

- 7) Yamashita T, Honda M, and Kaneko S. Cancer Stem Cells in Hepatocarcinogenesis. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Single Topic Conference 2011, Jeju, Korea, 2011.
- 8) 山下太郎、本多政夫、金子周一 肝癌幹細胞形質の多様性、日本臨床腫瘍学会総会、横浜、2011
- 9) 山下太郎、本多政夫、金子周一 肝癌幹細胞の特徴に応じたテーラーメイド医療の検討、日本肝臓学会総会、東京、2011
- 10) Yamashita T., Honda M., and Kaneko S. Signaling pathways responsible for self-renewal and differentiation in liver cancer stem cells. Japanese Cancer Association Annual Meeting 2010, Osaka, 2010.
- 11) Yamashita T., Honda M., Nakamoto Y., Yamashita T., Arai K., Takatori H., Nio K., Hara Y., Takamura H., Tani T., Ikeda H., Zen Y., Wang X.W., and Kaneko S. Heterogeneity and Hierarchy of Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer. American Association of Study of Liver Diseases Annual Meeting 2010, Boston, 2010.
- 12) Yamashita T, Honda M., Nio K., and Kaneko S. Oncostatin M renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. American Association of Cancer Research 101st Annual Meeting 2010, Washington D.C., 2010.
- 13) 山下太郎、本多政夫、金子周一 Oncostatin M を用いた幹細胞様肝癌の分化誘導療法の検討、日本肝臓学会総会、山形、2010年.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）
分担研究報告書

高活性型siRNAを用いたウイルス性肝炎および肝がんに対する創薬研究

小原 道法 東京都医学総合研究所・感染制御プロジェクト プロジェクトリーダー

研究要旨：長鎖の2本鎖RNA(dsRNA)をDicerにより切断し、産生されたsiRNAの混合物(Diced-siRNAs)が高いRNAi活性を持つことを認めた。Diced-siRNAs切断部位から推測して作製したsiRNAのRNAi効果を検討した結果、非常に高いRNAi活性をもつものが同定された。そこで、肝がん幹細胞マーカーであるEpCAMに対する高活性のsiRNAの探索と構築を試みた。EpCAM mRNAをオーバーラップする4領域(R1, R2, R3, R4)に分割して、それぞれ400塩基長の2本鎖RNAを作成しDicerにより切断した。我々が開発して方法を用いてdicer hunting siRNAを12種類作成した。このうちの1種類は数pMでHep3B細胞のEpCAMを効率よくノックダウンできることが示され、超高効率siRNAの作成に成功した。さらにsiRNAを効率よく肝臓に導入するためのDDSとしてpH感受性のエンドソームエスケープリポソームの検討を行った。

A. 研究目的

本研究はEpCAM陽性がん幹細胞に極めて高い特異性と治療効果を生み出しうる新規医薬品を開発する。そのために、まずDicer切断同定法によって高活性siRNAを作成する。さらに、開発した核酸の導入効率を飛躍的に高めたエンドソームエスケープリポソーム(DDS)を用いてEpCAM陽性肝がん幹細胞を標的とするドラッグデリバリー系(DDS)を構築する。Dicer切断同定法によって高活性のsiRNAの探索と構築を試み、高活性siRNAを上記のDDSに組み込むことで、EpCAM陽性がん幹細胞に選択的かつ高効率にsiRNAを導入し、薬剤標的分子の発現を抑制することで高い抗腫瘍効果を生み出す新技術を開発する。

B. 研究方法

肝がん幹細胞マーカーであるEpCAMのmRNAをオーバーラップする4領域(R1, R2, R3, R4)に分割して、in vitroでDiced-siRNAsを作製し、これら4種類のDiced-siRNAsをHep3B細胞に導入した。阻害活性はウエスタンブロット法によりHep3B細胞に対するRNAi効果を検討した。さらに、siRNAを効率よく標的細胞に導入し、RNAi活性を発現させるために新たなデリバリー系としてエンドソームエスケープ膜融合ペプチドを検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従う。また、東京都医学総合研究所動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

EpCAM の mRNA をオーバーラップする 4 領域 (R1, R2, R3, R4) に分割して作成した Dicer 切断 siRNA の阻害活性をウエスタンブロット法により検討したところ R3 領域に強い RNAi 活性が認められた。この領域に対して我々が開発して方法を用いて dicer hunting siRNA を 12 種類作成した。このうちの 1 種類は数 pM で Hep3B 細胞の EpCAM を効率よくノックダウンできることが示され、超高効率 siRNA の作成に成功した。さらに siRNA を効率よく肝臓に導入するための DDS として pH 感受性のエンドソームエスケープリポソーム (MEND) の検討を行った。MEND の表面に EpCAM 親和性の特殊環状ペプチドを結合させ、さらに EpCAMsiRNA を内封した。この標的化 MEND で Hep3B の EpCAM をノックダウンしたところ、標的化しないものに比較して数 10 倍の効率の上昇が認められた。

D. 考察

これらの結果から、dicer による dsRNA 切断部位を同定することで、非常に RNAi 活性の高い siRNA を作製できることが示された。これにより、高い RNAi 活性をもつ siRNA と高効率 DDS を組み合わせることにより、細胞表面抗原標的化遺伝子発現抑制を可能にした。

E. 結論

高い RNAi 活性を有する siRNA と EpCAM 標的化高活性修飾リポソームを用いて、in vivo における EpCAM 阻害効果を検討して

いく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fumihiko Yasui, Masayuki Sudoh, Masaaki Arai, Michinori Kohara. Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication. J. Med. Virol. (2013) in press.
- 2) Makoto Saito, Michinori Kohara, Yuri Kasama and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus induces overexpression of 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Sp1. J. Med. Virol. 84:733-746 (2012).
- 3) Yuichi Hirata, Kazutaka Ikeda, Masayuki Sudoh, Akemi Suzuki, Yuko Tokunaga, Leiyun Weng, Masatoshi Ohta, Yoshimi Tobita, Ken Okano, Kazuhisa Ozeki, Kenichi Kawasaki, Takuo Tsukuda, Asao Katsume, Yuko Aoki, Takuya Umehara, Satoshi Sekiguchi, Tetsuya Toyoda, Kunitada Shimotohno, Tomoyoshi Soga, Masahiro Nishijima, Ryo Taguchi, and Michinori Kohara. Self-enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis. PLoS Pathog. 2012 Aug;8(8):e1002860. Epub 2012 Aug 16. (2012).
- 4) Kazuaki Inoue, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Chiho Matsuda¹, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita, Shusuke Kuge, Makoto Yoshida and Michinori Kohara. Impairment of interferon regulatory factor-1 3 activation by hepatitis C virus core protein basic region 1. Biochem Biophys Res Commun. 428(4):494-499 (2012).

- 5) Satoshi Sekiguchi, Kiminori Kimura, Tomoko Chiyo, Takahiro Ohtsuki, Yoshimi Tobita, Yuko Tokunaga, Fumihiko Yasui, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Takaji Wakita, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Kyosuke Mizuno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Kouji Matsushima and Michinori Kohara. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS ONE* 7(12):e51656 (2012).
- 6) Yuri Kasama, Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Masaaki Satoh, Zhonzhi Wang, Nagla Elwy, Shinji Harada, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. *Virus Res.* 163:405-409 (2012).
- 7) Leiyun Weng, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Tetsuya Toyoda. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene* 496:79-87 (2012).
- 8) Hideyuki Konishi, Koichi Okamoto, Yusuke Ohmori, Hitoshi Yoshino, Hiroshi Ohmori, Motooki Ashiara, Yuichi Hirata, Atsunori Ohta, Hiroshi Sakamoto, Natsuko Hada, Asao Katsume, Michinori Kohara, Kazumi Morikawa, Takuo Tsukuda, Nobuo Shimma, Graham Foster, William Alazawi, Yuko Aoki, Mikio Arisawa, and Masayuki Sudoh. An orally available, small-molecule interferon inhibits viral replication. *Sci. Rep* 259:1-9 (2012).
- 9) Masaaki Arai, Hidenori Suzuki, Yoshimi Tobita, Asako Takagi, Koichi Okamoto, Atsunori Ohta, Masayuki Sudoh, Kunitada Shimotohno, Michinori Kohara. Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. *Arch. Virol.* 156:295-304 (2011).
- 10) Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masahiro Hayashi, Yuichi Hirata, Masaaki Satoh, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Masayuki Sudo, and Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology* 55(3):512-521 (2011)
- 11) Takashi Takano, Michinori Kohara, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Makoto Saito, Chieko Kai, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. 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).
- 12) Kiminori Kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* 89:433-442 (2011).

- 13) Kayo Yoshikawa, Aya Ogata, Chiho Matsuda, Michinori Kohara, Hideo Iba, Yukio Kitade, Yoshihito Ueno. Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance. *Bioconjugate Chemistry* 22:42-49 (2011).
- 14) Kiminori Kimura, Michinori Kohara. *Frontiers of Model Animals for Human Diseases*. *Experimental Animals* 60(2), 93-100 (2011).
- 15) Tomoko Chiyo, Satoshi Sekiguchi, Masahiro Hayashi, Yoshimi Tobita, Yumi Kanegae, Izumu Saito, and Michinori Kohara. 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(1-2):89-97 (2011).
- 16) Masaaki Satoh, Makoto Saito, Takashi Takano, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Yasumasa Nishito, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Masayuki Sudo, Chieko Kai, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1. *J Infect Dis.* 204(8):1172-80 (2011).
- 17) Yutaka Amako, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Yuichi Hirata, Satoshi Sekiguchi, Yoshimi Tobita, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Hiromichi Yonekawa and Michinori Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J. Virology* 84(1):303-311 (2010).
- 18) Kenichi Satoh, Hiroki Takahashi, Chiho Matsuda, Takuya Umehara, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Mikio Zeniya and Michinori Kohara. Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. *J. Med. Virol.* 82(9):1545-1553 (2010).
- 19) Yuri Kasama, Satoshi Sekiguchi, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Masaaki Satoh, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Motohiro Takeya, Yoichi Hiasa, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas *in vivo*. *Blood* 116(23):4926-4933 (2010).
- 20) Hideko Nuriya, Kazuaki Inoue, Takeshi Tanaka, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Kyosuke Kaji, Seishu Hayashi, Shuichi Kaneko and Michinori Kohara. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based *in situ* hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 48(11):3843-3851 (2010)
- 21) Leiyun Weng, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Ying He, Jin Zhong, Tetsuya Toyoda. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype specific manner. *J. Virology* 84(22):11761-11770 (2010).

2. 学会発表

- 1) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Taguchi R., Kohara M.: Self-enhancement of Hepatitis C Virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2012.10.4-11. Venice (Italy)
- 2) 小原恭子、佐藤正明、小原道法 : C型肝炎ウイルスの複製に關与する新規宿主因子BGT-1. 第71回日本癌学会学術総会 2012.9.19-21. 札幌
- 3) Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. : Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in C cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. 第11回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2012.9.11-14. 兵庫
- 4) Takano T., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. : Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. The International Liver Congress 2012.4.18-22 Barcelona (SPAIN)
- 5) 小原道法 : C型肝炎ウイルス研究の最新線 ウイルス学イブニングセミナー 2011.6.21 京都
- 6) 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
- 7) 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關与 第47回日本肝臓学会総会 2011.6.2-3 東京
- 8) 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
- 9) Yasui F., Munekata K., Sakoda Y., Kida H., Shibata S., Murakami T., Kohara M.: Immunization with recombinant vaccinia virus expressing hemagglutination protein of H5N1 HPAIV protect mice from lethal H5N1 HPIV infection via the neutralizing antibody-independent mechanism. Keystone Symposia-Pathogenesis of Influenza 2011.5.23-28 Kowloon (Hong Kong)
- 10) 平田雄一、井上和明、小原道法 : IFN λ を強力に誘導する核酸/リポソーム製剤の同定とその抗HCV効果 第18回日本消化器関連学会 2010.10.13-16. 横浜
- 11) 木村公則、小原道法 : C型慢性肝炎に対するHCV遺伝子組換えワクチニアウイルスによる新たな治療戦略 第18回日本消化器関連学会 2010.10.13-16. 横浜
- 12) Sekiguchi S., Kimura K., Chiyo T., Tobita Y., Yasui F., Kohara M. : Hepatitis C virus mediated pathogenesis is dependent on inflammatory cytokines with irrespective of HCV protein level. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2010.9.10-14. 横浜
- 13) Nakagawa S., Hirata Y., Tokunaga Y., Hirabatashi K., Yano J., Tateno C., Tanaka Y., Mizokami M., Inoue K., Yoshida M.,

Kohara M. : Interferon lambda plays a critical role on antiviral effect in human hepatocyte. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2010.9.10-14. 横浜

14) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Taguchi R., Kohara M.: Hepatitis C virus altered the sphingolipids metabolism for better environment its replication. Keystone Symposia 2010.6.6-11 Kyoto

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

特殊ペプチドを用いたC型肝炎ウイルスに対する創薬研究

菅 裕明 東京大学大学院理学系研究科・化学専攻 教授

研究要旨：本研究分担班は、独自に開発したRaPIDシステムを駆使し、C型肝炎ウイルスあるいは肝癌の新規標的や疾患関連因子に対し、特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指している。本研究期間に、肝臓がん幹細胞に強発現されているEpCAMに強力に結合するリガンド、HCVがヒト細胞に感染する際に重要に役割を果たすグライコタンパク質E2ならびにClaudinタンパク質に結合するリガンド特殊ペプチドを発見し、それらの応用研究を進めた。

A. 研究目的

本研究分担班は、C型肝炎ウイルスあるいは肝臓がんの新規標的や疾患関連因子に対し、本分担者が独自に開発したRaPIDシステムを駆使し、特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指す。

倫理面への配慮を特に必要ないが、全てP2レベルで実験は行っている。また、共同研究者が行う動物個体を用いた実験については、所属機関のルールに則って行う。

B. 研究方法

当研究室で独自に開発したRaPID(Random non-standard Peptide Integrated Discovery)システムを駆使し、翻訳系を用いて特殊ペプチドを合成、薬剤探索にあてた。本計画内で、肝臓がん幹細胞に強発現されているEpCAMに強力に結合する特殊ペプチドリガンドと、HCVがヒト細胞に感染する際に重要に役割を果たすグライコタンパク質E2ならびにClaudinタンパク質に結合する特殊ペプチドを発見し、それらの応用研究を進めることを目指した。

（倫理面への配慮）

本研究は*in vitro*を中心としており、

C. 研究結果

EpCAMに結合する特殊ペプチドリガンドは、1 nM解離定数 K_D をもち、抗体に匹敵するタンパク質選択性をもつことがわかり、蛍光化したペプチドを用いてEpCAM発現肝臓がん細胞を選択的に蛍光染色できることがわかった。さらに、蛍光基の代わりに放射線標識が可能な金属配位子DOTAを付加した特殊ペプチドも合成し、それを用いたマウス個体を用いた癌細胞可視を検討しているところである（金子班長との共同研究）。

グライコタンパク質E2に結合する特殊ペプチドの探索では、感染阻害活性を示す特殊ペプチドの発見に成功し、その詳細な検討を継続中である（脇田研との共同研究）。

Claudinタンパク質に結合する特殊環状ペプチドについては、バキュロ提示による探索（八木・近藤研との共同研究）と細胞を直接用いた探索（深澤研との共同研究）を試み、特殊ペプチドリガンドの発見に成功した。

D. 考察

EpCAM に結合する DOTA 付加特殊ペプチドリガンドについてのマウス個体を用いた初期検討で、溶解性が低いことに起因する非特異的な臓器標識が起きている可能性が示唆された。現在、新たに水溶性を向上させた DOTA 特殊ペプチドを合成し、検討を進めている。E2 結合特殊ペプチドについて、脇田研にて阻害活性のさらなる検討を進めている。Claudin 結合特殊ペプチドに関しては、これまでの単離精製標的を介さない探索技術開発に成功した。先行した Claudin-4 結合ペプチドに関しては、可逆的あるいは不可逆的にタイトジャンクション開閉を促進する機能をもつ特殊ペプチドの同定に成功しており、今後の応用展開が期待できる。Claudin-1 結合ペプチドについては今後も検討を継続する予定である。

E. 結論

RaPID システムを用いた特殊ペプチド探索技術により、これまで低分子化合物では標的にすることのできなかつた膜蛋白質を標的とした薬剤探索の可能性を拓いた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) C. J. Hipolito, H. Suga “Ribosomal production and in vitro selection of natural product-like peptidomimetics: The FIT and RaPID systems” **Current Opinion in Chemical Biology** 16 196-203 (2012)
- 2) Y. Hayashi, J. Morimoto, H. Suga “In vitro selection of anti-Akt2 thioether-macrocylic peptides leading to isoform-selective inhibitors” **ACS Chemical Biology** 7, 607-613 (2012)
- 3) K. Iwasaki, Y. Goto, T. Katoh, H. Suga “Selective thioether macrocyclization of peptides having the N-terminal 2-chloroacetyl group and competing two or three cysteine residues in translation” **Organic & Biomolecular Chemistry** 10, 5783-5786 (2012)
- 4) Y. Goto, T. Katoh, H. Suga “Flexizymes for genetic code reprogramming” **Nature Protocols** 6, 779-790 (2011)
- 5) T.-J. Kang, Y. Hayashi, H. Suga “Synthesis of a Backbone-cyclic Peptide SFTI-1 Promoted by the Induced Peptidyl-tRNA Drop-off” **Angewandte Chemie International Edition** 50, 2159-2161 (2011)
- 6) Y. Yamagishi, I. Shoji, S. Miyagawa, T. Kawakami, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga “Natural product-like macrocyclic N-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin ligase uncovered from a ribosome-expressed de novo library” **Chemistry&Biology** 18, 1562-1570 (2011).
- 7) T. Katoh, Y. Goto, S. Raza, H. Suga “Ribosomal synthesis of backbone

- macrocyclic peptides” **Chemical Communication** 47, 9946-9958 (2011).
- 8) J. Morimoto, Y. Hayashi, K. Iwasaki, H. Suga “Flexizymes: Their evolutionary history and the origin of catalytic function” **Accounts of Chemical Research** 44 (12), pp 1359–1368 (2011).
- 9) Y. Ohshiro, E. Nakajima, Y. Goto, S. Fuse, T. Takahashi, T. Doi, H. Suga “Ribosomal synthesis of backbone-macrocyclic peptides containing γ -amino acids”, **ChemBioChem** 12, 1183-1187 (2011)
- 10) G. Hayashi, Y. Goto, H. Suga “Ribosome evolution for two artificial amino acids in *E. coli*” **Chemistry&Biology** 17, 320-321 (2010)
- 11) 「RaPIDシステムによる特殊ペプチド薬剤の探索」飯田健夫・菅裕明 フロンティア22：生命現象を理解する分子ツール（化学同人）71-76（2010）
- 12) 「擬天然物特殊ペプチドのプログラム合成と応用」樋口岳、菅裕明 有機合成化学協会誌 68, 217-227（2010）
- 13) 「特殊環状ペプチドの翻訳合成と医薬品探索への展開」林剛介、大城幸紀、菅裕明 生化学 6, 505-514（2010）
- 14) 「RaPIDシステムが拓く新創薬戦略」後藤佑樹、伊東利紗、菅裕明 MEDCHEM NEWS No.4 26-31（2010）
2. 学会発表
- 1) Hiroaki Suga 「The nontraditional peptide therapeutics」 AACR Annual Meeting, Chicago, IL USA; 3.31.2011-4.4. 2012
- 2) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Natural Product-Like Peptides against Therapeutic Targets」 Asia TIDES Oligonucleotide and Peptide Research, Technology and Product Development, Las Vegas, NV USA; 5.20-5.23. 2012
- 3) Hiroaki Suga 「Non-Traditional Peptide Therapeutic Leads」 Colby-Sawyer College New London, NH USA; 8.5-8.10. 2012
- 4) Hiroaki Suga 「RaPID system: A new discovery tool of natural product-like peptides from de novo libraries」 3rd International Symposium on DNA-encoded chemical libraries, Zurich, Switzerland; 8.20. 2012
- 5) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 EFMC-ISMC 2012 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry, Berlin, Germany; 9.2-9.6. 2012
- 6) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 ICCP2012-International Conference on Circular Proteins, Heron island, Australia; 10.14-10.17. 2012
- 7) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 13th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Bangkok, Thailand; 11.25-11.27. 2012
- 8) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 13th Tetrahedron Symposium, Taipei, Taiwan; 11.27-11.30. 2012

- 9) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 Flexizyme, FIT and RaPID: The enabling technologies for probes discovery, Olmué, Chile; 12.2-12.6. 2012
- 10) Hiroaki Suga 「Genetic Code reprogramming」 PepTalk Cambridge Health Institute, Boston, USA; 5.9.2011
- 11) Hiroaki Suga 「Genetic Code reprogramming」 European Protein Society Meeting, Stockholm, Sweden, European Protein Society; 5.25.2011
- 12) Hiroaki Suga 「Genetic Code reprogramming」 22nd Enzyme Mechanisms Conference, Jan 2-6th, 2011, Florida, USA
- 13) Hiroaki Suga 「Genetic Code reprogramming」 International RNA Society Meeting, Kyoto, Japan, RNA Society; 6.15.2011
- 14) Hiroaki Suga 「Genetic Code reprogramming」 The 11th Tetrahedron Symposium "Frontiers in Organic and Bioorganic Chemistry", Sitage-Barcelona, Spain; 6.22.2011
- 15) Hiroaki Suga 「Genetic Code reprogramming」 American Peptide Conference, San Diego, USA, American Peptide Society; 6.27.2011
- 16) Hiroaki Suga 「Genetic Code reprogramming」 5th International Symposium on Advancing the Chemical Sciences on Challenges in Chemical Biology, Manchester, Royal Chemical Society, UK; 7.27.2011
- 17) Hiroaki Suga 「Genetic Code reprogramming」 Aminoacyl-tRNA Synthetase Meeting 2011, Snowbird, Salt Lake City, USA; 9.25.2011
- 18) Hiroaki Suga 「Genetic Code reprogramming」 The 9th Australian Peptide Conference, Hamilton Island, Australia; 10.16.2011
- 19) Hiroaki Suga 「Genetic Code reprogramming」 The 36th International Symposium of Nucleic Acid Chemistry, Sapporo, Japan; 11.9.2011
- 20) Hiroaki Suga 「Genetic Code reprogramming」 International Symposium of Nagoya Global COE on Elucidation and Design of Materials and Molecular Functions, Nagoya, Japan; 11.30.2011
- 21) Hiroaki Suga 「Genetic Code reprogramming」 The 34th Annual Meeting of Japanese Society of Molecular Biology "Leading Edge Lecture", Yokohama, Japan; 12.13.2011
- 22) Hiroaki Suga 「Genetic Code reprogramming」 PacifiChem, Dec 16-20th, 2010, Honolulu, USA
- 23) Hiroaki Suga 「Genetic Code reprogramming」 5th International Peptide Symposium, Dec 4-9th, 2010, Kyoto, Japan
- 24) 菅裕明 「特殊ペプチド創薬」第29回メ
ディシナルケミストリーシンポジウム
Nov 17, 2010, 京都
- 25) 菅裕明 「特殊ペプチド創薬」日本RNA
学会年会, July 27th, 2010, 東京
- 26) 菅裕明 「特殊ペプチド創薬」万有シン
ポジウム仙台, June 5th, 2010, 仙台

27) 菅裕明 「特殊ペプチド創薬」 日本分子
生物学会春期シンポジウム, June 7th,
2010, 松島

28) Hiroaki Suga 「 Genetic Code
reprogramming」 Annual Meeting of the
American Society for Biochem. and Mol.
Biol., Apr 24-28th, 2010, Anaheim, USA

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）
分担研究報告書

C型肝炎ウイルス産生に関する宿主因子の探索

深澤 征義 国立感染症研究所細胞化学部 室長

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）産生に関する宿主因子については依然不明のものも多い。HCV生活環の特徴として細胞内脂肪滴や脂質ラフトといった脂質と密接に関連した部位が重要な役割を果たしていることがわかっており、これまでに宿主細胞内脂肪滴に注目し、HCV感染・非感染培養細胞の脂肪滴画分の比較プロテオーム解析を行ってきた。それらの解析から、C14orf166がウイルス産生に重要であること、IMP1、IMP3がHCV産生に阻害的に働くことを新たに見出した。また、比較メタボローム解析によりHCV持続感染細胞にてコリン含量が顕著に上昇していること、細胞外からのCTL1を介したコリンの取り込みがHCV産生に重要であることも明らかとした。一方、遺伝学的手法を用いた探索も進めた。ヒトshRNAレンチウイルスライブラリーを導入したヒト肝細胞群を樹立し、これを親株としてHCV耐性宿主変異株の分離を行った結果、PI4KIII α 、MafB等の欠損株が分離され、これら分子のHCV生活環への関与が明らかとなった。以上の検討から見出された各宿主因子の抗HCV創薬標的としての可能性を今後さらに検討していきたい。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は本邦における肝硬変、肝がん発症の主要リスク要因であり、治療を目指した抗HCV対策が強く求められている。HCV産生に関する宿主因子は抗HCV薬標的として有用と考えられるが、依然として未解明のものも多い。我々は2つのアプローチにより、創薬標的となり得る宿主因子の同定を目指した研究を行った。一つは網羅的解析手法を駆使した方法である。細胞内脂肪滴や脂質ラフト、網状膜構造といった脂質と密接に関連した部位がHCV生活環に重要な役割を果たしていることがわかってきており、これら脂質

関連部位に特に注目し、プロテオミクス的手法によりHCV産生に関する宿主因子を探索した。また、脂質関連代謝物に注目しメタボローム解析の手法・結果を利用した検討も行った。もう一つは、遺伝学的手法を用いる方法である。shRNAライブラリーを導入した宿主細胞を用いてスクリーニングを行い、HCV生活環に関する宿主因子の同定を試みた。以上の検討により同定した宿主因子について、さらに詳細な検討を行い、最終的には治療・創薬における標的として提示したいと考えている。

B. 研究方法

(1) HCV感染・非感染培養細胞由来脂肪滴画分の比較プロテオーム解析

HCV感染・増殖能が非常によいことが知られる肝細胞株Huh7.5.1細胞を宿主細胞として用いた。HCV感染はHCV-JFH1株を用いた(以下、その他の検討でもすべて本株を用いている)。HCV感染後、全ての細胞が感染していることは、HCVコア蛋白質抗体を用いた細胞蛍光抗体染色により確認した。HCV感染/非感染細胞より、超遠心分離法等を用い脂肪滴画分を分離・精製した。脂肪滴の精製度は、各オルガネラマーカー抗体を用いたイムノブロットにより確認した。脂肪滴画分から脂質を有機溶媒により脱脂し、トリプシン限定分解後、直接LC-MS/MSで網羅的に蛋白質を同定した。同定蛋白質の脂肪滴画分における存在を確認するために各蛋白質のイムノブロット及び、細胞蛍光抗体染色を行った。

(2) 同定蛋白質のHCV感染・増殖に対する影響の解析

一過性感染実験にはHuh7.5.1細胞を用いた。感染はHuh7.5.1細胞にHCVを37°C、2時間感染することにより行った。HCV持続感染細胞はHuh7(FVC)細胞にHCV-JFH1株を感染し2週間以上長期培養したものを用いた。培養器はコラーゲンコート24あるいは48穴プレートを用いた(以下、その他の検討でも同様)。同定蛋白質のノックダウンは市販のステルスsiRNAを用い、各蛋白質につき3種のコンストラクトで行った。細胞への処理はlipofectamine RNAiMAXを用い20nMで感染前後に培地へ2回添加することにより行った。各蛋白質の発現量は

各抗体を用いた細胞画分のイムノブロットにより確認した。ウイルス産生能の測定は、経時的に培養液中のHCVコア蛋白質量をELISAで定量することにより行った。また、細胞中のウイルス蛋白質(コア蛋白質及びNS3)およびRNA量もイムノブロットあるいはqRT-PCRにより測定した。

(3) メタボローム解析

Huh7(FVC)細胞とこれにHCV-JFH1株を持続感染させた細胞株を用い、常法に従い比較メタボローム解析を行い、HCV感染の有無で発現量に大きな差がある因子を同定した。

(4) コリン除去、コリン輸送阻害剤、コリン輸送蛋白質ノックダウンによるHCV感染・増殖への影響の解析

感染実験のための宿主細胞はHuh7.5.1細胞を用い、感染はHCVを37°C、2時間処理することにより行った。また、Huh7.5.1細胞にHCVを持続感染させた細胞も用いた。コリン除去培地の作製は(株)細胞科学研究所に依頼した。通常培地(10%FCS/DMEM/penicillin/streptomycin/non-essential amino acids)、コリン除去培地、コリン除去培地にコリンを添加した培地を用いて、各条件にて培養した細胞のHCV産生を検討した。コリン輸送阻害剤にはHemicholinium-3を用いた。各濃度(100-400 μ M)にて感染3日前からの処理を行った。コリン輸送蛋白質のノックダウンは市販のステルスsiRNAを用いて常法に従い行った。また、各種コリントランスポーター(CTL1, OCT1, OCT2, CHT1)の発現量の測定にはqRT-PCR法を用いた。

(5) HCV感染細胞におけるコリン代謝の

解析

HCV 持続感染細胞、非感染細胞の培地中に放射標識コリン ($[^{14}\text{C}]$ choline) を添加し、細胞に取り込まれたコリンの代謝変動を常法に従い解析した。

(6) shRNAライブラリを用いたHCV生活環に関与する宿主因子の遺伝学的スクリーニング

shRNA ライブラリはヒト 47,400 遺伝子に対する 200,000 ターゲット shRNA を含むレンチウイルス shRNA ライブラリを用いた。宿主細胞にはヒト CD81 および Claudin1 を過剰発現した Huh7.5.1 細胞を用いた。本ライブラリを含むレンチウイルスを宿主細胞に $\text{MOI}=0.5$ で感染させ、puromycin で選択することで遺伝子ノックダウン細胞ライブラリを構築した。

スクリーニングは、以下のように行った。本細胞ライブラリに HCV を高用量 ($\text{MOI}=50$) で 10 日おきに 2 回感染させた後、生き残る細胞 (HCV 感染しない細胞) を分離した。本細胞に導入された shRNA 由来配列の同定は、ゲノム PCR 増幅・増幅断片のクローニング・配列決定により行った。同定因子の HCV 生活環への関与の確認には、各同定 shRNA を導入した宿主細胞を改めて樹立し利用した。HCV 感染による細胞変性効果を XTT アッセイにより観察し、HCV 産生能については、(2) で述べた方法により行った。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト臨床材料・実験動物等を直接用いていない。そのために倫理面での問題はない。

C. 研究結果

(1) HCV感染・非感染培養細胞由来脂肪滴画分の比較プロテオーム解析

HCV感染・非感染培養細胞の脂肪滴画分より計118種類の宿主蛋白質を同定した。HCV由来蛋白質ではコア蛋白質のみが同定された。脂肪滴の主要蛋白質であるADRPは感染細胞脂肪滴画分で相対的に少ないことがわかった。感染細胞特異的に脂肪滴に局在する蛋白質として、12種類の蛋白質が同定された。ほとんどがRNA結合能を有する分子であった。

(2) 同定蛋白質のHCV感染・増殖に対する影響の解析

感染細胞脂肪滴特異的に同定された蛋白質群について遺伝子ノックダウンを行い、HCV産生への影響を検討した。HCV産生の低下が、従来より報告のあったDDX3の遺伝子ノックダウンで見られたのみならず、C14orf166ノックダウンでも見られた。一方、IMP1及びIMP3では、遺伝子ノックダウンによりHCV産生が有意に上昇することがわかった。IMP1/3ダブルノックダウンでは相加的効果を示すこともわかった。よって、IMP1及びIMP3の(過剰な)存在はHCV産生に阻害的に働くことがわかった。以上の結果から、HCV感染により脂肪滴に局在するようになるRNA結合蛋白質にはHCV産生に対して正負両方の作用を有する分子が含まれることが明らかとなった。

(3) メタボローム解析

Huh7 (FVC) 細胞とこれにHCV-JFH1株を持続感染させた細胞株を用い、比較メタボローム解析を行った結果、HCV感染により

最も発現量が上昇する (8.3倍) 分子としてコリンが同定された。

(4) HCV 感染・増殖に対するコリン除去、コリントランスポーター阻害剤、コリントランスポーターノックダウンの影響の解析

Huh7.5.1 細胞を感染前後の各段階においてコリン除去培地で処理し、HCV 産生を検討した結果、感染前・中・後すべての期間コリン除去培地で処理した場合が最も HCV 産生低下が大きかったが、どの段階の処理でも HCV 産生阻害が有意に認められた。また、本条件下でのコリン除去培地による処理では細胞増殖には全く影響がなかった。さらに、コリン除去培地にコリンを添加し、コリン含量を戻すと HCV 産生の回復が見られた。以上の結果から、培地中のコリンが HCV 産生の各段階に重要であることが明らかとなった。HCV 持続感染細胞においてもコリン除去培地で培養することにより HCV 産生 (特に HCV 分泌) が大きく抑制されることが明らかとなった。

続いて、コリントランスポーター阻害剤である Hemicholinium-3 の HCV 産生に対する効果を検討した。その結果、薬剤の用量依存的に有意な HCV 産生阻害が見られた。このとき、細胞増殖への影響は認められなかった。以上の結果から、培地中から細胞内へのコリンの取り込みが HCV 産生に重要であると考えられた。HCV 持続感染細胞においてもコリントランスポーター阻害剤存在下で HCV 放出が大きく抑制されることも明らかとなった。

そこで、コリントランスポーターの検討を行った。まず、Huh7 細胞および

Huh7.5.1 細胞における各種コリントランスポーターの mRNA 発現量を測定した結果、CHT1 は検出限界以下であり、OCT2<OCT1<<CTL1 の順に発現が見られた。CTL1 は OCT2 に比べ 100 倍以上の発現量であり、CTL1 がこれら肝細胞における主要なコリントランスポーターであることがわかった。

次に、肝細胞で発現が見られたコリントランスポーター分子 (CTL1, OCT1, OCT2) を siRNA でノックダウンさせたときの HCV 産生を検討した結果、CTL1 siRNA 処理のみで有意な HCV 産生阻害が見られた。以上の結果から、CTL1 を介した培地中から細胞内へのコリンの取り込みが HCV 産生に重要であることが強く示唆された。

(5) HCV 持続感染細胞におけるコリン含有脂質の代謝

HCV 持続感染細胞、非感染細胞における放射標識コリンを用いた代謝標識実験を行った結果、持続感染細胞では、コリンの細胞内への取り込みは大きな変化が見られず、コリン含有リン脂質であるホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンへのコリンの取り込みが有意に低下していた。以上の結果から、コリン含有脂質の代謝が、HCV 感染細胞では有意に変動している可能性が考えられた。

(6) HCV 生活環に関与する宿主因子の遺伝学的スクリーニング

“研究方法”に従い、shRNA ライブラリを導入した宿主細胞を用いて、HCV に耐性を示す (死なない) 細胞をスクリーニングした。分離された細胞群から、導入されていた shRNA コンストラクトを 10 種類以上同定

した。同定された個々のshRNAを導入した宿主細胞を樹立し、HCV感染による細胞変性効果を確認した。特に有意にHCV耐性を示すことが確認できたものは、PI4KIII α (phosphatidylinositol-4-kinase III α)、MafB (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B)、INSL4 (insulin-like 4 protein)の3つの各shRNAを導入した細胞だった。さらに、これら遺伝子ノックダウン細胞でHCV産生を検討した結果、上記3種の細胞でHCV産生が有意に低下していることも確認された。以上の結果から、PI4KIII α 、MafB、INSL4が、HCV産生に関与していることが強く示唆された。

また、本研究過程で importin β 遺伝子をノックダウンすることでHCV産生が顕著に上昇することも見だし、特許を出願した。

D. 考察

脂肪滴の主要(構造)蛋白質である ADRP は感染細胞脂肪滴画分で相対的に有意に少なく、この結果は以前我々が行ったHCVコア蛋白質のみを発現した肝細胞由来の脂肪滴画分での結果 (*J. Biochem.* 139, 921, 2006) と同じ傾向を示した。HCV コア蛋白質は脂肪滴に局在することから、感染細胞においても本現象にHCV コア蛋白質の関与が考えられ、脂肪滴の構造・代謝に大きな影響を与えていることが示唆される。

感染細胞特異的に脂肪滴に局在する蛋白質として 12 種類の蛋白質が同定され、多くのものがRNA代謝に関わるもので興味深い。これらの分子には、HCV産生に対して正負両方の作用を持つものが存在し、HCV

RNA複製や粒子形成(HCVゲノムRNAパッケージング)あるいはHCV RNA分解系への関与が想定される。

今回同定されたC14orf166は、RNA polymerase IIの正の制御因子 (*J. Mol. Biol.* 362, 887, 2006) であると報告されており、RNAウイルスであるHCVの生活環においてRNA代謝関連過程(RNA複製など)に関与している可能性がある。また、本分子がインフルエンザウイルスpolymeraseと相互作用し、複製に必要であるとの興味深い報告もある (*J. Virol.* 85, 12062, 2011)。さらに、ある種のがんで高発現 (*FEBS Lett.* 566, 162, 2004; *Int. J. Cancer* 124, 1614, 2009) しているとも言われ、病原性との関連も予想される。C14orf166分子はHCVコア蛋白質と相互作用することが報告され (*J. Proteome Res.* 10, 4522, 2011)、HCV感染細胞脂肪滴にはHCVコア蛋白質が局在することから、C14orf166分子はHCVコア蛋白質との相互作用を介して脂肪滴画分にリクルートされている可能性も考えられた。

HCV持続感染/非感染細胞を用いた比較メタボローム解析から、持続感染細胞におけるコリンの細胞内蓄積が見出された。本結果に基づき様々な検討を行ったところ、培地からコリンを除去することでHCV産生が強く抑制されることを発見した。さらにこのコリンの取り込みにはコリントランスポーターCTL1が関与していることも明らかとなり、CTL1を介したコリンの取り込み系を標的とした新規抗HCV創薬の可能性を示すことができた。

また、細胞内コリン含有脂質代謝を検討

した結果、HCV持続感染細胞でコリン含有脂質へのコリンの取り込みが低下していることが明らかとなった。脂質代謝の観点から考えると、HCV感染細胞では一種のコリン欠乏状態を呈していると言えるかもしれない。これまでの様々な報告から、コリン欠乏状態では脂肪肝(細胞内脂肪滴の蓄積)が見られることや、発がんが誘導されることが示されている。HCV感染により脂肪滴が誘導されることや、HCV生活環に脂肪滴が必須であること、さらには発がんとの関連についても、HCV感染によるコリン代謝の変動で一部分説明ができる可能性があり、大変興味深い。

今回行ったHCV耐性を指標としたスクリーニング法を用い、我々はこれまでにHCV生活環に必須であるCD81やClaudin1等が欠損した宿主細胞変異株の分離に成功しており、本スクリーニング法は簡便かつ非常に有用な方法と考えている。shRNAライブラリを用いた本研究においても実際に複数のHCV生活環に関与する因子のノックダウン株が分離され遺伝子を同定することができた。同定された因子のうち、PI4KIII α は、HCV NS5Aと相互作用し(JBC 286, 11290, 2011)、その相互作用がHCV複製(複合体形成)に重要(Cell Host & Microbe, 9, 32, 2011)であることが最近他のグループより報告された。MafBはインターフェロン β の発現を抑制する因子として報告されており(Nature Immunology 11, 2010)、HCV産生に有利に働く可能性が予想される。INSL4は、乳がんとの相関の可能性について報告はあるが、機能未知の蛋白質である。今後、これら同定宿主因子の抗HCV薬標的

としての有用性をさらに検討したい。

E. 結論

宿主細胞内でのHCV生活環において、特徴的な脂質構造が重要な役割を果たしていることが強く示唆されている。HCV感染培養細胞及び非感染細胞の脂肪滴蛋白質のプロテオーム解析を行い、特に、感染細胞特異的に脂肪滴に局在する蛋白質として12種類の蛋白質を同定した。興味深いことにその多くがRNA結合能を有するものであり、HCV産生に正負両方の作用を有する分子が含まれていた。HCV持続感染細胞を用いたメタボローム解析の結果に基づき、細胞内コリンの蓄積に注目した検討も行った。広範な検討から、細胞外から細胞内へのコリンの取り込みが、HCV産生に必要であること、Huh7.5.1細胞においてはコリン輸送蛋白質CTL1を介したコリンの細胞内への取り込みが重要であることを明らかとした。また、shRNAライブラリを用いた宿主因子の遺伝学的スクリーニングにより、PI4KIII α 、MafB、INSL4がHCV産生に関与することも見出した。HCV生活環を理解する上でこれら分子の機能は大変興味深くさらに詳細に解析していく必要があり、今後の創薬研究に結びつけていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murakami, Y.; Fukasawa, M.; Kaneko, Y.; Suzuki, T.; Wakita, T.; and Fukazawa, H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple

- steps of the virus lifecycle. *Microbes and Infection*, 2013, 15, 45-55
- 2) Arnaud, N.; Dabo, S.; Akazawa, D.; Fukasawa, M.; Shinkai-Ouchi, F.; Hugon, J.; Wakita, T.; Meurs, E.F. Hepatitis C Virus Reveals a Novel Early Control in Acute Immune Response. *PLoS Pathogens*, 2011, 7, e1002289, 1-17
- 3) Yamamoto, M.; Aizaki, H.; Fukasawa, M.; Teraoka, T.; Miyamura, T.; Wakita, T.; Suzuki, T. The structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.*, 2011, 92, 2082-2087
2. 学会発表
- 1) 深澤征義、Claudin 1を標的としたC型肝炎ウイルス感染阻害、日本薬学会第133年会、横浜、2013
- 2) 白砂圭崇、齋藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、千葉丈、安部良、深澤征義、高感染能を有するHCV JFH-1適応変異株の性状解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012
- 3) Masayoshi Fukasawa, Ryo Anai, Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami, Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Jo Chiba, Kentaro Hanada., Isolation and characterization of a mutant hepatitis C virus adapted to mouse CD81, The 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Venice, Italy, 2012
- 4) Masayoshi Fukasawa, Ryo Anai, Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami, Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Jo Chiba, Kentaro Hanada, Isolation of a hepatitis C virus mutant adapted to mouse CD81 in hepatic cell culture system, The 51th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Denver, USA, 2011
- 5) 齊藤恭子、鈴木哲朗、相崎英樹、花田賢太郎、脇田隆字、西島正弘、深澤征義、培養細胞およびヒト肝キメラマウスのC型肝炎ウイルス感染モデルを用いたスクアレン合成酵素阻害剤の抗ウイルス効果の解析、第84回日本生化学会大会、京都、2011
- 6) 前濱朝彦、深澤征義、伊達朋子、脇田隆字、花田賢太郎、イノシトールリン脂質によるC型肝炎ウイルス増殖の制御、第84回日本生化学会大会、京都、2011
- 7) Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami, Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Jo Chiba, Masayoshi Fukasawa, Isolation and characterization of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations, IUMS2011, Sapporo, 2011
- 8) Hideki Aizaki, Yoshihiro Matsumoto, Koji Goto, Kooichi Watashi, Ryosuke Suzuki, Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada Shigeko Sato, Nobuhiro Takahashi, Yoshiharu Matsuura, Kiyoto Motojima, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are

- involved in HCV production, The 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011
- 9) Masayoshi Fukasawa, Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami, Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Ryosuke Suzuki, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Jo Chiba, Isolation of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations, The 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011
- 10) 齋藤恭子、鈴木哲朗、相崎英樹、花田賢太郎、脇田隆字、西島正弘、深澤征義、スクワレン合成酵素を標的としたC型肝炎ウイルス産生阻害、第53回日本脂質生化学会、東京、2011
- 11) 深澤征義、C型肝炎ウイルス感染とタイトジャンクション構成蛋白質、日本薬学会第131年会、静岡、2011
- 12) Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami, Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Jo Chiba, Masayoshi Fukasawa, Isolation of highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in hepatic cell culture system, The 50th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Philadelphia, USA, 2010
- 13) 白砂圭崇、齋藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、西島正弘、深澤征義、感染増殖能が上昇したC型肝炎ウイルス変異株の分離と性状解析、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010
- 14) Kyoko Saito, Tetsuro Suzuki, Hideki Aizaki, Kentaro Hanada, Takaji Wakita, Masahiro Nishijima, Masayoshi Fukasawa, Inhibition of cellular squalene synthase impairs hepatitis C virus proliferation in cultured cells, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Tokyo, 2010
- 15) Isei Tanida, Masayoshi Fukasawa, Takaji Wakita, Kentaro Hanada mTor-signaling pathway and autophagy in *in vitro* naïve HCV-particle infection system, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Tokyo, 2010
- 16) Noella M. Arnaud, Stephanie J. Dabo, Patrick Mailard, Agata Budkowska, Katerina I. Kalliampakou, Penelope Mavromara, Dominique Garcin, Jacques Hugon, Anne Gatignol, Fumiko Shinkai-Ouchi, Masayoshi Fukasawa, Daisuke Akazawa, Takaji Wakita, Eliana F. Meurs, Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Tokyo, 2010
- 17) Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada, Masahiro Nishijima, Isolation and characterization of a mammalian cell mutant defective in lipid droplet biogenesis, FASEB Summer Research Conference, Lipid Droplets: Metabolic Consequences of