

201125024A

厚生労働省科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因
と発症予防に関する研究

平成23年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 下遠野 邦忠

平成24年5月

目 次

I. 総括研究報告

1. 肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と
発症予防に関する研究
下遠野 邦忠(千葉工業大学附属総合研究所) ----- 1

II. 分担者研究報告

1. HCV 粒子感染による代謝異常と疾患の分子基盤
下遠野 邦忠(千葉工業大学附属総合研究所) ----- 17
 2. HCV 複製制御に関与する宿主因子の探索とその機能解析
高久 洋 (千葉工業大学工学部) ----- 22
 3. C 型肝炎ウイルスによる宿主転写調節機構の脱制御について
堀田 博(神戸大学大学院医学系研究科) ----- 28
 4. 持続的な HCV 複製による細胞機能変化の解析に関する研究
加藤 宣之(岡山大大学院医歯薬学総合研究科) ----- 33
 5. 持続的なHCV感染により生じる病原性の原因となる宿主因子の解析
小原 恭子(鹿児島大学共同獣医学部) ----- 42
 6. 遺伝子型1b型の感染性HCVの樹立とその応用
杉山 和夫(慶應義塾大学医学部) ----- 46
 7. HCV の宿主応答に関係するマイクロ RNA の同定
村上善基 (京都大学・ゲノム医学センター) ----- 51
 8. ヒト遺伝子編集酵素による HCV 感染制御機構の解析
丸澤 宏之(京都大学大学院医学研究科) ----- 57
 9. HCV 構造タンパク質による宿主遺伝子発現の制御機構
大島 隆幸 (徳島文理大学香川薬学部) ----- 62
 10. HCV感染複製による細胞の異常増殖機構の解明とその人為的制御
押海 裕之 (北海道大学大学院医学研究科) ----- 66
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 69
- III. 研究成果の刊行物・別刷り ----- 75

I 総括研究報告

肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と発症予防に関する研究

研究代表者 下遠野 邦忠 千葉工業大学 附属総合研究所 教授

研究要旨：

HCV が感染し複製する事が細胞に種々の効果をもたらし、最終的には肝硬変、肝がんを発症する。感染細胞の中で生じる変化を分子レベルで捉え、その機能を明らかにする事により、疾患発症の原因を突き止める事ができる。また、ウイルスの複製増殖を制御する宿主因子の解明により、複製の分子機構を明らかにできその知見をもとにしてウイルス増殖を予防する方策が見いだされると期待される。本研究では HCV 感染により変化する宿主要因を明らかにし、宿主側の変化がどのようにして代謝異常を惹起する要因になるか、宿主要因のなにが細胞の増殖を変化させるかを調べた。また、ウイルス複製を制御する宿主因子について解析した。また、HCV 持続感染による細胞側の変化を宿主遺伝子の変化から捉え、その意義を明らかにすべく研究を行った。その中でもウイルス増殖を負に制御する宿主要因についての研究も行い、抗ウイルス剤開発に向けての知見を得た。遺伝子型の異なる HCV 感染複製系の樹立も試みている。また、ウイルス酵素活性を標的にした抗 HCV 剤に対する耐性ゲノムに特有の変異が、これらの抗ウイルス剤を使用する以前の患者に既に存在している事を見いだした。本年度の研究で以下の点を明らかにした。(1) HCV 感染により増加する APOBEC1 の HCV 増殖との関連を明らかにした。(2) 糖新生に重要な働きをする PEPCK, G6Pase の遺伝子が HCV により亢進するが、それには ROS による JNK の活性化が重要である事を明らかにした。(3) HCV 感染により誘導されるコレステロール合成酵素のひとつである DHCR24 が細胞の増殖異常に関与している可能性を明らかにした。(4) HCV 感染により誘導されるインターフェロンには Riplet が重要である事を見いだした。(5) HCV 複製を制御する宿主因子として Hsp90 を明らかにしてきたが、その機能のひとつを解明した。

(6) HCV ゲノムの長期に亘る複製により誘導され、また抑制される宿主因子を明らかにした。(7) HCV コアに結合する宿主因子を明らかにし、そのことにより HNF4 活性が抑制される可能性を示した。(8) HCV のインターフェロン/リバビリン感受性とマイクロ RNA との関連性を調べ、ある種のマイクロ RNA が感受性と関連する事を見いだした。(9) インターフェロン/リバビリン投与前の感染者に、既にウイルスプロテアーゼ、およびポリメラーゼ耐性に特徴的な変異を持つ HCV が存在する事を見いだした。(10) 遺伝子型の異なる HCV ゲノムを用いた感染複製系の開発を継続した。

研究分担者

高久 洋 千葉工業大学 教授

丸澤 宏之 京都大学大学院 講師

堀田 博 神戸大学大学院 教授

大島 隆幸 徳島文理大学 准教授

加藤 宣之 岡山大学大学院 教授

押海 裕之 北海道大学大学院 講師

小原 恭子 鹿児島大学大学院 教授

杉山 和夫 慶應義塾大学 特任准教授

村上 善基 京都大学大学院

産学官連携准教授

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) は肝炎発症、および肝がん発症の危険因子である。このような疾患発症の背景には、HCV 感染細胞における宿主側の種々の変化が寄与していると考えられる。また、インターフェロン/リバビリン投与による慢性 C型肝炎患者に対する治療成績は約 50%程度であるが、最近承認されたウイルス酵素活性を標的にした抗 HCV 剤とインターフェロン/リバビリンの組み合わせにより、治療成績が増加した。しかし、この併用治療でも治癒率が満足できるものではなく、また副作用の問題を考えるとさらなる新たな治療法の開発、および新規の抗 HCV 剤の開発が切望される。これまでに多くの研究者が HCV 感染による宿主要因の変化などを解明し、さらにウイルスの複製機構の解析を行ってきた。その結果新たな事実が見いだされているが、これらの情報をもとにしても、ウイルス感染による疾患発症の機構や、ウイルス複製を効率よく抑制する方策が欠如している。この問題に対処するためには、精力的に研究を遂行していくことが必要である。本研究では、HCV 感染を制御する新たな宿主要因を探索し、それらの因子の機能をウイルス複製との関連と細胞の増殖との関連で明らかにすることを主たる目的として研究を進める。また慢性肝炎の治療法を少しでも改善するための方策を見いだすための研究を行う。

B. 研究方法

(1) HCV 感染細胞内、および上清のアポリポ蛋白質の発現解析 (下遠野)。感染細胞培養上清の ApoB100, ApoB48 をウエスタンブロットにより解析した。APOBEC1 mRNA は HCV 感染後の時系列で解析した。mRNA の定量には定量 RT-PCR を用いた。APOBEC1 が HCV の産生に与える影響を HCV の感染性ウイルス粒子産生を定量して解析した。

(2) HCV IRES 依存的翻訳に Hsp90 が関与する事の解析 (高久)。

HCV IRES を用いたレポータープラスミドを Huh7 細胞に導入し、Hsp90 阻害剤、17-AAG、または eIF3c-siRNA 処理により luciferase 活性の変化を測定して効果を見た。17-AAG による eIF3c のプロテアソーム依存的分解を解析するために HCV レプリコン細胞を 17-AAG またはプロテアソーム阻害剤、MG132、等で処理し、eIF3c 量を Western blot 法で解析した。

eIF3c knockdown による HCV IRES を介した翻訳への影響の解析: Huh7 細胞を eIF3c-siRNA で処理した後、HCV genome RNA を導入し、24 時間後に培養上清を回収して、その中の HCV-core タンパク質濃度を測定した。

(3) 糖新生にかかわる転写因子 FoxO1 の解析 (堀田)

抗 FoxO1 抗体を用いた間接蛍光抗体法により FoxO1 の細胞内局在を調べた。さらに、抗リン酸化 FoxO1 抗体を用いたウエスタンブロット法によりリン酸化 FoxO1 の量を調べた。JNK 活性化の検討は抗リン酸化 JNK (Thr183/Tyr185) 抗体を用いたウエスタンブロット法により JNK のリン酸化状態を調べ、JNK 活性化の指標とした。

Akt 活性化の検討は抗リン酸化 Akt (Ser473) 抗体を用いたウエスタンブロット法により Akt のリン酸化状態を調べ、Akt 活性化の指標とした。ミトコンドリア障害及び ROS 産生の解析は細胞を MitoSOX™ Red を加えて培養し、共焦点レーザー顕微鏡によりミトコンドリアの ROS 産生を観察しておこなった。

(4) HCV-RNA の長期複製による宿主遺伝子の発現レベルの変動解析 (加藤)

HCV レプリコンが自立的に複製する OL8 細胞と OL11 細胞について、2年間培養後の細胞および 3.5 年間培養後の細胞について、細胞の遺伝子の発現レベルを RT-PCR 解析と LightCycler を用いて定量的 RT-PCR で解析した。それをコントロール細胞の mRNA 量と比較して、持続複製において発現が変化している細胞 mRNA を解析した。定量的 RT-PCR

解析により得られた結果については、Student の t 検定を行い、有意差があるかを検討した。P が 0.05 以下になった場合を有意差ありとした。miRNA についても同様の解析を行った。

(5) DHCR24 の機能解析 (小原)。

siRNA で DHCR24 をノックアウトして、その効果を調べた。HCV ゲノム複製細胞として、FLR3-1, R6FLR-N, RepJFH を用いた。HCV 感染系は JFH-1 株を用いた。また、キメラマウス HCV 感染系により DHCR24 の効果を評価した。

(6) C 型慢性肝炎患者の HCVRNA 解析 (丸澤)

次世代シーケンサー (Illumina 社 Genome Analyzer II) を用いて、各種検体の HCV 配列を解析した。このゲノム解析基盤を用いて、以下の検討を行った。

・C 型慢性肝炎症例 27 例の血清より RNA を抽出し、感染クローンの全塩基配列の決定。

・C 型慢性肝炎に対するペグ・インターフェロン+リバビリン療法の施行前後での血中ウイルスの全ゲノム配列を deep sequencing で同定し、治療前後のウイルス quasispecies の動態と治療反応性の相関の有無、ならびに治療感受性ウイルスクローンの存在の有無についての評価を行った。

(7) C 型肝炎患者治療応答に関係するマイクロ RNA とその標的遺伝子同定 (村上)

ペグインターフェロン+リバビリン併用療法前に採取した肝生検組織について、マイクロ RNA 発現とインターフェロン関連遺伝子をマイクロアレイにて解析した。標的遺伝子同定のため、miRanda と Targetscan の二種のアルゴリズムを用いてマイクロ RNA が塩基配列上標的として認識する候補遺伝子を絞り込んだ。さらに in vitro で肝癌細胞株を用いてマイクロ RNA の機能を低下させた際に発現が亢進する遺伝子を探索した。末梢血エクソソーム中のマイクロ RNA 発現解析はヒト C 型慢性肝炎患者血清からエクソソーム濃縮画分を得て、その

中に存在するマイクロ RNA の解析を行った。

(8) 遺伝子型 1b 型 HCV ゲノムの単離と自立複製レプリコンの単離 (杉山)。HCV1b 陽性の患者血清由来の RNA をもとに long distance RT-PCR 法によって、複製に必要な HCV ゲノムの非構造領域 (NS3 から NS5B) を増幅した。つぎに、遺伝子型 1b 型 HCV の構造領域蛋白質領域 (コア蛋白質から NS2) を上記で樹立したレプリコン複製細胞へトランスフェクションし、構造領域蛋白質のトランスパッケージにより HCV レプリコン含有感染性ウイルスが形成されるかを調べた。

(9) HCV コア蛋白質の機能解析 (大島)。構造タンパク質である HCV p7 および core と相互作用する宿主因子を同定するために、酵母ツーハイブリッド法を用いたスクリーニングを行った。スクリーニングに用いた cDNA ライブラリーとして、p7 に対してはヒト肝臓およびヒト脳由来、また core に対してはヒト肝臓およびヒト脾臓を用いた。得られた宿主因子との動物細胞内での相互作用に関する解析は、発現ベクターを用いて HEK293T 細胞に過剰発現し、それぞれの抗体を用いた共免疫沈降法を行った。

(10) HCV ゲノム複製を制御する自然免疫 (押海)

RIG 経路が HCV 複製を制御する機構について詳細に解析を進めた。

(倫理面への配慮)

肝疾患患者などからの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮した。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年 12 月 28 日制定、平成 17 年 6 月 29 日一部改正) に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。その際、インフォームドコンセントに係わる手続き

を実施し、提供試料や個人情報 を適正に管理保存している。

組み換えDNA実験については組み換えDNA実験指針（平成14年1月31日）に基づき実施した。遺伝子組み換え生物等の第二種使用等については、遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律（平成15年法律第97号）、同施行規則（平成15年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号）、研究開発などに関わる遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置などを定める省令（平成16年文部科学省・環境省令第一号）、その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組み換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じた。

動物実験に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」等に基づく「研究期間等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日制定）」に従った。当該所属機関の動物実験委員会に申請し承認を受けた後、実施した。

C. 研究結果

(1) HCV 感染細胞では ApoB100 を ApoB48 に変換する酵素である APOBEC1 の mRNA 量が非感染細胞に比べ安定に維持された（下遠野）。

APOBEC1 の産生を確認する為の良い抗体がないために、APOBEC1 の遺伝子発現を mRNA の測定により行った。HuH7.5 に HCV を感染させ、その 36, 72 時間後の細胞から RNA を回収し、APOBEC1 mRNA の量を定量 RT-PCR を用いて解析した。感染後 36 時間においては非感染細胞内の APOBEC1 mRNA の量に比べ感染細胞では 4 倍量、また、72 時間においては 7 倍量近い増加が認められ、HCV 感染により APOBEC1 の量は増加すると考えられた。しかし、感染 0 時間目の細胞においても APOBEC1 mRNA の量が高いレベルになっている事が判明した為、APOBEC1 mRNA の量は HCV 感染により特異的に誘

導されたと結論づけるまでには至らなかった。

HCV 感染する前に既に APOBEC1 mRNA 量が高く維持されていた事から、APOBEC1 遺伝子は細胞の培養状態により変化すると考えられた。HuH7.5 細胞の場合における APOBEC1 の誘導と細胞分裂との関係を調べる為、HuH7.5 を継代培養する過程で APOBEC1 の発現がどのように変動するかを調べた。細胞の継代を続け、細胞全体が占める面積が培養基全体の面積に対して 90% 近い飽和状態にした場合の細胞における APOBEC1 mRNA 量が一番低く、継代して新しい培養基に移した時点での APOBEC1 量が最大値を示した。その後培養を 24, 36, 48, 72 時間経る毎に量は低下して、継代直前で最低の値になった。この事から、APOBEC1 は細胞継代という人為的な操作で発現誘導される事が明らかになった。

APOBEC1 の産生がウイルス産生に及ぼす影響を調べる為、人為的に APOBEC1 を過剰発現させた細胞からの HCV 産生を調べた。その結果、APOBEC1 が過剰産生している細胞からの感染性粒子の産生は、コントロール細胞に比べ低かった。

(2) Hsp90 の HCV 複製に及ぼす効果（ウイルス IRES 活性制御の観点から）（高久）

HCV IRES の存在下で eIF3c と Hsp90 の分子間相互作用の解析および HCV RNA の翻訳過程での Hsp90 の分子メカニズムを詳細に解析した。はじめに、HCV-1b レプリコン細胞である NNC#2 細胞を 17-AAG 処理した場合、Hsp90 の機能が阻害されるかを検討した。Hsp90 阻害により Hsp90 との複合体形成していた Hsf-1 が解離し、核内で Hsp70 の転写を活性化させて Hsp70 を過剰発現させることが知られている。従って Hsp90 の抑制を Hsp70 の増加を指標にして解析した。これまでに NNC#2 細胞では eIF3 の 5 つのサブユニット (eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g, eIF3i)

の中で eIF3c のみ、17-AAG の濃度依存的に発現が減少したことから、Hsp90 が eIF3c の安定化に関与していることが示唆された。そこで、eIF3c は Hsp90 依存的クライアントタンパク質で、ユビキチン化され、プロテアソーム依存的経路で分解されるか否か検討した。17-AAG による eIF3c のユビキチン化への影響を調べるため、ユビキチン発現プラスミド (pMyc-Ub) を NNC#2 細胞に導入した。さらに MG132 で処理した後に、細胞溶解物を回収し、anti-Myc Ab で免疫沈降法によりユビキチン結合タンパク質を免疫沈降した後、western blotting 法により eIF3c のポリユビキチン化の検出を行ったところ、17-AAG 存在下では eIF3c のユビキチン化が認められた。これらの結果より、eIF3c は Hsp90 依存的クライアントタンパク質で、ポリユビキチン化され、プロテアソーム依存的経路で分解されることが明らかとなった。次に eIF3c を siRNA で knockdown することで HCV IRES を介した翻訳への影響を調べた。Huh-7 細胞を siRNA-eIF3c (50nM) で処理した後、pRL-HCV-IRES-FL または pRL-EMCV-IRES-FL を導入した。24 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、HCV-IRES (62%) と EMCV-IRES (40%) は IRES 依存的ルシフェラーゼ活性が減少したが、Cap 依存的ルシフェラーゼ活性の減少は認められなかった。さらに、この事実を検証するために、eIF3c を siRNA で knockdown した Huh-7 細胞へ HCV full-genome RNA (NN/1b/FL) を導入し、CLEIA 法で HCV-core タンパク質濃度を測定したところ、HCV-core タンパク質は減少した。これらの結果から Hsp90 の機能が阻害されると、翻訳開始因子 eIF3c がプロテアソーム依存的経路で分解されることで HCV IRES RNA 依存的翻訳の阻害が起こることを明らかにした。次に eIF3c と Hsp90 が相互作用しているか検討した。Huh-7 細胞および NNC#2 細胞に pFLAG-eIF3c 発現 vector を導入

し、細胞溶解物を anti-FLAG Ab を用いて免疫沈降を行い、anti-Hsp90Ab と anti-FLAG Ab を用い Western blot 法によりタンパク質の検出を行った。その結果、Huh-7 細胞溶解液では、Hsp90 のバンドは検出できなかったが、NNC#2 細胞で免疫沈降した細胞溶解液では、Hsp90 のバンドが検出され Hsp90 と eIF3c が相互作用していることが示唆された。NNC#2 細胞と Huh-7 細胞との相違は細胞内で HCV replicon RNA および HCV のウイルスタンパク質存在の有無である。eIF3c が翻訳開始因子であり HCV IRES に直接結合することを考慮すると、HCV replicon RNA が Hsp90 と eIF3c の会合に係わっていると考えた。HCV IRES を細胞内で発現させることで、Hsp90 と eIF3c が相互作用するようになり、そこへ 17-AAG で Hsp90 を阻害した場合に eIF3c が減少するのではないかと考えられる。NNC#2 細胞溶解物を RNaseA で処理してから anti-eIF3c Ab を用いて免疫沈降を行い、anti-Hsp90 Ab を用い Western blot 法によりタンパク質の検出を行うと、Hsp90 と eIF3c の会合が消失したことから、Hsp90 と eIF3c との相互作用には HCV IRES が必須であることが明らかになった。

(3) HCV 感染による転写因子 FoxO1 のリン酸化の低下及び FoxO1 の核内蓄積 (堀田)

HCV 感染細胞では感染 4 日目 (4 dpi) 以降に、対照細胞に比べて、FoxO1 のリン酸化の著しい低下が認められた。また、蛍光抗体法解析により、FoxO1 が核内に蓄積することが観察された (4 dpi)。HCV 感染による Akt のリン酸化 (活性化の指標) が認められた。このことは、HCV 感染による FoxO1 のリン酸化の低下は、Akt 活性の低下によるものではないと考えられた。HCV 感染細胞では 4 dpi 以降に、対照細胞に比べて、JNK のリン酸化 (活性化の指標) が認められた。この JNK の活性化は、特異的阻害剤である SP600125 (20 μ M) 処理により解除され、それに伴って、FoxO1 リン

酸化の著しい低下が解除され、同時に FoxO1 の核内蓄積も解除され、非感染細胞と同じ状態になった。

(4) HCV 感染によるミトコンドリア ROS 産生の亢進と JNK 活性化及び FoxO1 リン酸化の低下の相関 (堀田)

MitoSOX™ Red (5 μ M) 存在下で、HCV 感染細胞ではミトコンドリアの ROS 産生が亢進することが共焦点レーザー顕微鏡により観察された (4 dpi)。HCV によるミトコンドリア ROS 産生の亢進は、抗酸化剤 NAC (5 mM) で処理することにより解除された。それに伴って、JNK の活性化が解除され、さらに FoxO1 リン酸化の低下と FoxO1 の核内蓄積も同時に解除され、非感染細胞と同じ状態になった。HCV タンパク質 (core, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) のうちどのタンパク質が糖新生の亢進に関与しているかを調べ、NS5A 発現細胞において、ミトコンドリア ROS 産生の亢進、JNK 活性化及び FoxO1 リン酸化の低下、並びに PEPCCK mRNA と G6Pase mRNA の発現増加とグルコース産生の増加が確認された。

(5) HCV-RNA の長期複製による宿主遺伝子の発現レベルの変動解析 (加藤)

昨年度、cDNA マイクロアレイ解析と RT-PCR 解析を組み合わせることにより、HCV-RNA が 2 年間持続的に複製した際、発現レベルが亢進する遺伝子として 6 種類、発現レベルが低下する遺伝子として 4 種類同定したと報告した。しかし、この場合の解析対象は発現量が比較的高い上位 200-300 個の遺伝子プローブのみであった。そのため、今年度は、中程度の発現レベルを示す遺伝子プローブも含めて上位 500 個ほどのプローブに範囲を拡げてさらに検討した。その結果、発現レベルが亢進したと考えられる遺伝子が 2 種類追加され、発現レベルが低下したと考えられる遺伝子が 5 種類追加された。それにより、発現が亢進したとして得られた遺伝子は以下の 8 種類 (遺伝子シンボル名で記す) となった。ACSM3, ANGPT1, CDKN2C, PLA1A, SEL1L3, SLC39A4, TBC1D4 および WISP3。また、

発現が低下したとして得られた遺伝子は以下の 9 種類となった。ANXA1, AREG, BASP1, CIDEA, CPB2, HSPA6, PI3, SLC1A3 および THSD4。再現性の実験を行い、最終的には、WISP3, TBC1D4, ANGPT1, SEL1L3 および CDKN2C の 5 種類を HCV-RNA が長期に複製することにより不可逆的な発現亢進が起った遺伝子として同定した。

次に、発現が低下した遺伝子群について同様に調べ、最終的には、BASP1, CPB2, ANXA1 および SLC1A3 の 4 種類を HCV-RNA が長期に複製することにより不可逆的な発現低下が起った遺伝子として同定した。

(6) HCV-RNA の長期複製による宿主の miRNA の変動解析 (加藤)

コントロール細胞とレプリコン細胞を 2 年間培養してから得られた miRNA を含む Total RNA を用いて、Agilent 社の Human miRNA rel 16.0 による miRNA のマイクロアレイ解析を行った。両者の比較において共通して 2 倍以上発現が亢進あるいは 1/2 以下に発現が低下している miRNA を選択した。その結果、HCV-RNA が 2 年間複製した細胞で発現亢進が起ったと考えられる 6 種類の miRNA と発現低下が起ったと考えられる 2 種類の miRNA を選択し今後の研究対象とした。

(7) HCV 複製における DHCR24 の役割 (小原)

HCV 複製における DHCR24 の役割を明らかにするために、2 種の siRNA (0.1~3.0 nM) を作製して 3 種のレプリコン細胞 (FLR3-1, R6FLR-N, JFH-1) と反応させた。その結果 siRNA の用量依存的に HCV の複製が抑制された。一方これらの濃度では、細胞毒性は認められなかった。

(8) DHCR24 の発現と細胞内コレステロールレベル (小原)

細胞内コレステロールの濃度と DHCR24 の発現レベルの関連を解析したところ、コレステロールの添加により DHCR24 の発現が低下し、メチル b シク

ロデキストリン投与により DHCR24 の発現が上昇した。また、DHCR24siRNA 処理により細胞内コレステロール濃度は低下した。以上の事から、DHCR24 の発現は細胞内コレステロール濃度と関連する事が明らかとなった。

(9) DHCR24 阻害剤の HCV 複製への効果 (小原)

DHCR24 の阻害剤である U18666A を HCV レプリコン細胞に処理すると 250nM 以下では細胞毒性なしに HCV 複製を抑制した。また、この U18666A による HCV 複製抑制はコレステロールの添加により回復した。また、HCV-JFH-1 感染系にも U18666A を処理したところ、0.5mM 以上での抑制効果が観察された。そこで、キメラマウス感染系において HCV を感染させ、U18666A, PEG-IFNa, U18666A+PEG-IFNa の投与を行った。その結果、2 週間後には、PEG-IFNa 単独投与よりも U18666A 単独投与の方が高いウイルス抑制効果を示した。さらには、U18666A は IFNa の抗ウイルス活性に対し相乗効果を示した。

(10) HCVRNA の Deep sequencing による解析 (丸澤)

Deep sequencing 解析を用いることにより各症例で平均 1,705 クローン、平均 14,875,801 塩基の配列が決定され、C 型慢性肝炎患者では極めて多彩な遺伝子変異を持つクローンが多数共存することが明らかとなった。27 症例のウイルスゲノム解析からは、Terapeutic 耐性変異の T54S/A が 20 例 (74.1%)、V36A/M は 12 例 (44.4%)、A156T/V は 7 例 (25.9%) の未治療症例の血清中で検出されることがわかった。各症例における耐性株の存在比はそれぞれ中央値 0.49%、0.47%、0.35%であった。また Terapeutic、Boceprevir を含む複数の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤に対する交差耐性を示す R155K/T/Q 変異は 5 例 (18.5%) で中央値 0.42%の存在比で認めた。同様に NS5B ポリメラーゼ阻害剤の耐性変異株も高頻度で存在し、全 27 症例においてこれらの抗ウイルス薬の

いずれかに対する耐性変異を有するクローンが治療前に既に様々な割合で存在することが明らかとなった。

(12) C 型慢性肝炎インターフェロン+リバビリン投与前後における HCV RNA 解析 (丸澤)

C 型慢性肝炎に対してペグ・インターフェロン+リバビリン療法の導入 1 週間後、血中ウイルスが速やかに減少した immediate virologic responder 8 例と、ほとんど治療反応性を示さなかった non-responder 8 例につき、治療前後での血中 HCV の全ゲノム配列を同定し、比較検討を行った。immediate virologic responder と non-responder では治療前の血中 HCV の quasispecies の程度に差異を認めなかった。しかしながら、immediate virologic responder 群ではインターフェロン投与後にすみやかにウイルスの genomic complexity が低下していたのに対して、non-responder 群ではインターフェロン投与前後で genomic complexity の有意な変化を認めなかった。そこで、HCV ゲノム上、もっとも多様性の高い envelope 領域の hypervariable region の塩基配列の詳細な解析を行ったところ、non-responder 群では各種変異を伴ったいずれのウイルスクローンもインターフェロン投与に対して感受性を示していないことが確認された。以上の結果から、インターフェロン治療に対して治療抵抗性を示す non-responder 群の治療不応性の要因として、宿主側のインターフェロンに対する反応性の欠如が大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

(13) C 型肝炎治療効果別に同定したマイクロ RNA の代表的遺伝子の同定 (村上)

SVR (著効例) と NR (無効例) の間に統計的に有意な発現差をもったマイクロ RNA は 8 種あった。これらのマイクロ RNA の標的遺伝子候補を miRanda と Targetscan の両者のアルゴリズムを用いて数種得た。hsa-miR-27b は hec

domain and RLD 5 (HERC5) を認識している事が明らかになった。

(13) マイクロ RNA による C 型肝炎ウイルスの制御 (ウイルス側因子の検討) (村上)

HCV レプリコン (OR6)、IFN 耐性のある HCV レプリコン (1bR、4bR) を用いて 46 種のマイクロ RNA を過剰発現とそれらの ASO を用いてレプリコン RNA の複製状況を検討した。miR-122 は過剰発現した際にレプリコンの複製は亢進し、機能抑制をした場合には複製を抑制した。

miR-22 を過剰発現した際にレプリコン RNA の複製を抑制し、機能抑制した際には複製能が亢進された。これらのマイクロ RNA は OR6 だけではなく、IFN 耐性のあるレプリコンでも共通の効果が得られ、IFN 耐性株にも影響なくレプリコンを抑制する事を明らかにした。

(15) サブゲノムレプリコンライブラリーの作製 (杉山)

60 症例の 1b 型 HCV 患者血清から抽出した RNA を用いて HCV の非構造領域 (NS3 から NS5B) に対する long distance RT-PCR を行った。その結果、32 症例で PCR 増幅が認められた。特に増幅の良かった 9 症例の PCR 産物を用いてサブゲノムレプリコンライブラリーを作製した。さらにサブゲノムレプリコンライブラリープラスミドを作製し、最終的に 21 個のネオマイシン耐性細胞クローンを得ることができた。これらのレプリコン細胞 4 種類に遺伝子型 1b 型 HCV の構造領域蛋白質領域 (コア蛋白質から NS2) をトランスフェクションし、ウイルス粒子が産生されるかを調べた。その結果、2 種類のレプリコン複製細胞由来の培養上清から HCV 蛋白質の発現が認められた。

(16) HCV コアと相互作用する宿主因子の単離同定 (大島)

酵母 two-hybrid 法により FKBP8 や Ewing 肉腫の原因因子である EWS が得られた。得られた宿主因子の中でも特に EWS との相互作用に着目し、動物細胞内での相互作用を検討した。その結果、両者の相

互作用が確認できた。また、それぞれの相互作用する領域を決定するために各種欠損変異体を作製し、同様に HEK293T 細胞を用いた共免疫沈降法によって解析した。その結果、core の N 末端 1-40 アミノ酸と EWS の RGG モチーフを含む C 末端が相互作用することが明らかとなった。

HNF4 の転写活性に対する core の影響を検討するために、HNF4 結合配列を 8 回タンデムに繋いだ DNA 断片を pGL3-luciferase ベクターに組み込み、ルシフェラーゼの活性を指標にその活性を解析した。その結果、core の発現により HNF4 の転写活性は抑制されることが明らかとなった。また HNF4 結合配列を含む p21 プロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイにおいても同様に抑制効果が認められた。さらに HNF4 と EWS の共発現によって認められた内在性の p21 の発現量の上昇は、core の過剰発現によって顕著に抑制された。DNA 沈降法により HNF4 結合配列上の HNF4 複合体を解析した結果、core の発現によって DNA 上にリクルートされる EWS の量が減少した。またこれは、core により HNF4 と相互作用する EWS 量が減少するためであることが明らかになった。

(17) HCV の RNA を細胞質内で認識するセンサー分子の解析 (押海)

HCV の RNA を細胞質内で認識するセンサー分子は RIG-I であることを確認した。我々が発見した Riplet 分子は、この RIG-I の C 末端をユビキチン化することで I 型と III 型インターフェロンが産生されることを解明した。さらに HCV の非構造蛋白質であるプロテアーゼが、この Riplet 分子を分解することで、RIG-I のユビキチン化を阻害することを発見し、これにより I 型と III 型インターフェロン産生が抑制されという新たな分子機構を解明した。

HCV 抑制の新たな因子として DDX60 ヘリケース分子を同定した。この DDX60 は主に細胞質に局在し、ウイルス感染

時の I 型インターフェロンを含む炎症性サイトカインの産生に関与することを解明した。詳細なメカニズムの解析から DDX60 は、RIG-I によるウイルス RNA の結合を促進する役割を果たすことを解明した。

さらに HCV 感染時の生体内での III 型インターフェロン産生機構の解明を試み、肝臓に於いては、IPS-1 経路依存的な III 型インターフェロン産生が重要であることを発見した。

D. 考察

HCV 感染により宿主細胞の脂肪代謝変化が生じ、また脂肪輸送経路に関わる細胞側要因がウイルスの放出、感染過程に導入される結果、宿主の脂肪代謝のホメオスターシスに変化が起これると考えられる。この事が長い間持続する事により、肝疾患が悪性化すると考えられる。

ウイルスの生活環に重要な役割を果たすリポ蛋白質を構成する宿主因子としてアポリポ蛋白質がある。MTTP 阻害によるリポ蛋白質産生抑制は、感染性粒子の産生も抑制するので、ApoB100 の粒子形成あるいは粒子の感染性における働きが示唆されている。一方、ApoB48 は小腸でのみ産生されカイロミクロンを形成する因子のひとつであるが、C 型慢性肝炎患者血液中の HCV は ApoB48 とも会合しているとされている。そこで、本研究では、培養細胞を用いた感染複製系を用いて、ApoB48 が実際にウイルス粒子産生に重要な役割を果たすかを明らかにする為に、ApoB48 産生に必須の遺伝子 APOBEC1 の発現を介してその意義を調べた。HuH7.5 に HCV を感染させることにより、APOBEC1 mRNA の量は増えた。また、培養上清中の ApoB48 の量も非感染細胞に比べ僅かであるが高くなった。この事から HCV は APOBEC1 の転写を活性化しているように思えたが、詳細な解析の結果、転写を活性化しているよりも APOBEC1 mRNA の安定化に関係していると考えられる結果を得た。APOBEC1 の生理的な機能として RNA の C

から T への変換による変異導入、および DNA メチル化の除去が知られている。APOBEC1 を産生するトランスジェニックマウスは効率にがんを発症する事から、これらの生理的な機能が HCV 感染細胞の肝疾患の増悪化に働いている可能性が考えられる。特に、HCV 感染細胞では APOBEC1 mRNA レベルが高く維持されることから、本遺伝子の疾患への積極的な関与が考えられる。

Hsp90 が HCV RNA 翻訳に対して、翻訳開始因子 eIF3c の安定化に寄与していた。さらに eIF3c の安定化に対する Hsp90 の役割を調べたところ、eIF3c は Hsp90/HCV IRES 複合体を形成しており、Hsp90 阻害により eIF3c が遊離し、プロテアソーム依存的分解が起これることを明らかにした。また、eIF3c と Hsp90 の相互作用には HCV IRES RNA が必須であることが判明した。

HCV 感染細胞では、転写因子 FoxO1 のリン酸化が抑制され、FoxO1 の核外輸送が阻害されて核内に蓄積することが明らかになった。そのため FoxO1 転写活性が継続的に維持され、糖新生律速酵素である PEPCK と G6Pase の遺伝子発現を促進して、糖新生が亢進すると考えられた。我々はこれまでに、HCV 感染によるミトコンドリア障害を介して JNK が活性化されることを報告した。そこで、HCV 感染細胞における FoxO1 リン酸化の低下と JNK 活性化の関連について解析を行い、FoxO1 リン酸化の低下は抗酸化剤処理によって解除されることが明らかになった。これらの結果より、HCV 感染はミトコンドリア ROS 産生の亢進による酸化ストレスを介して JNK を活性化し、これが FoxO1 のリン酸化を抑制して核内蓄積を維持してその転写活性を亢進させ、糖新生律速酵素 PEPCK と G6Pase の遺伝子転写促進を介して糖新生を亢進させると考えられた。この働きには、HCV NS5A が関与する事が示唆された。

発現レベルが不可逆的に亢進したと考えられる遺伝子として同定した 5 種

類について、HCV と関連するという報告は現在までない。ただ、肝がんと関連という面においては、血管構造の安定化と血管新生の相反する機能を制御する ANGPT1 (Angiopoietin 1) が肝がんで発現上昇しているという報告がある。しかし、その分子機序については不明である。それ以外については、肝がんと関連報告はないが、Wnt1 誘導性の CCN ファミリー分子 (CCN6) である WISP3 は大腸がんで発現上昇が報告されている。しかしながら、乳がんでは発現低下しているという報告もあり、がんとの関係もよく分かっていない。

発現レベルが不可逆的に低下したと考えられる遺伝子として同定した 4 種類についても、HCV と直接関係するという報告はない。しかしながら、*BASPI* と *ANXA1* については、がん抑制遺伝子候補として報告されており、*BASPI* については、DNA メチル化による発現低下が肝がんで明らかになっており、早期肝がんの臨床マーカーになると提唱されている。この遺伝子のメチル化により今回発現低下がもたらされたか否かについては、現時点では不明である。しかしながら、例えば、OL8 (3.5Y) 細胞に脱メチル化剤を添加して、発現レベルが OL8 (0Y) 細胞レベルに戻るかどうかの実験は可能であるので、今後調べる予定である。*ANXA1* の発現低下についても同様の分子機構が考えられるので、検討する予定である。なお、今回のマイクロアレイ解析により、共通して発現が亢進している 6 種類の miRNA と発現が低下している 2 種類の miRNA を得ることができた。miRNA の発現量と標的となる mRNA の発現量とは相関している可能性があるため、今後は今年度同定した遺伝子の発現レベルが発現変動を来たした miRNA に制御されている可能性を検討する予定である。今回得られた miRNA の標的遺伝子を同定することができれば、HCV RNA の長期複製により mRNA レベルやタンパク質レベルで影響を受ける遺伝子のさらなる同定につながる可能性がある。

DHCR24 はコレステロール合成酵素の 1 つであるが、HCV 複製においても役割を果たす事が明らかとなった。DHCR24 は HMG-CoA からコレステロールを合成する経路のうち、これまで報告された lovastatin の標的であるゲラニル化反応よりも下流のステロール中間体の $\Delta 24$ 結合の還元作用に作用し、ゲラニル化には影響を与えない。従ってこれまでの報告にはない新規の標的と考えられる (PNAS2005)。また、U18666A という阻害剤も抗ウイルス活性を示したことから、新たな抗 HCV 薬候補である可能性が考えられる。

我々のこれまでの検討により、さまざまな遺伝子編集酵素ファミリー分子が、HCV のコードするウイルスタンパクの直接作用、ならびに HCV 感染を契機とする炎症反応やインターフェロン産生に反応する形で肝細胞に発現誘導されること、これらの遺伝子編集酵素の中でも RNA 配列に対して塩基変化を誘導する作用をもつ分子の発現下においては、HCV のウイルスゲノム配列に遺伝子変異が誘導されることがわかってきた。次世代シーケンサーを用いた HCV ゲノムの deep sequencing 解析からは、従来の Sanger sequence 法では同定できなかった、C 型慢性肝炎症例への抗ウイルス治療と深く関連したウイルス変異クローンの全体像が明らかとなってきた。これらのウイルスゲノム変異には、ウイルス自身の複製エラーにより生じたものと、宿主遺伝子編集酵素により誘導されたものが混在しているものと推定され、宿主により誘導されたウイルスゲノム変異が病態形成や治療に対してどのように寄与しているかを特定することが、HCV に対する新しい抗ウイルス戦略の構築につながるものと期待された。

ペグインターフェロン+リバビリン併用療法効果に応じた遺伝子発現をマイクロ RNA とインターフェロン関連遺伝子別に同定する事ができ、またこの中でインターフェロン関連遺伝子を制

御するマイクロ RNA を同定した事で、インターフェロンやマイクロ RNA による抗ウイルスメカニズムを明らかにする可能性を示した。

最近、遺伝子型 2a 以外の遺伝子型を有する HCV 感染株の報告はあるが、遺伝子型 1b 型の感染株の感染性、複製能は必ずしも高くない。また、遺伝子型 2a であっても JFH-1 以外は必ずしも感染効率の良い感染株とはならない。一方、日本で最も頻度の高い HCV 遺伝子型は 1b 型であり、慢性化しやすく、肝硬変、肝癌の発症率が高い。したがって遺伝子型 1b 型 HCV のウイルス学的解明を進めるために感染効率の高い HCV 感染株の樹立は必須である。

我々はこれまで数種類の遺伝子型 1b のレプリコンを樹立し報告してきたが、これを利用して全長ゲノムの感染性 HCV 株の樹立には至らなかった。その考えられる原因の 1 つとして、レプリコンは培養肝細胞での複製には適応しているものの、感染性ウイルス粒子への組み立てには必ずしも適応していなかった可能性がある。ウイルス組み立てに必要な要素は JFH-1 株を用いた研究により次第に明らかになりつつあるが、遺伝子型 1b にそのまま当てはまるとは限らない。そこで本研究では、まず、1b 型感染性 HCV 株樹立の前段階として、ウイルス粒子への組み込みの可能を広げるために、患者血清における HCV ゲノムの多様性を利用し、サブゲノムレプリコンライブラリー法によって多様な遺伝子配列を有する 1b 型サブゲノムレプリコン複製細胞を樹立した。さらに、これらのレプリコン複製細胞のうち 2 種類の細胞へ 1b 型 HCV 構造領域をトランスに供給することで、実際、感染性ウイルス粒子としてパッケージされることを確認した。

HCV-1b 由来のサブゲノムレプリコン細胞に、非構造領域を発現するプラスミドを導入してウイルス粒子産生が得られる事を示した。この系を用いてさらに検討を加える事により、効率よい HCV-1b 由来の感染系が樹立できると期待され

る。

HCV コア蛋白質の生理機能を明らかにする目的で、core と相互作用する因子 EWS に着目して研究を進めた。EWS は染色体転座によって発症する難治性の Ewing 肉腫の原因因子として同定された。その構造として RGG モチーフを含む RNA 結合ドメイン有し、この RGG の R(アルギニン残基)がメチル化酵素 PRMT によってメチル化修飾されることにより、その細胞内局在や RNA 結合能が変化する。EWS は肝発生の儉約因子である核内受容体型転写因子 HNF4 の共役因子として機能し、core はその機能を抑制することが示唆された。EWS は HNF4 を中心とした転写開始複合体のみでなく RNA 伸長複合体にも含まれ、それぞれにおいて遺伝子発現を促進することが報告されている。これらの機能のどこを core は抑制しているのか、今後明らかにして行く必要がある。また HNF4 は糖や脂質代謝におけるマスターレギュレーター様の役割を果たし、また近年、肝がん発症との関連性も示唆されている。core による EWS の機能抑制を介した HNF4 の活性抑制メカニズムの詳細を解析することによって、HCV 持続感染時における糖代謝異常や肝細胞増殖異常などが明らかになることが期待される。

HCV は、宿主の I 型インターフェロン産生を抑制する。これは、RIG-I のアダプター分子である IPS-1 が、HCV のもつ NS3-4A プロテアーゼにより切断されることが原因であると考えられてきた。しかし、本研究から、我々が発見した Riplet 分子も HCV の蛋白質により分解されることを発見した。これは HCV による宿主のインターフェロン抑制のメカニズムが複数存在することを意味している。今後、HCV の遺伝子型の違いにより、これらの抑制機構の違いを解明することで病態との関連が解明されると期待される。

以上本年度に得られた種々の知見は、HCV 感染による肝疾患に対して、どのよ

うに捉えて対処すべきかについての情報になりうる。また、これらの情報を基にした HCV 複製を制御する方法の開発にも役立つと期待される。

E. 結論

HCV 感染により引き起こされる細胞側の変化を多方面から解析して以下の成果を上げた。(1) 遺伝子編集酵素のひとつ APOBEC1 の mRNA が感染により高いレベルに保たれる。しかし、この条件では HCV 複製が特に亢進はしない。APOBEC1 のウイルス複製以外の機能が考えられた。(2) 糖新生を亢進させる転写因子 FoxO1 を HCV 感染が活性化するメカニズムを明らかにした。(3) HCV 複製を制御する宿主因子として Hsp90、DHCR24、EWS、Riplet についてこれらの因子の機能を明らかにした。(4) HCV の長期持続感染により変化する宿主因子 (遺伝子および miRNA) を各種明らかにして、慢性肝炎との関連を示唆した。(5) インターフェロン+リバビリン処理前後の HCV RNA 解析を行い、quasispecies の全体像を明らかにした。また、遺伝子編集酵素が感染ウイルスを制御するための生体の防御反応としての役割を果たしている可能性を示唆する結果を得た。(6) 各種の肝疾患においてマイクロ RNA 発現プロファイルを得る事により、疾患発現メカニズムの解明の一端となる事がわかった。(7) レプリコンライブラリー法によって少なくとも 4 種類の新たな 1b 型 HCV サブゲノムレプリコン複製細胞を樹立し、それを用いた感染性ウイルスゲノム作成に持ちを開いた。これらの知見は、HCV を制御したり、HCV により引き起こされる疾患制御のための重要な情報になる。

F. 健康危険情報

今回の解析結果から、IL-28 の SNP などの宿主側の遺伝的要因によりインターフェロン+リバビリン併用療法が無効であった症例に対して、平成 23 年度末に保険採用となった Teraplevir を加えた

インターフェロン+リバビリン+Teraplevir 3 剤併用療法を施行した場合、薬剤耐性ウイルスが潜在した場合にはインターフェロン+リバビリンの作用では排除できず、3 剤治療でも無効となる可能性があることが示唆された。同時に、Teraplevir 投与により相対的に薬剤耐性ウイルスクロンの増殖が活性化されることにより、これらのウイルスの新たな変異の獲得が促進され、将来的に抗ウイルス剤に対する多剤抵抗性の増加への危険性についての考慮の必要性があることが推定された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for the analysis of HCV life cycle. *Microbiol Immunol.* 56: 1-9, 2011
2. Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, Shimotohno K, Takaku H. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: A necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Res.* 163: 390-395, 2011
3. Shimizu Y, Hishiki T, Ujino S, Sugiyama K, Funmi K, Shimotohno K. Lipoprotein components associated with hepatitis C virus is essential for virus infectivity. *Current Opinion in Virology.* 1: 19-26, 2011
4. 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.* 6(6): e21284, 2011
5. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy

- in chronic hepatitis C. *PLoS One*. 6(5): e19799, 2011
6. Morohashi K, Sahara H, Watashi K, Iwabata K, Sunoki T, Kuramochi K, Takakusagi K, Miyashita H, Sato N, Tanabe A, Shimotohno K, Kobayashi S, Sakaguchi K, Sugawara F. Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B. *PLoS One*. 6(4): e18285. 2011
 7. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. The Progression of Liver Fibrosis Is Related with Overexpression of the miR-199 and 200 Families. *PLoS One*. Jan 24;6(1): e16081, 2011
 8. Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, Shimotohno K, Takaku H. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: a necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Res*. 163: 390-395, 2012
 9. Shoji I, Deng L, Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Front. Microbiol.*, 2:A278, 1-5 (2012).
 10. Kamada K, Shoji I, Deng L, Aoki C, Ratnoglik SL, Wakita T, Hotta H. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. *Microbes Infect.*, 14(1):69-78 (2012).
 11. Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, Hotta H. A point mutation at ASN-534 that disrupts a conserved N-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis C virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization. *J. Med. Virol.*, 84(2):229-234 (2012).
 12. El-Shamy A, Shoji I, Kim SR, Ide Y, Imoto S, Deng L, Yoon S, Fujisawa T, Tani S, Yano Y, Seo Y, Azuma T, Hotta H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy. *PLoS ONE*, 7(2):e30513 (2012).
 13. El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, Hotta H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated Interferon/Ribavirin combination therapy. *Intervirology*, 55(1):1-11 (2012).
 14. Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, Ide YH, Hotta H. Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *J. Virol.*, 85(17): 8556-8568 (2011).
 15. Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Hotta H, Sada K. Inhibition of hepatitis C virus replication through AMP-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *Microbiol. Immunol.*, 55(11): 774-782 (2011).
 16. Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. *Virus Res.*, 151(1):61-70 (2011).
 17. 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(6):871-880 (2011).
 18. 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(14):6882-6892 (2011).
 19. 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(4):663-668 (2011).
20. 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, Takeshima F, Nakao K. Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells. *J. Gastroenterol.*, DOI 10.1007/s00535-011-0481 -z (2011).
21. 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*, DOI 10.1007/s11262-012-0712-2 (2012)
22. 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.*, DOI 10.1128//AAC.05762-11 (2012).
23. Saitou M, Kohara, M, Tsukiyama-Kohara K*. Hepatitis C virus promotes expression of the 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Sp1. *J. Med. Virol.*, (2012) accepted.
24. Kasama Y, Saito M, Takano T, Nishimura T, Satoh M, Wang Z, Nagla. E S, Harada S, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K*. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. *Virus Res.*, 163: 405-409 (2012).
25. Satoh M, Saito M, Takano T, Kasama Y, Nishimura T, Nishito Y, Hirata Y, Arai M, Sudoh M, Kai C, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K*. Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection thorough betaine/GABA transporter-1. *J. Infect. Dis.*, 204(8):1172-1180 (2011).
26. Takano T, Tsukiyama-Kohara K*, Hayashi M, Hirata Y, Satoh M, Tateno C, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Sudo M, and Kohara M. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology* 55(3) 512-521 (2011).
27. Takano T, Kohara M, Kasama Y, Nishimura T, Saito M, Kai C, Tsukiyama-Kohara K*. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 expression is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J. Med. Virol.*, 83, 801-809 (2011).
28. Tsukiyama-Kohara K*, Sekiguchi S, Kasama Y, Nagla ES, Machida K, Kohara M. Hepatitis C virus-related lymphomagenesis in a mouse model. *ISRN Hematology*, 2011: 167501 (2011).
29. Kasama Y, Satoh M, Saito M, Okada S, Kai C, and Tsukiyama-Kohara K*. Potential of a recombinant measles virus as expression vector of hepatitis C virus envelope proteins. *World J. Vaccine*. 1 98-103 (2011).
30. Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, Nishijima N, Takahashi K, Osaki Y, Yamashita Y, Inokuma T, Tamada T, Fujiwara T, Sato F, Shimizu K, Chiba T. Genetic Heterogeneity of Hepatitis C Virus in Association with Antiviral Therapy Determined by Ultra-deep Sequencing. *PLoS ONE*, 6: e24907 (2011).
31. Marusawa H, Takai A, Chiba T. Role of activation-induced cytidine deaminase in inflammation-associated cancer development. *Advances in Immunology*, 111: 109-141 (2011).
32. Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Mori A, Ogawa K, Yoshizawa A, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A,

- Haga H, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Chiba T. Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Viral Hepat*, 19: 32-38 (2012).
33. Okuyama S, Marusawa H, Matsumoto T, Ueda Y, Matsumoto Y, Endo Y, Takai A, Chiba T. Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. *Int J Cancer*, 130: 1294-1301 (2012).
34. Takahashi K, Marusawa H, Chiba T. Large-scale identification of effector genes that mediate the type I interferon antiviral response. *Gastroenterology*, 142: 178-180 (2012).
35. Takai A, Marusawa H, Minaki Y, Watanabe T, Nakase H, Tsujimoto G, Chiba T. Targeting activation-induced cytidine deaminase prevents colon cancer. *Oncogene*, (2012) (in press).
36. Shimizu Y, Hishiki T, Ujino S, Sugiyama K, Funami K, Shimotohno K. Lipoprotein component associated with hepatitis C virus is essential for virus infectivity. *Current Opinion in Virology*, 1:19-26 (2011)
37. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Predictive value of early viral dynamics during peginterferon and ribavirin combination therapy based on genetic polymorphisms near the IL28B gene in patients infected with HCV genotype 1b. *J Med Virol*.84: 61-70 (2012)
38. Toyoda H, Kumada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Antiviral combination therapy with peginterferon and ribavirin does not induce a therapeutically-resistant mutation in the HCV core region regardless of genetic polymorphism near the *IL28B* gene. *J Med Virol*. 83: 1559-1564 (2011)
39. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, and Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One*. 6:e19799 (2011)
40. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Impact of genetic polymorphisms near the *IL28B* gene and amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region on interferon sensitivity/resistance in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol*.83: 1203-1211(2011)
41. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. Overexpression of miR-199 and 200 families is associated with the progression of liver fibrosis. *PLoS One*. 6:e16081 (2011)
42. Mukai R, Ohshima T. Dual effects of HTLV-1 bZIP factor in suppression of interferon regulatory factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 409:328-332 (2011).
43. Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J Biochem.*, 151:5-11 (2012)
44. Oshiumi H, Okamoto M, Fujii K, Kawanishi T, Matsumoto M, Koike S, Seya T. The TLR3/TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J Immunol.*, 187: 5320-7. (2011)
45. Miyashita M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Mol Cell Biol*. 31:3802-3819. (2011)

46. 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 6:e21284. (2011)

47. Matsumoto M, Oshiumi H, Seya T. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. Rev Med Virol. doi: 10.1002/rmv.680. (2011)

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

「C型肝炎の予防、治療又は改善用組成物」特願 2011-125440 出願日 平成23年6月3日 発明者 小原恭子、松森昭、西村知裕、小原道法 出願人 国立大学法人熊本大学、松森昭、(一般財団法人)化学及血清療法研究所、財団法人東京都医学研究機構

II 分担者研究報告