

in the US will increase over the next two decades. Proc Natl Acad Sci USA. 2002. 99 (24) :15584-15589.

特許

1. C型肝炎の治療効果を予測するためのマーカー及びC型肝炎の治療効果の予測を行う方法並びにC型肝炎の予防又は治療剤 田中靖人、溝上雅史、徳永勝土 2009年8月21日。特願2009-192615。特許出願中。財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、公立大学法人名古屋市立大学。
2. HBV感染症を治療または予防するための医薬組成物  
溝上雅史、田中靖人、杉山真也、須藤正幸。2008年6月19日。特願2008-160601。出願中。公立大学法人名古屋市立大学、中外製薬株式会社。
3. 肝炎ウイルスの生体外増殖方法およびその用途  
山口達哉、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人。2006年10月4日。特願2006-260088。出願中。東洋紡績株式会社。

## 平成22年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題： ウイルス性肝炎の病態に応じたウイルス側因子の解明と治療応用  
課題番号： H22 - 肝炎 - 一般 - 006  
予定期間： H22年度から H24年度まで  
研究代表者： 榎本 信幸  
所属研究機関： 山梨大学  
所属部局： 第一内科  
職名： 教授  
年次別研究費(交付決定額)：1年目 80,600,000円

### I. 研究の意義

1. 肝炎ウイルス感染の治療抵抗性および病変進展、肝発癌が大きな問題となっている。
2. これらの治療反応性あるは病態の多様性は肝炎ウイルス遺伝子および宿主遺伝子の多様性を背景としており、ウイルス側因子の解明により難治性ウイルス肝炎の制御が期待される。

### II. 研究の目的、期待される成果

本研究は以下の目的で実施する。

1. 治療抵抗性肝炎ウイルス感染の病態を肝炎ウイルス遺伝子変異から解析し診断・治療法を確立する。
2. ウイルス肝炎の多様な病態(病変進展、発癌)に関連する肝炎ウイルス遺伝子変異を明らかとして、宿主因子との相互作用を解明して診断・予防・治療に展開する。
3. 病態に関連する肝炎ウイルス遺伝子変異の機能を解明することにより新規治療法の開発の基盤とする。
4. 肝炎ウイルス遺伝子情報を一般臨床に応用するために遺伝子検査・解析法の標準化を行う

本研究の結果として、直接的には以下の成果が期待される

1. 現行治療の効果的な適用により安全・確実なウイルス肝炎治療体系が実現する。
2. ウイルス性肝炎の多様な経過・病態に関与するウイルス因子を解明により、宿主因子との統合的な理解から予後予測診断・新たな治療標的の同定が可能となる。
3. 治療抵抗性・病変進展・発癌の病態の解明により肝炎ウイルス感染機構に関する理解が深まるとともに肝炎制御法開発の新たな基盤が形成される。
4. 研究により得られる肝炎ウイルス遺伝子情報を一般臨床へ導入するための基盤が形成される。

### III. 1年間の研究成果

●研究代表者(榎本信幸):ハイスループットの HCV ゲノムワイド解析システムを構築し、多数症例で HCV 全遺伝子配列を網羅的に決定し、IL28B 遺伝子とは独立に NS5A 遺伝子に Peginterferon/Ribavirin 併用療法の治療効果を決定するアミノ酸変異、NS3 領域には未治療症例であっても PI 耐性変異が存在することを解明した。次世代シーケンサーによる肝炎ウイルス遺伝子解析法を開発、HCV core 遺伝子変異が肝癌発症に関連する一方 IL28B は関連しないことを見出した。

●研究分担者(横須賀収):IL28B SNP は Peginterferon/Ribavirin 治療効果と強く関連するとともに、HCV コア変異や肝脂肪化との関連も示唆された。

●研究分担者(朝比奈靖浩):IL28BB 遺伝子の SNP と関連するウイルス遺伝子変異および宿主因子および自然免疫系遺伝子発現変化を明らかとした。

●研究分担者(鈴木文孝):B型肝炎に対する核酸アナログ使用による多剤耐性ウイルスの出現率とタイプを明らかにした。C型肝炎に対する PEG-IFN/RBV/プロテアーゼ阻害剤の効果に関係する HCV 遺伝子(Core aa70)を解明した。

●研究分担者(加藤直也):HCV core70 変異など治療抵抗性 HCV の定量法を確立し、治療抵抗性 HCV の治療中・後の動態を明らかにした

●研究分担者(中川美奈):NS5B と GBP-1 が相互作用を示し、NS5B が GBP-1 のもつ GTPase 活性を阻害することが HCV 持続増殖の一因と考えられた。さらに NS5B 存在下では GBP-1 蛋白発現が抑制されることが確認され、これらの相互作用が IFN による HCV 排除または IFN 抵抗性に関与している可能性が示唆された。

●研究分担者(堀田博):HCV-2a 及び-2b の PEG-IFN/RBV の治療効果が、NS5A の特定領域(IRRDR 及び ISDR)のアミノ酸配列の多様性と相関していることを確認した。

●研究分担者(加藤宣之):Li23 由来の細胞システムで検出されたリバビリンの抗 HCV 活性は、イノシンーリン酸脱水素酵素の阻害により細胞内 GTP 濃度が下がることに起因していること、そして、その結果、イノシンーリン酸が蓄積されることを見出した。Li23 由来の HCV 複製細胞からインターフェロン抵抗性細胞株を樹立した。

●研究分担者(鈴木哲朗):HCV 持続感染細胞を、HCV ポリメラーゼ阻害剤また NS4A 阻害剤存在下で長期間培養し NS4A 阻害剤に対する感染細胞の低感受性を観察した。

●研究分担者(今村道雄):HCV レプリコン細胞および HCV 感染マウスを用いて、ME3738 が IFN による IFN 誘導遺伝子の発現を促進し、抗 HCV 効果を増強することを見いだした。HCV 感染マウスに NS3/4A プロテアーゼ阻害剤と NS5B ポリメラーゼ阻害剤を併用することにより、マウス血中および肝臓内 HCV が消失することを証明した。

- 研究分担者 (中本安成): C型慢性肝炎・肝がん患者の CD4(+)/CD25(high)Foxp3(+)制御性 T 細胞(Treg) について、高い抑制性サイトカイン産生能を示し、肝がんの進展(最大腫瘍径)と関与することを示した。
- 研究分担者 (松本武久): NS2/3 プロテアーゼ阻害剤スクリーニング系開発のための活性化型 NS2/3 プロテアーゼタンパク質の in vitro 大量合成に成功した。
- 研究分担者 (山下篤哉): NS2をコードした薬剤ハイスループットスクリーニング可能なHCVサブゲノムレプリコン細胞を樹立、Cell based NS2/3プロテアーゼ阻害剤のハイスループットスクリーニング系を樹立した。新たな創薬ライブラリーソースとして海洋生物抽出物を用いて、HCVの増殖を阻害する物質を同定した。
- 研究分担者 (藤井秀樹): HCV 関連 HCC40 症例の凍結サンプルを用い、マイクロアレイによる遺伝子発現パターンでサブクラス分類し、これらの臨床学的特徴を分析した。

#### IV. 23~24 年度の課題

1. 核酸アナログ治療中に生じる HBV 遺伝子変異の解析と臨床応用
2. 治療反応性を規定している HCV ゲノム変異の特徴の解明
3. 宿主側の自然免疫分子・IL28B 系変異が HCV 遺伝子変異と相互関連して治療抵抗性に関与する機序の検討
4. 病変進展・肝発癌に関与するウイルス遺伝子の解析
5. 培養細胞系およびマウスモデルを用いた変異ウイルスによる肝炎病態の解析
6. 変異肝炎ウイルスに有効な新規化合物の探索
7. 肝炎ウイルス遺伝子情報を臨床応用するための遺伝子検査・解析法の標準化

#### V. 行政施策への貢献の可能性

1. 現行治療の効果的な適用により安全、確実なウイルス肝炎治療体系が実現
2. ウイルス性肝炎の多様な経過・病態の解明から予後予測診断の開発・新たな治療標的の同定
3. 治療抵抗性・病変進展・発癌の病態の解明により肝炎制御法開発の新たな基盤が形成
4. 研究により得られる肝炎ウイルス遺伝子情報を一般臨床へ導入

#### VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

##### ●主任研究者 (榎本信幸)

Pre-treatment 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)

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**. 2010 Jun;45(6):656-65.

##### ●研究分担者 (藤井秀樹)

Gene expression in nontumoral liver tissue and recurrence-free survival in hepatitis C virus-positive hepatocellular carcinoma. **Mol Cancer**. 2010 Apr 9;9:74.

##### ●研究分担者 (横須賀収)

Initial Virological Response and Viral Mutation with Adefovir Dipivoxil Added to Ongoing Lamivudine Therapy in Lamivudine-Resistant Chronic Hepatitis B. **Dig Dis Sci**. 2010 Oct 7.

##### ●研究分担者 (朝比奈靖浩)

Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology**. 2010 Aug;52(2):518-27.

##### ●研究分担者 (鈴木文孝)

Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. **Hepatology**. 2010 ;52:421-9.

##### ●研究分担者 (中川美奈)

Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants. **Virology**. 405: 361-369, 2010

##### ●研究分担者 (堀田 博)

Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. **Intervirology**, 53(1): 49-54, 2010.

##### ●研究分担者 (加藤宣之)

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.** in press, 2010.

##### ●研究分担者 (鈴木哲朗)

Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. **Antiviral Res** 85: 520-524, 2010.

##### ●研究分担者 (今村道雄)

Practical Evaluation of a Mouse with Chimeric Human Liver Model for Hepatitis C Virus Infection Using an NS3-4A Protease Inhibitor. **J Gen Virol** 2010;91:1668-7

##### ●研究分担者 (中本安成)

Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in IL28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. **Gastroenterology** 139: 499-509, 2010.

## Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

研究の目的: ウイルス肝炎の病態を規定する肝炎ウイルス遺伝子変異の解明と治療応用

背景 : 肝炎ウイルス遺伝子変異による多彩な病態  
B型肝炎ウイルス(HBV)に対する核酸アナログ治療  
ポリメラーゼ変異  
→長期投与による核酸アナログ耐性ウイルスの出現の予測は困難  
C型肝炎ウイルス(HCV)に対するインターフェロン・リバビリン治療  
コア・NS5A変異→依然として多数の治療抵抗性患者が存在  
難治性患者は肝硬変・肝癌に進展  
病変進展・発癌の多様性の機序は不明  
→ウイルス・宿主遺伝子の多様性  
肝炎ウイルス遺伝子変異の解析による病態解明・診断治療法の開発が急務

### H22年度の成果

#### 核酸アナログ耐性HBV感染の解析

ラミブジンおよびアデホビル耐性に関与するHBV遺伝子変異

#### 治療抵抗性HCV感染の解析

治療抵抗性HCVの全ゲノム解析による耐性遺伝子の解明  
NS5A遺伝子変異(ISDRとIRRDR)がIL28Bとは独立に治療反応性を決定  
薬剤抵抗性の解明  
HCV-NS5B蛋白によるインターフェロン系抑制機構の解明  
Li23細胞によるリバビリンの作用機序の解明  
プロテアーゼ耐性NS3変異の未治療例での頻度  
ウイルス因子と宿主因子の相互関係  
コア70変異がIL28B多型と関連し、インターフェロンおよびプロテアーゼ阻害剤の  
治療効果を規定

#### 病変進展・発癌に関与するウイルス遺伝子変異

コア70変異は発癌と関連する一方、IL28B多型は関連しない  
肝癌の遺伝子発現パターンが臨床像を規定

#### 新規の診断治療法の開発基盤

肝炎ウイルス変異解析への次世代シーケンサの導入  
肝炎モデルマウス・細胞培養系でのプロテアーゼ阻害剤の解析系の開発

期待される成果: 肝炎ウイルス遺伝子情報の診断・治療への応用、新規治療法の開発

治療抵抗性・病変進展・発癌に関与するウイルス変異の病態解明→  
予後予測による病変進展予防・早期診断・治療アルゴリズムの開発  
宿主因子との相互関係、発癌・病原性機構の解明による新たな治療標的の同定  
肝炎ウイルス遺伝子情報を臨床応用するための遺伝子検査・解析法の標準化→  
検査法・解析アルゴリズムの標準化と検証、有用性のエビデンスの確立  
治療効果の向上により肝硬変・肝癌死亡の減少

## ○研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

昭和 62 年(1987)–平成 2 年(1990) 金沢医科大学・消化器内科  
平成 3 年(1991)–平成 12 年(2000) 東京医科歯科大学・第2内科  
平成 13 年(2001)–平成 15 年(2003) 東京医科歯科大学・消化器内科  
平成 16 年(2004)以降 山梨大学医学部・第1内科

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

金沢医科大学・消化器内科 高田 昭 教授  
東京医科歯科大学・第2内科 丸茂文昭 教授  
東京医科歯科大学・保健衛生学科 佐藤千史 教授  
東京医科歯科大学・消化器内科 渡辺 守 教授  
武蔵野赤十字病院 泉 並木 副院長

### ・主な研究課題

1. HCV における治療反応性および病態を決定するウイルスおよび宿主因子の解明
2. HBV 遺伝子変異と病態
3. HCV 培養細胞モデルによる HCV 増殖機構、薬剤の抗ウイルス作用について分子生物学的研究
4. 消化器癌における発癌機序について網羅的遺伝子解析

### ・これまでの研究実績

1. Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology**. 2010 Aug;52(2):518-27.
2. Viral factors influencing the response to the combination therapy of peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C. **J Gastroenterol**. 2009;44(10):1009-15.
3. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. **J Infect Dis**. 2008 Feb 1;197(3):361-70.
4. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. **Gastroenterology**. 2008 May;134(5):1396-405.
5. The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase levels are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy. **J Hepatol**. 2008 May;48(5):736-42. Epub 2008 Feb 26.
6. Development of plaque assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. **Virology** 2008 Feb 5;371(1):71-85.
7. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. **J Gastroenterol Hepatol**. 2008 Sep;23(9):1437-47.
8. HCV nonstructural proteins responsible for suppression of RIG-I/Cardif -induced interferon response. **J Gen Virol** 2007 Dec;88(Pt 12):3323-33.
9. Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. **J Viral Hepatitis** 2006 Oct;13(10):690-700.
10. Site-specific mutation of the interferon sensitivity-determining region (ISDR) modulates hepatitis C virus replication. **J Viral Hepatitis** 2006 Sep;13(9):582-90.
11. Viral load change and sequential evolution of entire hepatitis C virus genome in Irish recipients of single source-contaminated anti-E immunoglobulin. **J Viral Hepatitis** 2005 Nov;12(6):594-603.
12. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. **J Hepatol**. 2005 Oct;43(4):623-9.
13. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**. 2005 Oct;42(4):962-73.
14. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin A is mediated by blockade of cyclophilins. **Gastroenterology**. 2005 Sep;129(3):1031-41.
15. Characteristic sequence changes of hepatitis C virus genotype 2b associated with sustained biochemical response to IFN therapy. **J Viral Hepat**. 2005 May;12(3):251-61.
16. Introduction of NS5A mutations enables subgenomic HCV replicon derived from chimpanzee-infectious HC-J4 isolate to replicate efficiently in Huh-7 cells. **J Viral Hepat**. 2004 Sep;11(5):394-403.
17. Quantitation of the level of hepatitis delta virus RNA in serum, by real-time polymerase chain reaction--and its possible correlation with the clinical stage of liver disease. **J Infect Dis**. 2004 Apr 1;189(7):1151-7. Epub 2004 Mar 12.
18. Regulation of hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 1. **J Virol**. 2004 Sep;78(18):9713-20.
19. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- alpha. **J Infect Dis**. 2004 Apr 1;189(7):1129-39. Epub 2004 Mar 16.
20. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. **Biochem Biophys Res Commun**. 2004 Jan 2;313(1):42-7.
21. Chronic HDV Infection with Genotype IIb Variant is Correlated with Progressive Liver Disease. **J Gen Virol** 2003 Dec;84(Pt 12):3275-89.
22. Hepatitis C Virus NS5A Protein Inhibits TNF-alpha Mediated Apoptosis in Huh7 Cells. **J Infect Dis** 2003 Nov 15;188(10):1537-44.
23. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. **EMBO Rep** 2003 Jun;4(6):602-8.
24. Sequence element correlating with circulating viral load in genotype 1b hepatitis C virus infection. **Virology** 311:376-83, 2003.  
Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. **N Engl J Med** 334:77-81, 1996.

●特許番号 2939171 および 3629372:ジェノタイプ 1b のC型肝炎ウイルスに対する治療の有効性の判定方法及びそのためのプライマー

## 平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：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

課題番号：H22-肝炎-一般-007

予定期間：H22年度からH24年度まで

研究代表者：脇田 隆字

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：ウイルス第二部

職名：部長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 62,000,000 円

### I. 研究の意義

- (1) 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。
- (2) HCV感染に対する現在の治療は不十分であり、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。一方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。
- (3) E型肝炎ウイルス感染症は輸入感染症としてだけでなく、人獣共通感染症として問題となってきた。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。
- (4) 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、新たな治療薬の開発が必要である。

### II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HCV感染増殖機構の解析と新規治療法の開発
- (2) HCV培養系による抗ウイルス薬スクリーニング
- (3) HBV感染増殖機構の解析と新規治療法の開発
- (4) HBV増殖系による抗ウイルス薬スクリーニング
- (5) HEV感染増殖機構の解析と抗ウイルス薬スクリーニング
- (6) HCV感染動物モデル開発
- (7) 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

### III. 1年間の研究成果

- ・研究代表者(脇田隆字)：HCVのライフサイクルに関わる宿主因子を解析した。HepG2 2.2.15細胞のリクローニングを行い、HBs抗原産生能が高いクローンを得た。これを用いて薬剤スクリーニングをおこなった。HEVのウイルス培養系および感染性クローンを確立した。
- ・研究分担者(土方 誠)：ヒト不死化肝細胞立体培養実験系の解析から、立体培養による宿主遺伝子発現変化を同定した。その中でプロスタグランジン(PG)合成酵素群の遺伝子発現変化のHCV生活環に対する影響を検討した。その結果、PGI受容体アゴニストがHCVの感染性を抑制した
- ・研究分担者(田中靖人)：HBVの3次元培養系の確立のために不死化ヒト肝細胞および肝癌細胞株を用い、中空糸ならびにスフェロイドによる培養系を比較検討し、HBV感染を確認した。
- ・研究分担者(森石恒司)：PA28 $\gamma$ を薬剤標的としてスクリーニングする系として、GAL4およびVP16融合蛋白質として発現させたPA28 $\gamma$ の多量体形成を培養細胞内で評価出来る系を確立した。
- ・研究分担者(坂本直哉)：インターフェロン効果を増強する化合物の大規模スクリーニングを行い、3種の化合物とその誘導体にインターフェロン応答増強効果、及び抗ウイルス効果の増強を認めた。

また、抗ウイルス化合物のスクリーニングによりウイルス増殖を抑制する化合物 8 種類を同定した。類似化合物の構造活性相関と作用機構を検討中。

- ・研究分担者(武部 豊)：抗 HIV 活性をもつグリフィスシン（高マンノース型糖鎖特異結合タンパク質）が HCV エントリーを特異的に阻害した。
- ・研究分担者(池田正徳)：2 種類の肝細胞株 (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開発した。
- ・研究分担者(上田啓次)：HBV pseudotype (HBVp) を用いて、ヒト肝臓 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。培養肝がん細胞株への HBVp の感染性が向上した。
- ・研究分担者(加藤孝宣)：VitD 誘導体の一つが HCV のウイルス粒子形成を阻害した。
- ・研究分担者(萩原正敏)：抗 HCV 作用機構のある蛋白リン酸化酵素阻害剤の標的リン酸化酵素を同定した。この化合物はフラビウイルス粒子産生を阻害した。
- ・研究分担者(三浦直行)：HCV 感染に重要な CD81, SR-BI, CLDN1, OCLN 発現するマウス (CCSO マウス) を作製した。HCV の E2 蛋白は野生型マウス肝臓切片には結合できないが、CCSO マウス肝臓切片には結合した。
- ・研究分担者(八木清仁)：ヒト iPS 細胞由来肝細胞では CD81, SR-BI, claudin-1, occludin が発現していた。
- ・研究分担者(水口裕之)：肝臓分化に必要な転写因子を、細胞分化の最適な時期に iPS 細胞へ導入することで、アルブミンや薬物代謝酵素を高発現する肝細胞の作製に成功した。

#### **IV. 23～24 年度の課題**

- (1) PGI 受容体アゴニストの抗 HCV 薬としての効果をヒト肝臓キメラマウスを用いて、インターフェロンとの併用効果等より詳細に検討する。立体培養による細胞側の変化の中でさらに HCV の生活環と密接に関連する因子を同定し、新規抗 HCV 薬開発の標的を見出す。
- (2) スクリーニングされた抗 HCV 化合物の作用機構の解析、最適化を行い、構造活性相関を明らかにする。さらに、標的分子、作用メカニズムの解明を進める。*in vivo* での有効性の評価を行う。
- (3) HBV 高感染モデルを確立するべく感染持続に最適な条件を検討する。HBV 粒子と相互作用する宿主因子の分離・同定を図る。
- (4) HBV 増殖系によりスクリーニングされた化合物の作用機序を解析する。さらにケミカルバイオロジーの手法により最適化された化合物の作用機序解明を試みる。
- (5) HEV のウイルス培養系により抗ウイルス薬スクリーニングを実施する。
- (6) CCSO マウスと Cd81 ノックアウトマウスと Oc1n ノックアウトマウスを交配し、HCV 感染がおこるかどうか検定する。ヒト肝臓 RNA から作製したレンチウイルスライブラリー、CCSO マウスからの初代肝細胞、Alb-uPA/免疫不全マウスを用いて、新規 HCV 感染因子をクローニングする
- (7) より肝炎ウイルス感染研究に適したヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の開発のために、新たな遺伝子を導入する等、分化誘導法を改良する。各分化状態のヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV 感染受容体の発現を蛋白質レベルで解析して、HCV の結合や HCV ゲノム複製の可否を解析する。

#### **V. 行政施策への貢献の可能性**

肝炎ウイルスに対する新たな治療法の開発は患者の予後を改善し、肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らし、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与する。さらに、治療効果が高く、副作用の少ない治療法の開発のためには多くの作用機序による抗ウイルス薬の開発が必須である。

#### **VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)**

- ・研究代表者 (脇田隆字)

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.

Podevin P, Carpentier A, Pène V, Aoudjehane L, Carrière M, Zaidi 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.

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.

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.

- ・研究分担者(土方 誠)

H Kushima, T Wakita, M Hijikata: A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J. Virol.* (2010) 84(18), 9118-9127

プロスタグランジン I<sub>2</sub> のアゴニストを含む、C 型肝炎ウイルスの感染抑制剤、発明者 土方 誠、阿部雄一、脇田隆字、出願日 2010 年 9 月 30 日、出願番号 特願 2010-222045

- ・研究分担者(田中靖人)

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.* 2010 Aug 25. [Epub ahead of print]

- ・研究分担者(森石恒司)

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.

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.

- ・研究分担者(坂本直哉)

G Suda, N Sakamoto, Y Itsui, M Nakagawa, K Mishima, Y Onuki-Karakama, M Yamamoto, Yu Funaoka, T Watanabe, K Kiyohashi, S Nitta, 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.

K Mishima, N Sakamoto, Y Sekine-Osajima, M Nakagawa, Y Itsui, S Azuma, S Kakinuma, K Kiyohashi, A Kitazume, K Tsuchiya, M Imamura, N Hiraga, K Chayama, T Wakita M Watanabe: Cell culture and in-vivo analyses of plaque-derived cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology* 2010; 405:361-369.

- ・研究分担者(池田正徳)

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.* In press (2010)

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*, in press (2010)

- ・研究分担者(萩原正敏)

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.

- ・研究分担者(水口裕之)

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*, 2010. in press.

Tashiro K, Kawabata K, Inamura M, Takayama, 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)



Ⅶ. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図等

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

研究の背景

- 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。
- 現在のHBV, HCVの治療法は不十分であり、新たな抗ウイルス療法の開発が必要

研究の目的

- 肝炎ウイルス感染増殖機構の解析と新規治療標的の同定による治療法の開発
- ウイルス培養系による抗ウイルス薬スクリーニング
- 新規肝炎ウイルス感染動物モデル開発、iPS細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス培養系の開発

新規抗ウイルス薬開発サイクル



平成22年度の主な研究成果

- ①プロスタグランジン受容体アゴニストがHCVの感染性を抑制した
- ②中空糸ならびにスフェロイドによる培養系を比較検討し、HBV感染を確認した。
- ③インターフェロン効果を増強する化合物の大規模スクリーニングを行い、3種の化合物とその誘導体を同定した。
- ④抗HIV活性をもつグリフィシシン(高マンノース型糖鎖特異結合タンパク質)がHCVエントリーを特異的に阻害した。
- ⑤抗HCV作用機構のある蛋白リン酸化酵素阻害剤の標的リン酸化酵素を同定した。
- ⑥ヒトiPS細胞からアルブミンや薬物代謝酵素を高発現する肝細胞の作製に成功し、その肝細胞ではCD81, SR-BI, claudin-1, occludinが発現していた。

平成23年度以降の検討課題

- 肝炎ウイルスライフサイクル研究  
HBV, HEVのウイルス増殖過程はよくわかっていない。新規治療標的の同定を進める。トランスジェニックマウスによる感染動物モデル開発も進める。iPS細胞から誘導した肝細胞による肝炎ウイルス増殖を検討

- 抗ウイルス薬スクリーニングとその展開研究  
同定された化合物の誘導体を系統的に解析し至適の構造を決定する。また、抗HCV効果の作用機構、標的の探索を行う。候補化合物の作用をキメラマウスの系を用いて*in vivo*での有効性の評価を行う

## ●研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

昭和63年～平成4年：名古屋大学大学院医学研究科 研究テーマ：B型肝炎ウイルスの変異株と病態との関連について（坂本信夫教授および各務伸一講師（前愛知医大消化器内科教授））

平成4年～7年：米国ハーバード大学医学部およびマサチューセッツ総合病院癌センター・客員研究員、研究テーマ：アンチセンスオリゴDNAおよびアンチセンスRNAによる抗ウイルス治療法の基礎的検討（Jack Wands 準教授）

平成7年～10年東京都臨床医学総合研究所・主任研究員 研究テーマ：スイッチング発現系によるHCVトランスジェニックマウスの開発（小原道法室長）

平成10年～18年 東京都神経科学総合研究所・副参事研究員 研究テーマ：HCVおよびフラビウイルスに関する研究

平成18年～現在国立感染症研究所・ウイルス第二部・部長 研究テーマ：肝炎ウイルスと下痢症ウイルス

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

指導を受けた研究者は上記に記載した。

主な共同研究者：鈴木哲朗（浜松医大）、茶山一彰（広島大学）、堀田博・勝二郁夫（神戸大学）、瀬谷司（北大）、溝上雅史（国立国際医療研究センター）、田中靖人（名古屋市大）、T Jake Liang (NIH)、Eliane Meurs (Pasteur Institute)

### ・主な研究課題

C型肝炎ウイルス感染複製機構の解析

肝炎ウイルスの病原性発現機構の解析

肝炎ウイルス感染症の新たな治療法の開発

下痢症ウイルスおよび腸管感染ウイルスの研究

### ・これまでの研究実績

代表論文

- 1) 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.
- 2) Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med.* 2009 15(7):794-7.
- 3) Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol.* 2009 83(10):5137-47.
- 4) Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology.* 2008 48(3):732-40.
- 5) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 2007 9(9):1089-97.
- 6) Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol.* 2007 81(15):8030-40.

- 7) Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2334-9.
- 8) Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Miyamoto M, Kaga M, Barth H, Baumert TF, Dubuisson J, Wakita T. CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2007 81(10):5036-45.
- 9) T Wakita, T Pietschmann, T Kato, T Date, M Miyamoto, Z Zhao, K Murthy, A Habermann, H-G Kräusslich, M Mizokami, R Bartenschlager, T J Liang. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome. *Nat Med*. 2005 11:791-6.
- 10) J Zhong, P Gastaminza, G Cheng, S Kapadia, T Kato, DR Burton, SF Wieland, S Uprichard, T Wakita, FV Chisari. Robust Hepatitis C Virus Infection in Vitro. *PNAS* 2005, 102:9294-9.
- 11) Date T, Kato T, Miyamoto M, Zhao Z, Yasui K, Mizokami M, Wakita T. Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon Can Replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J Biol Chem*. 2004, 279:22371-6.
- 12) Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, Wakita T. Efficient Replication of the Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon. *Gastroenterol*. 2003, 125:1808-17.
- 13) Wakita T, Taya C, Katsume A, Kato J, Yonekawa H, Kanegae Y, Saito I, Hayashi Y, Koike M, and Kohara M. Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *J Biol Chem*. 1998 273: 9001-6.
- 14) Wakita T and Wands JR. Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligodeoxy-nucleotides: In vitro model for selection of target sequence. *J Biol Chem*. 1994 269:14205-10.
- 15) Wakita T, Kakumu S, Shibayama M, Yoshioka K, Ito Y, Shinagawa T, Ishikawa T, Takayanagi M, Morishima T. Detection of pre-C and core region mutants of hepatitis B virus in chronic hepatitis B virus carriers. *J Clin Invest*. 1991 88: 1793-801
- 16) Wakita T, Kakumu S, Yoshioka K, Ishikawa T, Ito Y, Shinagawa T. Cellular immune responses of peripheral blood mononuclear cells to HBV antigens during chronic and acute HBV infection. *Digestion* 1992 52 : 26-33
- 17) Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Ito Y, Takayanagi M, Higashi Y, Shibata M, Morishima T. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon - alpha therapy : relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992 16: 293-9

## 特許出願

- 特願 2004-243975 自律複製能を有する改変されたヒトC型肝炎ウイルスゲノム RNA 出願日：2004年8月24日
- 特願 2004-045489 ヒトC型肝炎ウイルスの全長ゲノムを含む核酸構築物及び該核酸構築物を導入した組換え全長ウイルスゲノム複製細胞、並びにヒトC型肝炎ウイルス粒子の作成方法
- 特願 2003-148242 遺伝子型 2a のC型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム由来の核酸を含む核酸構築物、及び該核酸構築物を導入した細胞

|                |  |
|----------------|--|
| US 08/474,700  | Antisense inhibition of hepatitis C virus      |
| US 08/467,859  | Chimeric hepatitis B/hepatitis C virus vaccine |
| PCT/US95/13552 | Hepatitis virus vaccine                        |

## 平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と発症予防に関する研究

課題番号：H22-肝炎-一般-008

予定期間：H22 年度から H24 年度まで

研究代表者：下遠野 邦忠

所属研究機関：千葉工業大学

所属部局：附属総合研究所

職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：1年目 60,960,000 円

### I. 研究の意義

- (1) HCV の持続感染・増殖を支える宿主要因の理解が不足している。
- (2) HCV の持続的増殖による宿主細胞の機能変化が不明である。
- (3) HCV による糖尿病の発症を予防する方策の確立を期待できる。
- (4) 遺伝子型 1b 型 HCV に対する抗 HCV 薬スクリーニング系ができる。
- (5) ヒト遺伝子編集酵素による HCV 複製制御機構は不明である

### II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HCV の持続感染・増殖を支える宿主要因の解明。
- (2) HCV の持続的増殖による宿主側の機能変化の解明。
- (3) HCV を排除するための新たな治療法の開発に繋がる。
- (4) HCV 感染が肝臓細胞において DHCR24 を発現誘導し、酸化ストレス誘導性アポトーシスの抵抗性を獲得に至る知見が得られる。
- (5) 遺伝子型 1b 型 HCV に対する新たな抗 HCV 薬の開発に道を拓く。
- (6) 新しい抗ウイルス機構として、ヒト遺伝子編集酵素による HCV への変異導入ならびに複製制御の仕組みを明らかにする

### III. 1 年間の研究成果

- (1) アポリポタンパク質 E が HCV 粒子に会合して存在し、感染性を規定している事を明らかにした。
- (2) Hsp70 が HCV 複製に係わることを見いだした。
- (3) HCV が長期間持続的に複製した細胞において特異的に発現量が増加した遺伝子を同定した。
- (4) HCV NS5Aの単独発現により GLUT2 と HNF-1 $\alpha$  の遺伝子発現が抑制されることを証明した。
- (5) HCV NS5A と結合する宿主蛋白として SMYD3 を同定した。
- (6) 種々の遺伝子型 1b 型のサブゲノムレプリコン複製細胞を樹立した。
- (7) HCV 感染による肝線維化の程度別のマイクロ RNA 発現プロファイルを作成した。

- (8) ヒト肝細胞に慢性感染した HCV のウィルスゲノムに生じている遺伝子変異の全体像を明らかにした。
- (9) HCV により誘導される IFN シグナルに重要な役割を果たす SUMO 化宿主因子を同定した。
- (10) ウイルスによる宿主免疫抑制の新たな分子機構を解明した。

#### **IV. 23～24 年度の課題**

- (1) HCV 粒子産生によるリポタンパク質の機能を明らかにし、脂肪代謝変化との関連を解明する。
- (2) Hsp90 と翻訳開始因子との会合が、HCV の RNA 翻訳に及ぼす影響を明らかにする
- (3) HCV 持続感染増殖細胞で発現変化した宿主遺伝子について、ウイルスの持続的複製に対する効果および細胞の増殖特性の獲得に及ぼす効果を明らかにする。
- (4) 機能変化が明らかになった遺伝子を標的として HCV の持続的複製を人為的に制御する系を開発する。
- (5) SMYD3 と NS5A の相互作用が糖・脂質代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響を解析する。
- (7) 遺伝子型 1b の感染性全長 HCV 持続感染培養肝細胞株の樹立とその応用。
- (8) 肝線維化の程度をマイクロ RNA 発現のプロファイリングにより診断する系を作成する。
- (9) ヒト遺伝子編集酵素による HCV 制御を in vitro のアッセイ系で解析する。

#### **V. 行政施策への貢献の可能性**

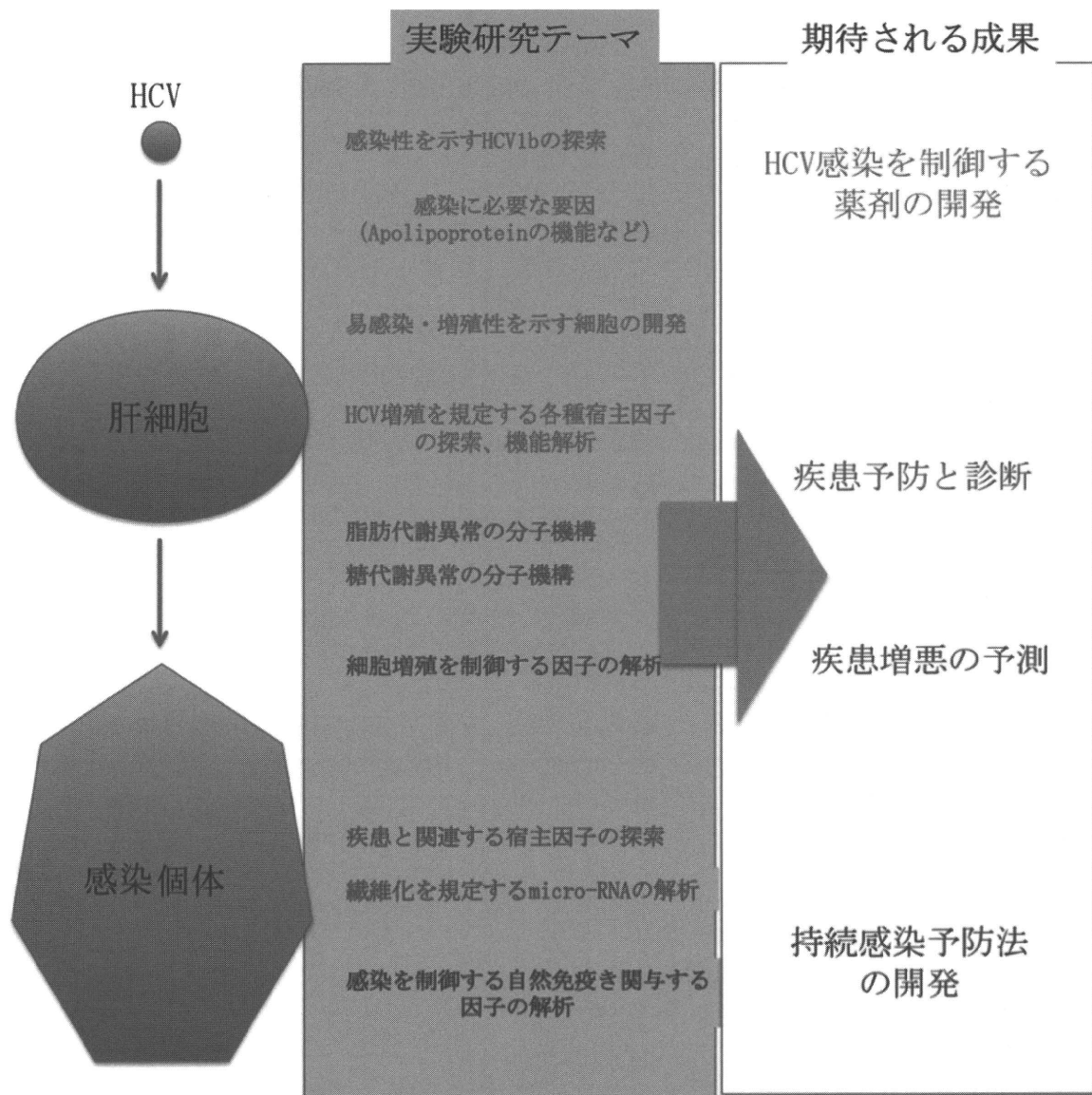
- (1) HCV 感染増殖と脂肪代謝異常について分子レベルでの理解が深まる結果、ウイルス増殖抑制および病態進行予防に向けた方策が見いだされるようになる。
- (2) HCV 増殖による細胞機能修飾の理解が進み、病態変化の診断に応用できるとともに、治療効果の向上を目指した抗 HCV 薬や発がん抑制薬の創薬研究につながることを期待される。
- (3) HCV 感染者の治癒あるいは QOL 改善に向けた貢献する。
- (4) HCV 感染による病態とくに繊維化の診断をし易くする。
- (5) 遺伝子編集酵素による、ウィルスゲノムへの変異の生成およびウイルス制御機構を明らかにすることで、HCV 感染症への新しい抗治療戦略の開発が期待できる。

#### **VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)**

1. Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J, Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. *J Virol.* 84(22):11761-11770, 2010.
2. Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol.* 84(22): 12048-12057, 2010.
3. Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H. Combination therapy for hepatitis C virus with heat-shock protein 90 inhibitor 17-AAG and proteasome inhibitor MG132. *Antivir Chem Chemother.* 20:161-167. 2010.
4. Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang D-P, Ide Y-H, Hotta H. 17 $\beta$ -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiol Immunol.* 54(11): 684-690, 2010.

5. Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *J Cell Biochem.* 111(3): 676–685, 2010.
6. Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 82(8): 1364–1370, 2010.
7. 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.* in press, 2010.
8. 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(9), 1324-1331, 2010.
9. Kasama Y, Sekiguchi S, Saito M, Tanaka K, Satoh M, Kuwahara K, Sakaguchi N, Takeya M, Hiasa Y, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. *Blood* in press.
10. Satoh M, Saito M, Tanaka K, Iwanaga S, Salem Nagla Elwy Salem Ali, Seki T, Okada S, Kohara M, Harada S, Kai C, and Tsukiyama-Kohara K. Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* in press.
11. Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, and Kohara M. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J. Virology* 84 303-311, 2010
12. Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Kato A, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Shimotohno K. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. *Virology.* 407(1):152-915, 2010
13. Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, and Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. *BMC Medical Genomics.* 3: 48, 2010
14. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. Overexpression of miR-199 and 200 families is associated with the progression of liver fibrosis. *PLoS ONE* (in press)
15. Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito S, 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. *Pathology International.* 60: 351-357, 2010
16. Ueda Y, Takada Y, Marusawa H, Haga H, Sato T, Tanaka Y, Egawa H, Uemoto S, Chiba T. Clinical features of biochemical cholestasis in patients with recurrent hepatitis C after living-donor liver transplantation. *J Viral Hepat.* 17(7):481-487, 2010.
17. Oshiumi H, Sakai K, Matsumoto M, Seya T. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN-beta-inducing potential. *Eur J Immunol.* 40(4): 940-948, 2010

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等



**Ⅶ. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図等****●研究代表者の研究歴等**

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

**・過去に所属した研究機関の履歴**

昭和47年～昭和58年 国立遺伝学研究所 分子遺伝部 (研究員)

昭和53年～昭和56年 米国 ウィスコンシン大学 McArdle 癌研究所 (博士研究員)

昭和58年～平成6年 国立がんセンター研究所 ウイルス部 (室長・部長)

平成6年～平成19年 京都大学 ウイルス研究所 (教授・所長)

平成19年～21年 慶應義塾大学 医学部 (特別研究教授)

平成21年～現在 千葉工業大学 附属総合研究所 (教授)

**・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)**

三浦 謹一郎 (国立遺伝学研究所)

Howard M. Temin (米国 McArdle 癌研究所)

杉村 隆 (国立がんセンター研究所)

**・主な研究課題**

- (1) レトロウイルスの複製機構の解析
- (2) レトロウイルスベクターに関する研究
- (3) ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV) の分子ウイルス学的研究
- (4) HCVの複製機構およびウイルス発がんに関する研究

**・これまでの研究実績**

**Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. *BMC Med Genomics*. 3(1): 48, 2010.**

**Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J, Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. *J Virol*. 84(22):11761-11770, 2010.**

**Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol*. 84(22): 12048-12057, 2010.**

**Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Kato A, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Shimotohno K. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. *Virology*. 407(1):152-915, 2010**

**Arimoto K, Funami K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(36): 15856-15861, 2010**

**Ohshima T, Mukai R, Nakahara N, Matsumoto J, Isono O, Kobayashi Y, Takahashi S, Shimotohno K. HTLV-1 basic leucine-zipper factor, HBZ, interacts with MafB and suppresses transcription through a Maf recognition element. *J Cell Biochem*. 111(1): 187-194, 2010**



- Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H. *Combination therapy for hepatitis C virus with heat-shock protein 90 inhibitor 17-AAG and proteasome inhibitor MG132. Antivir Chem Chemother.* 20(4): 161-167, 2010.
- Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K. *Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. Proc Jpn Acad* 85(7): 217-228, 2009
- Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Mizokami M, Shimotohno K, Hijikata M. *Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. Hepatology.* 50(3): 689-696, 2009
- Goto K, Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Shimotohno K. *Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. Cancer Sci.* 100: 1943-1950, 2009
- Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T and Shimotohno K., Negative regulation of the RIG-I signaling by the novel ubiquitin ligase RNF125. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 : 7500-7505, 2007
- Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. *The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. Nat Cell Biol.* 9(9):1089-1097, 2007
- Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K. *Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. J Biol Chem.* 282(45):32765-32772, 2007
- Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell.* 19 :111-122, 2005.
- Kodama Y, Hijikata M, Kageyama R, Shimotohno K, Chiba T. The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology.* 127:1775-1786, 2004
- Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology.* 38 :1282-1288. 2003
- Hijikata, M, Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kato, N., Kimura, K., and Shimotohno, K., Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 10773-10777, 1993
- Tajima, K., Shimotohno, K. and Oki, S. Natural horizontal transmission of HCV in microepidemic town in Japan. *Lancet*, 337: 1410-1411, 1991
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T. and Shimotohno, K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9524-9528, 1990
- Kitado, H., Chen, I.S.Y., Shah, N.P., Cann, A.J., Shimotohno, K. and Fan, H. U3 sequences from HTLV-I and -II LTRs confer pX protein response to a murine leukemia virus LTR. *Science*, 235: 901-904, 1987
- Shimotohno, K., Takano, M., Teruuchi, T. and Miwa, M. Requirement of multiple copies of a 21-nucleotide sequence in the U3 regions of human T-cell leukemia virus type I and type II long terminal repeats for trans-acting activation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8112-8116, 1986
- Shimotohno, K., Miwa, M., Slamon, D.J., Chen, I.S.Y., Hoshino, H., Takano, M., Fujino, M. and Sugimura T. Identification of new gene products coded from X regions of human T-cell leukemia viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 302-306, 1985
- Wachsman, W., Shimotohno, K., Clark, S.C., Golde, D.W. and Chen, I.S.Y. Expression of the 3' terminal region of human T-cell leukemia virus. *Science*, 266: 177-179, 1984

- Slamon,D.J., Shimotohno,K., Cline,M.J., Golde,D.W. and Chen,I.S.Y. Identification of the putative transforming protein of the human T-cell leukemia virus. HTLV-I and HTLV-II. **Science**, 266: 61-65, 1984
- Shimotohno,K. and Temin,H.M. Loss of intervening sequence in genomic mouse  $\alpha$ -globin DNA inserted in an infectious retrovirus vector. **Nature**, 299: 265-268, 1982
- Shimotohno,K. and Temin,H.M. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. **Cell**, 26: 67-77, 1981
- Shimotohno,K., Mizutani,S. and Temin,H.M. Sequence of retrovirus provirus resembles that of bacterial transposable elements. **Nature**, 285: 550-554, 1980

## 平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題： 自然免疫細胞リモデリングによるウイルス性肝炎の新規治療法の開発

課題番号 : H22-肝炎-一般- 009  
 予定期間 : H22 年度から H24 年度まで  
 研究代表者 : 大段 秀樹  
 所属研究機関 : 広島大学  
 所属部局 : 大学院医歯薬学総合研究科  
 職名 : 教授  
 年次別研究費(交付決定額) : 1 年目 37,180,000 円

**I. 研究の意義**

- (1) 肝移植後の C 型ウイルス (HCV) 再感染は、進行が早く予後を悪化させている。
- (2) 肝移植患者では、一般患者に比ベインターフェロン療法の効果が低い。
- (3) HCV 感染患者は、自然免疫機能が低下している。

**II. 研究の目的、期待される成果**

- (1) HCV 根治療法として、自然免疫細胞移入療法を確立するための前臨床的研究を行う。
- (2) 細胞移入療法に使用し得る自然免疫細胞をリモデリングする。
- (3) HCV 性肝硬変に対する肝移植後の HCV 肝炎の再発予防が可能となる。
- (4) 肝移植後のみならず、HCV 肝炎患者の根治治療が可能となる。
- (5) 肝臓に対する肝移植における癌再発予防が可能となる。

**III. 1 年間の研究成果**

## ・研究代表者(大段秀樹)

- (1) 末梢血リンパ球から増殖させた natural killer (NK) 細胞/NKT 細胞の抗 HCV 効果を HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスで確認した。
- (2) ヒト末梢血 CD34<sup>+</sup>造血幹細胞から NK 細胞の分化・誘導に成功した。
- (3) CD34<sup>+</sup>造血幹細胞から誘導した NK 細胞の抗 HCV 作用を *in vitro* で確認した。

## ・研究分担者(茶山一彰)

- (1) HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを作製した。
- (2) ヒト肝細胞キメラマウス内におけるリモデリング NK 細胞/NKT 細胞の生存期間を解析した。

## ・研究分担者(田原栄俊)

- (1) ヒト由来線維芽細胞からヒト iPS 細胞を樹立した。
- (2) iPS 細胞の維持に関わる microRNA を解析した。

・研究分担者(田中純子)

- (1) リモデリング自然免疫細胞の抗 HCV 作用に関する実験結果を統計学的に判定した。
- (2) HCV 感染肝移植患者の長期予後に関する疫学解析をした。

・研究分担者(立野知世)

- (1) 抗 HCV 療法を評価し得るヒト肝細胞とヒト類洞内皮細胞を置換したキメラマウスの作製を試みた。

・研究分担者(伊藤敬)

- (1) HCV の増勢と関わる肝再生の分子機構を解析した。

・研究分担者(渕本康史)

- (1) CD34<sup>+</sup>造血幹細胞の年齢別増殖活性を解析した。

#### **IV. 23~24 年度の課題**

- (1) ヒト iPS 細胞から NK/NKT 細胞を分化誘導する。
- (2) 誘導 NK/NKT 細胞のテロメラーゼ活性を解析する。
- (3) ヒト iPS 細胞の維持に関わる microRNA を利用し、誘導の効率化を試みる。
- (4) ヒト CD34<sup>+</sup>幹細胞あるいは iPS 細胞から誘導した NK/NKT 細胞の HCV 複製抑制効果について、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いてアニマルテストを行う。
- (5) 誘導 NK/NKT 細胞と IFN- $\alpha$  や IFN- $\beta$ 、抗ウイルス剤との併用効果を、キメラマウスを用いて解析する。
- (6) HCV 肝炎症例を対象に免疫細胞療法を臨床応用する場合の対象症例の選定を目的とした当該地域での疫学的評価を行う。

#### **V. 行政施策への貢献の可能性**

- (1) 肝炎の治療成績の向上に伴い、難治性肝疾患に従来費やされた医療費が軽減される。

#### **VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)**

##### 研究代表者

- (1) 大段 秀樹

##### 発表論文

1. Possibility of adoptive immunotherapy with peripheral blood-derived CD3-CD56<sup>+</sup> cells for inducing anti-hepatocellular carcinoma and anti-hepatitis C virus activity. Marlen Dorskali, Yuka Tanaka, Masahiro Ohira, Kohei Ishiyama, Hirotaka Tashiro, Kazuaki Chayama,