

201109002A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤研究事業

C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した
基礎的研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 孝宣

平成24（2012）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤研究事業

C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した
基礎的研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 孝宣

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した基礎的研究	1
加藤 孝宣	
II. 分担研究報告	
1. HCV粒子ワクチン作製に適した培養細胞の探索	17
加藤 孝宣	
2. 感染中和抗体と感染中和機構の解析	23
脇田 隆宇	
3. HCV 予防・治療ワクチンの霊長類モデルによる評価系の確立	31
明里 宏文	
4. HCV 構造蛋白の組換えバキュロウイルスによる発現	37
石井 孝司	
5. 霊長類モデルを用いたHCVワクチンの免疫原性・安全性評価に関する研究	41
中村 紀子	
6. TLR3-TICAM-1経路を活性化する新規アジュバントの開発と 機能評価に関する研究	47
松本美佐子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	51
IV. 研究成果の刊行物・別刷	57

I. 総括研究報告

C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した基礎的研究

研究代表者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究要旨 JFH-1株を用いたC型肝炎ウイルスの細胞培養系を用い、ウイルス粒子を培養細胞で大量生成し、そのウイルス粒子を精製不活化後ワクチン抗原として用いることでC型肝炎ウイルスワクチンの樹立を目指す。本年度は培養細胞で生成された粒子を用い、霊長類モデル（アカゲザル）でワクチン接種の安全性と抗体誘導能の確認を行った。また、効率的にウイルス粒子を生成する方法や効率的な抗体誘導のためのアジュバント選択など基礎的な検討も併せて行っている。さらに新規のワクチン候補としてHCVウイルス様粒子の生成にも着手した。HCV感染を評価するための新規動物モデルとしてGBV-Bとのキメラウイルスを用いた新規感染系の構築も行った。

研究分担者 脇田 隆字
国立感染症研究所ウイルス第二部
部長

研究分担者 明里 宏文
京都大学霊長類研究所
人類進化モデル研究センター
教授

研究分担者 石井 孝司
国立感染症研究所ウイルス第二部
室長

研究分担者 中村 紀子
東レ株式会社医薬研究所
主任研究員

研究分担者 松本美佐子
北海道大学大学院医学研究科
准教授

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は成人感染でも高率に慢性化し、肝硬変から肝臓に至る慢性肝疾患の原因となっている。世界中に多くのHCV感染者が存在し、日本でも150万人の感染者の存在が報告されている。近年、輸血用血液のスクリーニングにより輸血後のC型肝炎は減少しているが、医療従事者や薬剤常用者、もしくはC型慢性肝炎患者の介護にあたる者などハイリスク群では依然としてその感染のリスクにさらされている。

我々が開発したJFH-1株を用いたHCVの培養系により、培養細胞でこのウイルスを増殖させることが可能となった。またこのシステムではHCVの培養細胞への感染が観察できるため、中和活性の評価も可能である。本研究では、このJFH-1株によるHCV細胞培養系を用い、培養細胞で増殖させたウイルス粒子を免疫原として用いることでHCVワクチンの開発を行う。これまで我々は、培養細胞で大量生産したウイルス粒子を濃縮精製することでワクチン抗原を作成し、そのワクチン抗原でマウスを免疫することで中和活性を有する抗体が得られることを見いだした。

本年度は、よりヒトに近い霊長類動物モデルを用い、ウイルス粒子ワクチンの安全性と有効性の評価を行った。さらに、これまでマウスへの免疫で得られた中和抗体の詳細な解析や、ウイルス粒子の生成

と精製方法の改良、効果的なアジュバントの開発と選定、新規動物モデルの構築など基礎的な検討も引き続き行っている。また、他の免疫原の候補として、ウイルス様中空粒子の開発にも着手した。

B. 研究方法

1. アカゲザルを用いたHCVワクチンの安全性と抗体誘導能の評価

マカク属サル（アカゲザル3頭、Mm1938・Mm1836・Mm1854）へのHCV不活化粒子ワクチン接種実験を行った。ワクチン接種に用いる個体は抗HCV抗体陰性であることを確認した後に選抜した。まず先行して、アジュバントにAlumを用いMm1938（9ヶ月；♀；2.1 kg）へのHCV不活化粒子ワクチン接種を行った。4週目、12週目に追加接種を行い、14週目に実験殺を行った。各ワクチン接種2日後に血算・生化学検査を行い安全性評価も行なった。さらに実験殺によって得られた組織病理解析により安全性評価と血液からの抗体精製、および感染阻害活性の測定により有効性評価を行った。また引き続きMm1836（3才4ヶ月；♀；4.0 kg）、Mm1854（3才3ヶ月；♀；5.0 kg）へのワクチン接種も開始した。これら二頭ではアジュバントとしてAlum+CPGおよびMPL+TDL（Sigma Adjuvant System）を用い、Mm1938での抗体誘導と比較することで最適なアジュバントの検討を行っている。

2. アカゲザル血漿中の抗 E1 および抗 E2 抗体価の測定および感染阻害活性の評価

アカゲザル血漿中の抗体価測定のため、HCV の E1、E2 遺伝子を発現するベクターを準備した。HCV の配列は、遺伝子型 2a の J6CF 株、遺伝子型 1b の TH 株を使用した。E1、E2 領域それぞれの膜貫通ドメインを除去し、細胞外分泌シグナルを付加した。さらにタンパク質の精製を容易にするために、N 末端に FLAG ペプチドを付加した。これらのベクターを用い、E1、E2 タンパク質を発現させ、精製した蛋白質を固相化したプレートを作成した。このプレートを用い、アカゲザル血漿中の抗 E1、抗 E2 抗体を EIA 法にて検出した。

免疫したアカゲザルの血漿中に含まれる抗HCV抗体の感染阻害活性は、免疫に用いたHCV J6株のE1、E2蛋白質を持つレトロウイルス（HCVシュードタイプウイルス；HCVpp）を用いて評価した。このHCVppをアカゲザルの免疫前もしくは免疫後の血液から精製されたIgGと混合し、Huh-7.5.1細胞に感染させた。その後、感染細胞内のルシフェラーゼ活性を測定しコントロールと比較することにより、その感染阻害活性を評価した。

3. マウスにて不活化粒子免疫により誘導された抗体による *in vivo* 感染阻害実験

J6/JFH1キメラウイルス感染HuH-7細胞の培養上清から限外濾過および超遠心により精製したウイルス粒子をUV照射により不活化し、Sigma Adjuvant Systemと混合してBALB/cマウスに免疫した。免疫マウスの血清からIgGを精製し、感染阻害活性を培養細胞でのJ6/JFH1キメラウイルス感染系により測定した。さらに得られた精製IgGを感染性ウイルスと混合してヒト肝細胞キメラマウスに接種した。ウイルス接種マウスにはあらかじめIgGを腹腔内にも投与した。非免疫マウスから精製したコントロールIgGとの比較によりHCV感染阻害活性を評価した。

4. HCVが効率的に増殖複製できる細胞株の分離とその評価

HCVの増殖複製が可能なHuH-7細胞を限外希釈し、96 well plateに播種することによりクローン化細胞株を得た。得られた株にHCV JFH-1株の全長RNAを導入し、経時的に培養液中と細胞内のコア抗原量を測定することで、最もHCVの増殖効率のよい細胞株を同定した。分離同定した細胞株を、通常HCVの増殖複製に用いられるHuh-7.5.1細胞と比較し、HCVの感染と複製、ウイルス粒子形成能に与える影響、細胞周期に与える影響などの検討を行った。

5. HuH-7細胞以外の培養細胞を用いたHCV粒子産生系の検討

HuGK-14細胞、MRC-5細胞、HEK293細胞に全長JFH-1 RNAを導入し、経時的に培養液中と細胞内のコア

抗原量を測定した。また、HCVライフサイクルの各ステップでの関与が報告されている宿主因子について、特異的なprimer/probeセットを用いたTaqMan Gene Expression Assay法によりそれぞれの発現量をHuh-751細胞と比較し検討した。

6. 組換えバキュロウイルスを用いたHCVウイルス様中空粒子の作成

HCVのJFH-1株(遺伝子型2a)、J6株(遺伝子型2a)、TH株(遺伝子型1b)のそれぞれについて、構造蛋白領域のcore-E2、core-p7を発現するバキュロウイルストランスファーベクターを構築し、組換えバキュロウイルスを作成した。昆虫細胞Sf9およびTn5にこれらの組換えバキュロウイルスを感染させ、目的蛋白の発現をウエスタンブロットで確認した。その後、ショ糖密度勾配遠心法で分画し、各分画のHCV構造領域遺伝子の発現を評価することによりウイルス様中空粒子形成の有無を調べた。

7. TLR3-TICAM-1経路を活性化する新規アジュバントの開発

新規アジュバントの開発のため、TLR3のリガンド認識機構を考慮した28種類のRNA誘導体を合成し、その評価を行った。*In vivo assay*として、B16メラノーマ細胞を用いたマウス移植がんモデルにおけるNK細胞依存的抗腫瘍効果の査定、EG7細胞を用いたマウス移植がんモデルにおけるCTL依存的抗腫瘍効果の査定、およびマウス腹腔内投与後の炎症性サイトカイン産生の経時的測定を行った。マウスはB57BL/6(wild-type、TLR3 KO、TICAM-1 KO)を使用した。また*in vitro assay*として、HEK293細胞を用いてのTLR3を介したIFN- β promoterの活性化、細胞質内MDA5経路の活性化、マウス骨髄系樹状細胞によるサイトカイン産生について検討した。

8. HCV/GBV-Bキメラウイルス感染マーマセットモデルの確立

HCV/GBV-Bキメラウイルス(c156-E12wild/GBV-B; HCV TPF1/wildクローン)をベースとしてCoreの

一部およびE1、E2をGBV-Bの相当する遺伝子領域に組換えたもの)をマーマセット初代肝細胞に遺伝子導入し、その複製能を評価した。さらにこのキメラウイルスをタマリン肝臓内に接種し、生体内における複製能を評価した。接種個体からはケタミン麻酔下で定期的に採血し、得られた血液について血算・生化学検査、血漿中ウイルスRNA量の測定を行った。またこれと平行して、GBV-BをベースにCore領域をHCV型に組換えたキメラウイルスをマーマセット初代肝細胞に感染させ、その複製能を評価した。

GBV-B/タマリン再感染実験においては、初回GBV-B接種から起算して190週目に2回目のGBV-B接種を行った。さらに218週目(2回目の免疫から起算すると27週目)に3回目のGBV-B接種を行った。接種個体からはケタミン麻酔下で定期的に採血し、血算・生化学検査、血漿中ウイルス量および抗GBV-B抗体価の測定を行った。

(倫理面への配慮)

各種組換えDNAを用いた感染ウイルス生成および感染実験は、大臣確認申請を行い承認を受けた後に使用した。本研究で使用した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。すべての動物実験は、それぞれの実験を行った施設の動物実験委員会の審査・承認を得た実験計画に基づき、倫理的配慮を行いながら実施した

C. 研究結果

1. アカゲザルを用いたHCVワクチンの安全性と抗体誘導能の評価

HCV不活化粒子ワクチンの投与を行ったアカゲザルの投与後の生化学的血液検査の結果、ワクチン投与を行った3匹のアカゲザルすべてで、肝炎マーカー(AST、ALT)を含め異常を示す項目は認めなかった。

最初に不活化粒子ワクチン接種を行ったアカゲザル、Mm1938の病理学的組織解析の結果、心血管周囲のリンパ球浸潤(Perivascular cuffing)および心筋内のリンパ球中心の炎症性細胞浸潤を認

めた。肝臓では、巣状壊死 (focal necrosis)、および中心静脈周囲の肝細胞の細胞質に好酸性小体 (acidophilic body) の形成を認めた。一方、腎、脾臓、各リンパ節には著変を認められなかった。以上の様な結果から、原因は不明であるが、心筋の炎症細胞浸潤と肝臓の循環不全の病態が背景に有ったものと考えられるが、HCV 不活化粒子ワクチン投与との因果関係は無いと考えられた。

2. アカゲザル血液中の抗 E1 および抗 E2 抗体価の測定および感染阻害活性の評価

HCV 不活化粒子ワクチンの投与を行ったアカゲザルの投与後の血漿を 300 倍希釈し、E1 および E2 タンパク質に対する抗体価を EIA にて測定した。その結果、J6 株 E1 タンパク質、J6 株 E2 タンパク質および TH 株 E2 タンパク質に対する抗体の産生誘導が確認された。アジュバントとして、MPL+TDM を用いたアカゲサルにおいては、J6 株 E2 タンパク質に対する IgG 抗体価は、他の 2 匹のアカゲサルと同じように誘導されていたが、J6 株の E1 タンパク質および TH 株の E2 タンパク質に対する IgG 抗体価が低いことが明らかとなった。

アジュバントとして Alum を用いたアカゲザルの免疫後の血漿から精製した IgG を用い、J6 株のエンベロップ蛋白質を持つ HCVpp に対する感染阻害活性を測定した。その結果、免疫前の IgG では感染抑制は認めないが、免疫後の IgG では用量依存的に感染阻害が観察され、1mg/mL で HCVpp の感染を 66% 抑制した。

3. マウスにて不活化粒子免疫により誘導された抗体による *in vivo* 感染阻害実験

不活化 J6/JFH1 キメラウイルス粒子を用い、Sigma Adjuvant System と混合して BALB/c マウスに 4 回免疫した。培養細胞での検討では、免疫マウスの血清は JFH-1 株および J6 株 (遺伝子型 2a)、TH 株 (遺伝子型 1b) の HCVpp に対して感染阻害活性を有していた。コントロールとしてリコンビナント E1 および E2 蛋白質でもマウスに免疫してその免疫原性を比較したところ、ウイルス粒子の方がリコンビナント抗原よりも中和活性誘導能に優れていることが明らかとなっ

た。さらに J6/JFH1 ウイルス培養系を用いた検討では、免疫マウス血清から精製された IgG では用量依存的にその感染を阻害した。

そこでこの IgG を用いて、ヒト肝細胞キメラマウスによる *in vivo* での感染阻害実験を行った。免疫に使用したのと同じキメラウイルスをチャレンジウイルスとして用い、精製された IgG と混合してヒト肝細胞キメラマウスに接種した。ウイルス接種マウスにはあらかじめ IgG を腹腔内にも投与した。非免疫マウスから精製したコントロール IgG と HCV 感染阻害活性を比較した。コントロール IgG 投与群では 6 匹中 4 匹のマウスで感染が成立したが、免疫マウスの IgG 投与群では 6 匹の全マウスで感染が認められず、*in vivo* での感染阻害活性が観察できた。しかし、チャレンジウイルスとして遺伝子型 1b 株のウイルスを用いた場合、その感染阻害は観察できなかった。

4. HCV が効率的に増殖複製できる細胞株の分離とその評価

HuH-7 細胞をクローニングすることで、JFH-1 全長 RNA を導入した時に最もウイルス産生量の多い細胞株 HuH-7T1 細胞を得た。この細胞では培養上清中で Huh-7.5.1 細胞の 8.3 倍、細胞内で 4.4 倍のコア抗原量を示し、HCV がより効率良く増殖複製できると考えられた。

そこで、この細胞での効率的な HCV 増殖に関わる因子の同定のため、まず HCV 感染に対する感受性を HCVpp を用いて評価した。その結果、HuH-7T1 細胞の HCV の感染感受性は Huh-7.5.1 細胞より低いことが明らかとなった。次に、細胞内での HCV RNA 複製効率を比較したところ、HuH-7T1 細胞と Huh-7.5.1 細胞ではほとんど差がなく、HCV RNA 複製効率は二つの細胞でほぼ同様であると考えられた。さらにウイルス粒子の形成効率と分泌効率を比較した。HuH-7T1 細胞では Huh-7.5.1 細胞と比べてウイルス粒子形成効率が約 47 倍と非常に高く、分泌効率は逆に約 0.24 倍と低くなっていた。

また、これらの細胞で、HCV 感染による細胞周期への影響を解析した。Huh-7.5.1 細胞では HCV 感染により細胞周期が停止していることが示唆された。

HuH-7T1細胞ではHCV感染により細胞周期の分布に大きな変化は見られなかった。

5. HuH-7細胞以外の培養細胞を用いたHCV粒子産生系の検討

ワクチン製造細胞として実績がある細胞として、HuGK-14細胞、MRC-5細胞を、さらにHEK293細胞を加えて検討を行った。まず、それぞれの細胞に全長JFH-1 RNAを導入し、HCVのゲノム複製およびウイルス産生を検討したが、いずれの細胞でもHCVのゲノム複製、ウイルス産生は観察されなかった。

宿主因子の発現量測定パネルを用いてHCVライフサイクルに重要な宿主因子の発現量を比較した。その結果、HuGK-14細胞では複製に関わるCKB、粒子形成に関わるApoE、cPLA2の発現量がHuh-7.5.1と比べて低く、MRC-5細胞ではEntryに関わるClaudin-1、複製に関わるCKB、粒子形成に関わるApoEの発現量が低かった。また、HEK293細胞では、Entryに関わるClaudin-1、粒子形成に関わるApoEの発現量が低かった。

6. 組換えバキュロウイルスを用いたHCVウイルス様中空粒子の作成

使用した3種類のクローン(JFH-1株; 遺伝子型2a、J6株; 遺伝子型2a、TH株; 遺伝子型1b)それぞれの構造領域を組み込んだ組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞(Tn5)でHCVの構造領域蛋白質(core、E2)が発現していることを確認した。これらの蛋白質は細胞内に留まり、細胞外に分泌はされなかった。TH株(遺伝子型1b)についてはショ糖密度勾配遠心法でショ糖濃度約30%の分画にcore、E2蛋白がともに検出され、ウイルス粒子様の構造を取っている可能性が高いと考えられた。一方、遺伝子型2aの2種のクローンではいずれもショ糖密度勾配でcore、E2が最も重い分画に沈降することから、目的蛋白がうまく可溶化できていないと考えられた。

7. TLR3-TICAM-1経路を活性化する新規アジュバントの開発

28種類のRNA誘導体のうち11種類の誘導体につ

いて*in vivo*におけるアジュバント効果を調べた結果、2種類のRNA誘導体がB16メラノーマ細胞を用いたマウス移植がんモデルにおいて、poly(I:C)とほぼ同等のNK細胞依存的ながん退縮効果を示した。1種類のRNA誘導体(RNA X)についてノックアウトマウスを用いて解析した結果、TLR3、TICAM-1依存的にがんの退縮効果を示すことが明らかとなった。通常のマウスの腹腔内投与後のIL-6、TNF- α 産生量はpoly(I:C)投与時の50%、IL-10は10%程度であった。また、poly(I:C)投与で産生されるIFN- β はRNA X投与では検出限界以下であった。*In vitro*のマウス樹状細胞への刺激においても、IL-6、TNF- α 、IL-10産生はpoly(I:C)刺激に比較して少なく、細胞内RIG-I、MDA5経路を活性化しなかった。ヒト細胞を用いた評価では、HEK293細胞でのTLR3を介したIFN- β promoter 活性化能はpoly(I:C)と同等であったがRIG-I、MDA5の活性化は誘導しなかった。

8. HCV/GBV-Bキメラウイルス感染マーマーモセットモデルの確立

HCVをベースとしてCoreの一部の領域、およびE1E2領域をGBV-Bの相当する遺伝子領域に置換したキメラウイルスをマーマーモセット初代肝細胞に遺伝子導入した結果、良好な複製増殖が示された。そこで生体内での感染増殖能を確認するため、タマリン肝臓内に同クローンのRNAを接種した。その結果、低レベルながら検出可能な程度のウイルス血症が検出された。現在、このキメラウイルスクローン構築のストラテジーをベースに、より複製増殖能が高い改変クローンを構築している。また、GBV-BをベースとしてCoreもしくはE1E2領域をHCVの相当する遺伝子領域に置換したキメラウイルスの検討も行っている。

マーマーモセット初代培養肝細胞を用いたGBV-Bおよび上述のキメラウイルス感染実験系の構築を目的として、新世界ザル初代肝細胞の保存培養系を確立した。この初代培養肝細胞を用いて、GBV-B陽性のサル血漿を感染させたところ、培養上清中にウイルスRNAが検出され、GBV-Bの増殖が確認された。

この上清中のウイルス量は実験ごとに大きく異なっており、初代培養肝細胞の培養条件を最適化することが重要であると考えられた。

D. 考察

霊長類（アカゲザル）を用いた不活化HCV粒子ワクチン投与の実験では、血算・生化学検査および組織観察でワクチン投与に関連した異常所見を認めなかったことから、その安全性が確認されたと考えられる。現在、不活化HCV粒子ワクチン投与中の個体でも引き続き同様の検討を行い、さらに知見を積み重ねていきたい。最適なアジュバント同定のための検討として、水酸化アルミニウム（Alum）単独、CpGとAlumとの併用投与（Alum+CpG）、さらにマウスで効果の高かったSigma Adjuvant System（MPL+TDM）で比較を行っている。現在のところ、Alum単独投与の個体においては、抗HCV抗体の誘導が確認されており、HCVppを用いた感染阻害実験において用量依存的に中和活性を持つことも明らかとなった。これはマウスでのワクチン投与実験で得られた結果と一致しており、種を超えてよりヒトに近い霊長類で感染阻害活性を有する抗体誘導が確認できたことは大きな意義がある。現在進行中のAlum+CpG投与個体においてはより強い抗体の誘導を認めており、今後はマウスで誘導された抗体と同様にHCVccを用いた感染系での感染阻害実験、*in vivo*のヒト肝細胞キメラマウスでの感染阻害実験も同様に行い、さらに投与するアカゲザルの頭数を増やし詳細な解析を行いたい。またワクチン投与においては、抗体誘導とともに細胞性免疫誘導の評価も重要な課題となる。今後、細胞性免疫の評価のための測定系（ELISPOTなど）の構築も行いたい。

マウスの実験では、不活化ウイルス粒子による免疫により感染中和活性を持った抗体の誘導が確認されている。この精製ウイルス粒子を用いた免疫ではリコンビナントE1E2蛋白質を用いた免疫よりも感染中和抗体の誘導能にすぐれていた。E1およびE2蛋白質の立体構造はまだ解明されていないが、感染および感染中和に重要な構造が、粒子上の表面蛋白質では良く保たれている可能性が考えられる。*In*

*vivo*における感染阻害実験では免疫原と同じチャレンジウイルスの場合は感染阻害を認めたが、異なる遺伝子型のウイルスの場合は感染阻害を観察できなかった。免疫により誘導された中和活性が不十分であるか、あるいは*in vivo*においてウイルス株または遺伝子型特異的な中和活性が感染阻害に重要である可能性が考えられた。しかし、少なくとも同一ウイルスでは精製IgGによる*in vivo*での感染阻害活性があることが明らかとなった。

今後、不活化 HCV 粒子をワクチンとして使用していくためには、ウイルス粒子を大量に生成する方法と生成された粒子を効率的に精製する方法の確率が必要となる。今回、HCV が効率的に増殖複製できる細胞株として同定された HuH-7T1 細胞は、HCV の感染効率やウイルス粒子の分泌効率は Huh-7.5.1 細胞と比べ低いですが、細胞内でのウイルス粒子生成効率が高く、結果として培養上清中に放出されるウイルス量が多くなっていた。また、HCV 感染により、Huh-7.5.1 細胞は細胞周期が停止するが、HuH-T1 細胞では細胞周期に影響が少ないため、感染細胞が増殖し続ける。その結果、HuH-7T1 細胞では感染が多くの細胞に広がっていた。このような細胞を用いれば、効率的なウイルス粒子の生成が可能となり、HCV 粒子ワクチンの工業的生産法確立に寄与できる。来年度以降、精製方法の改良についても取り組んでいきたい。

さらに不活化ウイルス粒子ワクチンの認可に向け、HuH-7 細胞以外の培養細胞を用いた粒子産生系の検討を行った。しかし、現在のところ HuGK-14 細胞、MRC-5 細胞、HEK293 細胞では JFH-1 株の効率的な増殖は認めていない。それぞれの細胞において HCV ライフサイクルに重要な宿主因子の発現を Huh-7.5.1 細胞と比較し、発現量の低い数種類の宿主因子を明らかにした。今後は、これらの宿主因子を強制発現させ、JFH-1 RNA 導入後のゲノム複製、ウイルス産生について検討して行く予定である。

新たなワクチン抗原候補として、HCVのウイルス様中空粒子の作製についても取り組んだ。遺伝子型1bのTH株については、バキュロウイルス-昆虫細胞

発現系を用いてウイルス様中空粒子を作成できる可能性が示唆された。遺伝子型2aの株については今のところまだウイルス様中空粒子の形成は確認できていないが、使用する細胞や、可溶化条件を検討することでウイルス様中空粒子の取得を試みる。遺伝子型1bのウイルス様中空粒子については、電顕での粒子構造の確認を行い、抗原性の有無や中和抗体誘導能についてさらに検討して行く。

また、新規アジュバントの候補として RNA 誘導体のアジュバント効果について検討を行った。検討を行った RNA 誘導体の1つで、細胞外からの投与により TLR3 のみを活性化できることが明らかとなった。さらに、TLR3-TICAM-1 経路の活性化によりの NK 細胞の活性化と CTL の誘導がおこることが確認された。今後、この RNA 誘導体で Type-IFN や サイトカイン産生の誘導が局所でも起こっていないことを確認し、次世代アジュバントとして確立して行く。

HCV感染の評価のための新規動物モデルとして GBV-B/マーモセットを用いた新規感染系の構築を行った。HCVをベースにCoreの一部の領域とE1E2をGBV-B型に組換えたウイルスを構築し、このキメラウイルスがマーモセット初代肝細胞で感染増殖することを確認した。また、このキメラウイルスが肝臓内への接種によりタマリンに感染し増殖することも確認した。今後キメラウイルスのクローンを改良することで、さらに強い感染性を得られるよう検討を行う。このキメラウイルスを用いたタマリンでの感染系が確立されれば、HCVの非構造領域をターゲットとした治療用ワクチンの評価モデルとして用いることが可能となる。また、GBV-BをベースとしてCore領域、E1E2領域をHCVの相当する遺伝子領域に置換したキメラウイルスも構築し、その複製増殖能についての検討を開始した。このキメラウイルスが感染可能なモデルを構築すれば、HCVに対する中和活性を評価するモデルとして使用できる。

E. 結論

(1) 霊長類モデル (アカゲザル) を用い、HCV不活

化粒子ワクチンの安全性と有効性について評価を行った。3頭のアカゲザルを用い、アジュバントを変えて不活化HCV粒子による免疫を行った。その結果、E1およびE2タンパク質に対する抗体の誘導が確認されたが、用いたアジュバントにより抗体誘導能が異なっていた。またワクチン投与に関連した異常所見は認めなかった。

(2) 不活化HCV粒子を用いた免疫により、HCVの感染阻害活性を持つIgGの誘導が確認された。誘導されたIgGは用量依存的に培養細胞へのHCVppの感染を阻害した。

(3) マウスでの不活化ウイルス粒子を用いた免疫では、感染中和抗体が誘導され、得られた中和抗体は同一ウイルスの *in vivo*における感染阻害活性を示した。

(4) HCVの感染増殖が可能なHuH-7細胞をクローニングすることにより、HCVが効率的に増殖複製できる細胞株HuH-7T1細胞を分離同定した。この細胞株はワクチンの材料となるHCV粒子の大量培養に有用と考えられた。

(5) HuH-7細胞以外の培養細胞を用いたワクチン用粒子産生系の検討を行ったが、現在のところ検討した細胞ではHCV JFH-1株の効率的な増殖は認めていない。

(6) バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用い、遺伝子型1bのHCVのウイルス様中空粒子を作製できる可能性が示された。HCV不活化ウイルス粒子と比べ簡便かつ多量に粒子が精製できれば、ワクチンとして応用可能であると考えられる。

(7) 新規アジュバントとしてRNA誘導体を同定した。このアジュバントは、poly(I:C)と同様に細胞外からエンドソームTLR3を活性化しTICAM-1を介してシグナルを伝達するが、細胞質のRIG-IとMDA5は活性化せず、炎症性サイトカイン産生量はpoly(I:C)

より少ないことが示された。

(8) HCV感染の評価のための新規動物モデルとして GBV-B とのキメラウイルスを用いた新規感染系の構築を行った。このC型肝炎サロゲート感染モデルは HCV に対する予防・治療ワクチンの効果、C型肝炎病態解析を行う上で有用な実験系になると期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1. *J Virol*. 86(4): 2143-2152, 2012.
- 2) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) Pathway in Degradation of Hepatitis C Virus Envelope Proteins and Production of Virus Particles. *J Biol Chem*, 286: 37264-37273, 2011.
- 3) Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology*, 54: 425-433, 2011.
- 4) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*, 410: 404-409, 2011.
- 5) Yamamoto M, Sakamoto N, 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. *Hepatol Res*, 41: 258-269, 2011.
- 6) Weng L, Kohara M, Wakita T, Shimotohno K, Toyoda T. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene*. 2012 496(2):79-87.
- 7) Salim MT, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M. Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 415(4):714-9.
- 8) Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. *PLoS One*. 2011;6(10):e26620.
- 9) Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog*. 2011 7(10):e1002289.
- 10) Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2011 92(Pt 9):2082-7.
- 11) Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, Wakita T. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine*. 2011 29(29-30):4821-8.

- 12) Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2011 141(1):128-40,140.e1-2.
- 13) Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One*. 2011;6(6):e21284.
- 14) Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE: Geographic, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in *Cynomolgus* macaque (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Virology*, in press.
- 15) Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A: Diversity of MHC class I haplotypes in *cynomolgus* macaques. *Immunogenetics*, 64, 131-41, 2012.
- 16) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H: CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins. *Archives of Virology*, 157, 363-8, 2012.
- 17) Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee YJ, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H: Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in *cynomolgus* monkeys with minimal modifications. *Microbes and Infection* 13, 58-64, 2011.
- 18) Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A: Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics* 63, 417-28, 2011.
- 19) Ito M, Katakai Y, Ono F, Akari H, Mukai RZ, Takasaki T, Kotaki A, Kurane I: Serotype-specific and cross-reactive neutralizing antibody responses in *cynomolgus* monkeys after infection with multiple dengue virus serotypes. *Archives of Virology* 156, 1073-77, 2011.
- 20) Naruse TK, Okuda Y, Mori K, Akari H, Matano T, Kimura A: ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. *Immunogenetics* 63, 501-9, 2011.
- 21) Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I: Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate Model of dengue virus infection: development of high levels of viremia and demonstration of protective immunity. *Journal of General Virology* 92, 2272-80, 2011.
- 22) Iwasaki Y, Mori K, Ishii K, Maki N, Iijima S, Yoshida T, Okabayashi S, Katakai Y, Lee Y-J, Saito A, Fukai H, Kimura N, Ageyama N, Yoshizaki S, Suzuki T, Yasutomi Y, Miyamura T, Kannagi M, Akari H: Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets. *Frontiers in Microbiology* 2, 240, 2011.
- 23) Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Journal of Clinical Virology*, in press.

- 24) Miyamura T., Ishii K., Kanda T., Tawada A., Sekimoto T., Wu S., Nakamoto S., Arai M., Fujiwara K., Imazeki F., Kiyohara T., Wakita T. and Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatology Research*, in press
- 25) Yoshida T., Miyasaka T., Azegami Y., Uchiyama Y., Kasahara H., Ueda H., Nagase H., Fujita S., Ishii K. and Noda M. Investigation of epidemiology and HAV genomes regarding three hepatitis A infections that occurred in April-May, 2010-Nagano. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 64: 260-261 (2011)
- 26) Li T.C., Song S. Yang Q., Ishii K., Takeda N., and Wakita T. A cell culture system for hepatitis E virus. *Hepatology International*. 5: 202 (2011)
- 27) Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada T., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Hepatology International*. 5: 204-205 (2011)
- 28) Shime, H., M. Matsumoto, H. Oshiumi, S. Tanaka, A. Nakane, Y. Iwakura, H. Tahara, N. Inoue, T. Seya. 2012. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *PNAS* 109(6): 2066-2071.
- 29) Abe, Y., K. Fujii, N. Nagata, O. Takeuchi, S. Akira, H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya, and S. Koike. 2012. The Toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J. Virol.* 86(1): 185-194.
- 30) Oshiumi, H., M. Matsumoto, and T. Seya. 2012. Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J. Biochem. (Review)*151(1): 5-11.
- 31) Itoh, H., M. Tatematsu, A. Watanabe, K. Iwano. K. Funami, T. Seya and M. Matsumoto. 2011. UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling. *PLoS ONE* 6(12): e28500.
- 32) Sancho-Shimizu V, Pérez de Diego R, Lorenzo L, Halwani R, Alangari A, Israelsson E, Fabrega S, Cardon A, Maluenda J, Tatematsu M, Mahvelati F, Herman M, Ciancanelli M, Guo Y, Alsum Z, Alkhamis N, Al-Makadma AS, Ghadiri A, Boucherit S, Plancoulaine S, Picard C, Rozenberg F, Tardieu M, Lebon P, Jouanguy E, Rezaei N, Seya T, Matsumoto M, Chaussabel D, Puel A, Zhang SY, Abel L, Al-Muhsen S, Casanova JL. 2011. Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. *J. Clin. Invest.* 121(12): 4889-4902.
- 33) Hazeki, K., Y. Kametani, H. Murakami, M. Uehara, Y. Ishikawa, K. Nigorokawa, S. Takasuga, T. Sasaki, T. Seya, M. Matsumoto, and O. Hazeki. 2011. Phosphoinositide 3-kinase controls the intracellular localization of CpG to limit DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages. *PLoS ONE* 6 (10): e26836.
- 34) Oshiumi, H., M. Okamoto, K. Fujii, T. Kawanishi, M. Matsumoto, S. Koike, and T. Seya. 2011. The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J. Immunol.* 187(10): 5320-5327.
- 35) Miyashita, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. DDX60, a DHXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Mol. Cell Biol.* 31(18):3802-3819.
- 36) Wakasa K., H. Shime, M. Kurita-Taniguchi, M. Matsumoto, M. Imamura, and T. Seya. 2011. Development of monoclonal antibodies that specifically interact with necrotic lymphoma cells. *Microbiol. Immunol.* 55(5): 373-377.

- 37) Yamazaki S., K. Okada, A. Maruyama, M. Matsumoto, H. Yagita, and T. Seya. 2011. TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides in vivo. *PLoS ONE* 6 (4): e18833.
- 38) Sawahata, R., H. Shime, S. Yamazaki, N. Inoue, T. Akazawa, Y. Fujimoto, K. Fukase, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Failure of mycoplasma lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* 13(4): 350-358.
2. 学会発表
- 1) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.
- 2) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Wakita T, Kato T. Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.
- 3) Yokokawa H, Akazawa D, Moriyama M, Nakamura N, Kato T, Ishii T, Wakita T. Development of purification method for HCV particles using chromatographic technique. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, WA, USA.
- 4) Moriyama M, Yokokawa H, Akazawa D, Nishimura K, Nakamura N, Mochizuki H, Kato T, Ishii K, Wakita T. Immunological memory response to induce neutralizing immunoglobulin in HCV particles-immunized mice. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, WA, USA.
- 5) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Nomoto A, Wakita T, Kato T. Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.
- 6) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Wakita T, Kato T. HuH-7 subclone that supports high HCV production due to high virus assembly. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.
- 7) Watanabe N, Murayama M, Date T, Kato T, Aizaki H, Wakita T. Identification and analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.
- 8) Matsumura T, Kato T, Tasaka-Fujita M, Murayama A, Masaki T, Wakita T, Imawari M. 25-hydroxy- vitamin D inhibits hepatitis C virus replication and production of the infectious viruses. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 4-8, 2011. San Francisco, USA.

- 9) T Wakita. Hepatitis C Virus Infection and Replication, annual meeting of Prof. Juei-Low Sung's Research Foundation, Taipei, Taiwan (2011, 8. 6).
- 10) T Wakita. HCV RNA replication and drug development. The 8th APASL Single Topic Conference Beijing, China (2011, 10. 7).
- 11) T Wakita. Hepatitis C virus replication in vitro and persistent infection in vivo: mechanistic analysis and antiviral development, Singapore-Japan Forum on Emerging Concepts in Microbiology, National University of Singapore, Singapore (2011 Nov 15-16).
- 12) T Wakita. Hepatitis C virus replication in vitro and persistent infection in vivo: mechanistic analysis and antiviral development, Challenges to overcome Emerging Infectious Diseases in South-eastern Asia, Siran Kaikan, Kyoto University. Kyoto (2012 Jan 13).
- 13) T Wakita. Hepatitis C virus replication models and anti-viral development, The 1st International Symposium on Latent TGF-beta Activation Reaction, RIKEN Kobe Inst, Ctr. For Devel Biol, Auditorium, Kobe (2012 Feb 25).
- 14) Takebe, Y., Uenishi, R., Tani, H., Suzuki, R., Hase, S., Akazawa, D., Takagi, M., Tsuchiura, T., Nagasawa, K., Suzuki, T., Irie, K., Shinya, K., Wakita, T., Matsuura, Y., Patel, A., Small molecules that elicit anti-HCV activity through down-modulation of HCV entry receptors, 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.
- 15) N Watanabe, K Futai, H Suga, T Wakita, E2 binding peptide identified by RAPID system inhibited HCV infection, 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.
- 16) K Goto, T Kimura, K Watashi, R Suzuki, S Yamagoe, T Miyamura, K Moriya, H Yotsuyanagi, K Koike, T Suzuki, T Wakita, H Aizaki, Identification of novel NS5A-associated proteins in the host-cell membrane fraction and their role in HCV life cycle, 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.
- 17) R Suzuki, T Suzuki, K Saito, M Matsuda, K Watashi, Y Matsuura, T Wakita, H Aizaki, Identification and characterization of signal peptidase complex 1 that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assemble, 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.
- 18) J Law, D Hockman, S Frey, R Khoshy, T Wakita, J Bukh, C Rice, M Houghton, Does a vaccine derived from a single HCV strain elicit broadly cross-neutralising antibodies in humans?, 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.
- 19) M Fukasawa, Y Shirasago, K Saito, Y Murakami, H Fukazawa, T Suzuki, R Suzuki, T Wakita, K Hanada, J Chiba, Isolation of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations, 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.
- 20) M Esumi, S Kikuta, H Yamaguchi, S Nakajima, M Ishibashi, T Wakita, Serum and trypsin inhibitors inhibit the early step of hepatitis C virus infection, 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.

- 21) K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle, 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.
- 22) N Uchida, K Watashi, R Suzuki, H Aizaki, J Chiba, T Wakita, Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus life cycle, 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.
- 23) R Suzuki, K Saito, M Matsuda, K Watashi, Y Matsuura, T Wakita, T Suzuki, H Aizaki, Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16).
- 24) H Aizaki, Y Matsumoto, K Goto, K Watashi, R Suzuki, M Fukasawa, K Hanada, S Sato, N Takahashi, Y Matsuura, K Motojima, T Miyamura, T Suzuki, T Wakita, Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
- 25) Y Matsumoto, K Watashi, R Suzuki, T Matsuura, T Suzuki, T Miyamura, K Wake, T Wakita, H Aizaki, Antiviral activity of glycyrrhizic acid against hepatitis C virus in vitro, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16).
- 26) K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16).
- 27) K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Screening of small molecules affecting the production of hepatitis B virus, 2011 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct 9-12, Holliday Inn Walt Disney World Resort, FL US.
- 28) Hirofumi Akari, Yuki Iwasaki, Ken-ichi Mori, Koji Ishii, Noboru Maki, Sayuki Iijima, Tomoyuki Yoshida, Sachi Okabayashi, Yuko Katakai, Young-Jung Lee, Akatsuki Saito: Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets. International Union of Microbiological Society 2011 Congress. 11-16 September, 2011, Sapporo.
- 29) Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
- 30) Noda M., Tada Y., Uema M., Nakashima K., Shimada T., Nakamura N., Kiyohara T. and Ishii K. Food hygienic investigation on hepatitis A cases in the spring of 2010, Japan.
- 31) Akari H., Iwasaki Y., Mori K., Ishii K., Maki N., Iijima S., Yoshida T., Okabayashi S., Katakai Y., Lee Y.J. and Saito A. Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011.,
- 32) Uema M., Aoki N., Aoki S., Furuya Y., Nishio O., Shibata S., Kodaira A., Ishii K. and Noda M. Role of imported seafood as a vehicle of hepatitis A viruses. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

- 33) Someya Y., Shirato H., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Wakita T., Ishii K., Narimatsu H. and Kubota T. Structural basis for recognition of Lewis A antigen by norovirus. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
- 34) Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada C., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Bangkok, Thailand, February 17-20, 2011.
- 35) Li T.C., Song S., Yang Q., Ishii K., Takeda N. and Wakita T. The stability and inactivation of hepatitis E virus grown in cell culture. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Bangkok, Thailand, February 17-20, 2011.
- 36) Nakamura N., Shimada T., Tada N., Okabe N., Kiyohara T., Ishii K. and Noda M. Diffuse outbreak of hepatitis A suspected by national case based surveillance in Japan, 2010, International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED 2011), Vienna, Austria, February 17-20, 2011
- 37) Megumi Tatematsu, Tsukasa Seya, and Misako Matsumoto. Virus-derived single-stranded RNA with stable secondary structure extracellularly activates Toll-like receptor 3. IUMS 2011 Congress. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.
- 38) Hiroyuki Oshiumi, Misako Matsumoto, and Tsukasa Seya. Riplet ubiquitin ligase is essential for RIG-I dependent type I interferon production during viral infection. IUMS 2011 Congress. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.
- 39) Moeko Miyashita, Hiroyuki Oshiumi, Misako Matsumoto and Tsukasa Seya. DDX60, a novel DExD/H box helicase, participates in evoking antiviral immunity and enhancing the cytoplasmic IFN- β -inducing pathway. IUMS 2011 Congress. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.
- 40) Masaaki Okamoto, Hiroyuki Oshiumi, Misako Matsumoto, Satoshi Koike, and Tsukasa Seya. The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. IUMS 2011 Congress. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.
- 41) Moriyama M, Yokokawa H, Nakamura N, Wakita T. Immunological memory response to induce neutralizing immunoglobulin in HCV particles-immunized mice. 第40回日本免疫学会学術集会. 2011年11月, 千葉.
- 42) AZUMA Masahiro, EBIHARA Takashi, MATSUMOTO Misako, SEYA Tsukasa. PolyI:C-induced cross-priming and antitumor CTL depends on the TICAM-1 pathway in mouse Ag-presenting cells. 第40回日本免疫学会学術集会. 2011年11月, 千葉.
- 43) Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. Tumoricidal activity of tumor-associated macrophages induced by RNA adjuvant therapy. 第40回日本免疫学会学術集会. 2011年11月, 千葉.
- 44) Megumi Tatematsu, Hiroki Itoh, Ayako Watanabe, Katsunori Iwano, Kenji Funami, Tsukasa Seya and Misako Matsumoto. UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling. 第40回日本免疫学会学術集会. 2011年11月, 千葉.
- 45) 加藤孝宣, 村山麻子, 政木隆博, 相崎英樹, 脇田隆宇. 国内献血検体を用いたC型肝炎ウイルス陽性血漿パネルの作製とウイルス量測定法の評価. 第47回日本肝臓学会総会, 2011年6月, 東京.

- 46) 加藤孝宣、政木隆博、脇田隆宇。HCV JFH-1キメラ株を用いたNS5A阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価。シンポジウム10：C型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡。
- 47) 松村卓哉、加藤孝宣、井廻道夫。Vitamin Dとその代謝産物の抗HCV作用の検討。シンポジウム10：C型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡。
- 48) 加藤孝宣、椎名正明、脇田隆宇。HCV JFH-1株のチンパンジー感染実験で得られた適応変異株の機能解析。パネルディスカッション4：肝疾患動物モデルとTranslational Research 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡。
- 49) 村山麻子、三代俊治、脇田隆宇、加藤孝宣。C型肝炎ウイルス粒子の産生効率の良いHuH-7細胞サブクローンの分離と同定。第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡。
- 50) 横川寛、森山正樹、赤澤大輔、中村紀子、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆宇。クロマトグラフィー法を用いたC型肝炎ウイルス粒子の精製法の構築。第34回日本分子生物学会年会、2011年12月、横浜。
- 51) 脇田隆宇。「新型シーケンサで展開するウイルスゲノム研究」、ランチョンセミナー、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（2011, 12.14）
- 52) 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆宇。HCV感染に伴う宿主細胞の脂質代謝の変化と代謝産物のメタボロミクス解析、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、（2011, 6.2-3）、シンポジウム1「ウイルス肝炎・肝癌制圧の分子基盤」
- 53) 武田緑、池田正徳、有海康雄、脇田隆宇、加藤宜之、2種類のヒト肝細胞株を用いたHCV感染レポーターアッセイ系の開発、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、（2011, 6.2-3）、
- 54) 相崎英樹、多田有希、松本喜弘、後藤耕司、渡士幸一、鈴木亮介、田中純子、鈴木哲朗、岡部信彦、脇田隆宇、1999年から2009年における日本のC型急性肝炎の発生状況、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、（2011, 6.2-3）
- 55) 明里宏文：霊長類モデル動物を用いたウイルス感染症研究。東京医科歯科大学・難治疾患共同研究拠点研究集会（東京）平成23年10月7日
- 56) 明里宏文：エイズウイルスの宿主適合戦略。京都大学ウイルス研究所・ウイルス研究の潮流シリーズセミナー（京都）平成23年6月22日
- 57) 道免和文、田中博文、春野政虎、姜貞憲、石井孝司、高橋和明：2010年A型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討-1999年ボルネオ（カリマンタン）島由来株との近縁性、第39回日本肝臓学会西部会、平成23年12月、岡山
- 58) 上間匡、石井孝司、小原真弓、田中俊光、増本久人、入谷展弘、斎藤哲也、吉田徹也、山下育孝、柴田伸一郎、田中智之、内野清子、野田衛：A型肝炎ウイルス検出PCRの高感度化の検証、第32回日本食品微生物学会、平成23年10月、東京
- 59) 野田衛、多田有希、田中智之、石井孝司：2010年のA型肝炎の分子疫学と食品衛生上の原因究明、第32回日本食品微生物学会、平成23年10月、東京

60) 山下育孝、青木紀子、青木里美、土井光徳、
古屋由美子、西尾 治、石井孝司、野田 衛：A
型肝炎の国内発生における輸入生鮮魚介類の関与、
第32回日本食品微生物学会、平成23年10月、
東京

61) 西村浩一、原田誠也、李 天成、石井孝司、
田中智之、野田 衛：熊本県におけるイノシシ、
ブタ及びシカの E 型肝炎ウイルス保有状況に関する
実態調査、第32回日本食品微生物学会、平成
23年10月、東京

62) 石井孝司、清原知子、島田智恵、中村奈緒美、
多田有希、野田 衛、脇田隆宇：2010 年春季の A
型肝炎の diffuse outbreak の分子疫学的解析、第4
7回日本肝臓学会総会、平成23年6月、東京

63) 横川寛、森山正樹、赤澤大輔、中村紀子、加
藤孝宣、石井孝司、脇田隆宇. クロマトグラフィー
法を用いたC型肝炎ウイルス粒子の精製法の構築.
第34回日本分子生物学会年会. 2011年12月, 横浜.

H. 知的所有権の出願・登録状況

脇田隆宇、村山麻子、加藤孝宣. 培養細胞で感染性
ウイルス粒子産生可能なC型肝炎ウイルスJ6CF株変
異体

2011年5月出願済み

出願番号：2011-122795