

201125026A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルス感染における自然免疫応答の解析と新たな治療標的の探索に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松浦 善治

平成24(2012)年4月

## 目次

### I. 総括研究報告書

HCV 感染における宿主応答の分子機構の解析と新規創薬標的の探索

松浦善治 1

### II. 分担研究報告書

microRNA122 の発現による新規 HCV 感染性細胞株の樹立

松浦善治 12

HCV による RIG-I の機能阻害機構の解析

竹内 理 15

HCV 感染症におけるトリプトファン代謝酵素 (IDO) の免疫学的意義

考藤達哉 16

自然免疫センサーRIG-I による HCV 増殖阻害の解明と抗 HCV 製剤の開発

藤田尚志 19

ヒト肝細胞における自然免疫機構の解析とこの活性化による抗 HCV 戦略の開発

土方 誠 21

制限酵素を用いた IL28B SNP の判定

池田正徳 24

polyIC リポソーム製剤による肝炎ウイルス排除機構の解析

小原道法 28

ウイルス肝炎感染における自然免疫の解析と新たな治療標的の探索に関する研究

瀬谷 司 32

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 35

IV. 研究成果の刊行物・別冊 (別添) 38

## HCV 感染における宿主応答の分子機構の解析と新規創薬標的の探索

主任研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

**研究要旨：**肝臓特異的な microRNA-122 をヒト肝臓由来細胞株に発現させることにより新規 HCV 感受性細胞株を樹立した。ウイルス RNA と RIG-I などの宿主のセンサー分子は偶然に出会うのではなく、能動的に凝集体を形成することによって感知することが明らかとなった。また、RIG-I のシグナル伝達において TAB2 と TAB3 が炎症性サイトカインの産生に必須な役割を果たしており、新規 IPS-1 経路の増幅因子として DDX60 を同定した。ヒト初代培養細胞の性状を保持した不死化肝細胞 HuS-E/2 を用いた解析から、HCV 感染初期応答の肝臓特異性が示唆された。HCV 感染によって樹状細胞に機能性トリプトファン分解酵素が発現し、制御性 T 細胞の誘導などを介して PEG-IFN $\alpha$ /リバビリン療法の治療効果への影響が示唆された。また、PEG-IFN $\alpha$ /リバビリン療法の治療効果の宿主側予測因子として、IL28B 近傍の一塩基多型が重要であることが知られているが、制限酵素を用いた簡便な一塩基多型の判定法を開発した。polyI:C とカチオニックリポソームの複合体が、ヒト肝臓において IFN $\beta$  でなく IFN $\lambda$  を誘導して抗 HCV 効果を示すことを見いだした。

### 分担研究者

竹内 理 阪大微研・准教授  
考藤達哉 阪大医学系研究科・准教授  
藤田尚志 京大ウイルス研・教授  
土方 誠 京大ウイルス研・准教授  
池田正徳 岡大医学系研究科・准教授  
小原道法 都臨研・プロジェクトリーダー  
瀬谷 司 北大医学系研究科・教授

### A. 研究目的

我が国には既に 2 百万人以上もの HCV 感染者が存在すると推定され、原発性肝癌の約 8 割は C 型肝硬変を基礎に発症する。さらに、未だ臨床サンプルから HCV を効率よく分離培養できる細胞培養系はなく、しかも、感受性を示す実験動物はチンパンジー以外にいないことから、ワクチンや抗ウイルス剤の開発は困難を極めている。HCV

はその多様性や可変性、さらに、巧妙な手段によって宿主の免疫監視機構から逃避して持続感染を成立させていると考えられている。最近研究が進んでいる TLR や外来核酸の細胞内認識センサーは、病原因子の侵入を感知する自然免疫認識受容体であり、自然免疫の誘導は獲得免疫系の発動にも重要な役割を演じていることが明らかになってきた。HCV のプロテアーゼが自然免疫の誘導に関与するアダプター分子を特異的に切断し、巧みに宿主の自然免疫機構から回避している可能性が示唆されている。したがって、HCV が宿主の自然免疫の発動を阻害し、持続感染を成立させている可能性が考えられる。C 型慢性肝炎に対するワクチンや抗ウイルス剤の開発には、まず、HCV が如何にして自然免疫と獲得免疫を回避して持続感染を成立させているのかを明らかにすることが最重要課題である。現在、C 型慢性肝炎に対してペグ化 IFN とリバビリンの併用療法が開始されたが、遺伝子型が 1 型でウイルス量の多い HCV 感染者に対する著効率は約 50% であり、これらの難治例に対しては新たな治療法の開発が急務である。本研究事業により C 型慢性肝炎に対す

る抗ウイルス剤の開発に新しい展開をもたらすことができれば、肝癌発症の恐怖に曝され続けているC型慢性肝炎患者にとって大きな福音になるものと思われる。

## B. 研究方法

(松浦) レンチウイルスベクターを用いて miR-122 を種々のヒト肝臓由来細胞株に導入し、HCVcc の感受性を検討した。miR-122 の発現レベルはリアルタイム PCR で定量した。これら細胞に HCV を感染させ、感染細胞内のウイルスゲノムとタンパク質の発現を、リアルタイム PCR とウエスタンブロットで、上清中のウイルス力価を focus-forming assay で解析した。さらに、感受性を示した細胞を用いて、エレクトロポレーションによる HCV レプリコン細胞の樹立を試みた。

(竹内) RIG-I 及びそのシグナル伝達に関わると考えられたユビキチン結合分子、TAB2 を組織特異的に、また TAB3 を欠損するマウスを作製し RIG-I リガンドに対する応答を検討した。

(考藤) C 型慢性肝炎患者と非感染者を対象とした。IDO はトリプトファン (Trp) をキヌレニン (Kyn) に分解する酵素であり、IDO 活性は血清中、または細胞培養液中の Trp、Kyn を HPLC で定量して評価した。末梢血から単球由来 DC を誘導し、サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  など)、TLR リガンド (Poly I:C、LPS など) を添加し、IDO 活性を定量した。DC とナイーブ CD4+T 細胞の共培養を行い、CD4+T 細胞の表現型やサイトカイン産生能を評価した。また IDO 活性の特異性は、選択的 IDO 阻害剤 (1-MT) による変化で評価した。PEG-IFN $\alpha$ /リバビリン併用療法を施行された C 型慢性肝炎患者を対象に、IL28B SNP major/minor と IDO 活性 (血中 Kyn 値) の治療効果への関与を検討した。

(藤田) 培養細胞を用いて種々のウイルス感染時に抗ウイルス自然免疫応答を制御している蛋白質群の細胞内局在を解析した。解析には当研究室で作製した抗 RIG-I 抗体を中心として各種抗体を用いた。ウイルス

RNA の検出は FISH 法によって行った。またウイルス抗原と RIG-I などの物理的な結合は免疫沈降法によって検出した。

(土方) 初代培養ヒト肝細胞と類似した性質を有するヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞に、IRF3,IRF7, RIG-I の mRNA を抑制する siRNA あるいは shRNA を導入あるいは発現させて、その RNA ウイルス感染初期の自然免疫応答を解析した。HuS-E/2 細胞に JFH1 株由来の HCVNS3/4A を発現させた細胞クローンを作成し、HCV 感染し RIG-I 下流のアダプター分子 IPS1 が切断され RIG-I/IRF7 の機能を低下させた後、センダイウイルスを感染させ、各種自然免疫関連遺伝子の発現に対する影響を検討した。

(池田) IL28B 近傍の SNP である rs8099917 について、HuH-7 細胞、Li23 細胞から抽出したゲノムの塩基配列をダイレクトシーケンシング法により検討した。rs8099917 の遺伝子型判定については制限酵素 *BsrDI* を用いて遺伝子型を判定することが可能であったので、PCR 産物 (461 bp) を *BsrDI* 処理して電気泳動を行い、DNA 断片サイズのパターンを検討した。

(小原) polyI:C 及び肝臓特異的な DDS であるカチオニックリポソーム (LIC101) の複合体 (plyIC/LIC) を作製し、まず、HCV 感染および pIC-LIC の投与によるヒト肝臓型キメラマウスでの肝臓内 IFN $\lambda$ 、IFN $\beta$  の発現量の変化を評価した。次に、各種細胞株 (肝臓由来の HepG2、肺由来の MRC5、及び腎臓由来の HEK293T) での pIC-LIC 投与時の IFN $\lambda$ 、IFN $\beta$  の応答を評価するとともに、siRNA を使用した遺伝子ノックダウンを行いその誘導メカニズムを調べた。

(瀬谷) Vero 細胞にウイルスを MOI=0.1 で感染させて培養し、ゲルシフトアッセイ、プルダウンアッセイ、免疫沈降、ウエスタンブロットを行った。DDX60 の蛋白は大腸菌で作製し、His Trap HP カラムで精製を行った。

(倫理面への配慮) 本研究にあたっては、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、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研

究に関する共通指針」に則り各研究実施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、また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存する。

### C. 研究結果

#### 1. 調べたヒト肝細胞株の中で、miR-122 を発現させた Hep3B 細胞

(Hep3B/miR-122)に HCVcc を感染させると、Huh7 細胞と同等のゲノム複製と粒子産生能を示した。また、Hep3B/miR-122 細胞でサブゲノム及び、フルゲノム HCV レプリコンが樹立可能であった。さらに、これらレプリコン細胞内のウイルスゲノムをインターフェロンで排除させた“Cured 細胞”は、自然免疫応答に異常はなく、miR-122 の発現亢進が観察され、HCVcc の増殖効率が上昇していた。この Cured 細胞を用いることで、HCVcc を長期的に培養可能であった (松浦)

#### 2. AB2及びTAB3をマクロファージ特異的に欠損するマウスを作製した。このマウス由来マクロファージはRIG-Iにより認識されるRNAウイルス感染やpoly U/UC RNA刺激に対するサイトカイン産生、NF- $\kappa$ B活性化が著明に減弱していた。しかし、TLR刺激に対する応答は正常であった。(竹内)

#### 3. C型慢性肝炎患者では、非感染者に比べて血清中の Kyn 濃度、Kyn/Trp 比は有意に高値であった。TNF- $\alpha$ +PGE2、LPS+IFN- $\gamma$ などの刺激によって、DC にIDO が誘導された。DC におけるIDOの活性は、C型慢性肝炎患者で高値であった。IDO が誘導されたDCとCD4+T細胞との培養によって、CD4+CD25+FOXP3+のTregが誘導され、Treg誘導能はC型肝炎患者DCでより強度であった。血中Kynは、肝組織の炎症や線維化と正相関した。著効例では非著効例に比べて血中Kynは低値であり、IL28B minorの患者群では、その差は更に顕著であった。(考藤)

4. これまでの研究の結果、RIG-Iは各種ウイルスの感染によって顆粒状に凝集することが判明していたので、本年度はこの本態を明らかにすることを目指した。この凝集の誘導にはウイルスのRNAが必須であるとともに共局在していること、さらに凝集を阻害すると抗ウイルスシグナルが著しく減弱することが判明した。小凝集体の構成成分をさらに詳細に検討する目的で、凝集体を形成する事が知られている蛋白質に対する抗体を用いて細胞染色を行なった。その結果、RIG-Iの凝集体は様々なストレスによって誘導される「ストレス顆粒」である事が明らかとなった。ウイルス感染以外のストレスでもストレス顆粒は形成されるが、その場合インターフェロン誘導は起きず、その原因はウイルスRNAのストレス顆粒への有無が決定している事が明らかとなった。すなわちストレス顆粒形成はRIG-IがウイルスRNAを感知する場であって、その形成が無いと効率的にウイルスRNAのセンサーとしての機能が発揮できない事が判明した。また幾つかのウイルスはストレス顆粒の形成を阻害する事によって免疫機構から逃れている事も明らかとなった。さらにはウイルス感染した細胞内ではストレス顆粒はIPS-1の凝集体と密接に接触していることが見いだされた。(藤田)

5. HuS-E/2細胞をIRF3、IRF7、あるいはRIG-Iに対するsiRNAまたはshRNAを用いて処理し、センダイウイルス(SV)を感染させ各種インターフェロン(IFN)遺伝子の発現誘導をそのmRNAをRT-PCRおよび半定量RT-PCRによって検出することで解析した。その結果、IRF7はすべてのIFN遺伝子発現に関与しており、RIG-IはIFNbetaとIFNlambdaの発現に必要なことがわかった。HuS-E/2細胞にHCV NS3/4Aタンパク質を恒常的に発現する細胞を作成し、HCV感染の一部を再現するモデル細胞として樹立した。この細胞ではこれまで観察されたRIG-I依存的な自然免疫関連遺伝子発現が抑制されている事を確認できた。HuS-E/2細胞をより肝細胞に類似した遺伝子発現プロフ

ールを示す立体培養下で培養し、その自然免疫応答を解析したところ、平面培養に比べてウイルス感染のない状態で RIG-I と IRF7 遺伝子恒常発現が上昇した。SV 感染後の初期 IFN $\alpha$ 1, IFN $\beta$  と IFN $\lambda$  遺伝子の発現誘導は著しくより高くより初期におこった。このことから肝細胞におけるウイルス感染初期応答の解析により本来の肝細胞に類似している細胞を用いることの必要性が明らかになった。(土方)

6. rs8099917 では遺伝子型の違いを、制限酵素 *BsrDI* の切断パターンにより判定することが可能であることがわかった。Li21、Li22、Li23、Li24、PLC、OUMS29、PH5CH8、及び HepG2 細胞ではメジャー(T/T: 461bp)タイプを、NKNT3、HuH-6、および HuH-7 ではヘテロタイプ(T/G: 461、230、および 229 bp)を、HLE と HLF 細胞ではマイナータイプ(G/G: 230 と 229 bp)を示した。このように、制限酵素法による rs8099917 の遺伝子型の判定はダイレクトシーケンシング法の結果と完全に一致した。rs12979860 に対しては適当な制限酵素が存在しないため制限酵素法による遺伝子型の判定はできなかった。(池田)
7. HCV 感染及び polyIC-LIC 投与により、ヒト肝臓キメラマウスの肝臓内では IFN $\lambda$  が IFN $\beta$  に比べ著明に誘導されていることを見出した。in vitro の実験では、polyIC-LIC 投与により、HepG2 では IFN $\lambda$  が IFN $\beta$  に比べ誘導されるのに対し、MRC5、HEK293T では IFN $\beta$  が IFN $\lambda$  に比べ優位に誘導された。さらに、RNA の認識に必須の受容体である TICAM-1 及び RIG-I-like receptor (RLR) の下流分子である IPS-1 をノックダウンしたところ、いずれにおいても IFN $\lambda$  の誘導が抑制された。(小原)
8. RNA ウイルスは 2 重鎖(ds)RNA の認識経路を活性化して type I IFN を誘導する。細胞内 IPS-1 経路の抗ウイルス作用は良く知られるが RIG-I、MDA5 が dsRNA センサーとして働く際の dsRNA 認識機構は分かっていない。本研究では新規 IPS-1 経路の増幅因子、DDX60 を同定した。(瀬

谷)

## D. 考察

現在使用されている Cured 細胞株でも miR-122 の発現亢進が報告されており、Cured 細胞が HCVcc に高い感受性を示す理由として、これまで考えられてきた自然免疫応答の障害よりも、miR-122 の発現亢進がより深く関与する可能性が示唆された。

RIG-I 及び TLR は共通なシグナル伝達経路を介して NF- $\kappa$ B の活性化を起こすと考えられてきたが、今回の研究から TAB2、TAB3 を介した K63 ポリユビキチンシグナルにシグナルの特異性が存在することが示唆された。

細胞内の特定の場で増殖するウイルスを検出して、その周辺に RIG-I をはじめとするストレス顆粒に特異的な RNA 結合蛋白質が凝集し、そこで RIG-I の活性化が起きることが示された。詳細な機構はまだ不明であるが、ウイルス感染、特にウイルス特異的な二重鎖 RNA をストレスとして感知して、特異的な蛋白質を凝集させる機構が存在することが明らかとなった。

自然免疫系でこれまで明らかにされていなかった新規ヘリケース DDX60 を同定した。DDX60 は RIG-I 様受容体と共通する DExD/H box RNA helicase ドメインを持っていて、ウイルス感染で発現が上昇する。DDX60 は RLR と同じく細胞質に局在していて、ウイルス感染時の I 型 IFN の誘導に必要な分子の一つであることがわかった。作用点が RIG-I より上流で dsRNA と直接結合することが判明したので、dsRNA 認識の増幅分子である可能性が高い。なお、SKI2 の機能から類推した exosome による抗ウイルス関連活性はヒト DDX60 には証明できなかった。

HCV 感染は polyU/UC や dsRNA を介した type I IFN の誘導を誘起するが、NS3/4A プロテアーゼは RIG-I 下流の IPS-1 分子を切断することでこのシグナルを阻害する。HCV のコア蛋白質は DDX3 分子と IPS-1 との結合を阻害することで、IFN 誘導シグナルを阻害するの

で、DExD/H box ヘリケースは HCV 感染において様々な作用を持つことが推測される。

肝細胞では恒常的に発現している IRF7 は、ウイルスの感染に対する自然免疫応答の中で中心的な役割を持っていて

IFNalpha1、IFNbeta、IFNlambda3 そして RIG-I 遺伝子発現に関与することが示唆された。これらの中で IFNbeta、IFNlambda3 遺伝子の発現誘導は RIG-I に依存しており、IFNalpha1 遺伝子発現の初期誘導は RIG-I に非依存的であることがわかった。今後、肝細胞におけるウイルス感染初期の IFNalpha1 遺伝子発現が初期自然免疫応答に対してどのような役割を持つのかを明らかにする必要があると考えられた。

同じ不活化肝細胞を立体培養することで平面培養で観察する自然免疫応答遺伝子発現結果とは異なる結果を示すものがあった。特にこの応答に中心的な役割をしていることが考えられる RIG-I や IRF7 mRNA の発現が上昇していることは立体培養時の方がウイルス感染後の早く高い IFNalpha1、IFNbeta、IFNlambda3 mRNA の遺伝子発現誘導を説明するものであることが考えられた。

C型慢性肝炎患者においては血清 Kyn が高値であり、これは炎症や肝線維化によって DC に誘導される IDO 活性が関与すると考えられた。DC に発現する IDO は Treg 誘導に関与しており、PEG-IFN $\alpha$ /リバビリン併用療法の治療効果に関与する可能性が示唆された。

rs8099917 については制限酵素 *BsrDI* の切断モチーフを含むため、制限酵素による切断により遺伝子型の判定が可能であることがわかった。13種類のヒト肝細胞株における制限酵素法による rs8099917 の遺伝子型判定の結果は、ダイレクトシーケンス法の結果と完全に一致した。このことから、ダイレクトシーケンス法による rs8099917 の遺伝子型判定は、簡便な制限酵素法に置き換えることができることがわかった。

ヒト肝細胞での自然免疫応答において IFN- $\lambda$  が重要な役割を果たしていることが *in vivo*, *in vitro* で示された。また細胞株を使用した実験から、臓器により IFN

応答が異なることが示された。さらに、RNA が TLR および RLR の両経路に認識され IFN- $\lambda$  を誘導していることが明らかとなった。これらの結果は、ヒト肝細胞に感染する HCV に対する治療法に重要な示唆を与えるものであると考えられた。

## E. 結論

- 1 Hep3B 細胞に miR-122 を過剰発現させることで、HCVcc 感染許容細胞及びレプリコン細胞が樹立できた。
- 2 Hep3B/miR-122 細胞由来の Cured 細胞を用いることで、HCVcc の長期的な培養が可能であった。
- 3 TAB2及びTAB3はRIG-Iシグナルに特異的に必要とされることが明らかとなった。TAB2/3は自然免疫を特異的に調節する標的分子となりうる。
- 4 C型慢性肝炎患者におけるPEG-IFN $\alpha$ /リバビリン併用療法において、IL28B SNP とIDO活性（血中Kyn値）を組み合わせることで、治療効果予測が向上する可能性が示唆された
- 5 ウイルスによる、ストレス顆粒形成阻害を阻止すること、ストレス顆粒形成を促進することは、抗HCVストラテジーとして重要と考えられる。
- 6 肝細胞の自然免疫機構を解明するためには平面培養時における細胞の解析だけでは不十分であり、立体培養した細胞の動態も合わせた解析の必要性が考えられた。
- 7 IL28B SNP の遺伝子型を制限酵素法で決定した。
- 8 *plyIC/LIC* が難治性の HCV 感染者に対して有望な抗 HCV 治療薬となりうることが示唆された。
- 9 自然免疫系でこれまで明らかにされていなかった新規因子 DExD/H box RNA ヘリケースの DDX60 を同定した。

## F.健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1.論文発表

- 1 Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Establishment of a<sup>10</sup> novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. *J. Virol.*, 2012; 86, 1382-1393.
- 2 Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, and Matsuura Y. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J. Virol.*, 2011; 85, 13185-13194.
- 3 Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi M, and Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS ONE*, 2011; 6, e15967.
- 4 Fukuhara T, Tani H, Shiokawa M, Goto Y, Abe T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, and Matsuura Y. Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus. *Microbes Infect.*, 2011; 13, 405-412.
- 5 Iwasaki H, Takeuchi O, Teraguchi S, Matsushita K, Uehata T, Kuniyoshi K, Satoh T, Saitoh T, Matsushita M, Standley DM, and Akira S. The I $\kappa$ B kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1. *Nat Immunol.*, 2011; 12, 1167-1175.
- 6 Clark K, Takeuchi O, Akira S, and Cohen P. The TRAF-associated protein TANK facilitates cross-talk within the IkappaB kinase family during Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2011;108, 17093-17098.
- 7 Saitoh T, Satoh T, Yamamoto N, Uematsu S, Takeuchi O, Kawai T, and Akira S. Antiviral protein Viperin promotes Toll-like receptor 7- and Toll-like receptor 9-mediated type I interferon production in plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*, 2011;34, 352-363.
- 8 Lee PY, Kumagai Y, Xu Y, Li Y, Barker T, Liu C, Sobel ES, Takeuchi O, Akira S, Satoh M, and Reeves WH. IL-1 $\alpha$  modulates neutrophil recruitment in chronic inflammation induced by hydrocarbon oil. *J Immunol.*, 2011;186, 1747-1754.
- 9 Kanto T. Dendritic cells in hepatitis virus infection: a legatus within. *Current Immunology Reviews* 8: 12-22, 2012.
- 10 S Sakakibara M, Kanto T\*, Hayakawa M, Kuroda S, Miyatake H, Itose I, Miyazaki M, Kakita N, Higashitani K, Matsubara T, Hiramatsu N, Kasahara A, Takehara T, and Hayashi N. Comprehensive immunological analyses of colorectal cancer patients in the phase I/II study of quickly matured dendritic cell vaccine pulsed with carcinoembryonic antigen peptide. *Cancer Immunol Immunother*, 60: 1565-1575, 2011
- 11 Tatsumi T, Takehara T, Miyagi T, Nakazuru S, Mita E, Kanto T, Hiramatsu N, and Hayashi N. Hepatitis C virus-specific CD8+ T cell frequencies are associated with the responses of pegylated interferon-alpha and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol. Res.*, 41: 30-38, 2011.
- 12 Kageyama M, Takahasi K, Narita R, Hirai R, Yoneyama M, Kato H, and Fujita T. 55 Amino acid linker between helicase and carboxyl terminal domains of RIG-I functions as a critical repression domain and determines inter-domain conformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*415, 75-81, 2011.
- 13 Ouda R, Onomoto K, Takahasi K, Edwards MR, Kato H, Yoneyama M, and Fujita T. Retinoic Acid-inducible Gene I-inducible miR-23b Inhibits Infections by Minor Group Rhinoviruses through Downregulation of the Very Low Density Lipoprotein Receptor. *J. Biol. Chem.* 286, 26210-219, 2011.
- 14 Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada K, 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*, e19799, 2011.
- 15 Onoguchi K, Yoneyama M, and Fujita T. Retinoic Acid-Inducible Gene-I-Like Receptors. *J Interferon Cytokine Res.*, 31, 27-31, 2011.
- 16 Kato H, Takahasi K, and Fujita T. RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunological Reviews*, 243, 91-98, 2011.
- 17 Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, and Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J. Virol.*, 85, 6882-6892, 2011.



- 18 Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, and Kato N. The ESCRT System Is Required for Hepatitis C Virus Production. PLoS ONE, e14517, 2011.
- 19 Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, and Kato. Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: potential treatment for hepatitis C. Liver Int., 31, 871-880, 2011.
- 20 Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, and Kato N. Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. Virus Res., 157, 61-70, 2011.
- 21 Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, and 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.
- 22 Arai M, Suzuki H, Tobita Y, Takagi A, Okamoto K, Ohta A, Sudoh M, Shimotohno K, and Kohara M. Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. Arch. Virol. 156, 295-304, 2011.
- 23 Takano T, Kohara M, Kasama Y, Nishimura T, Saito M, Kai C, and Tsukiyama-Kohara K. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. J. Med. Virol., 83, 801-809, 2011.
- 24 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, 512-521, 2011.
- 25 Chiyo T, Sekiguchi S, Hayashi M, Tobita Y, Kanegae Y, Saito I, and Kohara M. Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice. Virus Res., 160, 89-97, 2011.
- 26 Itoh H, Watanabe K, Iwano K, Funami, Seya T, and Matsumoto M. UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling. PLoS ONE, 6, e28500, 2011.
- 27 Oshiumi H, Okamoto M, K. Fujii K, Kawanishi T, Matsumoto M, Koike S, and Seya T. The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. J. Immunol., 187, 5320-5327, 2011.
- 28 Miyashita M, Oshiumi H, Matsumoto M, and Seya T. The SKI2-related helicase DDX60 is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. Mol. Cell. Biol., 31, 3802-3819, 2011.
- 29 Aly H H, Oshiumi H, Matsumoto M, Shimotohno K, Wakita T, and Seya T. Establishing mouse hepatoma cell lines permissive to human hepatitis C virus. PLoS ONE, 6, e21284, 2011.
- 30 Seya T, Kasamatsu J, Azuma M, Shime H, and Matsumoto M. Natural killer cell activation secondary to innate pattern sensing. J. Innate Immunity, 3, 264-273, 2011.
- 31 Matsumoto M, Oshiumi H, and Seya T. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. Rev. Med. Virol., 21, 67-77, 2011.

## 2. 学会発表

- 1 松浦善治: 基調講演: C型肝炎・肝癌制圧の分子基盤: 第47回日本肝臓学会総会、東京、6月2日-3日, 2011.
- 2 松浦善治: 特別講演: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関する宿主因子: 第48回日本ウイルス学会九州支部総会、門司、8月26日-27日, 2011.
- 3 松浦善治: 特別講演: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に関する宿主因子 ~細胞内蛋白質分解システムの関与について~: 第10回 Hepatitis Expert Meeting、東京、8月27日, 2011.
- 4 小原道法: C型肝炎ウイルス研究の最前線 ウイルス学イブニングセミナー 2011.6.21 京都
- 5 小原道法: HCV 持続発現マウスを用いた HCV 治療ワクチンの開発, 第10回 CBSM2011, 2011.6.24-26, 軽井沢
- 6 大槻貴博、関口 敏、飛田良美、木村公則、小原道法: 新規 C 型慢性肝炎モデルマウスを用いた C 型慢性肝炎の病態解析 第58回日本実験動物学会総会 2011.5.25-27 東京
- 7 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.
- 8 木村公則、小原道法 : HCV感染による慢性肝炎の病態形成と炎症性サイトカインの関与 第47回日本肝臓学会総会 2011.6.2-3 東京
  - 9 井上和明、塗谷秀子、小原道法 : PCRと in situ hybridization を組み合わせたHCVとHBVのウイルスゲノム存在様式可視化の試み 第47回日本肝臓学会総会 2011.6.2-3 東京
  - 10 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
  - 11 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.
  - 12 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.
  - 13 武田 緑、池田正徳、有海 康雄、脇田隆字、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.
  - 14 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.
  - 15 Fukuhara T, Shiokawa M, Ninomiya A, Kambara H, Katoh H, Morita E, Wataru Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. : 第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日, 2011.
  - 16 Ninomiya A, Abe T, and Matsuura Y. Induction of IFN by inoculation of recombinant baculovirus in mouse embryonic fibroblasts suppresses transgene expression. : 第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日, 2011.
  - 17 Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki, Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. : 第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日, 2011.
  - 18 Fumihiko Y., Kai C., Morita K., Kohara M. : Clearance of SARS-CoV by cooperation of antibodies and phagocytes. 第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日, 2011.
  - 19 Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R., Kohara M. : Suppression of sphingomyelin augmented by hepatitis C virus has robust anti-viral effects in human livers. 第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日, 2011.
  - 20 Gomi S., Naganawa S., Yasui F., Munekata K., Ishii K., Sakoda Y., Kida H. Kohara M. : A single immunization with highly attenuated vaccinia virus DIs-based vaccines induce protective immunity against H5N1 avian influenza virus in mice. 第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日, 2011.
  - 21 Munekata K., Yasui F., Sakoda Y., Kida H., Kohara M. : Protection of mice from lethal H5N1 HPAIV infection via the neutralizing antibody-independent mechanism. 第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日, 2011.
  - 22 Fujita T. : Viral replication and its detection by RIG-I-Like Receptors: Formation of RIG-I granules and signal transduction through mitochondrion. 第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日, 2011.
  - 23 小原道法、木村公則、小原恭子 : C型肝炎発症におけるウイルス蛋白質と炎症性サイトカイン 第70回日本癌学会学術総会 2001.10.3-5. 名古屋
  - 24 高野貴士、小原道法、小原恭子 : C型肝炎ウイルスの複製におけるDHCR24の役割 第70回日本癌学会学術総会 2001.10.3-5. 名古屋
  - 25 Mori K, Hiraoka O, Ikeda M., Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. A host factor determining the anti-HCV activity of ribavirin. 第70回日本癌学会学術総会

- 2001.10.3-5. 名古屋
- 26 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. 第70回日本癌学会学術総会 2001.10.3-5. 名古屋
- 27 平田雄一、小原道法：ヒト肝細胞での自然免疫応答におけるIFN-λの重要性和その誘導メカニズム 第15回日本肝臓学会大会 2011.10.20-21. 福岡
- 28 木村公則、小原道法：HCV持続発現マウスを用いたHCVワクチンの開発 第15回日本肝臓学会大会 2011.10.20-21. 福岡
- 29 Kimura K., Otsuki T., Kohara M. : Recombinant vaccinia virus encoding hepatitis C virus nonstructural protein modulates host immune response and ameliorates chronic hepatitis in mouse model. 第40回日本免疫学会学術集会 2011.11.27-29. 千葉
- 30 Wada T., Kohara M., Yasutomi Y. Evaluation of the therapeutic effect of DNA vaccines in the mouse model of chronic HCV infection. 第40回日本免疫学会学術集会 2011.11.27-29. 千葉
- 31 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
- 32 宗片圭祐、安井文彦、迫田義博、喜田 宏、柴田伸一、村上利夫、小原道法：H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスHA発現組換えワクシニアウイルスワクチンによる発症防御機序の解析 第15回日本ワクチン学会 2011.12.10-11. 東京
- 33 Katoh H, Mori Y, Kambara H, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through the interaction with viral proteins and RNA. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日-16日、2011.
- 34 Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ohara Y, Ono C, and Matsuura Y. miR122 participates in the determination of cell tropism of hepatitis C virus. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日-16日、2011.
- 35 Tanaka T, Matsuura Y., and Kamitani W. Circumvention of the translational shut-off in cells infected with SARS coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日-16日、2011.
- 36 Hirata Y., Kameyama T., Tokunaga Y., Nakagawa S., Hayashi Y., Takaoka A., Kohara M. : Interferon-lambda plays a critical role in antiviral response in human hepatocytes. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日-16日、2011.
- 37 Nishimura T., Kohara M., Kino Y. Tsukiyama-Kohara K.,: French marine bark extract pycnogenol is a new candidate of Hepatitis C virus therapeutic material. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日-16日、2011.
- 38 Ikeda M., Takeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. The role of geranylgeranyl transferase II in hepatitis C virus life cycle. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日-16日、2011.
- 39 Yuichi Abe, Hussein Aly, Takaji Wakita, Makoto 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年会、横浜、12月13日-16日、2011.
- 40 Fujita T.: Viral replication and its detection by RIG-I-Like Receptors: Formation of RIG-I granules and signal transduction through mitochondrion. The Uehara Memorial Foundation Symposium-2011 June 6-8, 2011 Tokyo
- 41 Fujita T.: Antiviral Innate Immunity Induced by RIG-I-Like Receptors. Inter-University Biochemistry Postgraduate Symposium in Hong Kong June 11, 2011 Hong Kong
- 42 Fujita T.: Non-self RNA Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. CSH Asia Conferences Infection and Immunity September 8-12, 2011 Suzhou, China
- 43 Matsubara T, Kanto T., Kuroda S, Yoshio S, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Hiramatsu N, Kasahara A, Takehara T. Pro-angiogenic receptor TIE2-expressing

- monocytes/TEM as novel diagnostic biomarker for hepatocellular carcinoma. The Liver Meeting AASLD 62nd Annual Meeting and Postgraduate Course, San Francisco, CA, USA, 2011
- 44 Kakita N, Kanto T, Miyazaki M, Yoshio S, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Sakakibara M, Hiramatsu N, Kasahara S, Takehara T, Hayashi N. Enhanced ability of IL28A and IL28B induction in plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis C patients with major allele of IL28B single nucleotide polymorphism. The Liver Meeting AASLD 62nd Annual Meeting and Postgraduate Course, San Francisco, CA, USA, 2011
- 45 Fukuhara T, Shiokawa M, Ninomiya A, Kambara H, Katoh H, Morita E, Wataru Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. The American Society for Virology, 30th Annual Meeting, University of Minnesota, Minnesota, July 16-20, 2011.
- 46 Abe T, Fukuhara T, Morita E, and Matsuura Y. Annexins negatively regulate HCV RNA replication. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, Sept, 8-12, 2011.
- 47 Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Morita E, Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, Sept, 8-12, 2011.
- 48 Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, and Aizaki H. Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of HCV through an interaction with NS2. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, Sept, 8-12, 2011.
- 49 Kawakami K, Kasai H, Yamashita A, Kato I, Matsuura Y, Kusunoki M, and Moriishi K. Regulation of HCV replication by Hsp90 through FKBP8-dependent and -independent pathways. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, Sept, 8-12, 2011.
- 50 Tokunaga Y., Arai M., Nakaya A., Tobita Y., Tateno C., Kohara M. : Novel infectious clone of HCV 1a strain HCV-RMT efficiently replicate in vitro and in vivo using adaptive mutations. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, Sept, 8-12, 2011.
- 51 Munakata T., Nomoto A., Kohara M.: Regulation of HCV replication by fatty acid synthase. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, Sept, 8-12, 2011.
- 52 Takano T., Tsukiyama-Kohara K., Hirata Y., Tokunaga Y., Tateno C., Sudo M., Kohara M.: Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, Sept, 8-12, 2011.
- 53 Kasama Y., Sekiguchi S., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K. : Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in mice. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, Sept, 8-12, 2011.
- 54 Yuichi Abe, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus particle production. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, Sept, 8-12, 2011.
- 55 Ikeda M, Takeda M, Ariumi Y, Waikita T, Kato N. Geranylgeranyl transferase is essential for HCV RNA replication. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, Sept, 8-12, 2011.
- 56 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 Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, Sept, 8-12, 2011.
- 57 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 Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, Sept, 8-12, 2011.
- 58 Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV production requires the PML tumor suppressor protein. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, Sept, 8-12, 2011.
- 59 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 Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, Sept, 8-12, 2011.
- 60 Fujita T.: Activation of an antiviral program through the cytoplasmic recognition of non-self RNA patterns by RIG-I-Like Receptors. 9th Kyoto University and National Taiwan University Joint-Symposium "Molecular and Cell Biology Symposium" June 4, 2011 Kyoto, Japan
- 61 Ouda, R., Onomoto, K., Takahasi, K., Edwards, M.R., Kato, H., Yoneyama, M. and Fujita, T.: RIG-I-inducible miR-23b inhibits infections by minor group rhinoviruses through down-regulation of the receptor VLDL. The 18th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research Dec. 7-9, 2011 Shanghai, China
- 62 Fujita, T.: Viral replication and its detection by RIG-I-Like Receptors: Formation of RIG-I granules and signal transduction through mitochondrion. 2011 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction November 19-20, 2011 Tainan, Taiwan
- 63 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-AAACR Special Joint Conference, The Latest Advances in Liver Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics, Chiba, Japan, March 1-3, 2011.
- 64 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
- 65 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.
- 66 Sejima S, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing defferential 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.
- 67 Yasui F., Munekata K., Sakoda Y., Kida H., Shibata S., Murakami T., Kohara M.: Immunization with recombinant vaccinia virus expressing hemagglitination protein of H5N1 HPAIV protect mice from lethal H5N1 HPIV infection via the nentralizing antibody-independent mechanism. Keystone Symposia-Pathogenesis of Influenza 2011.5.23-28 Kowloon (Hong Kong)
- 68 Tsukiyama-Kohara K., Kohara M.: Spontaneous development of B-cell lymphomas by persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells in mics. 2011 ASBMB Special Symposia Series 2011.7.24-26 Guangzhou China
- 69 Kimura K., Otsuki T., Kohara M. : Recombinant vaccinia virus encoding hepatitis C virus nonstructural protein modulates host immune response and ameliorates chronic hepatitis in mouse model. The American Association for the Study of Liver Diseases 2011.11.4-8. San Francisco
- 70 Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R., Kohara M. : Suppression of sphingomyelin augmented by hepatitis C virus has robust anti-viral effects in human livers. The American Association for the Study of Liver Diseases 2011.11.4-8. San Francisco

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
研究分担報告書

microRNA122 の発現による新規 HCV 感染性細胞株の樹立

分担研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

**研究要旨：**肝臓特異的に発現している microRNA-122 (miR-122) は、HCV の複製に重要な役割を演じていることが報告されている。そこで、レンチウイルスベクターを用いて miR-122 を種々のヒト肝臓由来細胞株に導入し、HCV の感受性を検討した。調べたヒト肝細胞株の中で、miR-122 を発現させた Hep3B 細胞(Hep3B/miR-122) に HCV の実験室株を感染させると、Huh7 細胞と同等のゲノム複製と粒子産生能を示した。また、Hep3B/miR-122 細胞で HCV レプリコンが樹立可能で、さらに薬剤でウイルスゲノムを排除させた“Cured 細胞”は、ウイルスの増殖効率が上昇していた。

### A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)の研究に必須な *in vitro* 培養系としては、実験室株である遺伝子型 2a の JFH1 株 (HCVcc)と、ヒト肝癌由来細胞株である Huh7 細胞の組み合わせに限定されている。HCV の感受性細胞株が一つだけでは、ウイルス感染によって惹起される宿主遺伝子の変動を正確に解析するのは難しい。従って、比較対照となる HCV の感染性細胞株が必要である。近年、HCV の複製に肝臓細胞に特異的に発現している microRNA-122 (miR-122)が重要であることが明らかになってきた。実際、この miR-122 を過剰発現すれば、HCV のレプリコンを様々な細胞で樹立できることが報告されている。そこで今回、miR-122 を過剰発現させることで、HCVcc に感受性を示す新しいヒト肝細胞株の樹立を試みた。

### B. 研究方法

レンチウイルスベクターを用いて miR-122 を種々のヒト肝臓由来細胞株に導入し、HCVcc の感受性を検討した。miR-122 の発現レベルはリアルタイム PCR で定量した。これら細胞に HCV を感染させ、感染細胞内のウイルスゲノムとタンパク質の発現を、リアルタイム PCR とウエスタンブロットで、上清中のウイルス力価を focus-forming assay で解析した。さらに、感受性を示した細胞を用いて、エレクトロポレーションによる HCV レプリコン細胞の樹立を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、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、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施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、また提供試料、個人情報に厳格に管理、保存する。

### C. 研究結果

調べたヒト肝細胞株の中で、miR-122 を発現させた Hep3B 細胞 (Hep3B/miR-122) に HCVcc を感染させると、Huh7 細胞と同等のゲノム複製と粒子産生能を示した。また、Hep3B/miR-122 細胞でサブゲノム及び、フルゲノム HCV レプリコンが樹立可能であった。さらに、これらレプリコン細胞内のウイルスゲノムをインターフェロンで排除させた“Cured 細胞”は、自然免疫応答に異常はなく、miR-122 の発現亢進が観察され、HCVcc の増殖効率が上昇していた。この Cured 細胞を用いることで、HCVcc を長期的に培養可能であった。

### D. 考察

既報の Cured 細胞株でも miR-122 の発現亢進が報告されており、Cured 細胞が HCVcc に高い感受性を示す理由として、これまで考えられてきた自然免疫応答の障害よりも、miR-122 の発現亢進がより深く関与する可能性が示唆された。今後、新しく樹立した Hep3B/miR-122 細胞と Huh7 細胞を用いて、

HCV 感染による宿主遺伝子の変動を詳細に解析したい。

## E. 結論

1. Hep3B 細胞に miR-122 を過剰発現させることで、HCVcc 感染許容細胞及びレプリコン細胞が樹立できた。
2. Hep3B/miR-122 細胞由来の Cured 細胞は miR-122 が高発現しており、HCVcc の増殖効率が上昇していた。
3. Hep3B/miR-122 細胞由来の Cured 細胞を用いることで、HCVcc の長期的な培養が可能であった。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1.論文発表

- 1 Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. *J. Virol.*, 2012; 86, 1382-1393.
- 2 Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, and Matsuura Y. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J. Virol.*, 2011; 85, 13185-13194.
- 3 Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, and Suzuki T. Role of the ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J Biol Chem.*, 2011; 286, 37264-37273.
- 4 Katoh H, Mori Y, Kambara H, Abe T, Fukuhara T, Morita E, Moriishi K, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through an interaction with viral proteins and RNA. *J. Virol.*, 2011; 85, 10976-10988.
- 5 Mori Y, and Matsuura Y. Structure of hepatitis E viral particle. *Virus Res.*, 2011; 61, 59-64.
- 6 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. *Virology*, 2011; 412, 211-219.
- 7 Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi M, and Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One*, 2011; 6, e15967.
- 8 Fukuhara T, Tani H, Shiokawa M, Goto Y, Abe T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, and Matsuura Y. Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus. *Microbes Infect.*, 2011; 13, 405-412.
- 9 Motomura T, Taketomi A, Fukuhara T, Mano Y, Takeishi K, Toshima T, Harada N, Uchiyama H, Yoshizumi T, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, and Maehara Y. The Impact of IL28B Genetic Variants on Recurrent Hepatitis C in Liver Transplantation : Significant Lessons from a Dual Graft Case. *Am. J. Transplant.*, 2011; 11, 1325-1329.
- 10 Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J. Hepatol.*, 2011; 54, 432-438.
- 11 Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T., and Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology*, 2011; 410, 38-47.
- 12 Yamamoto M, Ma J.S, Mueller C, Kamiyama N, Saiga H, Kubo E, Kimura T, Okamoto T, Okuyama M, Kayama H, Nagamune K, Takashima S, Matsuura Y, Soldati-Favre D, and Takeda K. ATF6 $\beta$  is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18. *J. Exp. Med.*, 2011; 208, 1533-1546.

## 2. 学会発表

- 1 松浦善治: 基調講演: C型肝炎・肝癌制圧の分子基盤: 第47回日本肝臓学会総会、東京、6月2日-3日, 2011.
- 2 松浦善治: 特別講演: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関与する宿主因子: 第48回日本ウイルス学会九州支部総会、門司、8月26日-27日, 2011.
- 3 松浦善治: 特別講演: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に関与する宿主因子～細胞内蛋白質分解システムの関与について～: 第10回Hepatitis Expert Meeting、東京、8月27日, 2011.
- 4 Fukuhara T, Shiokawa M, Ninomiya A, Kambara H, Katoh H, Morita E, Wataru Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. : 第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日, 2011.
- 5 Ninomiya A, Abe T, and Matsuura Y. Induction of IFN by inoculation of recombinant baculovirus in mouse embryonic fibroblasts suppresses transgene expression. 同上
- 6 Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki, Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. 同上
- 7 Katoh H, Mori Y, Kambara H, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through the interaction with viral proteins and RNA. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日-16日, 2011.
- 8 Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ohara Y, Ono C, and Matsuura Y. miR122 participates in the determination of cell tropism of hepatitis C virus. 同上
- 9 Tanaka T, Matsuura Y, and Kamitani W. Circumvention of the translational shut-off in cells infected with SARS coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA. 同上
- 10 Tanaka T, Matsuura Y, and Kamitani W. Circumvention of the translational shut-off in cells infected with SARS coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA. The American Society for Virology, 30th Annual Meeting, University of Minnesota, Minnesota, July 16-20, 2011.
- 11 Katoh H, Mori Y, Kambara H, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through the interaction with viral proteins and RNA. 同上
- 12 Fukuhara T, Shiokawa M, Ninomiya A, Kambara H, Katoh H, Morita E, Wataru Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. 同上
- 13 Abe T, Fukuhara T, Morita E, and Matsuura Y. Annexins negatively regulate HCV RNA replication. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, September, 8-12, 2011.
- 14 Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Morita E, Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. 同上
- 15 Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of HCV through an interaction with NS2. Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, and Aizaki H. 同上
- 16 Kawakami K, Kasai H, Yamashita A, Kato I, Matsuura Y, Kusunoki M, and Moriishi K. Regulation of HCV replication by Hsp90 through FKBP8-dependent and -independent pathways. 同上

## H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。



厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
研究分担報告書

HCVによるRIG-Iの機能阻害機構の解析

分担研究者 竹内 理 大阪大学微生物病研究所 准教授

**研究要旨：**HCVはRIG-Iにより認識され、インターフェロン、炎症性サイトカイン産生につながる。RIG-IはIPS1を介してシグナルを伝達し下流はTLRとシグナル伝達分子を共有している。本年度は、シグナル分子TAB2及びTAB3がRIG-Iシグナルにおいて炎症性サイトカインの産生に必須の役割を果たしていることを明らかにした。

**A. 研究目的**

HCV感染に対する自然免疫応答のメカニズムを明らかにするために、特にRIG-I、及びそのシグナル伝達経路に焦点を当てて解析を行う。

**B. 研究方法**

RIG-I及びそのシグナル伝達に関わると考えられたユビキチン結合分子、TAB2を組織特異的に、またTAB3を欠損するマウスを作製しRIG-Iリガンドに対する応答を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、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、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施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、また提供試料、個人情報に厳格に管理、保存する。

**C. 研究結果**

TAB2及びTAB3をマクロファージ特異的に欠損するマウスを作製した。このマウス由来マクロファージはRIG-Iにより認識されるRNAウイルス感染やpoly U/UC RNA刺激に対するサイトカイン産生、NF- $\kappa$ B活性化が著明に減弱していた。しかし、TLR刺激に対する応答は正常であった。

**D. 考察**

RIG-I、及びTLRは共通なシグナル伝達経路を介してNF- $\kappa$ Bの活性化を起こすと考えられてきたが、今回の研究からTAB2 TAB3を介したK63ポリユビキチンシグナルにシグナルの特

異性が存在することが示唆された。

**E. 結論**

TAB2及びTAB3はRIG-Iシグナルに特異的に必要とされることが明らかとなった。TAB2/3は自然免疫を特異的に調節する標的分子となりうる。

**F. 健康危険情報**

特になし。

**G. 研究発表**

**1.論文発表**

- 1 Iwasaki H, Takeuchi O, Teraguchi S, Matsushita K, Uehata T, Kuniyoshi K, Satoh T, Saitoh T, Matsushita M, Standley DM, Akira S. The I $\kappa$ B kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1. *Nat Immunol.*, 2011; 12, 1167-1175.
- 2 Clark K, Takeuchi O, Akira S, Cohen P. The TRAF-associated protein TANK facilitates cross-talk within the I $\kappa$ B kinase family during Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2011;108, 17093-17098.
- 3 Saitoh T, Satoh T, Yamamoto N, Uematsu S, Takeuchi O, Kawai T, Akira S. Antiviral protein Viperin promotes Toll-like receptor 7- and Toll-like receptor 9-mediated type I interferon production in plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*, 2011;34, 352-363.
- 4 Lee PY, Kumagai Y, Xu Y, Li Y, Barker T, Liu C, Sobel ES, Takeuchi O, Akira S, Satoh M, Reeves WH. IL-1 $\alpha$  modulates neutrophil recruitment in chronic inflammation induced by hydrocarbon oil. *J Immunol.*, 2011;186, 1747-1754.

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
研究分担報告書

HCV 感染症におけるトリプトファン代謝酵素（IDO）の免疫学的意義

分担研究者 考藤達哉 大阪大学大学院医学系研究科  
樹状細胞制御治療学寄附講座 准教授

**研究要旨：**HCV は種々の免疫細胞の機能異常を来とし、持続感染を成立させる。免疫系の異常は、IFN 治療に対する抵抗性や、発癌、癌細胞の増殖にも寄与している。HCV による免疫系攪乱の機序と責任分子が明らかになれば、それを標的とした免疫制御方法を確立することが可能となる。本研究では、その責任分子としてトリプトファン分解酵素 Indoleamine-2,3-dehydrogenase (IDO)を想定し、HCV に対する治療標的としての有用性と、抗 HCV 治療における臨床的意義を明らかにすることを目的とした。C 型慢性肝炎患者の IDO 活性は非感染者より有意に高値であった。炎症性サイトカイン（TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  など）刺激によって、樹状細胞（DC）に選択的に IDO が高発現となった。また HCV 感染者 DC では非感染者に比べて、炎症刺激による IDO 発現が高値であった。DC に発現する IDO は、CD4+T 細胞のサイトカイン産生能や制御性 T 細胞の分化誘導に関与した。また PEG-IFN $\alpha$ /リバビリン併用療法を施行された C 型慢性肝炎患者を対象に、IL28B SNP major/minor と IDO 活性（血中キヌレニン値）の治療効果への関与を検討した。血中キヌレニンは、肝組織の炎症や線維化と正相関した。著効例では非著効例に比べて血中キヌレニンは低値であり、IL28B minor の患者群では、その差は更に顕著であった。以上の結果より、HCV 感染に伴う炎症や肝線維化によって DC に機能性 IDO が発現し、制御性 T 細胞の誘導などを介して PEG-IFN $\alpha$ /リバビリン療法の治療効果に関与することが示唆された。

**A.研究目的**

HCV は種々の免疫細胞の機能異常を来とし、持続感染を成立させる。免疫系の異常は、IFN 治療に対する抵抗性や、発癌、癌細胞の増殖にも寄与している。HCV による免疫系攪乱の機序と責任分子が明らかになれば、それを標的とした免疫制御方法を確立することが可能となる。本研究では、免疫抑制の責任分子として、トリプトファン分解酵素 Indoleamine-2,3-dehydrogenase (IDO)を想定し、HCV 感染者における制御性 T 細胞（Treg）の誘導機序や、PEG-IFN $\alpha$ /リバビリン併用療法における意義を明らかにすることを目的とした。

**B.研究方法**

C 型慢性肝炎患者と非感染者を対象とした。IDO はトリプトファン（Trp）をキヌレニン（Kyn）に分解する酵素であり、IDO 活性は血清中、または細胞培養液中の Trp、Kyn を HPLC で定量して評価した。末梢血から単球由来 DC を誘導し、サイトカイン（TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  など）、TLR リガンド（Poly I:C、LPS など）を添加し、IDO 活性を定量した。DC とナイーブ CD4+T 細胞の共培養を行い、CD4+T 細胞の表現型や

サイトカイン産生能を評価した。また IDO 活性の特異性は、選択的 IDO 阻害剤（1-MT）による変化で評価した。PEG-IFN $\alpha$ /リバビリン併用療法を施行された C 型慢性肝炎患者を対象に、IL28B SNP major/minor と IDO 活性（血中 Kyn 値）の治療効果への関与を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は大阪大学医学部倫理委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える。

**C.研究結果**

C 型慢性肝炎患者では、非感染者に比べて血清中の Kyn 濃度、Kyn/Trp 比は有意に高値であった。TNF- $\alpha$ +PGE2、LPS+IFN- $\gamma$  などの刺激によって、DC に IDO が誘導された。DC における IDO の活性は、C 型慢性肝炎患者で高値であった。IDO が誘導された DC と CD4+T 細胞との培養によって、CD4+CD25+FOXP3+ の Treg が誘導され、Treg 誘導能は C 型肝炎患者 DC でより強度であった。血中 Kyn は、肝組織の炎症や線維化と正相関した。著効例では非著効例に比べて血中 Kyn は低値であり、IL28B minor の患者群では、その差は更に顕著であっ

た。

#### D. 考察

C型慢性肝炎患者においては血清 Kyn が高値であり、これは炎症や肝線維化によって DC に誘導される IDO 活性が関与すると考えられた。DC に発現する IDO は Treg 誘導に関与しており、PEG-IFN $\alpha$ /リバビリン併用療法の治療効果に関与する可能性が示唆された。

#### E. 結論

HCV 感染に伴う炎症、線維化によって肝細胞や DC に機能性 IDO が発現し、Treg の誘導に関与する。C型慢性肝炎患者における PEG-IFN $\alpha$ /リバビリン併用療法において、IL28B SNP と IDO 活性（血中 Kyn 値）を組み合わせることで、治療効果予測が向上する可能性が示唆された

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 Kanto, T. Dendritic cells in hepatitis virus infection: a legatus within. *Current Immunology Reviews* 8: 12-22, 2012.
- 2 Sakakibara, M., Kanto, T. \*, Hayakawa, M., Kuroda, S., Miyatake, H., Itose, I., Miyazaki, M., Kakita, N., Higashitani, K., Matsubara, T., Hiramatsu, N., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Comprehensive immunological analyses of colorectal cancer patients in the phase I/II study of quickly matured dendritic cell vaccine pulsed with carcinoembryonic antigen peptide. *Cancer Immunol Immunother* 60: 1565-1575, 2011
- 3 Tatsumi, T., Takehara, T., Miyagi, T., Nakazuru, S., Mita, E., Kanto, T., Hiramatsu, N. and Hayashi, N., Hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell frequencies are associated with the responses of pegylated interferon-alpha and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol Res* 41: 30-38, 2011.
- 4 Oze, T., Hiramatsu, N., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Ito, T., Fukui, H., Inui, Y., Hijioka, T., Inada, M., Kaytayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Miyagi, T., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N.,

Indications and limitations for aged patients with chronic hepatitis C in pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin combination therapy. *J Hepatol* 54: 604-611, 2011.

- 5 Oze, T., Hiramatsu, N., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Ito, T., Inui, Y., Fukui, H., Hijioka, T., Katayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H., Inoue, A., Imai, Y., Hayashi, E., Kato, M., Hosui, A., Miyagi, T., Ishida, H., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Efficacy of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. *J Gastroenterol* 46: 1031-1037, 2011.
- 6 Inoue, Y., Hiramatsu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Fukuda, K., Mita, E., Haruna, Y., Inoue, A., Imai, Y., Hosui, A., Miyagi, T., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Amino acid substitution in the core protein has no impact on relapse in hepatitis C genotype 1 patients treated with peginterferon and ribavirin. *J Med Virol* 83: 419-427, 2011.
- 7 Hiramatsu, N., Inoue, Y., Oze, T., Kurashige, N., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Miyagi, T., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T., Oshita, M., Mita, E., Hagiwara, H., Inui, Y., Katayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H., Imai, Y. and Hayashi, N., Efficacy of pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for hepatitis C patients with normal ALT levels: a matched case-control study. *J Gastroenterol* 46: 1335-1343, 2011

##### 2. 学会発表

- 1 Matsubara T, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Hiramatsu N, Kasahara A, Takehara T. Pro-angiogenic receptor TIE2-expressing monocytes/TEM as novel diagnostic biomarker for hepatocellular carcinoma.
- 2 The Liver Meeting AASLD 62d Annual Meeting and Postgraduate Course, San Francisco, CA, USA, 2011
- 3 Kakita N, Kanto T, Miyazaki M, Yoshio S, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Sakakibara M, Hiramatsu N, Kasahara S, Takehara T, Hayashi N. Enhanced ability of IL28A and IL28B induction in plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis C patients with major allele of IL28B single nucleotide polymorphism.
- 4 The Liver Meeting AASLD 62d Annual Meeting and Postgraduate Course, San

Francisco, CA, USA, 2011

特に予定なし

## H.知的財産権の出願・登録状況