

201125023A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の 解明と新規治療法開発に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成24（2012）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の 解明と新規治療法開発に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

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

II. 分担研究報告

1. 肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発の総括 29
脇田 隆字
2. 患者由来 HCV の感染増殖に機能する肝細胞因子の解析 37
土方 誠
3. キメラマウス肝細胞を用いた 3 次元培養系の試み 41
田中 靖人
4. HCV 蛋白質に相互作用する宿主蛋白質の感染における役割 43
森石 恆司
5. 宿主・ウイルスを標的とした抗ウイルス薬剤の大規模スクリーニング 47
坂本 直哉
6. ヒト肝細胞移植 Alb-uPA/SCID マウスを用いた紅藻由来マンノース特異糖鎖
結合タンパク質 (Griffithsin) による感染防御効果に関する in vivo 実証
(Proof-of-concept) 実験 51
武部 豊
7. 脂質代謝を標的とする HCV 治療法の開発 57
池田 正徳
8. HBV pseudotype の作製と HBV 感染受容体同定への応用に関する研究 61
上田 啓次
9. HCV JFH-1 キメラウイルスを用いた NS5A 阻害剤の株特異的抗ウイルス作用
の検討 63
加藤 孝宣

10. 肝炎ウイルス増殖を抑制する新規治療薬候補物質の探索と作用機序の解明 に関する研究	69
萩原 正敏	
11. HCV 感染モデル動物の開発に関する研究	73
三浦 直行	
12. ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の解析	75
八木 清仁	
13. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の C 型肝炎ウイルス研究への応用	81
水口 裕之	
14. HBV 増殖系および HEV 培養系による新規抗ウイルス療法の探索に関する 研究	87
清原 知子	
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	91
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別冊	97

I. 総括研究報告

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発の総括

研究代表者 国立感染症研究所ウイルス第二部 脇田 隆宇

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

研究分担者 土方 誠
京都大学ウイルス研究所
准教授

研究分担者 田中靖人
名古屋市立大学大学院
教授

研究分担者 森石恒司
山梨大学医学部
教授

研究分担者 坂本直哉
東京医科歯科大学
准教授

研究分担者 武部 豊
国立感染症研究所
研究員

研究分担者 池田正徳
岡山大学大学院
准教授

研究分担者 上田啓次
大阪大学大学院
教授

研究分担者 加藤孝宣
国立感染症研究所
室長

研究分担者 萩原正敏
京都大学大学院
教授

研究分担者 三浦直行
浜松大学医学部
教授

研究分担者 八木清仁
大阪大学大学院
教授

研究分担者 水口裕之
大阪大学大学院
教授

研究分担者 清原知子
国立感染症研究所
主任研究官

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

1. 遺伝子型 3 の HCV レプリコンの樹立と解析 (脇田)

肝移植後 HCV 再感染症例の血清からウイルス遺伝子を分離し、S310 株と命名した。S310 サブジェノミックレプリコンを構築して RNA を合成し、Huh7 細胞に導入し、G418 による薬剤選択培養をおこない、コロニー形成を確認した。レプリコン細胞をクローニングして、複製するレプリコン RNA のコピー数を定量した。さらにレプリコンゲノム配列を決定し、変異の有無を確認した。レプリコン細胞で発現する HCV タンパク質を免疫染色およびウエスタンブロット法により解析した。変異を S310 サブジェノミックレプリコン構築に挿入して、コロニー形成能およびルシフェラーゼレポーターレプリコンにおける一過性複製能を検討した。S310 レプリコン複製に対する抗 HCV 薬の感受性を検討した。

2. 患者由来 HCV の感染増殖に機能する肝細胞因子の解析 (土方)

昨年度にマイクロアレイ法を用いて立体培養細胞で変化する遺伝子群を解析し、その中から HCV の感染性粒子産生と関連することが明らかとなったプロスタグランジン合成酵素について、その阻害剤ならびに各プロスタグランジン受容体に対するアゴニストあるいはアンタゴニストを用いてその関連の詳細を組換え体 HCV (JFH1) 感染性粒子産生系によって解析した。感染性粒子産生阻害効果のあったプロスタノイド合成酵素の阻害剤ならびにプロスタグランジン I (PGI) 受容体に対するアゴニストについてヒト肝臓キメラマウスを用いて感染させた患者由来 HCV (遺伝子型 1b) に対する抑制効果を検討した。ヒト肝臓キメラマウスに患者血清を注射してから一週間後から薬剤投与をおこない、その後一週間毎にマウス血液を採取し、その中の HCV RNA 量を定量した。

3. PA28 γ の多量体形成を利用した培養細胞系の構築 (森石)

pAct および pBIND に PA28 γ 遺伝子あるいはプロテアソーム活性化能を持たない PA28 γ 遺伝子を組み込み、VP16 および GAL4 蛋白質との融合蛋白質して発現するプラスミドを構築し、Huh7OK1 細胞に GAL4 結合領域をもつ Firefly luciferase レ

ポータープラスミドと共に導入した。48時間後、導入細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。遺伝子型1bの0株とN株のサブゲノムレプリコン細胞を用いて、FKBPの解析を行った。RNA干渉によってFKBPの発現を抑制し、レプリコンRNAにコードされているルシフェラーゼの活性によってレプリコンRNAの複製を評価した。JFH1ウイルス感染Huh7 OK1細胞の細胞内外のウイルスRNA量を経時的にreal-time PCRによって測定した。

4. 脂質代謝を標的とするHCV治療法の開発(池田)

2種類の肝細胞株(HuH-7とLi23)におけるゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ関連因子の発現量をマイクロアレイ解析、ウエスタンブロット解析で検討した。GGTase II関連因子としては、RABGGTA、RABGGTB、REP-1、及びREP-2について検討した。また、GGTase Iの関連因子であるPGGT1Bを陽性対照として検討した。GGTase IIがHCV RNA複製にどのような影響を及ぼすかについては、Li23細胞でレポーター遺伝子を含む全長HCV RNA(遺伝子型1b: 0株とKAH5株)が複製する、ORL8細胞とKAH5R細胞を用いて検討した。HCV RNA複製レベルはレニラルシフェラーゼ活性を指標として評価した。HCV感染に及ぼす、GGTase IIの影響については、レポーター遺伝子を含む全長HCV JFH-1株(JR/C5B)とLi23細胞由来のL8c-15細胞を用いた。

5. 宿主・ウイルスを標的とした抗ウイルス薬の大規模スクリーニング(坂本)

HCV-Feo replicon細胞、HCV-JFH1培養系を用いて、HCV増殖を制御する薬剤・化合物のhigh-throughput screening (HTS)をおこなった。JFH-1株のNS5AのC末端へ蛍光蛋白を挿入し、T4290AとC7653Tに変異導入することで粒子産生能を保持した蛍光蛋白YFP発現HCVを構築した。蛍光蛋白発現HCV感染細胞の培養上清を濃縮しスクリーニングに使用した。96 well plateにHuh7.5.1細胞を播種、翌日各種化合物を添加し、その2時間後にウイルス濃縮液を添加した。5日間培養後high content analysisを利用した感染

細胞数の定量解析を行った。レプリコンアッセイの結果と照合し、HCV複製増殖阻害活性は示さないが感染阻害活性を示した化合物を、エントリー阻害剤として抽出した。

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

Alb-uPA/SCIDマウスに、GRFT(20 mg/kg)を10日間にわたって皮下接種し、接種開始後3, 11, 18, 25日後に血液(baselineとして4日前の血液)を採取し、血清中のGRFT量をAntigen capture EIA法によって測定した。同時にGRFTのマウスに与える毒性を評価した。

GRFT(20 mg/kg)の皮下接種を10日間毎日1回行った。GRFT接種の8時間後にHCV(genotype 1a)(2.0×10^5 IU)を腹腔に接種し、その3, 11, 18, 25日後に血液を採取し、血中HCVコピーをQT-PCR法で定量した。また、ヒト肝細胞移植Alb-uPA/SCIDマウス(キメラマウス)を4群(各群n=4)に分け、感染防御実験を行った。各群のマウスに対して、HCV(genotype 1a)(2.0×10^6 IU)の腹腔接種の1日前(d-1)から感染後16日にわたってGRFTあるいは上記の対照薬剤を1日1回皮下接種した(計18回の接種)。感染の4日前(d-4)に採取した血液を処理前対照とし、HCV感染の3, 10, 17, 24, 31日後(d3, 10, 17, 24, 31)にそれぞれ血液を採取し、血中のHCV量をQT-PCR法で測定した。

7. 肝炎ウイルス増殖を抑制する新規治療薬候補物質の探索と作用機序の解明(萩原)

SR蛋白質リン酸化酵素SRPKの特異的阻害剤SRPIN340がC型肝炎ウイルスの増殖を抑制する作用機序を解明する。C型肝炎ウイルス、デング熱ウイルスなどフラビウイルスの増殖を抑制する化合物SFV785の作用機序をさらに検討し、SFV785から構造展開した化合物のC型肝炎ウイルスの増殖抑制活性を検討する。

8. HCV培養系による抗ウイルス薬スクリーニング(加藤)

HCV JFH-1株のNS5A領域を、H77株(Genotype 1a)、Con1株(Genotype 1b)、J6CF株(Genotype 2a)、MA株(Genotype 2b)のNS5A領域に入れ換えたHCV全

長の配列を持つプラスミドを作製した。合成した RNA を Huh-7.5.1 細胞に導入し、培養上清中と細胞内の HCV コア抗原量を測定した。同様に H77 株、Con1 株、J6CF 株、MA 株の NS5A 領域を持つ HCV レポーターサブジェノミックレプリコンを作成した。CD81 を発現していない Huh7-25 細胞を用い、シングルサイクル HCV 生成システムでキメラウイルスの増殖の評価を行った。Huh-7.5.1 細胞に JFH-1 株およびキメラウイルスの全長 RNA を導入した後、0.5 - 5,000 pM の濃度で NS5A 阻害剤を加え、キメラウイルスの NS5A 阻害剤に対する感受性を評価した。

9. HBV 増殖機構の解析と新規治療法の開発 (田中)

中空系モジュールにヒト肝細胞キメラマウスの肝組織より単離した肝細胞を充填して 3 次元培養系を作成した。感染源としては、HBV のウイルス粒子を含む患者血清を用い、3 次元培養系に患者血清を 10^5 copies/well となるように添加することで感染を成立させ、その後培養上清中の HBs 抗原、HBV DNA、細胞内 HBV core 関連抗原を測定し、HBV 感染・複製を確認した。

10. HBV pseudotype を用いた HBV 感染受容体の分離・同定とその応用 (上田)

HBV pseudotype (HBVp ; HBV の膜粒子を被ったレトロウイルス、gfp-hyg^r をもつ) の作製が可能であることがわかった。HBVp を活用し感染能による感染受容体の同定実験を進める。HBVp の感染性から、培養肝癌細胞 (HepG2) には付着因子が内在していることが示唆された。そこで HBV 膜蛋白の受容体リガンドとして想定される PreS1 から HBs の N 末に相当する領域 (PS1~SSN) を大腸菌にて発現・精製し、これをプローブとして付着因子の pull-down 実験を行った。

11. 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 (清原)

HBV:HepG2.2.15 細胞のクローンのうち、#1, #3, #4, #21, #G4 およびクローニング前の Original population について、HBs 抗原および HBc 抗原の経時変化を測定した。

HEV : HEV-VLP を結合した HEV プレートに血清検体を入れて、検体中の抗 HEV 抗体が結合していない HEV-VLP を HRPO 標識抗 HEV-VLP 抗体で検出した。

12. HCV 感染モデル動物の開発 (三浦)

HCV がヒト肝細胞に侵入する時に重要な CD81, SR-BI, CLDN1, OCLN の cDNA をアルブミン・ミニ enhancer/promoter の下流に連結した 4 種の DNA を受精卵に微小注射し、トランスジェニックマウス A1b-CCS, A1b-0 を得た。この両者を交配し、A1b-CCS0 マウスを完成させた。また、同じ 4 つの cDNA を CAG ベクターに連結し、マウス線維芽細胞 NIH/3T3 に遺伝子導入し、4 つのヒト蛋白を発現している細胞株を樹立した。A1b-CCS0 マウス肝臓から分離した初代肝細胞および 4 蛋白発現永久株に HCVpp を感染させ、ウイルスの侵入を検討した。

13. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製 (水口)

Ad ベクターを improved in vitro ライゲーション法により作製した。シャトルプラスミド pHMEF5 のマルチクローニング部位に LacZ 遺伝子、ヒト SOX17 遺伝子、HEX 遺伝子あるいは HNF4 α 遺伝子を挿入し、さらにベクタープラスミド pAdHM41-K7 に挿入して pAd-K7-EF-LacZ, pAd-K7-EF-SOX17, pAd-K7-EF-HEX, pAd-K7-EF-HNF4 α を作製した。作製した Ad ベクタープラスミドを 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-HNF4 α を作製した。定法により Ad ベクターの増殖・精製を行った。同様に、肝分化を促進する遺伝子のスクリーニングのため、FOXA2, HNF1 α , HNF1 β , HNF6 を発現する Ad ベクターを作製した。

ヒト ES 細胞 (H9) やヒト iPS 細胞 (201B7, Tic, Dotcom) を分化誘導開始の前日に無血清培地に交換した。次に、細胞剥離液を用いてヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞を回収後、6 因子 (human insulin, human apotransferrin, 2-mercaptoethanol, ethanolamine, sodium selenite, fatty acid free bovine albumin) および Activin A を含む hESF-GRO 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。

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、Ad-LacZ、Ad-SOX17 を中内胚葉系細胞に作用させた。次にヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞由来の内胚葉系細胞を Ad-LacZ、Ad-HEX で作用させた後、FGF4 と BMP4 を含んだ hESF-DIF 培地で 9 日間培養し、肝幹前駆細胞を得た。ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞由来の肝幹前駆細胞を Ad-LacZ、Ad-HNF4 α で作用させた後、FGF-4, HGF, Oncostatin M, dexamethasone を添加した hepatocyte culture medium 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。肝分化を促進する遺伝子のスクリーニング実験においては、上記と同様に、中内胚葉系細胞、内胚葉系細胞、肝幹前駆細胞に SOX17, FOXA2, HEX, HNF1 α , HNF1 β , HNF4 α , HNF6 を発現する Ad ベクターを感染させ分化能を検討した。

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

HCV 感染実験には、ルシフェラーゼ遺伝子を有する HCVpv (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) を使用した。ヒト iPS 細胞、ヒト iPS-hep 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。感染阻害実験として抗 CD81 抗体を HCVpv とインキュベートし、ウイルス作用 24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

HCV 複製実験にはテトラサイクリン応答性の RNA polymerase I 発現カセットを搭載したアデノウイルスベクター (Ad5/35) を用い、1b 型の HCV 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 (AdP₁235-HCV), NS5B (RNA dependent RNA polymerase) のポリメラーゼ活性欠損変異体ベクター (AdP₁235- Δ GDD)、感染効率補正用の EGFP-Luciferase 発現ベクター (AdP₁235-EL) を実験に供した (Nucleic Acids Res, 2011;39:e64)。

ヒト iPS 細胞、ヒト iPS-hep 細胞および Huh7 細胞を 48-well plate に播種し、テトラサイクリン応答性転写活性化因子をコードした Ad-tTA (5

MOI) 存在下 AdP₁235-HCV または複製能を欠損させた AdP₁235-DGDD (1 MOI) を感染させた。感染 24 時間後にドキシサイクリン (10 mg/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、AdP₁235-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 AdP₁235-HCV, AdP₁235-DGDD のルシフェラーゼ活性を各細胞の AdP₁235-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。また、ヒト iPS-hep 細胞にドキシサイクリンを添加する際 HCV 複製阻害薬である IFN を各濃度含む培養液を添加し、感染 72 時間後にルシフェラーゼ活性および細胞生存率を測定することで HCV 複製阻害効果を検証した。細胞障害性は WST-8 試薬を用いて測定した。ルシフェラーゼ活性および細胞障害性は IFN 非添加群を 100% として算出した。

(倫理面への配慮)

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

また、ヒト初代培養肝細胞は、京都大学附属病院移植外科においておこなわれた先天性代謝異常症患者への生体肝臓移植において切除された患者肝臓組織を用いて作成されたものである。この研究はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に

申請し、審査の後に承認されたものである。肝臓や血液提供者へのインフォームドコンセントや個人情報管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

1. 遺伝子型3のHCVレプリコンの樹立と解析(脇田)

肝移植後に遺伝子型3aのHCV再感染した症例の血清からウイルス遺伝子(S310株)を分離した。S310サブジェノミックレプリコンは1cfu/ug RNA以下と低ながらコロニー形成能を認めた。レプリコン細胞内では 10^7 ~ 10^8 copy/ug total RNAのレプリコンゲノムが複製した。さらに免疫染色法およびウエスタンブロット法により、レプリコン細胞で特異的に発現するHCVタンパク質を検出した。細胞内で増殖するレプリコンゲノムの配列を解析すると、NS3遺伝子に1箇所(T1286I), NS5A遺伝子に2箇所(T2188A, R2198H), NS5B遺伝子に2箇所のアミノ酸変異を伴う変異(T2496I, R2895G, R2895K)を見いだした。T1286Iは7個のレプリコン細胞で共通して同定された。これらの変異と遺伝子型1のレプリコンでS2204Iとして見いだされた適合変異を、遺伝子型3aでは配列の関係でS2210Iとして野生型S310サブジェノミックレプリコン構築に挿入してコロニー形成能を解析した。その結果、S2210I, T1286I, T2188A, R2198H, R2895G, R2895Kはそれぞれコロニー形成を100~10000倍程度増強した。S310レプリコンの複製はインターフェロンおよび核酸型NS5B阻害剤でJFH-1と同様に抑制された。しかし、非核酸型NS5B阻害剤にはS310はJFH-1よりも強く抑制され、プロテアーゼ阻害剤では逆に抑制が弱かった。

2. 患者由来HCVの感染増殖に機能する肝細胞因子の解析(土方)

JFH1感染性粒子産生系においてプロスタグランジン I_2 受容体(IP)アゴニストON01301は阻害効果があった。さらに他のIPアゴニストの効果を検証したところ、BMY45778はON01301は阻害効果を示したが、より高い濃度を必要とした。一方、

Beraprostはまったく効果を示さなかった。ON01301はトロンボキサン A_2 (TXA)合成酵素阻害活性も併せ持つが、Beraprostは持たない。BMY45778の分子構造もON01301に類似していたため、TXA合成酵素(TXAS)阻害活性があることが推定された。また、HuH7細胞には機能的なIPからのシグナル系が存在しない可能性が考えられたことからON01301の感染性HCV産生抑制効果はTXAS阻害活性によることが考えられた。TXAS阻害剤OzagrelはON01301同様に用量依存的に感染性HCV産生を抑制した。さらにON01301, Beraprost, Ozagrelはヒト肝臓キメラマウスに感染したHCVの感染伝播を抑制した。

3. PA28 γ の多量体形成を利用した培養細胞系の構築(森石)

宿主蛋白質PA28 γ を標的とした培養細胞系の構築を試みた。PA28 γ はホモ7量体を形成することでプロテアソームを活性化する。VP16-PA28 γ およびGAL4-PA28 γ との結合によって、GAL4プロモーターを活性化し、下流にコードされているルシフェラーゼが発現する培養細胞系を構築した。プラスミドをそれぞれHuh70K1細胞に導入しルシフェラーゼ活性を測定した。変異型との組み合わせより、PA28 γ の野性型同士の結合によるルシフェラーゼ活性が高かった。また、VP16のみとGAL4-PA28 γ の組み合わせ、およびVP16-PA28 γ とGAL4のみの組み合わせではルシフェラーゼ活性は認められなかった。

FKBP8の機能を代替する細胞内因子の存在が考えられたため、FKBP8のNS5A結合領域である3xTPRをもつイムノフィリンとNS5Aとの結合を免疫沈降法によって解析した。FKBP51, 52, 36, cyclophilin40で検討した結果、FKBP36のみがNS5Aと結合した。FKBP36をノックダウンすると、0株でレプリコンRNAの複製は低下したが、N株由来のレプリコン細胞株においてレプリコンRNAの複製低下は認められなかった。しかしながら、N株由来のレプリコン細胞株においてFKBP8とFKBP36の両方をノックダウンするとレプリコンRNAの複製は有意に低下した。0株とN株由来レプ

リコン細胞株のFKBP8とFKBP36の発現量をReal time PCRで測定すると、FKBP8に差は認められなかったが、N株由来のレプリコン細胞株のFKBP36の発現量は約4倍高かった。以上の結果から、FKBP36はウイルス複製をサポートする宿主因子で、FKBP8の機能を代替するタンパク質であることが示唆された。

4. 脂質代謝を標的とするHCV治療法の開発(池田)

HuH-7細胞ではGGTase IIの関連因子である、RABGGTA, RABGGTB, 及びREP-2のmRNAは発現していたがREP-1のmRNAは発現していなかった。一方、Li23細胞ではRABGGTA, RABGGTB, REP-1及びREP-2のすべてのmRNAが発現していた。また、GGTase Iの関連因子であるPGGT1BのmRNAはHuH-7とLi23細胞ともに発現していた。Li23細胞ではREP-1とREP-2はともに発現していたが、HuH-7細胞ではREP-2のみが発現していたため以下の研究ではLi23細胞を用いて実施した。

GGTase IIがHCV RNA複製に及ぼす影響を全長HCV RNAレポーターアッセイ系(ORL8とKAH5RL)を用いて検討した。GGTase II関連因子のRABGGTA, RABGGTB, REP-1, REP-2をノックダウンしたときに、ORL8細胞ではREP-1とRABGGTAではHCV RNA複製レベルを約70%抑制し、REP-2とRABGGTBでは約90%抑制した。KAH5RL細胞ではREP-1とRABGGTAではHCV RNA複製レベルを約50%抑制し、REP-2では約80%、RABGGTBでは約60%抑制した。陽性対照としてGGTase Iの関連因子であるPGGT1Bをノックダウンすると、ORL8とKAH5RL細胞でHCV RNAの複製レベルは約70%と50%抑制された。以上の結果はGGTase Iのみならず、GGTase IIもHCV RNA複製に重要な役割を果たしていることを示している。

次に、GGTase II関連因子がHCV感染に及ぼす影響について検討した。L8c-15細胞を感染24時間前に、RABGGTA, RABGGTB, REP-1, およびREP-2をsiRNA(10 nM)で処理し、感染後48時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。RABGGTA, RABGGTB, およびREP-2ではそれぞれ、約40, 40,

および90%の感染阻害効果が認められた。一方、REP-1のノックダウンでは全く感染阻害効果を示さなかった。

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

4046化合物からレプリコン増殖抑制効果を示す化合物を23個抽出し、さらにHCV-JFH1細胞培養系においてHCV増殖抑制効果を示す化合物を4個同定した。内1個はNF κ Bシグナル経路を活性化し、他の3個は既存のIFNやNF κ Bを介さない経路により抗HCV効果を示した。High content analysisでは、核周囲のウイルス蛋白染色を定量することにより簡便かつ迅速な蛍光蛋白発現細胞数を定量解析した。抗CD81抗体を用いたエントリー阻害試験では、70%以上の感染阻害を示した。400個の低分子化合物をスクリーニングした結果、35個が50%以上の感染阻害効果を示した。このうちレプリコンアッセイにおいて抗HCV活性を認めたものは1個で、残りの34個はエントリー過程を阻害している可能性がある。

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

血中GRFT量は接種後3日で0.72 mg/mL(\sim 57 nM), 11日後には3.3 mg/mL(\sim 260 nM)と、in vitroでのEC50=5.4 ng/mL(0.4 nM)の100-600倍のレベルに到達した。接種終了から1週間後のday18においても3.3 mg/mL(\sim 260 nM)と高いレベルが維持された。

HCV感染後3日後(day3)までは、血中のHCV量は、対照群と差がなく血中HCV量が上昇するが、day3以降血中HCV量の上昇がGRFT接種群で完全に阻止された。GRFT接種終了の2週間後(day25)では、血中HCV量の若干のリバウンドが観察された。2番目の実験ではGRFT接種群では、対照群に比べて、マウス血液中のHCVコピー数が3-4 log低下し、少なくとも30日間にわたってウイルス量のリバウンドは見られなかった。なお、GRFT単独接種群と、インターフェロン α 接種群、インターフェロン α およびGRFTの併用接種群との間で統計的な有意差、相乗効果は見い出されなかった。

7. 肝炎ウイルス増殖を抑制する新規治療薬候補物質の探索と作用機序の解明 (萩原)

我々の開発したSR蛋白質リン酸化酵素SRPKの特異的阻害剤SRPIN340が、C型肝炎ウイルスの増殖を抑制する作用を有することを見出した。SFV785投与により感染性を喪失したフラビウイルス粒子が産生されることから、新しい作用機構の抗ウイルス薬として有望で、従来の薬剤に耐性のC型肝炎ウイルスにも効果が期待できる。

8. HCV 培養系による抗ウイルス薬スクリーニング (加藤)

JFH-1株のNS5A領域をH77株、Con1株、J6CF株、MA株それぞれのNS5A領域に入れ換えたキメラウイルスを導入した細胞では、時間経過とともに培養上清中と細胞内のHCVコア抗原量の上昇が確認され、キメラウイルスはHuh-7.5.1細胞で増殖可能であると考えられた。H77株、Con1株、J6CF株、MA株それぞれのNS5A領域を持ったレポーターキメラレプリコンを導入した培養細胞内での複製効率に大きな差はないものと考えられた。次にHuh7-25細胞を用いたシングルサイクルHCV生成システムでこれらのキメラウイルスの増殖能の評価を行った。その結果、キメラウイルスの複製はJFH-1株と差が無かった。さらに培養細胞内での感染性ウイルス粒子の生成効率を評価した。NS5A-H77キメラウイルスでは培養上清中と細胞内の感染力価はともにJFH-1株とほぼ同程度であり、NS5A-Con1キメラウイルスでは両方ともJFH-1株と比較して低値であった。NS5A-J6CF、NS5A-MAキメラウイルスでは上清中、細胞内ともにJFH-1株より高い感染力価を示した。以上のような結果から、NS5Aを入れ換えたキメラウイルスのHuh-7.5.1細胞での増殖効率の差は、細胞内での感染性ウイルス粒子生成効率に依存していると考えられた。これらのキメラウイルスを用い、NS5A阻害剤(BMS-790052)に対する感受性を評価した。NS5A阻害剤の50%有効濃度(EC_{50})は、通常のJFH-1株(JFH-1/wt)が6.4 pMであったのに対し、H77株、Con1株に置換したキメラウイルスでは3.1 pMと1.4 pM、J6CF株、MA株に置換したキメラウイ

ルスではその1,500 pMと5,000 pM以上という結果であった。以上の結果から、Genotype 1のNS5A領域はNS5A阻害剤に感受性が高く、Genotype 2のNS5A領域は感受性が低いと考えられた。

9. HBV 増殖機構の解析と新規治療法の開発 (田中)

ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞による3次元培養において、培養上清中にHBs抗原やHBV-DNA、細胞内HBV core関連抗原が検出された。また、上清中にもHBV core関連抗原の検出を認めた。上清中のHBV-DNA量が培養期間を通じて継続的に検出され、HBV-DNA量は 10^4 - 10^5 copies/mlであり、60日間は培養の継続が可能であった。

10. HBV pseudotype を用いた HBV 感染受容体の分離・同定とその応用 (上田)

HBVpはヒト肝臓cDNAの哺乳類細胞への導入操作により感染性が上昇することが示唆された。この活性をよく示す細胞はヒト肝癌由来培養細胞株HepG2が最も顕著であったが、アフリカミドリザル腎由来とされるVero細胞でも確認された。この過程は感染受容体そのものは本来これらの細胞に備わっているものであり、導入操作自体がその活性に影響しているものと考えられた。HepG2を用いたHBV粒子付着試験でもその存在が示唆された。そこで、HBV膜蛋白の受容体リガンドに相当すると考えられるPS1~SSNをプローブとして、HepG2細胞から付着因子(感染受容体)の分離・同定を試み、幾つかの特異的な結合因子の存在を確認した。

11. 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 (清原)

HBV: クローン#1と#3はメディアウム交換後1日目からHBs抗原が検出されたがHBc抗原の産生は比較的遅く、4日目まで検出されなかった。HBs抗原産生量が多い#4もHBc抗原産生が遅く、且つ、#1、#3に比べて産生量は少なかった。クローン#4、#21どちらも抗原の産生量が少なかった。HBsおよびHBc抗原の産生パターンが似ているクローン#1と#3はHBe抗原産生パターンが異なり、独立したクローンであると推察された。

HEV:陰性コントロールは100倍希釈でも阻害率が0%であった。一方、陽性コントロールは10万倍以上希釈しても標識抗体の結合阻害が認められ、HEV抗体を特異的に検出していることが確認された。陽性コントロールはいずれも100倍から102400倍希釈まで用量依存性に阻害率が変化し最高希釈濃度でも20%以上の阻害率が計算された。

1.2. HCV感染モデル動物の開発 (三浦)

4蛋白を発現したNIH/3T3細胞にHCVppは効率よく侵入した。このことから、用いている4つのヒト蛋白cDNAは機能に問題ないことが証明された。次に、初代肝細胞にHCVppを感染させたが、ウイルス侵入は観察されなかった。そこで、A1b-CCS0マウス肝細胞とHCVppが感染できるヒト肝細胞株Huh7.5.1細胞でのCD81, SR-BI, CLDN1, OCLN蛋白量をウエスタンブロッティング法で比較した。結果は、CCS0マウス肝細胞での発現はHuh7.5.1細胞に比べて、CD81が20%、SR-BIが30%、CLDN1が10%、OCLNが20%とマウスのヒト蛋白発現量がかなり低値であった。

1.3. ヒトiPS細胞由来肝細胞の作製 (水口)

本研究では、肝細胞への分化効率を改善するため、中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞において発現している転写因子SOX17, HEX, HNF4 α 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ることで、肝細胞への分化効率の飛躍的な向上が可能になった。これら3遺伝子を導入することで作製した分化誘導肝細胞は、アルブミン陽性細胞が約80%となった。また、CYP3A4, CYP2D6をはじめとする薬物代謝酵素の活性レベルもヒト初代培養肝細胞と匹敵するレベルであった。さらに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。さらに、ヒトES/iPS細胞から肝細胞への各分化過程において、7種類の肝関連転写因子(SOX17, FOXA2, HEX, HNF1 α , HNF1 β , HNF4 α , HNF6)を遺伝子導入するスクリ

ーニングを実施した結果、FOXA2, HNF1 α 遺伝子を組み合わせることによって、さらなる肝成熟化が確認された。

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

前年度の解析によりヒトiPS-hep細胞はHCV感染受容体(CD81, SR-BI, claudin-1, occludin)を発現していることが確認されている。今年度、HCVpvを用いて感染能を評価したところ、ヒトiPS細胞では活性が検出されなかったが、ヒトiPS-hep細胞ではHuh7細胞と同等のHCVpv感染能を獲得していることが明らかとなった。

次に、HCV感染受容体であるCD81に対する抗体を用いた感染阻害実験を行った。その結果、コントロールとしてマウスIgGを用いた場合には感染は阻害されなかったが抗CD81抗体を用いた場合に濃度依存的に感染が阻害された。HCVpvのベースとなるVSVの感染能もiPS-hep細胞は分化誘導過程で獲得するがその感染能は抗CD81抗体によって阻害されなかった。

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ベクターシステムを構築し、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, 2011;39:e64)。そこで、本システムを用いて、ヒトiPS細胞およびヒトiPS-hep細胞におけるHCV複製を検討した。ヒトiPS-hep細胞にAdP₁235-HCVを添加したところ、Huh7細胞と同様にHCV複製が観察された。このとき、AdP₁235-DGDD感染細胞ではHCV複製が観察されなかった。一方、ヒトiPS細胞では、ルシフェラーゼ活性の上昇、HCV RNAの存在が観察されなかったことから、ヒトiPS細胞ではHCVは複製しないものと推察される。さらに、HCV複製阻害薬であるインターフェロンを用いてヒトiPS-hep細胞におけるHCV複製を阻害できることを明らかとした。

D. 考察

HCVにはウイルス培養系が開発され、ウイルスライフサイクルの各過程を標的とすることができ

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

本年度の各分担研究者の報告に詳述されているが、様々な成果をあげている。新たな実験系を確立し、すでに臨床に使用されている薬剤の抗 HCV 活性を同定した。また、新たな化合物もスクリーニングされており、標的因子の同定など今後の研究の進展が期待される。また、HBV 受容体の同定、HCV レセプタートランスジェニックマウスの開発も進んでいる。また、特筆すべきは iPS 細胞から誘導した肝細胞で HCV 感染や複製が可能であることである。この実験系によりさらに HCV の生活環の理解が進むと期待できる。

E. 結論

- ・遺伝子型 3a の S310 サブジェノミックレプリコンを世界に先駆けて樹立した。レプリコン細胞におけるウイルス遺伝子複製を確認し、薬剤感受性を検討した。

- ・IP アゴニストによる感染性粒子産生抑制は TXAS 阻害活性によると考えられた。細胞およびマウスで阻害活性を確認した。これらの薬剤は既に臨床で使用されているため、抗 HCV 薬剤として早期に使用できる可能性がある。

- ・ウイルス増殖に関与する宿主蛋白質性因子 FKBP36 を同定した。また、PA28 γ のホモ多量体形成をアッセイする培養細胞系を確立し、PA28 γ を標的とした化合物スクリーニングが可能となった。

- ・Rab 蛋白質のガラニルガラニル化修飾酵素である GGTase II が HCV の複製増殖に重要な宿主因子

であることを明らかにした。

- ・HCV キメラリポーターレプリコン系、および蛍光蛋白発現 HCV 培養系を用いたウイルス侵入、増殖、分泌のすべてのステップを標的とした阻害薬のスクリーニング・アッセイシステムは、HCV 生活環のあらゆるステップに対する阻害剤探索や薬効評価への応用が期待される。

- ・GRFT は、HCV エンベロープタンパク質の高マンノース型糖鎖に結合することによって、標的細胞へのウイルス吸着を阻害するエントリー阻害剤として作用し、*in vitro* で強力な抗 HCV 効果を示す。*in vivo* 実験でも、GRFT は抗 HCV 活性を示した。

- ・SFV785 の臨床応用に向けて、化合物の代謝安定性や毒性について検討し、*in vivo* での薬効薬理試験を行う必要がある。

- ・HCV NS5A 阻害剤は強い抗 HCV 活性を有する。日本に多くの患者が存在する Genotype 2 の株はこの薬剤に対し抵抗性であった。Genotype 2 の C 型慢性肝炎患者にこの NS5A 阻害剤を使用する場合には十分な注意が必要と考えられる。

- ・ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞、ならびに不死化ヒト肝細胞を中空糸に充填した 3 次元培養系による患者血清からの HBV 感染・複製の可能性が示された。以上のことから、この 3 次元培養系は非常に有用な感染モデルとなりうる。

- ・HBV の感染を許容しない培養肝がん細胞は内在性の HBV 付着因子を有しており、何らかの方法で活性化することで HBV 感染能を引き出すことが可能であると考えられた。また本付着因子の分離・同定を目指すことで感染受容体の実態に迫ることが可能であることが示唆された。

- ・Hep2215 クローンの特性を更に検討するとともに、その特性を生かした薬剤スクリーニング系および HBs 抗原、HBc 抗原産生の制御因子の探索につなげていきたいと考えている。

- ・4 つのヒト蛋白を肝細胞に発現するトランスジェニックマウスでは HCV の侵入がおこらなかった。これは、マウス肝細胞における 4 つのヒト蛋白の発現レベルが低いことが一つの原因であることが明らかになった。

・Ad ベクターを用いた機能遺伝子の導入によりヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞は、HCV 研究に使用可能なことが明らかとなった。

・ヒト iPS 細胞由来肝細胞分化誘導系を用いて HCV 感染・複製を解析したところ、ヒト iPS 細胞では HCVpv が感染せず、HCV レプリコンも複製しなかった。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、さらに HCV 感染受容体拮抗薬、HCV 複製阻害薬により HCV 感染および複製が阻害できた。以上の結果より、ヒト iPS 細胞由来肝細胞が HCV 感染・複製の評価・解析系として適用しうることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. Amin EM, Hua J, Cheung MK, Ni L, Kase S, Ren-nel ES, Gammons M, Nowak DG, Saleem MA, Hagiwara M, Schumacher VA, Harper SJ, Hinton D, Bates DO, Lodomery MR. WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. *Cancer Cell* 20(6):768-780. (2011)
4. Anwar A, Hosoya T, Leong KM, Onogi H, Okuno Y, Hiramatsu T, Koyama H, Suzuki M, Hagiwara M, Garcia-Blanco MA. The Kinase Inhibitor SFV785 Dislocates Dengue Virus Envelope Protein from the Replication Complex and Blocks Virus Assembly. *PLoS One*. 6(8):e23246. (2011)
5. Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J. Virol*. 85:6882-6892, 2011
6. Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT System Is Required for Hepatitis C Virus Production. *PLoS ONE*, 6:e14517, 2011
7. 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.
8. Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S, Sakamoto N, Izumi N. Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in IL28B with antiviral response. *Hepatology*, 55(1): 20-29, 2011
9. Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, Wakita T. Replication and Infectivity of a Novel Genotype 1b Hepatitis C Virus Clone. *Microbiol Immunol*. 2012 in press
10. Debdab M, Carreaux F, Renault S, Soundararajan M, Fedorov O, Filippakopoulos P, Lozach O, Babault L, Tahtouh T, Baratte B, Ogawa Y, Hagiwara M Eisenreich A, Rauch U, Knapp S, Meijer L, Bazureau JP. Leucettines, a class of potent inhibitors of cdc2-like kinases and dual specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases derived from the marine sponge leucettamine B:

- modulation of alternative pre-RNA splicing. *J Med Chem.* 54(12): 4172-4186. (2011)
11. Funaoka Y, Sakamoto N, Suda G, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe T, Mishima K, Ueyama M, Onozuka I, Nitta S, Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Watanabe M. Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. *J Virol*, 85(12):5986-5994, 2011
 12. Hikosaka K, Noritake H, Kimura W, Sultana N, Skarkar 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*, 32: 143-150, 2011
 13. Hiramatsu N, Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Sugauchi F, Tamori A, Kakinuma S, Matsuura K, and Izumi N. Pretreatment Prediction of Anemia Progression by Peginterferon Plus Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C: Decision-Tree Analysis. *J Gastroenterol*, 46 (9): 1111-1119, 2011
 14. 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.
 15. Iikura M, Furihata T, Mizuguchi M, Nagai M, Ikeda M Kato N, Tsubota A, Chiba K. ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, in press, 2012
 16. Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: potential treatment for hepatitis C. *Liver Int*, 31:871-880, 2011
 17. 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 M.K., Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther.* 19, 400-407 (2011)
 18. Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatol Int*, 5(3):789-799, 2011
 19. Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of genotype 2b hepatitis C virus in association with the response to peginterferon and ribavirin therapy. *PLoS One*, 6 (9):e24514, 2011
 20. Kakutani H, Takahashi A, Kondoh M, Sakihama T, Hamakubo T, Yagi K. A novel

- screening system for claudin binder using baculoviral display. *PLoS ONE*, 2011 Feb 14;6(2):e16611
21. Kambara, H., Tani, H., Mori, Y., Abe, T., Katoh, H., Fukuhara, T., Taguwa, S., Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2011). Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. *Virology* 412, 211-219
 22. Kataoka N, Diem MD, Yoshida M, 4, Hatai C, Dobashi I, Dreyfuss G, Hagiwara M and Ohno M. Specific Y14 domains mediate its nucleo- cytoplasmic shuttling and association with spliced mRNA. *Scientific Reports* 1, doi:10. 1038/srep00092. (2011)
 23. Kaushik-Basu N, Sakamoto N. Inhibition of hepatitis C virus NS5B polymerase by S-trityl-L-cysteine derivatives. *Eur J Med Chem*, in press, 2012
 24. Kawabata K., Inamura M., Mizuguchi H. Efficient hepatic differentiation from human iPS cells by gene transfer. *Methods Mol. Biol.*, 826, 115-124 (2012)
 25. Kawabata K., Takayama K., Nagamoto Y., Saldon M.S., Higuchi M., Mizuguchi H. Endodermal and hepatic differentiation from human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *J. Stem Cell Res. Ther.* in press
 26. 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.
 27. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Yatsushashi H, Izumi N. Age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among early virological responders to peg-interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. *Antivir Ther*, in press, 2011
 28. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N Nakagawa M, Izumi N. Data Mining Analysis of Hepatocellular Carcinoma Risk Predictors in Chronic Hepatitis C. *J Hepatol*, Epub ahead of Print, 2011
 29. Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Yatsushashi H, Izumi N. Pretreatment prediction of response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C using data mining analysis. *J Gastroenterol*, 46(3):401-409, 2011
 30. 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 prediction of response to PEG-interferon plus ribavirin: data mining analysis. *J Med Virol*, 83:445-452, 2011
 31. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors.

- J Hepatol, 54:439-448, 2011
32. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M. Identification of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. Antimicrob Agent Chemother; Epub ahead of Print, 2011
 33. Li, Y., Takebe, Y., Yang, J., Wei Zhang, W., Yang, R. (2011). High prevalence of HIV-1 subtype B' among heterosexuals in western Hubei, Central China: Bridging the epidemic into general population, AIDS Res. Hum. Retrovirus. 2011 Jan 27. [Epub ahead of print]
 34. Li, Z., He, X., Li, F., Yang, Y., Wang, Q., Xing, H., Takebe, Y., Shao, Y. Tracing the origin and history of HIV-1 subtype B' epidemic in China by near full-length genome analyses. AIDS. 2012 Jan 20. [Epub ahead of print]
 35. Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. Virus Genes, in press, 2012
 36. Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. Virus Res, 157: 61-70, 2011
 37. 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. 2012 86(4):2143-52.
 38. Nakamura Y, Arai A, Takebe Y, Masuda M. A chemical compound for controlled expression of nmt1-driven gene in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Anal Biochem. 2011 May 15;412(2):159-64
 39. Nakamura I, Tanaka Y, Ochiai K, Moriyasu F, Mizokami M, Imawari M. Clarification of interspousal hepatitis C virus infection in acute hepatitis C patients by molecular evolutionary analyses: Consideration on sexual and non-sexual transmission between spouses. Hepatol Res. 2011;41(9):838-845
 40. Nakano, K., Katano, H., Tadagaki, K., Sato, Y., Ohsaki, E., Mori, Y., Yamanishi, K., and Ueda, K. Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman's Disease; Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II. Virology in press
 41. Ninomiya K, Kataoka N, and Hagiwara M. Stress-responsive maturation of Clk1/4 pre-mRNAs promotes phosphorylation of SR splicing factor. J Cell Biol. 195(1):27-40. (2011)
 42. Nishida A, Kataoka N, Takeshima Y, Yagi M, Awano, H, Ota, M, Itoh K, Hagiwara M, and Matsuo M. Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene. Nature Commun 2, 308. (2011)
 43. 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. 2011 410(3):404-9.
 44. Onozuka I, Kakinuma S, Kamiya A, Miyoshi M, Sakamoto N, Kiyohashi K, Watanabe T, Funaoka Y, Ueyama M, Nakagawa M, Koshikawa

- N, Seiki M, Nakauchi H, Watanabe M. Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 406:134-140, 2011
45. Raghvani, J., Thomas, X. V., Koekkoek, S. M., Schinkel, J., Molenkamp, R., van de Laar, T., Takebe, Y., Tanaka, Y., Mizokami, M., Rambaut, A. and Pybus, O. G. (2011). The origin and evolution of the unique HCV circulating recombinant form 2k/1b. *J Virol*. 2012 Feb;86(4):2212-20.
46. Sabine A, Agalarov Y, Hajjami NME, Jaquet M, Hagerling R, Pollmann C, Bebbler D, Pfenniger A, Miura N Dormond O, Calmes JM, Adams R, Makinen T, Kiefer F, Kwak BR, Petrova TV: PROX1, FOXC2 and mechanotransduction cooperate to control connexin 37 and calcineurin during lymphatic valve formation. *Dev Cell*, in press
47. 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*. 2011 54(2): 425-33.
48. 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*. 2011 286(43):37264-73.
49. Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Yuki NS, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M, Ochanomizu-Liver Conference Study Group. Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b. *J Med Virol*, 83:871-878, 2011
50. 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.
51. Sa-Nguanmoo P, Tanaka Y, Ratanakorn P, Sugiyama M, Murakami S, Payungporn S, Sommanustweechai A, Mizokami M, Poovorawan Y. Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes. *Virus Res*. 2011; 158(1-2):209-215
52. 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.
53. Taguwa, S., Kambara, H., Fujita, N., Noda, T., Yoshimori, T., Koike, K., Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2011). Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J. Virol*. 85, 13185-13194
54. Takaya D, Yamashita A, Kamijo K, Gomi J, Ito M, Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Watanabe Y, Arai R, Umeyama H, Honma T, Matsumoto T, Yokoyama S. A new method for induced fit docking (GENIUS) and its