

200933022A

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

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた
治療抵抗性の肝炎に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

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

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた
治療抵抗性の肝炎に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 22 年 (2010 年) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究 1
茶山 一彰

II. 分担研究報告

1. 肝炎ウイルスに in vivo で相互作用する肝細胞膜蛋白質の解析
-ウイルス薬剤感受性の分子機構解明のための研究- 7
吉里 勝利
2. B型及びC型肝炎ウイルス感染に伴うヒト肝細胞キメラマウスの遺伝子
発現プロファイル解析 12
金子 周一
3. レプリコンを用いたC型肝炎ウイルス増殖に関与する宿主分子の網羅的
解析、リバーシジェネティックスの構築 15
土方 誠
4. 治療最適化を目指した長期持続型インターフェロン発現ベクターの開発 . . 18
高倉 喜信
5. 肝炎の進行と治療感受性を規定するウイルス領域の包括的検討 25
前川 伸哉
6. HCV感染細からの選択的なウイルス排除システムの開発 28
松浦 善治
7. ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いたウイルス排除機構の解析 31
大段 秀樹
8. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた新規抗HCV薬の効果判定 39
今村 道雄

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 45

IV. 研究成果の刊行物・別刷り 53

I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
平成21年度総括報告書

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

研究代表者 茶山一彰 広島大学病院 消化器内科 教授

研究要旨：我々は、治療抵抗性のウイルス性肝炎に対する新規治療を開発するための研究を行っている。このために、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスに、肝炎ウイルスを感染させた動物モデルを作製し、抗ウイルス作用を有する薬剤の探索、ウイルス増殖に関連するヒト遺伝子の探索を行うとともに、探索された分子の薬剤としての可能性を検証する系の開発を行っている。本マウスは、治療抵抗性のB型あるいはC型肝炎の患者血清を投与することにより、治療抵抗性の肝炎ウイルス感染モデルとして検討が可能である。さらに、我々はB型(HBV)およびC型肝炎ウイルス(HCV)のリバースジェネティックスの系も確立している。本研究は、これまでの研究を発展させ、クローニングした genotype 1b 型 HCV 全長の NS3 領域に protease 阻害剤耐性アミノ酸変異を挿入し、野生型あるいは変異型 HCV の protease 阻害剤に対する感受性あるいは変異株出現を検討した。さらに、本モデルを用いて protease 阻害剤や RNA polymerase 阻害剤などの HCV 蛋白を標的とする薬剤を組み合わせることにより、インターフェロン製剤を使用せずとも HCV の排除が可能であることを見いだした。これらの系は肝炎ウイルスのウイルス学的解析、各種耐性ウイルスに対する治療薬の効果判定、感染の成立、予防に関する研究に有用なモデルになると考えられる。またこれらウイルス感染マウスを用いて、肝組織内遺伝子および micro RNA (miRNA) 発現プロファイルを検討し、HBV および HCV 感染に伴うマウス肝臓内の遺伝子発現は、明瞭に異なっていることを明らかにした。さらに班員により多数の候補化合物、候補遺伝子が見いだされており、今後、さらに新規治療法の開発に向けた研究を継続していく。

【研究分担者】

吉里勝利 (株)フェニックスバイオ
学術顧問
金子周一 金沢大学大学院医学系研究科
教授
土方 誠 京都大学ウイルス研究所
准教授
高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科
教授
前川伸哉 山梨大学大学院消化器内科学
講師
松浦喜治 大阪大学微生物研究所
教授
大段秀樹 広島大学大学院医学系研究科
教授
今村道雄 広島大学病院消化器内科
助教

【班長研究協力者】

脇田隆字 国立感染研究所ウイルス第二部

A. 研究目的

我々は、肝炎ウイルスに対する新規治療の有効性を検証するモデル系として、2004 年度から肝炎ウイルスが感染するマウスモデルの作製に取り組んできた。このマウスは、広島大学理学研究科において作製された、免疫不全マウスと uPA マウスを交配して得られた uPA 遺伝子をホモに有するマウスにヒト肝細胞を移植したものである。既報の同様のマウスと比較して、我々のマウスは格段に高いヒト肝細胞置換率を示す。我々は、このマウスを使用し、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)の感染実験を行い、感染の成立、パッセージ、薬剤の有効性の評価が可能であることを確認してきた。さらに HBV、HCV のクローンを用いて、リバースジェネティックスの系も構築した。本研究では、この系を用いて、今後 HCV 治療に中心的となると思われる、HCV 蛋白阻害剤の有効性および耐性株の評価を行った。

B. 研究方法

1) ヒト肝細胞キメラマウスにgenotype 1b型HCV患者血清を静脈内投与し、HCV感染を惹起した。これらHCV感染マウスに28日間、protease 阻害剤 (telaprevir, 200 mg/kg, 1日2-3回, 連日経口投与), RNA polymerase 阻害剤 (MK-0609, 3 mg/kg, 1日2回, 連日経口投与;) 単独, 両者併用, あるいはIFN- α と組み合わせ投与し, マウス血中HCV RNA量の測定およびNS3, NS5B領域のアミノ酸配列を解析した。

2) Genotype 1b 患者血清から作成したHCV全長cDNA(KT9)より *in vitro* transcriptionによってHCV RNAを合成し, ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓内に直接投与しHCV感染を惹起した。またこのcDNAにprotease 阻害剤耐性であるNS3領域のA156S変異を挿入した耐性型クローン(KT9-NS3-A156S)も投与した。これらのクローンを用いて作成したHCV感染マウスにtelaprevirを連日経口投与した。

C. 結果

HCV感染マウスへの200 mg/kgのtelaprevirの投与により, 急速に血中HCV RNAは低下したが, 最終投薬から翌日の投薬の約10時間の間にHCV RNAはほぼ前値にもどっていた。Telaprevir投与によってHCV RNAは, 1時間あたり約0.1 - 0.15 log copy低下し, 最終投与後, HCV RNAは1時間あたり約0.2 - 0.3 log copy増加していた。Telaprevir投与により, マウス血中HCV RNAは著明に低下したが, 投与中, 耐性株(NS3領域のV36A変異)の出現により, breakthroughを起こすマウスが存在した。TelaprevirにIFN- α を併用投与することにより, より強い抗HCV効果およびbreakthroughの予防が可能であった。MK0609も単独投与により著明にマウス血中HCV RNAを低下させたが, telaprevirと同様, 投与中に耐性株(NS5B領域のS282T変異)の出現により, breakthroughを起こす

マウスが存在した。TelaprevirとMK-0609を併用投与すると, さらに強力な抗HCV効果を認め, すべてのマウスにおいてウイルスは投与1週後に検出感度以下に低下し, 観察した投与終了18週間までウイルスの再上昇を認めず, おそらく完全排除されたものと思われた。

野生型(KT9)あるいは変異型HCVクローン(KT9-NS3-A156S)を肝臓内注入することによりマウス血中HCV RNAは陽性となり, HCV感染が確認された。変異型クローンを投与したマウスではHCV RNAは野生型に比べ明らかに低値であり, 変異型HCVは野生型に比べ複製効率が低いことが示唆された。これらの感染マウスに200-300 mg/kgのtelaprevirを投与したところ, 野生型感染マウスでは血中HCV RNAは著明に低下したが, 耐性株感染マウスではHCV RNAの低下はわずかであった。これらの結果からNS3領域のA156S変異は明らかにtelaprevir耐性であり, これらのシステムを用いて, 種々の変異HCVの複製能および薬剤耐性能の検討が可能になると思われた。

また, 新規治療薬の候補薬剤, あるいは候補遺伝子として班員らにより研究が行われており, 以下のような成果が報告されている。

吉里班員は“*in vivo* affinity binding and cross-linking法”を利用し, ヒト肝細胞キメラマウスにPre-S抗原を持つHBV模擬particleおよび2価の架橋剤を注入することにより, マウスから肝臓を分離し粗膜画分を得て, Pre-S抗原に対する抗体を用いた免疫沈降物を電気泳動し, Pre-S抗原と結合するタンパク質として分子量約80 kDaのglucose-regulated protein 78/Immunoglobulin Binding Protein (GRP78/BiP)を同定した。培養細胞を用いた検討にて, 抗GRP78/BiP抗体はHBVの感染阻害活性を示さず, GRP78/BiPは“ウイルスレセプター”としてではなく, 他の機能でHBV-肝細胞相互作用に関与している可能性を考えた。

金子班員はHBV及びHCV感染ヒト肝細胞キメラ

マウスの肝組織遺伝子発現プロファイルを検討した。その結果、HBV、HCV 感染に伴うマウス肝臓内の遺伝子発現は明瞭に異なっており、HBV 感染マウスではアポトーシス関連遺伝子、Ras シグナル、p53 関連遺伝子の発現上昇が認められ、HCV 感染マウスではサイトカイン、炎症シグナル関連遺伝子の発現が認められた。また micro RNA (miRNA) の発現も HBV および HCV 感染では異なっており、それら miRNA の制御候補遺伝子を検索した結果、HBV 感染では細胞死・DNA 障害、細胞周期、癌関連遺伝子、HCV 感染ではケモカイン・サイトカイン、線維化、代謝、抗アポトーシス関連遺伝子が制御候補遺伝子として挙げられており、これらの発現変動は miRNA の発現により制御されている可能性が示唆された。

土方班員は組換え体 HCV およびレプリコン細胞を用いて HCV と宿主細胞との相互作用の網羅的な解析を行い、HCV の感染性粒子中に存在するコアタンパク質がジスルフィド結合によって二量体を形成していること、この二量体はコアタンパク質がプロセッシングによって産生される小胞体画分において既に形成されていることが明らかにした。さらにこのジスルフィド結合はコアタンパク質の 128 番目のシステイン残基一つで形成されており、この 128 番目のシステインをアラニンに変異させたコアタンパク質は野性型の組換え体 HCV の感染粒子産生を抑制することを見いだした。このジスルフィド結合そしてそれに関わる細胞因子を制御することですべての HCV 株の粒子形成を抑制することが可能になり、その増殖を制御する新たな抗 HCV 薬開発の標的になり得ると思われる。

高倉班員は長期持続型 IFN- γ 発現ベクターを開発した。SCID マウスに投与することにより、8 ヶ月間にわたり、治療有効レベルのヒト IFN- γ 血中濃度を保持できることを確認した。さらに HCV レプリコン細胞を用いた *in vitro* の系での遺伝子導入実験により発現した IFN- γ が抗 HCV 効果

を示すことも確認した。この長期持続型 IFN- γ 発現ベクターは C 型肝炎患者に対する臨床応用が期待される。

前川班員は多数例の genotype 1b の HCV 全翻訳領域を解析することにより、Peg-IFN+リバビリン併用療法 (PEG-IFN/RBV) の治療効果と関連するウイルス領域を検索した。これまで見いだした Core 領域 70 番目および NS5A 領域の ISDR の他、NS5A 領域の IFN/RBV resistance-determining region (IRRDR) のアミノ酸変異が、治療効果に強く関連することを見いだした。さらに genotype 2a 患者においても Core 領域のアミノ酸変異が治療効果と強く関連することを見いだした。

松浦班員は IFN の転写因子である IRF3 および IRF7 の dominant-active 変異体 (MR3) をレプリコン細胞や JFH1 株の感染細胞に導入するとウイルスゲノムの複製が抑制されることを見いだした。また、HCV のプロテアーゼ認識配列と小胞体残留シグナル配列を付加したキメラコンストラクトは、HCV プロテアーゼの発現により活性化され、感染細胞でのみ IFN を誘導できることを示した。さらに、HCV の複製に対して、抑制因子として機能する VAP-C においても、本システムの応用が可能である事を見いだした。

大段班員は NK 細胞と NKT 細胞を IL-2/抗 CD3 抗体存在下で培養させた場合、CD81 を介した抑制機構に抵抗性を示し、HCV 複製抑制効果を誘導し得ることを確認した。さらに HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスにヒト活性化 NK/NKT 細胞を移入することにより、血中 HCV RNA を消失させることに成功した。HCV が E2 蛋白/CD81 結合によって自然免疫応答を巧妙に回避し持続感染に移行する機構を断ち切る活性化 NK/NKT 細胞移入療法が、HCV 肝炎の再発予防・根治療法となりうることを示すものであると思われる。

今村班員はヒト肝細胞キメラマウスを用いて、Phosphorothioate oligonucleotide (PS-ON) が HCV 感染の阻害に有用であること、ソヤサポゲノ

ール B 誘導体が IFN- α の抗 HCV 効果を増強させることを示した。

D. 考察

HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HCV 蛋白を標的とした薬剤の抗ウイルス効果や耐性株出現の評価が可能であり、異なる薬剤を併用することでIFN製剤を使用せずともウイルスの排除が可能であることを見いだした。構築したHCVクローンをマウスに投与するシステムにより、生体内における変異株の増殖能および薬剤耐性能の検討が可能であった。

E. 結論

HCV蛋白を標的とした抗ウイルス剤を併用投与することにより、IFN製剤を使用せずともHCVの排除が可能である。変異型HCVの増殖能および薬剤耐性能を検討するシステムを構築した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

- Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Chayama K. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol* 51:1046-54,2009
- Ohira M, Ishiyama K, Tanaka Y, Doskali M, Igarashi Y, Tashiro H, Hiraga N, Imamura M, Sakamoto N, Asahara T, Chayama K, Ohdan H. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *J Clin Invest* 119:3226-35,2009
- Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hatakeyama T, Tsuge M, Kitamura S, Kimura T, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Fujimoto Y, Takahashi S, Nakamura Y,

Kumada H, Chayama K. Effects of structural variations of APOBEC3A and APOBEC3B genes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology Res* 23:1159-68,2009

- Noguchi C, Imamura M, Tsuge M, Hiraga N, Mori N, Miki D, Kimura T, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. G to A hypermutation in hepatitis B virus and clinical course of patients with chronic hepatitis B. *J Infect Dis* 199:1599-607,2009
- Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Chayama K. Deletion of angiotensin II type I receptor reduces hepatic steatosis. *J Hepatol* 50: 1226-35, 2009
- Matsumura T, Hu Z, Kato T, Dreux M, Zhang YY, Imamura M, Hiraga N, Juteau JM, Cosset FL, Chayama K, Vaillant A, Liang TJ. Amphipathic DNA Polymers Inhibit Hepatitis C Virus Infection by Blocking Viral Entry. *Gastroenterology* 137:673-81,2009
- Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, Hosono N, Kubo M, Tsunoda T, Kamatani N, Kumada H, Puseenam A, Sura T, Daigo Y, Chayama K, Chantratita W, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nat Genet* 41: 591-5, 2009
- Tsukada H, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Fujimoto Y, Tsuge M, Takahashi H, Kumada H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K; the Hiroshima Liver Study Group, and Toranomon Hospital. A Polymorphism in MAPKAPK3 Affects Response to Interferon Therapy for Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 136: 1796-805, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 in vivo cross-linking 法については出願の可否を確認中 (吉里班員)。
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

II. 分担研究報告

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）
（分担）研究報告書（平成21年度）
ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

肝炎ウイルスに *in vivo* で相互作用する肝細胞膜蛋白質の解析
-ウイルス薬剤感受性の分子機構解明のための研究-

研究分担者 吉里勝利 株式会社フェニックスバイオ 学術顧問
研究参加者 大房 健 東和环境科学株式会社
立野知世 株式会社フェニックスバイオ
石田雄二 株式会社フェニックスバイオ

研究要旨：肝炎ウイルスと相互作用する肝細胞膜蛋白質の同定は、抗肝炎ウイルス剤の開発に貢献することが期待できる。本研究は、肝炎ウイルスと *in vivo* で反応するヒト肝細胞膜蛋白質を網羅的に検索し、生物学的に意味のある結合蛋白質を同定することを目的とした。ウイルスとしては、取り扱いが容易な B 型肝炎ウイルスの (HBV) の Pre-S 抗原を持つ HBV 模擬 particle をモデルウイルスとして、また、*in vivo* を反映するヒト肝臓肝細胞としてはヒト肝細胞で置換された肝臓を持つキメラマウス肝臓中のヒト肝細胞を *in situ* で利用した。本研究では目的蛋白質の選別には「*in vivo* affinity binding and cross-linking 法」を利用したが、この方法の有効性はこれまでの研究において既に明らかにしている。キメラマウスに Pre-S 抗原を持つ HBV 模擬 particle 投与した後、肝臓内に 2 価の架橋剤を注入した。マウスから肝臓を分離し粗膜画分を得て、Pre-S 抗原に対する抗体を用いた免疫沈降物を電気泳動し、Pre-S 抗原と結合するタンパク質として分子量約 80 KDa の glucose-regulated protein 78/Immunoglobulin Binding Protein (GRP78/BiP) を同定した。上記した肝臓の粗膜画分に対して抗 GRP78/BiP 抗体で免疫沈降して得られる沈殿物は Pre-S 抗原を含んでいることを確認した。抗 GRP78/BiP 抗体存在下で HBV 感染が可能な培養細胞に HBV を感染させる実験を行なったところ、この抗体は感染阻害活性を示さなかった。本研究で HBV 結合性肝細胞膜蛋白質として同定された GRP78/BiP は“ウイルスレセプター”としてではなく、他の機能で HBV-肝細胞相互作用に関与している可能性が考えられる。文献的考察をもとに、GRP78/BiP は、肝細胞が HBV に感染した結果生じる小胞体ストレスの成立機序に関与していると推定している。

A. 研究目的

肝炎ウイルスに対する有効な感染予防法と感染者に対する効果的な治療法の開発は大きな社会的課題である。同ウイルスは特異的に肝細胞に感染し増殖し肝臓に障害を引き起こす。この過程で、ウイルスと宿主細胞は様々な生物学的相互作用を行なっている。相互作用は、通常、相互作用に関与する蛋白質間に結合が成立することで可能になる。肝炎ウイルスと肝細胞の相互作用を正確に再現できる *in vitro* の実験系（培養肝細胞実験系）は開発されていない。人体に

おける肝炎ウイルスと肝細胞の相互作用を再現できるモデル動物が期待されていた。私達は、ヒト肝細胞で高率に置換された肝臓をもつマウス（以下、キメラマウス）の作成に成功した（文献 1）。このキメラマウスにはヒト肝炎ウイルスが感染し増幅することができるので、このマウスは同ウイルスの感染研究のモデル動物として有用であることを示した（文献 2）。平成 19 年度の研究で、私達は、私達が新たに開発した *in vivo* affinity-binding and cross-linking 法とプロテオーム技術を利用して、HBV と結合能

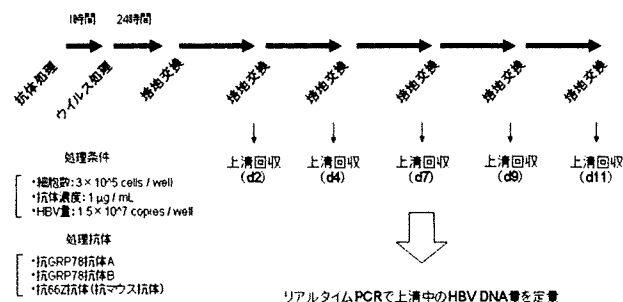
のある候補肝細胞膜蛋白として GRP78/BiP を同定した。本年度研究では、(1) この候補蛋白が HBV 結合蛋白であることをより確実にすることと、(2) この蛋白の生物学的役割に関する実験の二つの研究を行った。

B. 研究方法

ウイルスとしては、取り扱いが容易な B 型ウイルスの Pre-S 抗原を持つ HBV 模擬 particle をモデルウイルスとして、また、*in vivo* を反映するヒト肝臓肝細胞としてはヒト肝細胞で置換された肝臓を持つキメラマウス肝臓中のヒト肝細胞を *in situ* で利用した。本研究では目的蛋白の選別には「*in vivo* affinity binding and cross-linking 法」を利用した。GRP78/BiP は、Pre-S 抗原で処理されたキメラマウスの肝臓粗膜画分と抗 Pre-S 抗体を用いた免疫沈降で得られた沈殿物内の蛋白として同定された。この事実をさらに実験的に確実なものとするため、免疫沈降物の中に、Pre-S 抗原と GRP78/BiP 蛋白が存在するかどうかを調べるために以下の実験を行なった。キメラマウスに尾静脈から HBV Pre-S 抗原を注入後に、キメラマウスの門脈より生理食塩水を注入し、肝臓内より血液を除去し架橋剤を注入した。架橋反応後に、キメラマウス肝臓のヒト置換領域を採取し、タンパク質を抽出した。*in vivo* cross-linking によって得られた架橋反応物について、GRP78/BiP に対する抗体を用いて免疫沈降を行い、得られた免疫沈降物中に Pre-S 及び候補タンパク質自体が存在することを確認する目的で、ELISA 及びウエスタンブロットによる解析を実施した。

GRP78/BiP の生物学的機能を知るため以下の実験を行なった。HBV が感染することが知られているヒト肝癌由来培養細胞である HepaRG (文献 3) を用いて、抗 GRP78/BiP 抗体が HepaRG に対する HBV 感染を阻害するか否かを調べた(図参照)。HepaRG が GRP78/BiP を発現していることは、同抗体を用いたウエスタンブロットで確認した。抗 GRP78/BiP 抗体として、エピトープの異なる 2 種類の抗体 (A と B) を使用した。抗体 A はヒト GRP78/BiP 8 断片を、抗体 B はマウス GRP78/BiP の C 末端をエピトープとしており、GRP78/BiP の C 末端は細胞表面に出ていることが文献的に知られている (文献 4)。

細胞を次の 6 つのグループに分けた：(1) HepaRG, HBV 非感染 (対照細胞), (2)



HepaRG, HBV感染 (陽性対照細胞), (3) 抗 GRP78/BiP抗体Aで前処理したHepaRG, HBV感染 (実験グループ細胞), (4) 抗 GRP78/BiP抗体Bで前処理したHepaRG, HBV感染 (実験グループ細胞), (5) 抗66Z抗体 (抗マウス抗体)で前処理したHepaRG, HBV感染 (陽性対照細胞), (6) HepG2, HBV感染 (陰性対照細胞)。それぞれの群は2つの独立した細胞を含んでいる。抗体による細胞の前処理は、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で1時間行なった。ウイルス感染は、文献3に準じて細胞の50倍量のウイルスで24時間、細胞を処理した。感染後の培地交換は一日おきに行なった。培養上清100 μL からDNAを抽出し、TaqManプローブを用いたリアルタイムPCRで、2、4、7、9、11日目の培養上清中のHBV DNA量を定量した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト肝細胞キメラマウス及び樹立株化細胞を用いて、蛋白質の解析を実施した。ヒト肝臓組織およびキメラマウスに移植するヒト肝細胞は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に基づく手続きを経て入手したもの、あるいは海外から正式な手続きをもって購入した凍結ヒト肝細胞を用いた。

動物実験においては、動物愛護ならびに福祉の観点から、必要最低限の供試動物を使用し、実験動物の生理、生態や習性等を理解し、動物に苦痛を与えないように最大限の配慮をした。

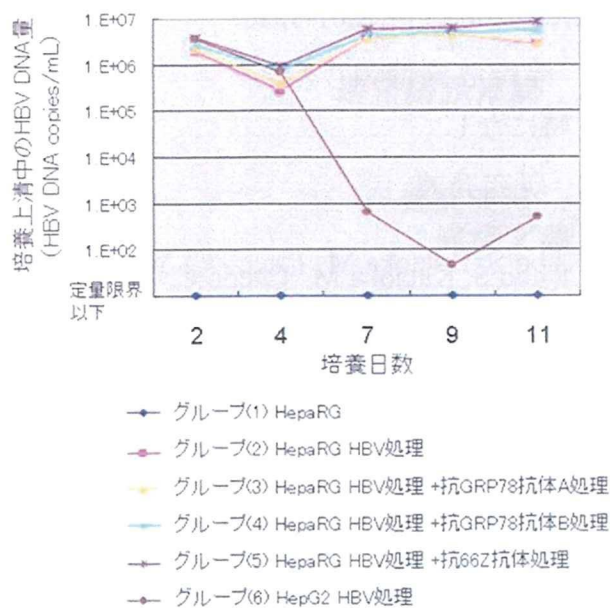
C. 結果

(I) GRP78/BiPがHBV結合蛋白であるとの結論の再現性および確実性強化に関する実験 Pre-S 抗原に対する抗体を用いた *in vivo* affinity binding and cross-linking によってキメラマウス肝臓膜画分から架橋反応物を得た。この反応物を抗原として、Pre-S 抗原に

対する抗体ならびにGRP78/BiPに対する抗体の2つの抗体を用いて、Pre-S並びにGRP78/BiPが得られた架橋反応物中に含まれるか否かを、ELISAならびにウエスタンブロット法で検定した。その結果、Pre-S抗原に対する抗体で得られた免疫沈降物中にGRP78/BiPが存在し、また逆に、GRP78/BiPに対する抗体によって得られた免疫沈降物中には、Pre-S抗原が存在していることが確認された。

(II) GRP78/BiPの生物学的役割に関する実験培養条件下で、HBVが感染することが知られているHepaRGを利用して、*in vitro*感染実験を実施した。同細胞に予め抗GRP78/BiP抗体を作用させた後にHBVを含む血清で処理し、感染阻害が生じるか否かをHBV DNA量の変化で確認した(図参照)。

抗GRP78抗体によるHBV感染阻害実験



グループ(1)では定量限界以上のHBVは検出されなかった。グループ(6)では、HBV DNA量は試験開始7日目まで減少した後、微量のHBV DNAが検出され続けた。これはHepG2ではHBVの感染が成立せず、最初に処理したHBVのうち除去し切れなかった分が検出されたためと考えられた。グループ(2)と(5)では、2日目から4日目にかけてHBV DNAの減少が見られたが、4日目から7日目にかけて10倍程度の増加が見られ、9日目、11日目でも同程度のHBV DNA量が維持されていた。また11日目の時点で、これらのグループと先に述べたグループ(6)のHBV DNA量を比較すると、およそ10,000倍もの

開きがあることから、グループ(2)と(5)ではHBVの感染が成立していたと考えられた。これらの結果から、この感染実験系は感染のアッセイ系として利用できることが分かった。2種類の抗GRP78/BiP抗体(AとB)でそれぞれ処理した実験グループの(3)と(4)では、いずれもグループ(2)と(5)と同様なHBV DNA量の推移を示した為、HBVの感染が成立していたことが分かった。GRP78/BiPの抗体がHBV感染を阻害できなかったことから、GRP78/BiPはウイルスリセプターとしての機能はないと考えられた。

D. 考察

GRP78/BiPは、当初、Pre-S抗体を使用した*in vivo* affinity binding and cross-linkingで同定された蛋白である。本研究で、この結論の再現性が確認できた。さらに、本研究当初とは逆の組み合わせ、すなわち、Pre-S抗体-*in vivo* affinity binding and cross-linkingで得られた免疫沈降物をさらにGRP78/BiP抗体で免疫沈降物させた沈降物中にPre-S抗原が存在することが確認された。これらの実験から、GRP78/BiPは、Pre-S抗原タンパク質と結合する蛋白であることは確実になった。しかしながら、GRP78/BiP抗体は、*in vitro*のHBV感染実験において、阻害効果を全く示さないことが本研究で示された。このことは、GRP78/BiPがHBVに対する膜リセプターとして機能する可能性は低くなった。

最近、私達の研究にとって興味ある論文が発表された(文献5)。Maらは、まずテトラサイクリンによってHBV産生をコントロールできる肝癌細胞株を作製した。次にHBV産生の有無によって発現量が変化する蛋白を網羅的に解析し、HBV産生時に発現が顕著に亢進する蛋白としてGRP78/BiPを同定した。GRP78/BiPの発現を抑制するとHBVの細胞内での増殖が促進され、逆に、発現を促進させると、IFN-β1の発現が高まり、ウイルスの増殖が抑制された。これらの結果は、GRP78/BiP蛋白がHBV感染を抑制する可能性を強く示唆している。最近、GRP78/BiPはシャペロンであり、その小胞体ストレス抑制作用が注目されている(文献6)。肝細胞が肝炎ウイルスに感染した結果の1つとして小胞体ストレスの増加が考えられる。GRP78/BiPは感染に伴うストレス増加を軽減させることによって、肝細胞

のウイルス耐性を高めている可能性が出て来た。この可能性は、新しい抗ウイルス剤の開発研究に繋がるものである。今後、肝炎ウイルス感染に於ける小胞体ストレス発生過程に対するGRP78/BiPの役割という観点から、HBVのみならずHCVも含めて研究を進展させる予定である。

E. 結論

in vivo cross-linking により得られた Pre-S と相互作用する GRP78/BiP は、逆の組み合わせの抗体を用いた免疫沈降を実施することにより、Pre-S との相互作用することが確認された。しかし、GRP78/BiP に対する抗体を用いても HBV 感染の阻害が観察されなかったことから、HBV 感染可能な培養細胞を用いる *in vitro* のシステムにおいては、GRP78/BiP と Pre-S 抗原との相互作用は、*in vivo* と比較して弱いか、あるいはほとんど無いものと考えられた。最近、GRP78/BiP が HBV 感受性細胞の細胞内で機能して HBV の感染を抑制する可能性を示唆する研究が発表された。また、GRP78/BiP はシャペロンとして機能し、肝炎ウイルス感染時に感染細胞に生じる小胞体ストレスを抑制する作用があることが知られている。本研究で同定された GRP78/BiP は肝炎ウイルスに感染した肝細胞の小胞体ストレス抑制作用を通じて感染防止機能を持つ可能性が出て来た。今後、この可能性を検証する研究を進展させる予定である。

A-E での引用文献

1. Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, Tachibana A, Soeno Y, Asahina K, Hino H, Asahara T, Yokoi T, Furukawa T, Yoshizato K. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol.* 2004;165:901-912.
2. Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, Noguchi C, Oga H, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Chayama K, Tateno C, Yoshizato K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology.* 2005; 42: 1046-1054.
3. Hantz O, Parent R, Durantel D, Gripon P, Guguen-Guillouzo, Zoulim F. Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular

DNA in HepaRG human hepatocytes-like cells. *J. General Virology.* 2009; 90, 127-135.

4. Uma Kant Misra, Yvonne Mowery, Steven Kaczowka and Salvatore Vincent Pizzo. Ligation of cancer cell surface GRP78 with antibodies directed against its COOH-terminal domain up-regulates p53 activity and promotes apoptosis. *Mol Cancer Ther* May 2009 8:1350-1362.
5. Ma Y, Yu J, Chan H, Chen Y-C, Wang H *et al.* Glucose-regulated Protein 78 Is an Intracellular Antiviral Factor against Hepatitis B Virus. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2009; 8: 2582-2594.
6. Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, Ferré P, Foufelle F. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest.* 2009;119:1201-1215.

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kubo S, Kataoka M, Tateno C, Yoshizato K, Kawasaki Y, Kimura T, Faure-Kumar E, Palmer DJ, Ng P, Okamura H, Kasahara N. In Vivo Stable Transduction of Humanized Liver Tissue in Chimeric Mice via High-capacity Adenovirus-Lentivirus Hybrid Vector. *Hum Gene Ther.* 2010, 21: 40-50.
2. Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010, 391(1):316-21.
3. Yoshizato K, Tateno C. A human hepatocyte-bearing mouse: An animal model to predict drug metabolism and effectiveness in humans. *PPAR Research.* 2009, 2009:1-11
4. Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Chayama K. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol.* 2009, 51(6):1046-54.

5. Nishie M, Tateno C, Utoh R, Kohashi T, Masumoto N, Kobayashi N, Itamoto T, Tanaka N, Asahara T, Yoshizato K. Hepatocytes from fibrotic liver possess high growth potential in vivo. *Cell Transplant*. 2009, 18 (5): 665-675.
6. Yoshizato K, Tateno C. In vivo modeling of human liver for pharmacological study using humanized mouse. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2009, 5(11):1435-1446.
7. Noguchi C, Imamura M, Tsuge M, Hiraga N, Mori N, Miki D, Kimura T, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. G-to-A hypermutation in hepatitis B virus (HBV) and clinical course of patients with chronic HBV infection. *J Infect Dis*. 2009, 199 (11): 1599-1607.
8. Uno S, Endo K, Ishida Y, Tateno C, Makishima M, Yoshizato K, Nebert DW. CYP1A1 and CYP1A2 expression: comparing 'humanized' mouse lines and wild-type mice; comparing human and mouse hepatoma-derived cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009, 15; 237 (1): 119-126.
9. Zion O, Genin O, Kawada N, Yoshizato K, Roffe S, Nagler A, Iovanna JL, Halevy O, Pines M. Inhibition of transforming growth factor beta signaling by halofuginone as a modality for pancreas fibrosis prevention. *Pancreas*. 2009, 38 (4): 427-435.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 in vivo cross-linking 法については出願の可否を確認中。
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

B 型及び C 型肝炎ウイルス感染に伴うヒト肝細胞キメラマウスの遺伝子発現プロファイル解析

研究分担者 金子 周一 金沢大学恒常性制御学 教授

研究要旨： HBV 及び HCV 感染キメラマウスの肝組織 mRNA と microRNA (miRNA) の遺伝子発現変化を解析した。HBV 感染と HCV 感染では明瞭に遺伝子発現が異なっており、ウイルスの直接要因による遺伝子発現変化を反映していることが示唆された。興味深いことに miRNA の遺伝子発現も HBV 感染キメラマウス、HCV 感染キメラマウスで明瞭に異なっており、異なる発現を示す miRNA の制御候補遺伝子探索より、HBV 感染、HCV 感染に特徴的な遺伝子発現が miRNA の発現変化により制御されている可能性が示唆

A. 研究目的

これまでに我々は、B 型慢性肝炎及び C 型慢性肝炎症例の肝組織における遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイを用いて解析し、肝炎組織内での情報伝達機構の違いを報告してきた(Honda et al 2006)。本研究ではキメラマウスに HBV 及び HCV を感染させ、肝組織における遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。併せて microRNA (miRNA) の遺伝子発現変化を解析した。

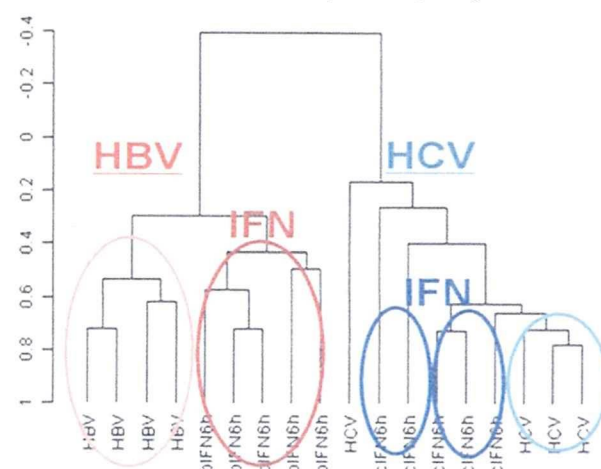
B. 研究方法

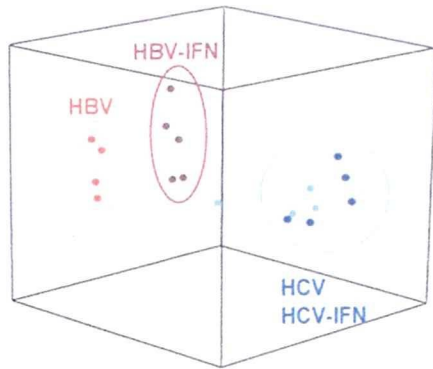
コントロールマウス(5 匹)、HCV 感染キメラマウス(4 匹)、HBV 感染キメラマウス(4 匹)、HBV 感染キメラマウス+インターフェロン(IFN)投与マウス(5 匹)及び HCV 感染キメラマウス+IFN 投与マウス(5 匹)を解析対象とした。肝組織から mRNA 及び miRNA を抽出し、マイクロアレイを用いて発現解析を行った。mRNA 発現解析には SAGE (serial analysis of gene expression) 法により様々な肝疾患で発現する遺伝子より選出された約 1 万クローンを有す

る In-house cDNA マイクロアレイを使用した。miRNA 発現解析には東レ 3D-Gene chip(900 個)を用いた。

C. 研究結果

HBV 感染、HCV 感染に伴い、肝組織内の遺伝子発現が明瞭に異なることが示された(図 1)。また IFN 投与により、HBV 感染キメラマウスでは明瞭な遺伝子発現変化が認められたが、HCV 感染キメラマウスでは IFN による遺伝子発現変化が低い傾向が認められた。





(図1)

HBV 感染マウスではアポトーシス関連遺伝子、Ras シグナル、p53 関連遺伝子の発現上昇が認められ、HCV 感染マウスではサイトカイン、炎症シグナル関連遺伝子の発現が認められた。

同一サンプルを用いた miRNA 発現解析では、miRNA の発現も HBV 感染キメラマウスと HCV 感染キメラマウスでは明瞭に異なっていることが明らかとなった。両肝炎ウイルス感染で異なる発現を示す miRNA を同定し、それらの制御候補遺伝子を探索した結果、HBV 感染では細胞死・DNA 障害、細胞周期、癌関連遺伝子、HCV 感染ではケモカイン・サイトカイン、線維化、代謝、抗アポトーシス関連遺伝子が制御候補遺伝子として挙げられ、これらの発現変動は miRNA の発現により制御されている可能性が示唆された。

D. 考察

HBV 感染キメラマウス、HCV 感染キメラマウスの肝組織遺伝子発現プロファイルを検討した。HBV 感染と HCV 感染では明瞭に遺伝子発現が異なっており、これまでにヒト肝組織において我々が報告した結果と一致した。しかしながら、キメラマウスを用いた検討では、よりウイルスの直接要因による遺伝子発現変化を反映していることが示唆された。興味深いことに miRNA の遺伝子発現も HBV 感染キメラマウス、HCV 感染キメラマウスで明瞭に異なっていることが明らかとなり、異なる発現を示す miRNA の制御候補遺伝子探索より、HBV 感染、HCV 感染に特徴的な遺伝子発現が miRNA の

発現により制御されている可能性が示唆された。

E. 結論

HBV 感染、HCV 感染において両肝炎ウイルスは異なる mRNA 及び miRNA 発現を誘導することが明らかとなった。

F. 研究発表

1.論文発表

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]

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]

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]

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 Apr;49(4):1098-112.

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

Mar;136(3):1012-24. Epub 2008 Dec 6.

Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T, Kaneko S. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 2009 Jan;50(1):100-10. Epub 2008 Oct 12.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

- 1.特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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）
（分担）研究報告書（平成21年度）
ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

レプリコンを用いたC型肝炎ウイルス増殖に関与する宿主分子の網羅的解析、
リバースジェネティックスの構築

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 C型肝炎ウイルス(HCV)の感染排除にはPEG化インターフェロン(IFN)とリバビリンの併用療法がおこなわれているが、未だにこの治療に効果を示さない患者が数多く残っており、これら難治性のHCV感染患者には新たな抗ウイルス治療薬の開発が必要である。そこで新たな抗HCV薬開発のための標的を探索する目的で、組換え体HCVおよびレプリコン細胞を用いてHCVと宿主細胞との相互作用の網羅的な解析をおこなったところ、HCVの感染性粒子中に存在するコアタンパク質がジスルフィド結合によって二量体を形成していることを新たに見出した。この二量体はコアタンパク質がプロセッシングによって産生される小胞体画分において既に形成されていることが明らかになった。またアミノ酸変異体を作製して解析したところ、このジスルフィド結合はコアタンパク質の128番目のシステイン残基一つで形成されることがわかった。この128番目のシステインをアラニンに変異させたコアタンパク質は野性型の組換え体HCVの感染粒子産生を抑制した。この128番目のシステイン残基はこれまで報告されているHCVの遺伝子配列のすべてにおいて保存されているため、このジスルフィド結合そしてそれに関わる細胞因子を制御することですべてのHCV株の粒子形成を抑制することが可能になり、その増殖を制御する新たな抗HCV薬開発の標的になることが考えられた。

研究分担者氏名・所属機関名及び所属機関における職名
土方 誠・京都大学・准教授

A. 研究目的

組換え体HCVおよびレプリコン細胞を用いてHCVと宿主細胞との相互作用の網羅的な解析をおこない、このウイルスの感染増殖に関連する細胞因子の同定とその機能の詳細を解明し、これを抑制することによる抗HCV戦略構築を目指した。

B. 研究方法

1. 組換え体HCV感染性ウイルス産生細胞および対照として非産生細胞から感染性ウイルス産生に機能することが知られている脂肪滴および小胞体を分画し、その総タンパク質のプロテオーム解析をおこない。ウイルス産生細胞特異的に存在するタンパク質の同定をおこな

った。

- 1において見出したHCVコアタンパク質のジスルフィド結合によって形成された複合体の生化学的解析および組換え体HCV感染性ウイルス産生細胞内における動態、ならびに人工的な変異体解析によるコアタンパク質のジスルフィド結合部位の同定をおこなった。
3. 野性型組換え体HCVと変異型組換え体HCVのそれぞれの合成RNAゲノムを培養細胞に導入することで変異型コアタンパク質の性状解析をおこなった。

(倫理面への配慮)

この研究は倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

1. 組換え体HCV感染性ウイルス産生細胞から得た脂肪滴および小胞体画分の総タンパク質の

プロテオーム解析によって、この細胞に特異的に存在するタンパク質をいくつか見出した。しかしながら、それらは既に報告されているものであった。しかしながら、その解析過程で培養上清中、脂肪滴、そして小胞体画分の HCV コアタンパク質がジスルフィド結合によって複合体を形成しているものが存在することを見出した。

2. 組換え体 HCV 感染性ウイルス産生細胞培養上清を浮遊密度勾配遠心法により分画し、ウイルス粒子画分を解析したところ、この分画に存在する HCV コアタンパク質はそのほとんどが複合体であることがわかった。
3. HCV コアタンパク質だけを培養細胞に発現させてもその複合体は観察されたため、野性型のコアタンパク質とエピトープタグ付きのコアタンパク質の双方を同時に培養細胞で発現させたところ野性型とタグ付きのコアタンパク質からなる複合体が観察され、この複合体がジスルフィド結合によって形成された二量体コアタンパク質であることがわかった。
4. コアタンパク質中の一アミノ酸変異解析によりこのジスルフィド結合は 128 番目のシステインで形成されることがわかった。またこのシステインをアラニンに置換させた変異体組換え体 HCV は感染性粒子の産生が著しく抑制された。
5. 野性型とこの変異体組換え体 HCV の RNA を同時に培養細胞 HuH7 細胞に導入すると野性型に由来する感染性粒子産生が変異体の量依存的に抑制されることがわかり、変異体がドミナントネガティブ体として働くことがわかった。

D. 考察

1. HCV の感染性粒子中のコアはそのほとんどがジスルフィド結合で形成された二量体で構成されており、この二量体同士が以前報告されたホ

モティピックな相互作用により多量体を形成し、粒子を形作ることが考えられた。

2. このジスルフィド結合を阻害する変異により感染性粒子産生が抑制されるため、この二量体形成は粒子産生に重要な役割をもつと考えられる。
3. このジスルフィド結合に関与する 128 番目のシステインはこれまで報告されているすべての HCV 株のコア配列で保存されているため、このジスルフィド結合を阻害することは抗 HCV 薬の良い標的となりうると考えられる。

E. 結論

1. HCV の粒子中のコアタンパク質はその大部分がジスルフィド結合による二量体を形成しており、この構造が粒子の形成に重要な役割を有すると考えられる。
2. ジスルフィド結合はコアが最初に翻訳・プロセッシングによって産生される小胞体において形成されているが、この領域においてこのジスルフィド結合を形成するメカニズムを明らかにすることは新しい抗 HCV 薬開発に重要な情報となりうると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文

- 1) Hussein H. Aly, Yue Qi, Kimie Atsuzawa, Nobuteru Usuda, Yasutsugu Takada, Yasuhiro 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、脇田隆字、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、脇田隆字、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。