

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

平成 20 年度

1. 論文発表

- 1) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR- α is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. *J Clin Invest* 2008;118:683-694.
- 2) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 2008;122:124-31.
- 3) Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus in Japan. *Hep Res* 2008;38:310-314.
- 4) Nagase Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, Kato T, Koike K, Suzuki M, Nishioka K, Iino S, Itoh F. Effect of treatment with interferon alpha-2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus. *Hepatol Res* 2008;38:252-258.
- 5) Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H,

Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular Basis for the Synergy between Alcohol and Hepatitis C Virus in Hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:S87-91.

- 6) Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;48:858-879.
- 7) Ishizaka N, Ishizaka Y, Seki G, Nagai R, Yamakado M, Koike K. Association between hepatitis B/C viral infection, chronic kidney disease and insulin resistance in individuals undergoing general health screening. *Hepatol Res* 2008;38:775-783.

2. 学会発表

- 1) Koike K: Steatosis, liver injury and hepatocarcinogenesis in HCV infection. *Hepatic Inflammation and Immunity* 2008, Galveston, 2008.
- 2) Abe K, Murakami K, Takamiya S, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Shoji I: Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding partners for HCV core protein. p210, 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, 2008.
 - 1) Yotsuyanagi H, Yamada N, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Itoh F, Iino S, Koike K. Hepatitis B virus splicing variants emerge and dominate in the immune clearance phase of

chronic hepatitis B. #677, 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Milan, 2008.

2) 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. #1071, 59TH Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Disease, San Francisco, 2008.

平成 21 年度

1. 論文発表

1) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Yamakado M, Nagai R. Impacts of changes in obesity parameters for the prediction of blood pressure change in Japanese individuals. *Kidney Blood Press Res* 2009;32:421-427.

2) 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* 2009;175:1515-1524.

3) 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* 2009;50:378-386.

4) Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Nishida K, Kato M, Sakai H, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis C in patients coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. *Hepatol Res* 2009;39:657-663.

5) Ishizaka Y, Ishizaka N, Tani M, Toda A, Toda EI, Koike K, Nagai R, Yamakado M. Association between changes in obesity parameters and incidence of chronic kidney disease in Japanese individuals. *Kidney Blood Press Res* 2009;32:141-149.

6) Murata M, Matsuzaki K, Yoshida K, Sekimoto G, Uemura Y, Sakaida N, Fujisawa J, Seki T, Koike K, Okazaki K. Hepatitis B virus X protein shifts hepatic Smad3-mediated signaling from tumor-suppression to oncogenesis in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009;49:1203-1217.

7) Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama

- T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y. A single amino acid of toll-like receptor 4 that is pivotal for its signaltransduction and subcellular localization. *J Biol Chem* 2009;284:3513-3520.
- 8) Ishizaka N, Ishizaka Y, Yamakado M, Toda E, Koike K, Nagai R. Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose tolerance test. *Atherosclerosis* 2009;204:619-623.
- 9) Koike K. Steatosis, Liver injury and hepatocarcinogenesis in hepatitis C viral infection. *J Gastroenterol* 2009;44supl:82-88.
- 10) Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics. *Biomed Chromatogr* 2009;23:480-487.
2. 学会発表
- 1) Shoji I, Abe K, Murakami K, Ishii K, Suzuki T, Wakita T, Miyamura T, Koike K, Hotta H. The HNRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein. p177, 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, 2009.
- 2) K. Moriya, H. Miyoshi, S. Shinzawa, H. Fujie, Y. Shintani, T. Tsutsumi, K. Koike: Branched chain amino acids ameliorate hepatic steatosis and insulin resistance in hepatitis C mouse model, p125, 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, 2009
- 3) Ohki T, Akahane M, Yamashiki N, Goto E, Enooku K, Sata T, Masuzaki R, Kondo Y, Tateishi R, Inoo S, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Ortomo K, Koike K, Omata M. A prospective randomized study to elucidate the efficacy of computed tomography with hepatic arteriography and arterial portography (CTA/P) as a pre-treatment examination among patients with small hepatocellular carcinoma: a preliminary report. #926, 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2009.
- 4) Tateishi R, Yoshida H, Sato T, Masuzaki R, Ohki T, Goto E, Enooku K, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Ortomo K, Koike K, Omata M. Proposal of surveillance program for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C using comprehensive scoring system and stratum specific likelihood ratio. #1756, 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2009.
- 5) Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inue Y, Nishkawa T, Watanabe N, Ikeda H, Koike K, Seyama Y, Kokudo N, Shibahara J, Shirataki H, Fujiwara K. Expression of alpha-taxilin may reflect malignant

- potential of hepatocellular carcinoma. #1776, 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2009.
- 6) K Koike. Animal models in HCC research. 3rd International Kobe Liver Symposium on HCC with a JSH-ILCA Joint Scientific Session, Kobe, 2009.
- 7) K Koike. HIV and HCV co-infection in Japan. US-Japan Joint AIDS-Hepatitis Meeting, Portland, USA, 2009.
- 8) 小池和彦. Virus associated ontogenesis Hepatocarcinogenesis and lipid metabolism in HCV infection. 第 68 回 日本癌学会総会. 2009. 横浜.

平成 22 年度

1. 論文発表

- 1) Watanabe S, Enomoto N, Koike K, Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M. Prolonged treatment with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin improves sustained virological response in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan. *Hepatol Res* 2010;40:135-44.
- 2) Tejima K, Masuzaki R, Ikeda H, Yoshida H, Tateishi R, Sugioka Y, Kume Y, Okano T, Iwai T, Gotoh H, Katoh S, Suzuki A, Koike Y, Yatomi Y, Omata M, Koike K. Thrombocytopenia is more severe in patients with advanced chronic hepatitis C than B with the same grade of liver stiffness and splenomegaly. *J*

Gastroenterol 2010;45:876-84.

- 3) Sakamoto A, Ishizaka Y, Toda EI, Nagai R, Koike K, Yamakado M, Ishizaka N. Impact of Changes in Obesity Parameters on Glucose Metabolism and Insulin Resistance Over a One-Year Period. *J Atheroscler Thromb* 2010.
- 4) Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inoue Y, Nishikawa T, Ikeda H, Seyama Y, Kokudo N, Shibahara J, Fukayama M, Koike K, Shirataki H, Fujiwara K. Expression of alpha-taxilin in hepatocellular carcinoma correlates with growth activity and malignant potential of the tumor. *Int J Oncol* 2010;37:1417-23.
- 5) Moriya K, Miyoshi H, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie H, Goto K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells. *J Med Virol* 2010;82:776-92.
- 6) Masuzaki R, Shiina S, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sugioka Y, Kondo Y, Goto T, Ikeda H, Omata M, Koike K. Utility of Contrast Enhanced Ultrasonography with Sonazoid in Radiofrequency Ablation for Hepatocellular Carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2010.
- 7) Koike K, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K. Lipid metabolism and liver disease in hepatitis C viral infection. *Oncology* 2010;78 Suppl 1:24-30.
- 8) Koike K, Moriya K, Matsuura Y. Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatol Res* 2010;40:69-82.

- 9) Kanamori H, Yuhashi K, Ohnishi S, Koike K, Kodama T. RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus binds to its coding region RNA stem-loop structure, 5BSL3.2, and its negative strand. *J Gen Virol* 2010;91:1207-12.
- 10) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Yamakado M, Koike K, Nagai R. Association between gamma-glutamyltransferase levels and insulin resistance according to alcohol consumption and number of cigarettes smoked. *J Atheroscler Thromb* 2010;17:476-85.
- 11) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda A, Tani M, Koike K, Yamakado M, Nagai R. Changes in waist circumference and body mass index in relation to changes in serum uric acid in Japanese individuals. *J Rheumatol* 2010;37:410-6.
- 12) Ishizaka N, Hongo M, Matsuzaki G, Furuta K, Saito K, Sakurai R, Sakamoto A, Koike K, Nagai R. Effects of the AT(1) receptor blocker losartan and the calcium channel blocker benidipine on the accumulation of lipids in the kidney of a rat model of metabolic syndrome. *Hypertens Res* 2010;33:263-8.
- 13) Ikeda H, Ohkawa R, Watanabe N, Nakamura K, Kume Y, Nakagawa H, Yoshida H, Okubo S, Yokota H, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Koike K, Yatomi Y. Plasma concentration of bioactive lipid mediator sphingosine 1-phosphate is reduced in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2010;411:765-70.
- 14) 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;85:520-4.
2. 学会発表
- 1) Masuzaki, R., R. Tateishi, S. Shiina, H. Yoshida, H. Nakagawa, T. Arano, K. Uchino, K. Enooku, E. Goto, Y. Kondo, T. Goto, Y. Sugioka, H. Ikeda, M. Omata, K. Koike. Prospective Risk Assessment for Hepatocellular Carcinoma Recurrence by Transient Elastography After Curative Radiofrequency Ablation. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). 2010. Viena, Austria.
- 2) Uchino, K., R. Tateishi, S. Shiina, T. Arano, K. Enooku, E. Goto, R. Masuzaki, H. Nakagawa, Y. Kondo, T. Goto, M. Omata, H. Yoshida, K. Koike. Clinical Features of Advanced Hepatocellular Carcinoma With Extrahepatic Metastasis. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). 2010. Vienna, Austria.
- 3) Arano T, Nakagawa H, Yoshida H, Tateishi, R., Uchino Y, Enooku K, T. Sato, R. Masuzaki, T. Ohki, E. Goto, Goto, R. Masuzaki, Y. Kondo, T. Goto, Shiina S, M. Omata, K. Koike. Association between serum adiponectin level and the risk for

hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.

4) Kojima K, Otsuka M, Takata A, Yoshikawa T, Kato N, Tateishi R, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. miRNA-122, a liver-specific miRNA, is a key regulator for bridging the clinical phenomena between alpha-feto-protein expression and biologically malignant phenotype in HCC. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.

5) Tanoue Y, Tomiya T, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Shirataki H, Ikeda H, Koike K, Fujiwara K. Insulin-like growth factor I stimulates proliferation and protein production in rat hepatocytes through an mTOR signaling pathway. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.

6) Takahashi H, Okuse C, Yamada N, Takatsu Y, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Suzuki M, Koike K, Itoh F. Hepatitis B virus clearance in acute hepatitis is prolonged in genotype A HBV infection. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.

7) Tsutsumi T, Goto K, Fujinaga H, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Suzuki T, Koike K. Association of the substitution of amino acid 75 in the hepatitis virus core region with IL-8 upregulation and hepatocarcinogenesis. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, 2010.

8) Li W, Muroyama R, Hu Z, Kawatari N, Goto T, Chang JH, Yoshida H, Omata M, Koike K, Kato N. Amino acid substitutions in genotype 1b HCV core protein and response to PEG-IFN/RBV treatment. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, 2010.

9) Yuhashi K, Kodama T, Koike K, Kanamori H. Identification of hepatic mRNA 3' -untranslated regions that bind to HCV NS5B. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, 2010.

10) 工藤洋太郎, 立石敬介, 田中康雄, 山本恵介, 金井文彦, 小俣政男, 小池和彦. 脂肪肝から肝発がんを呈する新たなモデルマウスの作成と解析. 第 47 回日本臨床分子医学会学術総会. 2010. 東京.

11) 大塚基之, 高田朱弥, 小島健太郎, 前田慎, 立石敬介, 池上恒雄, 平田善裕, 建石良介, 椎名秀一朗, 吉田晴彦, 小池和彦. microRNA machinery 構成因子 DDX20 の発現低下に伴う microRNA 機能の減弱によって惹起される肝発癌経路の同定. 第 47 回日

本臨床分子医学会学術総会. 2010. 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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シスの探索

分担研究者 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

研究要旨 HCV 感染・増殖には、細胞内の宿主タンパク質の関与が報告されている。宿主タンパク質の中でも、細胞内シグナル伝達情報制御機構の中心的役割を担うプロテインカイネーシスは、タンパク質のリン酸化を通じて、タンパク質輸送や転写・複製機構を制御していることから、HCV はそのリン酸化を通じてタンパク質輸送などの宿主細胞内機能を利用しているものと想像されている。本研究では、310 種類からなるヒトプロテインカイネーシスライブラリーを用いて、HCV プロテアーゼで切断される宿主プロテインカイネーシスの探索を行い、6 種類のヒトプロテインカイネーシスが切断されることを見出し、HCV 感染細胞内での切断および HCV プロテアーゼにより切断されたフォームが HCV 複製を亢進することを明らかにした。本研究で見出した切断型宿主プロテインカイネーシスは新しい創薬ターゲットになるものと期待できる。

A. 研究目的

近年の報告から、ウイルスは細胞内の宿主タンパク質を利用し、複製・増殖を行っていることがわかってきている。その中で、最近、HCV タンパク質が細胞内で宿主プロテインカイネーシスによりリン酸化されることがわかってきた。このリン酸化は、HCV 複製機構における重要な働きをしていること、鈴木らの報告から明らかとなった。また、我々の HIV プロテアーゼを用いた最近の研究により、HIV プロテアーゼの宿主プロテインカイネーシスの切断が活性化を引き起こし、HIV ゲノムの複製を誘導することがわかった。これらの事は、HCV プロテアーゼにより切断されるプロテインカイネーシスの網羅的な探索は、細胞内での HCV

増殖機構や細胞がもつ抗 HCV 機構の解明につながるものと思われる。しかし、ヒトゲノム上には 518 種類のプロテインカイネーシスがコードされており、細胞内から HCV プロテアーゼで切断されるプロテインカイネーシスの探索することは不可能である。そこで、本研究では我々が開発してきた真核型コムギ無細胞蛋白質合成系を用いてプロテインカイネーシスライブラリーの構築を行い、in vitro で HCV プロテアーゼにより切断されるプロテインカイネーシスの探索を可能とする系の開発と、HCV プロテアーゼの切断により HCV 感染・複製に利用される宿主プロテインカイネーシスの同定を目指した。

B. 研究方法

MGC と FANTOM クローン、そして我々の研究室でクローニングされた合計 390 種類の完全長プロテインカイネース遺伝子を鋳型に、コムギ無細胞タンパク質合成系によりプロテインカイネースタンパク質ライブラリーの構築を行った。また、N 末端に FLAG 配列、C 末端にビオチン化に必要な配列を付加し、ビオチンリガーゼ BirA とビオチンを上記無細胞系に加えることにより、ビオチンでラベルした 310 種類のプロテインカイネースタンパク質を得た。切断反応は、AlphaScreen 法により検出した。同定した 6 種類のプロテインカイネース遺伝子を用いて、動物細胞での発現ベクターに組み込んだ。HCV プロテアーゼによる細胞内切断は、HEK293T 細胞株に、HCV プロテアーゼと同定したプロテインカイネースを共発現させて行った。また、それらの切断部位は、CS 部位を中心にアラニン変異体解析を行って同定した。感染細胞内のプロテインカイネース切断実験には、国立感染症研究所の脇田先生のグループが開発した JFH-1 クローンおよび Huh7 細胞を用いた感染実験系を用いた。また、細胞内タンパク質の検出には、V5 タグに対する抗体を用いたイムノブロットングにより行った。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所研究等倫理規程を遵守し、倫理委員会の承認の下に患者様に適切な説明の上、同意を得た臨床検体のみを研究に使用する。特に、患者様個人

情報の管理には万全を期し、本研究はタンパクレベルの研究でありヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成 13 年告示）の対象外であるが、それに準じて連結可能匿名化を行い、本研究に関与しない個人情報管理者が個人情報を管理するようにする。

C. 研究結果

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作成した 390 種類の完全長ビオチン化プロテインカイネースライブラリーから、*in vitro* で 6 種類の HCV プロテアーゼで切断されるヒトプロテインカイネースを見出し、それらが、HCV プロテアーゼ過剰発現細胞内で切断されることが分かった。また、それらの切断部位を同定することに成功し、それらは HCV プロテアーゼの切断部位として報告されている CS (システインおよびセリン) 残基の間であった。また、HCV 感染細胞において、プロテインカイネース SGK495 が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わかった。また、別のプロテインカイネースにおいても、細胞内の HCV 複製の“場”である膜マイクロドメインの一種である lipid raft 上に局在することが分かった。

D. 考察

本研究は、コムギ無細胞タンパク質合成技術を基盤に、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

スタンパク質の網羅的探索を行ったものである。その結果、6種類の宿主プロテインカイナーゼが細胞内で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ナーゼを切断し、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。またこのプロテインカイナーゼは、lipid raft上に局在しており、HCV複製における積極的な役割が注目される。また、見出された6種類のプロテインカイナーゼの中には、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、カイナーゼ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ナーゼも、lipid raftに局在することが見出され、カイナーゼドメインと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。本研究のHCVプロテアーゼの基質宿主タンパク質を網羅的に同定するというアプローチは、世界に先駆けたものである。今回はHCV感染・複製に関与する細胞内シグナル伝達系を明らかにするためにターゲットをプロテインカイナーゼに絞って行ったが、別種のタンパク質ライブラリーをターゲットにすることで、新たな宿主タンパク質を

同定することが可能である。

E. 結論

本研究により、世界に先駆けて390種のプロテインライブラリーの中から、HCVプロテアーゼで切断される6種類の宿主プロテインカイナーゼを同定することに成功した。その中には、その切断されたプロテインカイナーゼは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ナーゼ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 CN, Muroi A, Maffei M E, Yoshioka H, Sawasaki T, Arimura G, Ca²⁺-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, Bertea 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.
- 12) Takai K, Sawasaki T, Endo Y. Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. *Nature Protocols* 2010, 5(2): 227-38.
- 13) Shimada H, Hirai K, Simamura E, Hatta T, Iwakiri H, Mizuki K, Hatta T, Sawasaki T, Matsunaga S, Endo Y, Shimizu S. Paraquat toxicity induced by voltage-dependent anion channel 1 acting as an NADH-dependent oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(42): 28642-9.
- 14) Nozawa A, Matsubara Y, Tanaka Y, Takahashi H, Akagi T, Seki M, Shinozaki K, Endo Y, Sawasaki T. Construction of a protein library of arabidopsis transcription factors using a wheat cell-free protein production system and its application for DNA binding analysis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2009, 73(7): 1661-4.
- 15) Igawa T, Fujiwara M, Takahashi H, Sawasaki T, Endo Y, Seki M, Shinozaki K, Fukao Y, Yanagawa Y. Isolation and identification of ubiquitin-related proteins from Arabidopsis seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(11):3067- 73.
- 16) Takahashi H, Nozawa A, Seki M, Shinozaki K, Endo Y, Sawasaki T. A simple and high-sensitivity method for analysis of ubiquitination and polyubiquitination based on wheat cell-free protein synthesis. *BMC Plant Biology*, 2009, 9: art. no. 39
- 17) Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. *FEBS Letters*, 2009 583(8): 1243-50.
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シスの比較. 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. 無細胞基盤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
- 19) Sawasaki T, Endo Y, Morishita R, Takai K, Membrane protein production and purification without affinity tag based on wheat germ cell-free system. Keystone Symposia Structural Genomics: Expanding the

- Horizons of Structural Biology (J2). January 8-13, 2010, Colorado, USA.
- 20) Takeo S, Sawasaki T, Torii M, Sattabongkot J, Endo Y, Tsuboi T, Functional production of malarial parasites' proteins with wheat germcell-free system. Keystone Symposia Structural Genomics: Expanding the Horizons of Structural Biology (J2). January 8-13, 2010, Colorado, USA.
- 21) 船橋一世、澤崎達也、遠藤弥重太. Screening of human protein kinases binding to SOCS1 protein 第32回日本分子生物学会年会. 横浜、2009年12月9-12日
- 22) 船橋一世、澤崎達也、遠藤弥重太. Screening of human protein kinases binding to SOCS1 protein 第32回日本分子生物学会年会. 横浜、2009年12月9-12日
- 23) 清水康平、田所大典、高濱正吉、遠藤弥重太、澤崎達也. Cell biological analysis of TRB3 cleaved by caspase-3. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜、2009年12月9-12日
- 24) 橋本季明、吉田茂生、澤崎達也、遠藤弥重太、吉川潮、鎌田真司. Screening of novel caspase substrates functioning at mitotic phase. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜、2009年12月9-12日
- 25) 熱田翠薫、吉田篤司、吉崎慎二、八島さやか、松永智子、澤崎達也、梁明秀. Production and characterization of new monoclonal antibodies against human PD-1 that inhibit PD-1/PD-L1 interaction. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜、2009年12月9-12日
- 26) 田所大典、高濱正吉、澤崎達也、遠藤弥重太. Complementary screening of Caspase-3-cleaved kinome and the cell biological analysis of the new substances. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜、2009年12月9-12日
- 27) 高濱正吉、澤崎達也、岡山明子、赤木達也、遠藤弥重太、山本直樹、梁明秀. 細胞極性抑制キナーゼ aPKCによるHIV-1 Gagのリン酸化及びその生理的意義. 第23回日本エイズ学会学術集会・総会. 名古屋、2009年11月26-28日
- 28) 正岡崇志、梁明秀、巽正志、杉浦互、松永智子、森下了、澤崎達也、山本直樹. 酵素活性を指標とした新規のHIVプロテアーゼ阻害剤耐性検査法の基盤技術の開発. 第23回日本エイズ学会学術集会・総会. 名古屋、2009年11月26-28日
- 29) 田所大典、高濱正吉、澤崎達也、

- 遠藤弥重太. カスパーゼ3により切断されるプロテインカイネーゼの網羅的探索、及び新規基質の細胞生物学的解析. 第4回無細胞生命科学研究会. 岐阜、2009年11月16-17日
- 30) 清水康平、田所大典、高濱正吉、澤崎達也、遠藤弥重太. Caspase-3によるTRB3切断の細胞生物学的解析. 第4回無細胞生命科学研究会. 岐阜、2009年11月16-17日
- 31) Matsuoka K, Komori H, Nose M, Endo Y, Sawasaki T. New Screening Method for Autoantigen Protein Based on Biotinylated Protein Library. HUP02009. September 26-30, 2009, The Westin HarbourCastle, Toronto.
- 32) 高橋宏隆、澤崎達也、遠藤弥重太. In vitro high-throughput screening of host protein kinases binding to HIV-1 accessory proteins, Vif, Vpu and Vpr, based on wheat cell-free system. 第10回熊本エイズセミナー・エイズグローバルCOE合同国際シンポジウム. 熊本、2009年9月28-29日
- 33) 高濱正吉、澤崎達也、遠藤弥重太. Atypical protein kinase C positively regulates the Vpr incorporation into HIV-1 particles by phosphorylating Gag p6. 第10回熊本エイズセミナー・エイズグローバルCOE合同国際シンポジウム. 熊本、2009年9月28-29日
- 34) Chidananda Nagamangala Kanchiswamy、高橋宏隆、Massimo Maffei、Wilhelm Boland、高林純示、澤崎達也、有村源一郎. 被食誘導遺伝子の発現制御に関するシロイヌナズナ calcium-dependent protein kinaseの同定. 第50回日本植物生理学会年会. 名古屋、2009年3月23-24日
- 35) 高橋宏隆、関原明、篠崎一雄、遠藤弥重太、澤崎達也. コムギ無細胞系を用いたモデル植物におけるユビキチン化経路探索法の構築. 第50回日本植物生理学会年会. 名古屋、2009年3月23-24日
- 36) 加藤晃、清水正則、高橋宏隆、澤崎達也、遠藤弥重太、関原明、篠崎一雄、小林裕和. 高等植物の σ 因子をリン酸化するタンパク質キナーゼの探索. 第50回日本植物生理学会年会. 名古屋、2009年3月23-24日
- 37) 松岡和弘、小森浩章、長岡亜紀子、坪井敬文、斉藤知行、能勢真人、青木一郎、澤崎達也、遠藤弥重太. コムギ無細胞系を基盤としたタンパク質ライブラリーを用いた関節リウマチにおける自己抗原タンパク質の網羅的な解析.

第3回無細胞生命科学研究会.
弘前、2009年3月16-17日

- 38) 野澤彰、澤崎達也、小笠原富夫、
松永智子、岩崎隆宏、遠藤弥重太.
コムギ無細胞系を用いた膜タン
パク質生産法の開発. 第3回
無細胞生命科学研究会. 弘前大
学、2009年3月16-17日
- 39) 松永智子、中川直樹、澤崎達也、
竹尾暁、坪井敬文、遠藤弥重太.
自己切断を利用した蛋白質精製
ベクターの開発. 第3回無細
胞生命科学研究会. 弘前大学、
2009年3月16-17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、C型肝炎の慢性化、肝硬変、肝がんへの進展と宿主免疫系の関与を分子機構として解明することを本研究で提案した。NK細胞、CTL誘導に到る自然免疫応答をKOマウスで解明した。

A. 研究目的

HCV 感染細胞が宿主免疫を起動する機構を解明し、肝炎の劇症化、肝硬変、肝がんへの免疫系の関与を科学的に検証する。HCV は肝実質細胞を標的とするが樹状細胞には殆ど感染せずHCV RNAの貪食が樹状細胞活性化に関与すること (Ebihara et al., Hepatology 2008)、HCV蛋白と自然免疫系の分子間応答が感染成立に寄与しうること (Oshiumi et al., PLoS ONE, 2010)、が判明した。本研究ではこれらを受けて、免疫応答が持続するならそのメカニズムを解明し肝病変の形成に如何に関わるかをマウスの培養系とpolyI:C, HCV ウイルス株を主に用いて検討する。

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^{-/-}, TICAM-1^{-/-}, IPS-1^{-/-},

IRF-3^{-/-}, IRF-7^{-/-}, IFNAR^{-/-} である。MyD88^{-/-}は審良研から、IRF-3^{-/-}, IRF-7^{-/-}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) 樹状細胞 (mDC) の外因性IFN誘導経路 (TICAM-1経路) がウイルスRNAを取り込むことによってNKドライブ活性を発現することを明らかにした (Hepatology 2008)。このmDC-NK活性化を担当するmDC上の膜分子 (INAM) の同定に成功した (J Exp Med 2010)。さらに INAMには腫瘍浸潤マクロファージを好がんから抗がん環境に変換する機能があることを示唆した (submitted)。
(2) がんの局所炎症巣形成にHCV感染細胞の傷害と分子遊離が重要となる。この観点から肝実質細胞のウイルス複製を促進する分

子DDX3を同定した (Eur J Immunol 2010)。驚くべきことにこの分子はIPS-1結合分子でIFN誘導を促進するが、コア蛋白の存在下でIPS-1複合体から外れてウイルス複製に向かうことが示された (PLoS ONE 2010)。同様にRIG-Iの必須cofactor Riplet を発見した (J Biol Chem 2009, Cell host microbe 2010)。

(3) 樹状細胞は種々のエフェクター細胞を活性化するが、mDCのIFN誘導経路がHCV由来のRNAで活性化すると脾臓などでNK, CTLの誘導が高まることが示された。これらの宿主応答には樹状細胞のTICAM-1 経路が最も強く関与する。

D. 考察

本研究でマウス樹状細胞のTICAM-1 経路がウイルスdsRNA依存性の細胞性免疫応答に強く関与することが判明した。IPS-1経路はウイルスRNAを検知してtype I IFNを誘導する細胞質内経路として重要だが、NK, CTL誘導への関与は弱い。マウスのHCV感染細胞系は漸く達成できる目処が立ち、今後実際の細胞感染系、ひいてはマウスモデル系を用いて顕彰が可能になる。

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。HCVの病態において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

E. 結論

HCVの誘起する肝炎、肝がんにはinterferon系を含む宿主自然免疫機構の応答異常が基盤にある。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。

G. 研究発表

1. 論文発表

別紙参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

- 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- α 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. To gashi, T. Seya, K. Onoé, and K. Iwabuchi. 2010. Dendritic cell-derived TNF- α is responsible for development of IL-10-producing CD4⁺ 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- β 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- β 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- β -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- β -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. Fuj