

- imoto, K. Fukase, T. Akazawa, N. Inoue, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Failure of mycoplasma lipoprotein MALP-2 to activate NK cells through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* (in press).
- Miyashita, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. The SKI2-related helicase DDX60 is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Mol. Cell. Biol.* (in press)
- Seya, T., H. Shime, T. Ebihara, H. Oshiumi, and M. Matsumoto. 2010. Pattern-recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. *Cancer Sci.* 101: 313-320 (review).
- Seya, T., 2010. Innate immunity and vaccine. *Vaccine* 28: 8041-8042. (preface)
- Matsumoto, M., H. Oshiumi, and T. Seya. 2010. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev. Med. Virol.* (in press) (review).
- Higuchi, M., A. Matsuo, M. Shingai, A. Ishii, K. Funami, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Combinational recognition of bacterial lipoproteins and peptidoglycan by chicken Toll-like receptor 2 subfamily. *Dev. Comp. Immunol.* 32: 147-155.
- Bas, S., L. Neff, M. Vuillet, U. Spenato, T. Seya, M. Matsumoto, and C. Gabay. 2008. The proinflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14. *J. Immunol.* 180: 1158-1168.
- Shime, H., M. Yabu, T. Akazawa, K. Kodama, M. Matsumoto, T. Seya and N. Inoue. 2008. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23-IL-17 proinflammatory pathway. *J. Immunol.* 180: 7175-7183.
- Matsuo, A., H. Oshiumi, T. Tsujita, H. Mitani, H. Kasai, M. Yoshimizu, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *J. Immunol.* 181: 3474-3485.
- Shingai, M., M. Azuma, T. Ebihara, M. Sasai, K. Funami, M. Ayata, H. Ogura, H. Tsutsumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated IFN-beta induction. *Int. Immunol.* 20: 1169-1180.
- Nakamura, M., K. Funami, A. Komori, T. Yokoyama, Y. Aiba, A. Araki, Y. Takii, M. Ito, M. Matsuyama, M. Koyabu, K. Migita, K. Taniguchi, H. Fujioka, H. Yatsushashi, M. Matsumoto, H. Ishibashi, and T. Seya. 2008. Increased expression of Toll-like receptor 3 in intrahepatic biliary epithelial cells at sites of ductular reaction in diseased livers. *Hepatology Int.* 2: 222-230.
- Ebihara, T., M. Shingai, M. Matsumoto, T. Wakita, and T. Seya. 2008. Hepatitis C virus (HCV)-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology* 48: 48-58.
- Funami K., M. Sasai, H. Oshiumi, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. Homo-oligomerization is essential for Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor molecule-1-mediated NF-kappa B and interferon regulatory factor-3 activation. *J. Biol. Chem.* 283: 18283-18291.
- Fukuda, K., T. Watanabe, T. Tokisue, T. Tsujita, S. Nishikawa, T. Hasegawa, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. Modulation of Double-stranded RNA Recognition by the N-terminal Histidine-rich Region of the Human Toll-like Receptor 3. *J. Biol. Chem.* 283: 22787-22794.
- Hirata, N., Y. Yanagawa, T. Ebihara, T. Seya, S. Uematsu, S. Akira, F. Hayashi, K. Iwabuchi, and K. Onoe. 2008. Selective synergy in anti-inflammatory cytokine production upon cooperated signaling via TLR4 and TLR 2 in murine conventional dendritic cells. *Mol. Immunol.* 45: 2734-2742.
- Itoh, K., A. Watanabe, K. Funami, T. Seya,

- and M. Matsumoto, 2008. The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN- $\beta$  production. *J. Immunol.* 181: 5522-5529.
- Matsumoto, M., and T. Seya. 2008. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 805-812. (review)
- Seya, T. 2008. Preface: Toll-like receptor and pattern sensing fore voking immune response. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 779-781. (preface)
- Oshiumi, H., A. Matsuo, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Pan-vertebrate Toll-like receptors during evolution. *Curr. Genomics* 9: 488-493 (Review).
- Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya. 2009. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- $\beta$  induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* 284: 807-817.
- Wu, J. D., C. L. Atteridge, X. J. Wang, T. Seya, and S. R. Plymate. 2009. Obstructing shedding of the immune stimulatory MHC class I chain-related gene B prevents tumor formation. *Clin. Cancer Res.* 15: 632-640.
- Oshiumi, H., Y. Suzuki, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Regulator of Complement Activation (RCA) gene cluster in *Xenopus tropicalis*. *Immunogenetics* 61: 371-384.
- Akao, Y., T. Ebihara, H. Masuda, Y. Saeki, K. Hazeki, O. Hazeki, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. *Cancer Sci.* 100: 1494-1501.
- Fujimoto, Y., M. Hashimoto, M. Furuyashiki, M. Katsumoto, T. Seya, Y. Suda, and K. Fukase. 2009. Innate Immunostimulatory lipopeptides of *Staphylococcus aureus* as TLR2 ligands; Prediction with mRNA expression, chemical synthesis and immunostimulatory activities. *CHEM-BIO-chem.* 10: 2311-2315.
- Yasukawa, K., H. Oshiumi, M. Takeda, Y. Yanagi, T. Seya, S. Kawabata and T. Koshiba. 2009. Mitofusin 2, a mitochondrial fusion mediator, acts as a negative regulator for mitochondrial antiviral signaling. *Science Signaling.* 2(84): ra47.
- Takaki, H., H. Oshiumi, T. Kawanishi, M. Sasaki, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Cytoplasmic oligomerized TICAM-1 recruits nuclear BS69 to enhance type I interferon induction. *Eur. J. Immunol.* 39: 3469-3476.
- Watanabe, T., K. Ito, M. Matsumoto, T. Seya, K. Hatakeyama, S. Nishikawa, T. Hasegawa, and K. Fukuda. 2009. Isolation and Characterization of RNA aptamers specific for the human Toll-like receptor 3 ectodomain. *Viva Origino.* 37: 10-18.
- Iwakiri, D., L. Zhou, M. Samanta, M. Matsumoto, T. Ebihara, T. Seya, S. Imai, M. Fujieda, K. Kawa, and K. Takada. 2009. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J. Exp. Med.* 206: 2091-2099.
- Kodama, K., M. Higashiyama, K. Takami, K. Oda, J. Okami, J. Maeda, T. Akazawa, M. Matsumoto, T. Seya, M. Wada, A. Hayashi, and K. Toyoshima. 2009. Innate immune therapy with a BCG cell wall skeleton for lung cancer: a case presentation and a case control study. *Surgery Today.* 39: 194-200.
- Seya, T., M. Matsumoto, T. Ebihara, and H. Oshiumi. 2009. Functional evolution of the TICAM-1 (TRIF) pathway for extrinsic RNA sensing. *Immunol. Rev.* 227: 44-53 (review).
- Seya, T., and M. Matsumoto. 2009. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy for cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 58:1175-1184 (review).
- Ebihara, T. M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Dendritic cell/NK cell interaction in RNA virus infection. *Curr. Immunol. Rev.* 5: 200-207 (review).

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

実験モデルの開発に関する研究

研究分担者 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。従って、本来の HCV 生活環を反映しているかどうかの検証システムが必要である。本研究では HuH-7 細胞株とは異なるヒト培養細胞株を用いた HCV の複製増殖システムを開発して HuH-7 由来の HCV 複製増殖システムで得られている結果と比較することを目的として研究を行い、3年間で以下に示すような成果を得た。（1）ヒト肝癌細胞株 Li23 由来で全長 HCV-RNA（遺伝子型 1b の HCV-0 株）の複製や感染性の JFH-1 株 HCV の産生が効率良く起こるクローン化細胞株を樹立した。これらの細胞株を用いて抗 HCV 活性を定量的に評価できる簡便なアッセイシステムを開発した（2）Li23 由来のアッセイシステムが、従来の HuH-7 由来のアッセイシステムでは困難であったリバビリンの抗 HCV 活性を評価できることを見出した。リバビリンの抗 HCV 活性は、リバビリンがインシンーリン酸デハイドロゲナーゼを阻害し、細胞内の GTP 濃度を減少させることに起因していることを明らかにした（3）Li23 由来のアッセイシステムと HuH-7 由来のアッセイシステムを用いて、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 活性の再評価を行った。その結果、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

感染性のある C 型肝炎ウイルス（HCV）を培養細胞レベルで産生増殖させることは長らく困難を極めていたものの 2005 年に遺伝子型 2a の JFH-1 株 HCV が登場して HCV の複

製に関する研究が急速に進展した。しかしながら、不思議なことに JFH-1 株 HCV を効率よくかつ持続的に複製できる培養細胞はヒト肝癌細胞株である HuH-7 由来の特殊な細胞クローンに限られており、その理

由も明らかになっていない。従って、これまでに得られた多くの研究成果は HuH-7 細胞に限定されたもので、本来の HCV の複製増殖機構によるものではない可能性がある。

本研究では、この疑問点を追求するために HuH-7 以外のヒト培養細胞株を用いた HCV 複製増殖システムを開発して、HuH-7 由来の HCV 複製増殖システムで得られている結果と比較することを目的とした。

## B. 研究方法

### (1) Li23 細胞株を用いた HCV 複製増殖システムの開発

NS3 と NS5A 領域に Q1112R、K1609E 及び S2200R 或は Q1112R、P1115L 及び S2200R の変異を有する HCV レプリコン RNA (ON/3-5B/QR, KE, SR および ON/3-5B/QR, PL, SR) を様々なヒト肝培養細胞にエレクトロポレーション法により導入した。G418 存在下で 3 週間培養して G418 耐性のコロニー (細胞株化できたものは HCV レプリコン複製細胞と呼ばれている) を作成させた。

NS3 領域に Q1112R と K1609E 及び NS5A 領域に S2200R の変異を有する全長 HCV RNA (ON/C-5B/QR, KE, SR) を HCV レプリコン複製細胞の治癒細胞 (インターフェロン (IFN) - $\gamma$  を添加して細胞から HCV レプリコンを排除した細胞) にエレクトロポレーション法により導入した。G418 存在下で 3 週間培養して G418 耐性のコロニーを作成させた。得られたコロ

ニーをそれぞれ細胞株化した。

レニラルシフェラーゼを発現でき NS3 領域に Q1112R と K1609E 及び NS5A 領域に S2200R の変異を有する全長 HCV RNA (ORN/C-5B/QR, KE, SR) を全長 HCV RNA 複製細胞の治癒細胞にエレクトロポレーション法により導入した。G418 存在下で 3 週間培養して G418 耐性のコロニーを作成させた。得られたコロニーをそれぞれ細胞株化した。

各種化合物の抗 HCV 活性の評価については、細胞 (24 ウェルプレート) に薬剤 (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化合物の 50% 阻害濃度 (EC50) を算出した。

In vitro で合成した HCV-JFH-1 RNA を HuH-7 由来のクローン化 RSc 細胞にエレクトロポレーション法により導入して感染性 HCV 粒子を産生させた。1 週間後に培養上清 (0.2 mm フィルターにて濾過後、低速遠心にて細胞残査を取り除いた) をとり、検定する各種ヒト培養細胞に添加して感染させた。1 週間後に再び上述した方法により産生した HCV を含む培養上清を調製して再び未感染の細胞に添加して感染させた。その後、1 週間置きに培養上清および細胞をサンプリングした。培養上清については、HCV コアのタンパク質量を ELISA で定量し、細胞については、細胞内の HCV RNA を定量的 RT-PCR 法により定量した。

細胞由来の各種 mRNA や HCV-RNA の

発現レベルをを調べるための RT-PCR や定量的 RT-PCR およびノーザンブロット解析、細胞由来の各種タンパク質や HCV タンパク質の発現レベルを調べるためのウェスタンブロット法および HCV タンパク質や二本鎖 RNA (dsRNA) を検出するための免疫蛍光染色は常法に従って行った。

(2) Li23 由来の細胞アッセイ系で抗 HCV 活性が見いだされたリバビリンの作用機序の解析

抗 HCV 活性のアッセイ用の細胞 (24 ウェルプレート) にリバビリン等の化合物 (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リバビリン等化合物の 50% 阻害濃度 (EC50) を算出した。

各種抗体を用いたウェスタンブロット解析や Total RNA を用いた RT-PCR 解析は常法に従って行った。

HCV 感染実験については、以下のような手順で行った。JFH1 株 HCV を感染させて 5 日目の RSc 細胞の培養上清を 0.2 mm のフィルターで濾過したものを感染性 HCV 粒子のソースとした。このソース (MOI が 0.05 から 0.1) を ORL8c 或は RSc 細胞に感染させた。数日間培養した細胞にリバビリンを添加して、その抗 HCV 活性は、HCV コアタンパク質についてのウェスタンブロット解析および HCV-RNA についての定量的 RT-PCR 解析によって評価した。

(3) 異なる細胞株由来のアッセイ系を用いた化合物の抗 HCV 活性評価  
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

(1) Li23 細胞株を用いた HCV 複製増殖システムの開発

HuH-7 由来のクローン化細胞を用いた全長 HCV-RNA 複製システムの開発過程で我々は、非構造領域 (NS3) 3 や NS5A に生じた適応変異の特殊な組み合わせが HCV-RNA の複製効率を

著しく上昇させることを見出した。そこで、このような適応変異の組み合わせを有する HCV レプリコン RNA や全長 HCV-RNA を HuH-7 細胞とは異なる細胞に導入した場合でも HCV-RNA の複製が起こるのではないかと考え、様々なヒト培養細胞株を用いて HCV レプリコン複製細胞株の樹立を試みた。

NS3 と NS5A 領域に適応変異を有する HCV レプリコン RNA (ON/3-5B/QR, KE, SR 及び ON/3-5B/QR, PL, SR) を様々なヒト肝培養細胞にエレクトロポレーション法により導入し、G418 耐性のコロニーの出現を待ったが、ほとんどの場合、期待したようなコロニーを得ることは出来なかった。しかしながら、唯一ヒト肝癌細胞株 Li23 において多数の G418 耐性コロニーが得られた。得られたコロニーをミックスしてポリクローン化細胞 s0L を得た (0 は HCV-0 株で、L は Li23 細胞由来という意味)。

次の段階として、IFN-g によりレプリコン RNA を s0L 細胞から完全に排除した治癒細胞 (s0Lc) を作成した。この s0Lc 細胞に *in vitro* で合成した全長 HCV RNA (ON/C-5B/QR, KE, SR) をエレクトロポレーション法にて導入し、G418 耐性のコロニーを得た。最終的に 14 種類のクローン化細胞株を樹立し OL1~OL14 細胞と命名した。これらの細胞内における HCV RNA 量を定量的 RT-PCR 法により調べ、HCV RNA 量が

多い OL8、OL11 及び OL14 細胞を以後の解析に使用した。これらの細胞について、HCV-RNA のノーザンブロット解析や HCV タンパク質のウェスタンブロット解析により OL8 と OL11 細胞は HuH-7 由来の全長 HCV RNA 複製細胞である 0 細胞と比較してほぼ同程度か若干低い程度であることが分かった。しかしながら、OL14 細胞はかなり低いことが分かった。OL8、OL11 および OL14 細胞由来の全長 HCV-RNA を RT-PCR 法により増幅させて、塩基配列を決定した。その結果、新たな適応変異の出現は認められなかった。以上の結果から、OL8 と OL11 細胞を以後の実験に使用する細胞株として選択し、それぞれの治癒細胞 (OL8c と OL11c) を IFN-g を添加することにより作成した。

作成した OL8c と OL11c 細胞に *in vitro* で合成した ORN/C-5B/QR, KE, SR (レニラルシフェラーゼを発現する全長 HCV RNA) をエレクトロポレーション法により導入し、G418 耐性コロニーを得た。その結果、OL8c 細胞から G418 耐性コロニーとして最終的に 9 クローン、OL11c 細胞からは 16 クローン得られた。

それぞれ得られたクローン化細胞における HCV RNA 量を定量的 RT-PCR 法により測定し、最も高い値が得られたクローンを選択してそれぞれ ORL8 細胞と ORL11 細胞と命名した。ORL8 細胞と ORL11 細胞における HCV RNA 量は 1 mg total RNA 当たり、そ

それぞれ  $8 \times 10^6$  コピーと  $4 \times 10^6$  コピーであった。ORL8 と ORL11 細胞については、ノーザンブロット解析により全長 HCV RNA に相当する 1.2 kb RNA を検出し、ウェスタンブロット解析により HCV タンパク質を検出した。その結果、ORL8 と ORL11 細胞は HuH-7 由来で抗 HCV 活性の評価のためのアッセイ系に使用されている OR6 細胞と比較すると発現レベルはやや低いものの、十分量の HCV タンパク質を発現していることが分かった。

次に得られた ORL8 や ORL11 細胞が抗 HCV 活性を評価するアッセイ系として使用されている OR6 細胞と同じようにアッセイ系として使用できるかどうかについて検討した。現在までに抗 HCV 活性が報告されている代表的なもの (IFN 製剤やスタチン剤など) について、ORL8、ORL11 および OR6 細胞を用いてそれぞれの抗 HCV 活性を測定し比較検討した。それぞれの化合物についての 50% 阻害濃度 (EC<sub>50</sub>) を算出して比較した。その結果、IFN- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、シクロスポリン、スタチン剤 (フルバスタチン、シンバスタチン、ローバスタチン、ピタバスタチン)、ミリオシンでは、ORL8 や ORL11 細胞の方が OR6 細胞より感受性が高く、逆に b-カロテンやゲルダナマイシンでは OR6 細胞の方が感受性が高いという結果になった。ORL8 や ORL11 細胞は OR6 細胞同様、非常に鋭敏なバイオセンサーの役割を持つ細胞であることが分

かった。

次に、ORL8c や ORL11c 細胞が感染性 HCV 粒子を産生させる能力を有するかどうかを検討した。現在汎用されている遺伝子型 2a の JFH-1 株 HCV を用いて検討した。HuH-7 由来の RSc 細胞から産生した感染性 HCV (HCVcc) を得られた RSc、ORL8c 或は ORL11c 細胞に感染させ、1 週間後に培養上清を再び未感染の RSc、ORL8c 或は ORL11c 細胞に感染させた。感染後 1 週間ごとに細胞 (HCV RNA の定量と HCV コア蛋白質の検出のため) と培養上清 (HCV コア蛋白質の定量のため) のサンプリングを行い、HCV の増殖レベルを調べた。その結果、RSc 細胞から産生された HCVcc は RSc、ORL8c および ORL11c 細胞のすべてに感染し、HCV 産生が効率よく起こることが分かった。しかしながら、ORL11c 細胞から産生された HCVcc は RSc 細胞には感染して増殖するものの、もう一度、未感染の ORL11c 細胞に感染させた場合ほとんど増殖しないことが分かった。これに反して、ORL8c 細胞から産生された HCVcc は RSc 細胞で増殖し、もう一度、未感染の ORL8c 細胞に感染させた場合でも増殖してくることが分かった。従って、少なくとも ORL8c 細胞においては HCV の生活環が再現されていることが示唆された。細胞内における HCV-RNA 量と培養上清における HCV コア蛋白質量については、RSc 細胞の方が ORL8c 細胞よりは数倍〜10 倍程度高かった。しかしなが

ら、ORL8c 細胞内の HCV-RNA は  $>10^7$  copies/mg total RNA 存在し、培養上清中の HCV コアタンパク質も  $>10^4$  fmol/L という値が得られたことから、少なくとも ORL8c 細胞においては感染性 HCVcc が効率よく産生されていることが示された。

(2) Li23 由来の細胞アッセイ系で抗 HCV 活性が見いだされたリバビリンの作用機序の解析

HuH-7 由来の OR6 アッセイ系では、リバビリンの EC50 は 100 mM 以上と抗 HCV 活性が非常に弱いのは対照的に、ORL8 や ORL11 アッセイ系ではリバビリンの EC50 値が、それぞれ 8.7 mM と 15.9 mM と予想外に低く、強い抗 HCV 活性を示すことを明らかにした。このような抗 HCV 活性の違いは、Core や NS5B に対する特異抗体を用いたウェスタンブロット解析によっても確認された。また、細胞の違いによるリバビリンの抗 HCV 活性の違いは、JFH1 株 HCV を感染させ HCV が増殖している状態においても観察された。

リバビリンが抗 HCV 活性を示す分子機序については、これまでに、RNA 変異源としての作用、インターフェロンシグナル伝達経路の活性化作用、イノシンーリン酸脱水素酵素 (IMPDH) の阻害による細胞内 GTP プールの減少効果、HCV の NS5B ポリメラーゼの活性阻害効果、T 細胞を介した免疫の亢進作用など、幾つも提唱されている。にも係わらず、現

在でも解明されていない。

本研究において開発した ORL8 や ORL11 アッセイ系ではリバビリンが HCV-RNA の複製を顕著に抑制した。従って、これらの細胞を用いることで、リバビリンの抗 HCV 活性の分子機序の解明ができるのではないかと考えた。そこで、これまでに提唱されている仮説のどれが、リバビリンの抗 HCV 活性に寄与しているかについて一つずつ検証を行った。

まず、リバビリンが IFN シグナル伝達系を亢進させるかどうかを検証した。ORL8 細胞に IFN- $\alpha$  (1, 10, 100IU/mL) 或はリバビリン (10, 25, 50, 100mM) を添加し、6 時間後に IFN 誘導遺伝子である ISG15 や IRF7 の発現が誘導されるかどうかを RT-PCR 法にて調べた。その結果、IFN- $\alpha$  については、1 IU/ml でも ISG15 や IRF7 の発現が誘導されたが、リバビリンでは 100mM の濃度でもまったく誘導されなかった。さらに、同じ濃度で、薬剤添加後 30 分で STAT1 のリン酸化が起こるかどうかについても比較検討した。その結果、IFN- $\alpha$  については、1 IU/ml でも STAT1 のリン酸化が観察されたが、リバビリンでは 100mM の濃度でも STAT1 のリン酸化はまったく観察されなかった。同様の結果は、HuH-7 由来の OR6 細胞や Huh7.5 細胞でも得られた。

次にリバビリンが酸化ストレス状態を亢進させて RNA 複製を抑制するかどうかを調べた。これまで、我々は、抗酸化剤であるビタミン E がシ



クロスポリン A や  $\beta$ -カロテンなどの抗 HCV 剤の活性をキャンセルする効果があることを報告している。そこで、リバビリンの抗 HCV 活性がビタミン E によりキャンセルされるかどうかを検討した。その結果、シクロスポリン A の抗 HCV 活性は 10 mM のビタミン E により著しくキャンセルされたが、リバビリンの抗 HCV 活性はビタミン E によってはキャンセルされなかった。

次に、リバビリンがプリン生合成経路におけるインシンーリン酸デハイドロゲナーゼ (IMPDH) の阻害剤として作用することにより HCV-RNA の複製を抑制するかどうかを調べた。ORL8 アッセイ系を用いて検討した結果、リバビリンの抗 HCV 活性はグアノシンの添加によりほぼ完全にキャンセルされることが分かった。同様の現象は、ORL11 アッセイ系においても観察された。これらの結果から、リバビリンの抗 HCV 活性は、主に IMPDH の阻害を介していることが示唆された。

### (3) 異なる細胞株由来のアッセイ系を用いた化合物の抗 HCV 活性評価

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 アッセイ系で再評価を行い、従来我々が使用していた HuH-7 由来の OR6 アッセイ系で得られた結果と比較した。その結果、多くの抗 HCV 剤に対して、

ORL8 や ORL11 アッセイ系は OR6 アッセイ系より高い感受性を示すことが分かった。その一方で、OR6 アッセイ系の方が高い感受性を示す抗 HCV 剤もあった。

これらの結果から、化合物の抗 HCV 活性をきちんと評価するためには、単独のアッセイ系ではなく、異なる由来の複数のアッセイ系を用いる必要があるのではないかと考えた。

そこで、我々はまず、PubMed 文献データベースから、抗 HCV 活性について報告されている化合物を検索することとした。抗 HCV 活性について HCV-RNA 複製系を用いた結果が報告されていたり、抗 HCV 活性があるのではないかと予想されている化合物で入手可能なものを 28 種類 (19 種類の合成化合物と 7 種類の植物抽出物由来の化合物を含む) を選択した。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。そして、我々が開発した HuH-7 由来の OR6 アッセイ系と Li23 由来の ORL8 アッセイ系を用いて抗 HCV 活性について評価を行った。また並行して、細胞毒性についても評価を行った。

評価の結果を既報の結果と比較した。その結果をもとに、評価した化合物を以下に示す 6 つのクラスに分類した。

[1] どちらか一方のアッセイ系で既報と同程度の EC50 値が得られた 7 化合物

[2] どちらか一方のアッセイ系で既報の 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系で既報の 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系で抗 HCV 活性が新たに見いだされた 4 化合物 [5] 両方のアッセイ系で抗 HCV 活性が認められなかった 3 化合物

[6] 両方のアッセイ系で HCV-RNA の複製を逆に増強させた 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。ただ、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-Azaauridine, Clemizole, Hemin, Isoliquiritigenin および Methotrexate の 7 種類で、既報から予想されたより高い抗 HCV 活性を示すことが分かった。ただ、6-Azaauridine については、既報に比べて細胞毒性が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、既報から予想されたより抗 HCV 活性が弱いことが分かった。

[4] に分類された化合物は 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。HCV コアタンパク質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

(1) Li23 細胞株を用いた HCV 複製増殖システムの開発

本研究においては、これまでの研究により得た適応変異の組み合わせ (Q1112R, K1609E 及び S2200R) によ

り HuH-7 細胞株以外の細胞株 (Li23) で全長 HCV-RNA 複製を伴うレポーターアッセイ系と JFH-1 株 HCVcc の産生系を初めて開発することができた。

現時点で、これらの適応変異の組み合わせがどのように Li23 細胞内での HCV-RNA の複製効率の向上に関与しているかについては不明である。現在でも HuH-7 由来の細胞だけが、HCV-RNA の複製に有利な環境を有している理由についてはよく分かっていない。本研究により HuH-7 とは異なる Li23 由来の細胞株が得られたことから、HuH-7 細胞との詳細な比較により RNA 複製に有用で両細胞に共通した宿主因子を抽出できる可能性がある。

本研究により Li23 由来の細胞株 ORL8 と ORL11 の樹立に成功し、化合物の抗 HCV 活性を定量評価するアッセイ系が完成した。これまで、HuH-7 由来の細胞株にのみ依存してきたが、今後はこれらのアッセイ系も使用して総合的に化合物の抗 HCV 活性を定量評価できるようになった。実際、これまで抗 HCV 活性ありとされていた物質について ORL8 や ORL11 アッセイ系を用いて EC50 値を評価したところ、大部分が HuH-7 由来の OR6 アッセイにより得られた EC50 値より低い値を示した。このことは、ORL8 や ORL11 アッセイ系は OR6 アッセイ系より感度の面で優れたアッセイ系であることを示唆する。従って、今迄見逃されていた物質に抗 HCV 活性

があることを見出す可能性もある。

本研究では、Li23 由来の ORL8c 細胞で感染性 HCV 粒子が産生され、それがさらに未感染の ORL8c 細胞に感染して HCV が増殖することを示した。このことは、従来世界中で汎用されている HuH-7 由来の細胞を用いなくとも HCV の生活環を培養細胞レベルで再現できたことを示している。現在のところ、産生される HCV 量は HuH-7 由来の細胞と比較すると 1 ケタ低いいため、今後細胞のサブクローニングを行い、HCV 産生効率のよい細胞を探す必要がある。

(2) Li23 由来の細胞アッセイ系で抗 HCV 活性が見いだされたリバビリンの作用機序の解析

本研究では、リバビリンの抗 HCV 活性が Li23 由来のアッセイ系で顕著に認められた。リバビリンについては、これまで、HCV-RNA の複製に対する抗 HCV 活性の検出が困難であったことから、HCV-RNA の複製阻害機構を説明できる様々な仮説がいくつも提唱されていたものの直接検証することは困難であった。しかしながら、Li23 由来の細胞系を用いることにより、仮説を直接検証することが可能になった。その結果、リバビリンが抗 HCV 活性を示す分子機序として IMPDH の阻害を介したものであることを初めて明らかにした。IMPDH が阻害されることにより細胞内の GTP 濃度が急速に低下するために HCV-RNA の複製が抑制されるものと

考えられる。OR6 アッセイ系では、なぜリバビリンの抗 HCV 活性が検出されないかについての解答は今後の研究課題ではある。

また、ORL8 や ORL11 アッセイ系を使用することにより、リバビリンのように OR6 アッセイ系と結果が大きく異なる他の化合物を見出せる可能性がある。

(3) 異なる細胞株由来のアッセイ系を用いた化合物の抗 HCV 活性評価

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 値を算出した。SI 値が大きいほど、抗 HCV 剤として優れていると評価されることから、それぞれのアッセイ系で得られた化合物の SI 値を相互に比較した。

まず、既報で用いられているアッセイ系（大部分は HCV Con1 株が複製している HuH-7 由来の細胞株を用いている）で報告されている SI 値と OR6 アッセイ系（HCV-0 株が複製している HuH-7 由来の細胞株を用いている）で得られた SI 値間での比較では、比較可能な 2 種類（CC50 値が報告されておらず比較不能の化合物が 6 種類あるため）のうち半数以上の 1 3 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 由来のアッセイ系でも 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 アッセイ系と Li23 細胞由

来の ORL8 アッセイ系（HCV-0 株が複製している）間での比較（比較可能な 2 5 種類）を行ったところ、9 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、同じ HCV 株（HCV-0 株）でもアッセイに用いる細胞の種類が異なると得られる結果も異なることが示唆された。

以上本研究により得られた結果から、化合物の抗 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 株由来のアッセイ系から得られた EC50 値と CC50 値から SI 値を求めて総合的に評価する必要があることが分かった。

## E. 結論

本研究により以下に示す 3 つの結論が得られた。

### (1)

全長 HCV RNA（遺伝子型 1b の HCV-0 株）の複製が効率良く起こるヒト肝癌細胞株 Li23 由来の複数の細胞株を樹立した。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や HCVcc（遺伝子型 2a の JFH-1 株）の持続的産生増殖システムを開発した。

## 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- $\beta$  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, Kukihara H, Taguwa 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).
- 3) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, and Ikeda M. Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new human hepatoma cell line. *Virus Res.* 146:41-50 (2009).
- 4) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, and Kato N. HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A. *Arch Virol.* 154:1671-1677 (2009).
- 3) Matsumoto A, Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Hirano K, Fujimoto M, Akiyama M, Miuma S, Ozawa E, Shibata H, Takeshita S, Yamasaki H, Ikeda M, Kato N, and Eguchi K. Interferon-alpha-induced mTOR activation is an anti-hepatitis C virus signal via the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-independent pathway. *J Gastroenterol.* 44:856-863 (2009).
- 4) Yano M, Ikeda M, Abe K, Kawai Y, Kuroki M, Mori K, Dansako H,

- Ariumi Y, Ohkoshi S, Aoyagi Y, and Kato N. Oxidative stress induces anti-hepatitis C virus status via the activation of extracellular signal-regulated kinase. *Hepatology* 50:678-688 (2009).
- 5) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, and Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- $\alpha$ . *FEBS Letters* 583: 1434-1438 (2009).
- 6) Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, and Kato N. Double-stranded RNA- induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. *Arch. Virol.* 154:801-810 (2009).
- 7) Bender H, Wiesinger MY, Nordhoff C, Schoenherr C, Haan C, Ludwig S, Weiskirchen R, and Kato N, Heinrich PC, Haan S. Interleukin-27 displays interferon  $\gamma$ -like functions in human hepatoma cells and hepatocytes. *Hepatology* 50: 585-591 (2009).
- 8) Kawai Y, Ikeda M, Abe K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, and Kato N. Development of an HCV relapse model using genome-length HCV RNA harboring cells possessing the IFN- $\alpha$ -resistance phenotype. *Hepatology Res.* 39: 898-909 (2009).
- 9) Vollmer S, Kappler V, Kaczor J, Flügel D, Rolvering C, Kato N, Kietzmann T, Behrmann I, and Haan C. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is upregulated by Oncostatin M and participates in Oncostatin M signaling. *Hepatology* 50:253-260 (2009).
- 10) Nishimura G, Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, and Kato N. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. *Antiviral Res.* 82:42-50 (2009).
- 11) Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, and Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J. Hepatol.* 50:883-894 (2009).
- 1) Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, and Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through

- down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J. Hepatol.* in press (2009).
- 2) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic Trioxide Inhibits HCV RNA Replication Through Modulation of the Glutathione Redox System and Oxidative Stress. *J. Virol.* 83, 2338-2348 (2009).
  - 3) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture. *Arch. Virol.* 154:77-85 (2009).
  - 4) Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors Ataxia-Telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 82:9639-9646 (2008). *J. Virol.* 82, 9305 (2008) spotlight
  - 5) Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Takemoto K, Ariumi Y, Kato N. A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res.* 137:72-79 (2008).
  - 6) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun.* 371:104-109 (2008).
  - 7) Ando M, Korenaga M, Hino K, Ikeda M, Kato N, Nishina S, Hidaka I, Sakaida I. Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication. *Liver Int.* 28:1158-1166 (2008).
  - 8) Hirano K, Ichikawa T, Nakao K, Matsumoto A, Miyaaki H, Shibata H, Eguchi S, Takatsuki M, Ikeda M, Yamasaki H, Kato N, Kanematsu T, Ishii N, Eguchi K. Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporin a, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells. *Liver Transpl.* 14:292-298 (2008).
  - 9) 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. 80:632-639 (2008)

## 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、田鍬 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.
- 1) 中村 光康、斎藤 英胤、池田 正徳、穂刈 量太、加藤 宣之、日比 紀文. 各種抗酸化剤の C 型肝炎ウイルス複製についての影響. 第 17 回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2009) / 第 13 回日本肝臓学会大会、京都、2009 年 10 月.
  - 2) 野崎 昭人、近藤 正晃、森本 学、沼田 和司、池田 正徳、加藤 宣之、田中 克明. C 型肝炎治療薬としての Hydroxyurea の可能性. 第 17 回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2009) / 第 13 回日本肝臓学会大会、京都、2009 年 10 月.
  - 3) 斎藤 誠、池田 正徳、加藤 宣之、田中 寅彦. C 型肝炎ウイルス非構造タンパク質 NS3 と NS4B の相互作用における責任部位の解析. 第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009 年 10 月.
  - 4) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Li23 cell-derived HCV-RNA replicating systems enabling analysis for anti-HCV mechanism of ribavirin. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, October 2009.
  - 5) Nishimura G, Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, October 2009.
  - 6) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- $\alpha$ . 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, October 2009.
  - 7) 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. リバビリンの抗 HCV 活性を解析評価できる Li23 細胞由来の HCV-RNA 複製システム. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.
  - 8) 池田 正徳、森 京子、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. オンコスタチン M はインターフェロンの抗 HCV 活性を相乗的に増強する. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.
  - 9) 斎藤 誠、池田 正徳、加藤 宣之、田中 寅彦. 1b 型 C 型肝炎ウイルス非構造タンパク質 NS3 と NS4B の相互作用の解析. 第 57 回日本

ウイルス学会学術集会、東京、  
2009年10月。

- 3) 河合 良成、池田 正徳、阿部 健一、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之、山本 和秀。全長HCV-RNA複製細胞を基に作成したIFN治療後再発モデルによる有効な治療法に検討・評価。第44回日本肝臓学会総会、松山、2008年6月。
- 4) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M. A new human hepatoma cell line enabling persistent reproduction of HCV life cycle and assay for anti-HCV reagents. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 3) Kawai Y, Ikeda M, Abe K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, Kato N. Genome-length HCV RNA replicating cells possessing IFN- $\alpha$  resistant phenotype for the development of relapse model. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 4) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with HCV genome derived from a patient with acute hepatitis 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 5) Ikeda M, Abe K, Kuroki M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Identification of 5-HETE as the anti-HCV molecule among the arachidonic acid metabolites. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 6) Ariumi Y, Kuroki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The vacuolar protein sorting pathway is essential for HCV budding. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 7) Abe K, Ikeda M, Tani H, Ariumi Y, Dansako H, Matsuura Y, Kato N. Low permissive cell lines obtained from a high permissive HCV RNA replication cell line by negative selection system: A new strategy for identification of novel host factors. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 8) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Cyclophilins A and B mediate the anti-HCV activity of cyclosporine A in 1b/2a chimeric replicon-harboring cells. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio,

Texas USA, October 2008.

- 9) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of oxidative stress. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 10) 池田 正徳、森 京子、西村 剛、阿部 健一、有海 康雄、團迫 浩方、中沢 貴秀、加藤 宣之. 異なる 1b 型 HCV 陽性血清由来の全長 HCV RNA 複製レポーターアッセイ系の開発. 第 5 6 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 11) 河合 良成、池田 正徳、阿部 健一、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、山本 和秀、加藤 宣之. IFN 抵抗性全長 HCV-RNA 複製細胞の特徴および有効な治療法を見出すための治療後再発モデルの構築. 第 5 6 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 12) 西村 剛、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、中沢 貴秀、加藤 宣之. 異なる HCV 陽性血清由来の 1b 型 HCV レプリコン複製細胞株の樹立と薬剤感受性の評価. 第 5 6 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 13) 加藤 宣之、森 京子、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、脇田 隆宇、池田正徳. 新しいヒト肝癌細胞株 Li23 を用いた HCV 生活環再現システム. 第 5 6 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 14) 池田 正徳、阿部 健一、黒木 美沙緒、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. 抗 HCV 活性を示すアラキドン酸代謝産物 5-HETE の同定. 第 5 6 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 15) 阿部 健一、池田 正徳、谷 秀樹、有海 康雄、團迫 浩方、松浦 善治、加藤 宣之. HCV 複製に関与する宿主因子探索用細胞株の Negative selection 法による樹立. 第 5 6 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 16) 阿部 健一、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之. Cyclosporine A に対し抵抗性を示す 1b/2aHCV キメラレプリコン. 第 5 6 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 17) 黒木 美沙緒、有海 康雄、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之. 亜ヒ酸は酸化ストレスを介して HCV RNA の複製を顕著に抑制する. 第 5 6 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 18) 有海 康雄、黒木 美沙緒、團迫 浩方、阿部 健一、池田 正徳、脇田 隆宇、加藤 宣之. DNA 損傷センサー ATM 及び Chk2 と HCV NS5B との相互作用. 第 5 6 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 19) 森 京子、加藤 宣之、阿部 健一、有海 康雄、團迫 浩方、池田 正徳. 新しいヒト肝癌細胞株 Li23 由来の全長 HCV-RNA 複製細