

201030033A

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

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の 解明と新規治療法開発に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成23（2011）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の 解明と新規治療法開発に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成23（2011）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発の総括 1
脇田 隆字

II. 分担研究報告

1. 肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発の総括 19
脇田 隆字
2. 患者由来 HCV の感染増殖に機能する肝細胞因子の解析 27
土方 誠
3. 不死化ヒト肝細胞を用いた HBV の新規 3 次元培養系の試み 31
田中 靖人
4. HCV コア蛋白質に相互作用する宿主蛋白質の感染における役割 33
森石 恆司
5. 宿主・ウイルスを標的とした抗ウイルス薬剤の大規模スクリーニング 37
坂本 直哉
6. HCV エントリーおよび後期過程に標的をもつ創薬シーズ探索とその作用機構
の解明：マンノース特異糖鎖結合タンパク質 (Griffithsin) による HCV エ
ントリー阻害とそれによるヒト肝細胞移植 uPA/SCID マウスにおける強力な
HCV 感染防御効果 41
武部 豊
7. 脂質代謝を標的とする HCV 治療法の開発 47
池田 正徳
8. HBV pseudotype の作製と HBV 感染受容体同定への応用に関する研究 55
上田 啓次
9. ビタミン D 代謝産物による抗 HCV 作用の検討 57
加藤 孝宣

10. 肝炎ウイルス増殖を抑制する新規治療薬候補物質の探索と作用機序の解明 に関する研究	61
萩原 正敏	
11. HCV 感染モデル動物の開発	65
三浦 直行	
12. ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構	69
八木 清仁	
13. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製	75
水口 裕之	
14. HBV 増殖系および HEV 培養系による新規抗ウイルス療法の探索に 関する研究	79
清原 知子	
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	81
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別冊	89

I. 総括研究報告

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発の総括

研究代表者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

研究要旨 肝炎ウイルス感染症は我が国における最も重要な疾患のひとつであり、その対策については社会的要請もあり、迅速に進める必要がある。HCV感染に対する治療はインターフェロンとリバビリンの併用により改善してきたが、未だに不十分である。一方HBV感染では、ラミブジンなど核酸アナログ剤による抗ウイルス療法の導入により治療法が大きく変化した。核酸アナログ剤の長期投与によりHBVキャリアの肝癌発生率は低下する。しかし、長期間にわたる治療が必要であり、HBV排除は容易に達成できない。さらに薬剤耐性ウイルスの出現およびそのコントロールが問題である。また、人獣共通感染症としてのE型肝炎ウイルス（HEV）感染症が問題となってきた。特に老人における感染の中には重症化・劇症化する場合がある。これらの肝炎ウイルスに関する問題点を解決するためには、新たな治療薬の開発が必要である。そのために肝炎ウイルスの感染複製増殖過程の解明に寄与する研究を遂行する。

研究分担者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授	研究分担者 加藤孝宣 国立感染症研究所 室長
研究分担者 田中靖人 名古屋市立大学大学院 准教授	研究分担者 萩原正敏 京都大学大学院 教授
研究分担者 森石恒司 山梨大学医学部 教授	研究分担者 三浦直行 浜松大学医学部 教授
研究分担者 坂本直哉 東京医科歯科大学 准教授	研究分担者 八木清仁 大阪大学大学院 教授
研究分担者 武部 豊 国立感染症研究所 研究員	研究分担者 水口裕之 大阪大学大学院 教授
研究分担者 池田正徳 岡山大学大学院 准教授	研究分担者 清原知子 国立感染症研究所 主任研究官
研究分担者 上田啓次 大阪大学大学院 教授	
研究分担者 池田正徳 岡山大学大学院 准教授	

A. 研究目的

HCV感染に対する治療はインターフェロンとリバビリンの併用により改善してきたが、未だに不十分であり、新たな抗ウイルス薬の開発による治療効果の改善が望まれている。HBV感染では、核酸アナログ剤の長期投与によりHBVキャリアの肝癌発生率は低下するが、薬剤耐性ウイルスの出現およびそのコントロールが問題である。また、HEV感染では、老人の感染が重症化・劇症化する場合がある。これらの肝炎ウイルスに関する問題点を解決するためには、新たな治療薬の開発が必要である。

本研究では肝炎ウイルス培養系や増殖系を用いて、ウイルス感染増殖過程の解明による新規治療標的の探索と新規肝炎治療法の開発を目的とする。HCVにはウイルス培養系が開発され、ウイルスライフサイクルの各過程を標的とすることができる。このウイルス培養系を利用してHCVの感染増殖複製過程を詳細に解析し、関与する宿主因子を同定して、新たな治療標的を同定する。さらに、HCV感染レセプターが明らかとなり、レセプター導入トランスジェニックマウスによる新規感染動物モデルを開発し、治療薬開発に役立てる。HBVは感染レセプターの同定を含めて、HBVの新たな感染実験系の開発を実施する。さらに、HBV、HCVともにハイスループット実験系を構築して低分子化合物ライブラリーによる抗ウイルス薬のスクリーニングを進め、同定した化合物の作用機序、標的の解析を進める。HEVも最近ウイルス培養系が確立された。このHEVのウイルス培養系を用いた抗ウイルス薬の開発を進める。また、ヒトiPS細胞の肝細胞分化誘導法が開発され、従来不可能とされていた薬物代謝酵素活性を有する肝細胞分化誘導条件を確立されつつある。この技術により、肝炎ウイルス感染増殖が成立する肝細胞分化誘導状態を特定し、関与する宿主因子を網羅的に解析する。

B. 研究方法

1. 患者由来HCVの感染増殖に機能する肝細胞因

子の解析（土方）

ヒト不死化肝細胞を立体培養することにより種々の患者血清由来HCVを感染増殖できる。マイクロアレイ法を用いて立体培養法で発現が変化する細胞の遺伝子を検索し、HCVの感染増殖と関連する細胞内反応系候補としてアラキドン酸カスケードを同定した。アラキドン酸カスケードの活性因子である各種PGの受容体に対するアゴニストとアンタゴニストを用いてHCV RNA複製や感染性粒子産生に対する影響を検討した。

2. PA28 γ の多量体形成を利用した培養細胞系の構築（森石）

感染前に、Eno1とPaxillinの発現を抑制しJFH1ウイルス感染細胞内外のウイルスRNA量を経時的にreal-time PCRで測定した。また、Con1full repliconおよびJFH1 subgenomic replicon細胞内のEno1およびPaxillinの発現を抑制し、細胞内ウイルスRNA量をreal-time PCRによって測定した。pActおよびpBINDにPA28 γ 遺伝子あるいはプロテアソーム活性化能を持たないPA28 γ Pro245Ala (PA28 γ P245A) 遺伝子を組み込み、Huh70K1細胞にGAL4結合領域を5つ(pG5luc)あるいは9つ(pGL4.35)もつFirefly luciferase レポータープラスミドと共に導入した。48時間後、導入細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。

3. 脂質代謝を標的とするHCV治療法の開発（池田）

HCVの1B-4株、KAH5株をHuH-7細胞に導入した1B-4R細胞とKAH5R細胞を作製した。また、1B-4株、KAH5株をLi23細胞に導入した、1B-4RL細胞とKAH5RL細胞を作製した。HuH-7細胞およびLi23細胞で複製するHCV RNAには全長HCV RNA遺伝子上流に、Renilla luciferase、ネオマイシン耐性遺伝子、EMCV IRESの3種類の外来性遺伝子を導入した。6種類のHCV RNA複製細胞におけるHCV蛋白質の発現を解析した。IFNs、オンコスタチンM(OSM)、サイクロスポリンA(CsA)、ピタバスタチン(PTV)に対するEC₅₀を求めた。また、テプレノン

の抗 HCV 活性、テプレノンと IFN- α あるいは、スタチン剤の併用効果について検討した。

4. 宿主・ウイルスを標的とした抗ウイルス薬剤の大規模スクリーニング (坂本)

HCV キメラルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現する HCV-Feo replicon 細胞、および HCV-JFH1 培養系を用いて、HCV 増殖を制御する薬剤・化合物の high-throughput screening (HTS) をおこなった。

JFH-1 株の NS5A 末端へ蛍光蛋白を挿入し、T4290A と C7653T に変異導入することで粒子産生能を保持した蛍光蛋白 YFP 発現 HCV を構築した。この蛍光蛋白発現 HCV 感染細胞の培養上清を濃縮しスクリーニングに使用した。細胞播種の翌日に各種化合物を添加、その 2 時間後にウイルスを接種した。翌日培地を交換し、5 日間の培養後 high content analysis を利用した感染細胞数の定量解析を行った。

5. HCV の E 2 タンパク質に結合する環状ペプチドによる感染阻害 (脇田)

S2 細胞で発現させた精製 E 2 タンパク質を東京大学の菅研究室に提供し、結合する環状ペプチドを探索した。その環状ペプチドを用いて HCV の感染阻害活性をシュードタイプ粒子および感染性 HCV の実験系で解析した。

6. HCV エントリーおよび後期過程に標的をもつ創薬シーズ探索とその作用機構の解明 (武部)

精製組換え rGRFT を用いた。HCV JFH-1 の感染性ウイルスと試験物質を混合後、精製した HCV 粒子を Huh7.5.1 細胞に感染させ、3 日後の培養上清中の HCV core 量を HCVcore 抗原 ELISA アッセイを用いて定量した。また、HCV (genotype 1) 感染の 1 日前 (d-1) から感染後 16 日にわたって GRFT を、ヒト肝細胞移植 uPA/SCID マウスに 1 日 1 回皮下接種を行った。

7. 肝炎ウイルス増殖を抑制する化合物の探索、

フラビウイルスの増殖を抑制する蛋白リン酸化酵素阻害剤の作用機構の解明 (萩原)

C 型肝炎を含むフラビウイルスの増殖を抑制する新規蛋白リン酸化酵素阻害剤 SFV785 の標的蛋白リン酸化酵素を同定した。その標的蛋白リン酸化酵素阻害活性を指標に SFV785 から構造展開した化合物やケミカルライブラリーをスクリーニングし、さらに強力に C 型肝炎ウイルスの増殖を抑制する化合物を探索した。

8. HCV 感染複製系を用いたビタミン D およびその代謝産物の抗 HCV 作用の評価 (加藤)

ビタミン D およびその代謝産物である 25(OH)VD₃、1 α (OH)VD₃、1,25(OH)₂VD₃ で Huh7 細胞を処理し、その後 JFH-1 ウイルスを moi=0.1 で感染させた。感染後、1 日、2 日、3 日で培養上清と細胞を改修し HCV コア抗原量を測定した。また HCVpp でもビタミン D 代謝産物の HCV 感染に与える影響を評価した。CD81 の発現していない Huh7-25 細胞を用い、シングルサイクルウイルス生成系による評価を行った。ビタミン D 代謝産物が HCV のライフサイクルのどの部分を阻害しているかを評価した。

9. 不死化ヒト肝細胞を用いた HBV の新規 3 次元培養系の開発 (田中)

中空糸モジュールあるいは特殊なナノレベル加工を施した培養プレートで 3 次元培養系を作成した。不死化ヒト肝細胞および肝癌細胞株を用い、HBV のウイルス粒子を含む患者血清を用いた。3 次元培養系に患者血清を感染させ、後培養上清中の HBV 抗原と核酸を測定した。

10. HBV pseudotype の作製と HBV 感染受容体同定 (上田)

HBVp の感染能による感染受容体の同定実験を進める。

11. HBV 増殖細胞の解析 (脇田)

抗ウイルス薬スクリーニングに適した HBV ゲ

ノムが増殖する細胞を探索した。Hep2215 細胞、HepAD38 細胞、HepaRG 細胞などを入手しウイルス増殖を解析した。

1 2. B型肝炎ウイルス (HBV) 増殖系についての検討 (清原)

HBV を産生する HepG2215 細胞から HBs 抗原産生能が異なる複数のクローンを検索した。一つのクローンについて市販の薬剤ライブラリを対象としたスクリーニング (マーカーは HBs 抗原量、細胞毒性は MTT Assay で確認) を実施した。

1 3. HCV 感染モデル動物の開発 (三浦)

ヒト肝臓 RNA を RT-PCR 法にて、CD81, SR-BI, CLDN1, OGDN の各 cDNA をクローニングした。各 cDNA をマウスアルブミンエンハンサー/プロモーター 2.3kbp に連結し、トランスジェニックマウスを得た。蛋白の存在はウエスタンブロット法、mRNA の発現は RT-PCR 法、マウスの遺伝子型は PCR 法、ウイルスの力価は IRES 部 RNA の定量的 RT-PCR 法で行った。

1 4. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製 (水口)

Ad ベクターの作製は improved in vitro ライゲーション法により行った。 β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子、ヒト SRY-box containing gene 17 (SOX17) 遺伝子、hematopoietically expressed homeobox runt-related transcription factor (HEX) 遺伝子あるいは X 遺伝子 (仮称の遺伝子名) をベクタープラスミド pAdHM41-K7 に挿入することにより pAd-K7-EF-LacZ、pAd-K7-EF-SOX17、pAd-K7-EF-HEX、pAd-K7-EF-X を作製した。これらの Ad ベクタープラスミドを 293 細胞に導入することにより、Ad-LacZ、Ad-SOX17、Ad-HEX、Ad-X を作製した。

ヒト ES 細胞 (H9) やヒト iPS 細胞 (201B7、Tic、Dotcom) を分化誘導開始の前日に無血清培地 hESF9 で培地交換した。次に、細胞剥離液である Accutase (Invitrogen 社) を用いてヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞を回収後、6 因子 (10 μ g/mL

human recombinant insulin、5 μ g/mL human apotransferrin、10 μ M 2-mercaptoethanol、10 μ M ethanolamine、10 μ M sodium selenite、0.5 mg/mL fatty acid free bovine albumin) および 100 ng/mL Activin A (R&D systems 社) を含む hESF-GRO (Cell Science & Technology Institute 社) 培地に懸濁後、マトリゲルでコーティングした細胞培養用プレートに播種した。

各 Ad ベクター (Ad-LacZ、Ad-SOX17) を中内胚葉系細胞に作用させ、48 時間後に免疫抗体染色により内胚葉分化効率を測定した。次に Ad-LacZ、Ad-HEX を作用させた後、10 ng/mL FGF4 (R&D systems 社) と 10 ng/mL BMP4 (R&D systems 社) を含んだ hESF-DIF 培地で 9 日間培養し、肝幹細胞を得た。さらに Ad-LacZ、Ad-X を作用させた後、10ng/mL FGF-4、10 ng/mL HGF (R&D Systems 社)、10ng/mL Oncostatin M (R&D Systems 社)、 10×10^{-7} M dexamethasone (Sigma 社) を添加した hepatocyte culture medium (Lonza 社) で 9 日間培養し肝細胞への分化効率の測定および機能性の評価を行った。

1 5. ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の解析 (八木)

iPS 細胞由来肝細胞は、水口裕之分担研究者によって作製されたものを使用した。

Dotcom (iPS) 細胞、human iPS-derived hepatocytes (iPS-hepa)、primary human hepatocytes (Primary-hepa) (CellzDirect 社)、Huh7 細胞、HepG2 細胞、SK HEP-1 細胞、293 細胞、HeLa 細胞から RNA を抽出し、HCV 感染受容体発現を解析した。

HCV 感染実験には、ルシフェラーゼ遺伝子を有する HCV シュードウイルスで評価した。iPS 細胞、iPS-hepa 細胞および Huh7 細胞を 48-well plate に播種し、HCVpv を 2 時間作用させ、ウイルス作用 24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

HCV 複製実験にはテトラサイクリン応答性の RNA polymerase I 発現カセットを搭載したアデノ

ウイルスベクター (Ad5/35) を用い、1b 型の HCV サブゲノム発現ベクター (AdP₁235-HCV)、NS5B (RNA dependent RNA polymerase) のポリメラーゼ活性欠損変異体ベクター (AdP₁235-ΔGDD) を使用した。iPS 細胞、iPS-hepa 細胞および Huh7 細胞を 48-well plate に播種し、Ad-tTA (5 MOI) 存在下 AdP₁235-HCV、 AdP₁235-DGDD (1 MOI) を感染させた。感染 24 時間後にドキシサイクリンを添加し、細胞ライセート中のルシフェラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報を厳格に管理保存する。

また、ヒト初代培養肝細胞は、京都大学附属病院移植外科においておこなわれた先天性代謝異常症患者への生体肝臓移植において切除された患者肝臓組織を用いて作成されたものである。この研究はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認されたものである。肝臓や血液提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

1. 患者由来 HCV の感染増殖に機能する肝細胞因子の解析 (土方)

立体培養した不死化肝細胞の遺伝子発現変化をマイクロアレイ法を用いて解析した。PGD 合成酵素とトロンボキササン A (TXA) 合成酵素の mRNA 量が

立体培養時に上昇し、それとは逆に PGI と PGE 合成酵素の mRNA 量が減少した。PG や TXA の HCV 感染増殖に対する影響を検討するため、HCV 産生細胞にそれらの受容体に対するアゴニストやアンタゴニストで処理したところ、すべてにおいて HCV ゲノム複製や粒子産生は大きく変化しなかった。しかし、HCV 産生細胞に PGI 受容体 (IP) に対するアゴニスト ON01301 で処理した場合、用量依存的にその培養上清中の感染性が低下した。組換え体 HCV 産生細胞に PGI 受容体 (IP) に対する異なるアゴニスト BMY45778 で処理した場合でも同様の効果が認められた。

2. PA28 γ の多量体形成を利用した培養細胞系の構築 (森石)

RNA 干渉試験で HCVcc では Eno1 の発現低下によってウイルス量が減少し、Eno1 はウイルス RNA 複製に必須な宿主遺伝子であることが示唆された。また、Paxillin に対するノックダウンによって、HCVcc および JFH1 subgenomic replicon 細胞内のウイルス RNA 量の低下が認められなかったが、Con1 full genomic replicon 細胞では有為な低下が認められた。

また、宿主蛋白質 PA28 γ を標的とした培養細胞系の構築を試みた。VP16-PA28 γ および GAL4-PA28 γ との結合によって、GAL4 プロモーターを活性化し、下流にコードされているルシフェラーゼが発現する培養細胞系の構築を試みた。トランスフェクションによってプラスミドをそれぞれ Huh70K1 細胞に導入し、48 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。GAL4 結合領域が 5 つのものより、9 つのレポータープラスミドの感度が高かった。また、変異型との組み合わせより、PA28 γ の野性型同士の結合によるルシフェラーゼ活性が高かった。また、VP16 のみと GAL4-PA28 γ の組み合わせ、および VP16-PA28 γ と GAL4 のみの組み合わせではルシフェラーゼ活性は認められなかった。

3. 脂質代謝を標的とする HCV 治療法の開発 (池田)

2種類の細胞株 (HuH-7、Li23) と3種類の HCV 株 (0、1B-4、KAH5) を用いて6種類の全長 HCV RNA レポーターアッセイ系を作製した。

これらの HCV RNA 複製細胞で HCV 蛋白質 (Core, NS3, NS5B) の発現をウエスタンブロット解析で確認した。これらの、6種類のアッセイ系を用いて IFN- α 、IFN- γ 、IFN- λ 1、OSM、CsA、PTV に対する感受性 (EC₅₀) を検討した。CsA では両細胞間で複製する HCV に対する感受性が同程度であった。しかし、HuH-7 細胞と Li23 細胞で複製する HCV に対する各薬剤の感受性は Li23 細胞で高い傾向がみられた。なかでも、IFN- λ 1 では Li23 細胞の HCV に対する感受性が HuH-7 細胞の HCV に比べて約 100 倍高かった。

メバロン酸経路で産生される GGPP に化学構造が似ているテプレノンの抗 HCV 活性について OR6 細胞を用いて検討した。テプレノンは、濃度依存的に HCV RNA 複製を抑制し、EC₅₀ は 5.3 μ g/ml であった。テプレノンは IFN- α と併用すると濃度依存的に IFN- α の抗 HCV 活性を増強した。

4. 宿主・ウイルスを標的とした抗ウイルス薬剤の大規模スクリーニング (坂本)

4046 化合物のうち、細胞毒性を示さずにレプリコン増殖抑制効果および HCV 増殖抑制効果を示す化合物を4個同定した。1個は NF κ B シグナル経路を活性化し、他の3個は既存の IFN や NF κ B を介さない経路で抗 HCV 効果を示した。エントリー阻害試験により 400 個の低分子化合物をスクリーニングし、35 個が 50%以上の感染阻害効果を示した。このうち複製阻害活性を認めたものは1個で、残りの 34 個はエントリー阻害活性を持つと考えられた。

5. HCV の E 2 タンパク質に結合する環状ペプチドによる感染阻害 (脇田)

HCV の E 2 タンパク質をハエ由来の S 2 細胞で発現させ、His タグによるアフィニティ精製およびゲル濾過により精製した。単量体の E 2 タンパク質を数ミリグラム得ることができた。精製 E

2 タンパク質は HCV シュードタイプ粒子および感染性 HCV の Huh7 細胞への感染を容量依存的に阻害した。従ってこの精製 E 2 蛋白質は HCV の細胞表面のレセプター結合を競合的に阻害できると考えられた。この精製 E 2 蛋白質に特異的に結合する環状ペプチドを東大・菅研究室でスクリーニングしてもらい、4種類のペプチド (D 2, D 4, L 1, L 7) を提供された。このなかで、L 1 および L 7 のペプチドは感染性 HCV の Huh7 細胞への感染を容量依存的に阻害した。

6. HCV エントリーおよび後期過程に標的をもつ創薬シーズ探索とその作用機構の解明 (武部)

GRFT は、ウイルス粒子との preincubation によって粒子の感染性を失わせ、GRFT がウイルス側に作用して、粒子の感染性を失わせる (中和する) 効果をもつことが示唆された。さらにヒト肝細胞キメラマウスを用いた感染防御実験を実施した。その結果、GRFT は、陰性対照 (生理的食塩水) に対して、3-4 log に及ぶ抗 HCV 効果を示した。マウスの ALT 値および体重に変化は見られなかった。

7. 肝炎ウイルス増殖を抑制する化合物の探索、フラビウイルスの増殖を抑制する蛋白リン酸化酵素阻害剤の作用機構の解明 (萩原)

C型肝炎を含むフラビウイルスの増殖を抑制する蛋白リン酸化酵素阻害剤 (SFV785) の作用機構を、米国デューク大学 Mariano Garcia-Blanco 教授およびシンガポール国立大学 Azlinda Bte Anwar 博士との共同研究で解明し、標的リン酸化酵素を同定するとともに、この化合物投与により感染性を喪失したフラビウイルス粒子が産生されることを証明した。また、C型肝炎遺伝子発現を抑制する化合物のスクリーニングを進め、新たに3系統のヒット化合物を見出した。さらに B 型肝炎ウイルスの増殖を抑制する化合物を探索する準備を行った。

8. HCV 感染複製系を用いたビタミン D およびその代謝産物の抗 HCV 作用の評価 (加藤)

HCV 感染複製系を用い、ビタミン D およびその代謝産物である 25(OH)VD₃、1 α (OH)VD₃、1,25(OH)₂VD₃ の抗ウイルス活性を評価した。その結果、25(OH)VD₃ でのみ抗 HCV 作用が観察された。ビタミン D は肝臓で代謝され 25(OH)VD₃ となるが、培養細胞へのビタミン D 投与では抗 HCV 作用は観察されなかった。

HCVpp による評価では 25(OH)VD₃ 各種濃度の処理において、感染後ルシフェラーゼの値に変化を認めず、25(OH)VD₃ は HCV の培養細胞への感染を阻害しないと考えられた。

JFH-1 の全長 RNA を Huh7-25 細胞にトランスフェクションし、各種濃度の 25(OH)VD₃ で処理した後、3 日後の細胞内コア抗原量と細胞内と上清中の感染力価を測定した。その結果、25(OH)VD₃ は 1 μ M の濃度で抗 HCV 作用を示した。さらに詳細な検討の結果、25(OH)VD₃ は HCV の細胞内の複製ではなく、感染性ウイルス粒子の形成を阻害していると考えられた。また、感染性ウイルス粒子の分泌には影響を与えていないと考えられた。

9. 不死化ヒト肝細胞を用いた HBV の新規 3 次元培養系の開発 (田中)

不死化ヒト肝細胞、肝癌細胞株ともに中空糸を用いた培養系では約 1 ヶ月間の培養が可能であった。また、特殊加工の培養プレートを用いた培養においてスフェロイドを形成、3 次元化することができた。スフェロイド形成は 2 週間程度持続した。さらに HBV 感染後、培養上清中に HBs 抗原や HBV DNA、細胞内 HBV core 関連抗原が検出された。

10. HBV pseudotype の作製と HBV 感染受容体同定 (上田)

HBVp はヒト肝臓 cDNA の哺乳類細胞への導入操作により感染性が上昇することが示唆された。この過程はライブラリーによる HBV 感染受容体遺伝子の発現、活性化等によるものではなく導入操作自体が感染性に影響を出しているものと考えられた。HBV 粒子付着試験でもその存在が示唆された。

11. HBV 増殖細胞の解析 (脇田)

HBV は培養細胞による感染実験系が存在しない。このため HBV のウイルスゲノムをタンデムに結合したプラスミドを培養細胞に導入することにより、ウイルスゲノム複製とウイルス粒子産生を観察できる。Hep2215 細胞は HBV プラスミドが組み込まれ安定的にウイルス増殖が見られるが、入手した細胞ではウイルス産生能は低かった。そこで米国の Dr. Seeger より HepAD38 細胞を入手し検討した。HepAD38 細胞では HBV 遺伝子がテトラサイクリンで発現制御可能なプロモーターで転写され、テトラサイクリン非存在下で HBV 複製増殖が誘導される。また、HepaRG 細胞では HBV の感染が可能と報告されているが、感染効率は低い。そのためウイルス感染増殖を解析するには感染効率を向上させる必要がある。

12. B 型肝炎ウイルス (HBV) 増殖系についての検討 (清原)

HepG2. 2. 15 細胞より HBs 抗原産生能が高いクローン G4 を得た。このクローンを用いて HBs 抗原産生抑制作用のある薬剤 (5 剤) を選択した。新たに HBs 抗原再生能が異なる 18 クローンを選択した。

13. HCV 感染モデル動物の開発 (三浦)

クローニングした CD81, SR-BI, CLDN1, OCN cDNA を CXN2 発現ベクターに組み込み、マウス NIH-3T3 細胞に発現した永久株を樹立した。この細胞に HCV 偽粒子 (HCVpp) を感染させたところ、高い luciferase 活性が検出されたことから、4 つのヒト蛋白 cDNA は機能を持っていることが確認できた。そこで、4 つのヒト蛋白を肝細胞に発現したマウス (CCSO マウス) の肝臓切片に対して、HCV E2 蛋白の結合実験を行ったところ、野生型マウスからの切片には結合しないが、CCSO マウスからの切片には結合が観察された。そこで、HCV を含む患者血清を尻静脈より注射し、2 週間後マウスより採血し、血清中のウイルス力価を測定したが、ウイルスは観測できなかった。そこで、ウイルス感染の第一段階であるウイルス侵入が起こっている

かどうかを CCS0 マウスからの初代肝細胞への HCVpp 感染実験を行った。結果は、陰性であった。

1 4. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製 (水口)

本研究では、肝細胞への分化効率を改善するため、中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞において発現している転写因子 SOX17、HEX、X 遺伝子を改良型 Ad ベクター(ファイバー領域にポリリジン配列を付与したファイバー改変 Ad ベクター)を用いて時期特異的に一過性に過剰発現させ、肝細胞への分化効率の飛躍的な向上を目指した。その結果、中内胚葉細胞への SOX17 遺伝子導入により内胚葉のマーカーの c-Kit 陽性・CXCR4 陽性の細胞 population が上昇し、肝分化能が高い HEX 陽性内胚葉の population も上昇した。また、内胚葉細胞に HEX 遺伝子を導入することで、AFP 陽性細胞の出現が上昇し、さらに AFP 陽性の肝幹前駆細胞に X 遺伝子を導入することで、アルブミン陽性細胞の出現率が上昇し、約 80%の細胞がアルブミン陽性となった。CYP3A4、CYP2D6 をはじめとする薬物代謝酵素の活性レベルもヒト初代培養肝細胞と匹敵するレベルであった。最終的に分化誘導した細胞の形態については、細胞間隙が明瞭になり、多核の細胞が現れる等、ヒト初代培養肝細胞の形態と酷似していた。本研究により、機能性の高い肝細胞が分化誘導できたと考えられたので、八木清仁研究分担者グループにおいて、HCV 感染受容体の発現確認、HCV 感染・複製に関する検討を行った。

1 5. ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の解析 (八木)

現在のところ、HCV 感染受容体として、CD81、SR-BI、claudin-1、occludin が同定されている。そこで、iPS 細胞および iPS-hepa 細胞における HCV 感染受容体発現を RT-PCR により解析したところ、iPS 細胞では CD81 や occludin は発現していたものの、SR-BI や claudin-1 を発現しない。一方、iPS-hepa 細胞では CD81、SR-BI、claudin-1、occludin の発現が認められた。このことは、HCV

は iPS-hepa 細胞に感染する可能性を示唆している。次に、HCV シュードウイルス (HCVpv) を用いて iPS 細胞、iPS-hepa 細胞における HCV 感染を解析した。HCV 感染細胞である Huh7 細胞では、HCVpv の添加濃度依存的な感染が認められていたものの、iPS 細胞では全く感染は観察されなかった。一方、iPS-hepa 細胞では、Huh7 細胞と同様の傾向を示し、添加濃度依存的に HCVpv が感染していた。

転写制御型 RNA polymerase I 発現カセットを搭載したアデノベクターシステムを構築し、世界に先駆けて HCV ゲノム発現アデノウイルスベクターの創出に成功した。本システムを用いて、iPS 細胞および iPS-hepa 細胞における HCV 複製を検討した。iPS-hepa 細胞に AdP₁235-HCV を添加したところ、Huh7 細胞 (HCV 複製細胞) と同様に HCV 複製 (ルシフェラーゼ活性の上昇) が観察された。このとき、AdP₁235-DGDD 感染細胞では HCV 複製が観察されず、HCV RNA polymerase 依存的な HCV ゲノム複製が iPS-hepa 細胞では生じている可能性がある。一方、iPS 細胞では、ルシフェラーゼ活性の上昇が観察されなかったことから、iPS 細胞では HCV は複製しないと考えられる。

D. 考察

HCV にはウイルス培養系が開発され、ウイルスライフサイクルの各過程を標的とすることができる。このウイルス培養系を利用して HCV の感染増殖複製過程を詳細に解析し、関与する宿主因子を同定して、新たな治療標的を同定する。HBV の場合、ウイルスゲノム導入による複製増殖系は確立しているものの、ウイルス感染が可能な培養細胞系が存在しないため、ウイルスライフサイクルの解析は限定的である。そこで、HBV の新たな感染実験系の開発も実施する。さらに、HBV、HCV とともにハイスループット実験系を構築して低分子化合物ライブラリーによる抗ウイルス薬のスクリーニングを進めたい。同定した化合物についてはその作用機序、標的の解析を進める。

本年度の各分担研究者の報告に詳述されている

が、様々な成果をあげている。すでに臨床に使用されている薬剤の抗HCV活性が同定された。また、新たな化合物もスクリーニングされており、標的因子の同定など今後の研究の進展が期待される。また、HBV受容体の同定、HCVレセプタートランスジェニックマウスの開発、iPS細胞から誘導した肝細胞による肝炎ウイルス感染実験など新たな展開が期待される。

E. 結論

- ・2種類のIPアゴニスト(ON01301とBMY45778)はHCV粒子産生細胞に働きかけ感染性粒子産生を制御する働きを有することが示唆された。したがって、これらのIPアゴニストは抗HCV薬の候補と考えられ、またこれらの効果によって変化する細胞因子は抗HCV薬剤開発の新たな標的となることが期待された。
- ・ウイルス増殖に関する宿主蛋白質因子Eno1およびPaxillinを同定した。また、PA28 γ のホモ多量体形成をアッセイする培養細胞系を確立し、PA28 γ を標的とした化合物スクリーニングが可能となった。
- ・HepAD38細胞によりHBVのウイルス増殖・ウイルス粒子産生を解析できた。
- ・HCVのE2タンパク質に結合する環状ペプチドのHCV感染阻害活性を確認した。
- ・GRFTはHCV pseudoparticle (HCVpp)感染を阻害するが、Replicon assayでは有意の抗HCV活性を示さない。GRFTの作用点は感染極初期にあると推定された。
- ・新規化合物SFV785はこれまでの薬剤とは異なる分子機構でC型肝炎ウイルス増殖阻害活性を有する。この新しい分子機構に作用して、さらに強力な抗C型肝炎ウイルス活性を示す化合物を探索するとともに、DNAウイルスの増殖を抑制してB型肝炎に有望であると予想される化合物の作用機構についても探索を進める必要がある。
- ・ビタミンDおよびその代謝産物である25(OH)VD3が抗HCV薬として使用できると考えられた。25(OH)VD3は市販されている薬剤ではないが、ビ

タミンDを投与することにより25(OH)VD3の肝臓での濃度が上昇し、抗ウイルス作用を発揮すると考えられる。

- ・不死化ヒト肝細胞を中空糸に充填した3次元培養系による患者血清からのHBV感染・複製の可能性が示されたことから、この3次元培養系は非常に有用な感染モデルとなりうる。
- ・HBVの感染を許容しない培養肝がん細胞は内在性のHBV付着因子を有しており、何らかの方法で活性化することでHBV感染能を引き出すことが可能であると考えられた。また本付着因子の分離・同定を目指すことで感染受容体の実態に迫ることが可能であることが示唆された。
- ・ウイルス培養系を用いた抗HBV薬剤スクリーニング系を開発するためには、1)目的に応じた、安定した性状を持つ細胞クローンの選択、2)選択したクローンと、ウイルス増殖マーカーの相関を明らかにすること、の2点が重要である。
- ・ヒトHCV受容体および感染後期因子である4つのヒト蛋白を肝細胞に発現させたトランスジェニックマウスの作製に成功した。このマウスにHCVが感染可能かどうかの最終的な判断は、免疫による修飾のないHCVccの感染により明らかになると思われる。
- ・Adベクターを用いた機能遺伝子の導入によりヒトES細胞やヒトiPS細胞から内胚葉系細胞や肝幹前駆細胞、肝細胞への効率のよい分化誘導が可能となった。
- ・ヒトiPS細胞由来肝細胞分化誘導系を用いてHCV感染・複製を解析したところ、ヒトiPS細胞ではHCVpvの感染は生じず、HCVレプリコンの複製も観察されなかった。一方、ヒトiPS細胞由来肝細胞ではHCVpvの感染およびHCVレプリコンの複製が観察された。以上の結果より、当該ヒトiPS細胞由来肝細胞はHCVの感染・複製機構解明に資する新たな培養細胞系であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1: 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*. 2010 84(22):12048-57.
- 2: von dem Bussche A, Machida R, Li K, Loevinsohn G, Khander A, Wang J, Wakita T, Wands JR, Li J. Hepatitis C virus NS2 protein triggers endoplasmic reticulum stress and suppresses its own viral replication. *J Hepatol*. 2010 53(5):797-804.
- 3: Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Kiyohashi K, Kitazume A, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Wakita T, Watanabe M. Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology*. 2010 405(2):361-9.
- 4: Podevin P, Carpentier A, Pène V, Aoudjehane L, Carrière M, Zaïdi S, Hernandez C, Calle V, Méritet JF, Scatton O, Dreux M, Cosset FL, Wakita T, Bartenschlager R, Demignot S, Conti F, Rosenberg AR, Calmus Y. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology*. 2010 139(4):1355-64.
- 5: Kushima Y, Wakita T, Hijikata M. A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J Virol*. 2010 84(18):9118-27.
- 6: Banaudha K, Orenstein JM, Korolnek T, St Laurent GC 3rd, Wakita T, Kumar A. Primary hepatocyte culture supports hepatitis C virus replication: a model for infection-associated hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2010 51(6):1922-32.
- 7: Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. *J Infect Dis*. 2010 202(1):75-85.
- 8: Arnaud N, Dabo S, Maillard P, Budkowska A, Kalliampakou KI, Mavromara P, Garcin D, Hugon J, Gatignol A, Akazawa D, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. *PLoS One*. 2010 5(5):e10575.
- 9: 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*. 2010 6(4):e1000885.
- 10: 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*. 2010 395(4):565-71.
- 11: 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*. 2010 84(11):5824-35.
- 12: Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, Fukai K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O. Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species during hepatitis B e antigen seroconversion. *J Hepatol*, 54(1):19-25, 2011
13. Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M. Direct cytopathic effects of particular hepatitis B virus genotypes in immunosuppressive condition. *Uirusu*, 60(1):79-86, 2010.
14. Kondo Y, Ueno Y, Kobayashi K, Kakazu E, Shiina M, Inoue J, Tamai K, Wakui Y, Tanaka Y, Ninomiya M, Obara N, Fukushima K, Ishii M, Kobayashi T, Niitsuma H, Kon S, Shimosegawa T. Hepatitis B virus replication could enhance regulatory T cell activity by producing soluble heat shock protein 60 from hepatocytes. *J Infect Dis*, 202(2):202-13, 2010.
15. Tripathi, L. P., C. Kataoka, S. Taguwa, K. Moriishi, Y. Mori, Y. Matsuura, and K. Mizuguchi. 2010.

- Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions. *Mol. Biosyst.* 6:2539-2553.
16. Tanaka, Y., Y. Mori, H. Tani, T. Abe, K. Moriishi, H. Kojima, T. Nagano, T. Okabe, T. Suzuki, M. Tatsumi, and Y. Matsuura. 2010. Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus. *Microbiol. Immunol.* 54:206-220.
17. Moriishi, K., I. Shoji, Y. Mori, R. Suzuki, T. Suzuki, C. Kataoka, and Y. Matsuura. 2010. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology* 52:411-420.
18. 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
19. Oshiumi H, Ikeda M, Matsumoto M, Watanabe A, Takeuchi O, Akira S, Kato N, Shimotohno K, Seya T. Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN- β induction. *PLoS ONE*, 5(12): e14528, 2010.
20. Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Kato N. Gene expression profile of Li23, a new human hepatoma cell line enables robust hepatitis C virus replication: Comparison with HuH-7 and other hepatic cell lines. *Hepatology Res.*, 40:1248–1253, 2010.
20. 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- α in vitro. *Liver Int.* 9: 1324-1331, 2010.
21. 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.
22. 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.
23. N Sakamoto, M Nakagawa, Y Tanaka, Y Sekine-Osajima, M Ueyama, M Kurosaki, N Nishida, A Tamori, Y Nishimura- Sakurai, Y Itsui, S Azuma, S Kakinuma, S Hige, Y Ito, E Tanaka, Y Hiasa, N Izumi, K Tokunaga, M Mizokami, M Watanabe: Association of IL28B polymorphism with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy in patients with chronic genotype 2 hepatitis C. *J Medical Virol* 2010; *in press*.
24. M Yamamoto, N Sakamoto, T Nakamura, Y Itsui, M Nakagawa, Y Nishimura- Sakurai, S Kakinuma, S Azuma, K Tsuchiya, T Kato, T Wakita, M Watanabe: Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatology Research* 2011; *in press*.
25. M Kurosaki, N Sakamoto, M Iwasaki, M Sakamoto, Y Suzuki, N Hiramatsu, F Sugauchi, A Tamori, M Nakagawa, N Izumi: Sequences in the Interferon Sensitivity Determining Region and Core Region of Hepatitis C Virus Impact Pretreatment Prediction of Response to Peg-interferon Plus Ribavirin: Data Mining Analysis. *J Medical Virol* 2011; *in press*.
26. M Kurosaki, N Sakamoto, M Iwasaki, M Sakamoto, Y Suzuki, N Hiramatsu, F Sugauchi, H Yatsushashi, N Izumi: Pretreatment Prediction of response to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C using data mining analysis. *J Gastroenterol* 2010; *EPub*.
27. N Sakamoto, Y Tanaka, Mina N, H Yatsushashi, S Nishiguchi, N Enomoto, S Azuma, Y Nishimura-Sakurai, S Kakinuma, N Nishida, K Tokunaga, M Honda, K Ito, M Mizokami, M Watanabe: ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatology Research* 2010; 40(11):1063-1071.
28. G Suda, N Sakamoto, Y Itsui, M Nakagawa, K Mishima, Y Onuki-Karakama, M Yamamoto, Y Funaoka, T Watanabe, K Kiyohashi, S Niita, S Azuma,

S Kakinuma, K Tsuchiya, M Imamura, N Hiraga, K Chayama, M Watanabe: IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. *Virology* 2010; 407:80-90.

29. Y Karakama, N Sakamoto, Y Itsui, M Nakagawa, M Tasaka-Fujita, Y Nishimura-Sakurai, S Kakinuma, S Oooka, S Azuma, K Tsuchiya, H Onogi, M Hagiwara, M Watanabe: Inhibition of HCV replication by a specific inhibitor of serin-arginine-rich protein kinase. *Antimicrob Agent Chemother* 2010; 54 (8):3179-3186.

30. Tashiro K, Kawabata K, Inamura M, Takayama K, Furukawa N, Sakurai F, Katayama K, Hayakawa H, Furue-Kusuda M, Mizuguchi H. Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram.*, 12, 501-507 (2010)

2. 学会発表および講演など

1. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構」、第23回肝臓フォーラム(東部)、日本工業倶楽部会館(2010, 6.5)

2. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構の解析」、第9回KMU研究推進セミナー、北陸がんプロ教育セミナー、金沢医科大学病院新館12階大会議室(2010, 6.18)

3. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの培養細胞でのウイルス複製と生体における持続感染機構」、京都大学ウイルス研究所 学術講演会、京都大学 京大会館 101号室(2010, 7.15)

4. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構の研究」、第17回ソニックフォーラム、ソニックシティビル 6階 602会議室(2010, 11.25)

5. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、宮村達男、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCVNS5A 蛋白のリン酸化に関する新規セリン/スレオニンキナーゼの探索、第46回日本肝臓学会総会、ホテルメトロポリタン山形、(2010, 5.27-28)、ワークショップ5「C型肝炎ウ

イルスの感染・増殖メカニズムと臨床応用」

6. 有海康雄、黒木美沙緒、土方誠、Qi Yue、池田正徳、脇田隆宇、下遠野邦忠、加藤宜之、ESCRT小胞輸送系のHCV産生への関与、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)、シンポジウム6 ウイルス培養系を用いたC型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明

7. 加藤孝宣、岡本有加、村山麻子、政木隆博、脇田隆宇、HCVの増殖適応変異とその意義、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)、シンポジウム6 ウイルス培養系を用いたC型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明

8. 相崎英樹、後藤耕司、松本喜弘、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、本島清人、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV粒子形成に関する脂肪滴周辺膜蛋白の機能解析、第46回日本肝臓学会総会、ホテルメトロポリタン山形、(2010, 5.27-28)

9. 鈴木亮介、齋藤憲司、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、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)

10. 白砂圭崇、齋藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、花田賢太郎、千葉丈、深澤征義、感染・増殖能が上昇したC型肝炎ウイルス変異株の分離と性状解析、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)

11. 阿部雄一、Aly Hassan Hussein、脇田隆宇、下遠野邦忠、土方誠、感染性HCV粒子産生に関わる新規細胞内シグナル経路の探索、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)

12. 土方誠、阿部雄一、Aly Hassan Hussein、齐月、脇田隆宇、下遠野邦忠、臨床分離HCV株の培養と性状、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)

13. 深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、村上裕子、C型肝炎ウイルス(HCV)に阻害作用を示す物質の

探索、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)

14. 渡士幸一、下遠野邦忠、Kuan-Teh Jeang、脇田隆宇、マイクロRNA経路のC型肝炎ウイルス複製における意義とその創薬標的としての役割、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)

15. 江角真理子、石橋真理子、鶴田浩一、山口裕美、菊田幸子、榊原由子、脇田隆宇、C型肝炎ウイルス感染に対する自然防御について、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)

16. 渡邊則幸、村山麻子、Mohsan Saeed、伊達朋子、加藤孝宣、相崎英樹、脇田隆宇、HCVエンペロプタンパク質に付加されるN型糖鎖の機能解析、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)

17. 久島透嘉、脇田隆宇、土方誠：CoreによるS-S結合型二量体はC型肝炎ウイルスの粒子形成に必須である、第58回日本ウイルス学会学術総会、平成22年11月7-9日、徳島 2010

18. 坂本知行、田中靖人、杉山真也、山川慶洋、松浦健太郎、日下部篤宣、新海登、木村吉秀、勝美康平、城卓志、溝上雅史。B型肝炎ウイルスGenotype Gの共感染下における複製メカニズムの検討。第46回日本肝臓学会総会、2010年5月、山形。

19. 森石恆司、松浦善治、HCVによる脂質代謝障害の分子機序、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7-9日、徳島

20. 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学術集会、2010年11月7-9日、徳島

21. 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型肝炎ウイルス複製を抑制する第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7-9日、徳島

22. 池田正徳、森京子、武田 緑、中澤 貴秀、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之 異なるHCV株、細胞株を用いたHCV RNA複製培養細胞での薬剤評価 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年10月

23. 森京子、池田正徳、有海 康雄、團迫 浩方、脇田隆宇、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10月

24. 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10月

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 がん抑制因子PMLはHCVライフサイクルに必須である 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年10月

25. 田中寅彦、黒田和道、榎島誠、池田正徳、加藤宣之 C型肝炎ウイルスNS4Bとlipid dropletの相互作用 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年10月

26. 篠原義康、藤田浩司、米田正人、野崎雄一、今城健人、鈴木香峰理、馬渡弘典、桐越博之、船越健悟、池田正徳、加藤宣之、前田慎、中島淳、斉藤聡 HCV感染におけるリポ蛋白代謝の解析 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年10月

27. 藤本雄介、前田信哉、榎本信幸、池田正徳、加藤宣之、伊藤正彦、山下篤哉 抗HCV NS2タンパク活性阻害剤 High throughput screeningのためのHCV subgenomic replicon細胞の構築 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年10月

28. 山下篤哉、古田篤史、松田泰嘉、谷英典、藤田統、秋光信佳、田中淳一、池田正徳、加藤宣之、前川信哉。榎本信幸、伊藤正彦、常田聡、関口勇地、野田尚宏 沖縄産ウミシダ(Alloecomatella polycladia)抽出物の抗HCV NS3 helicase 阻害活性によるHCV増殖抑制効果

第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 10 月

29. 池田正徳、森京子、武田緑、中澤貴秀、有海康雄、団迫浩方、加藤宣之 IL28B 領域の SNP が異なる肝細胞株 (HuH-7、Li23) における抗 HCV 剤の感受性 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月

30. 田中寅彦、黒田和道、槇島誠、池田正徳、加藤宣之 C 型肝炎ウイルス非構造タンパク質 4B における lipid droplet との相互作用部位の同定 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月

31. 飯倉南、降幡知己、池田正徳、加藤宣之、千葉寛 C 型肝炎治療薬リバビリンの薬効発現における細胞内リバビリン取込み機構の重要性 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月

32. 篠原義康、藤田浩司、米田正人、野崎雄一、今城健人、鈴木香峰理、馬渡弘典、桐越博之、船越健悟、池田正徳、加藤宣之、前田慎、中島淳、斉藤聡 HCV 感染における ER ストレスを介した細胞死の検討 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月

33. 加藤孝宣、脇田隆宇. C 型肝炎ウイルスの生体内での感染様式と培養細胞での増殖能、第 46 回日本肝臓学会総会、ホテルメトロポリタン山形、(2010, 5.27-28)

34. 川端健二、水口裕之. 遺伝子導入を用いた iPS 細胞の肝細胞への高効率分化誘導法、第 10 回日本再生医療学会総会、2011 年 3 月、東京.

35. 高山和雄、稲村充、川端健二、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之. SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘導、第 10 回日本再生医療学会総会、2011 年 3 月、東京.

36. 田代克久、川端健二、櫻井文教、水口裕之. 幹細胞の分化誘導系におけるアデノウイルスベクターの有用性、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2010 年 10 月、大阪.

37. 高山和雄、稲村充、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之. SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘導、第 9 回次世代を担うファーマ・バイオフォーラム 2010、2010 年 10 月、京都.

38. 稲村充、川端健二、高山和雄、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之. HEX 遺伝子の導入によるヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞からの効率良い肝幹細胞への分化誘導、第 16 回肝細胞研究会、2010 年 6 月、秋田.

39. 高山和雄、稲村充、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之. SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘導、第 16 回肝細胞研究会、2010 年 6 月、秋田.

40. 吉田孟史、近藤昌夫、水口裕之、八木清仁. RNA polymerase I 発現系を利用した HCV 複製評価系の開発. 第 17 回肝細胞研究会、平成 22 年 6 月、秋田

41. 山岸喜彰、吉田猛史、近藤昌夫、八木清仁. 感染受容体発現バキュロウイルスを用いた HCV 感染機構の解析. 日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

42. T Wakita. HCV replication and persistent infection, Cold Spring Harbor Asia Conference on Emerging Infectious Diseases: Emerging Viruses and the Control of Viruses, Cold Spring Harbor Asia Conference, October 18 - 22, 2010, Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China

43. T Wakita. HCV replication in vitro, The 7th Single Topic Conference: Hepatitis C Virus, Asia Pacific Association of the Study of the Liver (APASL), Makuhari Messe, Chiba, Japan (2010 Dec 17-18)

44. R Suzuki, D Akazawa, K Ishii, Y Matsuura, T Wakita, T Suzuki, Efficient production of *trans*-complemented hepatitis C virus particles: Use for study of viral entry process, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)

45. T Masaki, S Matsunaga, H Takahashi, T Kato, Y Endo, T Sawasaki, T Wakita, T Suzuki, Identification of hepatitis C virus NS5A-associated protein kinases, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
45. N Watanabe, A Murayama, M Saeed, T Date, T Kato, T Wakita, Analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
46. H Yokokawa, D Akazawa, M Moriyama, N Nakamura, H Mochizuki, T Suzuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, Development of a Purification Method of Highly Purified HCV Virion for Industrial Production, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
47. M Moriyama, H Yokokawa, D Akazawa, K Nishimura, N Nakamura, H Mochizuki, T Suzuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, The exploration of effective adjuvant for HCV vaccine to induce neutralizing immunoglobulin in mice, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
48. K Watashi, K Shimotohno, K-T Jeang, T Wakita, Inhibition of HCV replication by a small molecule that suppresses microRNA pathway, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
49. M Saeed, T Kato, M Shiina, M Imamura, K Chayama, Y Choi, K Krawczynski, T. J Liang, T Wakita, Hepatitis C Virus JFH-1 Strain That Adapted In Vivo Acquired Abilities for Efficient Virus Production and Anti-apoptosis, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
50. T Kanda, R Tamura, F Imazeki, S Nakamoto, S Wu, T Roger, T Wakita, H Shirasawa, O Yokosuka, HEPATITIS C VIRUS NS5A ATTENUATES LPS-INDUCED APOPTOSIS BY DOWNREGULATION OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4 SIGNALING PATHWAY, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
51. Y OKAMOTO, T MASAKI, A MURAYAMA, T KATO, H WATANABE, T Wakita, Affects of NS5a replacement in HCV JFH-1 genome on viral replication and infectious particle production in cell culture, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
52. Y Kushima, T Wakita, M Hijikata: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. 17th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sept 10-14 2010
53. Y Qi, HH. Aly, C Tsutsui, T Fujita, M Hijikata: IRF7 dependent IFN-alpha response in the early phase of the viral infected hepatocytes. 17th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sept 10-14 2010
54. Y Kushima, T Wakita, M Hijikata: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. The Association of Pacific Rim University, Research symposium on Interface between Molecular Biology and Nano Biology, Kyoto, Japan, Nov. 24-26 2010
55. Y Abe, T Wakita, M Hijikata: Chemical biological analysis for a mechanism of infectious HCV particle production. The Association of Pacific Rim University, Research symposium on Interface between Molecular Biology and Nano Biology, Kyoto, Japan, Nov. 24-26 2010
56. Kambara H., Taguwa S., Fujia N., Noda T., Yoshimori T., Moriishi K., Matsuura Y. Inhibition of autophagy induces lysosomal vacuolation in cells replicating HCV. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.