

OCDN 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 (以後、CCSO マウスと言う) 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 CCSO 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。

#### D. 考察

HCV 感染には、ウイルス侵入、ウイルス複製、ウイルスの組み立てと出芽の 3 段階がある。今回の結果は、ウイルス侵入がうまくいっていないことを示している。しかし、感染させた初代肝細胞は培養 1 日目では 4 つのヒト蛋白をほとんど検出できない状態になっていることが詳しい検討の結果、判明した。つまり、シャーレ内の HCVpp 感染は個体内の HCV 感染状態を反映していない可能性が残されている。また、CCSO マウスへ注射した HCV 血清は一例のみの結果であり、もっと多くの患者血清で試してみる価値がある。というのは、患者血清中の HCV ウイルス粒子数と感染力価が比例しないことが知られており。これは患者の免疫反応がウイルスの感染力価に影響している可能性を示唆している。患者免疫の影響を排除できる培養細胞から作製できる

HCV 粒子 (HCVcc) を大量に作製し、CCSO マウスに注射することで、CCSO マウスの HCV 感染性を再度検討する予定である。

#### E. 結論

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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hikosaka K, Noritake H, Kimura W, Sultana N, Sharkar MTK, Tagawa Y, Uezato T, Kobayashi Y, Wakita T, Miura N. Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occludin in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry. *Biomed Res*, in press.

Kimura W, Machii M, Xue X-D, Sultana N, Hikosaka K, Sharkar MTK, Uezato T, Matsuda M, Koseki H, Miura N. Irx11 mutant mice show reduced tendon differentiation and no patterning defects in musculoskeletal system development. *Genesis* 49: 2-9, 2011.

Yang Z, Hikosaka K, Sharkar MTK, Tamakoshi T, Chandra A, Wang B, Itakura T, Xue X-D, Uezato T, Kimura W, Miura N. The mouse forkhead gene *Foxp2* modulates expression of the lung genes. *Life Sci* 87: 17-25, 2010.

Xue X-D, Kimura W, Wang B, Hikosaka K, Itakura T, Uezato T, Matsuda M, Koseki H, Miura N. A unique expression pattern of

Tbx10 in the hindbrain as revealed by  
Tbx10<sup>lacZ</sup> allele. Genesis 48: 295-302, 2010.

## 2. 学会発表

木村航, Nishat Sultana, Mohammad Sharkar,  
三浦直行. Creation of a Tbx1-AmCyan1  
transgenic mice and its application to  
characterize the Tbx1-expressing cells.  
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, 2010年12月神戸.

三浦直行. 変異Rbトランスジェニックマウ  
スで肝臓腫瘍発生が促進される分子機構の  
研究、第69回日本癌学会学術総会, 2010年9  
月, 大阪.

三浦直行, 王博, 彦坂圭介, 薛晓東. 変異レ  
チノブラストーマ蛋白は肝臓腫瘍発生を促  
進する. 第17回肝細胞研究会, 2010年6月, 秋  
田.

林良郎, 彦坂圭介, 木村航, 三浦直行.  
Monoclonal antibody against colon cancer  
Caco-2 cell surface proteins detects cell  
heterogeneity of cancer cell. 第62回日  
本細胞生物学会大会, 2010年5月, 大阪.

## H. 知的財産権の出願・登録

特になし。

# 厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

## 分担研究報告書

### 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

分担研究者 八木 清仁 大阪大学大学院薬学研究科

#### 研究要旨

周知のように C 型肝炎ウイルス (HCV) の肝細胞における感染・複製機構の解析は C 型肝炎克服に向けた最重要課題であるものの、既存のヒト肝細胞初代培養系は利便性・汎用性に乏しく、依然としてヒト肝がん細胞株を用いた解析が主流となっている。本研究では、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いて HCV の感染・複製を解析し、本細胞の HCV 研究への応用の可否を検証すると同時に新たな HCV 創薬ターゲットを同定することを目的とする。

大阪大学大学院薬学研究科水口裕之教授グループは、独自のアデノウイルスベクターを利用することで、世界屈指の分化誘導効率を有するヒト iPS 細胞由来肝細胞誘導系を構築しつつある。また、当研究グループでは、転写制御型 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を用いた HCV ゲノムの高効率導入技術を開発している。本年度は、これら八木グループおよび水口グループの研究基盤を融合し、ヒト iPS 細胞、ヒト iPS 由来肝細胞における HCV 感染・複製能を解析した。

#### 研究協力者

水口裕之 大阪大学大学院薬学研究科  
近藤昌夫 大阪大学大学院薬学研究科  
渡利彰浩 大阪大学大学院薬学研究科  
吉田孟史 大阪大学大学院薬学研究科  
山岸善彰 大阪大学大学院薬学研究科  
稲村 充 大阪大学大学院薬学研究科  
(独)医薬基盤研究所  
高山和雄 大阪大学大学院薬学研究科  
(独)医薬基盤研究所

#### A. 研究目的

周知のように、我が国には200万人余りのHCV感染者

がいてると推定されており、肝臓の80%はHCV感染者が占めている。現在HCV治療法のゴールドスタンダードとしてインターフェロン・リバビリン併用療法が実施されているが、難治性Ib型ウイルスの高ウイルス量患者に対する奏効率は50%に過ぎないこと、薬剤耐性ウイルスが出現しやすいこと、副作用発現により治療の中断を余儀なくされる患者がいることが臨床で大きな問題となっている。2005年感染研協田らによりヒト肝がん細胞株を用いた2a型HCVの培養系が樹立され、HCV複製機構の解析およびHCVワクチン開発の端緒となったものの、依然として難治性Ib型HCVの培養系開発は立ち遅れている。肝細胞は増殖性に乏しい上に培養系では急速に肝細胞としての性質を消失すること、多能性幹細胞からの肝細胞分化誘導系が構築されていないことから、ヒト肝細胞を用いたHCV感染・複製評価研究はヒト肝がん細胞株やヒト肝臓キメラマウスの利用したアプローチしか無く、ここにHCV研究の難しさがあると言える。

研究協力者水口裕之博士は、自身が代表を務める先端医療開発特区（スーパー特区）『ヒトiPS細胞を用いた新規in vitro毒性評価系の構築』において、

独自の遺伝子導入技術を駆使したヒトiPS細胞の肝細胞分化誘導法開発を推進し、世界最高水準の肝細胞分化誘導法を確立している。また、当研究グループでは、in vitro・in vivoにおいて高い遺伝子導入効率を有し、汎用性・利便性に優れたアデノウイルスベクターを用いてHCVゲノム導入ベクターシステムを開発している。

本研究では、水口グループが確立したヒトiPS細胞由来肝細胞創出技術と当グループのHCVゲノム導入技術などを融合することで、HCVの感染・複製機構を解析し、新規創薬ターゲットの探索を試みることを目的としている。本年度は、パイロットスタディとして、ヒトiPS細胞、ヒトiPS由来肝細胞におけるHCV感染・複製能の解析を試みた。

## B. 研究方法

### 1. iPS細胞由来肝細胞

実験に供した iPS 細胞由来肝細胞は、大阪大学大学院薬学研究科・水口裕之教授グループによって作製されたものを使用した。

### 2. HCV 感染実験

#### (1) HCV 感染受容体発現解析

High Pure RNA Isolation Kit (Roche 社) を用いて 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、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen 社) を用いて抽出 RNA から cDNA を作製後、各種プライマー (CD81 forward: 5'-CGCCAAGGATGTGAAGCAGTTC-3', reverse: 5'-TCCCGGAGAAGAGGTCATCGAT-3'; SR-BI forward: 5'-ATTCCGATCAGTGCAACATGA-3', reverse: 5'-CAGTTTTGCTTCCTGCAGCACAG-3'; claudin-1 forward: 5'-TCAGCACTGCCCTGCCCCAGT-3', reverse: 5'-TGGTGTGGGTAAGAGGTTGT 3'; occludin forward: 5'-TCAGGGAATAATCCACCTATCACTTCAG-3', reverse: 5'-CATCAGCAGCAGCCATGTACTCTTCAC-3'; GAPDH forward: 5'-TCTTCACCACCATGGAGAAG-3',

reverse: 5'-ACCACCTGGTGCTCAGTGTA-3') を用いた PCR を行い、HCV 感染受容体発現を解析した。

#### (2) HCV 感染実験

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 (HCVpv: 水泡性口内炎ウイルス (VSV) のエンベロープを HCV エンベロープに置換したウイルス) を使用し、ルシフェラーゼ活性を指標に HCV 感染を評価した。

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。尚、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo 社) を用いて蛋白定量を行い、感染効率を補正した。

### 3. HCV 複製実験

#### (1) HCV ゲノム発現ベクター

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 ゲノムの構造蛋白質コード領域をルシフェラーゼに置換した HCV サブゲノム発現ベクター (AdP<sub>1</sub>235-HCV)、NS5B (RNA dependent RNA polymerase) のポリメラーゼ活性欠損変異体ベクター (AdP<sub>1</sub>235-ΔGDD)、感染効率補正用の EGFPLuciferase 発現ベクター (AdP<sub>1</sub>235-EL) を実験に供した (Nucleic Acids Res, in press)。

#### (2) HCV 複製実験

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 AdP<sub>1</sub>235-HCV、AdP<sub>1</sub>235-ΔGDD (1 MOI) を感染させた。感染 24 時間後にドキシサイクリン (10 μg/ml) を添加することで RNA polymerase I 発現カセットの転写活性をオフにした。ドキシサイクリン添加 48 時間後に細胞を回収し、Renilla Luciferase Assay System (Promega 社) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。また、Ad ベクターの感染効率を補正するために、AdP<sub>1</sub>235-EL (1 MOI) と Ad-tTA (5 MOI) を共感染させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。HCV 複製能は各細胞の

AdP<sub>1</sub>235-HCV、AdP<sub>1</sub>235-ΔGDD のルシフェラーゼ活性を各細胞の AdP<sub>1</sub>235-EL のルシフェラーゼ活性で補正することにより算出した。

## C. 研究結果

### 1. HCV 感染実験

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。そこでまず、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 の発現は確認されなかった (Fig. 1A)。一方、iPS-hepa 細胞では CD81、SR-BI、claudin-1、occludin の発現が認められた (Fig. 1A)。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。

そこで次に、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 (Fig. 1B)。

### 2. HCV 複製実験

HCV ゲノムの導入技術は HCV 機能解析における有用なツールとなるものの、長鎖 RNA 発現系である RNA polymerase I 発現カセットを有するベクターシステムの開発が遅延しており、HCV 複製機能の解析は遅れている。前述したように、当研究グループでは転写制御型 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ている (Nucleic Acids Res, in press)。そこで、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 AdP<sub>1</sub>235-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) が観察されていた。このとき、AdP<sub>1</sub>235-ΔGDD

感染細胞では HCV 複製が観察されなかったことから、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示唆された (Fig. 2)。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 は複製しないものと推察される。

## D. 考察

本研究では、HCVpv および HCV ゲノム導入ベクターを用いて、iPS 細胞および iPS-hepa 細胞における HCV 感染・複製の可否について検証を試み、iPS 細胞では HCV の感染・複製が起きないこと、iPS-hepa 細胞では HCV の感染・複製が生じることを見出した。RT-PCR 解析では iPS 細胞に CD81 および occludin が発現し、iPS-hepa 細胞では CD81、occludin、SR-BI、claudin-1 が発現していたことから、iPS-hepa 細胞の HCV 感染能獲得には肝細胞分化に伴う claudin-1 や SR-BI の発現が関与している可能性がある。今後は、FACS、ウエスタン、蛍光抗体染色法などにより、細胞内局在を含めて各受容体の蛋白質レベルでの解析を進める予定である。

また、HCV レプリコンシステムを用いて HCV 複製を解析したところ、iPS 細胞ではレポーター活性の上昇は観察されず、iPS-hepa 細胞ではレポーター活性が上昇していた。ΔGDD ゲノムではレポーター活性が上昇しないこと、RT-PCR による半定量的解析、Real-time PCR による定量的解析においても HCV ゲノムの複製が観察されたことから、iPS-hepa 細胞では HCV 複製が生じる可能性が強く示唆される (data not shown)。今後は、HCV 粒子を用いた検証を行うと同時に、各分化段階の iPS 細胞を用いて、HCV 複製に関与する宿主因子 (Hsp90、FKBP8、VAP-B、CMGC、CSK1 kinase families、geranylgeranylated FBL2、microRNA(miR)-122、miR-322、miR-197、miR-532-5p、miR-374、miR-199 など) の解析を進めて行く。

## E. 結論

大阪大学大学院薬学研究科 水口裕之グループによって確立されたヒト 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

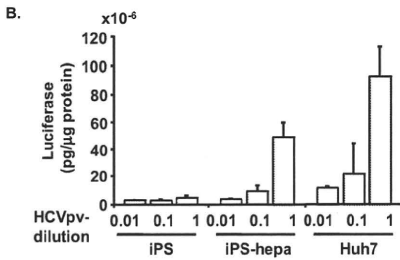
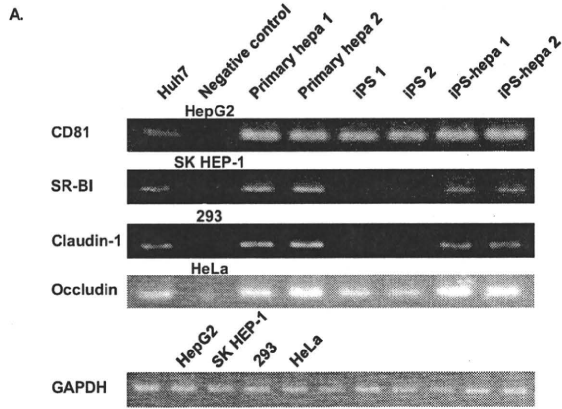
1. Yoshida T, Kondoh M, Ojima M, Mizuguchi H, Yamagishi Y, Sakamoto N, Yagi K. Adenovirus vector-mediated assay system for hepatitis C virus replication. *Nucleic Acids Res*, in press.
2. Kakutani H, Takahashi A, Kondoh M, Sakihama T, Hamakubo T, Yagi K. A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *PLoS ONE*, in press.
3. Yoshida T, Kondoh M, Yagi K. Promising targets for anti-hepatitis C virus agents. *Curr Med Chem*, in press.
4. Yagi K, Hayashi T. Cutting-edge research on hepatitis C treatment and the clinical perspectives. *Yakugaku Zasshi*, 130, 141-142, 2010.
5. 八木清仁、川瀬雅也、磯田勝広、近藤昌夫. 肝細胞機能制御を目的とした新規培養システムの開発. *薬学雑誌*, 130, 537-543, 2010.
6. Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T, Yagi K. Mucosal vaccination using claudin-4 targeting. *Biomaterials*, 31, 5463-5471, 2010.
7. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Kobayashi M, Tamesada M, Yagi K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury, *Biol Pharm Bull*, 33, 983-987, 2010.
8. Kakutani H, Kondoh M, Saeki R, Fujii M, Watanabe Y, Mizuguchi H, Yagi K. Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Eur J Pharm Biopharm*, 75, 213-217, 2010.

##### 2. 学会発表

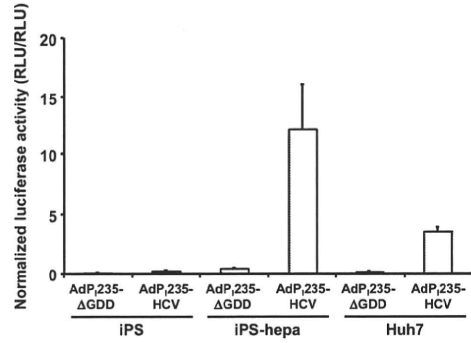
1. 吉田孟史、近藤昌夫、水口裕之、八木清仁. RNA polymerase I 発現系を利用した HCV 複製評価系の開発. 第 17 回肝細胞研究会、平成 22 年 6 月、秋田
2. Yoshida T, Satoh F, Kondoh M, Mizuguchi H, Yagi K. Development of an adenovirus vector-mediated assay system for Hepatitis C virus replication. 50th annual meeting of the American society for cell biology. December 11-15, 2010. Philadelphia, USA.
3. 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
4. 高橋梓、近藤昌夫、八木清仁. Claudin binder を利用した創薬基盤研究. 日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし



**Figure 1 Infection of HCVpv with iPS cells and iPS-derived hepatocyte cells.**  
 A) Expression of HCV entry receptors in iPS cells and iPS-hepa cells. Total RNA was extracted from the cells. Expression of HCV receptors mRNAs were detected by RT-PCR analysis as described in materials and methods. Huh7 cells were used as a positive control. HepG2, SK-HEP-1, 293 and HeLa cells were used as a negative control for CD81, SR-BI, occludin and claudin 1, respectively. B) Infection of HCVpv in iPS and iPS-hepa cells. The cells were treated with HCVpv for 2 h at the indicated dilution ratio. After 24 h of treatment, the luciferase activity was measured. The luciferase activity was normalized by the cellular protein levels. Data are mean  $\pm$  SD (n=3).



**Figure 2 HCV replication activity.**  
 Cells were co-transfected with AdP,235-HCV or AdP,235-DGDD (1 MOI) and Ad-tTA (5 MOI). After 24 h of transfection, the cells were treated with 10  $\mu$ g/ml of doxycycline for 48 h. Then the luciferase activity (HCV-luc) was measured. To normalize infectivity of Ad vector among the cells, the cells were co-transfected with AdP,235-EL (1 MOI) and Ad-tTA (5 MOI). After 72 h of transfection, the luciferase activity (EL-luc) was measured. The normalized luciferase activity was calculated by the following equation: HCV-luc/EL-luc. Data are mean  $\pm$  SD (n=3).

# 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

### ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製

分担研究者 水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科

本研究では、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の新規解析法開発を行うことを目的とする。そのため、遺伝子導入技術を活用して、ヒト iPS 細胞から肝細胞への効率の良い分化誘導法を開発し、大阪大学大学院薬学研究科・八木清仁教授グループとの連携の元、ヒト iPS 細胞由来肝細胞における C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染・複製に関する検討を行った。

#### 研究協力者

八木清仁 大阪大学大学院薬学研究科

近藤昌夫 大阪大学大学院薬学研究科

川端健二 (独)医薬基盤研究所  
大阪大学大学院薬学研究科

櫻井文教 大阪大学大学院薬学研究科

形山和史 大阪大学大学院薬学研究科

田代克久 (独)医薬基盤研究所

稲村 充 大阪大学大学院薬学研究科  
(独)医薬基盤研究所

高山和雄 大阪大学大学院薬学研究科  
(独)医薬基盤研究所

#### A. 研究目的

現在世界には 2 億人、本邦には 200 万人の C 型肝炎感染者がおり、世界では年間 200~300 万人ずつ感染者が増加している。依然として難治性 1b 型高ウイルス量患者に対しては既存薬剤の奏効率が

50%に過ぎないこと、インターフェロン投与による副作用発現により投与の中断を余儀なくされる場合があること、各種薬剤耐性ウイルスが出現することから、C 型肝炎の克服には宿主因子とウイルス感染・複製の関連性を詳細に解析し、肝炎ウイルス治療薬創出に資する新規創薬ターゲットを同定することが必須である。

そこで本研究では、iPS 細胞技術の創薬応用を目的に、まず(1)ヒト iPS 細胞から肝細胞を効率よく分化誘導させる技術を、申請者が独自開発した次世代アデノウイルス (Ad) ベクター技術を駆使して開発し、分化誘導した肝細胞の応用として、(2)大阪大学大学院薬学研究科・八木清仁教授グループとの連携の元、C 型肝炎をはじめとする肝炎克服研究のための in vitro 基盤技術 (評価系) 開発を行う。分化誘導状態の異なるヒト肝細胞様細胞を用いて肝炎ウイルス感染能および複製能を解析することで、肝炎ウイルス感染・複製に関与する宿主因子の同定や宿主因子とウイルス感染・複製の関連性を詳細に解析でき、肝炎ウイルス治療薬創出に資する新規創薬ターゲットの同定につながることを期待される。

本年度は、ヒト iPS 細胞から肝細胞を効率よく分化誘導させる技術開発を行い、大阪大学大学院薬学



研究科・八木清仁教授グループにおいて、HCV のレセプター発現や感染・複製に関する検討を行った。

## B. 研究方法

### B-1. Ad ベクターの作製

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。シャトルプラスミド pHMEF5 のマルチクローニング部位に  $\beta$ -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) を挿入し、それぞれのシャトルプラスミドを I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化した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。作製した Ad ベクタープラスミドを Pac I で消化し、SuperFect (Qiagen 社) を用いて 293 細胞にトランスフェクションすることにより、Ad-LacZ、Ad-SOX17、Ad-HEX、Ad-X を作製した。定法により Ad ベクターの増殖・精製を行った。

### B-2. 内胚葉系細胞、肝幹細胞、肝細胞への分化誘導

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 (Furue MK et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105, 13409-13414) 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  $\mu$ g/mL human recombinant insulin、5  $\mu$ g/mL human apotransferrin、10  $\mu$ M 2-mercaptoethanol、10  $\mu$ M ethanolamine、10  $\mu$ 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 12 プレートに播種した。

Ad ベクター用いた遺伝子導入によりヒト iPS 細胞から内胚葉系細胞への分化誘導を行う場合は、各 Ad ベクター (Ad-LacZ、Ad-SOX17) を 3,000 vector particles (VP)/cell の濃度で中内胚葉系細胞に作用させた。培地は上記のものと同じものを使用した。24 時間後に X-gal 染色により遺伝子導入効率を、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。

次にヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞由来の内胚葉系細胞を各 Ad ベクター (Ad-LacZ、Ad-HEX; 3,000 VP/cell) で作用させた後、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。

ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞由来の肝幹細胞を各 Ad ベクター (Ad-LacZ、Ad-X; 3,000 VP/cell) で作用させた後、10 ng/mL FGF-4、10 ng/mL HGF (R&D Systems 社)、10 ng/mL Oncostatin M (R&D Systems 社)、 $10 \times 10^{-7}$  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。

## C. 研究結果

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 (プロトコールについては Figure 1 参照)。

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 ( $\alpha$ フェトプロテイン)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 (Figure 2)。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 (Figure 3)。

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、大阪大学大学院薬学研究科・八木清仁教授グループにおいて、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。

#### D. 考察

時期特異的に SOX17、HEX、X 遺伝子をヒト ES 細胞や iPS 細胞から分化させた細胞に導入することで、極めて効率よく肝細胞へ分化誘導することに成功した。本研究では、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 ベクターを用いて遺伝子導入しているが、いずれの段階の iPS 細胞由来分化細胞においても、ほぼ 100%の遺伝子導入効率を示すことを確認しており、高い遺伝子導入能が優れた肝分化誘導能の一因であることが考えられた。

今後は肝幹細胞から肝細胞への分化誘導に関して、培養条件 (3 次元培養等) の検討や更なる機能遺伝子の導入を組み合わせることで、成体肝細胞と類似した細胞の分化誘導法を確立する。さらに、①分化誘導状態の異なるヒト肝細胞様細胞を用いて HCV をはじめとする肝炎ウイルス感染能および複製能を解析し、②肝炎ウイルス感染が成立するヒト肝

細胞様細胞やウイルス複製が成立するヒト肝細胞様細胞を取得する。また、③ゲノム・プロテオーム解析により当該細胞の分子基盤を網羅的に解析することにより、肝炎ウイルス感染・複製に関与する宿主因子を同定し、④宿主因子とウイルス感染・複製の関連性を詳細解析し、肝炎ウイルス治療薬創出に資する新規創薬ターゲットの同定を目指した研究を施行する予定である。

#### E. 結論

Ad ベクター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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther.*, in press.
- 2) Kawabata K, Inamura M, Mizuguchi H. Efficient hepatic differentiation from human iPS cells by gene transfer. *Liver Stem Cells: Methods and Protocols*, Humana Press, USA (part of the Springer publishing group), in press.
- 3) 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)
- 4) 川端健二, 田代克久, 水口裕之. iPS 細胞への

遺伝子導入を用いた分化誘導の最適化、薬学雑誌、130、1527-1534 (2010)

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。

## 2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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-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.
- 3) 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.
- 4) 高山和雄, 稲村充, 田代克久, 形山和史, 櫻井文教, 古江-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な分化誘導, 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.
- 5) 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-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.
- 6) 高山和雄, 稲村充, 田代克久, 形山和史, 櫻井文教, 古江-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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

名称：幹細胞から肝細胞への分化誘導方法

出願番号：特願 2010-154225

出願日：2010/7/6

基礎出願：特願 2009-247342 (2009/10/28) 、

特願 2010-121282 (2010/05/27)

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス

振興財団

発明者：水口裕之, 川端健二, 稲村充,

古江美保.

### 2. 実用新案登録

該当事項なし

### 3. その他

該当事項なし

## 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

研究分担者 清原 知子（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究要旨：ウイルス性肝炎は社会的な問題となる疾病であり、ワクチンによる予防や効果的な治療薬の開発が望まれる。本研究はB型肝炎、E型肝炎を対象とした薬剤スクリーニング系の開発を目的とし、今年度はB型肝炎ウイルス（HBV）増殖系について検討を行った。HBVを産生するHepG2.2.15細胞を限界希釈法でクローニングしたところ、HBs抗原産生能が異なる複数のクローンを得た。目的に応じた細胞クローンの選択とその性状解析は薬剤スクリーニング系構築の課題である。

研究協力者 石井孝司、李天成：  
国立感染症研究所ウイルス第二部

確認されるようになった。また、E型肝炎には人獣共通感染症としての側面もある。現在E型肝炎ワクチンが開発中であるが、それと同時に治療薬も必要とされる。

本研究の目的は *in vitro* のウイルス培養系を用いて効率の良い薬剤スクリーニング系を開発することである。

#### A. 研究目的

B型肝炎はB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) の感染によって引き起こされる急性および慢性肝炎である。世界中で20億人のHBV感染者が存在し、そのうち3億5千万人が持続感染者で、年50万～70万人がB型肝炎やB型肝炎に起因する疾病（肝硬変・肝がんなど）で死亡していると推定されている。主に治療に用いられる薬剤は、抗ウイルス作用のあるインターフェロン（IFN）と核酸アナログの2剤であるが、副反応や投与時期・期間、薬剤耐性株の誘導などの問題もあり、新たな薬剤の開発が望まれている。

一方、E型肝炎はE型肝炎ウイルス (hepatitis E virus, HEV) による経口急性肝炎である。以前は輸入感染症と考えられていたが調査が進むにつれて国内感染例が

#### B. 研究方法

本年度はHBVを産生するHepG2.2.15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。クローニングは限界希釈法で行った。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。

（倫理面への配慮）

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

#### C. 研究成果

元の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。

#### D. 考察

HepG2. 2. 15 細胞は HBs 抗原産生能が異な  
るクローンの集団であり、この中から薬剤  
スクリーニングに適したクローンを選択、  
性状を明らかにすることは有用である。  
今回は HBV 増殖のマーカーとして HBs 抗原  
を用いたが、他の HBV マーカーの動向につ  
いても検討が必要である。

#### E. 結論

*in vitro* の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 点が重要であり、  
今後の本研究の課題である。

#### F. 健康危険情報 (総括研究報告書)

#### G. 研究発表

該当無し

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, <u>Wakita T</u> , Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K.	Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms.	J Virol.	84(22)	12048-12057	2010
von dem Bussche A, Machida R, Li K, Loevinsohn G, Khander A, Wang J, <u>Wakita T</u> , Wands JR, Li J.	Hepatitis C virus NS2 protein triggers endoplasmic reticulum stress and suppresses its own viral replication.	J Hepatol.	53(5)	797-804	2010
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, <u>Wakita T</u> , Watanabe M.	Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants.	Virology	405(2)	361-369	2010
Podevin P, Carpentier A, Pène V, Aoudjehane L, Carrière M, Zaïdi S, Hernandez C, Calle V, Méritet JF, Scatton O, Dreux M, Cosset FL, <u>Wakita T</u> , Bartenschlager R, Demignot S, Conti F, Rosenberg AR, Calmus Y.	Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes.	Gastroenterology	139(4)	1355-1364	2010
Kushima Y, <u>Wakita T</u> , Hijikata M.	A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production.	J Virol.	84(18)	9118-9127	2010
Banaudha K, Orenstein JM, Korolnek T, St Laurent GC 3rd, <u>Wakita T</u> , Kumar A.	Primary hepatocyte culture supports hepatitis C virus replication: a model for infection-associated hepatocarcinogenesis.	Hepatology	51(6)	1922-1932	2010
Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, <u>Wakita T</u> , 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.	202(1)	75-85	2010
Amaud N, Dabo S, Maillard P, Budkowska A, Kalliampakou KI, Mavromara P, Garcin D, Hugon J, Gatignol A, Akazawa D, <u>Wakita T</u> , Meurs EF.	Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation.	PLoS One	5(5)	e10575	2010
Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, <u>Wakita T</u> , Toyoda T.	RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells.	PLoS Pathog.	6(4)	e1000885	2010
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, <u>Wakita T</u> .	Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope.	Biochem Biophys Res Commun. Res Commun.	395(4)	565-571	2010
Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, <u>Wakita T</u> , Suzuki T.	Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription.	J Virol.	84(11)	5824-5835	2010

Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, Fukai K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, <u>Tanaka Y</u> , 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
<u>Tanaka Y</u> , Sugiyama M, Mizokami M.	Direct cytopathic effects of particular hepatitis B virus genotypes in immunosuppressive condition.	Uirusu	60(1)	79-86	2010
Kondo Y, Ueno Y, Kobayashi K, Kakazu E, Shiina M, Inoue J, Tamai K, Wakui Y, <u>Tanaka Y</u> , 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)	202-213	2010
Tripathi, L. P., C. Kataoka, S. Tagawa, <u>K. Moriishi</u> , Y. Mori, Y. Matsuura, and K. Mizuguchi.	Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions.	Mol. Biosyst.	6	2539-2553	2010
Tanaka, Y., Y. Mori, H. Tani, T. Abe, <u>K. Moriishi</u> , H. Kojima, T. Nagano, T. Okabe, T. Suzuki, M. Tatsumi, and Y. Matsuura	Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus.	Microbiol. Immunol.	54	206-220	2010
<u>Moriishi, K.</u> , I. Shoji, Y. Mori, R. Suzuki, T. Suzuki, C. Kataoka, and Y. Matsuura	Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus.	Hepatology	52	411-420	2010
<u>Sakamoto N</u> , Nakagawa, M Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Nishimura- Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Ito Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M	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
Yamamoto M, <u>Sakamoto N</u> (equal contribution), Nakamura T, Itsui Y, Nakagawa M, Nishimura- Sakurai Y, Kakinuma S, Azuma S, Tsuchiya K, Kato T, Wakita T, Watanabe M	Studies on virus kinetics using infectious fluorescence- tagged hepatitis C virus cell culture.	Hepatology Research			2011 in press
Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, <u>Sakamoto N</u> , Tetsuya Nakamura T, Watanabe M	The suppression of Hath1 gene expression directly regulated by Hes1 via Notch signaling causes goblet cell depletion in ulcerative colitis.	IBD			2010 in press
Iwasaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Zheng X, Kano Y, Okada E, Araki A, Suzuki S, <u>Sakamoto N</u> , Kitagaki K, Akashi T, Eishi Y, Nakamura T, Mamoru Watanabe M	Longitudinal cell formation in the entire human small intestine is correlated with the localization of Hath1 and Klf4.	J Gastroentrol.			2010 in press
Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Tamori A, Nakagawa M, Izumi N	Sequences in the Interferon Sensitivity Determining Region and Core Region of Hepatitis C Virus Impact Pretreatment	J Medical Virol.			2011 in press



	Prediction of Response to Peg-interferon Plus Ribavirin: Data Mining Analysis.				
Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Yatsuhashi H, Izumi N	Pretreatment Prediction of response to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C using data mining analysis.	J Gastroenterol.			2010; EPub
Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Asahina Y, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Watanabe M, Sakai A, Honda M, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi I N, Mizokami M	Pretreatment Prediction of Response to Pegylated-Interferon Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C using Genetic Polymorphism in IL28B and Viral Factors.	J Hepatol.			2010 in press
Sakamoto N, Tanaka Y, Nakagawa M, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Enomoto N, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Nishida N, Tokunaga K, Honda M, Ito K, Mizokami M, Watanabe M	ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon-alfa and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C.	Hepatology Research	40(11)	1063-1071	2010
kameyama K, Nemoto Y, Kanai T, Shinohara T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Totsuka T, Hibi T, Watanabe M	L-2 is positively involved in the development of colitogenic CD4+ IL-7R-high memory T cells in chronic colitis.	Eur J Immunol	40(9)	2423-2436	2010
Suda G, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Mishima K, Onuki-Karakama Y, Yamamoto M, Funaoka Y, Watanabe T, Kiyohashi K, Nitta S, Azuma S, Kakinuma S, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Watanabe M	IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones.	Virology	407	80-90	2010
Karakama Y, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Oooka S, Azuma S, Tsuchiya K, Onogi H, Hagiwara M, Watanabe M	Inhibition of HCV replication by a specific inhibitor of serin-arginine-rich protein kinase.	Antimicrob Agent Chemother	54 (8)	3179-3186	2010
Nakagawa M, Sakamoto N, Ueyama M, Mogushi K, Nagaie S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka H, Enomoto N, Watanabe M	Mutations in the Interferon Sensitivity Determining Region and virological response to combination therapy with Pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b infection.	J Gastroenterol	45(6)	656-665	2010
Nishimura-Sakurai Y, Sakamoto N, Mogushi K, Nagaie S, Nakagawa M, Itsui Y, Sekine-Osajima Y, Tasaka-Fujita M, Onuki-Karakama Y, Suda G, Mishima K, Yamamoto M, Ueyama M, Funaoka Y, Watanabe T, Chen C-H, Kakinuma S, Tsuchiya K, Tanaka H, Enomoto N, Watanabe M	Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells.	J Gastroenterol	45(5)	523-536	2010
Kim KJ, Kook Kim KH, Kim HY, Cho HK, Sakamoto N, Cheong JH	Curcumin inhibits hepatitis C virus replication via suppressing the Akt-SREBP-1 pathway.	FEBS Letter	584(4)	707-712	2010
Mizui T, Yamashina S, Tanida I, Takashima M, Takei Y, Ueno T, Sakamoto N, Ikejima K, Kitamura T, Enomoto N, Sakai T, Kominami E, Watanabe S	Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy.	J Gastroenterol.	45(2)	195-203	2010
Arita M, Takebe Y, Wakita T,	A bifunctional anti-enterovirus	J Gen Virol.	91	2734-2744	2010

Shimizu H	compound that inhibits replication and the early stage of enterovirus 71 infection.				
Takebe Y, Liao H, Hase S, Uenishi R, Li Y, Li XJ, Han X, Shang H, Kamarulzaman A, Yamamoto N, Pybus OG, Tee KK	Reconstructing the epidemic history of HIV-1 circulating recombinant forms CRF07_BC and CRF08_BC in East Asia: the relevance of genetic diversity and phylodynamics for vaccine strategies.	Vaccine	28 Suppl 2	B39-44	2010
Li Y, Uenishi R, Hase S, Liao H, Li X-J, Tsuchiura T, Tee KK, Yang R, Pybus OG, Takebe Y	Explosive HIV-1 subtype B' epidemics in Asia driven by geographic and risk group founder events.	Virology	402(2)	223-227	2010
Li Y, Tee KK, Liao H, Hase S, Uenishi R, Li X-J, Tsuchiura T, Yang R, Govindasamy S, Yean Kong Yong, YK, Hong Yien Tan, HY, Pybus OG, Kamarulzaman A, Takebe, Y	Identification of a novel second-generation circulating recombinant form (CRF48_01B) in Malaysia: a descendant of the previously identified CRF33_01B.	J Acquir Immune Defic Syndr.	54(2)	129-136	2010
Han X, Dai D, Zhao B, Liu J, Ding H, Zhang M, Hu Q, Lu C, Goldin M, Takebe Y, Zhang L, Shang H.	Genetic and epidemiologic characterization of HIV-1 infection In Liaoning Province, China.	J Acquir Immune Defic Syndr	53 Suppl 1	S27-33	2010
Tee KK, Lam TT, Chan YF, Bible JM, Kamarulzaman A, Tong CY, Takebe Y, Pybus OG.	Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene.	J Virol.	84(7)	3339-3350	2010
Ikeda M. et al.	Anti-ulcer Agent Teprenone Inhibits Hepatitis C Virus Replication: Potential Treatment for Hepatitis C	Liver Int		in press	2011
Mori K. et al.	Mechanism of action of Ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system	Virus Res		in press	2011
Ariumi Y. et al.	The ESCRT System Is Required for Hepatitis C Virus Production.	PLoS One	6	e14517	2011
Oshiumi H. et al.	Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN- $\beta$ induction.	PLoS One	5	e14528	2010
Mori K. et al.	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
Ikeda F. et al.	Amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein are not associated with intracellular antiviral response to interferon- $\alpha$ in vitro	Liver Int	9	1324-1331	2010
Tanaka T. et al.	Generation of single-chain Fvs against detergent-solubilized recombinant antigens with a simple coating procedure	J. Biosci. Bioeng	110	374-376	2010
Shigoka M. et al.	Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development	Path. Int.	60	351-357	2010
Nozaki A. et al.	Hydroxyurea as an inhibitor of	Arch Virol.	155	601-605	2010

	hepatitis C virus RNA replication				
Nkamura M. et al.	An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus.	World J. Gastroenterol.	16	184-192	2010
Suzuki, T., Isobe, T., Kitagawa, M., and Ueda, K.	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA positively affects on ubiquitylation of p53.	Biochem. Biophys. Res. Comm.	403	194-197	2010
Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., Watanabe, S.	KSHV-infected PEL cell lines exhibit a distinct gene expression profile.	Biochem. Biophys. Res. Comm.	394	482-487	2010
Ogawa Y, Nonaka Y, Goto T, Ohnishi E, Hiramatsu T, Kii I, Yoshida M, Ikura T, Onogi H, Shibuya H, Hosoya T, Ito N, and <u>Hagiwara M.</u>	Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A.	Nature Commun. 1, Article	86	doi:10.1038/ncomms1090	2010
Karakama Y, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Oooka M, Azuma S, Tsuchiya K, Onogi H, <u>Hagiwara M.</u> and Watanabe M.	Inhibition of hepatitis C virus replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase.	Antimicrob Agents Chemother	54	3179-3186	2010
Kii I, Shiraishi A, Hiramatsu T, Matsushita T, Uekusa H, Yoshida S, Yamamoto M, Kudo A, <u>Hagiwara M.</u> and Hosoya T.	Strain-promoted double-click reaction for chemical modification of azido-biomolecules.	Org Biomol Chem.	8	4051-4055	2010
Takeuchi A, Hosokawa M, Nojima T, <u>Hagiwara M.</u>	Splicing reporter mice revealed the evolutionally conserved switching mechanism of tissue-specific alternative splicing.	PLOS One	5	e10946	2010
Kuroyanagi H, Ohno G, Sakane, H, Maruoka, H, and <u>Hagiwara M.</u>	Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation in vivo using fluorescence reporters in transgenic Caenorhabditis elegans.	Nature Protoc.	5	1495-1517	2010
Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodoran G, <u>Hagiwara M.</u> , Harper SJ, Woolard J, Lodomery MR, and Bates DO	Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms - a novel therapeutic strategy for angiogenesis.	J. Biol. Chem.	285	5532-5540	2010
Hikosaka K, Noritake H, Kimura W, Sultana N, Sharkar MTK, Tagawa Y, Uezato T, Kobayashi Y, Wakita T, <u>Miura N.</u>	Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occludin in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry.	Biomed Res			2011 in press
Kimura W, Machii M, Xue X-D, Sultana N, Hikosaka K, Sharkar MTK, Uezato T, Matsuda M, Koseki H, <u>Miura N.</u>	Irx1 mutant mice show reduced tendon differentiation and no patterning defects in musculoskeletal system development.	Genesis	49	2-9	2011
Yang Z, Hikosaka K, Sharkar MTK, Tamakoshi T, Chandra A, Wang B, Itakura T, Xue X-D, Uezato T, Kimura W, <u>Miura N.</u>	The mouse forkhead gene Foxp2 modulates expression of the lung genes.	Life Sci	87	17-25	2010
Xue X-D, Kimura W, Wang B, Hikosaka K, Itakura T, Uezato T, Matsuda M, Koseki H, <u>Miura N.</u>	A unique expression pattern of Tbx10 in the hindbrain as revealed by Tbx10 <sup>lacZ</sup> allele.	Genesis	48	295-302	2010
Yoshida T, Kondoh M, Ojima M,	Adenovirus vector-mediated	Nucleic Acids Res			in press

Mizuguchi H, Yamagishi Y, Sakamoto N, <u>Yagi K.</u>	assay system for hepatitis C virus replication.				
Kakutani H, Takahashi A, Kondoh M, Sakihama T, Hamakubo T, <u>Yagi K.</u>	A novel screening system for claudin binder using baculoviral display.	PLoS ONE			in press
Yoshida T, Kondoh M, <u>Yagi K.</u>	Promising targets for anti-hepatitis C virus agents.	Curr Med Chem			in press
<u>Yagi K.</u> , Hayashi T.	Cutting-edge research on hepatitis C treatment and the clinical perspectives.	Yakugaku Zasshi	130	141-142	2010
Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T, <u>Yagi K.</u>	Mucosal vaccination using claudin-4 targeting.	Biomaterials	31	5463-5471	2010
Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Kobayashi M, Tamesada M, <u>Yagi K.</u>	Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl4-induced liver injury.	Biol Pharm Bull	33	983-987	2010
Kakutani H, Kondoh M, Saeki R, Fujii M, Watanabe Y, Mizuguchi H, <u>Yagi K.</u>	Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin.	Eur J Pharm Biopharm	75	213-217	2010
Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, <u>Mizuguchi H.</u>	Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX.	<i>Mol. Ther.</i>			in press
Kawabata K, Inamura M, <u>Mizuguchi H.</u>	Efficient hepatic differentiation from human iPS cells by gene transfer.	Liver Stem Cells: Methods and Protocols			in press
Tashiro K, Kawabata K, Inamura M, Takayama K, Furukawa N, Sakurai F, Katayama K, Hayakawa H, Furue-Kusuda M, <u>Mizuguchi H.</u>	Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells.	Cell Reprogram.	12	501-507	2010