genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naive HIV/AIDS patients living in Liaoning Province, China: baseline prevalence and subtype-specific difference. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 23(3): 357-364, 2007.
 37. Utsumi, T., Nagakawa, H., Uenishi, R., Kusagawa, S., and Takebe, Y. An HIV-2-infected Japanese man who was a long-term nonprogressor for 36 years. *AIDS* 21(13): 1834-1835, 2007.
 38. Naito, Y., Nohtomi, K., Onogi, T., Uenishi, R., Ui-Tei, K., Saigo, K., and Takebe, Y. Optimal design and validation of antiviral siRNA for targeting HIV-1. *Retrovirology*. 4(1): 80, 2007.
 39. Shimizu, S., Urano, E., Futahashi, Y., Miyauchi, K., Isogai, M., Matsuda, Z., Notomi, K., Onogi, T., Takebe, Y., Yamamoto, N., and Komano, J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of