

ク質のリーク発現であること、この pIX の発現は目的遺伝子の発現用プロモーターとして EF1 α を用いることで回避できることを報告した。この結果、AdV を用いた遺伝子治療の可能性が、これまでの致死性高い疾患のみでの応用から全身投与による慢性疾患の治療へと広がる可能性が強く示唆された。その場合 VA RNAs がベクターで唯一発現しているウイルス由来の発現物となる。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を報告した。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。これらの結果を勘案すれば、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危険性が伴う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。

5. 抗 HCV 薬の探索

細胞内に感染しているウイルスを完全排除する、個体レベルでの免疫応答および細胞内レベルでのウイルス構成因子の認識機構及び分解排除機構を解明し、ウイルス感染に対する新たな防御法および治療法を確立することを目指した。ヒト肝臓キメラマウスの HCV/ HBV 感染モデル系で、カチオニックリポソーム及び PolyI:C 複合体がこれまで報告されている I 型インターフェロンだけでなく、III 型インターフェロンも誘導すること、そして HBV 及び HCV の排除に関しては III 型インターフェロンが主に寄与していることを示していた。

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。

HCV の全ライフサイクルを標的とする抗 HCV 薬スクリーニングを行った。レプリコン細胞を用いたスクリーニングでは発見困難と思われる、ウイルスの侵入過程や放出過程を標的とする物質が見いだされた。

Tamoxifen、clomifene、raloxifene に加え、ER α antagonist の SERMs に抗 HCV 活性が観察された。これらは C 型肝炎治療への臨床応用も可能と思われる。また、tamoxifen には複製阻害、侵入阻害の少なくとも二つの異なる HCV 阻害の機序があり、HCV 侵入の阻害活性については HCV に特異的な作用と考えられた。認可された薬のライブラリーを評価した。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、HCV 治療薬として、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。

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-M001 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-M016 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-M016 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。C 型肝炎の病態、抗ウイルス免疫応答の持続機構に関して新規知見を得た。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を行いその有用性を示した。抗 HCV 薬の探索から、HCV 蛋白、宿主側を標的とした候補阻害剤（ヒット化合物）を見出した。

得られた研究成果を基に今後以下の展開、課題が考えられる。

1) HCV 感染、複製、粒子形成機構、病原性発現機構、持続感染機構の解析を進展させ、新たな創薬標的を提示する。

2) 抗 HCV 薬スクリーニングで得られたヒット化

合物について、高次評価を積極的に実施し創薬シーズの同定、特許取得を進める。製薬企業との連携を強化する。

3) C 型慢性肝炎患者における脂肪肝の発症が HCV の感染、増殖と関連する可能性を明らかにする。その知見をウイルスの複製抑制、疾患予防に役立てる。

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, Tagawa 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 I. *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.
 14. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami

- H, Matsuura Y, Lai MMC, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol* 5137-5147 5137-5147, 2009.
15. Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., Suzuki, T: Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *J Virol* 83: 2389-2392, 2009.
 16. Kukihara H, Moriishi K, Taguwa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T, Taketomi A, Maehara Y, Matsuura Y: Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J Virol* 83: 7959-7969, 2009.
 17. Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K: Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* 50: 378-386, 2009.
 18. Taguwa S, Kambara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J Virol* 83: 10427-10436, 2009.
 19. 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* 16: 1123-1135, 2009.
 20. Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, Suzuki T, Wakita T, Fukasawa H: Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Res* 83: 112-117, 2009.
 21. Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Koike K: Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. *Am J Pathol.* 175: 1515-241, 2009.
 22. Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M: Cellular vimentin content regulates the protein level of Hepatitis C virus core protein and the Hepatitis C virus production in cultured cells. *Virology* 383: 319-27, 2009.
 23. 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.* 47: 4141-4143, 2009.
24. 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.* 377: 747-751 (2008).
 25. Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus production. *J. Virol.* 82: 7964-7976 (2008).
 26. Ishii, K., Murakami, K., Hmwe, S.S., Bin, Z., Li, J., Shirakura, M., Morikawa, K., Suzuki, R., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371: 446-450 (2008).
 27. Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Saito, K., Nishijima, M., Hanada, K., Matsuura, Y., Lai, M.M., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* 82: 5715-5724 (2008).
 28. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 82: 8349-8361 (2008).
 29. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol.* 82: 3480-3489 (2008).
 30. Tagawa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.* 82: 2631-2641 (2008).
 31. Omata, K., Suzuki, R., Masaki, T., Miyamura, T., Satoh, T., Suzuki, T. Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter. *Apoptosis* 13: 929-937 (2008).
 32. Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Wakita, T., Shoji, I. Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J. Gen. Virol.* 89: 1587-1592 (2008).
 33. Murakami, K., Inoue, Y., Hmwe, S.S., Omata, K., Hongo, T., Ishii, K., Yoshizaki, S., Aizaki, H., Matsuura, T., Shoji, I.,

Miyamura, T., Suzuki, T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. J. Virol. Methods. 148: 174-181 (2008)

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）
分担研究報告書

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 感染性粒子は浮遊密度が非感染性粒子に比べ小さいことから、脂肪性の因子あるいはリポ蛋白質関連因子が感染性に関与していると考えられた。VLDL 産生に重要な MTP の阻害剤で処理した細胞からの感染性粒子産生は強く抑制された。この阻害はアポリポ蛋白質 B(ApoB)の細胞外への放出抑制、および VLDL それ自身の放出抑制ともよく関連していた。さらには ApoB 産生を shRNA 処理により抑制した場合、感染性粒子産生は抑制された。このときに VLDL 産生も同時に抑制された。以上から、HCV の感染性には VLDL あるいは ApoB が直接関与している可能性が考えられた。

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画分に共存している 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。

感染細胞から放出されるウイルス粒子の性状を大きさを調べるために、ゲル濾過を行った。ゲル濾過により溶出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)に容出された。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、感染性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) キャリアーの多くが慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌

へと移行し、年間の死亡者も我が国では5万人を超えている。インターフェロンなどによる治癒率は 50%程度であ

り、画期的な治療薬が切望されている。この問題を解決するために、HCV 増殖を支える種々要因を明らかにし、増殖を人為的に抑制する制御法の開発が必要である。本研究では我々が最近明らかにした油滴を利用した HCV 複製の分子機構を解明し、粒子産生における脂肪代謝の意義を明らかにした新たな切り口による抗 HCV 剤開発に向けた研究を進展させ、これまでの治療に対する研究に相乗的な効果が現れる治療方法の原理を生み出す事を目的とする。さらに、脂肪滴周辺から産生される粒子の細胞外への放出についても解析して、ウイルスの生活環を明らかにする。

B. 研究方法

(1) HCV に感染性を賦与する細胞側要因の解析。

感染性ウイルスゲノム, JFH1 を導入した細胞から、培養外液にウイルス粒子が放出されるが、粒子の大部分は非感染性である。さらに感染性と非感染性の両者には浮遊密度の違いが存在する。この違いがウイルス粒子構成成分の中で、ウイルス蛋白質およびウイルス核酸の組成の違いに由来する可能性は排除出来ないが、それ以外に起因する原因を明らかにし、感染性に重要なウイルス側要因を明らかにする。

(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) HCV に感染性を賦与する細胞側要因の解析。

HCV 感染性の獲得にはウイルスが特定のリポ蛋白質と会合することが重要であると考え、脂肪代謝に関係する宿主遺伝子との関連性を調べた。まず、VLDL 産生に重要な働きをする MTP (microsomal triglyceride transfer protein) に着目してウイルス産生との関連で解析を行った。MTP の機能を阻害する薬剤 (Bay13) を投与した HCV 感染細胞からの感染性ウイルス粒子産生を薬剤濃度を変えて解析し、薬剤濃度依存的に感染粒子産性が抑制されることを見いだした。すなわち、薬剤濃度 0.001 マイクロモル濃度に於いて、感染性粒子産生は3分の1以下に低下していた。濃度を 0.01 マイクロモル濃度にするると、5分の1以下の量に低下した。MTP 阻害条件における細胞外への VLDL の放出を調べると、0.001 マイクロモル濃度に於いて、阻害が見られ、その傾向はアポリポ蛋白質 B の放出低下とよく一致していた。

以上の実験では MTP がアポリポ蛋白質 B を阻害する事により VLDL 産生阻害

をもたらす結果として感染性 HCV の産生も抑制されたと考えられる。アポリポ蛋白質 B 遺伝子を shRNA で阻害した時に、HCV 産生を調べたところ、感染性粒子の産生は強く抑制された。この条件下では VLDL の産生も同様に抑制されていた。

(2) HCV 感染・複製培養細胞系を用いた感染性獲得に対する細胞側要因の解析。

リポタンパク質の成分には ApoB 以外にもアポリポタンパク質 E (ApoE) , アポリポタンパク質 A (ApoA) , アポリポタンパク質 C (ApoC) などが存在する。それらのアポリポタンパク質の中でウイルス粒子の産生に関連する因子を探索し、ApoE が感染性ウイルス粒子の産生にとくに重要であることを見いだした。つまり、ApoE をノックダウンした細胞からの感染性粒子の産生は強く抑制された。一方、ApoA, ApoC のノックダウン細胞は感染性粒子の産生をあまり低下させない。

また、放出される粒子の物理的性状を密度勾配遠心分離により解析し、浮遊密度の小さい粒子に感染性が高いことを確認した。これらのことから、培養細胞の外に放出されるウイルス粒子はリポタンパク質と会合しており、感染性には ApoE が重要な働きをしていることが示唆された。

(3) ウイルス粒子の性状解析

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。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 の量が 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 処置による 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、および 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ウイルス調製液に混在していた 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、会合している限られたリポ蛋白質により感染性が規定される。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。

(4) ゲル濾過によるウイルスの解析
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。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 が溶離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。

(5) 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 に溶出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。しかし、感染性粒子が細胞の外に放出されるためにはリポタンパク質の細胞外放出の機構を利用している可能性が高いこと

がわかった。ウイルス粒子に会合している ApoE は感染性に重要な働きをしていることが明らかになった。おそらく HCV が細胞に感染する際に、ApoE 受容体を認識してウイルスが細胞に接触するなどの機構が考えられる。この機構が明らかになれば、抗 HCV に向けた薬剤開発の新たな標的を見いだすことができると考えられる。ウイルス粒子がリポ蛋白質を会合している事を生化学的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。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が待たれる。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. Ikejiri M, Ohshima T, Fukushima A, Shimotohno K, Maruyama T. Synthesis and evaluation of 5'-modified 2'-deoxyadenosine analogues as anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 18(16):4638-4641, 2008
2. Noguchi T, Otsubaki T, Ando I, Ogura N, Ikeda S, Shimotohno K. Isolation and gene analysis of interferon alpha-resistant cell clones of the hepatitis C virus subgenome. *Virology*. 375(2):424-432, 2008
3. Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Tada S, Kumagai N, Kato N, Shimotohno K, Hibi T. Possible molecular mechanism of the relationship between NS5B polymorphisms and early clearance of hepatitis C virus during interferon plus ribavirin treatment. *J Med Virol*. 80(4):632-639, 2008
4. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M. 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *Biochem Biophys Res Commun*. 379(2):330-334, 2009.
5. Okamoto M, Sakai M, Goto Y, Salim MT, Baba C, Goto K, Watashi K, Shimotohno K, Baba M. Anti-bovine viral diarrhoea virus and hepatitis C virus activity of the cyclooxygenase inhibitor SC-560. *Antivir Chem Chemother*. 20(1):47-54, 2009
6. Ikejiri M, Ohshima T, Fukushima A, Shimotohno K, Maruyama T. Synthesis and anti-HCV activity of 2',5'-deoxy-5'-phenacyladenine analogs. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 53:103-104, 2009.
7. Goto K, Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Shimotohno K. Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. *Cancer Sci*. 100(10):1943-1950, 2009
8. Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 85(7):217-228, 2009
9. Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Mizokami M, Shimotohno K, Hijikata M. Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. *Hepatology*. 50(3):689-696, 2009.
10. Sugiyama K, Suzuki K, Nakazawa T, Funami K, Hishiki T, Ogawa K, Saito S, Shimotohno KW, Suzuki T, Shimizu Y, Tobita R, Hijikata M, Takaku H, Shimotohno K. Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro. *J Virol*. 83(13):6922-6928, 2009
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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
- 発明の名称「肝炎ウイルスの増殖法、および肝炎ウイルス感染細胞を培養するための中空糸並びにその利用」
- 発明者：下遠野 邦忠、土方 誠、山口達哉
- 国際出願番号：PCT/JP2007/068611
- 出願日：2007年9月26日

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

HCV の複製に関与する宿主因子の機能解析

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨 HCV の複製に関与する宿主因子を解析し、NS5B 蛋白質と相互作用する Human vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) subtype B (VAP-B) のスプライシングバリエーションである VAP-C と、NS5A と相互作用する human butyrate-induced transcript 1 (hB-ind1) を同定した。VAP-C は HCV の複製を抑制しており、その発現は HCV の臓器親和性を規定する要因の一つである可能性が示唆された。また、hB-ind1 の N 末端に保存されている p23 と相同性の高い領域は Hsp90 と相互作用し、その機能を調節するコシャペロン活性を有していた。肝臓特異的に発現している Micro RNA-122 (miR-122) は HCV の翻訳効率を亢進することが報告されているが、miR-122 の発現が低い非肝臓由来細胞に miR-122 を強制発現させると HCV のゲノム複製を許容することが示された。

A. 研究目的

HCV に感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には 2 百万人もの HCV 感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。しかしながら、HCV を効率よく複製できる細胞培養系を欠くため、HCV の感染様式や発癌機構は依然として謎に包まれたままである。本研究は HCV の感染、成熟、そして複製過程に関与する宿主因子を解析し、これらの宿主因子をターゲットとした新しい C 型肝炎治療法の開発の可能性を探ることを目的とした。

B. 研究方法

各種 VAP を NS5A や NS5B とともに培養細胞に発現し、免疫沈降法によって相互作用を解析した。また、HCV レプリコン細胞や JFH-1 ウイルスの培養系に各種 VAP を発現させ、イムノプロットや定量的 RT-PCR によって、

ゲノム複製や粒子産生への影響を解析した。さらに、VAP-C の C 末端に存在するサブタイプ特異配列を認識する特異抗体を作製し、VAP-C の臓器分布を解析した。

hB-ind1 と相同性を示すコシャペロンの p23 とのキメラ変異体を作成し、グルココルチコイド受容体 (GR) シグナル抑制機構をモデルとしたコシャペロン活性検討試験を行った。またキメラ変異体を発現する細胞に JFH-1 ウイルスを感染させ、ウェスタンブロット法、定量的 RT-PCR、フォーカスフォーミングアッセイによって、HCV ゲノム複製およびウイルス増殖への影響を解析した。hB-ind1 と NS5A の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて詳細に解析した。

ヒト子宮頸癌由来 Hec1B 細胞における HCV のレセプター候補分子の発現をイムノプロットで検討した。ウイルス感染による自然免疫誘導能は、IFN α 刺激による ISG15

の発現を指標として、また、miR-122 の発現は qPCR で定量した。レンチウイルスベクターを用いて miR-122 を強制発現させた Hec1B 細胞や Claudin を強制発現させた 293T 細胞 (293T-CLDN) への HCVcc の感染性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、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を必要とする材料は含まれない。

C. 研究結果

VAP-C は主に腸管、子宮、膀胱などに発現していたが、VAP-A や VAP-B の発現が高い肝臓ではほとんど検出されなかった。VAP-A と VAP-B は major sperm protein (MSP) ドメイン、coiled-coil motif、および膜貫通領域の三つ機能ドメインで構成されており、coiled-coil と MSP ドメインを介してそれぞれ NS5A と NS5B に結合することが知られている。一方、VAP-C は VAP-B の MSP ドメインとサブタイプ特異配列のみで構成されており、NS5B とは結合するが NS5A には結合しなかった。VAP-C を過剰発現させると、VAP-A と VAP-B の NS5B への結合が阻害された。また、VAP-A や VAP-B を発現させた Huh70K1 細胞に JFH-1 ウイルスを感染させると、対照細胞に比べて細胞内のウイルス RNA 量は 10-30 倍に増加したが、VAP-C を発現させた細胞では 5 分の 1 以下に減少した。

コシャペロン活性検討試験の結果から、hB-ind1 の N 末端に存在する p23 様領域は Hsp90 を制御するコシャペロン活性を有する事が示された。p23 のコシャペロン領域を有する hB-ind1 キメラ変異体は野生型同様 Hsp90 結合依存的に HCV ゲノム複製を支持した。HCV レプリコン細胞およびウイルス感染細胞において hB-ind1 は NS5A と小胞体に存在した。さらに hB-ind1/NS5A 共局在部位には、同じく NS5A 結合蛋白質である FKBP8 や dsRNA、折り畳まれた膜や小胞構造が検出された。

Hec1B 細胞は HCV のレセプター候補分子である CD81、SR-BI、Claudin1、Occcludin を全て発現しており、HCVpv (HCV の侵入評価系) の感染性は Huh7 細胞と同等であった。また、IFN α や IFN λ の刺激による ISG15 の誘導は検出されず、ウイルス複製を阻害する自然免疫誘導能が欠損していた。しかしながら、miR-122 の発現は Hec1B 細胞や 293T-CLDN 細胞ではほとんど認められなかった。Hec1B 細胞に HCVcc を感染させると、HCV RNA 量は 72 時間後までほとんど変化しなかったが、miR-122 を強制発現させると感染 18 時間後より RNA 量が急速に増加し、48 時間後には約 100 倍まで上昇し、miR-122 の発現により Hec1B 細胞内でも HCV の複製が可能となることが示された。一方、293T-CLDN 細胞では miR-122 を強制発現させても HCV のゲノム量に変化は認められなかった。

D. 考察

多くのウイルスの複製に分子シャペロンが関与以上の成績から、VAP-C は VAP-A や VAP-B の NS5B への結合を競合的に阻害する事によって、HCV の複製を抑制していることが明らかとなった。また、VAP-C の発現は HCV の臓器親和性を規定する要因の一つである可能性が示唆された。

hB-ind1 は p23 同様、Hsp90 とクライアント蛋白質の乖離を促進するコシャペロン機能を有しており、その機能を以て HCV ゲノム複製を調節している事が示唆された。また複製時にはウイルス特異的な膜構造体であるメンブラスウェブにおいて、他のシャペロン関連蛋白質と共に局在し、効率的に複製複合体を構成する蛋白質の安定化を図ると考えられた。

Hec1B 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

E. 結論

- 1 VAP-C は VAP-A や VAP-B の NS5B への結合を競合的に阻害する事によって、HCV の複製を抑制している。
- 2 VAP-C の発現は HCV の臓器親和性を規定する要因の一つである可能性が示唆された。
- 3 NS5A 結合宿主因子である hB-ind1 はコシヤペロン活性により Hsp90 の活性を制御し、メンブラスウェブの様な閉鎖的微小環境下において、効率的な HCV ゲノム複製を制御していることが推測された。
- 4 ヒト子宮頸癌由来 Hec1B 細胞は miR-122 を強制発現することにより、HCVcc の感染を許容できることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. J. *Viol.*, 82, 8349-8361 (2008).
- 2 Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 7964-7976 (2008).
- 3 A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. Aizaki H., Morikawa K., Fukasawa M., Hara H., Inoue Y., Tani H., Saito K., Hanada K., Matsuura Y., Lai M. M. C., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 5715-5724 (2008).
- 4 A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 3480-3489 (2008).
- 5 Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. Taguwa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 2631-2641 (2008).
- 6 Co-chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. Taguwa S., Kambara H., Omori H., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 10427-10436 (2009).
- 7 Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. Kukihara H., Moriishi K., Taguwa S., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Fukuhara T., Taketomi A., Maehara Y., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 7959-7969 (2009).
- 8 Baculovirus induces type I IFN production through TLR-dependent and -independent pathways in a cell type-specific manner. Abe T., Kaname Y., Wen X., Tani H., Moriishi K., Uematsu S., Takeuchi O., Ishii K. J., Kawai T., Akira S., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 7629-7640 (2009).
- 9 Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core

- protein: analysis using mouse model and cultured cells. Moriya K., Miyoshi H., Tsutsumi T., Shinzawa S., Fujie H., Shintani Y., Yotsuyanagi H., Moriishi K., Matsuura Y., Suzuki T., Miyamura T., Koike K. *Am. J. Pathol.* 175, 1515-1524 (2009).
- 10 Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. Hara H., Aizaki H., Matsuda M., Shinkai-Ouchi F., Inoue Y., Murakami K., Shoji I., Kawakami H., Matsuura Y., Lai M.M., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 83, 5137-5147 (2009).
- 11 Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28-Dependent Mechanism. Suzuki R., Moriishi K., Fukuda K., Shirakura M. Ishii K., Shoji I., Wakita T., Miyamura T., Matsuura Y., and Suzuki T. *J. Virol.*, 83, 2389-2392 (2009).
- 12 Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. Mori K., Amano M., Takefuji M., Kato K., Morita Y., Nishioka T., Matsuura Y., Murohara T., Kaibuchi K. *J. Biol. Chem.*, 284, 5067-5076 (2009).
- 13 Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. Noritake J., Fukata Y., Iwanaga T., Hosomi N., Tsutsumi R., Matsuda N., Tani H., Iwanari H., Mochizuki Y., Kodama T., Matsuura Y., Brecht D.S., Hamakubo T., Fukata M. *J. Cell Biol.*, 186, 147-160 (2009).
- 14 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.
- 15 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.
- 16 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.
- 17 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.
- 18 Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihara 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.
- 19 Tripathi LP, Kataoka C, Tagawa 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.

2. 学会発表

- 1 松浦善治：C型肝炎ウイルスの複製および病原性発現における Rip の役割：第31回日本神経科学大会ワークショップ

- プ、東京、7月9-11日、2008.
- 2 Xiaoyu Wen、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: IRF7 dominant active 変異体による HCV 感染細胞における I 型 IFN の発現増強効果: 第 14 回日本遺伝子治療学会、札幌、10月21日-23日、2008.
 - 3 山下哲生、宮崎直幸、森嘉生、森石恆司、李天成、宮村達男、武田直和、吉村政人、月原富武、松浦善治: 分解能 3.5 Å の E 型肝炎ウイルス様粒子の X 線結晶構造解析: 第 56 回日本ウイルス学会総会、岡山、10月26日-28日、2008.
 - 4 田鋏修平、阿部隆之、森嘉生、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスの複製における hB-ind1 のコシャペロン活性、同上.
 - 5 森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染におけるプロテアソーム活性化蛋白質 PA28 γ の役割、同上.
 - 6 森嘉生、山下哲生、嶋亮一、森石恆司、李天成、武田直和、松浦善治: E 型肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製、同上.
 - 7 谷英樹、泉貴之、寒原裕登、要祐喜、森嘉生、森石恆司、松浦善治: 日本脳炎ウイルスの細胞侵入におけるセラミドの関与、同上.
 - 8 久木原博、森石恆司、松浦善治: ヒト VAP-C は C 型肝炎ウイルスの複製を抑制する、同上.
 - 9 阿部隆之、温小玉、田中佳典、寒原裕登、谷英樹、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染細胞特異的な IFN の誘導によるウイルス排除システムの構築、同上.
 - 10 阿部隆之、要祐喜、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染による TLR 経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上.
 - 11 田中佳典、森嘉生、谷英樹、阿部隆之、森石恆司、巽正志、松浦善治: 患者血清中に存在する C 型肝炎ウイルスの感染・複製を検出可能な指示細胞の樹立、同上.
 - 12 松浦善治: C 型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に關与する宿主因子: 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、シンポジウム、神戸、12月9日-12日、2008.
 - 13 森石恆司、勝二郁夫、鈴木亮介、鈴木哲朗、松浦善治: HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御: 第 57 回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日、2009.
 - 14 谷英樹、塩川舞、寒原裕登、要祐喜、森嘉生、森石恆司、松浦善治: 日本脳炎ウイルスの感染における脂質セラミドの役割、同上.
 - 15 福原崇介、谷英樹、塩川舞、森石恆司、前原喜彦、松浦善治: 患者血清由来 HCV の細胞内導入法、同上.
 - 16 寒原裕登、田鋏修平、藤田尚信、森嘉生、野田健司、森石恆司、吉森保、松浦善治: HCV の増殖とオートファジー、同上.
 - 17 片岡周子、要祐喜、阿部隆之、森石恆司、谷英樹、松浦善治: バキュロウイルスの細胞侵入機構の解析、同上.
 - 18 要祐喜、片岡周子、阿部隆之、森石恆司、谷英樹、松浦善治: バキュロウイルス gp64 蛋白質の補体抵抗性獲得機構、同上.
 - 19 阿部隆之、要祐喜、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、松浦善治: ヒアルロン酸による炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生と C 型肝炎の慢性化、同上.
 - 20 鈴木亮介、斎藤憲司、安東友美、石井孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、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、同上.
 - 21 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤滋子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗: HCV 粒子形成に關与する脂肪滴周辺蛋白質の同定と機能解析、同上.

- 22 田鍬修平、寒原裕登、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: C型肝炎ウイルスの感染におけるオートファジーの意義: 第32回日本分子生物学会年会、横浜、12月9日-12日, 2009.
- 23 松浦善治: バキュロウイルスを用いた哺乳動物細胞への遺伝子導入: 第82回日本生化学会大会、神戸、10月21日-24日, 2009. 松浦善治: Host factors involved in the replication of hepatitis C virus: 第62回細胞生物学会大会、大阪、5月19日-21日, 2010.
- 24 松浦善治: 温故知新・C型肝炎ウイルス研究の源流: 第52回日本消化器病学会大会、横浜、10月13日-16日, 2010.
- 25 寒原裕登、田鍬修平、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: C型肝炎ウイルスはオートファジーを誘導して持続感染を成立させる: 第58回日本ウイルス学会総会、徳島、11月7日-9日, 2010.
- 26 谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスの細胞侵入におけるフォスホリパーゼCおよびプロテインキナーゼC依存的なシグナル伝達経路の関与、同上。
- 27 福原崇介、本村貴志、二宮彰紀、阿部隆之、武富紹信、前原喜彦、松浦善治: IL28B遺伝子多型と肝移植後のインターフェロン感受性、同上。
- 28 塩川 舞、福原崇介、後藤志典、二宮彰紀、谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: 不死化ヒト肝細胞株(Hc細胞)への患者血清由来HCVの感染、同上。
- 29 森田英嗣、藤田尚信、牛島廣治、松浦善治、吉森保: 細胞内膜輸送系を介したRNA非エンベロープウイルスの細胞外への放出、同上。
- 30 森石恆司、松浦善治: HCVによる脂質代謝障害の分子機序、同上。
- 31 温 暁玉、阿部隆之、久木原博、田鍬修平、森 嘉生、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の構築、同上。
- 32 鈴木亮介、斎藤憲司、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、同上。
- 33 阿部隆之、谷 英樹、森石恆司、松浦善治: 細胞内アネキシンはC型肝炎ウイルスの複製を制御する、同上。
- 34 加藤大志、森 嘉生、寒原裕登、要 祐喜、谷 英樹、阿部隆之、神谷 亘、森石恆司、松浦善治: 核小体蛋白質B23はC型肝炎ウイルスの複製を抑制する、同上。
- 35 松浦善治: C型肝炎ウイルス感染による肝細胞癌の発症に関与する宿主因子: 第33回日本分子生物学会年会、神戸、12月7日-10日, 2010.
- 36 Hiroshi Kukihara, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human vesicle-associated membrane protein-associated protein subtype C inhibits HCV replication. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, October 5-9, 2008.
- 37 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: HCV infection induces IP-10 production through the TLR signaling pathway. 同上。
- 38 Hideki Tani, Takayuki Izumi, Hiroto Kanbara, Yuuki Kaname, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Ceramide plays a crucial role on the entry of Japanese encephalitis virus. 同上。
- 39 Yoshinori Tanaka, Yoshio Mori, Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of an indicator cell line that detects the replication of HCV in sera from hepatitis C patients. 同上。
- 40 Kohji Moriishi and Yoshiharu

- Matsuura: Proteasome activator PA28g is required for efficient growth of hepatitis C virus. 同上。
- 41 Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Viral elimination by a selective expression of IRF7 in human hepatocytes infected with HCV. 第15回日本遺伝子治療学会、大阪、6月10日-12日, 2009.
- 42 Yoshio Mori, Tetsuo Yamashita, Naoyuki Miyazaki, Masato Yoshimura, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, R. Holland Cheng, Tomitake Tsukihara, and Yoshiharu Matsuura: Structure-based analysis of hepatitis E virus-like particle. The American Society for Virology, 28th Annual Meeting, The University of British Columbia, Vancouver, July 11-15, 2009.
- 43 Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with both HCV NS5A and Hsp90 and regulates replication of hepatitis C virus. 同上。
- 44 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Hyaluronan participates in the IP-10 induction in cells infected with HCV through an engagement of TLR2 and CD44, 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7, 2009.
- 45 Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Suppression of HCV replication in hepatocytes through a selective induction of IRF7. 同上。
- 46 Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma- and E6AP-dependent degradation of HCV core protein in the viral production. 同上。
- 47 Ryosuke Suzuki, Kenji Saito, Tomomi Ando, Koji Ishii, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Plasmid-based production of trans-complemented HCV particles: its use for functional analysis of NS2. 同上。
- 48 Hideki Aizaki, Mami Yamamoto, Koji Goto, Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada, Shigeeko Sato, Nobuhiro Takahashi, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV replication. 同上。
- 49 Hiroto Kambara, Shuhei Taguwa, Naonobu Fujita, Kohji Moriishi, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori, , and Yoshiharu Matsuura: Autophagy is required for cell survival in cells replicating hepatitis C virus. The American Society for Virology, 29th Annual Meeting, Montana State University, Montana, July 17-21, 2010.
- 50 Matsuura Yoshiharu: Host factors involved in the propagation and pathogenesis of HCV, 17thth International Meeting on HCV and Related Viruses. 横浜, 9月10日-14日, 2010.
- 51 Takashi Motomura, Akinobu Taketomi, Takasuke Fukuhara, Ken Shirabe, Yoshiharu Matsuura, and Yoshihiko Maehara: Association of IL28B genetic variation and hepatic ISGs expression in the outcome of IFN