

- Comparison with a fiber-substituted Ad vector containing fiber proteins of Ad serotype 35. *J Control Release*. 148: 212-8. (2010).
20. Tashiro K, Kawabata K, Inamura M, Takayama K, Furukawa N, Sakurai E, Katayama K, Hayakawa T, Furue M, Mizuguchi H. Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cellular Reprogramming*.12: 501-7 (2010).
 21. Ushitora M, Sakurai E, Yamaguchi T, Nakamura S, Kondoh M, Yagi K, Kawabata K, Mizuguchi H. Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vectors. *J Control Release*. 142: 431-7 (2010).

H22-肝炎-若手-013

アデノウイルスベクターを利用したC型肝炎治療薬
創製基盤技術の開発

研究代表者： 櫻井 文教 (大阪大学大学院薬学研究科)
分担研究者： 渡利 彰浩 (大阪大学大学院薬学研究科)

本研究の背景・目的

- 1) 利便性に優れたHCV複製・感染評価系の構築が遅れている
・感染モデル動物はチンパンジー・ヒト肝臓キメラマウスのみ
➡ HCVの長鎖RNA (9.6 kb) の高効率な導入法が未開発
- 2) 新たな作用機構 (標的分子) を標的とした新規薬剤の開発が遅れている
・HCV複製・感染に関する新規宿主因子が同定 (複製; miR-122a) (感染受容体; CD81, Claudin-1, Occludin, SR-BI)
➡ 新規ターゲットに対する制御法の開発が遅延



肝臓への遺伝子導入効率に優れた
アデノウイルス (Ad) ベクターを用いて上記の問題点を克服

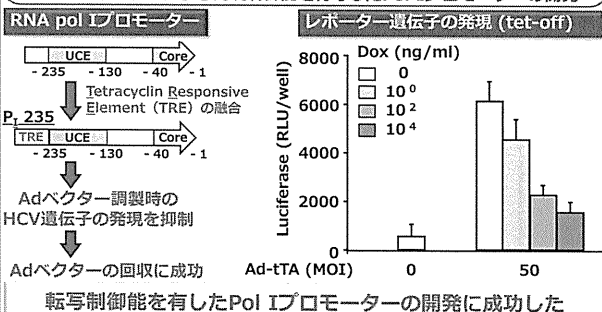
本研究の課題

1. Pol Iプロモーターを搭載したAdベクターの最適化
2. HCVゲノム発現Adベクターの開発
3. miR-122aを阻害可能なTough Decoy RNA発現Adベクターの開発
4. HCV受容体に対するShort-hairpin RNA発現Adベクターの開発

① Pol Iプロモーターを搭載したAdベクターの最適化

HCVゲノム発現Adベクター開発に向けた問題点①
HCVタンパク質のNS3/4AがAdのカプシドタンパク質を分解するため、Adベクターが回収できない

テトラサイクリンによる発現制御能を付与したPol Iプロモーターの開発

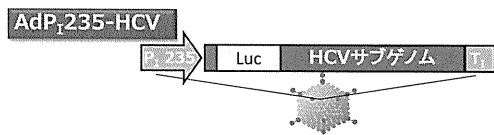
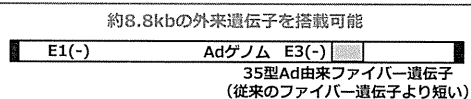


転写制御能を有したPol Iプロモーターの開発に成功した

② HCVゲノム発現Adベクターの開発

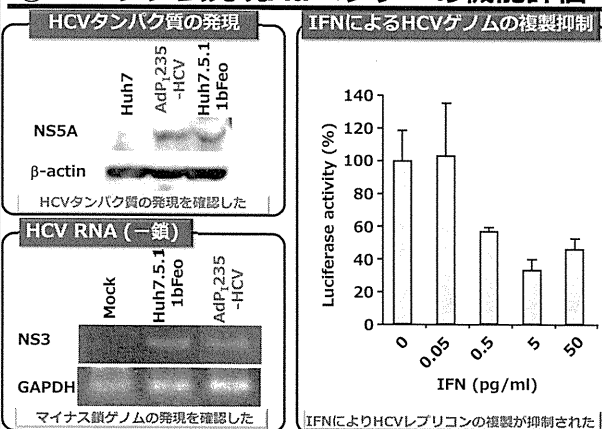
HCVゲノム発現Adベクター開発に向けた問題点②
HCVレプリコン発現カセットサイズ (約8.6kb) が、従来のAdベクターの外來遺伝子搭載可能なサイズ (約8.1kb) より大きいため、搭載不可能

より大きな外來遺伝子を搭載可能なファイバー置換型Adベクターの利用

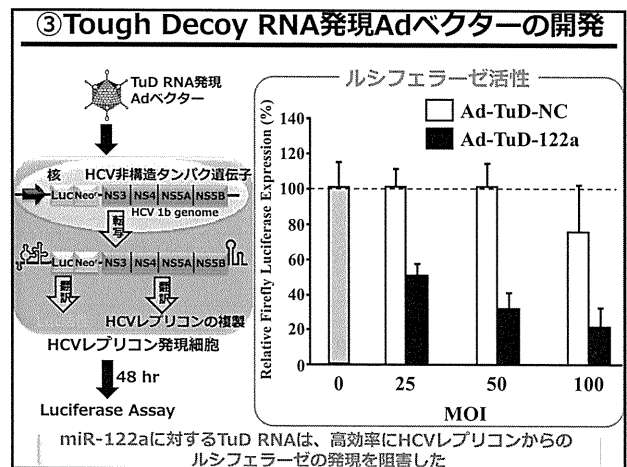
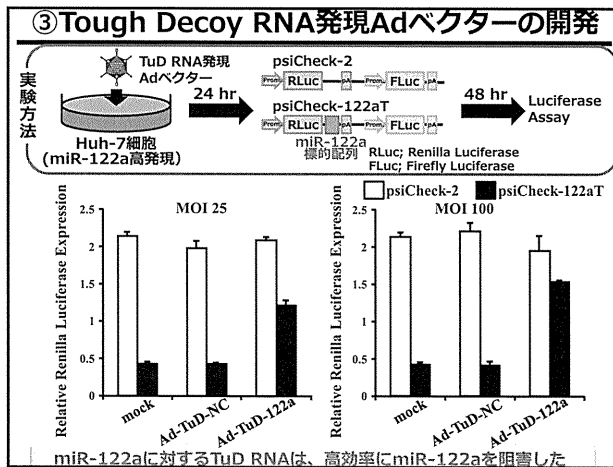
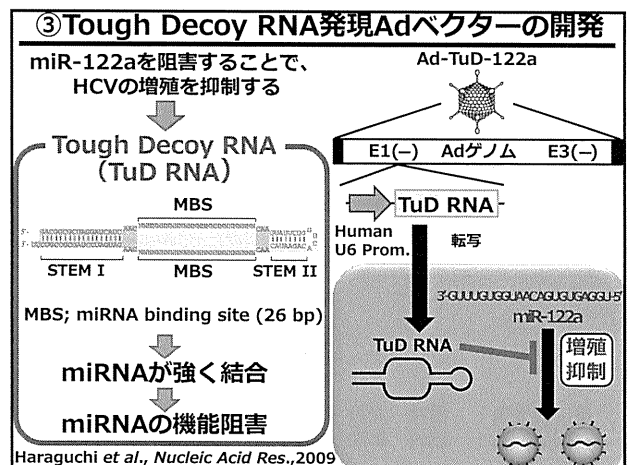
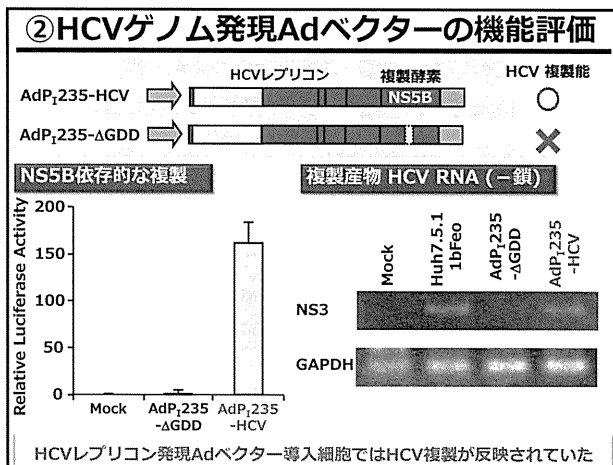


HCVレプリコン発現Adベクターの開発に成功!

② HCVゲノム発現Adベクターの機能評価



IFNによりHCVレプリコンの複製が抑制された



総括&来年度の予定

- ・ Pol Iプロモーターの最適化およびファイバー置換型 Adベクターの利用により、HCVサブゲノム発現Adベクターの開発に成功した。
- ・ HCVサブゲノム発現Adベクターを用いて、Huh-7細胞などにHCVサブゲノムを発現させることに成功した (Nucleic Acid Res, 39:e64 (2011)) (Biochem Biophys Res Commun, 416; 119-124 (2011))。
- ・ miR-122aに対するTough Decoy RNA発現Adベクターを開発し、HCVレプリコンの抑制に成功した (現在投稿中)。

来年度の予定

- ・ HCVフルゲノムを発現可能なAdベクターの開発 (Helper-dependent Adベクターの利用)
- ・ HCV感染受容体を高効率にノックダウン可能なAdベクターの開発

平成 23 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業『成果概要』

研究課題：小胞輸送 ESCRT 経路を利用した C 型肝炎ウイルス排除

課題番号：H22-肝炎-若手-015

予定期間：H22 年度から H24 年度まで

研究代表者：玉井恵一

所属研究機関：宮城県立がんセンター研究所

所属部局：がん先進治療開発研究部

職名：主任研究員

年次別研究費(交付決定額)：1 年目 6,500,000 円 2 年目 6,338,000 円

I. 研究の意義

- (1)C 型肝炎ウイルスのライフサイクルは未だ不明な点が多く残る。
 - (2)現在でも難治性の慢性 C 型肝炎は多数存在し、画期的な治療法の開発が望まれる
- ：

II. 研究の目的、期待される成果

- (1)C 型肝炎ウイルスのライフサイクルを明らかにすることで、新たな治療ターゲットを模索する
 - (2)HCV は小胞輸送経路をもって輸送されることが示唆されており、この経路と HCV の結合を阻害することで HCV 感染の抑制を図る。
- ：

III. 2 年間の研究成果

※この期間にどのような成果があったか、研究代表者、研究分担者毎に、できるだけわかりやすく

具体的に記述してください。

・研究代表者

- (1)HCV は Hrs 依存性のエクソゾーム経路を利用して放出されていることを明らかにした。
(*Virology*, in press)

：

・研究分担者(菅村和夫)

- (1)ヒト化肝臓マウスにおけるノックダウンの系を樹立するために、shRNA 配列をもったアデノウイルスベクターを作成した。

・研究分担者(田中伸幸)

- (1)ヒト化肝臓マウスにヒト肝細胞が生着することを確認し、さらに HCV コア遺伝子をヒト肝細胞内に発現させることに成功した。

IV. 平成 24 年度の課題

- (1)HCV 由来のタンパクと Hrs を含む ESCRT 経路との会合を明らかにする
- (2)ヒト化肝臓マウスの肝臓をノックダウンする系を樹立し、これまで細胞株で明らかにした HCV と ESCRT 経路との関わりを *in vivo* にて明らかにする。
- (3)HCV と ESCRT 経路との会合を阻害する化学物質を探索する。

:

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1)HCV のライフサイクルを阻害する薬物を開発することが出来れば、慢性 C 型肝炎治療のための新たな手段となり得る。

:

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、

知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。

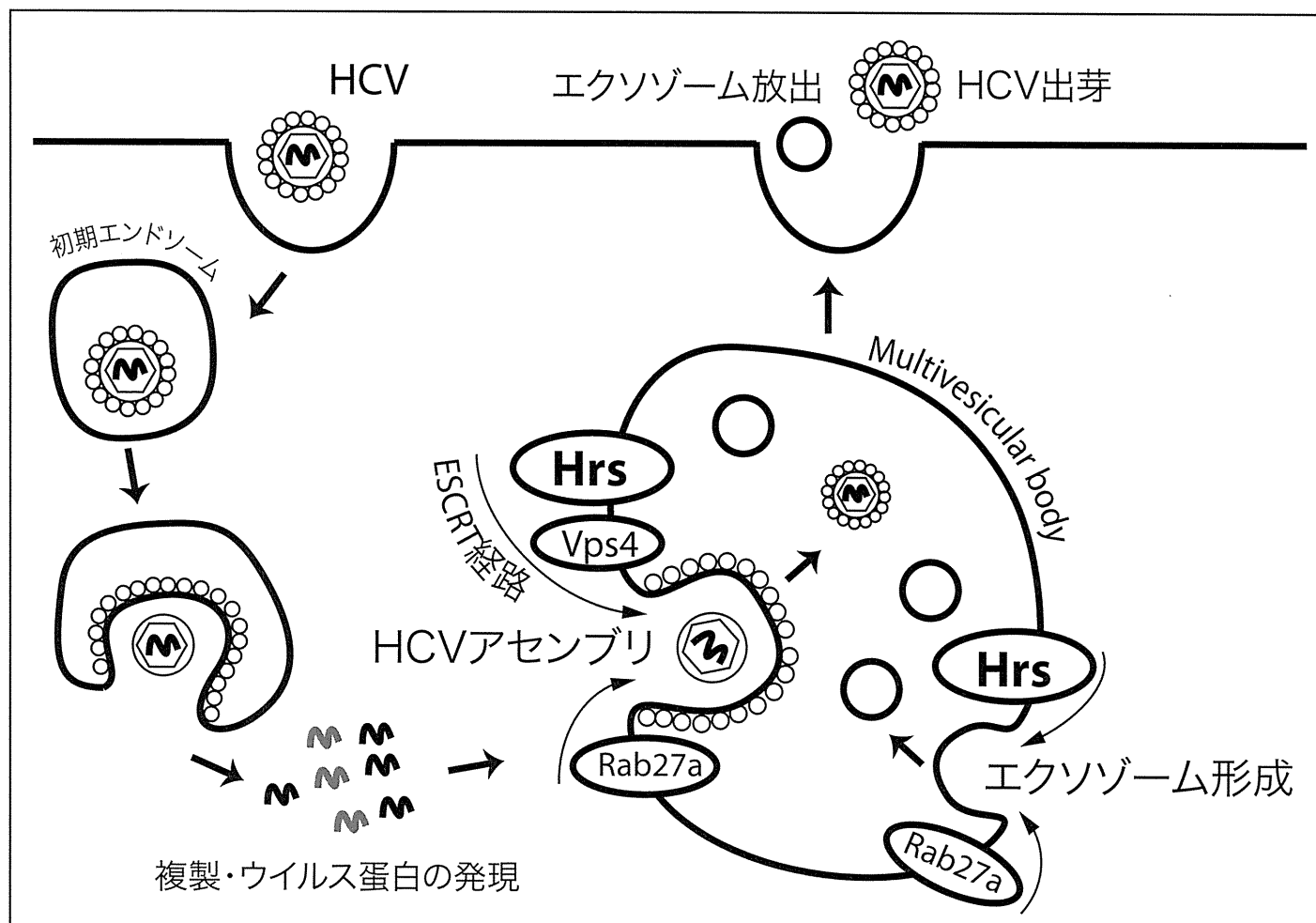
※執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

研究代表者 (玉井恵一)

- (1) Tamai K, Shiina M, Tanaka N, Nakano T, Yamamoto A, Kondo Y, Kakazu E, Inoue J, Fukushima K, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K. Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. *Virology*, *in press*.

:

VII. III(2年間の研究成果)の概要図等



ESCRT分子のHCVにおける役割を検討するために、まずHCVが含まれるとされるエクソゾームとESCRT最上流に位置するHrsの関連性を検討した。Hrsノックアウト樹状細胞においては、エクソゾームの放出量が抑制されており、エクソゾームのT細胞に対する抗原提示能も減少していた。以上のことからHrsはエクソゾーム放出に必須の分子であり、エクソゾームを介した抗原提示能にも関わっている可能性が示唆された。(BBRC, 2010)

次に、我々はHrsとHCV放出の関連を検討した。HrsノックダウンHuh7細胞にHCV株JFH1を感染させると、放出されるHCV-RNAは減少した。細胞内HCV-RNAやコアタンパク発現量には変化がなかったが、細胞内の感染性HCV粒子はHrsノックダウン細胞において減少していた。以上のことから、HrsはHCVアセンブリに関与している可能性が示唆された。更に我々は、HCVとエクソゾームの関連性を検討した。エクソゾーム放出に必須なタンパクとして知られるRab27aをノックダウンしたところ、Hrsと同様に感染性HCV粒子の放出量は著明に減少した。HCV感染細胞の上清を精製し、ショ糖密度勾配遠心にて分画すると、HCVコアタンパクとエクソゾームはほぼ同じ分画に存在した。免疫電顕をおこなうと、HCVコアタンパクとmultivesicular body内のintraluminal vesicleは共局在していた。以上のことからHCVはHrs依存性エクソゾーム経路を利用していることが明らかになった。(Virology, in press)

●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

2004-2008年 東北大学医学部免疫学分野

2008-2009年 東北大学医学部消化器病態学分野

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

宮城県立病院機構 理事長 菅村和夫 (前東北大学医学部免疫学分野教授)

宮城県立がんセンター研究所 がん先進治療開発研究部 部長 田中伸幸

宮城県立がんセンター研究所 がん幹細胞学部 部長 佐藤賢一

東北大学医学部消化器病態学分野 教授 下瀬川徹

山形大学医学部 内科学第二講座 教授 上野義之

東北大学医学部免疫学分野 教授 石井直人

・主な研究課題

原因不明の胆汁うっ滞性肝疾患におけるアクアポリンの役割

小胞輸送分子 Hrs とオートファジー経路との関連性

Hrs コンディショナルノックアウトマウスを用いた Hrs の生体内における機能解明

・これまでの研究実績

※研究代表者の本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要 VI と重複するものや本研究成果によるものは、太字・斜体文字で記載してください)

※発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を

通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

(発表論文)

[1] ***K. Tamai, M. Shiina, N. Tanaka, T. Nakano, A. Yamamoto, Y. Kondo, E. Kakazu, J. Inoue, K.***

- Fukushima, K. Sano, Y. Ueno, T. Shimosegawa, K. Sugamura, Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway, Virology, in press.*
- [2] T Hasegawa, M. Konno, T. Baba, N. Sugeno, A. Kikuchi, M. Kobayashi, E. Miura, N. Tanaka, K. Tamai, K. Furukawa, H. Arai, F. Mori, K. Wakabayashi, M. Aoki, Y. Itoyama, A. Takeda, Powered, The AAA-ATPase VPS4 Regulates Extracellular Secretion and Lysosomal Targeting of α -Synuclein, *PLoS One* (2011).
- [3] S. Suzuki, K. Tamai, M. Watanabe, M. Kyuuma, M. Ono, K. Sugamura, N. Tanaka, AMSH is required to degrade ubiquitinated proteins in the central nervous system, *Biochem Biophys Res Commun* 408 (2011) 582-588.
- [4] Y. Kondo, Y. Ueno, E. Kakazu, K. Kobayashi, M. Shiina, K. Tamai, K. Machida, J. Inoue, Y. Wakui, K. Fukushima, N. Obara, O. Kimura, T. Shimosegawa, Lymphotropic HCV strain can infect human primary naive CD4+ cells and affect their proliferation and IFN-gamma secretion activity, *J Gastroenterol* 46 (2011) 232-241.
- [5] E. Kakazu, Y. Ueno, Y. Kondo, J. Inoue, M. Ninomiya, O. Kimura, Y. Wakui, K. Fukushima, K. Tamai, T. Shimosegawa, Plasma L-cystine/L-glutamate imbalance increases tumor necrosis factor-alpha from CD14+ circulating monocytes in patients with advanced cirrhosis, *PLoS One* 6 (2011) e23402.
- [6] J. Inoue, Y. Ueno, Y. Wakui, H. Niitsuma, K. Fukushima, Y. Yamagiwa, M. Shiina, Y. Kondo, E. Kakazu, K. Tamai, N. Obara, T. Iwasaki, T. Shimosegawa, Four-year study of lamivudine and adefovir combination therapy in lamivudine-resistant hepatitis B patients: influence of hepatitis B virus genotype and resistance mutation pattern, *J Viral Hepat* 18 (2011) 206-215.
- [7] K. Tamai, N. Tanaka, T. Nakano, E. Kakazu, Y. Kondo, J. Inoue, M. Shiina, K. Fukushima, T. Hoshino, K. Sano, Y. Ueno, T. Shimosegawa, K. Sugamura, Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein, *Biochem Biophys Res Commun* 399 (2010) 384-390.
- [8] N. Obara, K. Fukushima, Y. Ueno, Y. Wakui, O. Kimura, K. Tamai, E. Kakazu, J. Inoue, Y. Kondo, N. Ogawa, K. Sato, T. Tsuduki, K. Ishida, T. Shimosegawa, Possible involvement and the mechanisms of excess trans-fatty acid consumption in severe NAFLD in mice, *J Hepatol* 53 (2010) 326-334.
- [9] Y. Kondo, Y. Ueno, K. Kobayashi, E. Kakazu, M. Shiina, J. Inoue, K. Tamai, Y. Wakui, Y. Tanaka, M. Ninomiya, N. Obara, K. Fukushima, M. Ishii, T. Kobayashi, H. Niitsuma, S. Kon, T. Shimosegawa, Hepatitis B virus replication could enhance regulatory T cell activity by producing soluble heat shock protein 60 from hepatocytes, *J Infect Dis* 202 (2010) 202-213.
- [10] E. Kakazu, Y. Ueno, Y. Kondo, K. Fukushima, M. Shiina, J. Inoue, K. Tamai, M. Ninomiya, T. Shimosegawa, Branched chain amino acids enhance the maturation and function of myeloid dendritic cells ex vivo in patients with advanced cirrhosis, *Hepatology* 50 (2009) 1936-1945.
- [11] J. Inoue, Y. Ueno, F. Nagasaki, T. Akahane, K. Fukushima, T. Kogure, Y. Kondo, E. Kakazu, K. Tamai, O. Kido, Y. Nakagome, M. Ninomiya, N. Obara, Y. Wakui, M. Takahashi, H. Okamoto, T. Shimosegawa, Sporadic acute hepatitis E occurred constantly during the last decade in northeast Japan, *J Gastroenterol* 44 (2009) 329-337.

- [12] K. Tamai, M. Toyoshima, N. Tanaka, N. Yamamoto, Y. Owada, H. Kiyonari, K. Murata, Y. Ueno, M. Ono, T. Shimosegawa, N. Yaegashi, M. Watanabe, K. Sugamura, Loss of hrs in the central nervous system causes accumulation of ubiquitinated proteins and neurodegeneration, *Am J Pathol* 173 (2008) 1806-1817.
- [13] K. Tamai, N. Tanaka, A. Nara, A. Yamamoto, I. Nakagawa, T. Yoshimori, Y. Ueno, T. Shimosegawa, K. Sugamura, Role of Hrs in maturation of autophagosomes in mammalian cells, *Biochem Biophys Res Commun* 360 (2007) 721-727.
- [14] K. Tamai, K. Fukushima, Y. Ueno, Y. Moritoki, Y. Yamagiwa, N. Kanno, D.M. Jefferson, T. Shimosegawa, Differential expressions of aquaporin proteins in human cholestatic liver diseases, *Hepatol Res* 34 (2006) 99-103.
- [15] A. Nakashima, N. Tanaka, K. Tamai, M. Kyuuma, Y. Ishikawa, H. Sato, T. Yoshimori, S. Saito, K. Sugamura, Survival of parvovirus B19-infected cells by cellular autophagy, *Virology* 349 (2006) 254-263.

小胞輸送ESCRT経路を利用した C型肝炎ウイルス排除

宮城県立がんセンター研究所 がん先進治療開発研究部

研究代表者 玉井 恵一
分担者 田中 伸幸
菅村 和夫

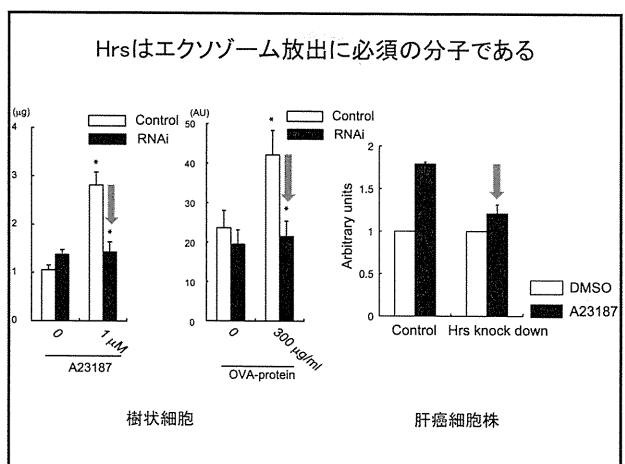
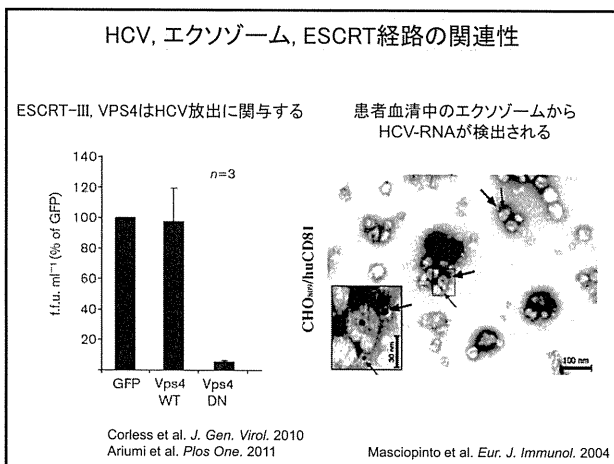
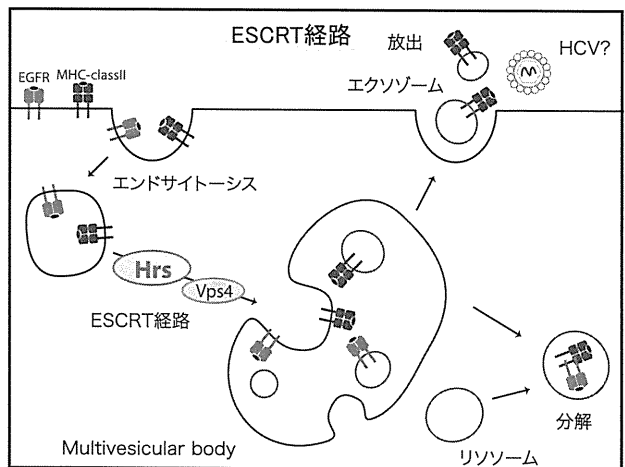
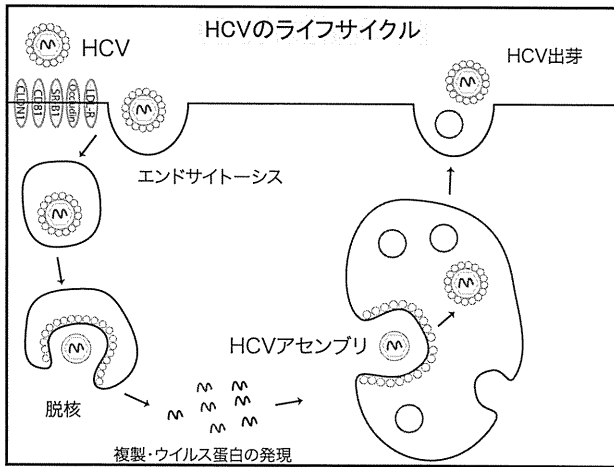
本研究の目的

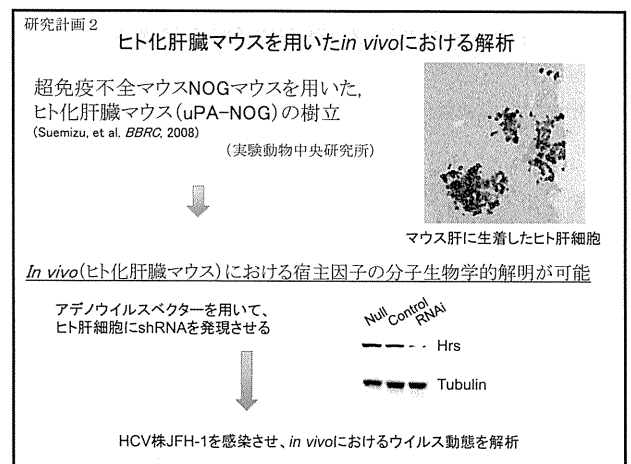
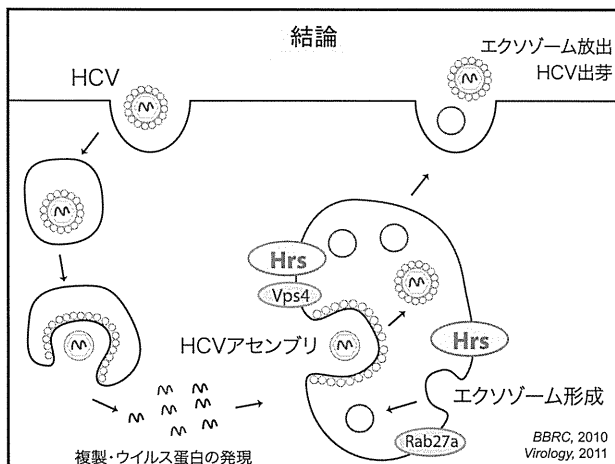
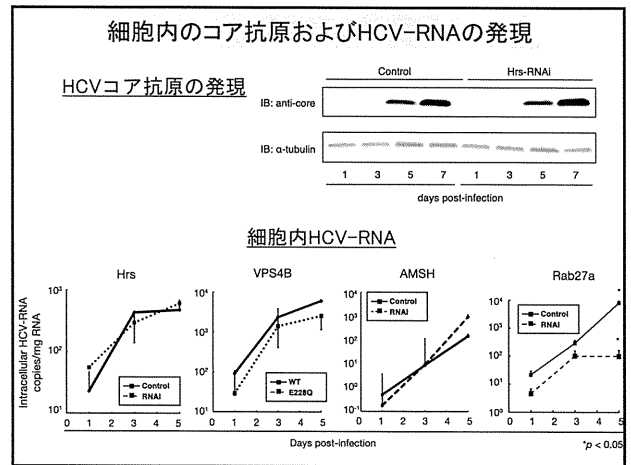
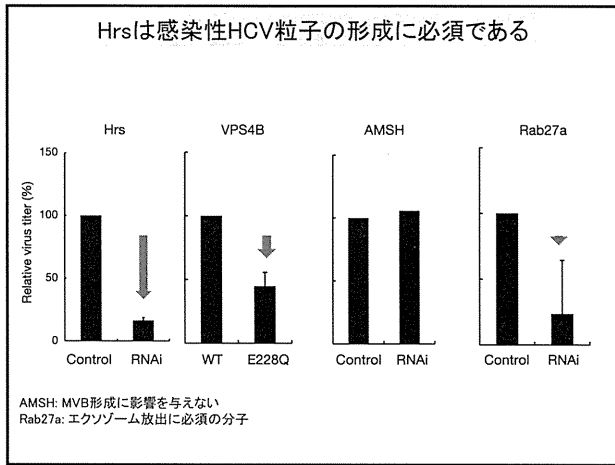
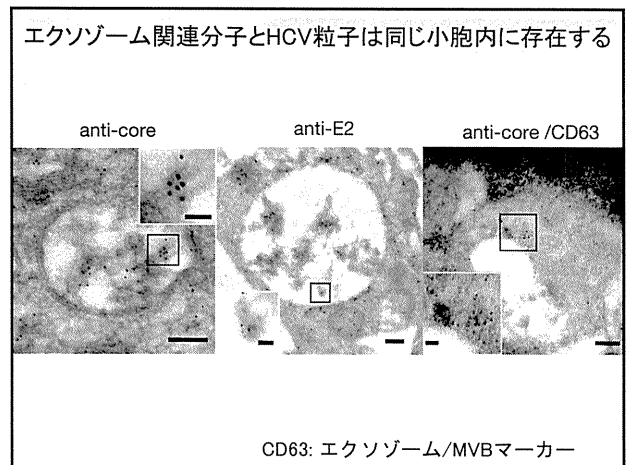
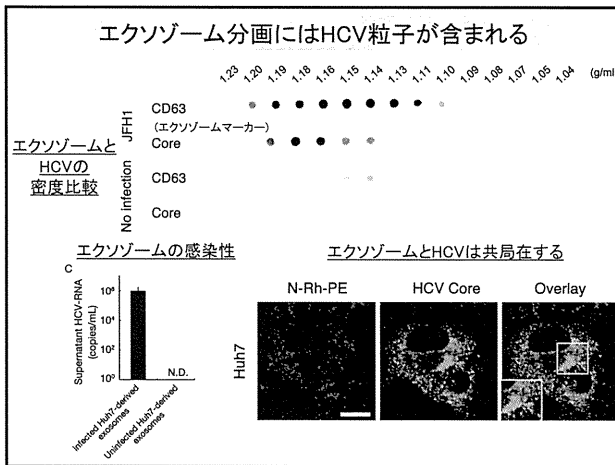
HCV感染に必要な宿主因子の解明

1. HCV細胞内輸送(ESCRT経路)に着目したHCVライフサイクルの解明
2. ヒト化肝臓マウスを用いた *in vivo*での検討



HCVライフサイクル阻害薬の開発





平成 23 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業『成果概要』

研究課題：C型肝炎ウイルスの非構造蛋白 5A を標的とした新規治療法の開発に関する研究

課題番号：H22-肝炎-若手-016

予定期間：H22 年度から H24 年度まで

研究代表者：村山麻子

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：ウイルス第二部

職名：研究員

年次別研究費(交付決定額)：1年目 4,980,000 円 2年目 4,980,000 円

I. 研究の意義

C型肝炎ウイルス(HCV)は本邦では約 200 万人の感染者が存在し、持続感染後肝硬変を経て高率に肝細胞癌を引き起こすことから、公衆衛生上きわめて重要なウイルスである。主な治療法はペグインターフェロンとリバビリンの併用療法であるが、効果は十分とは言えない。また HCV は変異しやすいウイルスであり、多剤併用療法が望ましい。そのため、従来の抗 HCV 薬とは異なる作用点を持つ治療法の開発は厚生労働行政上急務である。本研究における創薬標的を NS5A 蛋白質に設定した理由は(1)酵素としての機能が明確な NS3、NS5B 蛋白質に比べ NS5A 蛋白質を標的とした阻害剤の開発が遅れていること、(2)NS5A 蛋白質は HCV の複製増殖やインターフェロン感受性、病原性発現などに重要な多機能蛋白質であること、(3)リン酸化蛋白質であり、NS5A 蛋白質のリン酸化は複製、粒子形成過程において重要であることから、リン酸化制御という明確な創薬標的の設定が可能であること、の 3 点である。本研究では NS5A 蛋白質を標的とした新規治療法の開発を目標とし、HCV ゲノム複製、粒子形成を制御するプロテインキナーゼおよび NS5A 結合ペプチドの取得を目指す。

II. 研究の目的、期待される成果

研究の目的：本研究の目的は NS5A 蛋白質を標的とした新規治療法の開発である。

具体的には以下の 4 点について解析を行う。

- (1)HCV の NS5A 蛋白質と相互作用するプロテインキナーゼ(PK)の網羅的探索。
- (2)NS5A をリン酸化する PK の探索。
- (3)同定された PK が HCV 複製・粒子形成に及ぼす影響の解析とその作用機序の解明
- (4)NS5A 蛋白結合ペプチドの探索と HCV 複製・粒子形成を制御するペプチドの取得。

期待される成果：本研究により HCV の複製・粒子形成に関与する PK が得られれば、PK を標的とした治療法への応用が可能である。このような宿主因子を標的とした治療法はウイルスの遺伝子型や薬剤耐性変異など、従来の抗 HCV 薬が抱える問題点を克服できると期待される。一方、NS5A 結合ペプチドは PK を標的とした治療法とは異なる作用点を持つ治療薬として期待できる。

III. 2 年間の研究成果

研究代表者{政木隆博(H22.4.1-H23.8.31)、村山麻子(H23.9.1-)}**(1)HCV 生活環に關与する PK の同定****1 NS5A 蛋白質と強く相互作用する PK の同定**

404 種類のヒト PK を対象とした AlphaScreen 解析を行い、NS5A 蛋白質との強い相互作用が認められる PK を 89 種類得た。このうち 79 種類がセリン/スレオニン PK であった。

2 NS5A 蛋白質に対するリン酸化能の評価

AlphaScreen 解析でヒットした 79 種類の PK に対して、in vitro リン酸化アッセイを行い、NS5A リン酸化活性の高い 9 種類の PK を同定した。

3 同定された PK が HCV 複製、粒子形成に与える影響の解析

同定された 9 種類の PK のノックダウンによる HCV 複製、粒子形成への影響を検討した。9 種類の PK のうち、3 種類の PK (CK1 α , CK1 ϵ , CK2 α 2) のノックダウンにより、HCV のウイルス産生が阻害された。また、これらの PK のノックダウンはウイルス粒子形成過程の効率を低下させ、ゲノム複製過程には影響しなかったことから、これらの PK はウイルス粒子形成過程において重要であることが示唆された。CK1 α のノックダウン細胞を用いて詳細に解析した結果、CK1 α のノックダウンにより、NS5A 蛋白質の細胞内局在が変化していた。

4. CK1 α によるリン酸化部位の同定

HCV 感染細胞および HCV 感染 CK1 α ノックダウン細胞から抽出した NS5A 蛋白質をそれぞれ質量分析法により解析し、CK1 α によるリン酸化部位を同定した。

5 PK 阻害剤の HCV 増殖抑制効果の検討

HCV 感染細胞を用いて PK 阻害剤の HCV 増殖抑制効果を検討した。4 種類の CK 阻害剤において HCV 増殖抑制効果が認められた。

(2)NS5A 結合ペプチドの取得**1. NS5A 結合ペプチドのスクリーニング**

大腸菌発現システムを利用し、NS5A 蛋白質を発現、精製した。精製 NS5A 蛋白質を用いて東京大学先端科学技術研究センターと共同で 11 種類の NS5A 蛋白質結合ペプチドを取得した。

2. NS5A 結合ペプチドの HCV 増殖抑制効果の検討

得られた NS5A 結合ペプチドを細胞に導入し、HCV ゲノム複製における影響を解析した。11 種類のペプチドのうち、9 種類のペプチドにおいて HCV ゲノム複製の抑制効果が見られた。

IV. 平成 24 年度の課題

- (1) PK が關与する HCV ゲノム複製、粒子形成機構の解析
- (2) PK の作用、および PK 阻害剤の効果のウイルス遺伝子型間での相違の検討
- (3) PK 阻害剤の他の薬剤(インターフェロン、プロテアーゼ阻害剤等)との併用効果の検討
- (4) PK 阻害剤による耐性変異の検討
- (5) HCV 感染マウスモデルにおける PK 阻害剤の抗 HCV 効果の解析
- (6) NS5A 結合ペプチドにより制御される HCV ゲノム複製、粒子形成機構の解析

V. 行政施策への貢献の可能性

本研究により HCV ゲノム複製、粒子形成に關与する PK が同定されれば、ゲノム複製、粒子形成両者の制御を標的とした治療法への応用が可能であり、さらに、宿主因子を標的とした治療法であるため、遺伝子型やウイルス変異による薬剤耐性の問題を克服できるものと期待される。また、HCV ゲノム複製、粒子形成を制御する NS5A 蛋白質結合ペプチドが取得されれば、PK を標的とした治療法とは異なる作用点を持つ治療薬として、期待される。本研究により HCV ゲノム複製や粒子形成過程の制御が可能となれば、学術的な貢献のみならず C 型肝炎の新たな治療法開発への端緒を開くものと期待される。本研究成果を利用した医薬品が開発されれば、医療サービスの向上、国民の健康増進につながるとともに、肝癌発症率の低下に伴う医療費削減を介して行政への貢献も可能であると考えられる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者 政木隆博(平成 22 年 4 月-平成 23 年 8 月)

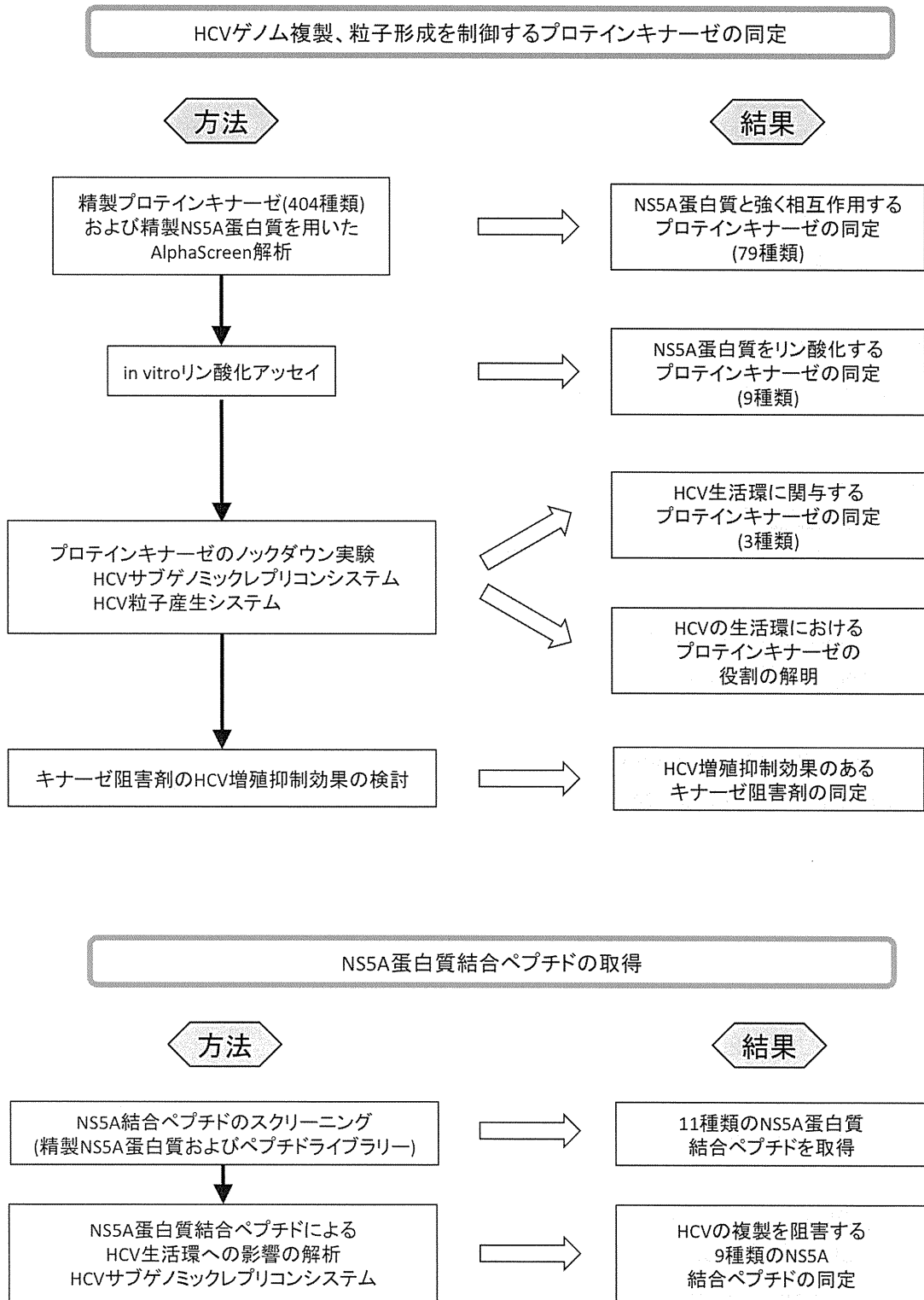
1. Poduction of infectious chimeric hepatitis C virus genotype 2b harboring minimal regions of JFH-1. Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. J Virol. 2011 In press.
2. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Jul 8;410(3):404-9.
3. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. 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, Suzuki T. Virology 2011;410:38-47.
4. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. J Virol 2010;84:5824-5835.
5. HCV NS5A蛋白質のリン酸化に關与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、遠藤弥重太、脇田隆字、澤崎達也、鈴木哲朗. 消化器内科、51巻、PP. 627-631、2010.
6. C型肝炎ウイルスの複製と粒子形成. 鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博. ウイルス、60巻、PP. 87-92、2010.

研究代表者 村山麻子(平成 23 年 9 月-)

1. Poduction of infectious chimeric hepatitis C virus genotype 2b harboring minimal regions of JFH-1. Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. J Virol. 2011 In press.
2. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Jul 8;410(3):404-9.

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。



● 研究代表者の研究歴等

研究代表者 政木隆博(平成22年4月-平成23年8月)

・ 過去に所属した研究機関の履歴

平成12年4月～平成17年3月

東海大学医学部基盤診療学系公衆衛生・社会医学教室 研究員

平成17年4月～平成20年3月

がん研究振興財団 リサーチレジデント、国立感染症研究所ウイルス第二部 流動研究員

平成20年4月～平成20年9月

ウイルス肝炎研究財団 リサーチレジデント、国立感染症研究所ウイルス第二部 流動研究員

平成20年10月～平成23年8月

国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

・ 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

平成12年4月～平成17年3月

東海大学医学部基盤診療学系公衆衛生・社会医学教室 岡崎 勲 教授

平成17年4月～平成20年9月

国立感染症研究所ウイルス第二部 宮村達男 部長、脇田隆字 部長(平成18年4月～)、
鈴木哲朗 第四室室長

平成20年10月～平成23年8月

国立感染症研究所ウイルス第二部 脇田隆字 部長、加藤孝宣 第三室室長

・ 主な研究課題

平成12年4月～平成17年3月

- (1)株化ヒト肝癌細胞におけるレチノイン酸によるアルブミン発現調節機構の解析
- (2)膵管上皮不死化細胞株の樹立と膵発癌過程の解析
- (3)造影超音波検査法を用いた切除不能進行膵癌患者の予後評価システムの確立

平成17年4月～平成20年3月

(1)All-trans retinoic acid による C/EBP β -LIP を介したヒトアルブミン遺伝子発現調節機構の解析

(2)RNA polymerase I システムを用いて作製した感染性 HCV 粒子の性状解析

平成20年4月～平成20年9月

(1)HCV の粒子形成過程に関与する NS5A 蛋白質領域の同定

(2)RNA polymerase I システムを用いた感染性 HCV 粒子持続産生細胞の樹立と抗ウイルス薬評価系への応用

平成20年10月～平成23年8月

(1)HCV の粒子形成を制御する分子機構の解析

- (2) HCV の粒子形成過程を標的とした新規治療法の萌芽的研究
 (3) HCV の非構造蛋白 5A を標的とした新規治療法の開発に関する研究

・ これまでの研究実績

[発表論文]

1. ***Poduction of infectious chimeric hepatitis C virus genotype 2b harboring minimal regions of JFH-1. Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. J Virol. 2011 In press.***
2. ***Role of the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. Saeed M, Suzuki R, WatanabeN, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. J Biol Chem, 286:37264-37273, 2011.***
3. ***Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Biochem Biophys Res Commun.;410(3):404-9, 2011.***
4. ***Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. 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, Suzuki T. Virology, 410(1):38-47, 2011.***
5. ***Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Journal of Virology, 84:5824-5835, 2010.***
6. The usefulness of perfusion-weighted magnetic resonance imaging in advanced pancreatic cancer. Ueno M, Niwa T, Ohkawa S, Amano A, Masaki T, Miyakawa K, Yoshida T. **Pancreas**, 38:644-648, 2009.
7. Lecithin: retinol acyltransferase protein is distributed in both hepatic stellate cells and endothelial cells of normal rodent and human liver. Nagatsuma K, Hayashi Y, Hano H, Sagara H, Murakami K, Saito M, Masaki T, Lu T, Tanaka M, Enzan H, Aizawa Y, Tajiri H, and Matsuura T. **Liver International**, 29:47-54, 2009.

8. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. **Journal of Virology**, 82:7964-7976, 2008.
9. Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter. Omata K, Suzuki R, Masaki T, Miyamura T, Satoh T, and Suzuki T. **Apoptosis**, 13:929-937, 2008.
10. Extracorporeal bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fatal experimental hepatic encephalopathy. Kanai H, Marushima H, Kimura N, Iwaki T, Saito M, Maehashi H, Shimizu K, Muto M, Masaki T, Ohkawa K, Yokoyama K, Nakayama M, Harada T, Hano H, Hataba Y, Fukuda T, Nakamura M, Totsuka N, Ishikawa S, Unemura Y, Ishii Y, Yanaga K, and Matsuura T. **Artificial Organs**, 31:148-151, 2007.
11. Reduction therapy of alanine aminotransferase levels prevent HCC development in patients with HCV-associated cirrhosis. Rino Y, Tarao K, Morinaga S, Ohkawa S, Miyakawa K, Hirokawa S, Masaki T, Tarao N, Yukawa N, Saeki H, Takanashi Y, and Imada T. **Anticancer Research**, 26:2221-2226, 2006.
12. Reconstruction of liver organoid using a bioreactor. Saito M, Matsuura T, Masaki T, Maehashi H, Shimizu K, Hataba Y, Iwahori T, Suzuki T, and Braet F. **World Journal of Gastroenterology**, 12:1881-1888, 2006.
13. *All-trans* retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBPbeta-LIP. Masaki T, Matsuura T, Ohkawa K, Miyamura T, Okazaki I, Watanabe T, and Suzuki T. **Biochemical Journal**, 397:345-353, 2006.
14. Noninvasive assessment of tumor vascularity by contrast-enhanced ultrasonography and the prognosis of patients with nonresectable pancreatic carcinoma. Masaki T, Ohkawa S, Amano A, Ueno M, Miyakawa K, Tarao K. **Cancer**, 103:1026-1035, 2005.
15. Ursodiol use is possibly associated with lower incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-associated liver cirrhosis. Tarao K, Fujiyama S, Ohkawa S, Miyakawa K, Tamai S, Hirokawa S, Masaki T, Tanaka K. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 14:164-169, 2005.

16. Sustained low alanine aminotransferase levels can predict the survival for 10 years without hepatocellular carcinoma development in patients with hepatitis C virus-associated liver cirrhosis of child stage A. Tarao K, Rino Y, Ohkawa S, Endo O, Miyakawa K, Tamai S, Hirokawa S, Masaki T, Nagaoka T, Okamoto N, Tanaka K, Tarao N. **Intervirolgy**, 47:65-71, 2004.
17. Study of the reappearance of sieve plate-like pores in immortalized sinusoidal endothelial cells - Effect of actin inhibitor in mixed perfusion cultures. Saito M, Matsuura T, Masaki T, Maehashi H, Braet F. **Comparative Hepatology**, 3 (Suppl 1):S28, 2004.
18. Serum alanine aminotransferase levels and survival after hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma and hepatitis C virus-associated liver cirrhosis. Tarao K, Rino Y, Takemiya S, Ohkawa S, Sugimasa Y, Miyakawa K, Tamai S, Masaki T, Hirokawa S, Kameda Y, Nagaoka T, Okamoto N, Kokubu S, Yoshida M, Kakita A. **Cancer Science**, 94:1083-1090, 2003.
19. CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver. Iwahori T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, Suzuki T. **Hepatology**, 37:665-673, 2003.

[邦文論文]

1. HCV NS5A蛋白質のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索.
政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、遠藤弥重太、脇田隆字、澤崎達也、鈴木哲朗. *消化器内科*, 51:627-631, 2010.

[著書]

1. C型肝炎ウイルスの複製と粒子形成.
鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博. *ウイルス*, 60:87-92, 2010.
2. HCVの分子生物学. 肝癌-基礎・臨床研究のアップデート.
政木隆博、鈴木哲朗. *日本臨床/日本臨床社編*, 67(3):134-137, 2009.
3. C型肝炎ウイルスの感染粒子形成機構.
鈴木哲朗、政木隆博、相崎英樹. *ウイルス*, 58:199-206, 2008.

研究代表者 村山麻子(平成23年9月-)

・ 過去に所属した研究機関の履歴

平成16年4月～平成17年3月

東京大学医学系研究科 微生物学教室 研究員

平成17年4月～平成18年3月

都立神経科学総合研究所 微生物研究部門 研究員

平成18年4月～平成20年3月

ウイルス肝炎研究財団 リサーチレジデント、国立感染症研究所ウイルス第二部 流動研究員

平成20年4月～平成22年3月

ヒューマンサイエンス振興財団 リサーチレジデント、国立感染症研究所ウイルス第二部 流動研究員

平成22年4月～現在

国立感染症研究所 ウイルス第二部第三室 研究員

・ 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

平成16年4月～平成17年3月

東京大学医学系研究科 微生物学教室 野本明男 教授

平成17年4月～平成18年3月

都立神経科学総合研究所 微生物研究部門 脇田隆宇 副参事研究員

平成18年4月～平成22年3月

国立感染症研究所 ウイルス第二部 脇田隆宇 部長

平成22年4月～現在

国立感染症研究所 ウイルス第二部第三室 加藤孝宣 室長、脇田隆宇 部長

・ 主な研究課題

平成16年4月～平成17年3月

「HCV コア蛋白質による病原性発現機構の解析」

平成17年4月～平成18年3月

「HCV 複製機構の解析」

平成18年4月～平成20年3月

「HCV 複製機構の解析」

「遺伝子型2aのJ6CFキメラ株を用いたHCV感染増殖系の樹立」

平成20年4月～平成22年3月

「遺伝子型2aのJ6CF株を用いたHCV感染増殖系の樹立」

「遺伝子型2bの株を用いたHCV感染増殖系の樹立」

平成22年4月～現在

「新規細胞株を用いた高効率なHCV感染増殖系の樹立」