

## 患者由来 HCV の感染増殖に機能する肝細胞因子の解析

研究分担者 京都大学ウイルス研究所 土方 誠

研究要旨 前年度、JFH1 感染性粒子産生系において用量依存的な感染性粒子産生阻害効果のあったプロスタグランジン I2 受容体 (IP) アゴニスト ON01301 の他により効果的な IP アゴニストを見出すために他の IP アゴニストの効果を検証したところ、BMY45778 は ON01301 と同様の効果を示すことがわかった。しかしながら同様の効果を示すにはより高い濃度を必要とした。一方、Beraprost は予想に反し、まったく効果を示さなかった。JFH1 感染性粒子産生系において使用されている 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。このことから ON01301 の感染性 HCV 産生抑制効果はその TXAS 阻害活性による可能性が考えられた。実際に TXAS 阻害剤 Ozagrel も同様の効果を示した。ヒト肝臓キメラマウスに感染させた患者血由来 HCV の感染伝播は ON01301 や Ozagrel だけでなく Beraprost でも効率良く抑制できることがわかった。それぞれの薬剤はこれまでにない感染性 HCV 粒子産生を抑制するという効果をもつ抗 HCV 薬剤であると考えられた。またこれらの薬剤はすべて他の疾患に対する薬剤として既に使用されているため、早期に使用する新たな抗 HCV 薬剤として有用性が極めて高いと考えられた。

### A. 研究目的

独自に開発した患者由来の C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染増殖細胞培養系では立体培養したヒト不死化肝細胞を用いている。平面培養では得られなかった効率で感染増殖や感染性粒子産生がおこなわれる原因を解明することにより、このウイルスの生活環に関わる細胞側因子の詳細を明らかにして、これを効果的に抑制する薬剤を抗 HCV 薬候補として同定することを目的とした。

### B. 研究方法

1. 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。

2. 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。

(倫理面への配慮)

この研究で用いられているか不死化肝細胞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研究に基づくものである。不死化肝細胞作製に用いた肝臓提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の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. 前年度、JFH1 感染性粒子産生系において用量依存的な感染性粒子産生阻害効果のあったプロスタグランジン I<sub>2</sub> 受容体 (IP) アゴニスト ONO1301 の他により効果的な IP アゴニストを見出すために他の IP アゴニストの効果を検証したところ、BMY45778 は ONO1301 と同様の効果を示すことがわかった。しかしながら同様の効果を示すにはより高い濃度を必要とした。一方、Beraprost は予想に反し、まったく効果を示さなかった。
2. ONO1301 と Beraprost の相違点は前者がトロンボキサン A<sub>2</sub> (TXA) 合成酵素阻害活性も併せ持つことであった。BMY45778 にはそのような報告がなかったがその分子構造を比較したところ ONO1301 に類似していたため BMY45778 にも TXA 合成酵素 (TXAS) 阻害活性があることが推定された。
3. JFH1 感染性粒子産生系で用いている HuH7 細胞に各 IP アゴニストが機能しているか否かを IP アゴニストによって細胞内で生じる cAMP の誘導を cAMP responsive element をプロモーターに有するレポータープラスミドを用いてそのルシフェラーゼ (Luc) 活性を測定することにより検討した。対照細胞として HuS-E/2 細胞を用いた場合、ONO1301 と Beraprost の双方で Luc 活性の上昇が認められたが、HuH7 細胞では双方のアゴニストに効果は認められなかった。このことから 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。このことから ONO1301 の感染性 HCV 産生抑制効果はその TXAS 阻害活性による可能性が考えられた。
4. TXAS 阻害剤 Ozagrel の効果を同様に検討した結果、ONO1301 同様に用量依存的に感染性 HCV 産生を抑制することが明らかとなった。
5. ONO1301 と Beraprost そして Ozagrel が実際に患者由来 HCV の感染を阻害する効果を有するか否かについて遺伝子型 1b の HCV を感染させたヒト肝臓キメラマウスを用いて検討した。その結果、上記3種の薬剤はすべて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ていることがわかった。

### D. 考察

1. 少なくとも JFH1 感染性粒子産生系においては2種の IP アゴニストによって感染性粒子産生が制御されるがこれは IP アゴニストとしての機能ではなく、その TXAS 阻害活性によるものであることが考えられた。実際に TXAS 阻害剤 Ozagrel も同様の効果を示した。
2. TXA は HCV の感染性粒子形成に機能することから TXA によって変化する細胞内の現象に関わる因子は新たな抗 HCV 薬の標的になる可能性がある。
3. ヒト肝臓キメラマウスに感染させた患者血由来 HCV の感染伝播は ONO1301 や Ozagrel だけでなく Beraprost でも効率良く抑制できることがわかった。この結果は用いた薬剤が組換え体 HCV 感染性粒子産生系だけでなく、患者血由来 HCV の感染に対しても同様の抑制効果を示すことを示しており、新たな作用機序を有する抗 HCV 薬剤として利用可能であることを示している。
4. Beraprost は組換え体 HCV 感染性粒子産生系では抑制効果を示さなかったが、ヒト肝臓キメラマウスに感染させた患者血由来 HCV には有効であった。立体培養の HuS-E/2 細胞では PGI 合成酵素遺伝子の発現は低下していること、効果のなかった HuH7 細胞では IP からのシグナルが異常であること、そして PGI は TXA と拮抗的な機能を有することまた TXA 産生に抑制的な効果があることなどから、IP アゴニストも当初予想されたようにヒト肝臓においては HCV 感染性粒子産生に対して抑制的な効果を持つことが考えられた。

### E. 結論

JFH1 感染性粒子産生系における IP アゴニストによる感染性粒子産生抑制はその TXAS 阻害活性によるものであることが考えられた。ヒト肝臓キメラマウスに感染させた患者血由来 HCV の感染伝播は IP アゴニストと TXAS 阻害剤で効率良く阻害されたことからそれぞれの薬剤はこれまでにない作用機序をもつ抗 HCV 薬剤であると考えられた。またこれらの薬剤はすべて他の疾患に対する薬剤として既に使用されているため、早期に使用する抗 HCV 薬剤として有用性が極めて高いと考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yasuo Ariumi, Misao Kuroki, Yukihiro Kushima, Kanae Osugi, Makoto Hijikata, Masatoshi Maki, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato: Hepatitis C Virus Hijacks P-body and Stress Granule Components Around Lipid Droplets. J. Virol., 85(14), 6882-6892, 2011

2) Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki, Matthew J. Evans, Kunitada Shimotohno, Kazuaki Chayama, Yoshiharu Matsuura, Makoto Hijikata, Kohji Moriishi, Tsukasa Seya, Nobuyuki Enomoto, Kazuhiko Koike, Nobuyuki Kato, Tatsuya Kanto, Hak Hotta: Will there be an HCV meeting in 2020? Summary of the 17<sup>th</sup> International Meeting in Hepatitis C Virus and Related Viruses, Gastroenterology, 141(1), E1E5, 2011

### 2. 学会発表

1) Yukihiro Kushima, Yuichi Abe, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Novel targets for anti HCV drugs preventing infectious virus particle production. The 3<sup>rd</sup> JCA-AACR Special Joint Conference, The Latest Advances in Liver Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics, Chiba, Japan, March 1-3, 2011.

2) Yuichi Abe, Hussein H. Aly, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Makoto 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

3) Yuichi Abe, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Makoto 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

4) Yuichi Abe, Hussein Aly, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production.

平成23年12月12-15日、横浜、2011年

5) 阿部雄一、下遠野邦忠、脇田隆字、土方 誠: HCV 粒子の感染性獲得に関与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、2011年6) 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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 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

2. 実用新案登録 特になし。

3. その他 特になし。

## キメラマウス肝細胞を用いた3次元培養系の試み

研究分担者 名古屋市立大学大学院医学研究科 田中 靖人

研究協力者 名古屋市立大学大学院医学研究科 杉山 真也、村上 周子

研究要旨 培養細胞株は3次元化して培養し組織化させることでその性質が変化することが知られている。中空糸に不死化ヒト肝細胞を充填することにより、3次元培養系を作成した。この3次元培養系においてB型肝炎ウイルス（HBV）感染患者血清を感染源としてHBVの感染実験を行った結果、感染初期から経時的に培養上清中のHBV-DNAの増加を確認し、約1ヶ月間に渡って培養上清中のHBV-DNA量は $10^5$  copies/mL以上で検出された。さらに、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用いて、中空糸によるHBVの3次元培養実験を行った。培地にHBV感染患者血清を添加してHBVを感染させ（ $>10^5$  copies/ml）、培養上清中のHBs抗原を測定することにより感染を確認した。培養期間を通じた上清中の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。今後、HBV培養系の実用化に向けた改良を重ねる。また、HBV培養上清を感染源として、キメラマウスへの感染実験を行う予定である。

### A. 研究目的

3次元培養系におけるB型肝炎ウイルス（HBV）の感染・複製の可能性について検討している。今年度は、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用いて3次元培養を行い、患者血清からのHBV感染・複製を試みた。

### B. 研究方法

- 1) 中空糸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。
- 2) 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た。
- 3) 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。

（倫理面の配慮）

患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換

えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

### C. 研究結果

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。

### D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞を用いた3次元培養系は不死化ヒト肝細胞と同様に長期間での培養が可能である。肝組織より単離した初代培養であることからより生体に近い状態での検討が期待できる。長期間での培養実験により、各種変異体の感染効率の違いやHBV感染・複製様式の解明、特にレセプターの探索や粒子放出過程などを解析できる。また、患者血清から

の感染が可能であることから、検体別の解析が期待できる。引き続き、HBV培養上清からのin vitroにおける再感染、さらには培養上清を感染源としたキメラマウスへの感染実験を検討中である。今後、この系を用いた感染防御実験（特にワクチンエスケープミュータントに関して）、標的分子薬剤の探索研究や新規治療法の開発研究の可能性を検討していきたい。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

- 1) 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 perss.
- 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):2143-2152.
- 3) 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.
- 4) 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.

- 5) 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.

##### 2.学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1.特許取得

なし

##### 2.実用新案登録

なし

##### 3.その他

なし

## 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

分担研究者 森石恆司 山梨大学医学部 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)のキャプシド蛋白質であるコア蛋白質による病原性発現およびウイルス増殖に宿主蛋白質 PA28 $\gamma$ の発現が必要である事を明らかにしてきた。また、NS5Aと結合するFK506 binding protein 8 (FKBP8)はウイルス複製に必須であることも報告している。本研究では、化合物スクリーニングによる抗HCV剤の開発を最終目標に、宿主蛋白質 PA28 $\gamma$ を標的とした培養細胞スクリーニング系の構築と、FKBP8に関連した内在因子の同定を試みた。VP16-GAL4 システムによって、細胞内における PA28 $\gamma$ のホモ複合体化を標的にしたスクリーニング系を確立した。また、レプリコン細胞株によって FKBP8 の依存度が異なることを明らかにし、FKBP8 の機能と同等のタンパク質因子の同定を試みた。これらの成果は、新規抗HCV薬開発に繋がるものと考えられる。

### A. 研究目的

国内で約200万人もの感染者が推定されているC型肝炎ウイルス(HCV)は、高率に持続感染に移行し、慢性肝炎・肝硬変、肝細胞癌を引き起こす。本邦の約8割の肝細胞癌はHCV感染に起因する。先進国に多い高ウイルス量タイプのウイルス遺伝子型1の感染者に対して現行で最も有効な治療法であるインターフェロン/リバビリンによる併用療法の著効率は約50%程度に留まるが、新規NS3プロテアーゼ抑制剤の登場により、より高い著効率が期待されている。しかしながら、RNAウイルスに対する抗ウイルス薬は、耐性ウイルスを出現させる事から、予断の許さない状況が続くと思われる。

フラビウイルス科に属するHCVはプラス鎖RNAゲノムを持つエンベロープウイルスである。そのウイルスゲノムに単一のポリプロテイン前駆体がコードされており、宿主およびウイルスプロテアーゼによって切断を受け、10個のウイルス蛋白質に成熟する。キャプシド蛋白質であるHCVコア蛋白質は前駆体のアミノ末端に位置し、シグナルペプチダーゼによる切断を始めに受け、更にC末端膜貫通領域がシグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)によって切断を受けて成熟する。宿主蛋白質PA28 $\gamma$ 存在下で、コア蛋白質は肝脂肪化、肝癌などの病原性発現を誘導し、PA28 $\gamma$ 遺伝子を欠損させるとその病原性発現誘導が失われることを我々は報告している。さらに、PA28 $\gamma$ はウイルス増殖において

も必須因子であることを、2010年報告している。ウイルス粒子形成のメカニズムはよくわかっておらず、宿主蛋白質因子の分子機構は明確になっていない。

以前、我々はウイルスゲノム複製に宿主蛋白質FKBP8が必要であることを報告している。このタンパク質はNS5Aに結合し、Hsp90と共にウイルス複製のあるmembranous webへリクルートされ、ウイルスタンパク質のフォールディングに機能する。FKBP8との結合にNS5A内の121番目のVal(あるいはIle)が重要で、このアミノ酸残基をAlaに置換すると、ウイルス複製は完全に抑制される。FK506結合タンパク質(FKBP)ファミリーが分類されるイムノフィリンで3つのTPRをもつものは、FKBP8, FKBP51, FKBP52, FKBP36, そしてCyclophilin 40が知られている。

本研究では薬剤スクリーニング方法の開発と、新規内在性標的因子を同定することを目的として、PA28 $\gamma$ の多量体形成を利用した培養細胞系の構築を試みた。また、FKBPファミリー中で、FKBP8以外の新規宿主因子の同定を試みた。

### B. 研究方法

pActおよびpBINDにPA28 $\gamma$ 遺伝子あるいはプロテアソーム活性化能を持たないPA28 $\gamma$ Pro245A1a(PA28 $\gamma$ P245A)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ように、プラスミドを構築し、Huh70K1細胞にGAL4結合領域を5つ(pG51uc)あるいは

9つ(pGL4.35)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。

#### (倫理面への配慮)

本研究にあたっては、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を必要とする材料は含まれない。

### C. 研究結果

化合物スクリーニングによる抗HCV剤の開発を最終目標に、宿主蛋白質PA28 $\gamma$ を標的とした培養細胞系の構築を試みた。PA28 $\gamma$ 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 $\gamma$ およびGAL4-PA28 $\gamma$ 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の構築を試みた。トランスフェクションによってプラスミドをそれぞれHuh7OK1細胞に導入し、48時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。GAL4結合領域が5つのものより、9つのレポータープラスミドの感度が高かった。また、変異型との組み合わせより、PA28 $\gamma$ 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 $\gamma$ の組み合わせ、およびVP16-PA28 $\gamma$ 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をRNA干渉によってノックダウンしたところ、0株由来のレプリコン細胞でレプリコンRNAの複製が抑制されたが、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。両レプリコンRNAにコードされてNS5Aの121番目の残基に変異は認められず、また、FKBP8との結合もN株細胞株からPCRで増幅したNS5Aで確認された。したがって、N株由来のレプリコン細胞株でFKBP8非依存ウイルス複製が認められる理由として、ウイルス側の変異という

より、FKBP8の機能を代替する細胞内因子の存在が考えられた。そこで、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。

### D. 考察

PA28 $\gamma$ のホモ多量体形成能を利用した培養細胞系の基盤が出来た。今後、安定して発現する細胞株を樹立し、化合物ライブラリーをスクリーニングし、ウイルス培養系において効果を確認する予定である。

また、ウイルス複製に必須の新規宿主タンパク質としてFKBP36を同定した。このFKBP36は細胞株で発現量が異なり、FKBP36の発現が高ければ、FKBP8の発現が低下した状態でも、FKBP36がFKBP8の機能を補うことでウイルス複製を維持できるものと考えられた。今後、FKBP36が抗ウイルス剤開発の標的になりうるかさらに検討が必要である。

### E. 結論

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 $\gamma$ 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 $\gamma$ を標的とした化合物スクリーニングが可能となった。

### F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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

2. 学会発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.

4. 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..
5. 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
6. 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
7. 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

- H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。



# 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 分担研究: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

研究分担者 坂本 直哉 東京医科歯科大学分子肝炎制御学講座

**研究要旨** 我々は、独自に開発したHCV増殖モデル、及びHCV-JFH1感染細胞を用い、抗ウイルス活性を持つ化合物・宿主蛋白などの探索、機能解析を遂行し、以下の結果を得た。(1)4,400種の合成化合物のスクリーニングにより、HCV増殖を抑制する4種の化合物が同定された。(2)YFP,RFPタグ付加HCVを用いたウイルスエンターリー阻害化合物のスクリーニング系を構築した。本研究で同定された化合物の作用機構の解析、小動物モデルを用いた効果・安全性の検証を進めることにより新たな抗ウイルス薬剤の開発につながると思われる。

## A. 研究目的

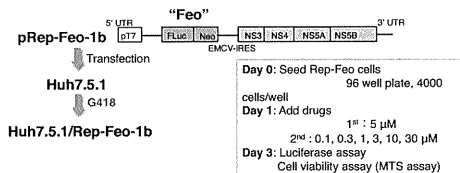
C型慢性肝炎の標準治療であるペグインターフェロン・リバビリン併用療法は、依然として著効率が50%にとどまり治療困難例が存在することから、新しい作用機構に基づいた治療法の開発が必須である。我々は、新規HCV阻害剤の探索を目的に、(1) HCV subgenomic replicon系を用いたウイルスゲノム増殖抑制化合物スクリーニング、および(2) 蛍光蛋白タグ付加HCV-JFH1培養系を用いたウイルスエンターリー阻害化合物のHigh-content screening assayを目的として研究を遂行した。上記スクリーニングで抽出された化合物のHCV増殖抑制効果について解析を行った。

## B. 研究方法

(1) HCV subgenomic repliconを用いたウイルス増殖抑制化合物のスクリーニング：HCVキメラルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現するHCV-Feo replicon細胞、およびHCV-JFH1培養系を用いて、

**対象：** 4046化合物  
「Lipinski則にのっとったdrug likeかつ構造の多様性を重視した化合物」という条件のもとに化合物サプライヤー（InterBioScreen社、Chemical Block International社）から購入。重金属は含まない。

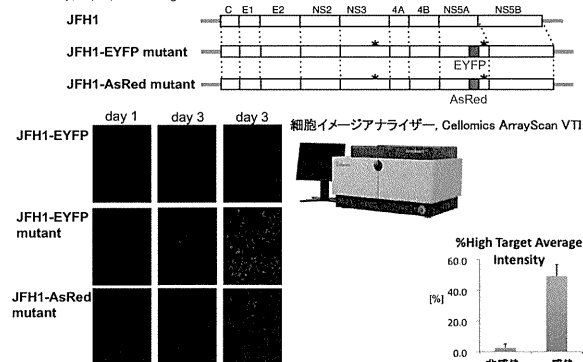
**方法：** 1. Screening：Feo レプリコン (Sakamoto et al. 2003, Tanabe et al. 2004)  
2. Validation：HCV-JFH1細胞培養系 (Wakita, Nature Med 2005)



HCV増殖を制御する薬剤・化合物のhigh-throughput screening (HTS)をおこなった。

(2) 蛍光蛋白タグ付加HCV-JFH1培養系を用いた解析：JFH-1株のNS5AC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。この蛍光蛋白発現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。翌日培地を交換し、5日間の培養後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、エンターリー阻害剤として抽出した。

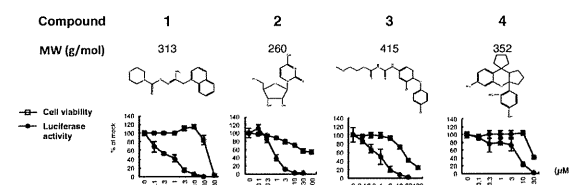


## (倫理面の配慮)

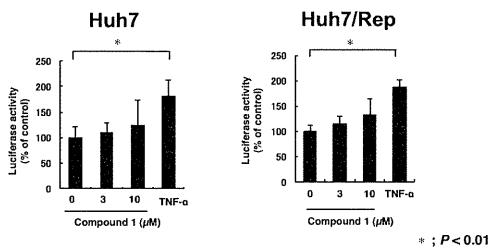
本研究における遺伝子組換え実験は、東京医科歯科大学組み換えDNA実験安全管理委員会の承認（承認番号 2007-123, 2008-160）、および文部科学大臣の確認（19 学文科振第 642 号）を取得している。ウイルスの使用に当たっては、東京医科歯科大学病原微生物等安全管理規則を遵守し、実験計画の届出・承認のもと遂行している。

## C. 研究結果

(1) 4046化合物のうち、細胞毒性を示さずにレプリコン増殖抑制効果を示す化合物を23個抽出した。このうち、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。これらはHCV-IRES翻訳活性には影響せず、HCV増殖を特異的に阻害している可能性が示唆された。



細胞内シグナル伝達系に対する効果についての解析では、1個はNFκBシグナル経路を活性化することが示され、他の3個は既存のIFNやNFκBを介さない経路により抗HCV効果を呈することが示された。



(2)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の定量解析に成功した。抗CD81抗体を用いたエンتری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تری過程を阻害している可能性が示唆された。

## E. 結論

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。本研究で同定された化合物の作用機構の解析・小動物モデルを用いた効果・安全性の検証を進めることにより HCV の新規治療法開発に結びつくものと考えている。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

[論文発表]

1. 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.
2. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Yatsuhashi 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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 application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(22):6892-6905, 2011.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Yatsuhashi H, Izumi N. Pretreatment prediction of response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C using data mining analysis. *J Gastroenterol* ,46(3):401-409, 2011.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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. *Hepato Res* ,41:258-269, 2011.
  18. 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.
  19. 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.
  20. 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.
  21. 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.
  22. 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.
- [総説]
1. 坂本直哉：インターロイキン 28-29 (IL-28・IL-29) -インターフェロンλ. 臨床免疫・アレルギー科特集：サイトカインのすべて 2011 in press.
  2. 坂本直哉：海外における DAA 開発臨床試験：最近の動向. 化学療法 2011; 63: 1112-1118, 2011.12.1 発行.
  3. 坂本直哉：海外における DAA 開発臨床試験：最近の動向. 肝胆膵 2011; 63: 1112-1118, 2011.12.1 発行.
  4. 須田剛生、坂本直哉：インターフェロン治療抵抗性に関わるサイトカイン. ネットワーク肝胆膵 2011; 63: 1112-1118, 2011.12.1 発行
  5. 藤田めぐみ、加藤孝宣、坂本直哉：HCV による自然免疫系の抑制機構: NS3、NS4B. 肝胆膵 2011; 63:1 107-1111, 2011.12.1 発行.
  6. 箴島裕子、中川美奈、坂本直哉：HCV の複製・増殖機構と遺伝子型・遺伝子変異. 日本臨床 2011; 69:52-58.
  7. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守：シクロフィリン阻害剤. 肝胆膵 2011;62:403-412.
  8. 坂本直哉：STAT-C 多剤併用療法：脱インターフェロン治療なるか？ 肝胆膵 2011; 62:421-426.
- [学会発表]
1. 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)
  2. 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)
3. 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)
  4. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nakauchi H, Watanabe M. Loww 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)
  5. Itsui I 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)
  6. 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)
  7. 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)
  8. 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)
  9. 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)
  10. Takeshi Yoshida, Fumi Satoh, Watari Akihiro, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Naoya Sakamoto, Kiyohito 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.
  11. Naoya Sakamoto, Yusuke Funaoka, Goki Suda, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Mamoru 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.
  12. Sayuri Nitta, Naoya Sakamoto, Megumi Tasaka-Fujita, Kei Kiyohashi, Akiko Kusano-Kitazume, Miyako Murakawa, Kouhei Yoshino, Kako Mishima, Sei Kakinuma, Mina Nakagawa, Mamoru 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.
  13. Yoshiaki Yamagishi, Takeshi Yoshida, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Naoya Sakamoto, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi. Development of RNA pol-driven adenovirus vector expressing hepatitis C virus replicon. Experimental Biology 2011. Apr-13-2011. Washington, DC.
- H.知的所有権の出願・取得状況
- 1.特許取得
    - 出願番号：特願 2011-194082
    - 発明の名称：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
    - 特許出願人：東京医科歯科大学
    - 提出日：平成 23 年 9 月 6 日
  - 2.実用新案登録
    - なし
  - 3.その他
    - なし

## 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

分担研究者： 武部 豊（国立感染症研究所エイズ研究センター）

共同研究者： Barry R. O’Keefe（米国国立がん研究所分子標的プログラム）

Garry Lund, Norman Knetman (KMT Hepatech)

脇田隆宇（国立感染症研究所ウイルス II 部）

**研究要旨** 紅藻から分離されたマンノース特異糖鎖結合性レクチンであるグリフィスシン (GRFT) は、JFH-1を用いたHCVcc assayにおいてsub nMオーダー (EC50~0.4 nM) の極めて強力な抗HCV活性を示す。ヒト肝細胞移植Alb-uPA/SCIDマウスを用いた*in vivo* 実証 (Proof-of-Concept) 実験の結果、GRFTは高いbioavailabilityを示し、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が起こらないことを明らかにした。また、ヒト肝細胞が既にHCVに感染している条件においても、おそらくHCVの再感染メカニズムを阻害することによって、HCV増殖を効果的に抑制できることを示した。これらの結果は、糖鎖結合タンパク質を用いた新たな抗HCV治療薬・治療技術開発の可能性を示唆するものである。

### A. 研究目的とその背景

糖鎖結合タンパク質 (carbohydrate binding protein, CBP) のもつ抗ウイルス効果に関しては、HIV-1 に対して最もよく研究されている。中でも、紅藻由来のマンノース特異糖鎖結合タンパク質であるグリフィスシン (GRFT) は、sub nM の極めて強力な抗 HIV-1 活性 (EC50=0.04 nM) を示すことが明らかにされている。GRFT は分子量 12.7 kDa の単量体からなる domain-swapped dimer で、dimer 当たり 6 個のマンノース結合サイトをもつ極めて特徴的な構造をもつことが知られている。

われわれは、これまでに GRFT が、実際に HCV に対して sub nM レベルの極めて強力な抗ウイルス活性を示すことを明らかにしてきたが、本研究は、個体レベルにおける抗 HCV 活性を、ヒト肝細胞移植 Alb-uPA/SCID マウスを用いて評価し、その新規治療薬としての可能性を探ろうとするものである。

### B. 研究方法

#### (1) GRFT の bioavailability と毒性（副作用）の検討。

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。

#### (2)ヒト肝細胞移植 Alb-uPA/SCID マウスを用いた HCV 感染防御実験

次の 2 つの条件で実験を行った。

##### (2-1) 感染防御実験 1 (HCV チャレンジを GRFT 接種開始の 8 時間後に行う)

GRFT (20 mg/kg) の皮下接種を 10 日間毎日 1 回行った。HCV (genotype 1a) ( $2.0 \times 10^5$  IU) の腹腔接種は第 1 回目の GRFT 接種の 8 時間後に行ない、ウイルス接種の 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。

##### (2-2) 感染防御実験 2 (HCV チャレンジは GRFT 接種開始の 1 日後)

ヒト肝細胞移植 Alb-uPA/SCID マウス (キメラマウス) を次の 4 群 (各群 n=4) に分け、感染防御実験を行った。:

- 1) 生理的食塩水接種群
- 2) GRFT (20 mg/Kg) 接種群;
- 3) インターフェロン  $\alpha$  (1,350 IU/Kg) 接種群
- 4) GRFT+インターフェロン  $\alpha$  接種群

各群のマウスに対して、HCV (genotype 1a) ( $2.0 \times 10^5$  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。

上記 2 実験において、血中の HCV 量の測定に並行して、移植ヒト肝臓組織の着生状況をマウス血漿中のヒト  $\alpha$ -1 アンチトリプシン (hAAT) 量 ( $>100 \mu\text{g/mL}$ ) で、またマウス体重の増減等マウスに与える毒性をモニターした。

(倫理面への配慮) 動物実験に関する指針を遵守。

### C. 研究結果

#### (1) GRFT の bioavailability および毒性 (副作用)

図 1 に見るように、血中 GRFT 量は接種後 3 日で  $0.72 \text{ mg/mL}$  ( $\sim 57 \text{ nM}$ ), 11 日後には  $3.3 \text{ mg/mL}$  ( $\sim 260 \text{ nM}$ ) と、*in vitro* 実験での  $\text{EC}_{50}=5.4 \text{ ng/mL}$  ( $0.4 \text{ nM}$ ) 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  $3.3 \text{ mg/mL}$  ( $\sim 260 \text{ nM}$ ) と *in vitro*  $\text{EC}_{50}$  の 100 倍のレベルが維持された。本実験における 10 日間の GRFT 接種によっては、軽度の体重減少を除いて副作用は見られなかった。

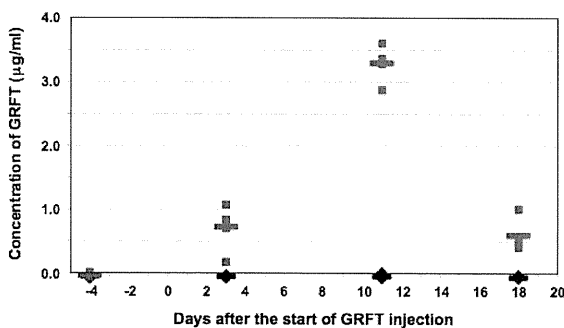


図 1. GRFT の Bioavailability

#### (2) ヒト肝細胞移植 Alb-uPA/SCID マウスを用いた HCV 感染防御実験

##### (2-1) 感染防御実験 1 (HCV チャレンジと GRFT 接種開始の 8 時間後の場合: GRFT 接種は 10 日間)

図 2 に示すように、HCV 感染後 3 日後 (day3) までは、血中の HCV 量は、対照群 (生理的食塩水接種群) 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。実験期間中、すべてのマウスが GRFT 接種に対して耐容性を示し、有意の毒性は観察されなかった。

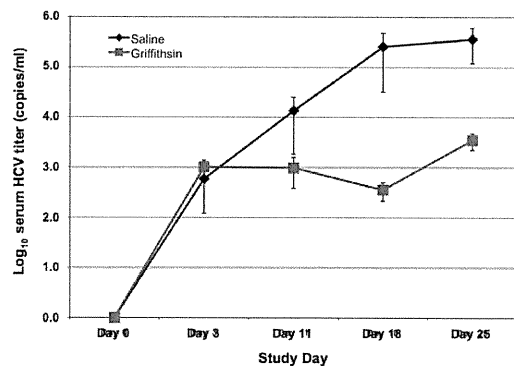


図 2. GRFT による感染防御実験(1)

##### (2-2) 感染防御実験 2 (HCV チャレンジが GRFT 接種開始の 1 日後: GRFT 接種を 18 日間に延長)

図 3 に示すように、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。

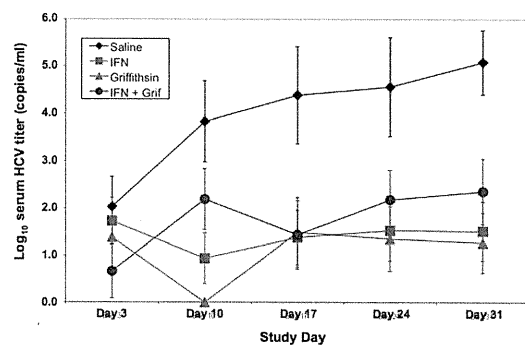


図 3. GRFT による感染防御実験 (2)

なお、GRFT 単独接種群と、インターフェロン  $\alpha$  接種群、インターフェロン  $\alpha$  および GRFT の併用接種群との間で統計的有意差、相乗効果は見い出されなかった。

18 日間の GRFT 接種に対しても、多くのマウスは認容性を示したが、少数に毒性(致死を含む)が観察されるという問題点が明らかとなった。

#### D. 考察

これまでの解析結果を含め、GRFT は HCV エンベロープタンパク質 (E1/E2) の (高マンノース型) 糖鎖に結合することによって、標的肝細胞への HCV 粒子の吸着 attachment さらに HCV 粒子の HCV エントリー受容体 (CD81 および SR-B1) への結合をブロックし、その結果 HCV のエントリー過程が阻害され、強力な抗 HCV 活性が発現すると考えられる。

一般にタンパク性因子は、bioavailability が低いという問題があるが、GRFT は、図 1 に見るように高い bioavailability を示すことが明らかとなった。血中半減期も 3-4 日と、タンパク性因子としては例外的に長い半減期を示す。それに対応し、図 2 に見るように、GRFT が十分な血中レベルに達した場合、既に HCV が感染していると考えられる条件においても、HCV の増殖を十分に阻止できることが示された。このことは、GRFT が感染ヒト肝組織片での HCV 再感染を阻害することによって、感染拡大を抑制しうることを示す観察であるという点で重要である。

一方、HCV チャレンジの 1 日前から GRFT 接種を開始した場合、HCV チャレンジの時点には既に十分な血中レベルに達しているものと推定され、図 3 に見るように GRFT 接種の終了後の 2 週間以降を含めて、HCV 増殖の完全な阻止が可能であった。これらの観察は、GRFT が特に、肝臓移植後の HCV 再感染阻止といった分野に、十分に応用可能であることを示唆するものと考えられる。

問題の 1 つは、GRFT の長期投与における毒性であるが、今回の接種条件では、接種量が防御効果を示す最少量に比して、相当の大過剰となっているものと考えられ、bioavailability に関する実験結果 (図 1) から見て、おそらく接種量を少なくとも 1/5 程度に減量することができるものと期待

される。

先にも議論したように (前年度分担報告書参照)、分子量が 10,000 を超えるタンパク質であるために、経口吸収性や良好な血中薬理動態を期待できないことや、抗体産生の誘導のために薬理効果が短期間で減弱する可能性、さらに過敏性反応などの重篤な副作用を起因する虞れがあることから、臨床応用に向けては多くのハードルがクリアされる必要があると考えられる。しかし、ここで見たマウスモデルでの良好な結果は、抗 HCV 戦略の新たな道筋としての可能性を期待させるものである。

#### E. 結論

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。ヒト肝細胞移植 Alb-uPA/SCID マウスを用いた *in vivo* 実証実験によっても、GRFT は強力且つ持続性の抗 HCV 活性を示すことから、抗 HCV 戦略の新たな開発の可能性が期待される。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

[論文発表]

1. Takebe, Y., Saucedo, C. J., Lund, G., Uenishi, R., Hase, S., Tsuchiura, T., Knetman, N., Ramessar, K., Tyrrell, D. L. J., Shirakura, M., Wakita, T., McMahon J. B., and O'Keefe, B. R., Antiviral lectins from red and blue-green algae show potent *in vitro* and *in vivo* activity against hepatitis C virus. *Hepatology*. 2012. in submission.
2. 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. Epub 2011 Nov 23. PMID: 22114341
3. 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. Epub 2011 Jul 11.
  4. 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. Epub 2011 Feb 2.
  5. 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. Epub 2011 Jul 11.
  6. 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] PMID: 21174631.
  7. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S; WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation (as a collaborator). Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS*. 2011 Mar 13;25(5):679-89. PMID: 21297424 [PubMed - in process].
  8. 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]. PMID: 22269972
  9. 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.
- [学会発表]
1. 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, Japan.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 該当なし
  2. 実用新案登録 該当なし
  3. その他 該当なし



图 1

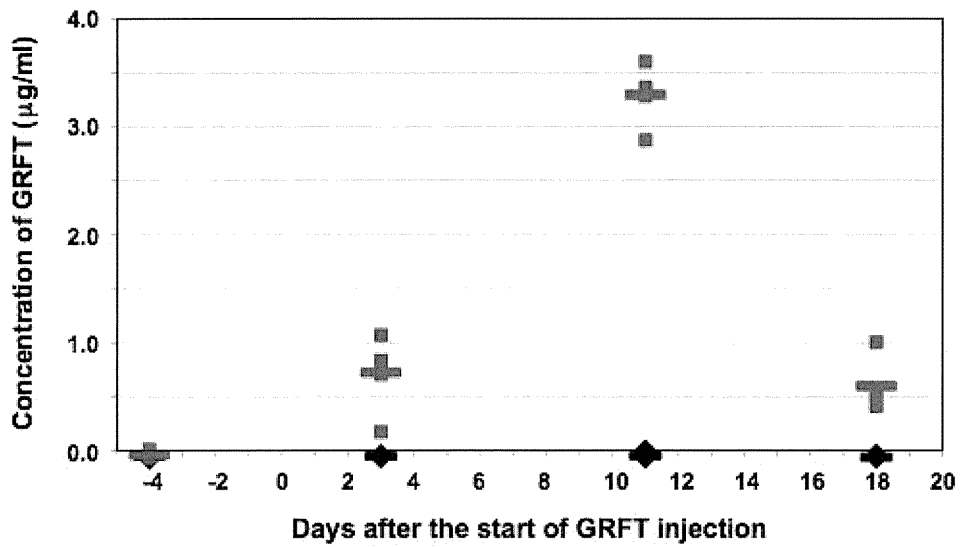


图 2

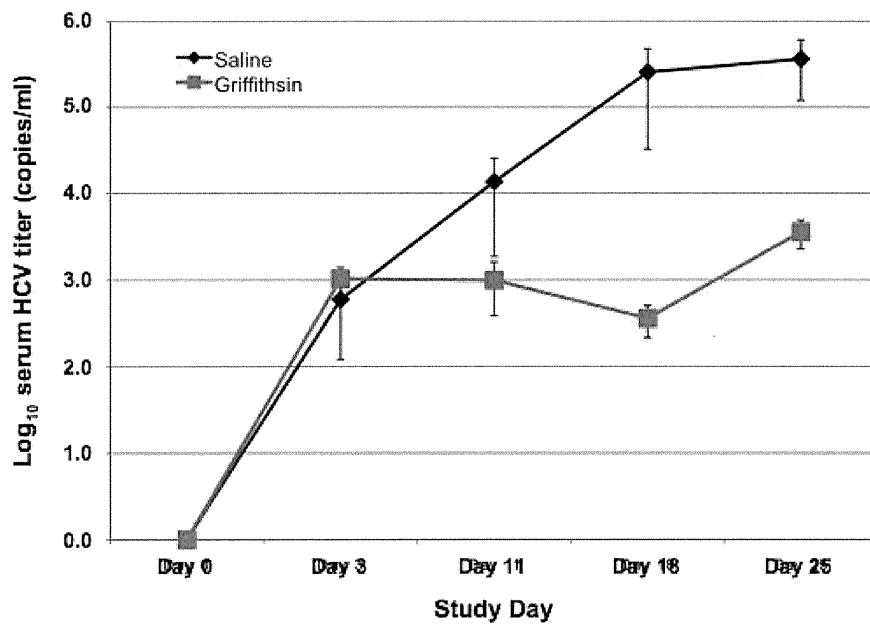
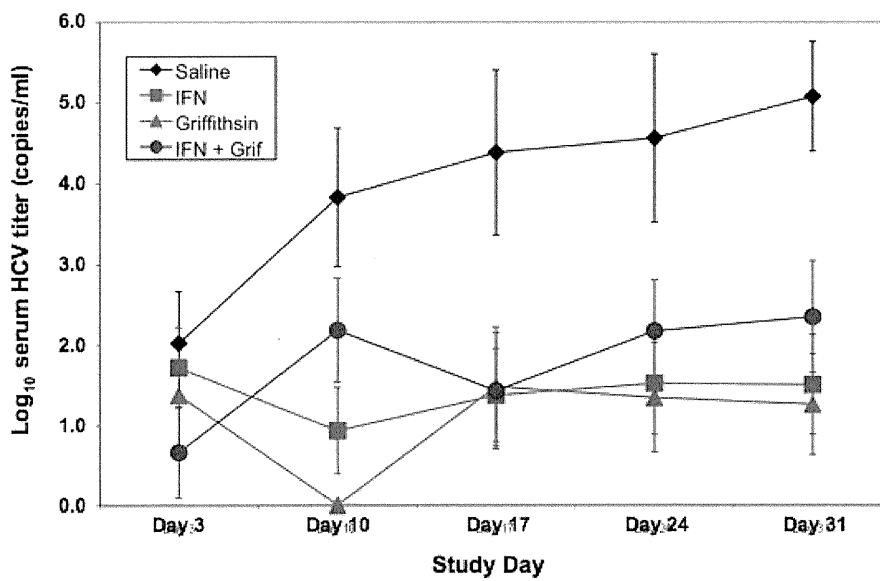


图 3



## 脂質代謝を標的とするHCV治療法の開発

研究分担者 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 池田 正徳

研究要旨 メバロン酸経路は脂質代謝において抗 HCV 剤の重要な標的の一つである。メバロン酸経路では、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ (GGTase)I が HCV RNA 複製に必要なことがこれまで報告されているが、GGTase II については明らかとなっていない。本年度は GGTaseII が HCV RNA 複製に必要なことを明らかにした。また、GGTase II の構成因子である REP-2 が HCV の複製と感染に重要であることを明らかにした。興味深いことに REP-1 は複製には必要であるが感染には必須ではないことがわかった。GGTase II は小胞輸送に関わる Rab 蛋白質に特化してゲラニルゲラニル化の修飾をする酵素で、HCV のライフサイクルにかなりの影響を及ぼすことが予想される。GGTaseII は新たな抗 HCV 剤の標的分子として期待できるものと思われる。

### A. 研究目的

宿主蛋白質のゲラニルゲラニル化がHCV RNA複製に必要なことが知られている。ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ (GGTase) IIについてはこれまで検討されていたが、Rab蛋白質のゲラニルゲラニル化に関わる GGTaseIIについては明らかにされていない。本研究は、GGTase IIがHCVのライフサイクルに及ぼす効果について明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

HCVの複製増殖が可能な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 IとGGTase IIの違いについては、1)GGTase IがRho、Rap1、FBL2などの様々な宿主因子の修飾をするのに対して、GGTase IIは小胞輸送に関わるRabファミリーの修飾に特化していること、2) GGTase IIではGGTase Iにない、REP-1とREP-2が必要なことが挙げられる。REP-1とREP-2はRab蛋白質のゲラニルゲラニル化以外に修飾されたRab蛋白質の標的とする膜への輸送にも関わる。REP-1とREP-2は相互に代償しあうものと考えられているが、詳細は

不明である。

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: O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。RABGGTA、RABGGTB、REP-1、及びREP-2をsiRNAでノックダウンした時のHCV RNA複製と感染にたいする効果について検討した。

(倫理面の配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのため倫理面への特段の配慮はなかった。

### C. 研究結果

HuH-7細胞とLi23細胞に対してマイクロアレイ解析を実施した。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細胞のいずれにおいても発現していた。REP-1とREP-2に対してはウエスタンブロット解析を実施した。Li23細胞ではREP-1とREP-2のいずれの蛋白質も発現していたが、HuH-7細胞ではREP-1は発現しておらず、REP-2のみが発現していた。REP-1とREP-2のいずれの機能も欠損させてしまうと、細胞が生存できない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。両細胞でGGTaseIIの関連因子であるRABGGTA、RABGGTB、REP-1、およびREP-2を、それぞれsiRNAによりノックダウンしたときのHCV RNA複製レベルについてルシフェラーゼ活性を指標に評価した。ORL8細胞では各siRNA 10 nMで処理したとき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細胞では各siRNA 10 nMで処理したとき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。また、陽性対照としてGGTase Iの関連因子であるPGGT1BをsiRNAで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、レポーター遺伝子を含む全長HCV JFH-1株(JR/C5B)とLi23細胞由来で感染効率の高いL8c-15細胞を用いて検討した。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。

#### D. 考察

HCVの複製増殖が可能なHuH-7とLi23細胞におけるGGTase II関連因子の発現解析を行い、HCV RNA複製、

HCV感染に及ぼす役割について検討した。Li23細胞ではRABGGTA、RABGGTB、REP-1、及びREP-2のすべての因子が発現していたが、HuH-7ではこれらの因子のうちREP-1が発現していなかった。また、HCV RNAの複製にはこれらの宿主因子のすべてが関わっていたが、HCV感染のステップにおいては、REP-2は必須であるがREP-1は必須ではないことを明らかにした。

REP蛋白質はRab Escort Proteinと呼ばれ、REP-1とREP-2が知られている。REP-1とREP-2はGGTase IにはないGGTase IIにのみ存在する蛋白質で、Rab蛋白質のグラニルグラニル化とグラニルグラニル化されたRab蛋白質の標的膜への輸送に必須である。REP-1とREP-2はそれぞれの機能を代償できるものと考えられているが詳細は明らかではない。例えば、進行性の視力低下を来すChoroideremiaではREP-1の異常によりグラニルグラニル化されないRab27aが蓄積することが知られている。Rab27aにおいては、REP-2はREP-1の機能を代償できないことを示している。本研究では、HCV感染のステップではREP-2の機能をREP-1では代償できないことを明らかにした。HCV感染に関わるRab蛋白質ではREP-1ではなくREP-2により特異的にグラニルグラニル化修飾を受ける可能を示唆しているものと思われる。今後、このようなRab蛋白質の同定を行ってゆきたい。

本研究において、Rab蛋白質をグラニルグラニル化するGGTase IIが新たにHCVの複製増殖に関わることを明らかにした。特に、感染のステップではREP-1ではなくREP-2が重要であることを示すことができた。この結果を利用して、HCVの感染のステップに関わり、REP-2によりグラニルグラニル化されるRab蛋白質を同定できれば、抗HCV剤の新しい分子標的の発見が期待できるものと思われる。

#### E. 結論

Rab蛋白質のグラニルグ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。

#### F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) Takeshita S, Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H, Matsuzaki T, Otani M, Muraoka T, Akiyama M, Miuma 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.
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) 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.
- (7) 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.
- (8) 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.*, 409:663668, 2011.

### 2. 学会発表

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) 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.
- (7) 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.
- (8) Ikeda M, Takeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. The role of geranylgeranyl transferase II in