

201030011A

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

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 **基盤的研究**

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成23(2011)年3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

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

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成23(2011)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

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 鈴木 哲朗	1
---	---

II. 分担研究報告書

HCV複製増殖機構の解析に関する研究 下遠野 邦忠	11
Micro RNA-122によるHCVの翻訳亢進機構の解析 松浦 善治	17
高感染性HCV適応変異株の性状解析 深澤 征義	21
ウイルス蛋白-宿主因子相互作用の分子機構に関する研究 堀田 博	27
C型肝炎と脂質代謝 小池 和彦	31
無細胞技術を用いたHCV proteaseで切断される宿主プロテインカイネーゼの探索 澤崎 達也	37
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 瀬谷 司	43
実験モデルの開発に関する研究 加藤 宣之	47
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 鐘ヶ江 裕美	53
C型肝炎ウイルス排除機構の解析 小原 道法	57
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 深澤 秀輔	61
抗C型肝炎ウイルス(HCV)活性を有する化合物の探索・創製研究 掛谷 秀昭	63

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別冊

I. 総括研究報告書

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

研究代表者 鈴木 哲朗 浜松医科大学医学部 教授

研究要旨：以下の研究成果を得た。1) HCV コアに対する細胞内抗体（イントラボディ）を作出し、コアとの結合、HCV 産生阻害作用を明らかにした。2) 細胞外へ放出された感染性 HCV 粒子は HCV/VLDL 複合体よりも小さいこと、ApoE の会合は感染性に必要だが十分でないことを明らかにした。3) Micro RNA-122 による HCV 翻訳亢進機構の解析に有用な細胞株 Hec1B を見出し、miR-122 導入による顕著な HCV 産生亢進を示した。4) 高感染能を持つ HCV 適応変異株（K74T, I414T を有する）を分離した。I414T 変異がウイルス侵入過程の促進に大きく寄与すること、両変異により HCV ゲノム RNA パッケージング効率が上昇することを示した。5) HCV 複製に起因する ROS 産生亢進により JNK が活性化され、FOXO1 リン酸化低下を誘発すること、NS5A により PEPCK、G6Pase の遺伝子発現及びグルコース産生が亢進することを示した。6) コアによる desaturase 活性亢進に伴って一価不飽和脂肪酸が増加すること、中性脂肪代謝関連遺伝子、転写因子の発現がコア蛋白によって亢進されること、NADH の減少によって、それが改善されることを見出した。7) NS3/4A プロテアーゼによって細胞内で切断され HCV 複製上昇に働く宿主リン酸化酵素を見出した。8) TICAM-1, IPS-1 は異なる経路で NK, CTL の起動を行うこと、樹状細胞の TICAM-1 経路が主要な細胞性免疫起動経路であることを明らかにした。9) Li23 由来及び Huh7 由来アッセイ系による抗 HCV 剤解析から、半数程度の化合物で有効濃度、細胞毒性濃度が両アッセイ間で異なることを明らかにした。10) shRNA の最も効率的な発現領域及び向きを規定し、VA 発現細胞を用いた VA 欠失ベクター作製法を確立したことにより、治療用遺伝子と shRNA を併せ持つアデノウイルスベクター作製が可能になった。11) HCV 感染依存に脂肪酸合成経路が活性化すること、脂肪酸合成酵素阻害剤がウイルス複製を阻害することを見出した。12) 既存薬ライブラリー、試薬ライブラリーの約 2000 化合物を評価し、抗 HCV 治療薬候補を得た。13) ヒット化合物を基に合成展開し、構造活性相関に関し細胞障害性と抗 HCV 活性を分離可能であることを示唆する知見を得た。

分担研究者

下遠野邦忠 千葉工業大学附属総合研究所
教授
堀田 博 神戸大学医学研究科 教授
瀬谷 司 北海道大学医学研究科 教授
小原 道法 東京都臨床医学総合研究所

プロジェクトリーダー

加藤 宣之 岡山大学医歯学総合研究科 教授
小池 和彦 東京大学医学部 教授
松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授
深澤 秀輔 国立感染症研究所 室長
深澤 征義 国立感染症研究所 室長

澤崎 達也 愛媛大学無細胞生命科学工学研究
センター 准教授
鐘ヶ江裕美 東京大学医科学研究所 助教
掛谷 秀昭 京都大学薬学研究科 教授

A. 研究目的

高感度な診断系の開発により輸血による HCV 感染は激減したが、全世界には 1.7 億人もの感染者が存在する。HCV 感染症は、その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと移行し、肝癌での年間死亡者は我が国で 3 万人を超える。インターフェロン (IFN)、リバビリンを基軸とした現行の化学療法では、その有効率は 40-50%程度であり、半数以上の C 型肝炎患者は、肝癌発症のリスクを避けられない。本研究では、HCV の生活環における各ステップ、特にウイルスゲノム複製と粒子形成過程の分子機構を解明することにより C 型肝炎治療薬開発のための新たな標的を見出す。また、実際に阻害剤スクリーニングを行い、創薬候補化合物を同定する。さらに、HCV 感染に伴う肝発癌、脂質代謝異常などの病態、また持続感染の成立に関与する分子機構を明らかにし、得られる知見を基に発症予防など HCV キャリア対策に資する提案を行うことを目的とする。

B. 研究方法

各解析に関する研究方法の詳細は、各分担研究報告書の当該項目に記載した。

HCV コア蛋白に対するイントラボディの作出と粒子産生阻害 (研究代表者担当分) については、HCV コア蛋白に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 5 種類 (東京都神経研より供与) から抗体遺伝子の variable region を 5' RACE 法によってクローニングした。Pol I プロモーター/ターミネーター支配下で全長 HCV RNA を産生する pHJFH-1 を Huh7 細胞へトランスフェクシ

ョンして得られる HCV 産生細胞系を用いてイントラボディの抗 HCV 活性を評価した。

(倫理面への配慮)

肝疾患患者等からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮する。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し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、保存した。動物実験に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号) 及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号) の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部科学省国際学術局長通知、文学情第 141 号) の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。当該研究機関の動物実験倫理委員会に申請し承認を受けた後実施した。

C. 研究結果

1. HCV 複製増殖機構の解析

1-1. HCV コア蛋白に対するイントラボディの作出と粒子産生阻害

HCV コア蛋白は、粒子形成に不可欠であるとともに、肝脂肪化、肝発がんなど病原性にも関与する。抗コア抗体を産生する 5 種類のハイブリドーマから RNA を抽出し、抗体遺伝子の H 鎖、L 鎖の variable region をクローン化した。各遺伝子を CAG プロモーター支配下で発現するプラスミドを作製し、細胞へコア発現ベクターと共導入しコア-抗体 (イントラボディ) 相互作用を免疫沈降法で解析した。また、各イントラボディの HCV 産生阻害作用を評価した。その結果、大部分のイントラボディがコアとの相互作用を示し、ハイブリド

一マ 2H9 由来 L 鎖、AA10 由来 H 鎖などではウイルス産生を 80%以上抑制した。2H9、AA10 について L 鎖と H 鎖をリンカーを介して連結した一本鎖抗体 (scFV) scFV に発現ベクターを構築し、抗 HCV 活性を調べたところ、AA10 では L、H 鎖単独の場合に比べ有意に抗 HCV 活性が亢進し 90%以上の阻害を観察した。2H9 の場合は、L 鎖単独の場合より scFV の阻害効果が低かった。さらに、scFV を産生する組換えアデノウイルスを作製し細胞内接種による抗 HCV 効果を明らかにした。

1-2. HCV 粒子産生及び感染性における脂質関連因子の役割

HCV の粒子密度が粒子の組成から期待されるものよりも小さいこと、感染性を示す粒子はさらに低密度であることなどから、HCV はリポ蛋白質に会合していること、および感染性にリポ蛋白質の重要性が示唆されているが、その実体は不明である。そこで、培養細胞で感染増殖させ得られたウイルス画分をリポ蛋白質分解酵素で処理し、ウイルス粒子の性状および感染性の変化を調べた。その結果リポプロテインリパーゼ (LPL) で処理したウイルス粒子は浮遊密度が大きくなり、感染性を失った。感染性の喪失はウイルス粒子調製液に共存している hepatitic triglyceride lipase (HTGL) の混在により、LPL 処理に引き続き HTGL でも加水分解されるために起こったと推定した。ゲル濾過法によって HCV 粒子の性状、大きさの解析を行った。各画分のウイルス感染性を調べたところ、大部分の HCV 粒子が溶出される exclusion volume 画分には感染性は存在せず、exclusion volume に引き続いて溶出される画分以降に多峰性を示して感染性が認められた。最も高い感染性を示した画分は LDL が溶出される画分と一致した。また、各画分中で HCV と会合している ApoE の分布を調べた。その結果、感染性を示す画分にあるウイルスとは会合していたが、その他に exclusion volume の HCV とも会合していた。

1-3. microRNA による翻訳亢進機構の解析

近年、HCV の複製に重要な因子として肝臓特異的な micro RNA である miR-122 が報告され、その阻害剤が臨床応用されつつある。しかし、その複製亢進のメカニズムは不明なままである。広く HCV 感染増殖実験に用いられている Huh7 細胞は miR-122 の発現が非常に高いため、翻訳に対する miR-122 の影響を正確に評価するのは困難である。本研究では miR-122 を強制発現することにより、HCVcc 感染を許容する細胞株の検索を試みた。調べた細胞株の中で子宮頸癌由来の Hec1B 細胞は、HCV の感染受容体候補分子を全て発現しており、miR-122 を強制発現させると感染後 48 時間後にはウイルス RNA 量が 100 倍に増加することが明らかになった。

1-4. 高感染性 HCV 適応変異株の性状解析

昨年度までに高感染増殖能を示す適応変異株 HCV-JFH1 (K74T/I414T) を分離し変異導入部位などを決定した。本年度はさらに本適応変異株の性状解析を進めた。K74T、I414T 単独、あるいは両変異を有する HCV-JFH1 RNA ゲノムを調製し、HCV 産生能を調べた結果、ウイルス産生には顕著な差は見られなかった。培養上清に放出された各変異ウイルス粒子を Huh7.5.1 細胞に感染させたところ、K74T 変異ではわずかな HCV 産生の上昇しか見られなかったが、I414T 変異では親株に比べ顕著な宿主内でのウイルス蛋白質の経時的な蓄積、HCV RNA の上昇 (100 倍以上) と HCV 粒子の放出促進が見られた。二重変異体 (K74T/I414T) ではさらなるウイルス産生上昇がみられた。以上の結果から、I414T 変異が HCV 産生の上昇、特にウイルス侵入過程促進に主要な寄与をしており、K74T 変異もその活性を強める働きがあるものと考えられた。二重変異ウイルスでは HCV RNA/HCV コア蛋白質比が 10 倍以上高いこともわかった。

HCV-JFH1 (K74T/I414T) 株は、効率は悪いながら

もマウス CD81 を持つ 751r/mCD81 細胞への感染が見られた。このことは、ウイルスが K74T/I414T 変異により、マウス CD81 を受容体として利用できるようになってきていることを示している。そこで HCV-JFH1 (K74T/I414T) 株を親株として 751r/mCD81 に対してより高い感染能を有する適応変異株の分離をさらに進めた。その結果、継代を繰り返すことで 751r/hCD81 と同程度に 751r/mCD81 にも感染する適応変異株が複数分離された。その中から 4 バッチについて構造タンパク質領域のゲノム配列を決定した結果、全てで同じ配列を示し、K74T/I414T 変異に加え、E1 領域では N234D、V293A、T331S 変異が、E2 領域では V402A の変異が認められた。これらの変異はマウス CD81 の認識に重要と考えられた。

2. 病原性発現機構の解析

2-1. 糖代謝系への HCV の関与

HCV は慢性肝炎や肝硬変、肝細胞癌を引き起こすのみならず、2 型糖尿病発症の背景因子ともなる。昨年度の本研究で、HCV レプリコン細胞や HCV 感染細胞では、対照細胞に比べて、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 及びグルコース-6-ホスファターゼ (G6Pase) の遺伝子発現が亢進し、その結果、グルコース産生が亢進していることを報告した。PEPCK や G6Pase の遺伝子発現は転写因子 FOXO1 によって制御されているが、HCV 複製・感染細胞では、通常とは異なる Akt 非依存性のシグナル伝達経路を介して、FOXO1 のリン酸化が低下し、その転写活性が亢進する可能性が考えられた。

本年度、FOXO1 転写活性の亢進に関わる Akt 非依存性シグナル伝達経路、及びそれに関与する HCV 蛋白質について調べた。その結果、HCV 複製・感染細胞においては、reactive oxygen species (ROS) 産生の亢進に伴って c-Jun N-terminal kinase が活性化されることが FOXO1 リン酸化の低下と密接に相関することが明らかになった。また、

PEPCK 及び G6Pase の遺伝子発現の亢進及びグルコース産生の亢進は HCV 非構造蛋白質 NS5A の単独発現により引き起こされることも明らかになった。

2-2. 脂質代謝異常への HCV の関与

C 型肝炎患者及び HCV コア遺伝子トランスジェニックマウスの肝に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸、cis-ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることが明らかになっている。そこで、この肝脂肪化および一価不飽和脂肪酸増加の機序と意義を知るために、コア蛋白発現 HepG2 細胞と JFH-1 増殖 Huh7 細胞を用いた解析を行った。不飽和脂肪酸の増加をもたらす desaturase 活性はコア蛋白発現細胞において δ -9、 δ -6、 δ -5 desaturase のいずれもが亢進していた。多価不飽和脂肪酸 (PUFA) である eicosatetraenoic acid (EPA) や arachidonic acid (AA) の投与によって一価不飽和脂肪酸はコア蛋白非特異的に減少したが、コア蛋白によって誘発されている活性酸素種 (ROS, reactive oxygen species) は PUFA によっては減少しなかった。これに対して、ピルビン酸の投与によって解糖系において NADH を消費させると、中性脂肪、一価不飽和脂肪酸、ROS 産生のいずれもがコア蛋白発現細胞で特異的に減少した。コア蛋白発現 HepG2 細胞において、対照細胞に比して発現の増加していた脂質代謝遺伝子の発現制御に重要な転写因子である SREBP-1c は、ピルビン酸の投与によって低下が認められたが、EPA や AA の投与では低下は認められなかった。また、JFH-1 増殖 Huh-7 細胞にても中性脂肪の増加が認められた。

2-3. HCV プロテアーゼによる宿主因子のプロセッシング

独自に開発した真核型コムギ無細胞蛋白質合成系を利用して作製した 390 種類の完全長ビオチン化プロテインライブラリーを用い

て、HCV NS3/4A プロテアーゼで切断される宿主プロテインカインースの探索を行った。その結果、6種類のヒトプロテインカインースが切断されることを見出した。そのうちのひとつSGK495は、HCV 感染細胞においても切断されることが分かり、HCV 複製細胞において、切断型SGK495がHCV複製を亢進することが見出された。

3. 持続感染機構の解析

RNA ウイルスの複製過程で生じる dsRNA は内因性に RIG-I/MDA5, 外因性に TLR3 を刺激し、樹状細胞 (mDC) に免疫応答を惹起する。dsRNA primed mDC は NK 細胞を活性化し、抗原特異的に CD8+ T を増殖させる。mDC のどの dsRNA 認識経路が如何なる転写系で NK, CTL をドライブする成熟化状態を起動するのかを分子レベルで解明することを目的とした。樹状細胞を移入した各種ノックアウトマウスへの polyI:C 刺激の実験などから、樹状細胞以外の非骨髄細胞が NK 活性化に関与すると判明した。一方、TICAM-1 は樹状細胞で働いて DC-NK の接着で NK 活性化を誘起し、mDC が NK 活性化に向かう成熟状態になると判明した。その担当分子は新規分子 INAM であった。

polyI:C と OVA の投与マウスで OVA cross-presentation と CTL 誘導を検討した。CTL 誘導には mDC の TICAM-1>IPS-1 の関与が証明された。CTL 誘導には IRF-3 と IRF-7 が関与し、両方の KO で cross-priming は完全に抑えられた。一方、IRF-1 単独 KO マウスでも CTL 誘導は抑制がかかることから別の CTL 誘導経路も存在すると考えられた。

4. 新規 HCV 実験系の開発

4-1. ヒト細胞株 Li23 を使った HCV 複製増殖系

HuH-7 とは異なるヒト肝癌細胞株 Li23 を用いた HCV 複製増殖システムを昨年度までに開発した。今年度は、Li23 由来で抗 HCV 活性を定量的に評価できる簡便な細胞アッセイシステム (ORL8) とこれ

まで汎用して来た HuH-7 由来の細胞アッセイシステム (OR6) を用いて、他の研究室から抗 HCV 活性について論文としてこれまで報告されている 28 化合物 (植物抽出物由来化合物 7 種類、合成化合物 19 種類、その他 2 種類) についてそれらの抗 HCV 活性を再評価した。その結果、評価した化合物の半数程度において得られた EC50 値 (50%有効濃度)、CC50 値 (50%細胞毒性濃度) あるいは SI 値 (選択性指数) が両アッセイシステム間で異なることを明らかにした。

4-2. 新規アデノウイルスベクターの開発

肝臓への遺伝子導入効率が極めて高い非増殖型アデノウイルスベクター (AdV) を用いて、C型肝炎に対する治療法に資する、多目的型 short-hairpin RNA (shRNA) 高度発現型新規 AdV の開発を行う。

AdV 上で唯一野生型と同程度発現している 2 種類の Virus associate RNAs (VA RNAs) のプロモーター領域を欠失したベクター (以下 VA 欠失 AdV) の作製効率化を図るために、VA RNAs を恒常的に発現する 293 細胞と 293T 細胞を樹立化した。実際に、これらの細胞を用いて VA 欠失ベクターの作製が可能であることを示した。

次に、治療用遺伝子 IFN- α 2 の cDNA をクローン化し、EF1 α プロモーターから IFN- α 2 を発現する発現単位を E1 領域に、hU6 プロモーターから shRNA を発現する発現単位を E4 領域左向きに挿入した VA 欠失 AdV 作製用コスミドカセットと IFN- α 2 のみを持つ VA 欠失 AdV 作製用コスミドカセットを作製し、-41-293 細胞へ導入しベクター作製を行った。

5. 抗 HCV 薬の探索

5-1. 脂肪酸合成酵素 (FASN) 阻害剤による HCV 複製阻害

これまでの解析から、HCV 複製依存に FASN のプロモーター活性が上がることを培養細胞系で見出した。また、ヒト肝臓キメラマウスを用いた感染

実験で、FASN 阻害剤が新たな HCV 治療薬となる可能性が示された。種々の化合物を解析し、調べた FASN 阻害剤全てが抗 HCV 作用を有することが判明した。HCV 複製の抑制活性は C75 が一番高く、次いでオルリスタット、トリクロサンの順だった。この結果は、FASN の持つ酵素活性の中でケトアシル ACP シンターゼ活性が HCV 複製に最も必要である可能性を示している

5-2. HCV 全生活環を標的にする抗 HCV 剤スクリーニング

HCV JFH1 株を Huh7.5.1 細胞に感染させる系を用いて、HCV の全生活環を標的とした抗 HCV 薬のスクリーニングを行った。

既存薬ライブラリー、試薬ライブラリーの約 2000 化合物を評価した結果、HMG-CoA 還元酵素阻害剤、SERMs など既に HCV 阻害活性が報告されている薬剤以外に、imatinib、gefitinib などのチロシンキナーゼ阻害剤、orlistat などの脂肪酸合成酵素阻害剤、非ステロイド性抗炎症薬、核内レセプターアゴニストなどに活性が見いだされた。チロシンキナーゼ阻害剤は HCV 感染後に添加すると、HCV 阻害作用が弱くなることから、少なくとも一部は侵入過程を標的としていると考えられた。

上記スクリーニングとは独立に、HCV 持続感染細胞を用いて、独自に合成した化合物群について抗 HCV 活性を評価した。その結果、顕著な抗 HCV 活性を有するヒット化合物を見出し、構造活性相関研究に適した化合物群のデザイン・創製・評価を行った。構造活性相関に関して、宿主細胞への細胞障害活性と抗 HCV 活性を分離可能であることを示唆する重要な知見が得られた。

D. 考察

1. HCV 複製増殖機構の解析

HCV コア蛋白に対するイントラボディを作出しその HCV 産生阻害活性を明らかにした。今後、コア発現細胞、コア遺伝子トランスジェニックマウスなどを用いて、イントラボディが脂質代謝改善効果を有するかを明らかにして行きたい。また、コア-イントラボディ複合体の構造解析を行うことにより、相互作用部位の立体構造が明らかになり、コアの機能をブロックすることによる新たな抗 HCV 薬の開発に有益な知見が得られるものと期待される。

ウイルス粒子の性状と感染性との関係を解析しながら、粒子産生の分子機構解明に役立てようと試みた。分子篩によるウイルス粒子の解析から、感染性ウイルス粒子の大きさは VLDL よりも小さい事が示された。ウイルス粒子本来の大きさを加味すると、ウイルス粒子に会合しているリポ蛋白質は VLDL よりも遥かに小さいと考えられ、粒子産生においてリポ蛋白質がどのような機構で取り込まれるかに興味を持たれる。また、ゲル濾過法により HCV 粒子を分画すると、感染性を示さない粒子にも ApoE が結合している事が判明した。これが、ApoE だけでは感染性を賦与するのには十分で無い事を示しており、今後感染性を示す分子機構の解析が重要になる。

HCV の複製を許容する細胞株は Huh7 細胞に限定されているが、Huh7 細胞は miR-122 の発現量が極めて高いため、HCV RNA の翻訳におよぼす miR-122 の影響を正確に評価するのは難しい。そこで本研究では、miR-122 の強制発現によって HCV 複製を許容する新たな細胞株を検索して Hec1B 細胞を見出した。この細胞は Huh7 細胞に比較して、内在性の miR-122 の発現レベルが低いいため、HCV 複製における miR-122 の機構解析に適した細胞であることが示された。今後、miR-122 と結合する HCV の 5'UTR に変異を導入し、翻訳亢進機構の解析を進めたい。

HCV 適応変異の解析から E2 領域の I414T 変異がウイルス産生上昇、特に侵入過程の促進に関与することが明らかになった。変異導入により感染性粒子の比重が幅広くなっていることから、侵入に有利となるリポタンパク質との相互作用が促進されている可能性が考えられた。また、変異ウイルスでは HCV RNA/HCV コア蛋白比が高く、粒子形成において HCV RNA のパッケージングの効率が上がっている可能性も示唆された。このことも感染能の上昇に寄与しているものと考えられた。また今回、ヒト CD81 と同等にマウス CD81 を侵入に利用できる HCV 適応変異株を樹立することができた。この変異株は構造タンパク質である E1, E2 のウイルス表面領域に計5ヶ所の変異を有しており、N234D による糖鎖の欠損が一つの特徴と考えられる。これらの変異により、ヒト CD81 に加えマウス CD81 との高親和性も獲得したものと考えられた。

2. HCV 病原性発現機構の解析

2 型糖尿病の素因として高血糖の持続が重要である。肝細胞は糖を産生し、血糖値の維持に重要な役割を果たしている。

HCV 感染は、酸化ストレスの誘導 (ROS 産生の亢進) を介して JNK を活性化し、この経路が FOXO1 のリン酸化を抑制してその転写活性を亢進させ、糖新生律速酵素遺伝子 (PEPCK 及び G6Pase) の転写促進を介して糖新生を亢進させると考えられた。通常インスリンシグナル経路で FOXO1 の転写活性調節に重要な役割を果たしている Akt/PKB は HCV 感染により逆に活性化されており、HCV 感染による糖新生促進において Akt/PKB シグナル伝達経路は直接には関与していないと考えられた。また、FOXO1 リン酸化の抑制及び糖新生の亢進に HCV NS5A が関与している可能性が示唆された。

今回の検討によって、一価不飽和脂肪酸の増加はコア蛋白による desaturase 活性の増加による

こと、その活性増加をもたらすのは肝細胞内への NADH 蓄積にあることが明らかになった。また、SREBP-1c、fatty acid synthase (FAS)、 δ -9 デサチュラーゼといった中性脂肪代謝関連遺伝子、転写因子の発現がコア蛋白によって直接あるいは間接的に亢進されること、NADH の減少によって、それが改善されることも重要な所見である。HCV によるミトコンドリア電子伝達系複合体 I (NADH dehydrogenase) の機能障害が、C 型肝炎の肝病態において中心的な役割を演じている事が示されたといえる。NADH を減少させる方法によって C 型肝炎の病態を改善させる可能性がある。

網羅的探索技術を基盤に、HCV NS3/4A プロテアーゼにより切断される宿主プロテインカイネースタンパク質の探索を行った。同定したプロテインカイネース 6 種類が細胞内で HCV プロテアーゼにより切断され、少なくともその中の1つは、HCV 感染細胞内でも切断され、HCV 複製を亢進する結果を得た。これは、HCV が自身のプロテアーゼを用いて、宿主プロテインカイネースを切断し、細胞内シグナル伝達系を改変して、複製に利用している可能性を示唆している。また、見出されたプロテインカイネースの中には、インターフェロン産生のレギュレーターである TBK1 が含まれており、切断部位は、カイネースドメイン内であったため、HCV は感染後細胞内の TBK1 を切断し、インターフェロン産生に必要なシグナル伝達機構をシャットオフする可能性が考えられる。また、RNA 認識ドメインを別のカイネースも、lipid raft に局在することが見出され、カイネースドメインと RNA 結合ドメインとの間を切断することが分かり、HCV 複製時における RNA 結合ドメインの関与は興味深いところである。

3. 持続感染機構の解析

HCV 患者からウイルス株を分離培養する系も確立されておらず、JFH1 株で多くの in vitro 実験が

行われている。HCVの持続感染時にウイルス dsRNA がどの様に機能するかは殆ど未解明の課題と言える。本研究でマウス肝実質細胞に HCV 感染が成立し、mDC を介した NK 細胞の活性化と cross-priming による抗原特異的 CTL 誘導が TICAM-1 経路を介して強く起きることがノックアウトマウスを使って証明された。HCV の免疫病態の解明の他、HCV の患者株の抽出、創薬のスクリーニングなど多くの臨床研究に本研究の自然免疫改変モデルマウスが有益であり、更に発がんのリスク因子の解明にも貢献するかもしれない。

4. 新規 HCV 実験系の開発

Li23 由来で抗 HCV 活性を定量的に評価できる簡便な細胞アッセイシステム (ORL8) とこれまで汎用して来た HuH-7 由来の細胞アッセイシステム (OR6) を用いて、抗 HCV 活性が知られている 28 化合物を評価し、CC50 値を EC50 値で割った SI 値を算出して、それらの結果をアッセイ間で比較した。

まず、既報のアッセイシステム (大部分は HuH-7 細胞由来で HCV Con1 株が複製している) と OR6 アッセイシステム (HuH-7 細胞由来で HCV-0 株が複製している) 間での比較では、比較可能な 22 種類 (CC50 値が報告されておらず比較不能のものが 6 種類あるため) のうち半数以上の 13 種類の化合物の SI 値が 2 倍以上異なっていた。この結果から、細胞が同じ HuH-7 由来のアッセイシステムでも HCV 株の違い (HCV Con1 株と HCV-0 株) により得られる結果が異なることが示唆された。

次に OR6 アッセイシステムと Li23 細胞由来の ORL8 アッセイシステム (HCV-0 株が複製している) 間での比較 (比較可能な 25 種類) をおこなったところ、9 種類で SI 値が 2 倍以上異なっていた。この結果から、同じ HCV 株でも細胞の種類が異なることにより得られる結果が異なることが示唆された。

以上のことから、抗 HCV 活性を正しく評価する

ためには、複数の細胞株と複数の HCV 株由来のアッセイシステムを用いて総合的に評価する必要性があると考えられた。

多目的型 shRNA 高度発現型新規アデノウイルスベクターの開発を行った。

本研究では、まず shRNA の最も効率的な発現領域及び向きを規定し、VA 発現 293 細胞を用いた VA 欠失ベクター作製法を確立したことにより、治療用遺伝子と shRNA を併せ持つベクター作製が可能になった。本研究で開発したこれらの技術は、非常に有用性が高いと考える。本ベクターはアデノウイルスベクターで唯一野生型と同程度に発現している 2 種類の VA RNAs のプロモーター領域を欠失しているため安全性が高いだけでなく、肝炎ウイルスに対する shRNA と治療用遺伝子を組み合わせることが可能であり、日本発のベクターとなりうる新しいシステムである。

5. 抗 HCV 薬の探索

FASN 阻害剤が新たな HCV 治療薬となる可能性が示された。脂肪酸はグリセリンをエステル化して中性脂肪と成るほか、脂質の構成成分であり、エネルギー源としても代謝される。哺乳動物細胞の場合、FASN の主な合成物はパルミチン酸である。パルミチン酸は長鎖脂肪酸伸長酵素 ELOvl-6 によりステアリン酸となる。これらの脂肪酸は小胞体やミトコンドリアでアラキジン酸のような更なる長鎖脂肪酸へと変換される。またステアリン酸はステアロイル CoA 不飽和酵素 SCD によりオレイン酸となる。これらの各種脂肪酸が HCV 複製に与える影響について今後解析を進める予定である。

既存薬のライブラリー、試薬ライブラリーを 2 種類のアッセイ系で評価した。既に医薬品として使用されている薬剤のいくつかに抗 HCV 作用が確認された。これらは安全性、体内動態が十分に調べられている薬剤であり、非臨床試験から始める

新規開発よりも有利な点が多い。今後さらに多くの既存薬を評価する予定である。imatinib、gefitinib を含むチロシンキナーゼ阻害剤が抗 HCV 作用を示したが、imatinib (ABL、PDGFR、KIT 阻害)と gefitinib (EGFR 阻害)は阻害スペクトラムが異なっている。実際にチロシンキナーゼの阻害が抗 HCV 作用に関与しているかどうかは不明であり、その作用機序の解析は今後の課題である。2 種類のアッセイ系は再現性があり、抗 HCV 薬のスクリーニング系として十分信頼できると考えられたが、ヒットする物質は重なり合うものの完全には一致しなかった。複数のアッセイ系を用いることで、より網羅的な HCV 阻害物質の検出が可能となると考えられる。

ヒット化合物として見出した KUSC-M001 は蛋白輸送阻害剤である goldicide A と構造が類似している。ヒット化合物を起点とした創薬化学的研究を目指して、KUSC-M001 の各種類縁化合物 KUSC-M002~KUSC-M016 を 3 成分 one-pot reaction により合成し、抗 HCV 活性を測定したところ、KUSC-M016 は細胞障害性を示さない濃度域において顕著な抗 HCV 活性を示した。KUSC-M016 は KUSC-001 のアニリン由来芳香環上の置換基を変換した化合物であるので、キノリン骨格上の芳香族置換基が活性発現に重要であることが示唆されるとともに、これら化合物群における宿主細胞への細胞障害活性と抗 HCV 活性の 2 つの生物活性を分離可能であることが示唆された。さらに、これらの結果は、KUSC-016 の作用点が必ずしも goldicide A と同じであるとは限らず、今後、KUSC-016 の詳細な薬理活性評価を行うことで、抗 HCV 剤開発のための新しい標的が明らかになる可能性も期待できる。

E. 結論

ウイルス側及び細胞側因子の関与を含め、HCV 生

活環、特に感染、翻訳、粒子形成過程、の制御機構に関する新たな知見を得た。HCV 関連の脂質代謝異常、糖代謝異常の分子機構研究、またウイルスプロテアーゼの宿主蛋白リン酸化酵素活性への介入の解析を通じて C 型肝炎の病態を明らかにするための成果を得た。抗ウイルス免疫応答の持続に関与する宿主因子の同定とその動態及び肝病変への影響について解析を進めた。Li23 細胞を使った新規薬剤探索システムの構築、治療用アデノウイルスベクターの開発などを行いその有用性を示した。抗 HCV 薬の探索から、脂肪酸合成、チロシンキナーゼ、蛋白輸送系など宿主側を標的とした候補阻害剤を見出した。また、HCV コアを標的とした抗 HCV 戦略を初めて示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (研究代表者分)

論文発表

1. Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, Suzuki T: Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *Biochem Biophys Res Commun* (in press).
2. Inoue, Y., Aizaki, H., Hara, H., Matsuda, M., Ando, T., Shimoji, T., Murakami, K., Masaki, T., Shoji, I., Homma, S., Matsuura, Y., Miyamura, T., Lai, MMC, Wakita, T., and Suzuki, T: Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology* 410: 38-47, 2011.
3. Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi K, Matsuura Y.: Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a

- selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One*. 6:e15967, 2011.
4. Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. : Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: Polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J. Hepatol*. 54:432-438, 2011.
 5. 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* 85: 520-524, 2010.
 6. 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* 84; 5824-5835, 2010.
 7. Braconi C, Valeri N, Gasparini P, Huang N, Taccioli C, Nuovo G, Suzuki T, Croce CM, Patel T. Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes. *Clin Cancer Res* 16: 957-966, 2010.
 8. Tanaka Y, Mori Y, Tani H, Abe T, Moriishi K, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Suzuki T, Tatsumi M, Matsuura Y. Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*. 54:206-220, 2010.
 9. 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*. 395: 565-571, 2010.
 10. Ito M, Murakami K, Suzuki T, Mochida K, Suzuki M, Ikebuchi K, Yamaguchi K, Mizuochi T. Enhanced expression of lymphomagenesis-related genes in peripheral blood B cells of chronic hepatitis C patients. *Clin Immunol* 135; 459-465, 2010.
 11. 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*. 6; e1000885, 2010.
 12. Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *J Cell Biochem*. 111: 676-685, 2010.
 13. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology*. 52: 411-420, 2010.
- H. 知的所有権の出願・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。

Ⅱ. 分担研究報告書

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）
研究分担報告書

HCV 複製増殖機構の解析に関する研究

分担研究者 下遠野 邦忠 千葉工業大学 附属総合研究所

研究要旨 HCV 複製における細胞内の代謝異常はウイルスの複製と関連している事を明らかにした。特に、ウイルスが感染細胞から放出され、リポ蛋白質複合体として存在する事を生化学的に明らかにするために、ウイルス画分をリポ蛋白質分解酵素で処理し、ウイルス粒子の性状および感染性の変化を調べた。その結果リポプロテインリパーゼ (LPL) で処理したウイルス粒子は浮遊密度が大きくなり、感染性を失った。感染性の喪失はウイルス粒子調製液に共存している hepatic triglyceride lipase (HTGL) の混在により、LPL 処理に引き続き HTGL でも加水分解されるために起こったと推定した。

感染細胞から放出されるウイルス粒子の性状を大きさで調べるために、ゲル濾過を行った。ゲル濾過により溶離されたウイルス粒子の大部分は本カラム操作では分離できない排除容量(Exclusion volume)であった。その画分には VLDL も溶出されたために、VLDL との大きさの比較はできなかった。一方、感染性を示す粒子は排除容量の分画よりも小さなサイズのものが溶出される画分に見られた。この事は感染性を示すウイルス粒子は大部分の非感染性粒子よりも僅かに小さい事を示した。さらに、非感染性を示す画分にも ApolipoproteinE (ApoE) が検出された事から、ApoE は感染に必要な宿主因子であるが、完成の獲得にはそれだけでは十分でない事も明らかになった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) は肝炎発症、および肝がん発症の危険因子である。HCV 感染によるこれらの疾患を予防するにはウイルス複製を効率よく阻害する薬剤の開発が急務である。そのためには、HCV 複製機構を理解して、その基本的なメカニズムを標的にした抗ウイルス剤の開発が必要である。本研究では、これまでに樹立した HCV サブゲノムが効率よく自立複製する細胞およびウイルス感染複製系を用いて、複製を制御する細胞側の因子を、とくに脂肪代謝系の

制御との関連で解析を行う。

B. 研究方法

(1) ウイルスゲノム自立複製細胞から放出されるウイルスの性状解析。

培養細胞に HCV を感染させ、そこから放出される粒子の産生効率が高い条件を調べる。産生されるウイルスの性状を密度勾配遠心分離およびゲル濾過により解析する。同時に感染性も調べ非感染性粒子との違いを明らかにする。

(2) HCV 粒子に会合しているリポ蛋白質

のウイルス感染における意義の解明。

これまでに HCV はリポ蛋白質と会合して存在するといわれているが、本当にそうなのか、もしそうだとすれば、リポ蛋白質が会合している意義は何か、など不明な点が多い。そこで、リポ蛋白質を加水分解する酵素処理によるウイルス性状の変化と感染性を調べ、リポ蛋白質のウイルス粒子への会合の意義を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト臨床検体、あるいは動物実験を含まない。

C. 研究結果

(1) 培養細胞から放出されたウイルスの回収と密度勾配による解析。

これまでの研究から培地に放出されたウイルス粒子には感染性があるものと無いものが存在する事が知られている。感染性のある粒子は浮遊密度が非感染性粒子に比べて小さい。感染性粒子と非感染性粒子を密度による違いから分画する試みを行ったが、分画には再現性がなかった。培地の条件を変えて試みても感染性粒子のみを分離する事ができなかったが、その過程でウイルスの安定性に関する知見を得る事ができた。無血清培地で培養した細胞から産生された粒子を分子篩により濃縮操作を続けると速やかに分解された。血清成分がウイルス粒子の安定性に関与していると考えられたために、無血清培地にアルブミンを添加して培養した細胞から得られたウイルスは、その後の操作で破壊される率は低下した。しかし、この条件で得られたウイルス粒子でも密度勾配遠心で

非感染性と感染性の違いで分離する事はできなかった。

(2) ウイルス粒子の性状解析

ウイルス粒子の密度が粒子の組成から期待されるものよりも小さいこと、感染性を示す粒子はさらに密度が小さい事などから、ウイルスはリポ蛋白質に会合していること、および感染性にリポ蛋白質の重要性が示唆されているが、その実体は不明である。そこで、生化学的な手法によりウイルスとリポ蛋白質との会合および、感染性との関連を明らかにする事を試みた。

肝細胞から遊離されるリポ蛋白質の代表は VLDL である。VLDL は血流中で lipoprotein lipase (LPL)により部分的に加水分解を受けて IDL に変換される。IDL はさらに肝特異的リパーゼ (hepatic triglyceride lipase: HTGL) により分解を受けて LDL になる。IDL から LDL に移る過程で、リポ蛋白質の構成蛋白質のひとつである、Apolipoprotein E が脱理する。HCV 感染細胞から遊離されるウイルスは VLDL 様リポ蛋白質と会合していると考え、LPL あるいは HTGL で処理する事により、その大きさおよび密度が変わると期待される。そこで、ウイルス画分を LPL で処理し、その後のウイルス粒子密度を調べると、重い方にシフトした。その際に感染性は無くなった。この実験から HCV はリポ蛋白質成分と会合しているという結果を生化学的な方法で示したといえる。また、リポ蛋白質粒子の変換はウイルスの感染性に影響を与える事も明らかになった。LPL 処理で感染性が無くなる理由をさらに明らかにするために、ウイルス粒子と会合している

ApoEの量をLPL処理前後でどのように変化するかを調べた。その結果LPL処理によりApoBに対するApoEの量は低下した。

これまでのリポ蛋白質の研究では、LPL処理によるVLDLからのApoEの脱落はなく、引き続き起こるHTGLの処理により脱落が生じるといわれている。培養細胞上清から回収したHCV粒子にはHTGLが混在している可能性が考えられた事、およびLPL処理をしないでHTGL単独の処理でも感染性に影響を与える可能性が考えられたために、LPL処理する際に抗HTGL抗体を存在させたときのウイルスの感染性の変化を調べる。さらにHTGL単独処理で見られる効果を調べた。まず、抗HTGL抗体存在下でLPL処理をした場合、ウイルスの感染性の低下は抑制された。すなわち、LPL処理による感染性の低下は混在していたHTGLのためである可能性が示唆された。また、HTGL単独処理した場合にもウイルスの感染性は低下したことから、ウイルスに会合しているリポ蛋白質はLPL処理しなくてもHTGL処理により変化しうるものである事が分かった。

これらの実験から、ウイルスの感染性にはリポ蛋白質が必要であるが、限られたリポ蛋白質である事が明らかになった。さらに感染に必要なリポ蛋白質にはApoEが会合している必要性が強く示唆された。

(3) ゲル濾過によるウイルスの解析

HCVがVLDL用リポ蛋白質と会合していると考えられる根拠のひとつは、microsomal triglyceride transfer protein (MTP)により粒子の培養液への放出が阻害される事、肝細胞はVLDLを産生する事などによるのみであり、実際にVLDLが会合するの

かについての実験的な解析はない。そこで、ウイルス粒子の大きさを分子篩方法で調べた。

トーソーのゲル濾過用樹脂を用いた液体クロマトグラフィーで分子篩を行い、溶出画分を回収して各分画へのウイルスの存在、およびリポ蛋白質の溶出状態を調べた。VLDLがexclusion volumeに溶出されないほどの容量を持つゲル濾過用樹脂がなかったために、十分に満足する結果は得られなかったがウイルス粒子の大部分はカラムの排斥容量の画分に溶出された。その分画にはVLDLも溶出されていた。この事から、HCVはVLDLと会合している可能性も考えられたが、会合しているVLDLの大きさまで研究する事はできなかった。一方、ウイルスの感染性を調べたところ、大部分のウイルス粒子が溶出されるexclusion volume画分には感染性は存在しないで、exclusion volumeに引き続いて溶出される画分以降に多峰性を示して感染性が認められた。最も高い感染性を示した画分はLDLが溶出される画分と一致した。

これらの結果から、感染性ウイルスと会合しているリポ蛋白質はVLDLよりも小さいものである事が分かった。

(4) ApoEはウイルスの感染に必要なリポ蛋白質側の因子であるが、感染を賦与するのに十分な要因ではない。

ウイルス粒子のゲル濾過によって得られる各分画中でHCVと会合しているApoEの分布を調べた。その結果、感染性を示す画分にあるウイルスとは会合していたが、その他にexclusion volumeのHCVとも会合していた。Exclusion volumeに溶離されるウイルスには感染性が無いので、これら

の結果は ApoE が HCV に会合しているだけでは感染性には十分でない事を示している。

D. 考察

HCV が細胞内で複製し、感染性粒子を産生する機構は明らかでない。この機構を明らかにすることにより、抗 HCV に向けた薬剤の開発が可能になると期待される。本研究ではウイルス粒子の性状と感染性との関係を解析しながら、粒子産生の分子機構解明に役立てようと試みた。

その結果、ウイルス粒子がリポ蛋白質と会合している事を生化学的な手法で証明する事ができた。また、ウイルスの感染性にはリポ蛋白質の性状が大切である事も明らかにした。特に ApoE の存在は感染に重要である可能性を示した。

一方、分子篩によるウイルス粒子の解析から、感染性ウイルス粒子の大きさは VLDL よりも小さい事が示された。ウイルス粒子本来の大きさを加味すると、ウイルス粒子に会合しているリポ蛋白質は VLDL よりも遙かに小さいと考えられ、粒子産生においてリポ蛋白質がどのような機構で取り込まれるかに興味が待たれる。

ApoE はウイルス粒子と会合して感染性の獲得に重要である。粒子に会合している ApoE は新たに細胞に感染する際に、リポ蛋白質受容体に吸着する際にリガンドとしての役割を果たすと考えられる。実際に ApoE ノックダウン細胞、あるいは LDLR との結合が弱いアイソフォームのひとつである ApoE2 を発現している細胞から産生されるウイルスは ApoE2 と会合しているにもかかわらず感染性は著しく低い。ゲル濾過

法により、HCV 粒子を分画すると、感染性を示さない粒子にも ApoE が結合している事が判明した。この事は ApoE だけでは感染性を賦与するのには十分で無い事を示しており、今後感染性を示す分子機構の解析が重要になる。

E. 結論

HCV が宿主の脂肪代謝機構をハイジャックして増殖する事を明らかにしてきた。その中で、リポ蛋白質の輸送機構を利用してウイルス粒子が細胞の外に放出される事、ウイルスはリポ蛋白質と物理的に会合している事を生化学的な手法でしめした。また、感染性粒子の大きさは HCV/VLDL 複合体の大きさよりも小さい事も明らかにし、ApoE の会合が感染性にとって必要ではあるがそれだけでは十分でない事も明らかにした。これらの情報は HCV による脂肪代謝異常による疾患の理解および抗 HCV 剤の開発に資するものである。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. *BMC Med Genomics*. 3(1): 48, 2010.
2. 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*. 84(22):11761-11770, 2010.
3. 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. 84(22): 12048-12057, 2010.

4. Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Kato A, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Shimotohno K. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV)

through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. Virology. 407(1):152-915, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし