

る低回収率の原因として、溶液中の低タンパク質濃度に由来する基材、担体への吸着および HCV 粒子同士の凝集による失活が考えられる。HCV 粒子を安定的に精製するためには、精製時の緩衝液の組成、pH の条件だけでなく、タンパク質の安定化剤の添加を含めてさらに検討する必要がある。

また本研究では、不活化 HCV 粒子ワクチンの免疫原性を最も効果的に高めるアジュバントを見出すことを目的として、3 種類の臨床応用可能なアジュバント (Alum、CpG および poly I:Q および対照として、MPL+TDM を用いて検討を行った。本検討においては、2 週間の間隔を空けて 4 回免疫を行い、免疫期間中の血清中の抗体価の推移を測定した。その結果、免疫を行っていない control マウスと比較すると、いずれの投与群でも明らかな IgG 抗体価の上昇が見られた。さらに誘導された IgG 抗体中のアイソタイプを測定したところ、IgG1 については、3 種類のアジュバントを単独あるいは併用した群のいずれにおいても誘導が確認された。一方、IgG2a、IgG2b および IgG3 については、polyI:C 単独あるいは 3 種類のアジュバントを組み合わせた群において強い抗体誘導が認められた。したがって、total IgG の抗体価に対するアジュバント間の効果の差異は、IgG2a、IgG2b および IgG3 の差異が反映されているものと考えられる。

Alum と CpG については 2 つのアジュバントを組み合わせることによって、単独で使用した場合よりも IgG1 以外のアイソタイプへのクラススイッチを強く誘導することが示された。これまでに、Alum は IgG1 を誘導し、CpG は IgG2a や IgG2b の抗体を誘導することが報告されている。本検討に

においても、CpG 単独投与群では Alum に比べて、IgG2a や IgG2b を比較的強く誘導した。さらに、Alum と CpG を組み合わせることにより、IgG2a や IgG2b の誘導効果がさらに高くなった。Alum と CpG の組み合わせにより、IgG1 に加えて IgG2a も誘導することができることはすでに報告されているが、HCV 粒子ワクチンにおいてこうした効果が認められるということは、今回の検討により初めて明らかとなった。

一般に IgG1 抗体は Th2 タイプの免疫反応を示し、IgG2a や IgG3 (および IgG2b) は Th1 タイプの免疫応答を反映すると考えられている。Th2 タイプの免疫応答はいわゆる体液性免疫反応を示し、Th2 細胞と B 細胞を中心とした防御機構を意味する。また、Th1 タイプの免疫応答は細胞性免疫反応を示し、Th1 細胞と CD8T 細胞を中心とした防御機構のことを指している。生体における免疫反応としては Th1 と Th2 のバランスが重要であるため、ワクチンの作用としても考慮すべき重要な観点と考えられる。さらに、Th2 のみに特化した反応においては IgE を誘導するケースがあり、その場合にはアレルギー応答を引き起こすという点で望ましくない。したがって、バランスのとれた免疫応答を誘導する HCV ワクチンを作製することは重要な課題である。この点で、Alum と CpG の組み合わせは、アジュバントとして用いるときに有力な候補と成り得る。

次に、最終免疫の 1 週間後に採血した血清を用いて、HCVpp および HCVcc に対する感染阻害活性を測定した。その結果、Alum+CpG 群は、評価したアジュバントの中で最も強い感染阻害活性を示した。さらに、遺伝子型 1b の構造タンパク質を有する TH-HCVpp および TH/JFH1 HCVcc に対し

ても、MPL+TDM と同等の感染阻害活性が認められた。以上から、Alum+CpG 群の感染阻害活性の誘導効果が、再現性を持って確認できた。一方、polyI:C 使用群においては、単独あるいは併用使用群のいずれにおいても、IgG2a や IgG2b の抗体誘導活性は認められたが、HCVpp および HCVcc の感染阻害活性については、MPL+TDM 群ほどの誘導は見られなかった。いずれの検討においても poly I:C には併用によるアジュバント効果の増強が認められなかった。Poly I:C の使用を考える場合には、poly I:C そのものを改善する必要があると考えられる。

今回、評価したアジュバントの中で、Alum と CpG は併用による作用が最も効果的に認められた。Alum と CpG はそれぞれ NALP3 および TLR9 という分子を介して細胞を活性化することが知られているが、両方の分子を同時に活性化することで、より強く効果が現れるという可能性が考えられる。さらには、不活化 HCV 粒子ワクチンは TLR7 を活性化するウイルス由来の RNA も含まれている。TLR7 および TLR9 の両方を有するような細胞としては、特に I 型インターフェロンの主要産生細胞であるプラズマサイト様樹状細胞が挙げられるが、このような細胞を効率的に活性化するのかもしれない。また、HCVpp および HCVcc に対しても感染阻害活性の誘導効果は遺伝子型が異なった場合にも認められたことから、汎用性 HCV ワクチンとして使用できる可能性が強く示唆された。

アジュバントの組み合わせを考える場合においては、大きく 2 つの要素を考慮する必要がある。1 つは細胞応答に対する作用が異なるアジュバントを組み合わせる場合で、特に樹状細胞への抗原

の取り込みを高めるアジュバント (Alum など) と、樹状細胞の活性を高めるアジュバント (MPL、CpG など) というようにメカニズムが異なるものを使用するケースである。もう 1 つは細胞の受容体へ作用した後のシグナル伝達経路が異なるというケースで、これには MyD88 依存的経路のみを活性化する受容体 (TLR2、TLR5、TLR7、TRL9 など) に作用するアジュバント、MyD88 非依存的経路のみを活性化する受容体 (TLR3) に作用するアジュバントというように作用が異なるものがある。これらの組合せや構成比率などをさらに広く検討することにより、現状のアジュバントよりも効果の高いアジュバントを見出すことができる可能性がある。今後は、細胞性免疫に対する効果も検証することで、今回検討を行った体液性免疫に対する作用と合わせて、HCV ワクチンの免疫原性と最適なアジュバントを見極める予定である。

今回得られたモノクローナル抗体の一つは、興味深いことに、エンベロープタンパク質の 10 アミノ酸残基からなるペプチドを認識しないことから、直鎖状エピトープでなく、エンベロープタンパク質の立体構造 (コンフォメーション) を認識する抗体であることが示唆された。このような抗体は、Native form の抗原を認識することから、感染阻害抗体としての効果が期待できる。

## E. 結論

- ①HCV 粒子の 3 段階の精製工程を検討し、2 段階の精製工程 (ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製まで) で高効率に夾雑蛋白質が除去できる条件を見出した。
- ②イオン交換クロマトグラフィーにおける低回収率の原因として、溶液中の低タンパク質濃度に

由来する HCV 粒子の凝集や担体・基材などへの吸着が考えられた。

③HCV 粒子を安定的に精製するために、精製時の pH、バッファー、濃度勾配の最適化、および安定化剤の添加等を含めた、更なる検討が必要であると考えられた。

④精製 HCV 粒子免疫マウスにおいて、HCV E1 および E2 に対する様々なアイソタイプの IgG 抗体が誘導された。

⑤遺伝子型 2a の HCV 粒子免疫マウスにおいて、遺伝子型 2a だけではなく、遺伝子型 1a および 1b の HCVpp および HCVcc に対する感染阻害活性が誘導された。

⑥評価アジュバントの中では、Alum+CpG が最も高い免疫応答を誘導した。

⑦エンベロープタンパク質発現系を作製し、本タンパク質を用いた HCV 抗体検出用 EIA 系を構築した。

⑧精製 J6/JFH-1 キメラ HCV 粒子免疫マウスから感染阻害活性を有する抗体を取得した。本抗体の一つは立体構造エピトープを認識することが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver -derived cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377: 747-751 (2008)

2) Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T,

Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun.* (2010) 395:565-571

### 2. 学会発表

1) Daisuke Akazawa, Kenichi Morikawa, Noriaki Omi, Hitoshi Takahashi, Noriko Nakamura, Hidenori Mochizuki, Takaji Wakita. Production and purification of HCV particles from serum-free culture. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, USA 2008.

2) Noriaki Omi, Daisuke Akazawa, Hitoshi Takahashi, Noriko Nakamura, Kenichi Morikawa, Tomoko Date, Tetsuro Suzuki, Koji Ishii, Takaji Wakita. Analysis of immunogenicity of cell culture-grown hepatitis C virus in the mouse. The 2nd Vaccine Congress Boston USA 2008.

3) Masaki Moriyama, Daisuke Akazawa, Noriaki Omi, Yuko Shibuya, Kazumi Nishimura, Noriko Nakamura, Hidenori Mochizuki, Tetsuro Suzuki, Koji Ishii and Takaji Wakita. [Vaccination of infectious HCV particles with several adjuvants and induction of neutralization immunoglobulin in mice], 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France (2009.10.3-7)

4) Masaki Moriyama, Daisuke Akazawa, Hiroshi Yokokawa, Kazumi Nishimura, Noriko Nakamura,

Hidenori Mochizuki, Tetsuro Suzuki, Takanobu Kato, Koji Ishii and Takaji Wakita 「The exploration of effective adjuvant for HCV vaccine to induce neutralizing immunoglobulin in mice」, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan (2010.9.10-14)

5) Hiroshi Yokokawa, Daisuke Akazawa, Masaki Moriyama, Noriko Nakamura, Hidenori Mochizuki, Tetsuro Suzuki, Takanobu Kato, Koji Ishii and Takaji Wakita 「Development of a Purification Method of Highly Purified HCV Virion for Industrial Production」, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan (2010.9.10-14)

6) 尾見法昭、赤澤大輔、高橋 仁、中村紀子、森川賢一、伊達朋子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆字：細胞培養系により産生された HCV ウイルスの免疫原性に関する検討、第 56 回ウイルス学会、平成 20 年 10 月、岡山。

7) 赤澤大輔、森川賢一、尾見法昭、高橋 仁、中村紀子、脇田隆字：無血清培養における HCV 粒子の作製とその精製、第 56 回ウイルス学会、平成 20 年 10 月、岡山。

8) 渋谷悠子、尾見法昭、中村紀子、脇田隆字：細胞培養系で作製した C 型肝炎ウイルスにより誘導された抗体の性状解析、第 12 回日本ワクチン学会、平成 20 年 11 月、熊本。

9) 森山正樹、赤澤大輔、尾見法昭、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆字：培養細胞由来 HCV 粒子を用いたワクチンの免疫誘導能および最適アジュバントの検討、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、平成 21 年 10 月、東京

10) 赤澤大輔、森山正樹、尾見法昭、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆字：培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの免疫による異なる遺伝子型 HCV 感染阻害活性の誘導、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、平成 21 年 10 月、東京

11) 横川寛、赤澤大輔、森山正樹、中村紀子、望月英典、鈴木哲朗、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字：工業化のための高純度 HCV 粒子精製方法の構築、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、平成 22 年 11 月、徳島

12) 森山正樹、赤澤大輔、横川寛、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆字：培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの免疫誘導能と最適アジュバントの検討、第 14 回日本ワクチン学会学術集会、平成 22 年 12 月、東京

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

1) 発明の名称：C型肝炎ウイルス（HCV）に対して感染阻害活性を有する抗体およびその用途

出願番号：PCT/JP2008/063424

出願日：2008.7.25

発明者：赤澤大輔、中村紀子、尾見法昭、森川賢一、鈴木哲朗、脇田隆字

2) 発明の名称：C型肝炎ウイルスのエンベロープタンパク質 2 に結合する抗体及びそれを用いた C型肝炎ウイルスの遺伝子型の同定方法

出願番号：PCT/JP2009/067051

出願日：2009.9.30

発明者：渋谷悠子、中村紀子、脇田隆字

3) 発明の名称：C型肝炎ウイルスワクチン組成物

出願番号：PCT/JP2010/067096

出願日 : 2010. 9. 30

発明者 : 森山正樹、赤澤大輔、中村紀子、  
脇田隆宇

4) 発明の名称 : C型肝炎ウイルス (HCV) に対して感染阻害活性を有する抗体およびその用途

出願番号 : PCT 出願済

出願日 : 2010. 10. 30

西村和美、中村紀子、赤澤大輔、脇田隆宇

分担研究報告書

## 感染中和機構に重要な HCV の初期感染過程の解析

分担研究者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆字

研究要旨 JFH-1 株により C 型肝炎ウイルス (HCV) のウイルス培養系で作製した精製ウイルス粒子により中和活性の誘導が可能であることが明らかとなった。そこで、HCV の予防的及び治療的ワクチンの実用化に向けた研究と共に、ウイルス感染および中和に関する基盤的研究を進める。ワクチン開発により C 型肝炎の予防が可能となるだけでなく、HCV の感染過程の解明による新たな治療標的が探索できることも期待できる。本分担研究では HCV 感染中和機構の解明を目指し、ウイルスの粒子構造、ウイルス表面蛋白質の構造解析など初期感染に関連する機構の解析をおこなう。

### A. 研究目的

HCV のワクチン開発が進まなかった最大の理由として、培養細胞系で増殖しなかったこと、宿主域が狭くヒト及びチンパンジー以外の動物に感染・発症しないことが挙げられる。劇症肝炎患者から分離した JFH-1 株は、これまでの HCV 株と比較して培養細胞における複製能力が非常に高く、JFH-1 株の合成全長 RNA を培養細胞に導入することにより感染性ウイルス粒子が分泌される。我々は、この JFH-1 株によるウイルス感染系を用いてウイルス感染中和活性のアッセイ系の樹立に成功し、またウイルス粒子を大量精製して小動物に免疫し、感染中和活性が誘導されることを実証した。HCV には多くの genotype が存在することも治療を困難にしており、genotype に関わらず効果を発揮するワクチンが望まれる。とりわけ日本人に多い genotype 1b に対して感染中和活性を有するワクチンの開発を目的として、JFH-1 (genotype 2a) の構造蛋白領域を他の genotype に置き換えて、キメラウイルス粒子によるワクチンを作製して

免疫原性を比較する。さらにウイルス粒子の不活化法を開発し、実際に投与可能な不活化リコンビナントウイルスワクチンを作製する。HCV に対するワクチン開発は新たな HCV 感染を減少させ、HCV 感染症の最終病態である肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らすことにより、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与することが可能である。このために、本分担研究では HCV 感染中和機構の解明を目指し、ウイルスの粒子構造、ウイルス表面蛋白質の構造解析など初期感染に関連する機構の解析をおこなう。

### B. 研究方法

#### 1. ウイルス粒子の構造解析

精製したウイルス粒子の夾雑物を減らす目的でさまざまな濃度で界面活性剤を添加した後にしょ糖密度勾配によりウイルスを精製した。精製ウイルス粒子を電子顕微鏡で観察した。抗 E2 抗体による免疫電子顕微鏡観察を試みた。

## 2. HCVエンベロープ蛋白質の精製

HCVエンベロープ蛋白質 (E1およびE2) は糖鎖による修飾を受けるため、リコンビナント蛋白質による構造解析が進まなかった。そこで、一部の糖鎖修飾酵素が欠損した培養細胞を用いてE1およびE2蛋白質を精製した。E2遺伝子の3' 端の膜貫通領域を欠損し、5' 端にFLAGタグ配列を挿入し、哺乳細胞プロモーターの下流に挿入した発現プラスミドを作成した。293細胞でリコンビナントE2蛋白を作製し、その糖鎖構造を質量分析で解析した。さらに、感染性全長HCV遺伝子の糖鎖付加部位を改変して、HCVの複製増殖に対する影響を検討した。

## 3. 無血清培養によるHCVウイルス産生

FCS濃度を10%, 5%, 2%, 1%, 0.5%およびFCSなしとした培養液を作成し、Huh7細胞を培養した。さらにFCS各濃度におけるウイルス培養を試みた。

## 4. 不活化粒子免疫により誘導された抗体によるin vivo 感染防御実験

J6/JFH1キメラウイルス感染Huh7細胞の培養上清から限外濾過および超遠心により精製したウイルス粒子をUV照射により不活化し、Sigma Adjuvant systemと混合してBALB/cマウスに免疫した。免疫マウスの血清からIgGを精製し、感染阻害活性をウイルス培養系により測定した。さらにこのIgGを感染性ウイルスと混合してヒト肝細胞キメラマウスに接種した。ウイルス接種マウスにはあらかじめIgGを腹腔内にも投与した。非免疫マウスから精製したコントロールIgGとHCV感染阻害活性を比較した。

## (倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### 1. ウイルス粒子の構造解析

JFH-1およびJ6/JFH-1ウイルスの全長RNAを培養細胞に導入して、培養液中に分泌されたウイルス粒子を限外濾過法により濃縮した。さらにしょ糖密度勾配遠心法で精製したウイルス粒子にNP40を添加し、4℃でインキュベーションした。そのウイルス粒子をもう一度しょ糖密度勾配遠心法で精製した。精製後、ウイルス標品の総タンパク濃度は非常に低くなった。0.02%以上のNP40を添加するとウイルス粒子様構造は分解され観察されなかった。0.013% NP40の添加では20面体構造とみられる小粒子が観察され、エンベロープを失ったヌクレオキャプシドと考えられた。0.0067%および0.002% NP40の添加により直径約60nm程度のウイルス粒子様構造が確認できた。また、抗E2抗体による免疫電子顕微鏡観察によりウイルス様構造の表面への抗体付着が確認できた。

## 2. HCVエンベロープ蛋白質の精製

HCVエンベロープ蛋白質 (E1およびE2) は糖鎖による修飾を受ける。E1には4ヶ所、E2には11ヶ所の糖鎖修飾部位が存在する。E2遺伝子の3' 端の膜貫通領域を欠損し、5' 端にFLAG タグ配列を挿入し、哺乳細胞プロモーターの下流に挿入した発現プラスミドを作成した。293細胞およびGnTI糖転移酵素が欠損した293GnTI(-)細胞にE2発現プラスミドをトランスフェクションし、培養上清中のE2蛋白質をFLAG抗体カラムで精製した。培養上清中のE2蛋白質をFLAG抗体カラムで精製した。293細胞で発現したE2蛋白質はブロードな分子量を示した。この精製E2蛋白質の糖鎖構造を質量分析で解析すると複合型であった。

E1およびE2の糖鎖付加部位アミノ酸をNからQへ変異させた全長ウイルスを作成し、ウイルス増殖、ウイルス粒子産生および感染性について解析した。その結果ウイルス増殖への影響はなかった。またウイルス粒子産生能は一部のアミノ酸変異ではウイルス粒子産生が低下した。興味深いことに一部のアミノ酸変位ではウイルス粒子産生は変化しないが、ウイルスの感染性の増強が観察された。複数の糖鎖付加部位を変異させたクローンを作製して、ウイルス粒子表面の糖鎖機能の解析をさらに進めている。

## 3. 無血清培養によるHCVウイルス産生

FCS濃度を10%, 5%, 2%, 1%, 0.5%およびFCSなしとした細胞培養液中の総蛋白濃度は1%, 0.5%およびFCSなしでほぼ同程度で、10%FCSの約1/4程度であった。でHuh7細胞の増殖を観察した。さらにFCS濃度を下げるとHuh7細胞の増

殖は低下するものの、1%, 0.5%および無血清で同程度に増殖した。そこで、10%FCS培養液と無血清培養液により培養したHuh7細胞にJFH-1およびJ6/JFH1の全長RNAをトランスフェクションしてウイルス粒子産生を比較したところ、培養液中にはほぼ同程度のHCVコア濃度のウイルスが分泌された。感染性もほぼ同程度であったが、抗CD81抗体および抗E2抗体による感染阻害を比較すると無血清培養で作成したウイルスの方がどちらの抗体でも阻害されやすいことがわかった。さらに、apoBおよびapoE抗体により免疫沈降実験で、10%FCSで作成したウイルスは感染性の一部が除去されるが、無血清で作成したウイルスは除去されなかった。

## 4. 不活化粒子免疫により誘導された抗体によるin vivo 感染防御実験

J6/JFH1キメラウイルス感染Huh7細胞の培養上清を集めて、限外濾過により低分子夾雑物を除去および濃縮した。さらにしょ糖クッションによる超遠心法によりウイルス粒子を精製した。精製ウイルス粒子をUV照射により不活化し、Sigma Adjuvant systemと混合してBALB/cマウスに4回免疫した。免疫マウスの血清はJFH-1とJ6(遺伝子型2a), TH(遺伝子型1b)のHCVppに対して感染阻害活性を示した。さらに免疫マウス血清からIgGを精製し、感染阻害活性をJ6/JFH1ウイルス培養系により測定すると、容量依存性に感染を阻害した。そこでこのIgGを感染性ウイルスと混合してヒト肝細胞キメラマウスに接種した。ウイルス接種マウスにはあらかじめIgGを腹腔内にも投与した。非免疫マウスから精製したコントロールIgGとHCV感染阻害活性を比較した。コントロールIgG投与群では6匹中4匹のマウスで感



染が成立したが、免疫マウスの IgG 投与群では 6 匹の全マウスで感染が認められず、in vivo での感染阻害活性が観察できた。

#### D. 考察

ウイルス粒子の界面活性剤による精製により得られる、ウイルス標品の電子顕微鏡による解析とエンベロープ蛋白質の糖鎖付加部位の変異によるウイルス複製増殖および感染性への影響を解析した。現在の精製法により得られる精製ウイルス粒子には夾雑物が多く含まれることがわかってきた。これはウイルス粒子の性質にもよるが宿主由来の脂質や蛋白質が付着していると考えられる。これらの宿主因子はHCVの感染性にも影響していると考えられ、その機能について解析する必要がある。一方でこれらの夾雑物はウイルス粒子の形態解析を阻害する。そこでその影響を避けるために、界面活性剤を添加することによりウイルス粒子に付着する夾雑物の除去を試みた。一定濃度以上の界面活性剤を添加するとウイルス粒子自体も破壊され粒子構造物は観察されなくなるが、濃度を薄くしていくことにより、ヌクレオキャプシド構造およびウイルス粒子構造が観察できた。抗E2抗体を用いた免疫電子顕微鏡によりこれらのウイルス粒子がHCV粒子であることを確認できた。クライオ電顕などをおこなうためさらにウイルス粒子の精製を試みている。

また、HCVのエンベロープ蛋白質にはE1に4ヶ所、E2に11ヶ所と多くの糖鎖付加部位がある。従って、ウイルス粒子上には多くの糖鎖が存在している。しかし、この糖鎖がどのような構造をして、どのような役割を果たしているかは明らかでない。そこで、精製エンベロープ蛋白質に付加してい

る糖鎖構造を解析したところ複合型であることがわかった。さらにウイルス粒子状の糖鎖機能を解析するために、糖鎖付加部位を欠損するウイルス株を作製してその複製増殖感染機能を検討した。1ヶ所ずつの糖鎖欠損では複製能に影響はなかったが、ウイルス粒子の産生が低下する変異が存在した。さらに興味深いことにウイルスの感染性を増強する変異が見られた。一部の糖鎖は感染に必要な構造をマスクしている可能性が考えられる。現在糖鎖付加部位をすべて欠損するウイルスを作成してその機能を検討中である。

さらにウイルス培養において夾雑物を減らすために重要な無血清培養によるウイルス培養を試みた。ウイルス培養に使用しているHuh7細胞は無血清培養に馴化可能なことが知られており、我々も無血清での培養が可能であった。さらに無血清で培養したHuh7細胞によるウイルス産生が可能であることが明らかとなった。興味深いことに抗CD81抗体および抗E2抗体による感染阻害への感受性が変化していた。アポ蛋白抗体による感染ウイルスの除去実験により、無血清培養で作成したウイルスはほとんど除去されなかった。以上の結果から無血清培養で作成しウイルスはアポ蛋白の付加が少なく、そのためCD81とE2の結合への依存性が高い可能性が示唆された。

また、不活化精製ウイルス粒子で免疫したマウスには感染阻害抗体が誘導された。この免疫マウスから精製したIgGはin vivoでの感染阻害活性があることが明らかとなった。この結果は感染予防ワクチンおよび抗HCV免疫グロブリン開発の可能性を示している。HCVは世界中で1.7億人にのぼる感染者が存在し、肝細胞癌に至る重大な感染症である。インターフェロ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、治療用ワクチンも期待されている。HCVワクチンが開発され、HCVの新たな予防法および治療法が開発されれば、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。また、予防用及び治療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。

1. ウイルス粒子の精製法を改良することにより精製度の高いHCV粒子を得ることができ、より精密にHCV粒子を電子顕微鏡で観察することができた。

2. HCVの初期感染過程に重要な役割を果たすE2蛋白質の精製に成功した。エンベロープ蛋白質上の糖鎖は複合型であった。

3. 糖鎖付加部位を欠損したウイルスも感染複製増殖が可能であった。ウイルス粒子産生能、感染性の変化が観察された。

4. 無血清培養により作成したウイルスの性状を解析した。

5. 不活化精製ウイルス粒子を免疫したマウスから精製したIgGにin vivoにおける感染阻害活性を確認した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1: Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J,

Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. *J Virol.* 2010 84(22):11761-70.

2: Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol.* 2010 84(22):12048-57.

3: von dem Bussche A, Machida R, Li K, Loevinsohn G, Khander A, Wang J, Wakita T, Wands JR, Li J. Hepatitis C virus NS2 protein triggers endoplasmic reticulum stress and suppresses its own viral replication. *J Hepatol.* 2010 53(5):797-804.

4: 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(2):361-9.

5: Podevin P, Carpentier A, Pène V, Aoudjehane L, Carrière M, Zaidi S, Hernandez C, Calle V, Méritet JF, Scatton O, Dreux M, Cosset FL, Wakita T, Bartenschlager R, Demignot S, Conti F, Rosenberg AR, Calmus Y. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology.* 2010 139(4):1355-64.

6: Kushima Y, Wakita T, Hijikata M. A disulfide-bonded dimer of the core protein of

- hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J Virol.* 2010 84(18):9118-27.
- 7: Banaudha K, Orenstein JM, Korolnek T, St Laurent GC 3rd, Wakita T, Kumar A. Primary hepatocyte culture supports hepatitis C virus replication: a model for infection-associated hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 2010 51(6):1922-32.
- 8: 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(1):75-85.
- 9: Arnaud N, Dabo S, Maillard P, Budkowska A, Kalliampakou KI, Mavromara P, Garcin D, Hugon J, Gatignol A, Akazawa D, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. *PLoS One.* 2010 5(5):e10575.
- 10: Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T. RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLoS Pathog.* 2010 6(4):e1000885.
- 11: Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 395(4):565-71.
- 12: Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol.* 2010 84(11):5824-35.
13. Hazari S, Chandra PK, Poat B, Datta S, Garry RF, Foster TP, Kousoulas G, Wakita T, Dash S. Impaired antiviral activity of interferon alpha against hepatitis C virus 2a in Huh-7 cells with a defective Jak-Stat pathway. *Virology.* 2010 7(1):36.
14. Ishibashi M, Wakita T, Esumi M. 2',5'-Oligoadenylate synthetase-like gene highly induced by hepatitis C virus infection in human liver is inhibitory to viral replication in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 392(3):397-402.
15. Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res.* 2010 85(3):520-524.
16. Liu X, Wang T, Wakita T, Yang W. Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells. *Virology.* 2010 398(1):57-67.
17. Angus AG, Dalrymple D, Boulant S, McGivern DR, Clayton RF, Scott MJ, Adair R, Graham S, Owsianka AM, Targett-Adams P, Li K, Wakita T, McLauchlan J, Lemon SM, Patel AH. Requirement of cellular DDX3 for hepatitis C

- virus replication is unrelated to its interaction with the viral core protein. *J Gen Virol.* 2010 91(1):122-32..
18. Seronello S, Ito C, Wakita T, Choi J. Ethanol enhances hepatitis C virus replication through lipid metabolism and elevated NADH/NAD+. *J Biol Chem.* 2010, 285(2):845-54.
19. Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A. *Arch Virol.* 2009;154(10):1671-7.
20. Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T. Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. *J Clin Microbiol.* 2009 47(12):4141-3.
21. Kato N, Mori K, Abe KI, 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.* 2009 146(1-2):41-50.
22. 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.* 2009 5(7):937-45.
23. Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Res.* 2009 83(2):112-7.
24. Kang JI, Kim JP, Wakita T, Ahn BY. Cell culture-adaptive mutations in the NS5B gene of hepatitis C virus with delayed replication and reduced cytotoxicity. *Virus Res.* 2009 144(1-2):107-16.
25. Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Double-stranded RNA-induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. *Arch Virol.* 2009;154(5):801-10.
26. Weng L, Du J, Zhou J, Ding J, Wakita T, Kohara M, Toyoda T. Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain. *Arch Virol.* 2009;154(5):765-73.
27. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol.* 2009 83(10):5137-47.
28. Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, Shoji I. Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *J Cell Biochem.* 2009 106(6):1123-35.

29. Park CY, Jun HJ, Wakita T, Cheong JH, Hwang SB. Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *J Biol Chem*. 2009 284(14):9237-46.
30. Kondo Y, Machida K, Liu HM, Ueno Y, Kobayashi K, Wakita T, Shimosegawa T, Lai MM. Hepatitis C Virus Infection of T Cells Inhibits Proliferation and Enhances Fas-Mediated Apoptosis by Down-Regulating the Expression of CD44 Splicing Variant 6. *J Infect Dis*. 2009 199(5):726-736.
31. Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic Trioxide Inhibits Hepatitis C Virus RNA Replication through Modulation of the Glutathione Redox System and Oxidative Stress. *J Virol*. 2009 83(5):2338-2348.
32. Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, Wakita T, Miyamura T, Matsuura Y, Suzuki T. Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28{gamma}-Dependent Mechanism. *J Virol*. 2009 83(5):2389-2392.
33. 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*. 2009 383(2):319-27.
34. Wakita T. Isolation of JFH-1 strain and development of an HCV infection system. *Methods Mol Biol*. 2009;510:305-27.
35. Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 377(3):747-51.
36. Lan L, Gorke S, Rau SJ, Zeisel MB, Hildt E, Himmelsbach K, Carvajal-Yepes M, Huber R, Wakita T, Schmitt-Graeff A, Royer C, Blum HE, Fischer R, Baumert TF. Hepatitis C virus infection sensitizes human hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis in a caspase 9-dependent manner. *J Immunol*. 2008 181(7):4926-35.
37. Kimura T, Imamura M, Hiraga N, Hatakeyama T, Miki D, Noguchi C, Mori N, Tsuge M, Takahashi S, Fujimoto Y, Iwao E, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Arataki K, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Okamoto T, Matsuura Y, Chayama K. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*. 2008 89(9):2108-13.
38. Kato T, Choi Y, 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*. 2008 48(3):732-40.

39. Sir D, Chen WL, Choi J, Wakita T, Yen TS, Ou JH. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology*. 2008 48(4):1054-61.
40. 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*. 2008 82(19):9639-46.
41. Murakami K, Kimura T, Osaki M, Ishii K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T, Shoji I. Virological characterization of the hepatitis C virus JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J Gen Virol*. 2008 89(7):1587-92.
42. Ebihara T, Shingai M, Matsumoto M, Wakita T, Seya T. Hepatitis C virus-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology*. 2008 48(1):48-58.
- 43: 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(16):7964-76.
44. Mateu G, Donis RO, Wakita T, Bukh J, Grakoui A. Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death. *Virology*. 2008 376(2):397-407.
45. Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Zhang B, 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*. 2008 371(3):446-50.
46. Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, van Poll D, Wakita T, Chung RT, Yarmush ML. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology*. 2008 47(5):1437-45.
47. 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(12):5715-24.
2. 学会発表および講演など
1. 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構」、第23回肝臓フォーラム（東部）、日本工業倶楽部会館（2010, 6.5）
2. 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構の解析」、第9回KMU研究推進セミナー、北陸がんプロ教育セミナー、金沢医科大学病院新館12階大会議室（2010, 6.18）
3. 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスの培養細胞でのウイルス複製と生体における持続感染機構」、京都大学ウイルス研究所 学術講演会、京都大学 京大会館101号室（2010, 7.15）

4. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構の研究」、第17回ソニックフォーラム、ソニックシティビル 6階602会議室 (2010, 11.25)
5. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、宮村達男、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCVNS5A 蛋白のリン酸化に関する新規セリン/スレオニンキナーゼの探索、第46回日本肝臓学会総会、ホテルメトロポリタン山形、(2010, 5.27-28)、ワークショップ5 「C型肝炎ウイルスの感染・増殖メカニズムと臨床応用」
6. 有海康雄、黒木美沙緒、土方誠、Qi Yue、池田正徳、脇田隆宇、下遠野邦忠、加藤宜之、ESCRT 小胞輸送系の HCV 産生への関与、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)、シンポジウム6 ウイルス培養系を用いたC型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明
7. 加藤孝宣、岡本有加、村山麻子、政木隆博、脇田隆宇、HCVの増殖適応変異とその意義、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)、シンポジウム6 ウイルス培養系を用いたC型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明
8. 相崎英樹、後藤耕司、松本喜弘、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、本島清人、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV 粒子形成に関する脂肪滴周辺膜蛋白の機能解析、第46回日本肝臓学会総会、ホテルメトロポリタン山形、(2010, 5.27-28)
9. 鈴木亮介、齋藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆宇、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
10. 白砂圭崇、齊藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、花田賢太郎、千葉丈、深澤征義、感染・増殖能が上昇したC型肝炎ウイルス変異株の分離と性状解析、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
11. 阿部雄一、Aly Hassan Hussein 脇田隆宇、下遠野邦忠、土方誠、Exploration of a new signaling pathway related to infectious HCV production、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
12. 土方誠、阿部雄一、Aly Hassan Hussein、齐月、脇田隆宇、下遠野邦忠、臨床分離 HCV 株の培養と性状、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
13. 深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、村上裕子、C型肝炎ウイルス (HCV) に阻害作用を示す物質の探索、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
14. 渡士幸一、下遠野邦忠、Kuan-Teh Jeang、脇田隆宇、マイクロRNA経路のC型肝炎ウイルス複製における意義とその創薬標的としての役割、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
15. 江角真理子、石橋真理子、鶴田浩一、山口裕美、菊田幸子、榊原由子、脇田隆宇、C型肝炎ウイルス感染に対する自然防御について、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
16. 渡邊則幸、村山麻子、Mohsan Saeed、伊達朋子、加藤孝宣、相崎英樹、脇田隆宇、HCVエンベロープタンパク質に付加されるN型糖鎖の機能解析、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)

17. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスのウイルス培養系とその応用」第28回広島山口肝疾患研究会、リーガロイヤル広島 (2009, 4.4)
18. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究結果について」、第165回袋井病診カンファレンス、袋井市民病院 (2009, 4.20)
19. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究と新規治療法開発」、Hep C Forum 2009 KANAZAWA 石川県文教会館ホール (2009, 6.13)
20. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究の進歩」、第12回臨床肝臓研究会、ザ・ナハテラス (2009, 9.25)
21. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖に関する話題」、第6回京滋ウイルス性肝炎研究会、ホテルグランヴィア京都 (2010, 2.6)
22. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究の進歩とその応用」、第6回九州C型肝炎研究会、ホテル日航福岡 (2010, 2.20)
23. 相崎英樹、脇田隆宇、感染性HCV粒子形成における宿主生体膜の役割、第45回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、(2009, 6.4-5)、シンポジウム1「C型慢性肝炎における宿主とウイルスの interaction」
24. 加藤孝宣、伊達朋子、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの生体内での感染様式と培養細胞での増殖能、第45回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、(2009, 6.4-5)、ワークショップ3「C型肝炎の基礎と臨床」
25. 脇田隆宇、肝炎ウイルス基礎研究、第45回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、(2009, 6.4-5)、ハイライトレクチャー
26. 鈴木哲朗、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの感染粒子形成機構、第13回日本肝臓学会大会、国立京都国際会館、(2009, 10.14-16)、パネルディスカッション13「肝炎ウイルス研究の新展開-新しい治療戦略を目指して」
27. 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV粒子形成に關与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)、ワークショップ7 ウイルス粒子形成
28. 石橋真理子、鶴田浩一、山口裕美、藤田順一、田中輝明、清水洋子、脇田隆宇、鈴木操、江角真理子、肝臓類洞内皮C型レクチンL-SIGN発現系を用いたC型肝炎ウイルス粒子JFH1の感染実験、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
29. 鈴木亮介、斎藤憲司、安東友美、石井孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルスの *trans*-packaging系を用いたNS2蛋白質の感染性粒子形成における機能解析、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
30. 渡邊則幸、村山麻子、赤澤大輔、朝長充則、伊達朋子、加藤孝宣、鈴木哲朗、脇田隆宇、HCV E2タンパク質の糖鎖機能の解析、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
31. 赤澤大輔、森山正樹、尾見法昭、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆宇、培養細胞由来HCV粒子ワクチンの免疫による異なる遺伝子型HCV感染阻害活性の誘導、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2008, 10.25-27)



3 2. 山本真民、相崎英樹、宮村達男、濱野國勝、脇田隆宇、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルス粒子形成、感染性に重要なコレステロール構造の解析、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)

3 3. 久島透嘉、脇田隆宇、土方誠、coreの変異体を用いたC型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)

3 4. 有海康雄、黒木美沙緒、牧正敏、池田正徳、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宜之、ESCRT小胞輸送系のHCV産生への関与、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)

3 5. 赤澤大輔、森山正樹、尾見法昭、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆宇、培養細胞由来HCV粒子ワクチンの免疫による異なる遺伝子型HCV感染阻害活性の誘導、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)

3 6. 谷田以誠、深澤征義、脇田隆宇、花田賢太郎、オートファジーはHCV粒子産生に関与している、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)

3 7. 森山正樹、赤澤大輔、尾見法昭、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆宇、培養細胞由来HCV粒子を用いたワクチンの免疫誘導能および最適アジュバントの検討、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10. 25-27)

3 8. 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルス研究の進展：ウイルス増殖からワクチン開発へ」、第134回日本医学会シンポジウム「感染症をめぐる最近の話題」、日本

医師会館、(2008, 7. 17)

3 9. 森川賢一、脇田隆宇、培養細胞で作製した感染性C型肝炎ウイルス粒子の免疫原性の解析およびワクチン応用への可能性、第44回日本肝臓学会総会、愛媛県民文化会館、(2008, 6. 5-6)、ワークショップ7「肝炎ウイルスの感染・複製・排除のメカニズム」

4 0. 加藤孝宣、三代俊治、脇田隆宇、HCV JFH1株のチンパンジーへの感染実験：in vivo適応変異の機能的解析、第44回日本肝臓学会総会、愛媛県民文化会館、(2008, 6. 5-6)、ワークショップ7「肝炎ウイルスの感染・複製・排除のメカニズム」

4 1. 脇田隆宇、C型肝炎ウイルス研究の最先端、第12回日本肝臓学会大会、グランドプリンスホテル新高輪、(2008, 10. 1)、シンポジウム1「肝炎ウイルス研究のカットニングエッジ：基礎から臨床への贈り物」

4 2. 脇田隆宇、ウイルス培養系を用いたC型肝炎ウイルス研究、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10. 26-28)、シンポジウム4 C型肝炎

4 3. 原弘道、相崎英樹、松田麻美、村上恭子、勝二郁夫、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、creatine kinase BはC型肝炎ウイルスNS4Aとの相互作用によりウイルスゲノム複製複合体へ運ばれエネルギー供給に働く、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10. 26-28)、ワークショップ2 ウイルス複製機構

4 4. 政木隆博、鈴木亮介、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、村山麻子、伊達朋子、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV粒子形成に

における NS5A 蛋白の役割、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター (2008, 10. 26-28)、ワークショップ 6 ウイルス侵入・粒子機構

4 5. 山下篤哉、松本武久、高谷大輔、上條加寿恵、前川伸哉、雨宮史武、坂本直哉、脇田隆宇、梅山秀明、横山茂之、榎本信幸、伊藤正彦、In silico screening による HCV NS3 プロテアーゼ阻害化合物の検索、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター (2008, 10. 26-28)、ワークショップ 8 ウイルス感染症の診断と治療

4 6. 脇田隆宇、C 型肝炎ウイルスのウイルス培養とワクチン開発、第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場 (2008, 10. 28-30)、シンポジウム 4 ウイルス発癌

4 7. 有海康雄、黒木美沙緒、團迫浩方、阿部健一、池田正徳、脇田隆宇、加藤宜之、ATM DNA 損傷センサーは C 型肝炎ウイルスの RNA 複製に必要である、第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場 (2008, 10. 28-30)、ワークショップ 3-4 HCV

4 8. 政木隆博、鈴木亮介、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV の粒子形成における NS5A 蛋白の役割、第 4 4 回日本肝臓学会総会、愛媛県民文化会館、(2008, 6. 5-6)

4 9. 平賀伸彦、今村道雄、木村俊之、畠山剛、光井富喜子、三木大樹、森奈美、柘植雅貴、高橋祥一、脇田隆宇、茶山一彰、HBV と HCV はインターフェロン感受性が異なる - ウイルス複製培養細胞および動物モデルを用いた検討 -、第 4 4 回日本肝臓学会総会、愛媛県民文化会館、(2008, 6. 5-6)

5 0. 脇田隆宇、「C 型肝炎ウイルスの細胞内粒子形成過程の解析」「感染現象のマトリックス」横系の会、東京大学医科学研究所 (2008, 5. 29-30)

5 1. 相崎英樹、脇田隆宇、「C 型肝炎ウイルスの生活環における脂質の役割に関する研究」「感染現象のマトリックス」横系の会、兵庫医科大学 (2008, 6. 28-29)

5 2. 加藤宜之、森京子、阿部健一、團迫浩方、有海康雄、脇田隆宇、池田正徳、新しいヒト肝癌細胞株 Li23 を用いた HCV 生活環再現システム、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター (2008, 10. 26-28)

5 3. 下池貴志、SA McKenna, DA Lindhout, 脇田隆宇, JD. Puglisi, HCV IRES 依存的翻訳は eIF2 のリン酸化耐性である、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター (2008, 10. 26-28)

5 4. 有海康雄、黒木美沙緒、團迫浩方、阿部健一、池田正徳、脇田隆宇、加藤宜之、DNA 損傷センサー ATM および Chk2 と HCV NS5B との相互作用、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター (2008, 10. 26-28)

5 5. 石井孝司、村上恭子、ススムエー、張斌、李津、白倉雅之、森川賢一、鈴木亮介、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルスの subgenomic replicon を持つウイルス用粒子の形成と感染性、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター (2008, 10. 26-28)

5 6. 棟方翼、脇田隆宇、野本明男、TLR3 は C 型肝炎ウイルス感染を抑制する、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター (2008, 10. 26-28)

5 7. 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬朗、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆宇、勝二郁夫、HCV コア蛋白質に結合する新規宿主因子

hnRNPH1/H2 の HCV 生活環における役割、日本ウイルス学会第 56 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

58. 石橋真理子、脇田隆宇、江角真理子、C 型肝炎ウイルス量の多い肝組織に発現亢進する分子 OASL はウイルス制御分子か?、日本ウイルス学会第 56 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

59. 浜本いつき、村上恭子、鈴木哲郎、多屋馨子、岡部信彦、脇田隆宇、勝二郁夫、C 型肝炎ウイルス複製を制御する宿主因子 ERGIC-53 の機能、日本ウイルス学会第 56 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

60. 黒木美沙緒、有海康雄、池田正徳、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宜之、亜ヒ酸は酸化ストレスを介して HCV RNA の複製を顕著に阻害する、日本ウイルス学会第 56 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

61. 武部豊、上西理恵、納富香子、廖華南、長谷彩希、鈴木哲朗、脇田隆宇、袴田航、CD81 を標的とする新しいクラスの低分子性 HCV エントリー阻害剤の同定、日本ウイルス学会第 56 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

62. 尾見法昭、赤澤大輔、高橋仁、森川賢一、伊達朋子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆宇、細胞培養により産生されたキメラ HCV ウイルス株および JFH-1 株の免疫の検討、日本ウイルス学会第 56 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

63. 上西理恵、廖華南、袴田航、納富香子、長谷彩希、赤澤大輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、武部豊、HCV JFH-1 infectivity assay を用いた低分子 HCV 阻害剤の探索とその評価、日本ウイルス学会第

6 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

64. 阿部健一、池田正徳、有海康雄、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宜之、Cyclosporine A に対し抵抗性を示す 1b/2a キメラレプリコン、日本ウイルス学会第 56 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

65. 渋谷悠子、尾見法昭、中村紀子、脇田隆宇、細胞培養系で作製した C 型肝炎ウイルスにより誘導された抗体の性状解析、第 12 回日本ワクチン学会学術集会、崇城大学市民ホール(2008, 11.8-9)

66. 千代智子、関口敏、松原明弘、保富康宏、脇田隆宇、志田壽利、水野喬介、村井深、小原道法、HCV 遺伝子組換えワクチニアウイルスの作製とワクチンとしての検討、第 12 回日本ワクチン学会学術集会、崇城大学市民ホール(2008, 11.8-9)

67. 勝二郁夫、大崎一直、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆宇、堀田博、C 型肝炎ウイルスコア蛋白質のユビキチン化シグナル、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008. 12.9-12)

68. 相崎英樹、山本真民、原弘道、森川賢一、谷英樹、松浦善治、斎藤恭子、深澤征義、花田賢太郎、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、脂質の C 型肝炎ウイルス感染における役割、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008. 12.9-12)

69. 高橋仁、尾見法昭、赤澤大輔、中村紀子、望月英典、鈴木哲朗、脇田隆宇、エピトープタグを付加した組換え HCV 粒子の効率的な産生と性状解析、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008. 12.9-12)

69. 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆宇、勝二郁夫、HCV コア蛋白に結合する新規宿主因子 hnRNP H1/H2 の HCV 生活環における役割、第31回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド (2008. 12. 9-12)

70. 石橋真理子、脇田隆宇、清水洋子、江角真理子、肝臓類洞内皮 C 型レクチン L-SIGN の C 型肝炎ウイルス受容体機能の解析、第31回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド (2008. 12. 9-12)

71. T Wakita. HCV replication and persistent infection, Cold Spring Harbor Asia Conference on Emerging Infectious Diseases: Emerging Viruses and the Control of Viruses, Cold Spring Harbor Asia Conference, October 18 - 22, 2010, Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China

72. T Wakita. HCV replication in vitro, The 7th Single Topic Conference: Hepatitis C Virus, Asia Pacific Association of the Study of the Liver (APASL), Makuhari Messe, Chiba, Japan (2010 Dec 17-18)

73. R Suzuki, D Akazawa, K Ishii, Y Matsuura, T Wakita, T Suzuki, Efficient production of *trans*-complemented hepatitis C virus particles: Use for study of viral entry process, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)

74. T Masaki, S Matsunaga, H Takahashi, T Kato, Y Endo, T Sawasaki, T Wakita, T Suzuki, Identification of hepatitis C virus

NS5A-associated protein kinases, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)

75. N Watanabe, A Murayama, M Saeed, T Date, T Kato, T Wakita, Analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)

76. H Yokokawa, D Akazawa, M Moriyama, N Nakamura, H Mochizuki, T Suzuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, Development of a Purification Method of Highly Purified HCV Virion for Industrial Production, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)

77. M Moriyama, H Yokokawa, D Akazawa, K Nishimura, N Nakamura, H Mochizuki, T Suzuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, The exploration of effective adjuvant for HCV vaccine to induce neutralizing immunoglobulin in mice, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)

78. K Watashi, K Shimotohno, K-T Jeang, T Wakita, Inhibition of HCV replication by a small molecule that suppresses microRNA pathway, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep.