

201030009A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成23(2011)年4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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 23 年 (2011 年) 年 4 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. 薬剤感受性の分子的機構解明のためのアプローチ
-肝炎ウイルスに in vivo で相互作用するタンパク質の解析- 11
吉里 勝利
2. C型肝炎ウイルス複製における HVR の Quasispecies 14
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 17
土方 誠
4. 血中滞留型インターフェロン- γ 発現ベクターの開発 20
高倉 喜信
5. 肝炎の進展、癌化と関連するC型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索 26
前川 伸哉
6. 肝移植症例における IL28B 遺伝子多型と IFN 治療感受性の相関とその意義 . 30
松浦 善治
7. C型肝炎に対する肝移植後の抗ウイルス免疫機構の解明 34
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 40
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22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、B型(HBV)あるいはC型肝炎ウイルス(HCV)を感染させたヒト肝細胞キメラマウスを用いて、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してきた。これまでに確立したHBVおよびHCV全長クローンをを用いたリバーシジェネティックスの系を発展させ、本年度、HBx欠損クローンをを用いることにより、HBx蛋白がHBVの感染・複製に必須であり、抗ウイルス療法のターゲットとなり得ることを見いだした。HCVに関しては、これまでに確立した genotype 1a, 1b, 2a型に加え、2b型HCVのリバーシジェネティックスの確立にも成功した。また1b型クローンのCoreやISDR薬剤耐性変異を挿入することにより、変異ウイルスの薬剤耐性および複製能を検証する系の作製、さらにはCoreやISDR領域にアミノ酸変異を挿入することにより、変異ウイルスのIFN感受性や複製能を解析する系の作製にも成功した。またHCV感染マウスを用いてプロテアーゼ阻害剤投与によるウイルス動態および耐性株出現の検討を行い、さらにはプロテアーゼ阻害剤やポリメラーゼ阻害剤などの異なるHCV蛋白を標的とする薬剤を併用することにより、IFN製剤を使用せずともHCVの排除が可能であることを見いだした。また多数のHCV患者のサンプルを用いてHCVのCoreおよびISDR変異や宿主のIL28B遺伝子多型が、インターフェロンの治療効果と密接に関与していることが明らかとなった。本研究を通じて見いだされたこれら候補遺伝子や治療抵抗性に関与するウイルスおよび宿主因子は、今後のさらなる創薬および新規治療法の開発に応用されるものになると思われる。

【分担研究者】

吉里勝利	広島大学大学院理学系研究科	教授
金子周一	金沢大学大学院医学系研究科	教授
高倉喜信	京都大学大学院薬学研究科	教授
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
土方 誠	京都大学ウイルス研究所	准教授
前川伸哉	山梨大学大学院消化器内科学	講師
今村道雄	広島大学大学院医学系研究科	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 部長

A. 研究目的

我々は、ヒト肝細胞キメラマウスを使用し、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、リバーシジェネティックスの系も構築した。本研究では、この系、肝炎ウイルス培養系および臨床サンプルを用いて、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、予防に関する研究を行った。

B. 研究方法

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた新規治療薬標的分子の探索と効果実証システムの構築

- 1) ヒト肝細胞キメラマウスに1.4倍長のgenotype C型HBV全長発現plasmidをtransfectionした培養上清を投与した、この際、HBx遺伝子欠損plasmidをtransfectionさせた培養上清も投与した。
 - 2) genotype 2b型のC型急性肝炎患者からHCV全長遺伝子をクローニングし、HCV RNAをマウス肝臓内に注入した。
 - 3) Genotype 1b型HCV全長クローン(KT9)あるいはKT9のNS3領域にtelaprevir耐性変異となるA156S変異を挿入した耐性型クローン(KT9-NS3-A156S)を用いて感染マウスを作製した。これらHCV感染マウスにtelaprevirを連日経口投与した。
- 治療抵抗性に関与するウイルス因子の

探索とその対策

- 4) HCV感染マウスにインターフェロン- α あるいはソヤサボゲノール B 誘導体を投与し、マウス血中HCV RNA低下量、肝臓内HCVコア抗原量および肝臓内IFN誘導遺伝子発現量を測定した。
- 5) HCV感染マウスに28日間、NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤であるtelaprevir (200 mg/kg, 1日2回, 連日経口投与)あるいはNS5Bポリメラーゼ阻害剤であるMK-0609 (3 mg/kg, 1日2回, 連日経口投与)単独および両者を併用投与し、マウス血中HCV RNA量の測定した。

C. 結果および考察

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた新規治療薬標的分子の探索と効果実証システムの構築

H20-21年度に確立したHBVおよびHCVのリバーシジェネティックスの系を応用し、本年度、HBx欠損クローンを用いることにより、HBx蛋白がHBVの感染・複製に必須であり、抗ウイルス療法のターゲットとなり得ることを見いだした。またすでに確立していたgenotype 1a, 1b, 2a型に加え、2b型HCVのリバーシジェネティックスの確立にも成功した(茶山, 今村班員)。また1b型クローンのCoreやISDR薬剤耐性変異を挿入することにより、変異ウイルスの薬剤耐性および複製能を検証する系の作製、さらにはCoreやISDR領域にアミノ酸変異を挿入することにより、変異ウイルスのIFN感受性や複製能を解析する系の作

製にも成功した(今村班員). 本マウスへ種々の遺伝子を導入するため, 肝臓への遺伝子デリバリーに関する研究も行った. H20-21 年度に開発した長期持続型 IFN- γ 発現ベクターを HCV 感染マウスに hydrodynamic injection 法を用いて投与することにより, IFN- γ の遺伝子導入が可能であり, さらにはマウス血中 HCV が投与 1 週後に陰性化し, その効果が長期間持続することを確認した(高倉班員). これまでに “*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. 本年度は逆の組み合わせ, すなわち, GRP78/BiP に対する抗体を用いた免疫沈降により Pre-S 抗原が回収されることが確認された. この結果は, GRP78/BiP が, Pre-S 抗原タンパク質と相互作用する可能性が極めて高いことを示すものである(吉里班員).

培養細胞を用いた新規治療薬標的分子の探索と効果実証システムの構築

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(土方班員). H77 と JFH-1 のキメラクローンを細胞に transfection し, 長期培養したところ, H77 血清中で最も多く含まれる HVR1 species よりも 2 番目の species を優性に認めた. また HVR1 に対するポリクローナル中和抗体を反応させると, species 間で中和能に差があり, 変異のない species の中和能が高い傾向にあった. しかしながら, 変異のない species, 変異のある species 間で HVR1 の変異を交換して中和能を評価すると, 変異のある species の中和能が高くなり, HVR1 外部の変異が大きく中和能に影響するためと考えられた. 今後この Quasispecies の系をキメラマウスに導入することにより, 感染防御の機構及び感染による新たな細胞内シグナル伝達系の機構を解明することが期待される(金子班員).

治療抵抗性に關与するウイルス因子の探索とその対策

多数例のgenotype 1bのHCV全翻訳領域を解析することにより、Core領域の70番のアミノ酸変異が、肝癌の発癌に關与を示し、さらにこの変異は宿主のIL28B遺伝子型と強く關連していることを見いだした(前川班員)。また生体肝移植後のドナーおよびレシピエントのIL28B遺伝子型がレシピエントのHCV再感染に対するIFN療法の治療効果と關連していることを見いだした。すなわち、ドナーおよびレシピエントのrs8099917がTTである症例では有意にSVR達成率が高いものであり、さらにHCVのCoreおよびISDR変異を組み合わせることにより、より詳細な治療効果予測が可能であった(松浦班員)。HCVに対する新規治療法の開発として、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、さらにはプロテアーゼ阻害剤やポリメラーゼ阻害剤などの異なるHCV蛋白を標的とする薬剤を併用することにより、IFN製剤を使用せずともHCVの排除が可能であることを見いだした(今村班員)。HCVレプリコン細胞を用いて、培養上層トランスウエル内でリンパ球混合試験を施行した結果、アロ応答T細胞のIFN- γ 産生能の程度に依存して、下層のHCVレプリコン細胞のHCV複製が抑制されることを見いだした。これらの結果は、組織傷害を惹起することなくIFN- γ 産生細胞を肝臓に誘導し得れば、HCV肝炎の移植後再発を抑止し得る可能性を示唆するものである(大段班員)。

E. 結論

今後、ウイルス感染マウスあるいは多数のHCV患者のサンプルを用いてHCVのCoreおよびISDR変異や宿主のIL28B遺伝子多型が、どのようなメカニズムによりインターフェロンの治療効果に關与しているかを見だし、治療抵抗性肝炎に対する、治療法の開発が必要である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Tsuge M, Hiraga N, Akiyama R, Tanaka S, Matsushita M, Mitsui F, Abe H, Kitamura S, Hatakeyama T, Kimura T, Miki D, Mori N, Imamura M, Takahashi S, Hayes CN, Chayama K. HBx protein is indispensable for development of viraemia in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*. 2010;91:1854-64.
2. Kamiya N, Iwao E, Hiraga N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Miyoshi S, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Practical Evaluation of a Mouse with Chimeric Human Liver Model for Hepatitis C Virus Infection Using an NS3-4A Protease Inhibitor. *J Gen Virol* 2010;91:1668-7
3. Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Kiyohashi K, Kitazume A, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Wakita T, Watanabe M. Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology* 2010;405:361-9.
4. Suda G, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Azuma S, Kakinuma S, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K Watanabe M. IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon

- sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. *Virology* 2010;407:80-90
5. Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of Hepatitis C Virus by Short Term NS3-4A and NS5B Inhibitor Combination Therapy in Human Hepatocyte Chimeric Mice. *J Hepatol* 54;872-8, 2011
 6. Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo. *J Hepatol*, in press
 7. Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, Abe H, Tsuge M, Imamura M. Animal model for study of human hepatitis viruses. *J Gastroenterol Hepatol*.26:13-18,2011.
 8. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic Potential of Propagated Hepatocyte Transplantation in Liver Failure. *J Surg Res*. 2011.
 9. Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T, Miya F, Tsunoda T, Yoshizato K. Growth Hormone-Dependent Pathogenesis of Human Hepatic Steatosis in a Novel Mouse Model Bearing a Human Hepatocyte-Repopulated Liver. *Endocrinology*. 2011.
 10. Nishi H, Inagi R, Kawada N, Yoshizato K, Mimura I, Fujita T, Nangaku M. Cytoglobin, a novel member of the globin family, protects kidney fibroblasts against oxidative stress under ischemic conditions. *Am J Pathol*. 2011;178:128-39.
 11. Yamasaki C, Kataoka M, Kato Y, Kakuni M, Usuda S, Ohzone Y, Matsuda S, Adachi Y, Ninomiya S, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K, Tateno C. In vitro evaluation of cytochrome p450 and glucuronidation activities in hepatocytes isolated from liver-humanized mice. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2011;25:539-50.
 12. Utoh R, Tateno C, Kataoka M, Tachibana A, Masumoto N, Yamasaki C, Shimada T, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K. Hepatic hyperplasia associated with discordant xenogeneic parenchymal-nonparenchymal interactions in human hepatocyte-repopulated mice. *Am J Pathol*. 2010;177:654-65.
 13. Ogawa T, Fujii H, Yoshizato K, Kawada N. A human-type nonalcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits. *Am J Pathol*. 2010;177:153-65.
 14. 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;391:316-21.
 15. Kubo S, Kataoka M, Tateno C, Yoshizato K, Kawasaki Y, Kimura T, Faure-Kumar I 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.
 16. Sunagozaka H, Honda M, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2011 In press
 17. Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab*. 2010;12:483-95.
 18. Honda M, Nakamura M, Tateno M, Sakai A, Shimakami T, Shirasaki T, Yamashita T, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Differential interferon signaling in liver lobule and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2010;53:817-26.
 19. Honda M, Sakai Y, Yamashita T, Yamashita T, Sakai A, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tatsumi I, Miyazaki Y, Tanno H, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system cancers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;400:7-15.

20. Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2010;22:499-509.
21. Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. *J Infect Dis.* 2010;202:75-85.
22. Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y, Kaneko S. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res.* 2010;70:4687-97.
23. Zang L, Nishikawa M, Machida K, Ando M, Takahashi Y, Watanabe Y, and Takakura Y. Inhibition of nuclear delivery of plasmid DNA and transcription by interferon γ : hurdles to be overcome for sustained gene therapy. *Gene Ther.* 2011, in press
24. Miyakawa N, Nishikawa M, Takahashi Y, Ando M, Misaka M, Watanabe Y, Takakura Y. Prolonged circulation half-life of interferon γ activity by gene delivery of interferon γ -serum albumin fusion protein in mice. *J Pharm Sci.* 2011, in press.
25. Takiguchi N, Takahashi Y, Nishikawa M, Matsui Y, Fukuhara Y, Oushiki D, Kiyose K, Hanaoka K, Nagano T, Takakura Y. Positive correlation between the generation of reactive oxygen species and activation/reactivation of transgene expression after hydrodynamic injection into mice. *Pharm Res.* 2011, in press.
26. Takahashi Y, Vikman E, Nishikawa M, Ando M, Watanabe Y, Takakura Y. Persistent interferon transgene expression by RNA interference-mediated silencing of interferon receptors. *J Gene Med*; 12, 739-746 (2010)
27. Hattori K, Nishikawa M, Watcharanurak K, Ikoma A, Kabashima K, Toyota H, Takahashi Y, Takahashi R, Watanabe Y, Takakura Y. Sustained exogenous expression of therapeutic levels of IFN-gamma ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice via Th1 polarization. *J Immunol*; 184, 2729-2735 (2010)
28. Guan X, Nishikawa M, Takemoto S, Ohno Y, Yata T, Takakura Y. Injection site-dependent induction of immune response by DNA vaccine: comparison of skin and spleen as a target for vaccination. *J Gene Med*; 12(3), 301-309 (2010)
29. Yamaoka A, Guan X, Takemoto S, Nishikawa M, Takakura Y. Development of a novel Hsp70-based DNA vaccine as a multifunctional antigen delivery system. *J Control Release*; 142(3), 411-415 (2010).
30. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, and Matsuura Y. Involvement of PA28g in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology* 2010;52;411-420.
31. Tani H, Shiokawa M, Kaname Y, Kambara H, Mori Y, Abe T, Moriishi K, and Matsuura Y. Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. *J Virol* 2010; 84, 2798-2807.
32. Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol* 2010; 84, 5824-5835.
33. Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, Uchiyama H, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, and Maehara Y. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peginterferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology* 2010; 39,1577-1585.
34. Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihiro H, Moriishi K, Matsuura Y, Yamaguchi K, and Mizuochi T. Peripheral B Cells May Serve as a Reservoir for Persistent Hepatitis C Virus Infection. *J Innate Immun* 2010; 2, 607-617.
35. Tripathi LP, Kataoka C, Taguwa S, Moriishi K, Mori Y, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions. *Mol Biosyst* 2010; 6, 2539-2553.
36. T. Kawaoka, N. Hiraga, S. Takahashi, S. Takaki, F. Mitsui, M. Tsuge, Y. Nagaoki, Y. Kimura, Y. Hashimoto, Y. Katamura, A.

Hiramatsu, K. Waki, M. Imamura, Y. Kawakami, H. Aikata, H. Tashiro, H. Ohdan, K. Chayama. Prolongation of interferon therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation: analysis of predictive factors of sustained virological response, including aminoacid sequence of the core and NS5A regions of hepatitis C virus. Scand J Gastroenterol. 2010;45:1488-1496

37. Y. Ushitora, H. Tashiro, S. Takahashi, H. Amano, A. Oshita, T. Kobayashi, K. Chayama, H. Ohdan. Splenectomy in Chronic Hepatic Disorders: Portal Vein Thrombosis and Improvement of Liver Function. Dig Surg 2011;28:9-14

38. M. Doskali, Y. Tanaka, M. Ohira, K. Ishiyama, H. Tashiro, K. Chayama, H. Ohdan. Possibility of Adoptive Immunotherapy With Peripheral Blood-derived CD3⁻CD56⁺ and CD3⁺CD56⁺ Cells for Inducing Antihepatocellular Carcinoma and Antihepatitis C Virus Activity. J Immunother 2011;34:129-138

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 プロスタグランジン I2 のアゴニストを含む、C型肝炎ウイルスの感染抑制剤、発明者 土方 誠、阿部 雄一、脇田隆字、出願日 2010年9月30日、出願番号 特願 2010-222045
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22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

薬剤感受性の分子的機構解明のためのアプローチ
—肝炎ウイルスに *in vivo* で相互作用するタンパク質の解析—

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

研究要旨：昨年までの研究により、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた *in vivo* cross-linking 法によって HBV パーティクルと相互作用する GRP78 を同定した。逆の操作、すなわち、*in vivo* においては、GRP78 抗体を用いた免疫沈降によって Pre-S 抗原が回収されることが確認されたことから、GRP78 が Pre-S 抗原タンパク質と相互作用する可能性が極めて高いと考えられる。一方、キメラマウス肝臓ホモジネートを用いて *in vitro* で実施した同様の操作では、当初と同じ操作、逆の操作のいずれからも相互作用の存在を示す結果は得られず、PreS1 と GRP78 の相互作用は、*in vivo* でのみ生じており、*in vitro* では再現されなかった。また、HBV 感染並びに HCV 感染キメラマウスにおける GRP78 mRNA 発現レベルは、HBV 感染後 5 週では非感染対照個体の約 75% に、HBV 感染後 9 週間においては非感染対照個体の約 30% に低下した。

A. 研究目的

これまでの研究からヒト肝細胞キメラマウス（以下、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既に確認されている。本年度は、*in vivo* cross-linking 法とプロテオーム技術を利用して得られた HBV の細胞表面への結合のプロセスに係わるタンパク質について、ウイルスタンパク質と当該タンパク質の両者の抗体を用いて bait/prey の両方を用いたプルダウン操作を行い相互作用の実態の解明を行うとともに、肝炎ウイルス感染後のキメラマウス肝内における当該タンパク質の遺伝子発現プロファイルを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

in vivo において、ウイルス Pre-S 抗原と結合する肝細胞膜蛋白を網羅的に釣り上げる方法として、アミノ基を標的とした 2 価の架橋剤を利用する *in vivo* cross-linking 法を開発し、クロスリンクさせた複合体の中から肝炎ウイルス pre-S 抗原に対する抗体で沈殿する蛋白質を分析した。その結果、GRP78 分子が上記性質を有する蛋白質として同定された。また、質量分析計によるタンパク質同定操作から、この GRP78 タンパク質はヒト型配列に特異的なアミノ酸配列を有しており、キメラマウス肝内のヒト肝細胞に由来することが強く示唆された。この蛋白質は分子シャペロンタンパク質ファミリーに属しており、主として小胞体ストレスに関わる多機能性分子である。また、ウイルス感染などのスト

レスにより発現が亢進することを示した研究も報告されている。

本年度は、さらに、*in vitro* において、HBV 感染キメラマウス肝臓ホモジネートにクロスリンカー処理を行って作成した複合体から、GRP78 抗体を用いて免疫沈降されるタンパク質の解析を行った。また、同複合体中から、PreS1 抗体を用いて得られた免疫沈降物について同様の解析を行った。

さらに、肝炎ウイルス感染と GRP78 発現レベルの関係を明らかにする目的で、HBV 感染並びに HCV 感染キメラマウスにおける GRP78 mRNA 発現レベルの変動を調べた。これらの感染動物から肝臓を採取した mRNA を逆転写して得られた cDNA を鋳型として、GRP78 特異的プライマーを用いた real-time 定量性 PCR によって mRNA 発現レベルの解析を行った。

（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、タンパク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

in vitro において、HBV 感染キメラマウス肝臓ホモジネートにクロスリンカー処理を行って作成した複合体から、GRP78 抗体を用いて免疫沈降されるタンパク質の解析を行った。その結果、得られた沈殿物中には、PreS1 に対する抗体に反応するタンパク質は存在せず、また、SDS-PAGE 及び質量分析計によるタンパク質同定作業においても PreS1 と考えられるタンパク質を得ることが出来なかった。また、同複合体中から、PreS1 抗体を用いて得られた免疫沈降物について同様の解析を行ったが GRP78 は得られなかった。これらのことから、PreS1 と GRP78 の相互作用は、in vivo でのみ生じており、in vitro では再現されないことが強く示唆された。

HBV 感染並びに HCV 感染キメラマウスにおける GRP78 mRNA 発現レベルは、HBV 感染後 5 週では非感染対照個体の約 75% に、HBV 感染後 9 週間においては非感染対照個体の約 30% に低下した。

D. 考察

in vivo cross-linking 後に、Pre-S 抗体によって免疫沈降することを指標として得られた候補タンパク質は、当初とは逆の組み合わせ、すなわち、該候補タンパク質に対する抗体を用いた免疫沈降により Pre-S 抗原が回収されることが確認されたことにより、該候補タンパク質は、Pre-S 抗原タンパク質と相互作用する可能性が極めて高いことが確認された。しかし、一方では、キメラマウス肝臓ホモジネートを用いて in vitro で実施した同様の操作では、当初の操作、逆の操作のいずれからも相互作用の存在を示す結果は得られなかった。

また、HBV 感染並びに HCV 感染キメラマウスにおける GRP78 mRNA 発現レベルは肝炎ウイルス感染後 5-9 週という期間においては有意に低下することが明らかとなった。このことはウイルス感染直後 (24 時間など) に GRP78 の mRNA 発現が亢進するとして既報の論文とは異なるが、他に 5-9 週後の発現量変化の報告はなく、ウイルス感染に対する応答として増加した GRP78 発現量は、その後減少することが明らかとなったことから、慢性的にウイルス感染が持続する肝炎ウイルス感染症の特徴との関連が示唆された。今後、感染成立前後での本蛋白質遺伝子の発現を詳しく調べることにより、肝炎ウイルス感染における GRP78 の役割を明らかにできるものと考えている。

E. 結論

以上の結果より、PreS1 と GRP78 の相互作用は、in vivo でのみ生じており、in vitro では再現されなかった。このことから、他のタンパク質の介在など、

未解明の何らかの機作により、これら 2 種類のタンパク質の相互作用は細胞膜表面においてのみ成立することが強く示唆され、in vivo 感染モデルの優位性を示す実証データの 1 つとなった。

長期に感染を維持できるモデル実験系が他にないことから、これまで分子シャペロンタンパク質の発現は、肝炎ウイルス感染後短期的には増加するという報告がなされているのみであり、HBV、HCV 感染後 5 週以降においてストレス応答性の分子シャペロンファミリータンパク質の発現が減少することの生物学的意味は不明であり、今後の研究が必要である。一般的には、ウイルスとの長期接触は、宿主 (肝細胞) の生物学的病理学的性質に変化を齎すものと考えられ、この変化は、何らかの経路で肝臓の繊維化、あるいは肝細胞のガン化と関係している可能性もある。この実験結果は、今後の研究成果次第では、ヒト肝細胞キメラマウスのインビボウイルス感染系としての有用性を示すことになると考えている。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic Potential of Propagated Hepatocyte Transplantation in Liver Failure. J Surg Res. 2011 Jan 7.
2. Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T, Miya F, Tsunoda T, Yoshizato K. Growth Hormone-Dependent Pathogenesis of Human Hepatic Steatosis in a Novel Mouse Model Bearing a Human Hepatocyte-Repopulated Liver. Endocrinology. 2011 Feb 8.
3. Nishi H, Inagi R, Kawada N, Yoshizato K, Mimura I, Fujita T, Nangaku M. Cytoglobin, a novel member of the globin family, protects kidney fibroblasts against oxidative stress under ischemic conditions. Am J Pathol. 2011 Jan;178(1):128-39.
4. Yamasaki C, Kataoka M, Kato Y, Kakuni M, Usuda S, Ohzone Y, Matsuda S, Adachi Y, Ninomiya S, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K, Tateno C. In vitro evaluation of cytochrome p450 and glucuronidation activities in hepatocytes isolated from liver-humanized mice. Drug Metab Pharmacokinet. 2011 Jan 14;25(6):539-50.
5. Utoh R, Tateno C, Kataoka M, Tachibana A, Masumoto N, Yamasaki C, Shimada T, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K. Hepatic hyperplasia associated

with discordant xenogeneic parenchymal-nonparenchymal interactions in human hepatocyte-repopulated mice. *Am J Pathol.* 2010 Aug; 177 (2): 654-665.

6. Ogawa T, Fujii H, Yoshizato K, Kawada N. A human-type nonalcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits. *Am J Pathol.* 2010 Jul; 177 (1): 153-165.

7. Kamiya N, Iwao E, Hiraga N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Miyoshi S, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Practical evaluation of a mouse with chimeric human liver model for hepatitis C virus infection using an NS3-4A protease inhibitor. *J Gen Virol.* 2010 Jul; 91(Pt 7): 1668-1677.

8. 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 Jan 1; 391 (1): 316-321.

9. 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. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

C型肝炎ウイルス複製における HVR の Quasispecies

研究分担者 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科恒常性制御学 教授

研究要旨:これまでキメラマウスに導入されてきた Patient H strain (H77)の宿主細胞に対する感染能につき詳細に評価した。一般にHCVのゲノム多様性(quasispecies)は構造領域E2で最も著明であり、超可変領域HVR1が重要である。今回そのquasispeciesを含む構造領域をHCV残りの全領域を含むカセットベクターに導入し、各々の感染能、中和抗体による中和能を培養細胞系にて評価した。その結果、予想に反し長期培養後のquasispeciesを調べるとH77クローン配列のHVR1speciesと異なるspeciesが優勢となった。また興味深いことに抗HVR1抗体による中和能は、そのHVR1配列との相同性よりも外部の変異が大きく影響を与えるものと示された。以上より、HCV感染能を評価する際は、quasispeciesも考慮に入れることが重要であるとされた。

A. 研究目的

ヒト肝細胞内でのHCV感染・複製機構を詳細に解明することがキメラマウスを用いた研究により可能となった。キメラマウスに対しPatient H strain (H77)から得られた感染クローンpCV-H77を導入し、主に感染モデルとしてIFN誘導シグナルの変化を検討してきた。さらにHBV感染モデルとmicro RNA (miRNA)の遺伝子変化を比較することにより、HCVにおけるmiRNAの発現変化が重要であることも見出した。しかしながらこの感染させたクローンは患者血清を由来としたものの、一般的にHCVは一つの宿主中にウイルスゲノムが多様な状態で存在する。これはQuasispeciesと称されて、構造領域E2の超可変領域(HVR1)で最も高頻度に認められ、中和抗体のターゲットとなる。更にHCVがこの中和反応から逃避する大きな原因の一つとされ、ワクチン開発の障害にもなっている。これまでHVR1 Quasispeciesのシーケンス解析が数多く報告されて

いるが、一つ一つのspeciesの作用及び他との相互作用については詳細に明らかにされていない。今回患者血清における構造領域のQuasispeciesを培養細胞系で再現した上で、それぞれのspeciesの持ちうる相互作用につき検討した。

B. 研究方法

H77の構造領域とJFH-1の非構造領域を組み合わせたキメラクローンの構造領域を取り除いたカセットベクターを作成した。そのクローンにPatient Hの血清(H77)から構造領域

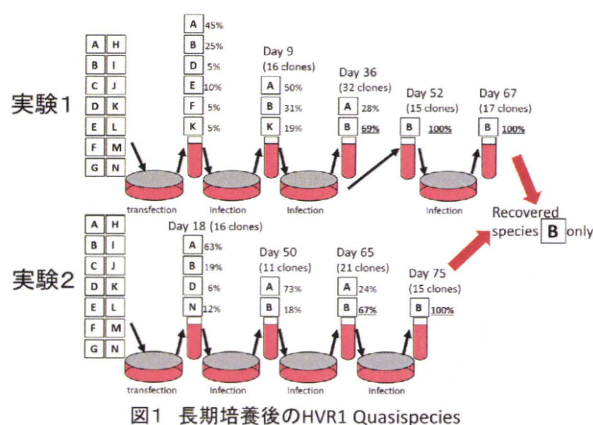


図1 長期培養後のHVR1 Quasispecies

(E 1 及び E 2 の全領域) の quasispecies を含む断片を挿入し、得られたプラスミドのシーケンスを行った。更に、プラスミドを含む大腸菌は一つにまとめてウイルス RNA を合成し、培養細胞に導入させ、長期培養を行った。また、HVR1 に対するポリクローナル抗体を利用し、各 species のウイルスを中和し、比較を行った。

(倫理面への配慮)

本患者血清サンプルは患者からの承諾を得て研究目的に使用され、倫理上問題なく、ヘルシンキ宣言に沿っている。

C. 研究結果

H77 血清と同様の Quasispecies を含む状態で長期培養されたウイルスのシーケンスを解析すると、血清中で最も多く含まれる HVR1 species よりも 2 番目の species が優勢に認められた (図 1 における species B)。HVR1 に対するポリクローナル中和抗体 (LMF87) を反応させると、species 間で中和能に差があり、変異のない species の中和能が高い傾向にあった (図 2 左)。しかしながら、変異のない species、変異のある species 間で HVR1 の変異を交換して中和能を評価すると、変異のある species の中和能が高くなり、HVR1 外部の変異が大きく中和能に影響するためと考えられた (図 2 右)。

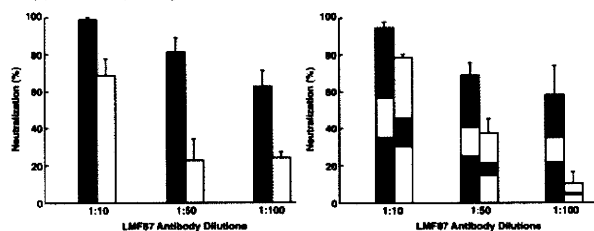


図2 抗HVR1抗体による中和能の測定

左図における黒: species A, 白: species B
 右図における内部が白: HVR1がspecies B
 右図における内部が黒: HVR1がspecies A

D. 考察

HVR1 外部の構造領域内の変異が Quasispecies 間の生存に関わる相互作用及び中和抗体による反応に影響を与えることが明らかとなった。HVR1 をターゲットとした中和反応はその配列が同一であれば効率が高くなるが、その外部の変異が中和能に大きく影響する。これは HCV で問題とされる中和反応からの逃避のメカニズムの一つとされ、ワクチンターゲットを探る上で重要であると考えられた。今後この Quasispecies の系をキメラマウスに導入することにより、感染防御の機構及び感染による新たな細胞内シグナル伝達系の機構を解明することが期待できる。

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sunagozaka H, Honda M, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. Int J Cancer. 2011 In press

2) Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi

Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab.* 2010 Nov 3;12(5):483-95.

3) Honda M, Nakamura M, Tateno M, Sakai A, Shimakami T, Shirasaki T, Yamashita T, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Differential interferon signaling in liver lobule and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2010 Nov;53(5):817-26.

4) Honda M, Sakai Y, Yamashita T, Yamashita T, Sakai A, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tatsumi I, Miyazaki Y, Tanno H, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Sep 10;400(1):7-15.

5) Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2010 Aug;139(2):499-509.

6) Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y,

Murakami S, Wakita T, Kaneko S. La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. *J Infect Dis.* 2010 Jul 1;202(1):75-85.

7) Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y, Kaneko S. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res.* 2010 Jun 1;70(11):4687-97.

2. 学会発表

1) Kazunori Kawaguchi, Kristina N Faulk, Masao Honda, Shuichi Kaneko, Robert H Purcell, Suzanne U Emerson. HVR1 quasispecies selection and neutralization by anti-HVR1 of HCV in cell culture are strongly influenced by mutations in the E1E2 region outside of HVR1. The 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 横浜、2010

G. 知的所有権の取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

特になし

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22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、
リバーシ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 PEG化インターフェロン(IFN)とリバビリンの併用療法に対して抵抗性を示す難治性の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。そこでこれまでに新たな抗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によって、HCV粒子産生培地中に存在するコアタンパク質に128番目のシステインを介したジスルフィド結合によって二量体を形成しているものを含むことを新たに見出している。この培地をプロテイナーゼKで処理するとこの二量体コアタンパク質のみが検出されるようになり、非イオン性界面活性化剤の共存下でこの二量体が分解されたことから膜で包まれたウイルス様粒子構造にはこの二量体コアタンパク質のみが存在することがわかった。しかしながら非イオン性界面活性化剤の共存下においてもトリプシンに対してはこの二量体が抵抗性を示すことから、HCVのウイルス様粒子中のヌクレオキャプシドは二量体コアタンパク質で構成されていて、それぞれの二量体コアタンパク質間は密に接しており、塩基性アミノ酸に富んだコアタンパク質のアミノ末端領域はヌクレオキャプシドの中心部に存在することが考えられた。コアタンパク質の128番目のシステインをアラニンに変異させた変異体型組換え体HCVは野性型組換え体HCVと同時に細胞内に導入することによって野性型の感染性粒子の産生を抑制したことから、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HCV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。

A. 研究目的

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によってこのウイルスの感染増殖に関わるウイルス因子と細胞側因子の詳細を明らかにして、これを効果的に抑制する薬剤を抗HCV薬候補として同定することを目的とした。

B. 研究方法

組換え体HCV感染性粒子産生細胞の培養

上清から前年度見出したジスルフィド結合型二量体HCVコアタンパク質に関して、実際にウイルス粒子に含まれているコアタンパク質の正常を明らかにするため、このウイルス様粒子を含む培養上清を非イオン性界面活性化剤の存在、非存在下においてプロテイナーゼKやトリプシンで処理し、コアタンパク質のプロテアーゼに対する反応性を検討した。

組換え体HCV粒子には感染性を有するものと非感染性のものが存在するため、その感染性とジスルフィド結合型二量体HCV

コアタンパク質との関連を明らかにするため、浮遊密度勾配超遠心法を用いて感染性の異なるウイルス様粒子を分画し、ジスルフィド結合型二量体を検出した。

野性型組換え体 HCV と 128 番目のシステイン変異型組換え体 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粒子産生に対する阻害効果の検討をおこなった。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒトからのサンプルは用いていないため、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

組換え体 HCV 感染性粒子産生細胞の培養上清をプロテイナーゼ K で処理した場合、培養上清に存在した単量体コアタンパク質はすべて消化され、ジスルフィド結合型二量体のみが検出され、プロテイナーゼ K に抵抗性を示すことがわかった。この抵抗性は非イオン性界面活性化剤の共存下では失われるため、ジスルフィド結合型二量体コアタンパク質は膜構造に包まれた構造内、つまりウイルス粒子構造に含まれることが示唆された。プロテイナーゼ K の代わりにトリプシンを用いた場合には、非イオン性界面活性化剤の共存下においてもコアタンパク質はトリプシンに対して抵抗性を示した。

浮遊密度勾配超遠心法を用いて感染性ウイルス様粒子を含む分画と非感染性ウイルスを含む分画を得て、そこに存在するコアタンパク質の性状を解析したが、そのどちらにもジスルフィド結合型二量体コアタンパク質が存在した。

組換え体 HCV ゲノムのコアタンパク質領域の 128 番目のシステインをアラニンやセリンに変化させた変異体組換え体 HCV ゲノムを作成し、野性型組換え体 HCV ゲノムと同時に HuH-7 細胞に導入して、培地への粒子産生を検討したが、変異体の量依存的に培地への粒子産生量が低下することがわかった。

D. 考察

HCV のウイルス様粒子のヌクレオキャプシドを構成しているコアタンパク質はそのほとんどがジスルフィド結合型二量体コアタンパク質であり、このジスルフィド結合型二量体コアタンパク質がヌクレオキャプシドの構成する単位である可能性が考えられた。

HCV のウイルス様粒子のヌクレオキャプシドのトリプシンに対する抵抗性からヌクレオキャプシドではジスルフィド結合型二量体コアタンパク質が密接に相互作用し、トリプシンの切断部位が豊富に存在するコアタンパク質のアミノ末端領域がヌクレオキャプシドの内側に隠れた構造をとっていることが推定された。

128 番目のシステインに変異を持つ組換え体 HCV ゲノムは量依存的に野性型組換え体 HCV ゲノムからの粒子産生を抑制したことからコアタンパク質のジスルフィド結合を阻害し、二量体化を抑制することで HCV の粒子産生を阻害することが可能になることが示唆された。

E. 結論

HCV のウイルス様粒子中のヌクレオキャ