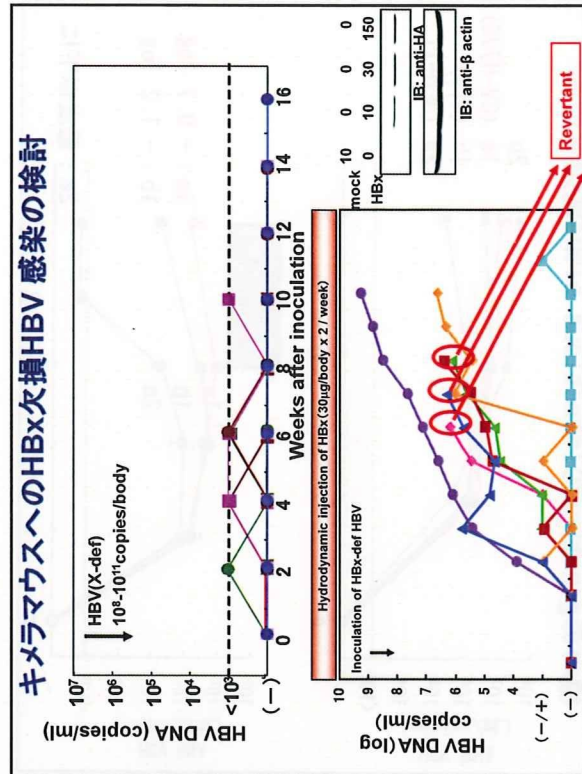
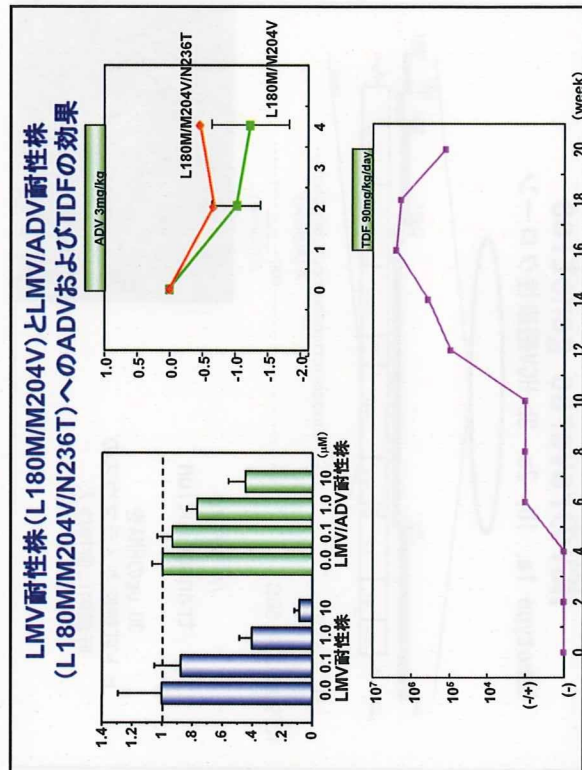
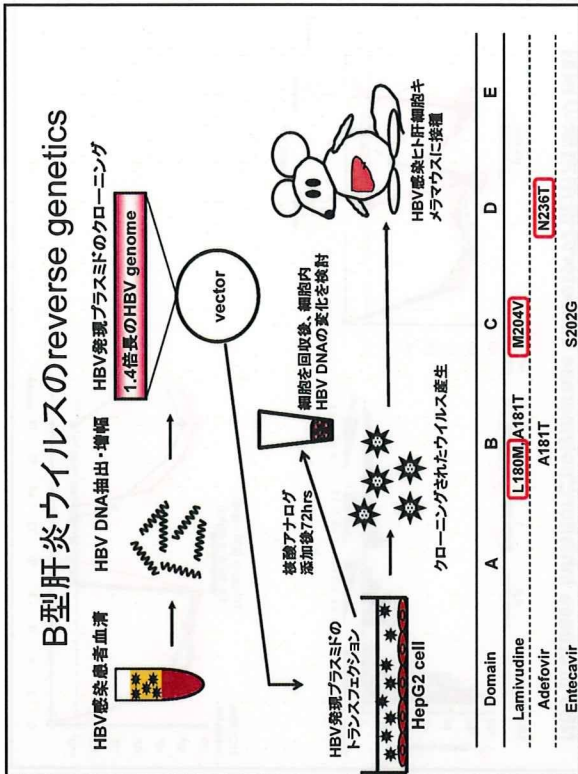
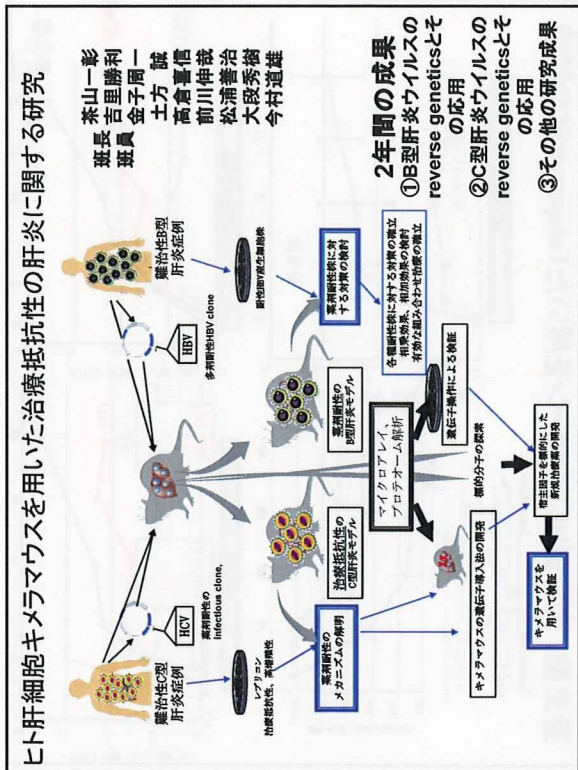


- Y, Murashima N, Ikeda K. Deletions in the hepatitis B virus core gene may influence the clinical outcome in hepatitis B e antigen-positive asymptomatic healthy carriers. *J Med Virol*. 1998
- (447) Kobayashi M, Chayama K, Fukuda M, Tsubota A, Suzuki Y, Arase Y, Koida I, Saitoh S, Murashima N, Ikeda K, Koike H, Hashimoto M, Miyano Y, Kobayashi M, Kumada H. Biochemical and histological features of hepatitis G virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 1998
- (448) Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Koida I, Arase Y, Fukuda M, Chayama K, Murashima N, Kumada H. Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepatitis: a prospective observation of 2215 patients. *J Hepatol*. 1998
- (449) Fukuda M, Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Murashima N, Ikeda K, Kumada H. Predictive factors in eradicating hepatitis C virus using a relatively small dose of interferon. *J Gastroenterol Hepatol*. 1998
- (450) Ikeda K, Kumada H, Saitoh S, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Koida I, Fukuda M, Arase Y, Chayama K, Murashima N, Tango T. A randomized controlled trial of interferon- α in patients with cirrhosis caused by 2a/2b genotype hepatitis C virus. *J Hepatol*. 1998
- (451) Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Kobayashi M, Tsubota A, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Murashima N, Ikeda K, Kumada H. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology*. 1998
- (452) Kobayashi M, Kumada H, Arase Y, Chayama K, Kobayashi M, Tsubota A, Koida I, Saitoh S, Suzuki Y, Murashima N, Ikeda K, Miyano Y, Mizoshita K, Matsuda M, Koike H, Hashimoto M. Usefulness of hepatitis C virus RNA counts by second generation HCV bDNA-probe in chronic hepatitis C based on the HCV genotype. *J Gastroenterol*. 1998
- (453) Yasui M, Park YD, Okamura T, Chayama K, Yoshimoto T, Inoue M, Yagi K, Kawa K. CD34+ progenitor cell transplantation from two HLA-mismatched healthy fathers to two infants with severe aplastic anemia. *Int J Hematol*. 1998
- (454) Suzuki F, Chayama K, Nakajima T, Kawasaki T, Kumada H, Yoshimi T. Case report: Clinical and virological analyses of a patient positive for hepatitis C virus-RNA by branched DNA assay but negative for anti-hepatitis C virus antibodies. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997
- (455) Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Fukuda M, Koida I, Arase Y, Chayama K, Murashima N, Kumada H. Interferon decreases hepatocellular carcinogenesis in patients with cirrhosis caused by the hepatitis B virus: a pilot study. *Cancer*. 1998
- (456) Chayama K, Kobayashi M, Ikeda K, Kumada H. Effect of interferon therapy on viral titers in patients with chronic hepatitis C who are positive for hepatitis GB virus C. *J Hepatol*. 1997
- (457) Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, Tsubota A, Koida I, Kobayashi M, Arase Y, Chayama K, Murashima N, Kumada H. Effect of arterial administration of a high molecular weight anti-tumor agent, styrene maleic acid neocarzinostatin, for multiple small liver cancer—a pilot study. *J Gastroenterol*. 1997
- (458) Tsubota A, Kumada H, Chayama K, Arase Y, Saitoh S, Koida I, Suzuki Y, Kobayashi M, Murashima N, Ikeda K, Suzuki Y, Kobayashi M, Murashima N, Ikeda K. Time course of histological changes in patients with a sustained biochemical and virological response to interferon- α therapy for chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 1997
- (459) Park YD, Yasui M, Yoshimoto T, Chayama K, Shimono T, Okamura T, Inoue M, Yumura-Yagi K, Kawa-Ha K. Changes in hemostatic parameters in hepatic veno-occlusive disease following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1997
- (460) Arase Y, Ikeda K, Murashima N, Chayama K, Tsubota A, Koida I, Suzuki Y, Saitoh S, Kobayashi M, Kumada H. The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. *Cancer*. 1997
- (461) Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, Koida I, Tsubota A, Kobayashi M, Arase Y, Chayama K, Murashima N, Kumada H. A prospective randomized administration of 5'-deoxy-5-fluorouridine as adjuvant chemotherapy for hepatocellular carcinoma treated with transcatheter arterial chemoembolization. *Am J Clin Oncol*. 1997
- (462) Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Okamoto K, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Suzuki Y, Murashima N, Ikeda K, Kumada H. Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 1997
- (463) Ikeda K, Chayama K, Saitoh S, Koida I, Suzuki Y, Tsubota A, Kobayashi M, Arase Y, Murashima

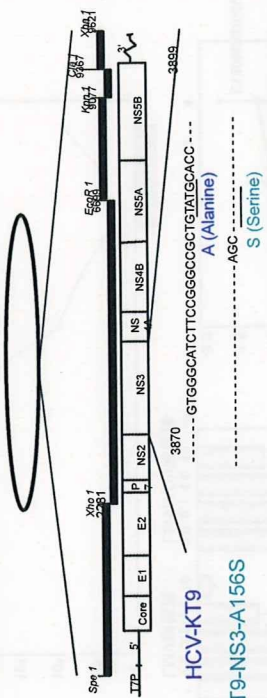
- N, Kumada H. Hepatitis C virus subtype 3b infection in a hospital in Japan: epidemiological study. *J Gastroenterol.* 1996
- (464) Tsubota A, Kumada H, Chayama K, Arase Y, Saitoh S, Koida I, Murashima N, Suzuki Y, Kobayashi M, Takagi K, Kobayashi M, Ikeda K. Relationship between pretreatment viremia level and response to interferon- α therapy in chronic hepatitis C differs in viral type 1 and 2 infections. *Dig Dis Sci.* 1996
- "(465) Arase Y, Chayama K, Tsubota A, Murashima N, Suzuki Y, Koida I, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H, Kobayashi M, Suzuki H. A randomized, double-blind, controlled trial of natural interferon- β therapy for e-antigen-negative chronic hepatitis B patients with abnormal transaminase levels. *J Gastroenterol.* 1996
- (466) Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Murashima N, Ikeda K, Kumada H. A pilot study of corticosteroid priming for lymphoblastoid interferon α in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1996
- (467) Chayama K, Tsubota A, Arase Y, Saitoh S, Ikeda K, Matsumoto T, Hashimoto M, Kobayashi M, Kanda M, Morinaga T. Genotype, slow decrease in virus titer during interferon treatment and high degree of sequence variability of hypervariable region are indicative of poor response to interferon treatment in patients with chronic hepatitis type C. *J Hepatol.* 1995
- (468) Saitoh S, Ikeda K, Koida I, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Arase Y, Chayama K, Murashima N, Kumada H. Diagnosis of hepatocellular carcinoma by concanavalin A affinity electrophoresis of serum alpha-fetoprotein. *Cancer.* 1995
- (469) Saitoh S, Ikeda K, Koida I, Tsubota A, Arase Y, Chayama K, Kumada H. Serial hemodynamic measurements in well-differentiated hepatocellular carcinomas. *Hepatology.* 1995
- (470) Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Tsubota A, Arase Y, Chayama K, Kumada H. A prospective randomized evaluation of a compound of tegafur and uracil as an adjuvant chemotherapy for hepatocellular carcinoma treated with transcatheter arterial chemoembolization. *Am J Clin Oncol.* 1995
- (471) Chayama K, Kobayashi M, Tsubota A, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Molecular analysis of intraspousal transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol.* 1995
- (472) Tamari Y, Chayama K, Tsuji H. Longitudinal study on selenium content in human milk particularly during early lactation compared to that in infant formulas and cow's milk in Japan. *J Trace Elem Med Biol.* 1995
- (473) Chayama K, Tsubota A, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Nucleotide sequence of hepatitis C virus (type 3b) isolated from a Japanese patient with chronic hepatitis C. *J Gen Virol.* 1994
- (474) Saitoh S, Ikeda K, Koida I, Tsubota A, Arase Y, Chayama K, Kumada H. Serum des-gamma-carboxyprothrombin concentration determined by the avidin-biotin complex method in small hepatocellular carcinomas. *Cancer.* 1994
- (475) Kobayashi M, Kumada H, Chayama K, Arase Y, Saitoh S, Tsubota A, Koida I, Ikeda K, Hashimoto M, Iwasaki S. Prevalence of HCV genotype among patients with chronic liver diseases in the Tokyo metropolitan area. *J Gastroenterol.* 1994
- (476) Saitoh S, Ikeda K, Koida I, Tsubota A, Arase Y, Chayama K, Kumada H. Small hepatocellular carcinoma: evaluation of portal blood flow with CT during arterial portography performed with balloon occlusion of the hepatic artery. *Radiology.* 1994
- (477) Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Tsubota A, Arase Y, Chayama K, Kumada H. Imaging diagnosis of small hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 1994
- (478) Arase Y, Kumada H, Chayama K, Tsubota A, Koida I, Ikeda K, Saitoh S, Matsumoto T, Kobayashi M. Interferon retreatment of nonresponders with HCV-RNA-positive chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 1994
- (479) Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology.* 1994
- (480) Tsubota A, Chayama K, Ikeda K, Yasuji A, Koida I, Saitoh S, Hashimoto M, Iwasaki S, Kobayashi M, Hiromitsu K. Factors predictive of response to interferon- α therapy in hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 1994
- (481) Chayama K, Arase Y, Koida I, Tsubota A, Saitoh S, Ikeda K, Matsumoto T, Kanda M, Iwasaki S, Kobayashi M. Antiviral effect of lymphoblastoid interferon- α on hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis type C. *J Gastroenterol Hepatol.* 1994

- (482) Tsubota A, Chayama K, Arase Y, Koida I, Saitoh S, Ikeda K, Iwasaki S, Matsumoto T, Kobayashi M, Kumada H. Factors useful in predicting the response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 1993
- (483) Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Arase Y, Tsubota A, Chayama K, Kumada H, Kawanishi M. A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology*. 1993
- (484) Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Tsubota A, Arase Y, Chayama K, Kumada H. Diagnosis and follow-up of small hepatocellular carcinoma with selective intraarterial digital subtraction angiography. *Hepatology*. 1993
- (485) Chayama K, Tsubota A, Arase Y, Saitoh S, Ikeda K, Matsumoto T, Sakai Y, Kobayashi M, Morinaga T, Kumada H. Effect of lymphoblastoid alfa-interferon in patients with chronic hepatitis C having different genotypic subtype of hepatitis C virus. *Gastroenterol Jpn*. 1993
- (486) Chayama K, Tsubota A, Arase Y, Saitoh S, Koida I, Ikeda K, Matsumoto T, Kobayashi M, Iwasaki S, Koyama S. Genotypic subtyping of hepatitis C virus. *J Gastroenterol Hepatol*. 1993
- (487) Ikeda K, Saitoh S, Tsubota A, Arase Y, Chayama K, Kumada H, Watanabe G, Tsurumaru M. Risk factors for tumor recurrence and prognosis after curative resection of hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1993
- (488) Arase Y, Kumada H, Chayama K, Tsubota A, Ikeda K, Saitoh S, Sakai Y, Matsumoto T, Kobayashi M. Alanine aminotransferase and HCV-RNA responses following interferon therapy of HCV-RNA positive chronic hepatitis. *Gastroenterol Jpn*. 1992
- (489) Ikeda K, Kumada H, Saitoh S, Arase Y, Chayama K. Effect of repeated transcatheter arterial embolization on the survival time in patients with hepatocellular carcinoma. An analysis by the Cox proportional hazard model *Cancer*. 1991
- (490) Chayama K, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Matsumoto T, Sakai Y, Kobayashi M, Unakami M, Morinaga T, Kumada H. Effect of interferon administration on serum hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1991

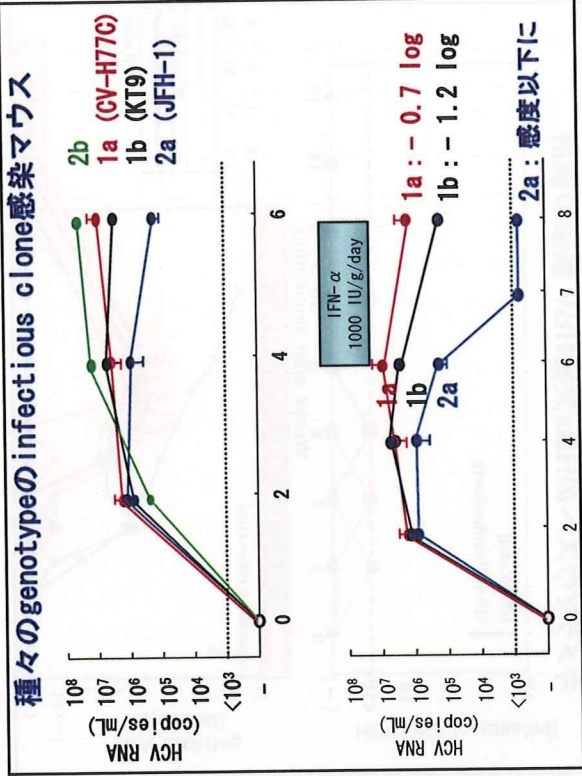


HCVのreverse genetics

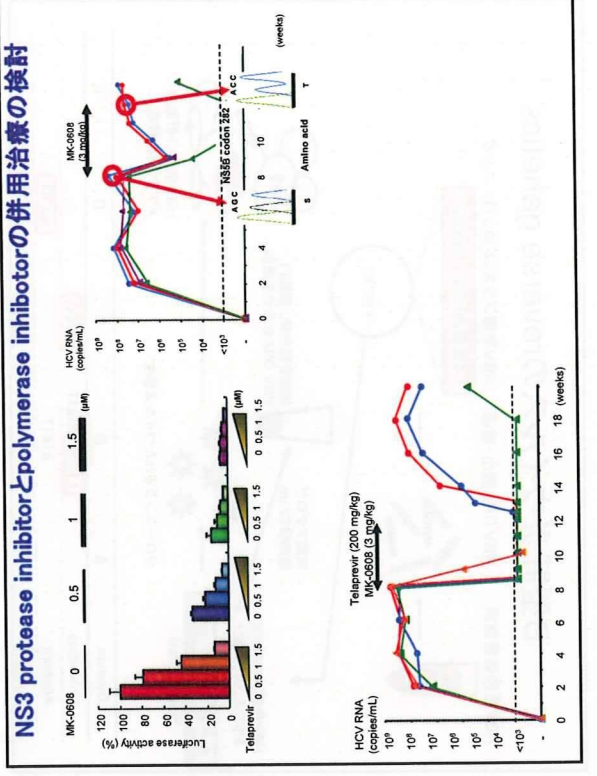
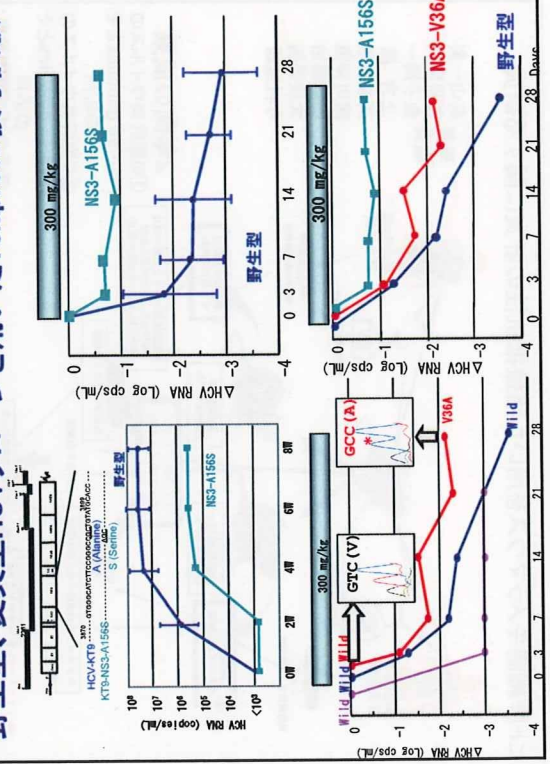
Genotype 1a, 1b, 2a, 2b HCV感染性クローン



in vitro transcription
30 ugのRNAを
ヒト肝細胞キメラマウスの
肝臓内に直接注入



野生型、変異型HCVクローンをを用いたTelaprevir投与試験



平成 21 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：肝炎ウイルスワクチン実用化のための基盤的研究

課題番号：H20-肝炎一般-010

研究代表者：石井 孝司

I. 研究の意義

- (1) C型肝炎ウイルス(HCV)感染は持続感染化し、肝細胞癌を発症する重大な感染症である。しかし、インターフェロンおよびリバビリンによる治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少しているが、医療従事者などハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待され、HCV のワクチン開発が望まれている。
- (2) HCV ワクチンが、HCV 感染に対する新たな予防法および治療法となれば、多くの患者の社会復帰を可能にし、医療保険のコスト軽減に寄与できると考えられる。また、予防用ワクチンを世界に先駆けて開発することにより、HCV キャリアー率の高い国々への国際協力が可能となる。医療関係者だけでなく、薬物常用者などへの接種も考えられる。最近では HIV 感染において HCV の重感染が問題となっている。このため HIV 感染者に対する感染防御も必要である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) ワクチン実用化に向けたウイルス産生法および精製法向上
- (2) 効果的な免疫法の検討
- (3) Genotype に関わらず感染中和活性を誘導できるワクチンの開発
- (4) ウイルス様中空粒子産生系およびウイルス抗原を用いた安全な組換えワクチンの開発
- (5) ワクチン効果を実証できる動物モデルの開発
- (6) 感染中和機構に重要な HCV の初期感染過程の解析

III. 2年間の研究成果

・研究代表者(石井孝司)

- (1) ヒト肝癌由来細胞を用いて、感染性のある HCV 中空粒子を恒常的に産生する系を確立した。
- (2) 中空粒子中に外来遺伝子を包埋し、感染細胞で目的遺伝子を発現させることに成功した。
- (3) 3種類のプラスミドトランスフェクションにより、感染性粒子を産生させる系の確立に成功した。
- (4) 粒子の感染性に NS2 領域が重要であることを証明した。

・研究分担者(脇田隆宇、中村紀子)

- (1) HCV の E1、E2 タンパク質を動物細胞で大量に発現し精製することに成功した。
- (2) 感染性 HCV 粒子 (J6/JFH-1 ウイルス) を高純度に精製することに成功した。
- (3) E2 タンパク質および不活化精製 HCV 粒子を種々のアジュバントを用いてマウスに投与し、感染中和活性をもつ抗体が誘導されるアジュバントを探索。HCV 粒子を抗原とした場合、高中和抗体が誘導されるアジュバントを見出し特許出願した。
- (4) (2) で得られた高純度 HCV 粒子をマウスに免疫し、感染阻害活性を持つ抗体の誘導を指標に本高純度 HCV 粒子にワクチン能があることを確認した。さらに、取得した感染阻害活性を持つモノクローナル抗体のエピトープを解析し、特許出願した (2件)。

・研究分担者(明里宏文)

- (1) 長期慢性C型肝炎の霊長類モデルを初めて作出した。マウスモデルと異なり正常な免疫機能が保持されたサル類において、ウイルス特異的免疫応答に対して連続的なエスケープ変異により長期持続感染が成立し慢性肝炎を呈するなどヒトC型肝炎に極めて近似することが示された。
- (2) 新規抗ウイルス薬やC型肝炎予防治療ワクチンの評価系として期待される、肝細胞で複製可能な HCV/GBV-Bキメラウイルスを構築した。
- (3) C型肝炎予防治療ワクチンのフィージビリティスタディに着手した。

・研究分担者(加藤孝宣)

- (1) JFH-1 株の長期培養により、培養細胞内で効率的にウイルス粒子を生成する適応変異ウイルスを得た。しかし、ダイレクトシーケンス法でそのウイルスに同定された変異を JFH-1 株に戻しても同等の粒子生成能は認めなかった。そこで、適応ウイルスを限界希釈し 96 ウェルプレートに播き、増殖効率の良い株を分離することで、粒子生成能に関与する新たな変異を同定した。これらの変異を導入した JFH-1 株では、適応変異ウイルスと同程度の粒子生成能が確認された。

・研究分担者(松本美佐子)

- (1) HCV は樹状細胞に感染せず、HCV の dsRNA を含む感染細胞の debris が樹状細胞に取り込まれ TLR3-TICAM-1 経路を活性化し NK, T 細胞を活性化することを明らかにした
- (2) 樹状細胞の TLR3-TICAM-1 経路を細胞外から活性化できる新規合成 RNA 分子を開発した。

IV. 22年度の課題

- (1) ウイルス培養系におけるウイルス産生の向上とウイルス精製法の改良。
- (2) 高中和抗体を誘導するアジュバントにより誘導される細胞性免疫の解析。
- (3) 慢性霊長類モデルにおける抗ウイルス免疫応答に対するエスケープ変異の免疫学的解析を行ない、その機能的意義を明らかにする。
- (4) 感染性を有する HCV/GBV-B キメラウイルスの構築及びこれを用いたサル類への感染実験を実施する。
- (5) 高いウイルス粒子生成能を持つ JFH-1 変異株がどのような機序でウイルス粒子生成能を増強しているかを検討し、さらに効率の良いシステムの確立を目指す。また、得られた変異が他の HCV 株やキメラ株でも同様の効果をもたらすかどうか普遍性についても検討する。
- (6) 合成 RNA 分子のエンドソーム配送機構の解明とアジュバント効果の査定を行う。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 感染予防が可能なワクチンが開発できれば、医療従事者などのハイリスクグループに対処することが可能となる。
- (2) 中和抗体による感染防御が可能となれば、針刺し事故などの医療事故にも対処可能となる。
- (3) 予防用ワクチンを世界に先駆けて開発することができれば HCV キャリアー率の高い国々への国際協力が可能となる。特に海外に多い薬物常用者の HCV 感染や HIV 感染者の HCV 重感染の予防が可能となりその意義は大きい。
- (4) 治療用ワクチンの開発も期待されている。HCV の新たな治療法となれば、多くの患者の社会復帰を可能にし、医療保険のコスト軽減に寄与できる

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

主任研究者 石井孝司

1. Ishii K., Murakami K., Hmwe S., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371: 446-450 (2008)
2. Ishii K., Iijima S., Kimura N., Lee Y.-J., Ageyama N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Iwata N., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues *in vivo*. *Microbes and Infection*, 9, 515-521 (2007)
3. Murakami K., Ishii K., Ishihara Y., Yoshizaki S., Tanaka K., Gotoh Y., Aizaki H., Kohara M., Yoshioka H., Mori Y., Manabe N., Shoji I., Sata T., Bartenshalager R., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351: 381-392 (2006)

分担研究者 脇田隆字

1. Hara H., Aizaki H., Matsuda M., Shinkai-Ouchi F., Inoue Y., Murakami K., Shoji I., Kawakami H., Matsuura Y., Lai M.M., 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.* 83: 5137-5147 (2009)
2. Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol.* 2008 82: 7964-76.
3. Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2008 82: 5715-24.

分担研究者 明里宏文

1. Akari H, Iwasaki Y, Yoshida T, Iijima S. Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection. *Microbiology and Immunology*, in press.
2. Yokota T, Iijima S, Kubodera T, Ishii K, Katakai Y, Ageyama N, Chen Y, Lee Y-J, Unno N, Nishina K, Iwasaki Y, Maki N, Mizusawa H, and Akari H: Efficient regulation of viral replication by systemically administered siRNA with cationic liposome in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361, 294-300 (2007)
3. Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee Y-J, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, and Akari H: GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues *in vivo*. *Microbes and Infection* 9, 515-521 (2007)

分担研究者 加藤孝宣

1. Kato T, Choi YK, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology*, 48: 732-740 2008.
2. Kato T, Matsumura T, Heller T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J Virol*, 81: 4405-4411 2007.
3. Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc*, 1: 2334-2339 2006.

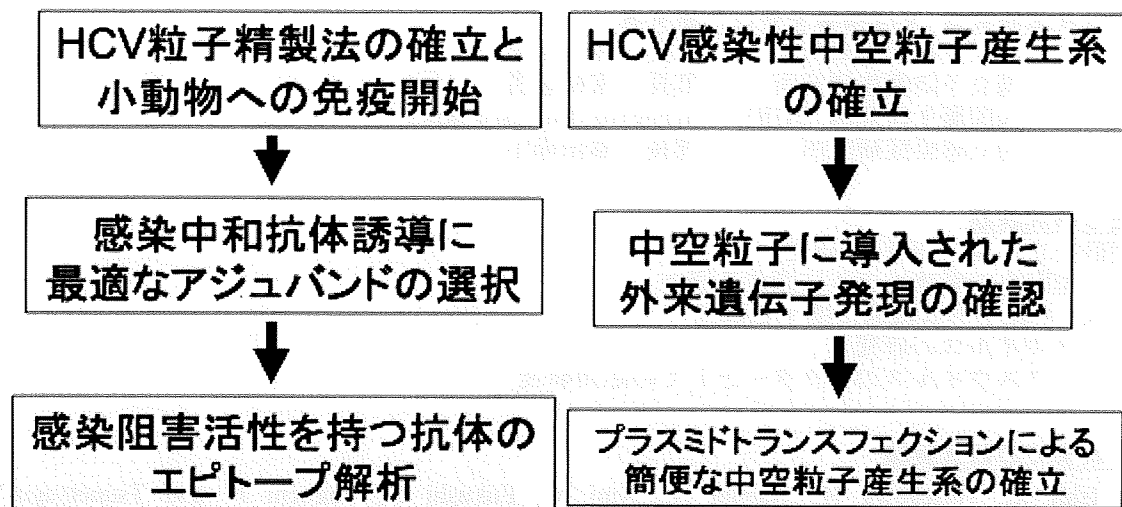
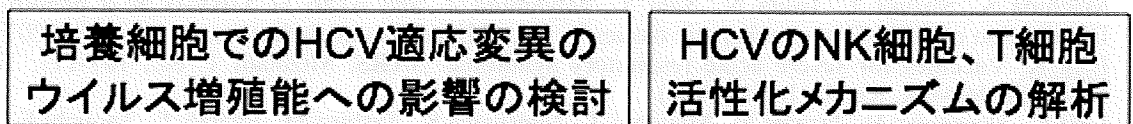
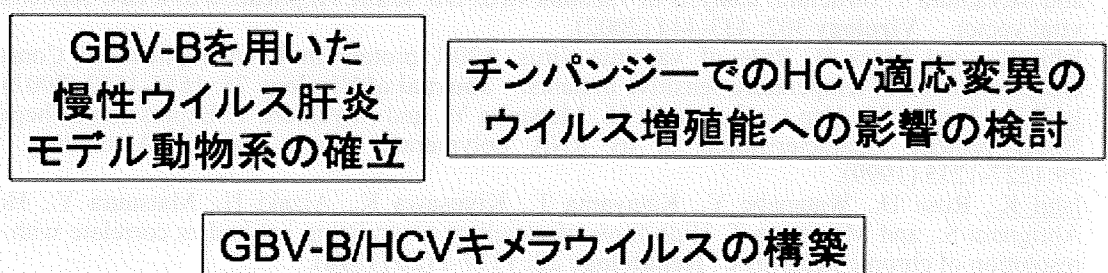
分担研究者 中村紀子

1. Akazawa D., Date T., Morikawa K., Murayama A., Omi N., Takahashi H., Nakamura N., Ishii K., Suzuki T., Mizokami M., Mochizuki H. and Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371: 747-751 (2008)

分担研究者 松本美佐子

1. Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya. 2008. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* (in press).
2. Matsumoto M., and T. Seya. 2008. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *ADDR* 60: 805-812.
3. Ebihara, T., M. Shingai, M. Matsumoto, T. Wakita, and T. Seya. 2008. Hepatitis C virus (HCV)-infected apoptotic cells extrinsically modulate dendritic cell function to activate T cells and NK cells. *Hepatology*. 48: 48-58.

VII. III (2年間の研究成果)の概要図等

C型肝炎ワクチン候補の作成と検討**細胞培養系での感染防御メカニズムの検討****HCV感染動物モデルの作成と応用**

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

(所属)	(職 名)	(在職期間)
帝人生物医学研究所	研究員	平成1年～6年
国立予防衛生研究所 (現・国立感染症研究所)	研究員	平成7年～11年
米国衛生研究所 (NIH)	research fellow	平成11年～13年
国立感染症研究所	主任研究官	平成13年～20年
国立感染症研究所	室長	平成20年～現在

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

帝人生物医学研究所	所長：島 武男
国立予防衛生研究所	部長：宮村達男
米国衛生研究所 (NIH)	Director: Bernard Moss
国立感染症研究所	部長：脇田隆字

・主な研究課題

- C型肝炎ウイルス(HCV)の研究
 - C型肝炎の動物モデルに関する研究
 - HCVの粒子形成機構に関する研究
- ポックスウイルスの研究
 - ポックスウイルスのベクターとしての応用研究

・これまでの研究実績

1. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Ami Y., Fukushi S., Taguchi F. and Tsunetsugu-Yokota Y. Vaccine-induced neutralizing antibody against SARS-CoV Spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. **Microbiology and Immunology** 53: 75-82 (2009)
2. Ishii K., Murakami K., Hmwe S., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 371: 446-450 (2008)
3. Ishii K., Iijima S., Kimura N., Lee Y.-J., Ageyama N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Iwata N., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. **Microbes and Infection**, 9, 515-521 (2007).
4. Ishii K. Vaccines for severe acute respiratory syndrome. **SARS**, Mizutani T. ed.: 107-117, Transworld Research Network, Kerala, India (2006).
5. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Tsunetsugu-Yokota Y. and Miyamura T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs. **Virology** 351: 368-380 (2006).
6. Ishii K., and Moss B. Mapping Interaction Sites of the A20R Protein, a Component of the Vaccinia Virus DNA Replication Complex. **Virology** 303: 232-239 (2002).
7. Ishii K., Ueda Y., Matsuo K., Matsuura Y., Kitamura T., Kato K., Izumi Y., Someya K., Ohsu T., Honda M. and Miyamura T. Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: Application as a new replication-deficient viral vector. **Virology** 302: 433-444 (2002).
8. Ishii K., and Moss B. Role of vaccinia virus A20R protein in DNA replication: Construction and characterization of temperature-sensitive mutants. **Journal of Virology** 75: 1656-1663 (2001).
9. Ishii K., Tanaka Y., Yap C.-C., Aizaki H., Matsuura Y., and Miyamura T. Expression of hepatitis C virus NS5B protein: Characterization of its RNA polymerase activity and RNA binding. **Hepatology** 29:1227-1235 (1999).
10. Ishii K., Rosa D., Watanabe Y., Katayama T., Kiyosawa K., Aizaki H., Matsuura Y., Houghton M., Abrignani S., and Miyamura T. High titres of envelope neutralizing antibodies correlate with spontaneous resolution of chronic hepatitis C. **Hepatology** 28: 1117-1120 (1998).
11. Ishii K., Yamagami S., Tanaka H., Motoki M., Suwa Y., and Endo N. Full active Baculovirus expressed human monocyte chemoattractant protein 1 with the intact N-terminus. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 206: 955-961 (1995).
12. Ishii K., Iwasaki M., Inoue S., Kenny P.T.M., Komura H., and Inoue Y. Free sialooligosaccharides found in the unfertilized eggs of a freshwater trout, *Plecoglossus altivelis*. A large storage pool of complex-type bi-, tri-, and tetraantennary sialooligosaccharides. **Journal of Biological Chemistry** 264: 1623-1630 (1989).

研究課題名：肝炎ウイルスワクチン実用化のための基礎的研究

(H20 - 肝炎 - 一般 - 010)

C型肝炎ワクチン候補の作成と検討

(不活化粒子、精製エンペロープ蛋白、中空粒子)

- JFH-1、J6/JFH-1の大量培養とウイルス粒子精製法の確立
- マウスへの免疫、抗血清のウイルス中和能の確認
- 至適アジュバントの探索とアジュバント取り込み機構の解析
- 無血清条件下でのウイルス培養の検討(精製工程の簡便化)
- JFH-1への変異導入による高増殖性ウイルスの取得
- プラスミドトランスフェクションによる簡便な中空粒子産生系の確立

HCV感染モデルの作成とワクチン評価への応用

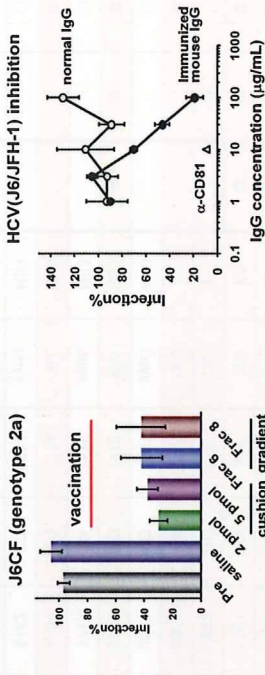
- GBV-Bと小型霊長類を用いた慢性ウイルス肝炎モデルの確立
- HCV/GBV-Bキメラウイルスの作成と増殖性評価

培養細胞由来C型肝炎ウイルス粒子を利用したワクチンの免疫による感染阻害活性の誘導および最適アジュバントの検討

東レ株式会社 医薬研究所

【今年度の成果】

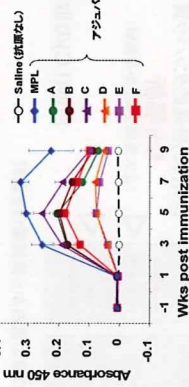
- 高複製HCV粒子の取得およびマウスでの免疫原性の確認
- ワクチン効果の高いアジュバントの最適化



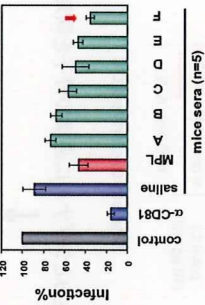
新精製法で得られた精製HCV粒子ワクチンで免疫したマウスの血清はHCV感染中和活性を示した
→ マウスよりハムプリドマを作成し、感染中和抗体 (IgG 2種) を得た (特許出願)

ワクチン免疫されたマウス血清のIgGはHCV感染中和活性を示した
→ マウスよりハムプリドマを作成し、感染中和抗体 (IgG 2種) を得た (特許出願)

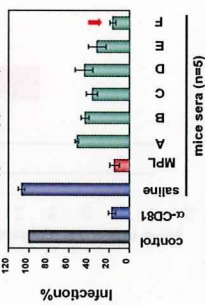
抗HCVエンペロープ抗体の検出



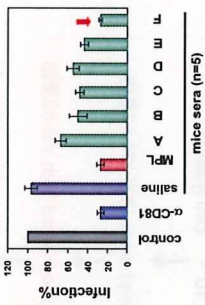
J6CF (genotype 2a)



TH (genotype 1b)



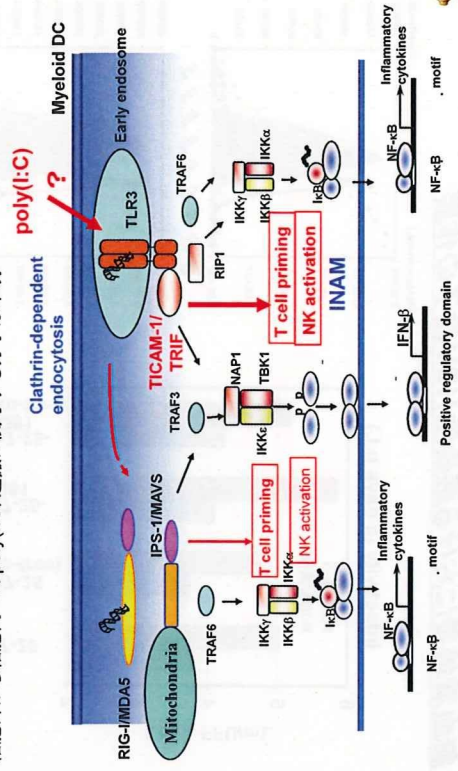
H77 (genotype 1a)



HCV新ワクチンアジュバント(MPLおよびA/GF)の効果マウスで確認した
アジュバントFを用いることでMPLと同等の汎用性ワクチンとしての効果が期待できる(特許出願済)

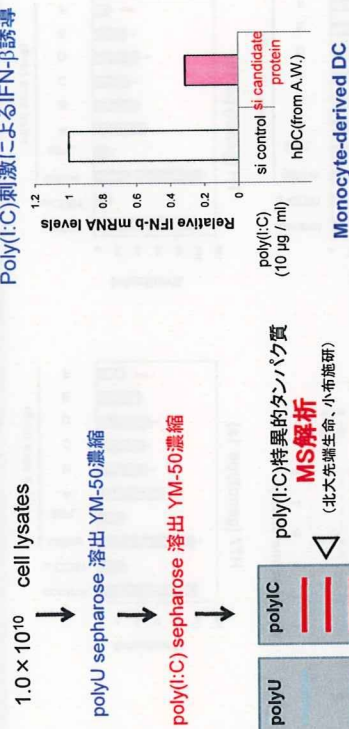
Poly(I:C) 認識と樹状細胞応答

細胞外から細胞内へのpoly(I:C) 運搬に関与する分子は不明



Poly(I:C)取り込みに関与するタンパク質の同定

Poly(I:C)刺激によるIFN-β誘導

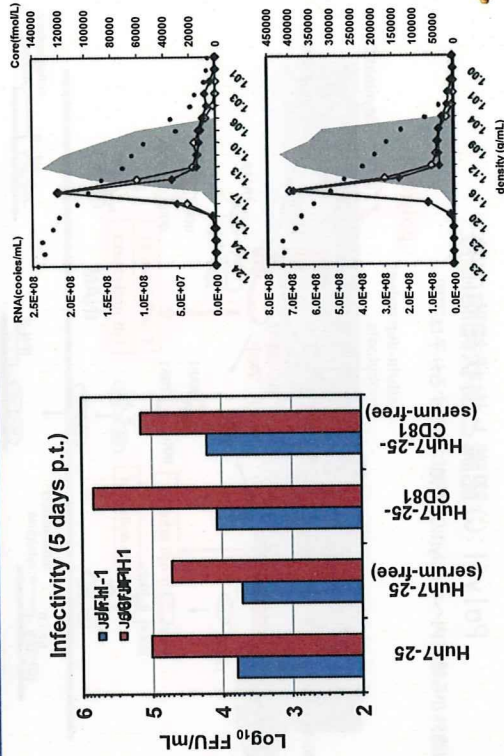


Poly(I:C)の取り込みとシグナルに必須の分子を同定した。

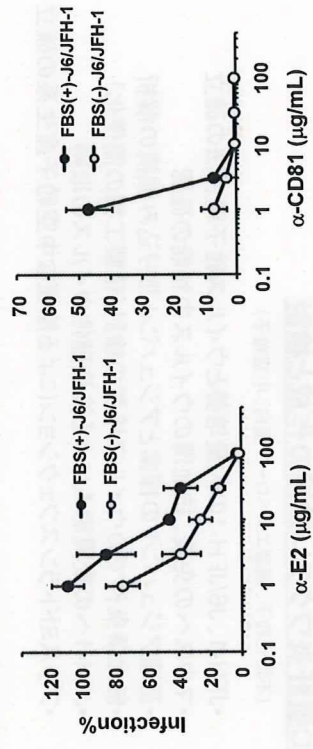
122個の蛋白から候補蛋白を選択

アジュバントの機能発現に取り込み機構が重要

無血清培養における感染性HCV粒子の作製



無血清培養HCV粒子の抗体による感染阻害

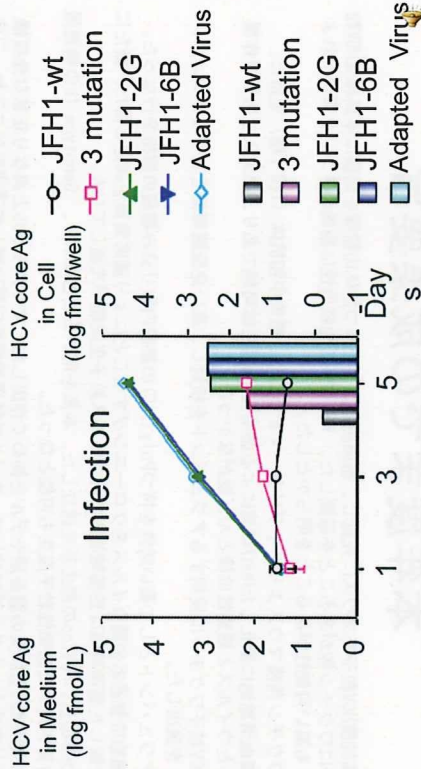


無血清培養 HCV は感染阻害の許容性が高く
ApoB, ApoE 依存的な感染を示さない

ISOLATION OF JFH-1 CELL-CULTURE ADAPTED VIRUS

nt position	nucleotide	aa position	amino acid	region	Adapted Virus	2-G	6-B
1198	C/T	286	syno.	E1	●	●	●
1587	C/A	416	T/N	E2	●	●	●
2612	T/G	758	LV	p7	●	●	●
2641	T/A	767	H/Q	p7	●	●	●
3631	A/G	1097	syno.	NS3	○	○	○
3705	A/G	1122	K/R	NS3	●	●	●
3715	G/A	1125	syno.	NS3	○	○	○
4294	A/G	1318	I/M	NS3	●	●	●
5182	C/T	1614	syno.	NS3	○	○	○
7069	G/A	2243	syno.	NS5a	○	○	○
7658	G/C	2440	V/L	NS5a	●	●	●
7913	C/T	2525	L/F	NS5b	●	●	●
8458	G/C	2706	syno.	NS5b	○	○	○
8932	C/T	2864	syno.	NS5b	●	●	●
9235	A/G	2965	syno.	NS5b	●	●	●

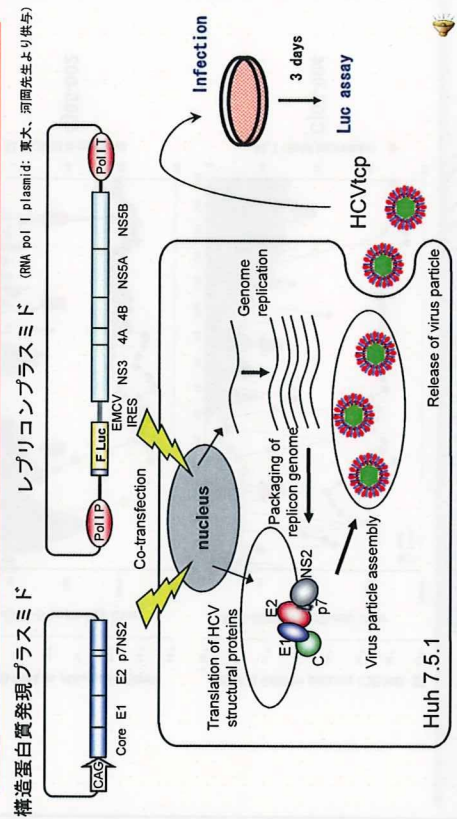
JFH-1 CELL-CULTURE ADAPTED VIRUS



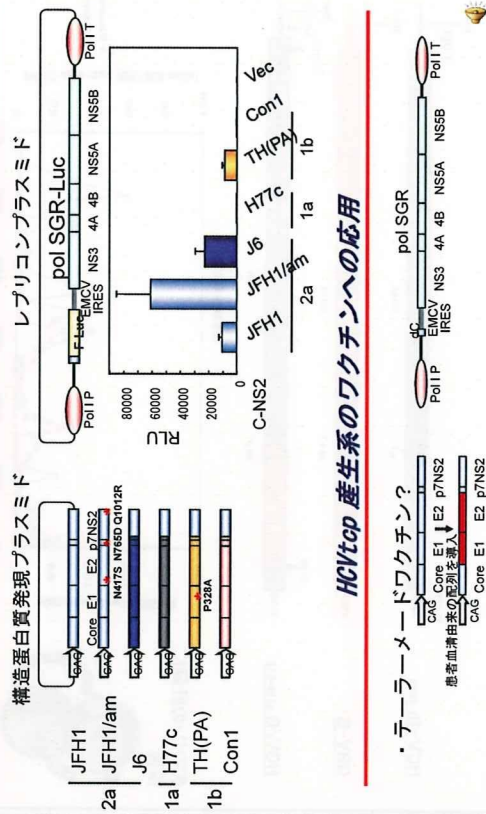
JFH-1 CELL-CULTURE ADAPTED VIRUS

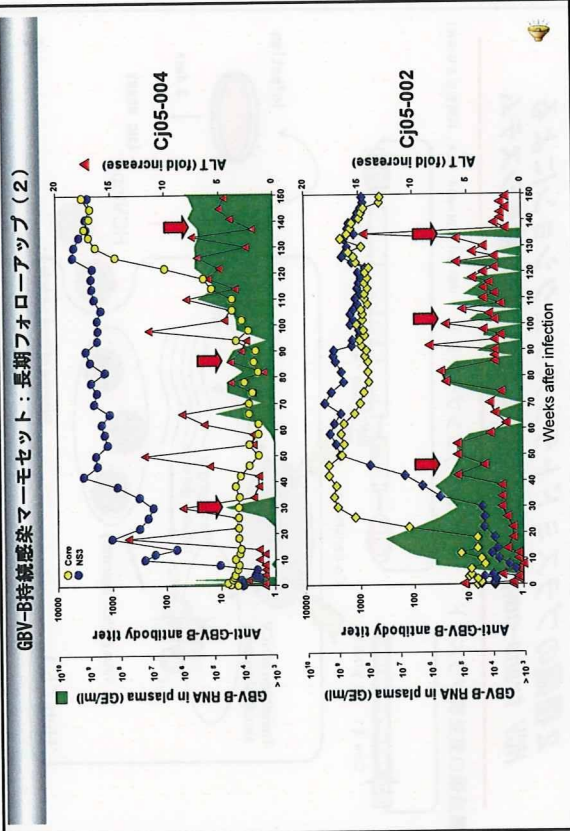
	JFH1-wt	³ Mutation	JFH1-2G	JFH1-6B
Extracellular Specific Infectivity (FFU/10 copies)	1.33×10^2	2.51×10^2	6.53×10^2	1.06×10^3
Intracellular Specific Infectivity (FFU/10 copies)	9.67×10^1	6.78×10^2	2.39×10^3	3.76×10^3
Secretion Rate (Extra/Intra)	5.56	5.05	8.13	8.50

2種類のプラスミドトランスフェクションによる HCV trans-complemented particles (tcp) 産生システム



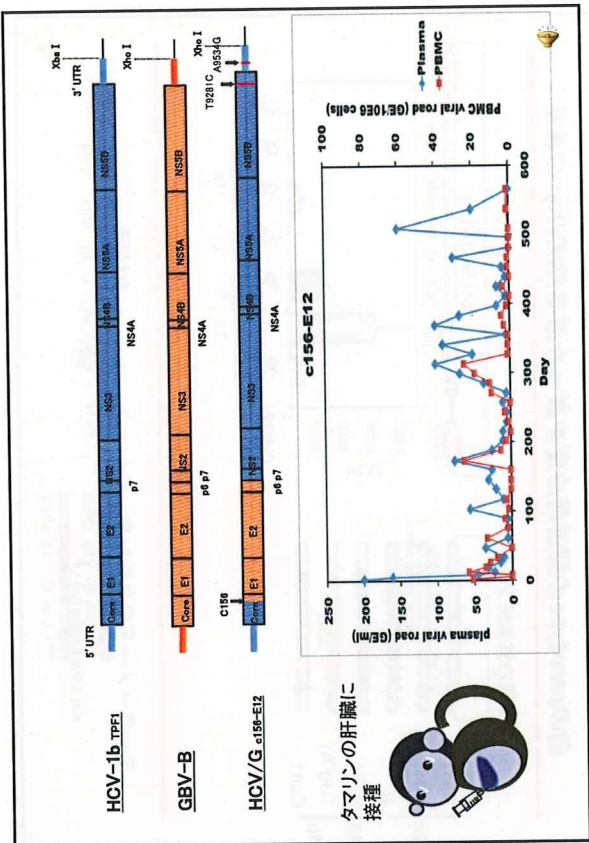
他の genotype の構造蛋白質を被った感染性 HCVtcp の産生





本年度までの成果要旨

- 高純度HCV粒子をマウスに免疫し、感染阻害活性を持つ抗体の誘導を指標に本高純度HCV粒子にワクチン能力があることを確認した。HCV粒子の免疫原性は組換えタンパク質のそれよりも高い可能性があることを明らかにした。
- ワクチン免疫マウスよりハイブリドーマを作製し、感染中和抗体 (IgG 2種) を得た。
- 無血清培地に馴化したHuH7細胞による感染性HCV産生は可能であり、血清入り培養で作製したウイルスと感染性はほとんど差がなかった。
- HCV粒子ワクチンに使用するアジュバントを検討し、高い免疫誘導能を有するアジュバントを見出した。
- アジュバントとして高い活性を持つPoly(I:C)の細胞内取り込み機構の解析を行なった。
- 細胞培養適応変異ウイルスをクロニングすることにより適応変異を同定し得た。新たに分離した高増殖株は培養細胞内でのウイルス粒子生成能が亢進していた。
- 効率の良いHCV/Hcpの産生系を確立した。本系を用いることにより、Genotype 1bの構造蛋白質を用いた感染性粒子産生も可能となった。
- 長期慢性型肝炎の霊長類モデルを初めて作出した。マウスモデルと異なり正常な免疫機能が保持されたサル類において、ウイルス特異的免疫応答に対して運命的なエスケープ変異により長期持続感染が成立し慢性肝炎を呈するなどヒト型肝炎に極めて近似的なことが示された。
- 新規抗ウイルス薬や心型肝炎予防治療ワクチンの評価系として期待される、肝細胞で複製可能なHCV/GBV-Bキメラウイルスを構築した。



今後の検討課題

- 不活化HCV粒子の精製度の向上。
- 治療ワクチンとしての可能性 (細胞性免疫の誘導効果)。
- 各種動物モデルを用いた不活化粒子のワクチン効果の検討。
- 合成RNA分子のエンドソーム配達機構の解明とアジュバント効果の査定。
- 高いウイルス粒子生成能を持つJFH-1変異株のウイルス粒子生成能増強機序の解析。
- 本変異が他のHCV株でも同様の効果をもたらすかどうか普遍性についての検討。
- 中空粒子のワクチン効果の検討。
- 慢性型霊長類モデルにおける抗ウイルス免疫応答に対するエスケープ変異の免疫学的解析。
- 感染性を有するHCV/GBV-Bキメラウイルスの構築及びこれを用いた感染実験。

平成 21 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題： C型肝炎ウイルスキャリア成立の分子基盤と新規治療薬開発のための基礎的研究

課題番号： H20-肝炎一般-011

研究代表者： 鈴木哲朗

I. 研究の意義

- (1) HCV 感染は、慢性肝炎、肝硬変、肝がんの主要因である。
- (2) 現在の治療法の有効率は約 50%であり、新たな発症予防、治療法の確立が待望されている。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) ウイルス側及び細胞側因子の関与を含め、HCV 生活環の制御機構を明らかにする。
- (2) HCV の持続感染、病原性発現の制御機構を明らかにする。
- (3) 新たな実験モデルの開発と創薬シーズの探索。

III. 2年間の研究成果

研究代表者

- (1) HCV ゲノム複製における NS4A 結合因子 CKB(ATP 産生酵素)の重要性を見出し、NS4A antagonist #806 が HCV 複製への CKB の介入を阻害し抗 HCV 作用を示すことを明らかにした。
- (2) HCV NS5A がゲノム複製だけでなく粒子産生にも重要な役割を果たすことを見出し、合成ペプチドライブラリーから HCV 産生阻害活性を有する NS5A 結合ペプチドを同定した。
- (3) HCV NS2 が感染粒子産生に必要であり、特に N 末端側膜貫通領域、C 末端領域が重要であることを明らかにした。

分担研究者 (下遠野、松浦、深澤 (征))

- (1) HCV 粒子産生にはリポ蛋白の産生またアポリポ蛋白の介在が重要であることを実証した。
- (2) NS5A 結合因子 hB-ind1 がコシャペロン活性を有し、HCV 複製調節に働くことを明らかにした。
- (3) ビメンチンが HCV Core の翻訳後修飾に介入しウイルス産生を制御することを見出した。
- (4) 既知の HCV 受容体候補分子は発現し HCV 非感受性の Huh7 細胞株を取得した。タイトジャンクション構造が感染過程に重要であることが示唆された。

分担研究者 (堀田、小池、澤崎)

- (1) HCV が糖新生系律速酵素群の機能亢進を介して糖尿病発症の素因となることを実証し、GLUT2 の発現抑制を介して糖尿病発症の素因となることを明らかにした。
- (2) HCV 感染初期における細胞内中性脂肪量の減少とウイルス増殖に伴う脂質量及び 1 価不飽和脂肪酸の増加を明らかにした。
- (3) HCV は抗酸化系の一部を減弱させ酸化ストレスを増加させることを示した。C 型肝炎における他の肝炎よりも強大な酸化ストレス産生の機序が明らかにされた。
- (4) HCV NS3 プロテアーゼによって切断される宿主リン酸化酵素を 6 種類同定した。

分担研究者 (瀬谷)

- (1) 樹状細胞の外因性 IFN 誘導経路がウイルス RNA を取り込むことにより NK ドライブ活性を発現すること、この mDC-NK 活性化を担当する樹状細胞上の膜分子 INAM を同定した。
- (2) HCV Core 結合因子 DDX3 が IPS-1 と結合し RNA の初期認識に関与することを示した。

分担研究者 (小原、加藤、深澤 (秀)、鐘ヶ江)

- (1) リポソーム製剤 NS9 が低用量 (ヒト安全使用量以下) で PEG-IFN 以上の抗ウイルス活性を示すことを見出した。IFN、NK 活性化以外の作用機序が考えられた。
- (2) HCV 全生活環を標的とする抗 HCV 薬スクリーニング系を樹立、化合物探索を行い、ビスインドリルマレイミドおよび選択的エストロゲン受容体調節物質 (Selective Estrogen Receptor Modulators) に強い抗 HCV 活性を見出した。
- (3) 新規ヒト肝癌細胞株 Li23 を樹立し、HCV レプリコン、全長 HCV RNA 複製細胞およびそのレポーターアッセイシステム、さらに HCV 持続感染システムの開発に至った。
- (4) リバビリンの抗 HCV 活性が、イノシンーリン酸デハイドロゲナーゼ (IMPDH) の阻害によるものであることを初めて明らかにした。
- (5) 多目的型肝選択性遺伝子導入アデノウイルスベクターの開発を目指し、コスミドカセットの改変を行った。

IV. 22年度の課題

- (1) HCV 感染、複製、粒子形成機構、病原性発現機構、持続感染機構の解析を発展させ、新たな創薬標

的を提示する。

- (2) 培養細胞系での抗 HCV 薬スクリーニングで得られたヒット化合物について、動物モデルでの二次評価を積極的に実施し創薬シーズの同定、特許取得を進める。

V. 行政施策への貢献の可能性

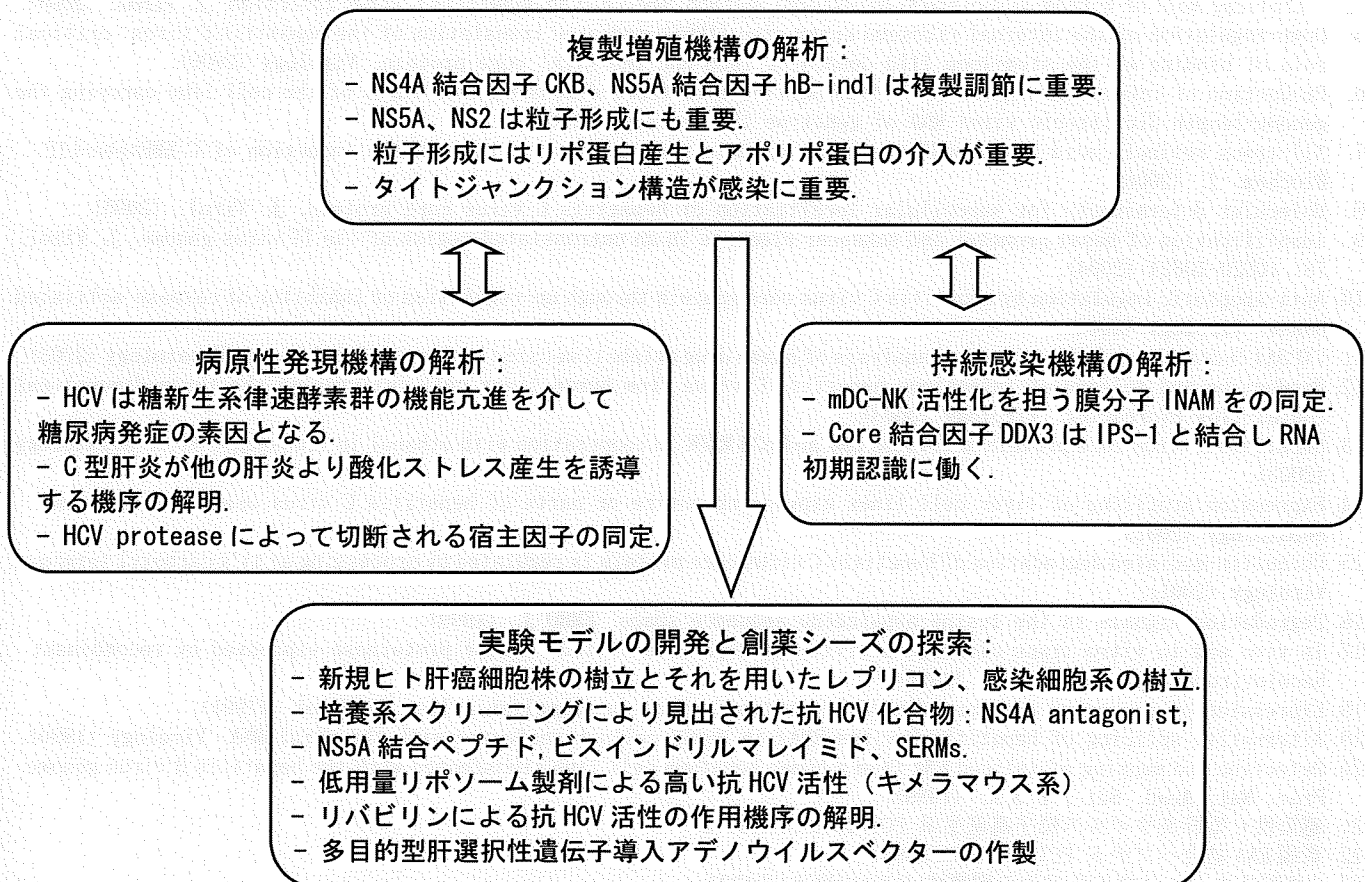
- (1) HCV キャリアからの発症予防対策、進行性肝疾患の発生抑制対策、新たな治療法（新規抗 HCV 薬、免疫療法）の開発、治療薬使用法の改善へ寄与する。保健、医療、福祉の向上に直結するとともに、高齢者医療費の低減に貢献することが期待される。
- (2) 多様性を示す HCV キャリアからの発症阻止のための個別治療への道が拓かれる。

VI. 本研究の成果（発表論文・ガイドライン・マニュアル等）

- Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MMC, 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.* 83: 5137-5147 (2009).
- Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Wakita T, Miyamura T, Matsuura Y, Suzuki T. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *J. Virol.* 83: 2389-2392 (2009).
- Kukihara H, Moriishi K, Tagawa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T, Taketomi A, Maehara Y, Matsuura Y: Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J Virol* 83: 7959-7969 (2009).
- Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K: Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* 50: 378-386 (2009).
- Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, Suzuki T, Wakita T, Fukasawa H: Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Res* 83: 112-117 (2009).
- Tagawa S, Kambara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y: Co-chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J Virol* 83: 10427-10436 (2009).
- Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus production. *J. Virol.* 82: 7964-7976 (2008).
- Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai M.M., Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* 82: 5715-5724 (2008).
- Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M. Cellular vimentin content regulates the protein level of Hepatitis C virus core protein and the Hepatitis C virus production in cultured cells. *Virology* 383: 319-327 (2008).
- Murakami K, Kimura T, Osaki M, Ishii K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T, Shoji I. Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J. Gen. Virol.* 89: 1587-1592 (2008).
- Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Bin Z, Li J, Shirakura M, Morikawa K, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371: 446-450 (2008).
- Okamoto K, Mori Y, Komoda Y, Okamoto T, Okochi M, Takeda M, Suzuki T, Moriishi K, and Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 82: 8349-8361 (2008).
- Okamoto T, Omori H, Kaname Y, Abe T, Nishimura Y, Suzuki T, Miyamura T, Yoshimori T, Moriishi K, and Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol.* 82: 3480-3489 (2008).
- Tagawa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Moriishi K, and Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.* 82: 2631-2641 (2008).
- Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H. Heat-shock protein 90 is essential for stabilization of the hepatitis C virus non-structural protein NS3. *J. Biol. Chem.* 284: 6841-6846 (2009)
- Zhang J, Yamada O, Kawagishi K, Araki H, Yamaoka S, Hattori T, Shimotohno K. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax modulates interferon-alpha signal transduction through competitive usage of the coactivator CBP/p300. *Virology.* 379:306-313 (2008).
- Noguchi T, Otsubaki T, Ando I, Ogura N, Ikeda S, Shimotohno K. Isolation and gene analysis of interferon alpha-resistant cell clones of the hepatitis C virus subgenome. *Virology.* 375:424-432, (2008)
- Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J. Hepatol.* 50:883-894, 2009.
- Mohd-Ismail NK, Deng L, Sukumaran SK, Yu VC, Hotta H, Tan YJ. The hepatitis C virus core protein contains a BH3 domain that regulates apoptosis through specific interaction with human MCL-1. *J. Virol.* 83:9993-10006 (2009).
- Amako Y, Sarkeshik A, Hotta H, Yates J 3rd, Siddiqui A. Role of Oxysterol Binding Protein in Hepatitis C Virus infection. *J. Virol.* 83:9237-9246 (2009).
- Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, Hotta H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma. *J. Gen. Virol.* 90: 1681-1691 (2009).
- Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, Hotta H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondria-mediated, caspase-3-dependent pathway. *J. Virol.* 82:10375-10385 (2008).
- Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya H, Kohara M, Sada K, Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J. Gen. Virol.* 89:1231-1242 (2008).

- El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Sequence variation in the hepatitis C virus NS5A protein predicts clinical outcome of pegylated interferon/ ribavirin combination therapy. *Hepatology*, 48:38-47 (2008).
- Ebihara, T., Azuma, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M., and Seya, T. Identification of INAM, a polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.*, (2009) (in press).
- Yasukawa, K., Oshiumi, H., Takeda, M., Ishihara, N., Yanagi, Y., Seya, T., Kawabata, S., Koshiba, T. Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Sci. Signal.*, (2009) 2: ra47.
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S., and Seya, T. Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.*, (2009) 284:807-17.
- Ebihara, T., M. Shingai, M. Matsumoto, K. Shimotohno, T. Wakita, and T. Seya. Hepatitis C virus (HCV)-infected apoptotic cells extrinsically modulate dendritic cell function to activate T cells and NK cells. *Hepatology*. 48: 48-58 (2008).
- Y Amako, K Tsukiyama-Kohara, A Katsume, Y Hirata, S Sekiguchi, Y Tobita, Y Hayashi, T Hishima, N Funata, H Yonekawa, M Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in Tupaia belangeri *J. Virol.* (2009) in press.
- T Nishimura, M Kohara, K Izumi, Y Kasama, Y Hirata, Y Huang, M Shuda, H Nuriya, Y Tokunaga, C Kai and K Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus impairs P53 via persistent over-expression of 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase. *J. Biol. Chem.* (2009) in press.
- K Machida, K Tsukiyama-Kohara, S Sekiguchi, E Seike, S Tóne, Y Hayashi, Y Kasama, M Shimizu, H Takahashi, C Taya, H Yonekawa, N Tanaka, M Kohara. Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins. *Gastroenterology* 137:285-96. (2009)
- Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Satoh K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Cheng-Hsin C, Yano Y, 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. Gastroenterol. Hepatol* 23:1437-47 (2008).
- Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M. Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new human hepatoma cell line. *Virus Res.* 146, 41-50 (2009)
- Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors Ataxia-Telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 82:9639-9646 (2008).
- Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Takemoto K, Ariumi Y, Kato N. A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res* 137:72-79 (2008).
- Mori K, Abe KI, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun* 371:104-109 (2008).
- Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 22:124-131 (2008).
- Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR- α is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. *J Clin Invest* 118:683-694 (2008).
- Tanida I, Fukasawa M, Ueno T, Kominami E, Wakita T, Hanada K. Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy* 5: 937-45 (2009)
- Kondo, S., Takata, Y., Nakano, M., Saito, I. and Kanegae, Y. Activities of various FLP recombinases expressed by adenovirus vectors in mammalian cells, *J. Mol. Biol.*, 390: 221-230 (2009).

VII. III (2年間の研究成果) の概要図等



○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

万有製薬探索研究所	研究員	昭和 58 年～平成 3 年
国立予防衛生研究所	研究員	平成 3 年～8 年
カリフォルニア工科大学	Research fellow	平成 5 年～8 年
国立感染症研究所	主任研究官	平成 7 年～12 年
同上	室長	平成 12 年～現在

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

万有製薬探索研究所	所長：岡西昌則
国立予防衛生研究所	部長：宮村達男, 室長：松浦善治
カリフォルニア工科大学	Professor：Alexander Varshavsky
国立感染症研究所	部長：脇田隆宇

・主な研究課題

C型肝炎ウイルス(HCV)の研究

- HCV 蛋白プロセッシング機構に関する研究
- HCV コア蛋白の成熟化、粒子形成機構に関する研究
- HCV 増殖細胞系の開発と複製調節機構に関する研究
- HCV コア蛋白による病原性発現機構に関する研究

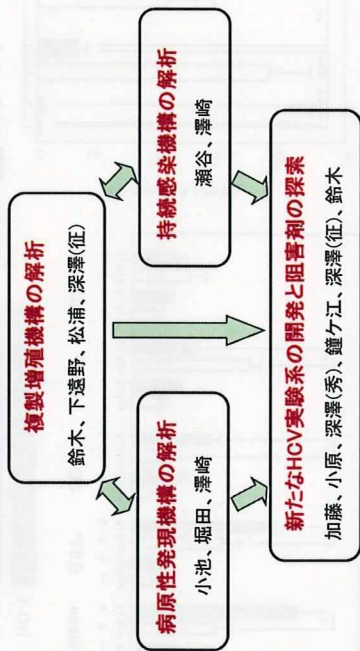
B型肝炎ウイルス(HBV)の研究

- HBV の RNA プロセッシングに関する研究
- ユビキチン化蛋白の選択的分解機構に関する研究
- 細胞分化誘導物質による抗癌剤開発

これまでの研究実績

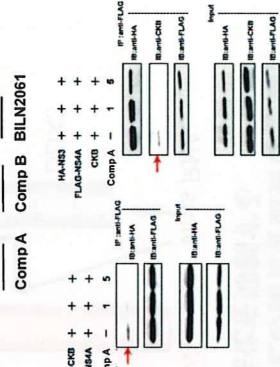
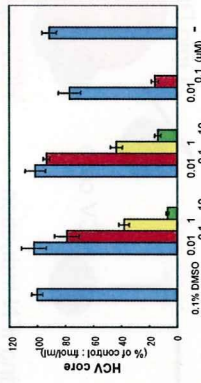
1. *Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. J. Virol. (2009).*
2. *Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. J. Virol. (2009).*
3. *Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus production. J. Virol. 82: 7964-7976 (2008).*
4. *A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. J. Virol. (2008).*
5. Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop IIIId domain of IRES and the viral core protein. *Virology (2006).*
6. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology (2006).*
7. All-trans retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBPbeta-LIP. *Biochem. J. (2006).*
8. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol. (2005).*
9. Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *J. Virol. 78: 10820-10824 (2004).*
10. Anti-apoptotic regulation by hepatitis C virus core protein through up-regulation of inhibitor of caspase-activated DNase. *Virology (2003).*
11. CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver. *Hepatology (2003).*
12. Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology (2003).*
13. Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology (2003).*
14. Expression profiling of liver cell lines expressing entire or parts of hepatitis C virus open reading frame. *Hepatology (2002).*
15. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology (2001).*
16. Degradation signals in the lysine-asparagine sequence space. *EMBO J. (1999).*
17. In vivo and in vitro trans-cleavage activity of hepatitis C virus serine proteinase expressed by recombinant baculoviruses. *J. Gen. Virol. (1995).*
18. Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells. *J. Virol. (1991).*
19. Alternative splicing of hepatitis B virus RNAs in HepG2 cells transfected with the viral DNA. *Virology (1990).*
20. Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with the hepatitis B virus genome. *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A. (1989).*
21. 感染性 C 型肝炎ウイルス粒子高産生系 PCT/2006/JP319572
22. 新規 RNA 結合ペプチド PCT/JP2006/320991
23. C 型肝炎ウイルス粒子及びその増殖法 PCT/JP2006/304223

C型肝炎ウイルスキャリア成立の分子基盤と 新規治療薬開発のための基礎的研究



NS4AアタゴニストによるHCV産生阻害

複製増殖機構の解析
阻害剤の探索

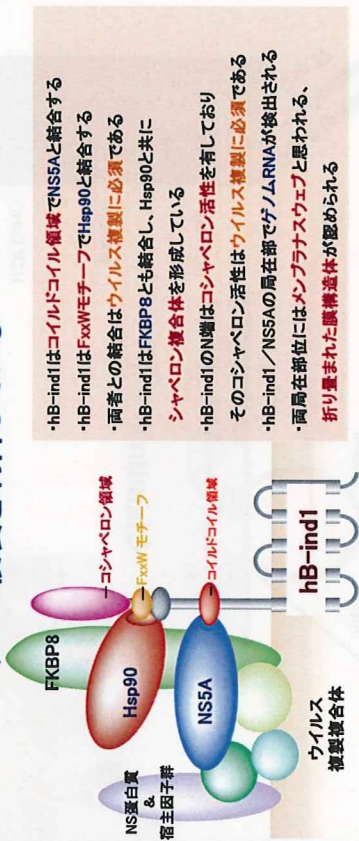


RNA replication ↑
ATP ↑
ADP
Pcr
cr

CKBはNS4AによってHCV複製複合体へ運ばれエネルギー供給に寄与する

hB-ind1はコシヤペロン活性を介してHCV ゲノム複製を制御している

複製増殖機構の解析



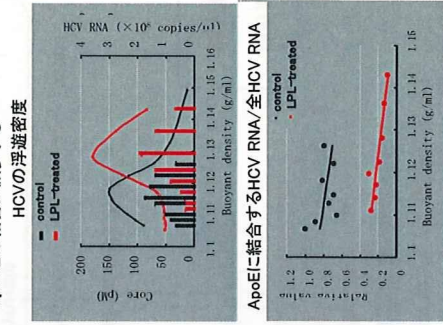
- ・hB-ind1はコイルドコイル領域でNS5Aと結合する
- ・hB-ind1はFxxWモチーフでHsp90と結合する
- ・両者との結合はウイルス複製に必須である
- ・hB-ind1はFKBP8とも結合し、Hsp90と共にシヤペロン複合体を形成している
- ・hB-ind1のN端はコシヤペロン活性を有しておりそのコシヤペロン活性はウイルス複製に必須である
- ・hB-ind1/NS5Aの高在部位でゲノムRNAが検出される
- ・高在部位にはメンブラスウェーブと思われる、折り畳まれた膜構造体が認められる

・HCV NS5A蛋白質と相互作用する分子として単離
・N端にHsp90のコシヤペロンp23と相同領域を持つ
・詳しい生化学的機構は不明

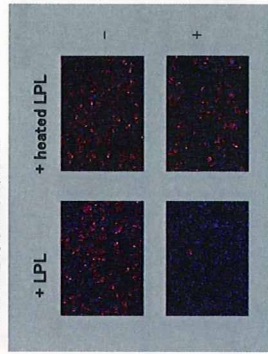
VLDL様リポ蛋白との複合体形成がHCV の感染性に重要である

複製増殖機構の解析

LPL処理によりHCVの浮遊密度が変化しApoEとの結合が減少する

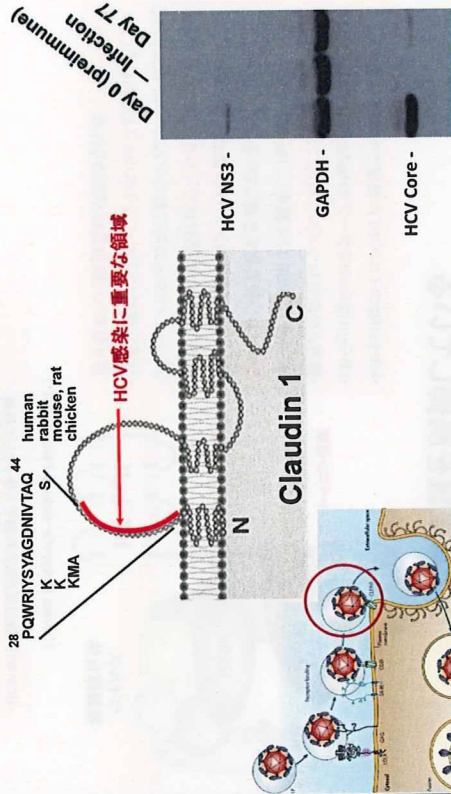


HCVはリポ蛋白リリナーゼ(LPL)処理により感染性が失われる



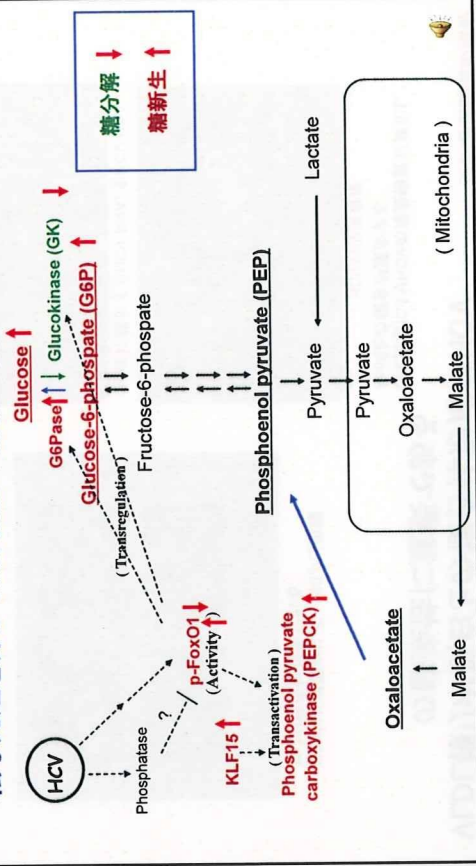
抗Claudin1抗体がHCV感染・増殖阻害に有効である

複製増殖機構の解析



HCVはFoxO1脱制御経路により、PEPCK及びG6Paseの転写亢進を介して、肝細胞の糖新生を促進させる

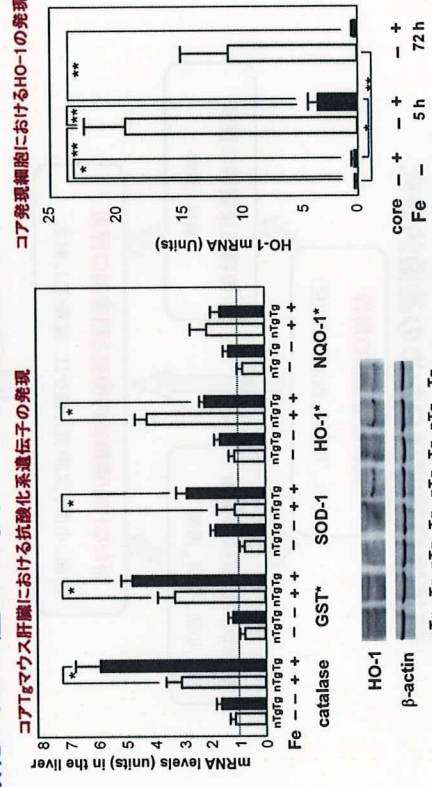
病原性発現機構の解析



酸化ストレス消去系の減弱がC型肝炎における高度の酸化ストレス産生に寄与している可能性がある

病原性発現機構の解析

コア発現細胞におけるHO-1の発現



HCVコア蛋白は、IPS-1とDDX3との結合を阻害して、DDX3によるIFN-βの活性化を抑制する

持続感染機構の解析

コア蛋白によるIFN-β抑制機構のモデル

