

- application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(22):6892-6905, 2011
55. Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue M.K., Mizuguchi H. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction. *Mol. Ther.*, 20, 127-137 (2012)
 56. Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Tashiro K., Katayama K., Hayakawa T., Furue M.K., Mizuguchi H. Efficient and selective generation of two distinct endoderm lineages from human ES and iPS cells by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One*, 6, e21780 (2011)
 57. Tammela T, Zarkada G, Nürmi H, Jakobsson L, Heinolainen K, Tvorogov D, Zheng W, Franco C, Murtomaki A, Aranda E, Miura N, Yla-Herttuala S, Fruttiger M, Makinen T, Eichmann A, Pollard J, Gerhardt H, Alitara K: VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signaling. *Nature Cell Biol* 13: 1202-1213, 2011
 58. Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Human Molecular Genetics*, 20 (17):3507-3516, 2011
 59. Takeshita S, Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H, Matsuzaki T, Otani M, Muraoka T, Akiyama M, Miura S, Ozawa E, Ikeda M, Kato N, Isomoto H, Tkashima F, Nakao K. Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells. *J Gastroenterol*, in press, 2011
 60. Tee, K.K. Kamarulzaman, A., Matano, T., and Takebe, Y. Phylodynamic inference of infectious diseases caused by the human immunodeficiency virus, enterovirus 71 and 2009 Swine-origin human influenza virus. *Future Virol.* 2011. In press
 61. Toyoda M, Kitaoka A, Machida K, Nishinakagawa T, Yada R, Kohjima M, Kato M, Kotoh K, Sakamoto N, Shiota G, Nakamuta M, Nakashima M, Enjoji M. Association between lipid accumulation and the cannabinoid system in Huh7 cells expressing HCV genes. *Int J Mol Med*, 27:619-624, 2011
 62. Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and hepatitis C virus strains are required for the objective evaluation of anti-hepatitis C virus reagents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 409:663-668, 2011
 63. Ueyama M, Nakagawa M, Sakamoto N, Onozuka I, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Kitazume A, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Sekine-Osajima Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M, Ochanomizu-Liver Conference Study Group. Serum interleukin-6 levels correlate with resistance to treatment of chronic hepatitis C infection with pegylated-interferon-alpha2b plus ribavirin.

- Antivir Ther, 16(7):1081-1091, 2011
64. Uezato T, Sato E, Miura N: Screening of natural medicines that efficiently activate neurite outgrowth in PC12 cells in C2C12-cultured medium. Biomed Res, in press
 65. Urano E, Kuramochi N, Ichikawa R, Murayama SY, Miyauchi K, Tomoda H, Takebe Y, Nermut M, Komano J, Morikawa Y. Novel postentry inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 replication screened by yeast membrane-associated two-hybrid system. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Sep;55(9):4251-60.
 66. Wang J, Singh US, Rawal RK, Sugiyama M, Yoo J, Jha AK, Scroggin M, Huang Z, Murray MG, Govindarajan R, Tanaka Y, Korba B, Chu CK. Antiviral activity of novel 2'-fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine against wild-type and drug-resistant hepatitis B virus mutants. Bioorg Med Chem Lett. 2011;21(21):6328-31
 67. Wang B, Hikosaka K, Sultana N, Sharkar MTK, Noritake H, Kimura W, Wu Y-X, Kobayashi Y, Uezato T, Miura N: Liver tumor formation by a mutant retinoblastoma protein in the transgenic mice is caused by an up-regulation of c-Myc target genes. Biochem Biophys Res Commun, 417: 601-608, 2012
 68. Watanabe T, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Itsui Y, Nishimura-Sakurai Y, Ueyama M, Funaoka Y, Kitazume A, Nitta S, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Oooka S, Watanabe M. Inhibitory effect of a triterpenoid compound, with or without alpha interferon, on hepatitis C virus infection. Antimicrob Agents Chemother, 55(6):2537-2545, 2011
 69. Wen, X., Abe, T., Kukihara, H., Taguwa, S., Mori, Y., Tani, H., Kato, N., Suzuki, T., Tatsumi, M., Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2011). Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. PLoS One 6, e15967.
 70. 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.
 71. 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.
 72. 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
 73. Yoshida T, Takayama K, Kondoh M, Sakurai F, Tani H, Sakamoto N Matsuura Y, Mizuguchi H, Yagi K. Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. Biochem Biophys Res Commun, 416(1-2):119-124, 2011
 74. Yoshida T, Kondoh M, Ojima M, Mizuguchi H, Yamagishi Y, Sakamoto N Yagi K Adenovirus vector-mediated assay system for hepatitis C virus replication. Nucleic Acids Res, 39(10):e64, 2011
 75. Yoshida T., Takayama K., Kondoh M., Sakurai F., Tani H., Sakamoto N., Matsuura Y., Mizuguchi H., Yagi K. Use of human hepatocyte-like cells derived from

induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 416, 119-124 (2011)

2. 学会発表および講演など

1. T Wakita. Hepatitis C Virus Infection and Replication, annual meeting of Prof. Juei-Low Sung ' s Research Foundation, Taipei, Taiwan (2011, 8. 6)
2. T Wakita. HCV RNA replication and drug development. The 8th APASL Single Topic Conference Beijing, China (2011, 10. 7)
3. 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)
4. 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)
5. 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 Delop Biol, Auditorium, Kobe (2012 Feb 25)
6. 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 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
7. N Watanabe, K Futai, H Suga, T Wakita, E2 binding peptide identified by RAPID system inhibited HCV infection, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
8. 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 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
9. 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 assembly, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
10. 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 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
11. Y Okamoto, T Masaki, A Murayama, T Wakita, T Kato, Development of chimeric hepatitis C virus expressing NS5A from strains of genotypes 1 and 2:

- virus production and susceptibility to NS5A inhibitor, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
12. 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 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 13. H Yokokawa, D Akazawa, M Moriyama, N Nakamura, T Kato, K Ishii, T Wakita, Development of purification method for HCV particles using chromatographic technique, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 14. 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 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 15. M Moriyama, D Akazawa, H Yokokawa, K Nishimura, N Nakamura, H Mochizuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, Immunological memory response to induce neutralizing immunoglobulin in HCV particles-immunized mice, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 16. 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 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 17. 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 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 18. N Watanabe, A Murayama, M Saeed, T Date, T Kato, H Aizaki, T Wakita, Identification and analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
 19. Y Okamoto, T Masaki, A Murayama, A Nomoto, T Wakita, T Kato, Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
 20. 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)
 21. A Murayama, N Sugiyama, S Yoshimura, M Ishihara-Sugano, T Wakita, T Kato, Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
 22. 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)
23. 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)
24. 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)
25. 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 USA
26. 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
27. 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
28. Y. Kushima, Y Abe, T Wakita, K Shimotohno, M Hijikata: Novel targets for anti HCV drugs preventing infectious virus particle production. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference, The Latest Advances in Liver Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics, Chiba, Japan, March 1-3, 2011.
29. Y Abe, H H. Aly, T Wakita, K Shimotohno, M Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production. The 6th International symposium of institute network. Tokyo, Japan, June 9-10, 2011
30. Y Abe, T Wakita, K Shimotohno, M Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus particle production. 18th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, USA, Sept 8-12, 2011
31. Y Abe, H Aly, T Wakita, M Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production. 第 34 回日本分子生物学会総会 2011 年 12 月 13 日~16 日、横浜
32. Yamashita A., Fujimoto Y., and Moriishi K Marine natural products as a source of the novel antiviral agent targeting to HCV NS3 helicase XV International Congress of Virology., September 11-16, 2011 Sapporo. Japan
33. Fujimoto Y., Yamashita A., and Moriishi K Inhibitory effect of marine natural products on the replication of hepatitis C virus., September 11-16, 2011 Sapporo.

- Japan
34. Kambara H., Tani H., Mori Y., Abe T., Katoh H., Fukuhara T., Taguwa S., Moriishi K., and Matsuura Y. Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. September 11-16, 2011 Sapporo. Japan
 35. Kawakami, K., Kasai, H., Yamashita, A., Enomoto, N., Matsuura, Y., Kusunoki, M., and, Moriishi K.. Regulation of HCV replication by FKBP8-dependent or -independent Hsp90 activity.. 18th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 8-12, 2011 Seattle. USA.
 36. Kawakami, K., Kasai, H., Yamashita, A., Enomoto, N., Matsuura, Y., Kusunoki, M., and, Moriishi K.. Regulation of HCV replication by FKBP8-dependent or -independent Hsp90 activity. 第34回日本分子生物学会総会, 2011年12月13日~16日, 横浜
 37. Kataoka C., Tani H., Kaname Y., Taguwa S., Abe T., Fukuhara T., Moriishi K., and Matsuura Y. Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells. 第34回日本分子生物学会総会, 2011年12月13日~16日, 横浜
 38. Mori K, Hiraoka O, Ikeda M., Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. A host factor determining the anti-HCV activity of ribavirin. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2011. Oct, Nagoya
 39. Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M., Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles in cell-based long-term HCV RNA replication. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2011. Oct. Nagoya
 40. Ikeda M. Takeda M, Ariumi Y, Wakita T., Kato N. The role of geranylgeranyl transferase II in hepatitis C virus life cycle. The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society in Japan, 2011. Dec., Yokohama
 41. Ikeda M., Takeda M, Ariumi Y, Waikita T., Kato N. Geranylgeranyl transferase II is essential for HCV RNA replication. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep., Seattle, US
 42. Takeda M, Ikeda M., Ariumi Y, Waikita T., Kato N. Development of HCV JFH-1 reporter assay systems using different human hepatoma cell lines. Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2011, 2011 Sep., Sapporo, Japan
 43. Mori K, Hiraoka O, Ikeda M., Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Identification of a host factor determining the anti-HCV activity of ribavirin. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep., Seattle, USA
 44. Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M., Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and HCV strains are required for the objective evaluation of anti-HCV reagents. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep., Seattle, USA
 45. Sejima S, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M., Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles in cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2011, 2011 Sep., Sapporo, Japan
 46. Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M., Dansako H,

- Wakita T, Kato N. HCV production requires the PML tumor suppressor protein. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep., Seattle, USA
47. Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijilata M, Maki M, Ikeda M Wakita T, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-Body and stress granule components around lipid droplets. 18th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2011 Sep., Seattle, USA
48. Sakamoto N Tanaka Y, Nakagawa M, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Enomoto N, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Nishida N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M. ITPA gene variant protects against treatment-induced anemia and improves viral clearance by pegylated interferon- alfa and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. Nov-4-2011. San Francisco, CA. (Poster #1016)
49. Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nakauchi H, Watanabe M. MMP-2 and MMP-14 derived from donor cells enhance therapeutic efficacy of liver cell transplantation in mice. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. Nov-4-2011. San Francisco, CA. (Poster #670)
50. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Yamamoto M, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyohashi K, Nitta S, Murakawa M, Hagiwara M, Watanabe M. A high-content screening assay using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus reveals candidates for small molecule inhibitors of viral entry. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. Nov-4-2011. San Francisco, CA. (Poster #383)
51. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nakauchi H, Watanabe M. Low of Wnt5A promotes biliary differentiation of murine hepatic stem/progenitor cells. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. Nov-4-2011. San Francisco, CA. (Oral presentation #176)
52. Itsuil Y, Sakamoto N, Yauchi T, Watanabe M. Antiviral effect of a novel interferon-inducible protein, IFI-27, against hepatitis C virus replication. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. Nov-4-2011. San Francisco, CA. (Poster #2086)
53. Suda G, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Azuma S, Kakinuma S, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Watanabe M. IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. 62th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. Nov-4-2011. San Francisco, CA. (Poster #2040)
54. Kurosaki M, Itakura J, Yasui Y, Tsuchiya K, Nakanishi H, Takahashi Y, Asahina Y, Tanaka Y, Mizokami M, Sakamoto N, Enomoto N, Izumi N. Prediction model of ribavirin-induced anemia incorporating ITPA genotype could identify chronic hepatitis C patients at high risk of relapse among virological responders to pegylated-interferon and ribavirin. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. Nov-4-2011. San Francisco, CA. (Poster #982)

55. Matsuura K, Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Watanabe T, Sugauchi F, Kurosaki M, Izumi N, Sakamoto N Enomoto N, Yatsushashi H, Nishiguchi S, Hino K, Kaneko S, Nojiri S, Joh T, Tokunaga K, Mizokami M. IL28B and ITPA gene variants correlate with treatment efficacy in pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. Nov-4-2011. San Francisco, CA. (Poster #994)
56. Kurosaki M, Sakamoto N, Matsuura K, Kakinuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Enomoto N, Izumi N. Mutations in the interferon sensitivity determining region of HCV, age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among early virological responders to peg-interferon plus ribavirin therapy. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. Nov-4-2011. San Francisco, CA. (Poster #995)
57. T Yoshida, F Satoh, W Akihiro, M Kondoh, H Mizuguchi, N Sakamoto, K Yagi. Development of an RNA polymerase I-driven adenoviral vector and its application in an HCV replication assay. 18th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-8-2011. Seattle, WA
58. N Sakamoto, Y Funaoka, G Suda, M Nakagawa, S Kakinuma, M Watanabe. Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. 18th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-8-2011. Seattle, WA
59. S Nitta, N Sakamoto, M Tasaka-Fujita, K Kiyohashi, A Kusano-Kitazume, M Murakawa, K Yoshino, K Mishima, S Kakinuma, M Nakagawa, M Watanabe. HCV-NS4B targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immune response. 18th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-8-2011. Seattle, WA
60. Yamagishi, T Yoshida, M Kondoh, H Mizuguchi, N Sakamoto, A Watari, K Yagi. Development of RNA pol-driven adenovirus vector expressing hepatitis C virus replicon. Experimental Biology 2011. Apr-13-2011. Washington, DC
61. Takebe Y., Uenishi R., Tani. H., Suzuki, R., Akazawa, D., Takagi, M., Tsuchiura, T., Hase, S., Suzuki, T., Shinya, K., Wakita, T., Matsuura, Y., Patel, A. Small molecules that elicit strong anti-HCV activity through down-modulation of HCV entry receptors. 17th International symposium on Hepatitis C virus and related viruses. September 10-14, 2011, Seattle
62. M Hagiwara, Moduration of Pre-mRNA Splicing Patterns with Synthetic Chemicals and Their Clinical Applications, The UEHARA Memorial Foundation Symposium, Chembiomolecular Science: at Frontier of Chemistry and Biology, June6-8, Tokyo, Japan
63. M Hagiwara, Visualization of Alternative Splithin with Multi-color Splicing Reporters and Their Application for Screen of Trans-acting Factors and Small Chemicals, The16th Annual Meeting of the RNA Society/The RNA Society of Japan 13th Annual Meeting Kyoto, Japan June14-18, 2011
64. M Hagiwara, Moduration of Pre-mRNA Splicing Patterns with Synthetic Chemicals and Their Clinical Applications,

- The UEHARA Memorial Foundation Symposium, Chembiomolecular Science: at Frontier of Chemistry and Biology, June 6-8, Tokyo, Japan
65. M Hagiwara, Visualization of alternative splicing and the therapeutic manipulation with chemical compounds, US-Japan Conference at City of Hope, August 4-5, USA
 66. M Hagiwara. New therapeutics by alteration of mRNA expression and processing with small chemicals”, International Chemical Biology Conference, October 11-12, USA, 2011
 67. M Hagiwara. New RNA-targetting therapeutics with protein kinase inhibitors, Protein kinases regulating RNA splicing, November 12-16, 2011, France
 68. Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Watanabe T, Tajiri K, Kishi H, Mizokami M. Cross-genotype protection of HBV and a role of HBS antigen mutation in immunity escape in vitro and in vivo model using UPA/SCID mice with human hepatocytes. The 62nd Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases. November 4-8, 2011. San Francisco, USA
 69. Sugiyama M, Tanaka Y, Nakanishi M, Sudoh M, Mizokami M. Host sphingolipid biosynthesis as a therapeutic target for hepatitis B virus replication. The 62nd Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases. November 4-8, 2011. San Francisco, USA
 70. Fujiwara K, Tanaka Y, Orito E, Acharya Subrat K, Joh T, Allison Robert D, Mizokami M. Analysis of a novel “replacement mutation” in core promoter of hepatitis B virus. The 62nd Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases. November 4-8, 2011. San Francisco, USA
 71. Kimura W, Machii M, Sultana N, Hikosaka K, Sharkar MTK, Uezato T, Koseki H, Miura N. Reduced tendon differentiation in the *Irx11* knockout mice. 70th Annual Meeting, of Society of Developmental Biology, July 21-25 2011, Chicago IL
 72. Takayama, M Inamura, K Kawabata, K Katayama, K Tashiro, F Sakurai, M Kusuda-Furue, H Mizuguchi: Efficient generation of mature hepatocytes from human pluripotent stem cells by HNF4 α transduction. 第 26 回日本薬物動態学会年会, 広島, 2011 年 11 月 16-18 日
 73. Takayama, M Inamura, K Kawabata, K Katayama, K Tashiro, F Sakurai, M Kusuda-Furue, H Mizuguchi: HNF4 α promotes hepatic maturation from human embryonic stem cell-derived hepatoblasts. The 6th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, Seoul, Korea, June, 2011
 74. Takayama, M Inamura, K Kawabata, K Katayama, K Tashiro, F Sakurai, M Kusuda-Furue, H Mizuguchi: Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction. International Society for Stem Cell Research, Tronto, June, 2011
 75. Yoshida, T., Satoh, F., Akihiro, W., Kondoh, M., Mizuguchi, H., Sakamoto, N., Yagi, K. Development of an RNA polymerase I-driven adenoviral vector and its application in an HCV replication assay. HCV 2011. September 8-12. Seattle, USA
 76. 脇田隆字, 「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)
77. 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」
 78. 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、第 15 回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)、シンポジウム 1「C 型肝炎治療の新たな展開」
 79. 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、第 15 回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)、パネルディスカッション 4「肝疾患動物モデルと translational research」
 80. 武田緑、池田正徳、有海康雄、脇田隆宇、加藤宣之、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)
 81. 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)
 82. 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、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)
 83. 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、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)
 84. 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 115 回日本肝臓学会大会、2010 年 10 月、福岡
 85. 阿部雄一、下遠野邦忠、脇田隆宇、土方誠：HCV 粒子の感染性獲得に関する肝細胞内シグナルの解析。第 7 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、平成 23 年 7 月 1 日、広島、
 86. 土方誠：プロスタノイドによる HCV の感染性粒子産生制御。平成 23 年度北海道大学遺伝子病制御研究所研究集会『感染、免疫、炎症、発癌』、平成 23 年 12 月 4-5 日、札幌、2011
 87. ウイルス感染による細胞内 SUMO 化修飾の動態解析。芦沢暁、森石恆司、藤室雅弘：第 34 回日本分子生物学会総会、2011 年 12 月 13 日～16 日、横浜
 88. 上田優輝、森 京子、池田正徳、有海康雄、加藤宣之：抗 HCV 剤の活性評価には複数の細胞株由来のアッセイ系が必要である。第 47 回日本肝臓学会総会、2011 年 6 月、東京
 89. 上田優輝、森 京子、池田正徳、有海康雄、加藤宣之：抗 HCV 活性の客観的な評価には複数の細胞株と複数の HCV 株由来のアッセイ系が必要である。第 26 回中国四国ウイルス研究会、2011 年 6 月、徳島
 90. 瀬島寛恵、森 京子、有海康雄、池田正徳、加藤宣之：長期にわたる C 型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現が変動した遺伝子群の同定。第 26 回中国四国ウイルス研究会、2011 年 6 月、徳島
 91. 池田正徳、武田 緑、加藤宣之：メバロン酸経路を標的とした新しい抗 HCV 剤開発の基礎。第 47 回日本肝臓学会総会、東京、2011 年 6 月
 92. 武田 緑、池田正徳、有海康雄、脇田隆宇、加藤宣之：異なるヒト肝細胞株 (HuH-7 と Li23) を用いた HCV 感染レポーターアッセイ系の開発。第 26 回中国四国ウイルス研究会、2011 年 6 月、徳島

93. 中野和司、大崎恵理子、上田啓次: カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の vIRF-3/LANA2 が誘導する IFN シグナルを vIRF-1 が抑制する. 第 26 回ヘルペスウイルス研究会, 6 月 2 日~4 日, 大阪アカデミア, 大阪
94. 大崎恵理子、中野和司、Xin Zheng、Zunlin Yang、上田啓次: KSHV ゲノム複製における LANA の機能的役割と書く内骨格構造の重要性. 第 26 回ヘルペスウイルス研究会, 6 月 2 日~4 日, 大阪アカデミア. 大阪
95. 中野和司、大崎恵理子、上田啓次: カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の vIRF-3 が誘導する IFN シグナルを vIRF-1 が直接結合し抑制する. 第 8 回 EBV 研究会. 7 月 8 日. 大阪大学大学院银杏会館
96. 大崎恵理子、中野和司、Xin Zheng、Zunlin Yang、上田啓次: KSHV LANA と核マトリックス因子 NuMA のキメラ蛋白による ori-P 複製能の検討. 第 8 回 EBV 研究会, 7 月 8 日, 大阪大学大学院银杏会館
97. 高山和雄、稲村充、川端健二、菅原道子、菊池きよ美、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: FOXA2・HNF1 α 遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞の分化誘導. 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 2012 年 3 月 28-31 日
98. 水口裕之: ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術開発と創薬応用, ヒト ES/iPS 細胞: 産業応用最前線セミナー ~細胞治療と創薬スクリーニング~ ダイアローグ社セミナー, 東京, 2011 年 12 月 12 日
99. 水口裕之: 遺伝子導入技術を駆使したヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術開発と創薬応用. 第 26 回長崎 DDS・再生医療研究会, 長崎, 2011 年 12 月 9 日
100. 水口裕之: ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術開発と創薬応用. サイエンスエキスポ関西, 大阪, 2011 年 10 月 21 日
101. 水口裕之: 創薬応用を目指したヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術開発. 第 1 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会, 東京, 2011 年 9 月 2-3 日
102. 水口裕之: ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築. 第 31 回ヒューマンサイエンス基礎研究講習会, 大阪, 2011 年 9 月 1 日
103. 水口裕之: 遺伝子導入技術を駆使したヒト ES/iPS 細胞から肝臓細胞への分化誘導. 第 28 回日本小児肝臓研究会, 筑波, 2011 年 7 月 16 日
104. 水口裕之: 創薬における iPS 細胞を活用した in vitro 毒性評価, サイエンス&テクノロジーセミナー, 東京, 2011 年 7 月 15 日
105. 水口裕之: ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発と in vitro 毒性評価系への応用. 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会, 東京, 2011 年 7 月 13 日
106. 高山和雄、稲村 充、川端健二、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: HNF4 α 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの成熟肝細胞への高効率分化誘導, 第 18 回肝細胞研究会, 東京, 2011 年 6 月 24-25 日
107. 八木清仁、吉田孟史、近藤昌夫、水口裕之: ヒト iPS 細胞由来肝細胞を利用した C 型肝炎ウイルスの複製・感染評価. 日本薬学会第 132 年会, 平成 24 年 3 月, 札幌
108. 山根誠司、吉田孟史、高山和雄、近藤昌夫、櫻井文教、谷英樹、坂本直哉、松浦善治、水口裕之、八木清仁: ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた HCV 感染モデルの作製. 日本薬学会第 132 年会, 平成 24 年 3 月, 札幌
109. 吉田孟史、佐藤芙美、渡利彰浩、近藤昌夫、水口裕之、八木清仁: RNA ポリメラーゼ I 発現系を利用した長鎖 RNA 発現ベクターの開発. 第 27 回日本 DDS 学会, 平成 23 年 6 月, 東京
- G. 知的所有権の出願・登録状況
特許出願

1. 特許取得

1) 上皮性体性肝細胞の製造方法

発明者: 土方 誠、アリ ハサン フセイン、山口
達哉

出願日: 2011 年 3 月 25 日

出願番号: 特願 2011-67112

2) 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、茶山
一彰

出願日: 2011 年 9 月 30 日

出願番号: PCT/JP2011/072682

3) C 型肝炎ウイルスの増殖を抑制する医薬組成物

発明者: 坂本直哉、渡辺守、北詰晶子、萩原正敏、
奥野友紀子

出願番号: 特願 2011-194082

特許出願人: 東京医科歯科大学

出願日: 2011 年 9 月 6 日

II. 分担研究報告

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。

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。

分担研究としてはHBV、HCV、HEVのウイルス増殖機構の解析、抗ウイルス活性を有する化合物の同定などを進めるとともに、研究班に参加する研究分担者の研究をまとめ、研究者間の共同研究を推進する。

B. 研究方法

遺伝子型3のHCVレプリコンの樹立と解析

肝移植後にHCV再感染した症例の血清からウイルス遺伝子をPCRおよびクローニングにより分離し、遺伝子配列を決定し、S310株と命名した。構

造領域以外の HCV 遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子と EMCV IRES 遺伝子により S310 サブジェノミックレプリコンを構築した。S310 サブジェノミックレプリコン構築から 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った。培養終了時に固定し、クリスタルバイオレット染色によりコロニー形成を確認した。さらに、コロニーを形成するレプリコン細胞をクローニングシリンダーによりクローニングした。レプリコン細胞で複製するレプリコン RNA のコピー数を定量し、ノーザンブロットにより解析した。さらに、RT-PCR 法により cDNA を増幅して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。レプリコンゲノムに確認した変異を 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。

(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。

C. 研究結果

遺伝子型 3 の HCV レプリコンの樹立と解析

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の Huh7 細胞に

おけるコロニー形成能は 10ug の RNA トランスフェクションにより数コロニーの形成 (1cfu/ug RNA 以下) ではあるものの、G418 による 3 週間の選択培養の後にコロニーの形成を認めた。レプリコン細胞をクローニングして解析すると、細胞内では $10^7 \sim 10^8$ copy/ug total RNA のレプリコンゲノムの複製していた。ノーザンブロット解析により約 8Kb のレプリコン RNA を確認した。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。従って、S310 レプリコンは Huh7 細胞において複製が可能と考えられた。さらに、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。NS5B 遺伝子の変異の 1 箇所は異なる 2 つのアミノ酸への変異を別々のレプリコン細胞から見いだした。また、T1286I は 7 箇のレプリコン細胞で共通して同定された。これらの変異および、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それぞれ挿入して、その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。さらに、ルシフェラーゼによるレポーターレプリコンアッセイにより、S2210I, R2198H, R2895G, R2895K は一過性複製も増強した。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。

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。

今年度は世界に先駆けて遺伝子型 3a のレプリコン細胞の樹立に成功した。我が国および米国においては遺伝子型1および2型の感染が主体だが、アジア諸国、オセアニア、ヨーロッパにおいては遺伝子型3の感染は広く見られる。インターフェロンおよびリバビリンの治療に加えて、プロテアーゼ阻害剤が承認され、今後はHCVに対する特異的阻害剤の開発が進むと考えられる。しかし、本研究で明らかとなった様に、特異的阻害剤は遺伝子型によりその効果が異なる。従って、S310サブジェノミックレプリコンは遺伝子型3に対する抗ウイルス薬開発に重要な研究ツールとなることが期待される。また、遺伝子型3のHCV感染は脂肪肝との関連が報告されている。遺伝子型により病原性や複製増殖に必要な宿主因子の要求性などが異なる可能性がある。S310サブジェノミックレプリコンや今後開発予定の全長ウイルス複製系などを用いて遺伝子型3のHCVの解析を進める。

E. 結論

遺伝子型 3a の S310 株によるサブジェノミックレプリコンを樹立した。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1: 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.

2: 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.

3: 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.

4: 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.

5: 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.

6: 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.

7: 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.

8: 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.

9: 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.

10: 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.

11: 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.

12: 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.

2. 学会発表および講演など

1. 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)

2. 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」

3. 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、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10. 20-21)、シンポジウム1「C型肝炎治療の新たな展開」

4. 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、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10. 20-21)、パネルディスカッション4「肝疾患動物モデルと translational research」

5. 武田緑、池田正徳、有海康雄、脇田隆宇、加藤宜之、2種類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)、

6. 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)

7. 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、ホテルグランパシフィック、(2011, 6. 2-3)

8. 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、福岡国際会議場、(2011, 10. 20-21)

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 Delop 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 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
15. N Watanabe, K Futai, H Suga, T Wakita, E2 binding peptide identified by RAPID system inhibited HCV infection, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
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 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
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 ASSEMBLY, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
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 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
19. Y Okamoto, T Masaki, A Murayama, T Wakita, T Kato, Development of chimeric hepatitis C virus expressing NS5A from strains of genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
20. 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 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
21. H Yokokawa, D Akazawa, M Moriyama, N Nakamura, T Kato, K Ishii, T Wakita, Development of purification method for HCV particles using chromatographic technique, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
22. 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 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
23. M Moriyama, D Akazawa, H Yokokawa, K Nishimura, N Nakamura, H Mochizuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, Immunological memory response to induce neutralizing immunoglobulin in HCV particles-immunized mice, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
24. 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 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
25. 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 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
26. N Watanabe, A Murayama, M Saeed, T Date, T Kato, H Aizaki, T Wakita, Identification and analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
28. Y Okamoto, T Masaki, A Murayama, A Nomoto, T Wakita, T Kato, Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
29. 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)
30. A Murayama, N Sugiyama, S Yoshimura, M Ishihara-Sugano, T Wakita, T Kato, Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
31. 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)
32. 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)
33. 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)
34. 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 USA

G. 知的所有権の出願・登録状況
なし