

本年度の研究により、世界に先駆けて HCV 感染細胞内で HCV 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を同定することに成功した。さらに、その切断されたプロテインカイネースは HCV 複製を亢進したことから、本研究で見出した切断型宿主プロテインカイネースは新しい創薬ターゲットになるものと期待できる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Makino S, Sawasaki T, Endo Y, Takai K, Use of domain enzymes from wheat RNA ligase for in vitro preparation of RNA molecules, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 404(4): 1050-4
- 2) Kanchiswamy C N, Muroi A, Maffei M E, Yoshioka H, Sawasaki T, Arimura G, Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases and their substrate HsfB2a are differently involved in the heat response signaling pathway in *Arabidopsis*, *Plant Biotechnology*, 2010, 27(5): 469-73
- 3) Arimura G and Sawasaki T, *Arabidopsis* CPK3 plays extensive roles in various biological and environmental responses, *Plant Signaling and Behavior*, 2010, 5(10): 1263-5
- 4) Tadokoro D, Takahama S, Shimizu K, Hayashi S, Endo Y and Sawasaki T, Characterization of a caspase-3-substrate kinome using an N- and C-terminally tagged protein kinase library produced by a cell-free system, *Cell Death and Disease*, 2010, 1, Article number e89
- 5) Madono M, Sawasaki T, Morishita R and Endo Y, Wheat germ cell-free protein production system for post-genomic research, *New Biotechnology*, 2010, in press
- 6) Matsuoka, K, Komori H, Nose M, Endo Y, Sawasaki T, Simple screening method for autoantigen proteins using the N-terminal biotinylated protein library produced by wheat cell-free synthesis, *Journal of proteome research*, 2010, 9: 4264-73
- 7) Makino S, Sawasaki T, Endo Y, Takai K, In vitro dissection revealed that the kinase domain of wheat RNA ligase is physically isolatable from the flanking domains as a non-overlapping domain enzyme, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 397: 762-6
- 8) Matsunaga S, Matsuoka K, Shimizu K, Endo Y, Sawasaki T, Biotinylated-sortase self-cleavage purification

- (BISOP) method for cell-free produced proteins, BMC Biotechnology, 2010, 10, Article number 42
- 9) Nagamangala Kanchiswamy C, Takahashi H, Quadro S, Maffei M E, Bossi S, Berteza C, Atsbaha Zebelo S, Muroi A, Ishihama N, Yoshioka H, Boland W, Takabayashi J, Endo Y, Sawasaki T and Arimura G Regulation of Arabidopsis defense responses against *Spodoptera littoralis* by CPK-mediated calcium signaling, BMC Plant Biology, 2010, 97(in press).
  - 10) Takai K, Sawasaki T and Endo Y, The Wheat-Germ Cell-Free Expression System, Current Pharmaceutical Biotechnology, 2010, 11(3): 272-8
  - 11) Tanaka Y, Komori H, Mori S, Soga Y, Tsubaki T, Terada M, Miyazaki T, Fujino T, Nakamura S, Kanno H, Sawasaki T, Endo Y, Nose M, Evaluating the Role of Rheumatoid Factors for the Development of Rheumatoid Arthritis in a Mouse Model with a Newly Established ELISA System, The Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2010, 220(3): 199-206.
2. 学会発表
- 1) 根本圭一郎、関原明、篠崎一雄、遠藤弥重太、澤崎達也。コムギ無細胞タンパク質発現系を用いた植物チロシンキナーゼ (PPTK) の網羅的探索・同定および機能解析。第 52 回日本植物生理学会年会。仙台、2011 年 3 月 20-22 日
  - 2) Matsunaga S, Kojima Y, Morishita R, Sawasaki T, Ryo A. An In Vitro Cleavage Assay System for XMRV Protease by Wheat-Germ Cell Free Protein Production. the 50th annual meeting the american society for cell biology. December 10-15, 2010, Pennsylvania, USA.
  - 3) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Yamamoto N, Ryo A. Identification of a Host Factor Antagonizing Vpu-Mediated BST-2/Tetherin Down-Regulation. the 50th annual meeting the american society for cell biology. December 10-15, 2010, Pennsylvania, USA.
  - 4) Yasuoka S, Endo Y, Sawasaki T. Screening of Cancer-Related E3 Ubiquitin Ligase by Wheat Cell-Free System. the 50th annual meeting the american society for cell biology. December 10-15, 2010, Pennsylvania, USA.
  - 5) Nishimori K, Matsuoka K, Endo Y, Sawasaki T. Development of a Cell-Free Based Screening Method to Identify Cancer Specific Autoantigen Proteins. the 50th annual meeting the american

- society for cell biology. December 10-15, 2010, Pennsylvania, USA
- 6) 安岡左起、佐々木敦朗、遠藤弥重太、澤崎達也. コムギ無細胞系を基盤としたがん化促進ユビキチン化 E3 リガーゼの構築. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会). 神戸、2010 年 12 月 7-10 日
  - 7) 林祥太、清水康平、橋本季明、吉川潮、遠藤弥重太、澤崎達也. Caspase-3 により切断されるプロテインカイネースの比較. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会). 神戸、2010 年 12 月 7-10 日
  - 8) 清水康平、高濱正吉、遠藤弥重太、澤崎達也. Caspase-3 cleavage of stress-responsible TRB3 attenuates activated Akt and activates caspase-3 activity. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会). 神戸、2010 年 12 月 7-10 日
  - 9) 高橋守、宮島早紀、小笠原富夫、遠藤弥重太、澤崎達也. 無細胞基質プロテオリポソームを用いた細胞への膜タンパク質導入技術の開発. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会). 神戸、2010 年 12 月 7-10 日
  - 10) 岩崎隆宏、遠藤弥重太、澤崎達也. Regulation of Myosin Phosphatase during Apoptosis. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会). 神戸、2010 年 12 月 7-10 日
  - 11) 酒巻和弘、坂本尚久、河村拓馬、千場久美子、澤崎達也、小山田耕二. 細胞死に伴う小胞形成の時系列的変動の解析. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会). 神戸、2010 年 12 月 7-10 日
  - 12) 根本圭一郎、瀬藤拓也、関原明、篠崎一雄、遠藤弥重太、澤崎達也. 植物 protein Kinase ライブラリーを用いた Plant Protein Tyrosine Kinase の探索と同定. 第 5 回無細胞生命科学研究会. 岡山、2010 年 9 月 29-30 日
  - 13) 高橋守、宮島早紀、小笠原富夫、遠藤弥重太、澤崎達也. 無細胞基質プロテオリポソームを用いた細胞への膜タンパク質導入技術の開発. 第 5 回無細胞生命科学研究会. 岡山、2010 年 9 月 29-30 日
  - 14) 安岡佐起、遠藤弥重太、澤崎達也. コムギ無細胞系を基盤としたがん化促進ユビキチン化 E3 リガーゼの探索. 第 5 回無細胞生命科学研究会. 岡山、2010 年 9 月 29-30 日
  - 15) 林祥太、清水康平、橋本李明、吉川潮、鎌田真司、遠藤弥重太、澤崎達也. Caspase-3, 6, 7 により切断されるプロテインカイネースの比較. 第 5 回無細胞生命科学研究会. 岡山、2010 年 9 月 29-30 日

- 16) 有村源一郎、Chidananda Nagamangala kanchiswam、高橋宏隆、吉岡博文、遠藤弥重太、澤崎達也。無細胞タンパク質合成系を用いた植物のカルシウム依存リン酸化制御機構の解明。第5回無細胞生命科学研究会。岡山、2010年9月29-30日
- 17) 清水康平、高濱正吉、遠藤弥重太、澤崎達也。TRB3がcaspase-3に切断されるかどうかは細胞生存と細胞死のターニングポイントの一つである。第62回日本細胞生物学会大会。大阪、2010年5月19-21日
- 18) 岩崎隆宏、遠藤弥重太、澤崎達也。アポトーシス時におけるミオシンホスファターゼ活性調節機構。第62回日本細胞生物学会大会。大阪、2010年5月19-21日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

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

分担研究者 瀬谷 司 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨 抗ウイルス免疫応答の持続に関与する宿主因子を同定し、それらの動態と肝病変形成への影響を解析する。今年度は樹状細胞 TLR3 経路の NK 活性化への関与と、RLR の特異アダプター IPS-1 が非ミエロイド細胞の IFN- $\alpha/\beta$  を介して間接的に NK 細胞を活性化することを明らかにした。HCV 感染が修飾する IPS-1 関連分子と宿主炎症応答の関連を調べるマウスモデル系を確立する予定である。

A. 研究目的

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する。

B. 研究方法

各種 KO マウスに polyI:C を i. p. して脾臓から mDC, リンパ球を採取するか、ex vivo 系 (骨髄性樹状細胞 (BMDC) と T 細胞の混合系) に polyI:C を加えて、mDC の dsRNA 認識経路の機能を解析した。用いたマウスは MyD88<sup>-/-</sup>, TICAM-1<sup>-/-</sup>, IPS-1<sup>-/-</sup>, IRF-3<sup>-/-</sup>, IRF-7<sup>-/-</sup>, IFNAR<sup>-/-</sup> である。MyD88<sup>-/-</sup> は審良研から、IRF-3<sup>-/-</sup>, IRF-7<sup>-/-</sup> は谷口研から恵与を受けた。BM キメラマウスの作製と調整は既報に準じた。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。

C. 研究結果

1. polyI:C i. p. 投与マウスは 2 日以内に NK 活性化を起動した。同様の系を IPS-1<sup>-/-</sup> 背景に正常 (WT) 樹状細胞を移入したキメラマウスに適用しても polyI:C の NK 活性化は殆ど起きなかった。逆に WT 背景に IPS-1<sup>-/-</sup> 樹状細胞を移入すると polyI:C の NK 活性化は起きた。以上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 活性病態において NK, CTL が肝組織傷害の増悪因子として働くか、感染・炎症の収束因子として機能するか、マウスのモデル系で推測しうるであろう。

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。

2. 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。TICAM-1 経路の cross-priming 誘導因子はまだ未同定である。

3. HCV 感染をマウスモデルで行う必要があるが、適切な（免疫系が査定できる）モデルが無い。IPS-1<sup>-/-</sup>のマウス肝実質細胞にヒト (h) CD81 を発現させると HCV の感染・複製が成立することことが判明した。現在 IPS-1<sup>-/-</sup>/hCD81 のマウス不死化肝細胞株の樹立とモデルマウス作製を計画している。

#### D. 考察

HCV の持続感染と慢性化、線維化からがん化に到る過程には慢性炎症が背景にあり、自然免疫の関与が強く示唆されている。しかし、その分子基盤は未解明である。抗体、CTL, NK 活性化について患者血液を使った報告があるが、これらの終末応答が HCV 感染と如何なる因果関係にあるかも判っていない。マウスを使った HCV 感染解析ができれば樹状細胞・自然免疫の活性化を含めて HCV 病態解明に進展が期待できる。

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 (2a) 株で多くの in vitro 実験が行われている現状である。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 KO マウスを使って証明された。

#### E. 結論

KO マウスを用いて樹状細胞 TICAM-1 が IPS-1 経路より NK, CTL の起動に重要であることを証明した。HCV がどちらを活性化するか、それが予後にどう影響するかは今後の検討課題である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sasai, M., H. Oshiumi, K. Funami, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Molec. Immunol.* 47: 1283–1291.

Kubota, N., T. Ebihara, M. Matsumoto, S. Gando, and T. Seya. 2010. IL-6 and interferon-alpha induced by polyI:C-stimulated bone-marrow-derived dendritic cells regulate peripheral expansion of regulatory T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391: 1421–1426.

Hirata, N., Y. Yanagawa, M. Satoh, H. Ogura, T. Ebihara, M. Noguchi, M. Matsumoto, H. Togashi, T. Seya, K. Onoé, and K. Iwabuchi. 2010. Dendritic cell-derived TNF- $\alpha$  is responsible for development of



- IL-10-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *Cell. Immunol.* 261: 37-41.
- Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN-beta inducing potential. *Eur. J. Immunol.* 40: 940-948.
- Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Sugiura, K. Kodama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Sci.* 101: 1596-1603.
- Kasamatsu, J., H. Oshiumi, M. Matsumoto, Kasahara, and T. Seya. 2010. Phylogenetic and expression analysis of Lamprey Toll-like receptors. *Dev. Comp. Immunol.* 34: 855-865.
- Azuma, M., R. Sawahata, Y. Akao, T. Ebihara, S. Yamazaki, M. Matsumoto, M. Hashimoto, K. Fukase, Y. Fujimoto, and T. Seya. 2010. The peptide sequence of diacyl lipopeptides determines dendritic cell TLR2-mediated NK activation. *PLoS ONE* 5: e12550.
- Tatematsu, M., A. Ishii, M. Horiuchi, H. Oshiumi, F. Inagaki, T. Seya, and M. Matsumoto. 2010. Molecular mechanism for activation of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 (TICAM-1). *J. Biol. Chem.* 285: 20128-20136.
- Ebihara, T., M. Azuma, H. Oshiumi, J. Kasamatsu, K. Iwabuchi, K. Matsumoto, H. Saito, T. Taniguchi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Identification of a polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* 207: 2675-2687.
- Ehira, N., H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Kondo, M. Asaka and T. Seya. 2010. An embryo-specific expressing TGF-beta family protein, growth-differentiation factor 3 (GDF3), augments progression of B16 melanoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 29: 135.
- Oshiumi, H., H. Mori, M. Ikeda, N. Kato, M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, K. Shimotohno, and T. Seya. 2010. Hepatitis C virus (HCV) core protein promotes viral replication by abrogating IFN-b-inducing function of DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase. *PLoS ONE.* 5: e14258.
- Oshiumi, H., M. Miyashita, N. Inoue, M. Okabe, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Essential role of Riplet in RIG-I-dependent antiviral innate immune responses. *Cell host microbe.* 8: 496-509.
- Yabu, M., H. Shime, H. Hara, T. Saito, M. Matsumoto, T. Seya, T. Akazawa, and N. Inoue. 2010. Lactic acid acts on macrophages to induce antigen-dependent IL-17 production from effector/memory helper T cells. *Int.*

*Immunol.* 23: 29-41.

Takaki, H., Y. Watanabe, M. Shingai, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- $\beta$ -inducing potential. *Molec. Immunol.* 48: 497-504.

Watanabe A., C. Obuse, K. Saeki, H. Shime, A. Yoshimura, T. Seya, and M. Matsumoto. 2011. Raftlin mediates cell entry of poly(I:C) to induce TLR3 activation. *J. Biol. Chem.* (in press).

Sawahata, R., H. Shime, S. Yamazaki, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Akazawa, N. Inoue, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Failure of mycoplasmal lipoprotein MALP-2 to activate NK cells through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* (in press).

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし



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）  
研究分担報告書

実験モデルの開発に関する研究

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨 培養細胞レベルでのC型肝炎ウイルス（HCV）の複製増殖にはヒト肝癌細胞株であるHuH-7由来の細胞クローンのみが汎用されている。我々は、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、我々が開発した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化合物についてそれらの抗HCV活性を再評価した。その結果、以下に示す成果を得た（1）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。（2）化合物の正当な評価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が必要であることを明らかにした。

A. 研究目的

HCVの複製を効率よくかつ持続的に産生できる培養細胞はヒト肝癌細胞株であるHuH-7由来の細胞に限られていた。しかしながら、最近、我々は、HCVの複製が持続的に起こる新たなヒト肝癌細胞株Li23を見出し、Li23由来のHCVゲノム複製細胞クローン株の樹立に成功した。さらに、これらの細胞株を用いて抗HCV活性を簡便に定量評価できるアッセイシステム（ORL8とORL11）を開発した。

これまでに我々が抗HCV活性を確認した各種抗HCV剤（インターフェロン（IFN）やスタチン剤）について、Li23由来のORL8やORL11アッセイシステムで再評価を行い、従来我々が使用していたHuH-7由来のOR6アッセイシステムで得られた結果と比較したところ、多くの抗HCV剤に対して、ORL8やORL11はOR6より高い感受性を示すことが分かった。その一方で、OR6の方が高い感受性を示す抗HCV剤もあつ

た。

これらの結果から、抗HCV活性を評価するためには、単独のアッセイ系ではなく、複数のアッセイ系を使用する必要性があるのではないかと考えた。

そこで、我々はPubMed文献data baseを利用して、他の研究室から報告されている抗HCV活性物質で入手可能な28種類（天然化合物や合成化合物）について、ORL8とOR6アッセイシステムで評価を行い、どの程度の差異がみられるのかを検討した。

B. 研究方法

抗HCV活性の評価については、アッセイ用の細胞（24ウェルプレート）に化合物（各種濃度）を添加して72時間後にルシフェラーゼ活性を測定することにより各種薬剤の50%阻害濃度（EC50）を算出した。

細胞毒性については、別途細胞（96ウェルプレート）に化合物（各種濃度）を添

加して 72 時間後に WST-1 アッセイにより 50%細胞毒性濃度 (CC50) を算出した。

選択性指数 (SI) は CC50/EC50 にて算出した。

抗 HCV コア抗体を用いたウェスタンブロットは常法に従って行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

### C. 研究結果

HCV の複製増殖システムを用いて、これまでに抗 HCV 活性について報告されている化合物を PubMed により検索し、市販品など入手可能な 28 化合物を選択した。内訳は、植物抽出物由来の化合物 7 種類、合成化合物 19 種類、その他 2 種類の計 28 種類を対象とした。このうち 19 種類は、肝疾患以外の疾患において既に治療薬として使われている化合物であった。

これらの化合物について、OR6 アッセイシステムと ORL8 アッセイシステムにより抗 HCV 活性ならびに細胞毒性を測定評価した。

その結果を既報の結果と比較し以下に示すような 6 つのクラスに分類した。

(1) どちらか一方のアッセイシステムで既報と同程度の EC50 値が得られた 7 化合物 (2) どちらか一方のアッセイシステムで既報の EC50 値より 3 分の 1 以下の低い値を示した 7 化合物 (3) どちらか一方の

アッセイシステムで既報の EC50 値より 3 倍以上高い値を示した 2 化合物 (4) HCV 以外で抗ウイルス活性が認められていて、今回両方のアッセイシステムで抗 HCV 活性が新たに見いだされた 4 化合物 (5) 両方のアッセイシステムで抗 HCV 活性が認められなかった 3 化合物 (6) 両方のアッセイシステムで逆に HCV-RNA の複製を増強させた 5 化合物。

(1) に分類された化合物は Griseofulvin, Crucumin, Cinanserin hydrochloride, 2'-deoxy-5-fluorouridine, Hydroxyurea, Nelfinavir および Resveratrol の 7 種類であった。CC50 値もほぼ既報の値と同程度であったが、Griseofulvin は OR6 細胞と ORL8 細胞に対する細胞毒性が既報に比べてかなり強いという違いも認められた。

(2) に分類された化合物は Acetylsalicylic acid, Artemisinin, 6-Azauridine, Clemizole, Hemin, Isoliquiritigenin および Methotrexate の 7 種類で、予想より高い抗 HCV 活性を示すことが分かった。ただ、6-Azauridine については、既報に比べて、細胞毒性がかなり強いという違いも認められた。

(3) に分類された化合物は Nitazoxanide と Tizoxanide の 2 種類で、予想より抗 HCV 活性が弱いことが分かった。

(4) に分類された化合物 Artesunate, Cantharidin, Cephalotaxine および Homoharringtonine の 4 種類で、既報で予想されていたように HCV にも抗ウイルス活性を示す化合物であることが今回初めて明らかになった。これらの化合物の

EC50 値は、既報の B 型肝炎ウイルスなどで得られていた EC50 値とほぼ同程度であった。

(5) に分類された化合物は Guanazole, HA1077 および Rolopram の 3 種類で、ほとんど抗 HCV 活性を示さなかった。

(6) に分類された化合物は Bisindolymaleimide, Carvedilol, Esomeprazole, Silibinin A および Y27632 の 5 種類で、EC50 値は算出されるものの、CC50 値が EC50 値と同じかそれ以下であった。

細胞毒性が顕著に認められる場合においても、高いルシフェラーゼ活性を示したことから、HCV コアについてウェスタンブロット解析を行ったところ、これらの化合物は HCV-RNA の複製レベルを予想とは逆に亢進させる作用を有することが分かった。

#### D. 考察

今回のアッセイ結果から得られたそれぞれの化合物について 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。

以上の結果をまとめると、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があることが示唆された。

#### E. 結論

今年度は以下に示す 2 点の成果を得た (1) ORL8 アッセイシステムと OR6 アッセイシステムを用いて 28 化合物 (これまでに抗 HCV 活性について報告されている) の活性評価を行った。その結果、半数程度の化合物において得られた EC50 値、CC50 値あるいは SI 値が両アッセイシステム間で異なることがわかった。(2) 化合物の評価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が必要であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. Virus

- Res. in press (2011).
- 2) Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: Potential treatment for hepatitis C. *Liver Int.* in press (2011).
  - 3) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Kato N. Gene expression profile of Li23, a new human hepatoma cell line that enables robust hepatitis C virus replication: Comparison with HuH-7 and other hepatic cell lines. *Hepatol. Res.* 40:1248-1253 (2010).
  - 4) Ikeda F, Dansako H, Nishimura G, Mori K, Kawai Y, Ariumi Y, Miyake Y, Takaki A, Nouse K, Iwasaki Y, Ikeda M, Kato N, Yamamoto K. Amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein are not associated with intracellular antiviral response to interferon- $\alpha$  in vitro. *Liver Int.* 30:1324-1331 (2010).
  - 5) Nozaki A, Morimoto M, Kondo M, Oshima T, Numata K, Fujisawa, Kaneko T, Miyajima E, Morita S, Mori K, Ikeda M, Kato N, Tanaka K. Hydroxyurea as an inhibitor of hepatitis C virus RNA replication. *Arch. Virol.* 155:601-605 (2010).
  - 6) Nozaki A, Numata K, Morimoto M, Kondo M, Sugimori K, Morita S, Miyajima E, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Tanaka K. Hydroxyurea Suppresses Hepatitis C Virus Replication in Human: A Phase I Trial of Oral Hydroxyurea in Chronic Hepatitis C Patients. *Antiviral Therapy* 15:1179-1183 (2010).
  - 7) Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Hokari R, Kato N, Hibi T, Miura S. An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus. *World J. Gastroenterol.* 16:184-192 (2010).
  - 8) Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito H, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Path. Int.* 60:351-357 (2010).
  - 9) Yu S, Chen J, Wu M, Chen H, Kato N, Yuan Z. Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3. *J. Gen. Virol.* 91:2080-2090 (2010).
  - 10) Tanaka T, Hasegawa Y, Saito M, Ikeda M, Kato N. Generation of single-chain Fvs against detergent-solubilized recombinant antigens with a simple coating

procedure. *J. Biosci. Bioeng.* 110, 374-376 (2010).

- 11) Oshiumi H, Ikeda M, Matsumoto M, Watanabe A, Takeuchi O, Akira S, Kato N, Shimotohno K, and Seya. Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN- $\alpha$  induction. *PLoS One* 5(12):e14258 (2010).
- 12) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. *PLoS One* 6(1):e14517 (2011).
- 13) Wen X, Abe T, Kukiwara H, Tagawa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi K, and Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One* 6(1): e15967 (2011).

## 2. 学会発表

- 1) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Anti-HCV mechanism of ribavirin in novel HCV replication cell systems. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, September 2010.
- 2) Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Development of genome-length HCV RNA replication assay systems derived from different HCV strains using HuH-7 and Li23 cells. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, September 2010.
- 3) Shinohara Y, Fujita K, Mawatari H, Yoneda M, Nozaki Y, Kirikoshi H, Imajo K, Suzuki K, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S. Clearance of the hepatitis C virus replicon by interferon-alpha treatment restored the signal pathway involving JNK. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, September 2010.
- 4) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Mechanism of Anti-HCV of Ribavirin in a Novel HCV Replication Cell System. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月。
- 5) 上田 優輝、森 京子、池田 正徳、有海 康雄、加藤 宣之。異なる細胞株を用いて開発した全長HCV-RNA複製系による抗HCV活性が報告されている薬剤等の再評価。第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月。
- 6) 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之。ヒト肝癌細胞株Li23由来の新しいHCV-RNA複製システムを用いたリバビリンの作用機序の解明。第18回日本消化器関連学会週間(JDDW 2010) / 第14回日本肝臓学会大会、横浜、2010年10月。
- 7) 池田 正徳、森 京子、中澤 貴秀、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之。C型肝炎ウイルスに対する新しい抗ウイルス剤スクリーニング系の開発。第18回日本消化器関連学会週間(JDDW



20110) / 第 14 回日本肝臓学会大会、  
横浜、2010 年 10 月。

8) 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、  
團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之。  
リバビリンの抗 HCV 活性を決定する因  
子の解析. 第 58 回日本ウイルス学会  
学術集会、徳島、2010 年 11 月。

9) 温 暁玉、阿部 隆之、久木原 博、  
田 鋏 修平、谷 英樹、加藤 宣之、  
鈴木 哲朗、巽 正志、森石 恆司、  
松浦 善治. C 型肝炎ウイルス感染細  
胞特異的なウイルス排除システム  
第 58 回日本ウイルス学会学術集会、  
徳島、2010 年 11 月。

#### 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

分担研究者 鐘ヶ江 裕美 東京大学医科学研究所・助教

研究要旨 本研究では、肝炎ウイルスに対する治療のために、多目的型 short-hairpin RNA (shRNA) 高度発現型新規アデノウイルスベクターの開発を行う。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種類のウイルス由来RNA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。

A. 研究目的

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型肝炎ウイルスに対する shRNA と治療用遺伝子を組み合わせた遺伝子治療用ベクターの開発及び有用性の確認を行う。

B. 研究方法

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。VA RNAsを高発現するためにはVAコード領域の上流に数塩基残存することが必要であるため、VA上流残存型VA発現プラスミドとVAをヒトU6プロモーターから強制発現するプラスミドを構築した。これらのプラスミドを293細胞にTransfastTMを用いてトランスフェクションし、real-time PCRによりVA RNA量を定量した。41塩基残存型とU6プロモーター型のプラスミドを293または293T細胞に導入しPuromycin耐性細胞株を樹立化し、VA RNAの発現をreal-time PCRにより定量した。本研究ではC型肝炎ウイルスに対するshRNAと治療用遺伝子を搭載したベクター作製を目指しているため、治療用遺伝子としてヒトインターフェロン $\alpha 2$ (IFN- $\alpha 2$ )を選択した。IFN- $\alpha 2$ のcDNAを293細胞の総DNAからPCRにより増幅し、クローニングを行い、塩基配列を確認後ベクター作製用コスミドカセットに挿入した。IRESに対するshRNAは、既にSakamoto

らによって報告されていたshRNAと本研究で新たに設計したshRNAの2種類を、昨年度最も高いshRNAの発現を示すことを報告したウイルスゲノム右端のE4領域に左向きでコスミドカセットに挿入した。

(倫理面への配慮)

本研究は、遺伝子治療用のベクター作製法の開発であり、現時点では倫理面に抵触する研究は進行していない。

C. 研究結果

昨年度は、AdVへのshRNAの挿入は、通常用いられているE1左向きよりもゲノム右端のE4領域右側に左向きに挿入した方が高い目的遺伝子発現抑制効果を示すこと、VA欠失ベクターは、通常の293細胞では増殖効率が極めて劣るため、Rasが恒常的に活性化していることが報告されている293T細胞でのみ作製が可能であったことを報告した。しかし、AdVの作製には最低でも2週間以上細胞を維持しなくてはならないため、細胞変性と細胞のダメージを見分けることが困難である293T細胞では、E3領域にdsRedを挿入して生成したベクターを可視化する必要性も報告した。

今年度は、E3にdsRedを挿入したVA欠失ベクターの作製を試みたが、ベクターは全く生成しな



かったため、293T細胞を用いてshRNAと治療用遺伝子を併せ持つVA欠失ベクターを作製することは困難であると考えた。そこで、VA RNAsを発現する293細胞の樹立化を行った。VA RNAsは配列内部のPolIIIプロモーターから発現するが、その発現にはVAコード領域の上流の配列が必要であることは報告されていたが、何塩基必要であるかについて具体的な報告が乏しかった。そこで、VA RNAsの上流に16、41あるいは75塩基を有するプラスミドを構築し、VA RNAs領域付近の28から32マップユニットを持つコントロールプラスミドのVA RNAs発現と比較した。その結果、16塩基しか持たないプラスミドはVA RNAsの発現が70%程度に低下していたが、41塩基以上挿入した場合にはコントロールプラスミドと同程度のVA RNAsの発現を示すことが明らかになった。

そこで、VA RNAsの上流41塩基を有する-41-VAあるいはヒトU6プロモーターからVA RNAsを強制発現するhU6-VAとPuromycin耐性遺伝子を持つプラスミドを構築し293細胞に導入した。また-41-VAを発現する293T細胞の樹立化も行った。各々20クローンを検討した結果、2種類のVA RNAsともに発現する293細胞及び293T細胞が確認されたが、VA RNAsの発現量はウイルス複製時と比べれば非常に少ないものであった。しかし、これらの細胞を用いてshRNA発現VA欠失コントロールベクター（非常に作製効率が高いことが既知のベクター）作製を行った所、hU6-293では58%、-VA41-293では45%となり、これらの細胞を用いればベクター作製は可能ではないかと考えられた。-VA-293T細胞は、ベクターの作製効率が99%と極めて高く、ベクターの増殖等には有用性が高いと考えられた。

以上の結果からVA欠失ベクターの作製は可能であると考え、次に治療用遺伝子であるIFN-a2のクローニングを行った。IFN-aはイントロンのない遺伝子として知られており、細胞の総DNAからPCRによりクローニングが可能であるが、サブ

タイプが14以上、遺伝子数も18以上あるため、IFN-a2の単離には更なる工夫が必要である。そこで、PCRによる増幅後、用いたプライマー配列に比較的近い配列を持つIFN-a 1、5、6、8及び13の混入を最小限に留めるため、PCR反応産物をIFN-a2には認識サイトの無いXcmIとHincIIで切断後、pBSSK (-) にクローニングした。その結果9割以上が目的とするIFN-a2であり、塩基配列からも正しいIFN-a2であったことを確認した。

C型肝炎に対するshRNAは、Sakamotoらの報告したHCV-21と加えてIRESのF領域を標的とする独自のshRNAを選定し合成したのち、hU6プロモーターの下流に挿入した。

EF1 $\alpha$ プロモーターからIFN-a2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-a2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。またVAを持つ各々のAdVも作製している。

#### D. 考察

第1世代AdVで唯一残存して発現しているVA RNAsについては、これまで注目されることはなかったが、2010年にApalicioらがVA RNAsがmiRNAとして機能すること、その結果細胞周期や癌化などに関わる多くの遺伝子発現が影響を受ける可能性が報告された。我々もVA存在と非存在状態でのマイクロアレー解析から複数の細胞遺伝子の発現が上昇あるいは低下していたことを示してきた。VA RNAsが残存したままの第1世代ベクターの遺伝子治療への応用に関しては、今後慢性疾患などへの応用へと応用範囲が広がった場合には問題となる可能性も捨てきれないと考える。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。

#### E. 結論

今年度は、2010年に報告された Apalicio らの論文や我々の研究成果からベクターに残存し野生型と同程度発現している VA RNAs が細胞の遺伝子発現に影響を与えることが明らかになり、C型肝炎ウイルスの治療薬として考えた場合には、本研究で開発しているVA欠失ベクターの有用性が更に高まった。そこで、VA RNAs 欠失ベクターの作製効率の上昇を目指したベクター作製細胞の樹立化を行い、有用性の高い細胞株を得た。そこで本研究の目的である C 型肝炎に対する shRNA と治療用遺伝子 IFN- $\alpha$ 2 をともにもつ VA 欠失ベクターを複数構築した。今後は治療効果についても検討を進めていく。

日本癌学会総会，大阪，2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

F. 健康危険情報  
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Kanegae, Y., Terashima, M., Kondo, S., Fukuda, H., Maekawa, A., Pei, Z. and Saito, I. High-level expression by tissue/cancer-specific promoter with strict specificity using a single-adenoviral vector., *Nucleic Acids Res.*, 39: e7, 2011.

・ Sakamoto, S., Yazawa, T., Baba, Y., Sato, H., Kanegae, Y., Hirai, T., Saito, I., Goto, T. and Kurahashi, K. Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice., *Am J Respir Cell Mol Biol*, in press.

2. 学会発表

鐘ヶ江 裕美, 合田 直樹, 寺島 美保, 斎藤 泉. 新規アデノウイルスベクターを用いた癌細胞標的化遺伝子治療法の開発とマウスモデルの確立, 第69回日本癌学会総会, 大阪, 2010.

合田 直樹, 寺島 美保, 鐘ヶ江 裕美, 斎藤 泉. 癌細胞特異的切り出し発現型アデノウイルスベクター発現増強に向けた改良, 第69回

C型肝炎ウイルス排除機構の解析

分担研究者 小原 道法 東京都臨床医学総合研究所・感染制御プロジェクト  
プロジェクトリーダー

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）の解析を通して、ウイルス感染依存に脂肪酸合成経路が活性化すること、及び脂肪酸合成酵素（FASN）の阻害剤がウイルス複製をも阻害することが我々の実験で判明した。さらに、HCV 培養細胞系及びヒト肝臓キメラマウスを用いた感染阻害実験で、FASN 阻害剤が新たな HCV 治療薬となる可能性が示された。脂肪酸はグリセリンをエステル化して油脂（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。本研究では、脂肪酸合成がウイルス感染で果たす役割を解明すると共に、発現が誘導された脂肪酸合成酵素経路の因子と HCV 感染後の病態との関係も解析した。

A. 研究目的

HCV複製依存に脂肪酸合成酵素（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。パルミチン酸はFASNによって合成される炭素数16の長鎖脂肪酸であり、HCV複製に必要なウイルス或いは宿主因子がパルミチン酸化の標的である可能性を明かにし、新たなHCV治療薬としての研究を進めた。

B. 研究方法

脂肪酸合成酵素（FASN）は哺乳類においては七種の酵素活性を有する巨大蛋白質複合体として存在する。我々はその中の三種類の酵素活性に対する低分子化合物の阻害剤を用いて、HCV複製にFASNが関与しているかどうかを検討した。その際、HCV複製活性はルシフェラーゼ活性だけでなく、ウイルスRNAと蛋

白質を検出することでも判定した。

（倫理面への配慮）

動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従う。また、東京都臨床医学総合研究所動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

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。オルリスタットは図に示した以上の濃度で使用してもHCV複製を完全に止めることは出来なかった。またトリクロサンは、これ以上の濃度では毒性が強く出た。この結果は、FASNの持つ酵素活性の中でKS活性がHCV複製に最も必要である可能性を示

している。

#### D. 考察

ヒト等の哺乳動物の細胞の場合、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 ELOVL6 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は今後解析を進める予定である。

#### E. 結論

HCV 複製だけを観察できるレプリコン細胞系で FASN 阻害剤が抗 HCV 作用を持つ点を考えて、NS4B のパルミトイル化が影響を受けている可能性の検討を進めている。さらに、FASN 阻害剤の HCV 感染動物モデルでの抗 HCV 効果についても現在解析中であり、FASN 阻害剤を新規な抗 HCV 薬として応用するための臨床研究へ至る道を探索している。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yutaka Amako, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Yuichi Hirata, Satoshi Sekiguchi, Yoshimi Tobita, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Hiromichi Yonekawa and Michinori Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* J. Virology 84(1):303-311 (2010).

2) Kenichi Satoh, Hiroki Takahashi, Chiho Matsuda, Takuya Umehara, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Mikio Zeniya and Michinori Kohara. Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. J. Med. Virol. 82(9):1545-1553 (2010).

3) Yuri Kasama, Satoshi Sekiguchi, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Masaaki Satoh, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Motohiro Takeya, Yoichi Hiasa, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. Blood 116(23):4926-4933 (2010).

4) Hideko Nuriya, Kazuaki Inoue, Takeshi Tanaka, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Kyosuke Kaji, Seishu Hayashi, Shuichi Kaneko and Michinori Kohara. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based in situ hybridization. J. Clin. Microbiol. 48(11):3843-3851 (2010)

5) Leiyun Weng, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Ying He, Jin Zhong, Tetsuya Toyoda. Sphingomyelin activates hepatitis C virus



RNA polymerase in a genotype specific manner. *J. Virology* 84(22):11761-11770 (2010).

6) Masaaki Arai, Hidenori Suzuki, Yoshimi Tobita, Asako Takagi, Koichi Okamoto, Atsunori Ohta, Masayuki Sudoh, Kunitada Shimotohno, Michinori Kohara.

Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. *Arch. Virol.* 156:295-304 (2011).

7) Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masahiro Hayashi, Yuichi Hirata, Masaaki Satoh, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Masayuki Sudo, and Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology* (2011) in press.

8) Takashi Takano, Michinori Kohara, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Makoto Saito, Chieko Kai, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J. Med. Virol.* (2011) in press.

9) Kiminori Kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of interleukin-18 in

intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* (2011) in press.

## 2. 学会発表

1) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Taguchi R., Kohara M.: Hepatitis C virus altered the sphingolipids metabolism for better environment its replication. *Keystone Symposia 2010.6.6-11 Kyoto*

2) Nakagawa S., Hirata Y., Tokunaga Y., Hirabatashi K., Yano J., Tateno C., Tanaka Y., Mizokami M., Inoue K., Yoshida M., Kohara M. : Interferon lambda plays a critical role on antiviral effect in human hepatocyte. *17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2010.9.10-14. 横浜*

3) Sekiguchi S., Kimura K., Chiyo T., Tobita Y., Yasui F., Kohara M. : Hepatitis C virus mediated pathogenesis is dependent on inflammatory cytokines with irrespective of HCV protein level. *17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2010.9.10-14. 横浜*

4) 木村公則、小原道法：C型慢性肝炎に対するHCV遺伝子組換えワクチニアウイルスによる新たな治療戦略 第18回日本消化器関連学会 2010.10.13-16. 横浜

5) 平田雄一、井上和明、小原道法：IFN $\lambda$ を強力に誘導する核酸/リポソーム製剤の同