

201227007A

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

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の
解明と新規治療法開発に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆宇

平成25（2013）年 3月

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

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の 解明と新規治療法開発に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発の総括 1
脇田 隆宇

II. 分担研究報告

1. 肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発の総括 23
脇田 隆宇
2. 患者由来 HCV の感染増殖に機能する肝細胞因子の解析 29
土方 誠
3. HBV 増殖機構の解析と新規治療法の開発 33
田中 靖人
4. HCV 蛋白質に相互作用する宿主蛋白質の感染における役割 37
森石 恆司
5. 宿主・ウイルスを標的とした抗ウイルス薬剤の大規模スクリーニング . 41
坂本 直哉
6. 強力な HCV 阻害活性を示す微生物生産物由来の低分子化合物の同定とその
作用機構の解析 47
武部 豊
7. 脂質代謝を標的とする HCV 治療法の開発 53
池田 正徳
8. HBV pseudotype の作製と HBV 感染受容体同定への応用に関する研究 . 57
上田 啓次
9. 抗菌ペプチドによる抗 HCV 作用の検討 59
加藤 孝宣

10. 肝炎ウイルス増殖を抑制する新規治療薬候補物質の探索と作用機序の解明に関する研究	63
萩原 正敏	
11. HCV 感染モデル動物の開発	67
三浦 直行	
12. ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の解析	69
八木 清仁	
13. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の C 型肝炎ウイルス研究への応用	75
水口 裕之	
14. HBV 増殖系及び HEV 培養系による新規抗ウイルス療法の探索	85
清原 知子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	89
IV. 研究成果の刊行物・別冊	95

I . 総括研究報告

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究

研究代表者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

研究要旨 肝炎ウイルス感染症は我が国における最も重要な疾患のひとつであり、その対策については社会的要請もあり、迅速に進める必要がある。HCV感染に対する治療はインターフェロンとリバビリンの併用により改善してきたが、未だに不十分である。一方HBV感染では、ラミブジンなど核酸アナログ剤による抗ウイルス療法の導入により治療法が大きく変化した。核酸アナログ剤の長期投与によりHBVキャリアの肝癌発生率は低下する。しかし、長期間にわたる治療が必要であり、HBV排除は容易に達成できない。さらに薬剤耐性ウイルスの出現およびそのコントロールが問題である。また、人獣共通感染症としてのE型肝炎ウイルス（HEV）感染症が問題となってきた。特に老人における感染の中には重症化・劇症化する場合がある。これらの肝炎ウイルスに関する問題点を解決するためには、新たな治療薬の開発が必要である。そのために肝炎ウイルスの感染複製増殖過程の解明に寄与する研究を遂行する。

研究分担者 土方 誠
京都大学ウイルス研究所 准教授

研究分担者 田中靖人
名古屋市立大学大学院 教授

研究分担者 森石恒司
山梨大学大学院 教授

研究分担者 坂本直哉
北海道大学大学院 教授

研究分担者 武部 豊
国立感染症研究所 研究員

研究分担者 池田正徳
岡山大学大学院 准教授

研究分担者 上田啓次
大阪大学大学院 教授

研究分担者 加藤孝宣
国立感染症研究所 室長

研究分担者 萩原正敏
京都大学大学院 教授

研究分担者 三浦直行
浜松医科大学医学部 教授

研究分担者 八木清仁
大阪大学大学院 教授

研究分担者 水口裕之
大阪大学大学院 教授

研究分担者 清原知子
国立感染症研究所 主任研究官

A. 研究目的

HCV感染に対する治療はインターフェロンとリバビリンの併用により改善してきたが、未だに不十分であり、新たな抗ウイルス薬の開発による治療効果の改善が望まれている。HBV感染では、核酸アナログ剤の長期投与によりHBVキャリアの肝癌発生率は低下するが、薬剤耐性ウイルスの出現およびそのコントロールが問題である。また、HEV感染では、老人の感染が重症化・劇症化する場合がある。これらの肝炎ウイルスに関する問題点を解決するためには、新たな治療薬の開発が必要である。

本研究では肝炎ウイルス培養系や増殖系を用いて、ウイルス感染増殖過程の解明による新規治療標的の探索と新規肝炎治療法の開発を目的とする。HCVにはウイルス培養系が開発され、ウイルスライフサイクルの各過程を標的とする

ことができる。このウイルス培養系を利用してHCVの感染増殖複製過程を詳細に解析し、関与する宿主因子を同定して、新たな治療標的を同定する。さらに、HCV感染レセプターが明らかとなり、レセプター導入トランスジェニックマウスによる新規感染動物モデルを開発し、治療薬開発に役立つ。HBVは感染レセプターの同定を含めて、HBVの新たな感染実験系の開発を実施する。さらに、HBV、HCVともにハイスループット実験系を構築して低分子化合物ライブラリーによる抗ウイルス薬のスクリーニングを進め、同定した化合物の作用機序、標的の解析を進める。HEVも最近ウイルス培養系が確立された。このHEVのウイルス培養系を用いた抗ウイルス薬の開発を進める。また、ヒトiPS細胞の肝細胞分化誘導法が開発され、従来不可能とされていた薬物代謝酵素活性を有する肝細胞分化誘導条件を確立されつつある。この技術により、肝炎ウイルス感染増殖が成立する肝細胞分化誘導状態を特定し、関与する宿主因子を網羅的に解析する。

B. 研究方法

1. 遺伝子型 2a の新規 HCV レプリコンおよび感染性クローンの樹立と解析 (脇田)

心臓手術後に劇症肝炎を発症した症例の血清からウイルス遺伝子を分離し、JFH-2 株と命名した。JFH-2 サブジェノミックレプリコン構築から RNA を合成し、Huh7 細胞に導入し、G418 による薬剤選択培養し、コロニー形成を確認した。レプリコンゲノム配列を決定し、変異の有無を確認した。最も複製効率増強効果の高かった適合変異 (2217AS) を全長遺伝子に組み換えた。全長のウイルス RNA を合成して Huh7.5.1 細胞に導入して、細胞の経代を約 4 ヶ月間継続した。

2. 患者由来 HCV の感染増殖に機能する肝細胞因子の解析 (土方)

感染性 HCV 粒子産生のどの過程においてトロンボキサン₂ (TXA₂) 合成酵素 TXAS が関与するのかを以下の 3 点について解析した。i. TXAS 阻害剤 Ozagrel で処理した細胞の培養上清中の HCV 粒子の

浮遊密度をショ糖密度勾配超遠心法で解析し、感染性粒子を検出した。ii. Ozagrel で処理した細胞内における HCV core タンパク質や NS5A タンパク質の脂肪滴局在を間接蛍光個体法を用いて検討した。iii. Ozagrel で処理した細胞内における感染性 HCV 粒子産生量を検討した。TXAS がどのように感染性粒子産生に関与するのかを明らかにするために、TXAS の産物である TXA₂ の効果を TXA₂ 受容体 (TP) に対するアゴニストおよびアンタゴニスト等を JFH1 感染性粒子産生系に作用させ、感染性 HCV 粒子産生について解析した。

3. FKBP8 あるいは新規標的因子に対する抗 HCV 剤開発の試み (森石)

遺伝子型 1b の O 株と N 株のサブゲノムレプリコン細胞を用いて、FKBP の解析を行った。RNA 干渉によって FKBP の発現を抑制しレプリコン RNA にコードされているルシフェラーゼの活性によってレプリコン RNA の複製を評価した。JFH1 ウイルス感染 Huh7 OK1 細胞の細胞内外のウイルス RNA 量を経時的に real-time PCR によって測定した。また、ウイルス蛋白質および宿主蛋白質の相互作用を免疫沈降法により解析した。さらに組換え蛋白質を作製し、直接の結合を解析した。蛍光免疫染色法によってウイルスおよび内在蛋白質を染色し、細胞内局在を解析した。

4. 脂質代謝を標的とする HCV 治療法の開発 (池田)

HCV に対して高い感受性を示す、Li23 細胞を開発するため細胞のサブクローン化を行った。ORL8 細胞の治癒細胞である L8c15 細胞を用いて、限界希釈法により最も感染効率の高いサブクローン化細胞の選択を行った。サブクローン化細胞の選択は、HCV RNA 複製能と ELISA 法による HCV Core の産生量を指標とした。Li23 由来のサブクローン化細胞において感染効率が高い理由を明らかにするために HCV 受容体 (CD81, SR-B1, CLDN1, OCLN および NPC1L1) と miR122 の各細胞における発現レベルを比較検討した。

5. 宿主・ウイルスを標的とした抗ウイルス薬

剤の大規模スクリーニング (坂本)

HCV subgenomic replicon を用いたウイルス増殖抑制化合物のスクリーニング: HCV キメラルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現する HCV-Feo replicon 細胞、および HCV-JFH1 培養系を用いて、HCV 増殖を制御する薬剤・化合物の high-throughput screening (HTS) をおこなった。

蛍光蛋白タグ付加 HCV-JFH1 培養系を用いた解析: JFH-1 株の NS5A 末端へ蛍光蛋白を挿入し、T4290A と C7653T に変異導入することで粒子産生能を保持した蛍光蛋白 YFP 発現 HCV を構築した。この蛍光蛋白発現 HCV 感染細胞の培養上清を濃縮しスクリーニングに使用した。96 well plate に Huh7.5.1 細胞を播種、翌日各種化合物を添加し、その2時間後にウイルス濃縮液を添加した。翌日培地を交換し、5日間の培養後 high content analysis を利用した感染細胞数の定量解析を行った。レプリコンアッセイの結果と照合し、HCV 複製増殖阻害活性は示さないが感染阻害活性を示した化合物を、エントリー阻害剤として抽出した。

6. HCV/HIV-1 阻害剤スクリーニング (武部)

微生物由来の生物活性物質ライブラリー (n~800) を試験化合物としてスクリーニングを進めた。Huh7.5.1 細胞に試験化合物を (最終濃度: 5 μ M) を添加し、10-15分後に HCV (JFH-1) を感染させた。感染から72時間後の培養上清を回収し、ELISA 法によって HCV コアタンパク質量を定量した。陽性コントロールには IFN α を用いた。

一方 HIV-1 阻害剤スクリーニングには、C8166R5 細胞 (CD4/HIV-1 coreceptor CXCR4, CCR5 発現 T 細胞株) と HIV-1 NL432 株を用いた。Assay は HCV 阻害剤スクリーニングに準じて行い、抗 HIV-1 作用は、上清中の逆転写酵素活性を測定した。陽性対照は、既知の逆転写阻害剤 AZT を用いた。

試験化合物存在下および非存在下での HCVpp あるいは HCVpv の Huh7.5.1 細胞への感染性をルシフェラーゼ活性で測定した。陽性対照として、抗 CD81 単クローン抗体を用いた。

7. 肝炎ウイルス増殖を抑制する新規治療薬候補物質の探索と作用機序の解明 (萩原)

増殖ルシフェラーゼ発現 HCV レプリコン細胞を用いて、東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中から、見つかった新たな化合物の作用機序を解明するとともに、JFH-1C 型肝炎ウイルスの増殖抑制活性について検討した。

独自に合成しヘルペスウイルスなど DNA ウイルスの増殖を抑制することが判明している化合物が、B型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性について検討した。

8. ビタミン D が免疫細胞で誘導する抗菌ペプチドの抗 HCV 作用 (加藤)

HuH-7 細胞を抗菌ペプチドで処理し、その後 JFH-1 ウイルスを moi=0.1 で感染させた。感染後3日で培養上清と細胞中の HCV コア抗原量を測定し、抗ウイルス活性を評価した。

HCVpp および HCVcc システムにより、公金ペプチドが HCV 感染に与える影響を評価した。

9. HBV 増殖機構の解析と新規治療法の開発 (田中)

特殊な加工を底面に施した培養プレートにキメラマウス肝細胞を播種してスフェロイドを形成し、3次元培養系を作成した。感染源としては、HBV のウイルス粒子を含む患者血清を用いた。3次元培養系に患者血清を 10⁵ copies/well となるように添加することで感染を成立させ、その後培養上清中の HBs 抗原、HBV DNA、細胞内 HBV core 関連抗原を測定し、HBV 感染・複製を確認した。

10. HBV pseudotype を用いた HBV 感染受容体の分離・同定とその応用 (上田)

作製した HBVpp を用いて、ヒト肝臓 cDNA ライブラリーを用いた感染スクリーニングを実施した。HBV 膜蛋白の受容体リガンドに相当すると考えられる PS1~SSN を大腸菌で発現・精製した。PS1~SSN をプローブとして、HepG2 細胞から付着因子 (感染受容体) の分離・同定を試みた。

11. HBV 増殖系および HEV 培養系による新規抗ウイルス療法の探索 (清原)

HBV: HBV 産生細胞 HepG2 2.2.15 由来のクローン株 #1、#3、#4、#G4 の培養液中に B型肝炎治療

薬であるラミブジンを加え、HBV 産生に及ぼす影響を HBs 抗原、HBc 抗原量でモニターした。ラミブジン濃度は $25 \mu\text{M}$ 、培養期間は 1、3 日を検討した。

HEV:アレキサンダー細胞に HEV-RNA をトランスフェクションし、96 well 組織培養プレートに播種した。直後に薬剤 (LOPAC [SIGMA-ALDRICH]。約 1,300 種類の薬剤を含むライブラリを使用した) を終濃度 $100 \mu\text{M}$ になるように添加し、1 週間培養し、培養液中の HEV 抗原量を ELISA により測定した。HEV 抗原が陰性コントロールと比較して 30%以下になる薬剤は 5 倍階段希釈 (2、10、 $50 \mu\text{M}$) で再度試験を行った。

1.2. HCV 感染モデル動物の開発 (三浦)

CCSO マウス肝細胞の抽出液を作り、4 因子の発現量を Huh7.5.1 細胞のそれとウエスタンブロット法で解析する。また、マウス Cd81, Oc1n やアンチセンス NPC1L1 を Huh7.5.1 細胞に過剰発現をさせて、HCV の細胞内侵入への効果を検討した。

1.3. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製 (水口)

Ad ベクターの作製は improved *in vitro* ライゲーション法により行った。シャトルプラスミドは pHMEF5 を使用した。ヒト ES 細胞株 H9 (WA09) は 5 ng/mL の bFGF を含む霊長類 ES 細胞用培地 (ReproStem) を用いて、マイトマイシン C 処理済みの MEF 上で培養した。ヒト iPS 細胞株 Dotcom は 10 ng/mL の bFGF を含む iPSELLON を用いて、マイトマイシン C 処理済みの MEF 上で培養した。5-7 日ごとに 0.1 mg/mL ディスパーゼ (Roche 社) を用いてヒト ES/iPS 細胞のコロニーを回収後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。

ヒト ES/iPS 細胞から内胚葉への分化誘導は以下の方法で行った。分化誘導開始の 24 時間前に無血清培地 hESF9 で培地交換した。次に、細胞剥離液、Accutase cell detachment solution を用いてヒト ES/iPS 細胞を回収後、 100 ng/mL Activin A および 10 ng/mL bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地を含む 霊長類 ES 細胞用分化誘導基礎培養液である hESF-DIF に懸濁後、 $50 \mu\text{g/cm}^2$ Matrigel でコーティングした細胞培養用マルチプレートに播種したのち、2 日間培養した。

Ad ベクター用いた遺伝子導入によりヒト ES/iPS 細胞由来中内胚葉 (培養 2 日目) から内胚葉への分化誘導を行う場合は、ヒト ES/iPS 細胞を上記の方法で中内胚葉まで培養し、各 Ad ベクター (AdK7-EF-FOXA2) を 90 分間作用させた。

ヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化誘導は以下の方法で行った。分化誘導した内胚葉 (培養 5 日目) を、 0.05% trypsin- 0.053 mM EDTA で細胞を剥離したのち回収し、 100 ng/mL Activin A および 10 ng/mL bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地に懸濁後、 $50 \mu\text{g/cm}^2$ Matrigel でコーティングした細胞培養用マルチプレートに播種した。継代した翌日に Ad ベクター (AdK7-EF-FOXA2、AdK7-EF-HNF1 α) を作用させたのち、 20 ng/mL FGF4、 30 ng/mL BMP4 を含む HCM Hepatocyte Culture Medium に交換した。

ヒト ES/iPS 細胞由来の肝幹前駆細胞から肝細胞への分化誘導は以下の方法で行った。分化誘導した肝幹前駆細胞に各 Ad ベクター (AdK7-EF-FOXA2 および AdK7-EF-HNF1 α) をそれぞれ作用させた後、 10 ng/mL FGF1、 10 ng/mL FGF4、 10 ng/mL FGF10、 10 ng/mL HGF を含む HCM に交換した。その後、上記培地を用いて毎日培地交換を行い、11 日目まで培養した。培養 11 日目に 0.05% trypsin- 0.053 mM EDTA を用いて細胞を剥離したのち回収し、FGF1、FGF4、FGF10、HGF (すべて 10 ng/mL) を含む HCM に懸濁後、 $20 \mu\text{g/cm}^2$ Matrigel でコーティングした日立ナノピラー細胞培養 12 well プレートに播種した。1 日後に Ad ベクター (AdK7-EF-FOXA2 および AdK7-EF-HNF1 α) を作用させた後、 20 ng/mL HGF、 20 ng/mL OsM、 10 ng/mL FGF4、 10^{-6} M DEX を含む HCM を用いて 1 日おきに培地交換を行い、13 日間培養した。分化誘導肝細胞をさらに成熟化させるため、Matrigel を分化誘導肝細胞の上に重層化させた。 0.25 mg/mL Matrigel、 4 mM L-Glutamine、 $50 \mu\text{g/mL}$ gentamycin sulfate、 $1 \times \text{ITS}$ 、 20 ng/mL OsM、 10^{-6} M DEX を含む William's E Medium (以下、Matrigel Working Solution

とする)を4℃で作製した。培養25日目の各wellに対して、1mLのMatrigel Working Solutionを添加し、24時間培養した。培養26日目に余分なWorking Solutionを除去したのち、20ng/mL Osm、 10^{-6} M DEXを含むHCMを用いて1日おきに培地交換を行い、9日間培養した。

各細胞集団からTotal RNAを抽出した。RNase-free DNase Iで処理した後、逆転写反応を行い、cDNAを合成した。定量的リアルタイムPCRによる解析はTaqman gene expression assaysを使用した。

1.4. ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の解析(八木)

HCVシールドウイルス(HCVpv)を使用し、ルシフェラーゼ活性を指標にHCV感染を評価した。ヒトiPS細胞、ヒトiPS-hep細胞およびHuh7細胞にHCVpvを2時間作用させ、24時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。感染阻害実験として抗CD81抗体(JS-81)またはマウスIgGをHCVpvと2時間反応させ、24時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

HCV複製実験にはテトラサイクリン応答性のRNA polymerase I発現カセットに1b型のHCVゲノムを搭載したアデノウイルスベクター(AdP₁235-HCV)を用いた。ヒトiPS細胞、ヒトiPS-hep細胞およびHuh7細胞にテトラサイクリン応答性転写活性化因子をコードしたAd-tTA存在下に、AdP₁235-HCVまたは複製能を欠損させたAdP₁235-DGDDを感染させた。感染24時間後にドキシサイクリン(10mg/ml)を添加し、さらに48時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子

解析に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究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、提供試料、個人情報情報を厳格に管理保存する。

また、ヒト初代培養肝細胞は、京都大学附属病院移植外科においておこなわれた先天性代謝異常症患者への生体肝臓移植において切除された患者肝臓組織を用いて作成されたものである。この研究はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認されたものである。肝臓や血液提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

1. 遺伝子型2aの新規HCVレプリコンおよび感染性クロンの樹立と解析(脇田)

劇症肝炎症例の血清からウイルス遺伝子(JFH-2)を分離した。JFH-2サブジェノミックレプリコン細胞内では 10^7 ~ 10^8 copy/ug total RNAのレプリコンゲノムが複製していた。レプリコンゲノム配列の解析により、NS3遺伝子に4箇所(1109EG, 1547FL, 1614CW, 1651TN)、NS5A遺伝子に5箇所(2195AT, 2217AS, 2222HQ, 2280QR, 2373GS)、NS5B遺伝子に1箇所のアミノ酸変異を伴う変異(2519KN)を見いだした。この中で2217AS変異のみがコロニー形成を6,000倍程度増強した。そこで、2217AS変異をJ6株の構造領域を有する全長遺伝子に導入した。この構築から全長ウイルスRNAを合成してHuh7.5.1細胞に導入し、細胞を4ヶ月間経代培養した。培養液中のコアタンパク質を継続して測定したところ、トランスフェクション直後は200-300fmol/Lに上昇したものの徐々に低下した。しかし、30日以上経代培養を継続するとコアタンパク質濃度は徐々に上昇し、2ヶ月から4ヶ月にかけて、2,000-5,000fmol/Lまで上昇した。培

養液中の感染力価は最終的に 4,000-13,000ffu/ml まで上昇した。培養上清を繰り返し感染後ウイルスゲノムの塩基配列を決定したところ、独立した2つの実験で 2217AS 以外に7カ所および9カ所の変異を同定した。そこでこれらの変異を全長ウイルス遺伝子に組み換えた構築を作成し、合成ウイルス RNA を作成して Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションすると直ちに培養液中にコアタンパク質および感染力価の上昇を認めた。従って、2217AS 以外に7カ所および9カ所の変異は適合変異であると考えられた。

2. 患者由来 HCV の感染増殖に機能する肝細胞因子の解析 (土方)

Ozagrel 未処理あるいは処理した細胞の培養上清を濃縮し、ショ糖密度勾配超遠心法で解析し、各浮遊密度画分における HCV ゲノム RNA 量とその感染性を解析した結果、培養上清に認められる非感染性粒子を含む浮遊密度画分における HCV ゲノム量については、未処理と処理細胞での相違は認められなかった。しかしながら、感染性粒子を含む浮遊密度画分においては HCV ゲノム量が、処理細胞で著しく低下していた。Ozagrel 未処理あるいは処理した細胞内において感染性 HCV 粒子産生に関する脂肪滴への HCV core タンパク質と NS5A タンパク質の局在化について間接蛍光抗体法を用いて解析したが、双方に大きな相違は認められなかった。Ozagrel 未処理あるいは処理した細胞内から凍結融解法を用いて得た HCV 様粒子について、その HCV ゲノム RNA 量と感染性を解析したところ、ゲノム RNA 量は大きな変化はなかったが、感染性が著しく低下していた。JFH1 感染性粒子産生系に TP アンタゴニストを作用させ、感染性粒子産生に対する効果を解析したが、TP アンタゴニストは Ozagrel 同様の効果は示さなかった。JFH1 感染性粒子産生系に Ozagrel を作用させ、同時に TP アゴニストを作用させ JFH1 感染性粒子産生に対する効果を解析したが、感染性 HCV 粒子産生に対する Ozagrel の抑制効果は変化しなかった。

3. FKBP8 あるいは新規標的因子に対する抗 HCV 剤開発の試み (森石)

内在蛋白質 FKBP8 の発現をさせると、遺伝子型 1b の 0 株由来のレプリコン細胞でウイルス複製が抑制された。しかし、同じ遺伝子型 1b である N 株由来のレプリコン細胞株内のウイルス複製低下は認められなかった。N 株由来のレプリコン細胞株で FKBP8 の機能を代替する細胞内因子の存在が考えられた。そこで、FKBP8 と同様の分子ドメインをもつ FKBP4、5、6、cyclophilin40 と NS5A との結合を免疫沈降法によって解析した結果、FKBP6 のみが NS5A と結合した。FKBP6 の発現が低下すると、0 株でレプリコン RNA の複製は低下し、N 株由来のレプリコン細胞株のレプリコン RNA の複製低下は FKBP8 と FKBP6 の両方をノックダウンしなければ低下しなかった。FKBP8 のイソメラーゼ活性を標的にする化合物 DM-CHX をレプリコン細胞へ投与したところ、0 株および N 株由来のレプリコン細胞で、ウイルス複製が有意に抑制された。以上の結果から、FKBP6 はウイルス複製をサポートする宿主因子の一つで、FKBP8 とともにそれらを標的因子とした抗 HCV 化合物開発に繋がること示唆された。

4. 脂質代謝を標的とする HCV 治療法の開発 (池田)

D7 細胞に対する HCV 感染効率は HuH-7 由来の RSc 細胞とほぼ同じレベルであった。HCV 感染 D7 細胞の培養上清中の HCV はナイーブな D7 細胞に再感染し、HCV のライフサイクルが D7 細胞で再現できた。D7 細胞では HCV 受容体のうち CLDN1 の発現レベルが親株の Li23 細胞よりも高かった。また、NPC1L1 と miR122 の発現レベルも D7 細胞では親株の Li23 細胞や HuH-7 細胞よりも高かった。HuH-7 由来の細胞株とは異なる Li23 由来の D7 細胞株を樹立し、JFH-1 株 HCV 感染レポーターアッセイシステムを開発した。親株の Li23 細胞と D7 細胞の宿主因子の発現レベルを比較すると、D7 細胞において HCV 受容体である CLDN1 の発現が高く、また、NPC1K1、miR122 といった HCV の侵入、複製に関わる宿主因子の発現も D7saibou の方が親株の Li23 細胞よりも高かつ

た。このことは、Li23 細胞のサブクローン化の過程で、HCV の感染、複製に適応した細胞クローンが選択されて来たことを示唆しているものと思われる。

5. 宿主・ウイルスを標的とした抗ウイルス薬剤の大規模スクリーニング (坂本)

4046 化合物のうち、細胞毒性を示さずにレプリコン増殖抑制効果を示す化合物を 23 個抽出した。このうち、HCV-JFH1 細胞培養系において HCV 増殖抑制効果を示す化合物を 4 種同定した。これらは HCV-IRES 翻訳活性には影響せず、HCV 増殖を特異的に阻害している可能性が示唆された。同定された 4 種の化合物それぞれと IFN およびプロテアーゼ阻害薬(BILN2061)との併用効果をレプリコン細胞を用いて解析した。IFN との併用では化合物 A が相乗効果、B、C とは相加効果、D とは拮抗効果であった。IFN との併用では化合物 A が相乗効果、B、C とは相加効果、D とは拮抗効果であった。BILN2061 との併用では化合物 B が相乗効果、A、C とは相加効果、D とは拮抗効果であった。細胞内シグナル伝達系に対する効果についての解析では、1 個は NF κ B シグナル経路を活性化することが示され、他の 3 個は既存の IFN や NF κ B を介さない経路により抗 HCV 効果を呈することが示された。High content analysis では、核周囲のウイルス蛋白染色を定量することにより簡便かつ迅速な蛍光蛋白発現細胞数の定量解析に成功した。抗 CD81 抗体を用いたエンتری阻害試験では、70%以上の感染阻害を示した。400 個の低分子化合物をスクリーニングした結果、35 個が 50%以上の感染阻害効果を示し、エンتری過程を阻害している可能性が示唆された。

6. HCV/HIV-1 阻害剤スクリーニング (武部)

全体で約 800 種の低分子化合物ライブラリーの中から、HCV および HIV-1 阻害活性物質として、それぞれ 9 個および 11 個のヒット化合物を得た。同定された HCV 阻害活性物質は、構造的に近縁なそれぞれ 3 個、6 個の 2 グループに分類された。それぞれの群の代表的な化合物を compound X, compound Y と名付けた。Compound Y に代表される第 2 のグループは EC50 が sub nM の極めて強力な抗 HCV 効果を

示す化合物を含む。非常に興味深いことに、compound Y に代表される化合物群は HIV-1 に対しても sub nM オーダーの強力な阻害活性を示し、個々の類縁化合物の抗ウイルス活性は HCV と HIV-1 とで並行関係が見られた。Compound Y は HCV replicon assay では、ほとんど活性を示さないか (genotype 1b: Con1) あるいは弱い活性 (genotype 2a: JFH-1) を示すのみであった。そのため、その主要な作用点は HCV のライフサイクルのおそらく初期過程あるいは後期過程 Late stage にあると推定された。Compound Y が HCV のエンتری過程に作用するかどうかをテストするために HCVpv assay を行ったが、その阻害活性は、control の VSV-G および JEV pseudovirion に対しても見られることから、この強い阻害効果は HCV-E2 に依存しない何らかの非特異的なメカニズムによることが推定された。一方、HCVpp assay では明確な阻害効果を観察できなかった。また、Compound Y は CD81 の細胞表面での発現を 30-80%阻害した。

7. 肝炎ウイルス増殖を抑制する新規治療薬候補物質の探索と作用機序の解明 (萩原)

東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中から C 型肝炎ウイルスの増殖を抑制する化合物を見出した。そのうちの一つはレチノイド関連化合物であったが、今までレチノイン酸で報告されている抗 HCV 能を凌いでいた。マイクロアレイ、RT-PCR を用いた遺伝子発現変動解析などから、酸化ストレス応答に関する酵素発現の回復がこの化合物の作用点であることを見いだした (論文投稿準備中)。

DNAウイルス増殖阻害化合物が、B型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性について、解析系の検討を行った。

8. ビタミン D が免疫細胞で誘導する抗菌ペプチドの抗 HCV 作用 (加藤)

HCV 感染複製系を用い、抗菌ペプチドの抗ウイルス活性を評価した。HuH-7 細胞に抗菌ペプチドを 10 μ g/mL の濃度で加え 1 時間培養した後に JFH-1 ウイルスを感染させた。3 日後に培養上清

と細胞中のコア抗原量を測定したところ、抗菌ペプチドで処理した細胞ではコア抗原量が 1/3 程度まで低下しており、この抗菌ペプチドに抗 HCV 作用が有ると考えられた。

そこで、次に HuH-7 細胞に JFH-1 RNA を遺伝子導入し、その後抗菌ペプチドを加え抗 HCV 作用を確認した。その結果、上清中のコア抗原量は約半分程度まで低下したが、細胞内のコア抗原量の低下は認めず、この抗菌ペプチドは HCV の細胞内の複製にはあまり影響を与えないと考えられた。HCV 粒子を含む培養上清を密度勾配で分画し検討を行った。その結果、抗菌ペプチド処理により感染性粒子のピークが消失し、この抗菌ペプチドは HCV 粒子を直接破壊している可能性が考えられた。用いた抗菌ペプチドは 10 µg/mL の濃度では細胞障害を認めなかった

9. HBV 増殖機構の解析と新規治療法の開発 (田中)

ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞による 3 次元培養において、培養上清中に HBs 抗原の増加を認め、細胞内に HBV core 関連抗原が検出された。上清中の HBV-DNA 量は培養期間を通じて継続的に 10^5 - 10^6 copies/ml で検出され、約 1 ヶ月間は培養の継続が可能であった。

10. HBV pseudotype を用いた HBV 感染受容体の分離・同定とその応用 (上田)

cDNA ライブラリー導入処理で、培養肝癌細胞株の HBVpp に対する感染性が著しく上昇した。PS1^{SSN} をプローブとした pull-down アッセイで HepG2 細胞から付着因子 (感染受容体若しくはその一部) の分離・同定を試み、幾つかの特異的な結合因子の存在を確認した。

11. HBV 増殖系および HEV 培養系による新規抗ウイルス療法の探索 (清原)

HBV: 培養期間 3 日間の方が安定した結果を得られた。ラミブジン 25 µM 添加による HBs 抗原及び HBc 抗原産生阻害率は低いか、または再現性が乏しい結果となった。

HEV: 濃度依存的に HEV 抗原産生を阻害する 12 薬剤を選択した。

12. HCV 感染モデル動物の開発 (三浦)

CCS0 マウスの CD81, CLDN1, SRBI, OCLN 発現量は、Huh7.5.1 細胞の 20%, 10%, 20%, 10%と低値を示した。また、マウス Cd81, Oc1n の過剰発現は、HCV の肝細胞への侵入を 25%, 20%阻害した。アンチセンスで NPC1L1 をノックダウンすると、HCV の侵入は 50%阻害された。

13. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製 (水口)

本年度は、ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞をナノピラープレート上に播種し、三次元培養を行うことで、さらなる肝成熟化を試みた。これまでの単層培養系で作製した分化誘導肝細胞と本研究における三次元培養系で作製した分化誘導肝細胞を比較するために、継時的に両培養系の分化誘導肝細胞における肝マーカー遺伝子 (アルブミン) の発現量を調べた。その結果、単層培養系の分化誘導肝細胞では培養 20 日目にアルブミン遺伝子発現量がピークに達するのにたいして、ナノピラープレートを用いた三次元培養系の分化誘導肝細胞では培養 20 日目以降もその遺伝子発現量は上昇し続け、培養 35 日目に最高値を示した。また、培養 20 日目の単層培養の分化誘導肝細胞と培養 35 日目の三次元培養の分化誘導肝細胞のアルブミン産生量および尿素産生能を調べた。その結果、培養 35 日目の三次元培養の分化誘導肝細胞の方がいずれも高かった。以上の結果から、ナノピラープレートを用いた三次元培養を用いることで、従来の単層培養よりも各種肝機能の高い分化誘導肝細胞をヒト iPS 細胞から作製できることが示された。

14. ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の解析 (八木)

水口グループは 3 種のアデノウイルスベクターを用いてそれぞれ内胚葉細胞、肝幹前駆細胞、成熟肝細胞への分化効率を高めることに成功している。そこで、3 段階の分化過程である内胚葉細胞、肝幹前駆細胞、iPS-hep 細胞のそれぞれを用いて感染実験を行い、どの段階でヒト iPS 細胞由来細胞が HCV 感染能を獲得するかを調べた。内胚葉細胞および肝幹前駆細胞においては HCVpv 感染がみられず、最終ステップの iPS-hep

細胞でのみ感染が確認された、したがって HCV 感染能は分化の最終段階まで獲得されないことが明らかとなった。

3 段階の分化過程である内胚葉細胞、肝幹前駆細胞、iPS-hep 細胞のそれぞれを用いて複製実験を行い、どの段階でヒト iPS 細胞由来細胞が HCV 複製能を獲得するかを調べた。複製活性は内胚葉細胞の段階から発現し肝幹前駆細胞、iPS-hep 細胞へと分化が進むにつれて活性が上昇することが示された。

D. 考察

HCV にはウイルス培養系が開発され、ウイルスライフサイクルの各過程を標的とすることができる。このウイルス培養系を利用して HCV の感染増殖複製過程を詳細に解析し、関与する宿主因子を同定して、新たな治療標的を同定する。HBV の場合、ウイルスゲノム導入による複製増殖系は確立しているものの、ウイルス感染が可能な培養細胞系が存在しないため、ウイルスライフサイクルの解析は限定的である。そこで、HBV の新たな感染実験系の開発も実施する。さらに、HBV、HCV とともにハイスループット実験系を構築して低分子化合物ライブラリーによる抗ウイルス薬のスクリーニングを進めたい。同定した化合物についてはその作用機序、標的の解析を進めてきた。

本年度の各分担研究者の報告に詳述されているが、様々な成果をあげている。新たな実験系を確立し、すでに臨床に使用されている薬剤の抗 HCV 活性を同定した。また、新たな化合物もスクリーニングされており、標的因子の同定など今後の研究の進展が期待される。HBV 受容体の同定もすすんでいる。今後は B 型肝炎創薬研究でひきつづき受容体の同定が進められると考える。HCV レセプタートランスジェニックマウスの開発も進んでいるが、4 因子を導入しただけでは感染感受性が得られないことがわかってきた。発現量の増強を含めてさらに検討が必要である。iPS 細胞から誘導した肝細胞で HCV 感染や複製が可能なが明らかとなり、分化段階の異なる細胞で感染感受性と複製感受性が得られること明らかとなった。この実験系によりさらに HCV

の生活環の理解が進むと期待できる。

E. 結論

・ 遺伝子型 2a の JFH-2 株により新たなレプリコンおよび感染性クローンを樹立した。これまで JFH-1 株のみで実施していた HCV のライフサイクル研究に新たな研究手法を加えることができ、その複製増殖機構の解析や創薬研究に有意義である。

・ TXAS 阻害薬 Ozagrel の感染性 HCV 粒子産生阻害効果は細胞内における感染性粒子形成あるいは成熟を阻害することによることが考えられた。TXA₂ による TP 非依存的なシグナル経路あるいは TXA₂ の代謝産物による新たなシグナル系が関連している可能性が考えられ、この新たなシグナル経路の中に、新たな薬剤の標的が存在すると思われ、今後のさらなる研究が必要であると考えられた。

・ ウイルス増殖に重要な宿主蛋白質因子 FKBP6 を同定した。また、FKBP8 や FKBP6 を標的とした化合物候補のリード化合物情報も得る事ができ、今後の新規抗ウイルス薬開発に繋がる研究ができた。

・ HuH-7 細胞とは異なる Li23 細胞をサブクローン化することでレポーター遺伝子を含む HCV が効率良く複製増殖することが可能な D7 細胞を開発した。

・ HCV キメラリポーターレプリコン系、および蛍光蛋白発現 HCV 培養系を用いたウイルス侵入、増殖、分泌のすべてのステップを標的とした阻害薬のスクリーニング・アッセイシステムは、HCV 生活環のあらゆるステップに対する阻害剤探索や薬効評価への応用が期待される。

・ HCV キメラリポーターレプリコン系、および蛍光蛋白発現 HCV 培養系による阻害薬のスクリーニング・アッセイシステムは、HCV 生活環のあらゆるステップに対する阻害剤探索や薬効評価への応用が期待される。本研究で同定された化合物の作用機構の解析・小動物モデルを用いた効果・安全性の検証を進めることにより HCV の

新規治療法開発に結びつくものとする。

・微生物由来の低分子化合物ライブラリーから HCVcc assay において EC50 が sub nM レベルにある強力な抗 HCV 活性を示す化合物を同定した。その抗 HCV 作用機構の詳細は完全には解明できていないが、少なくとも HIV エントリー受容体の一つである CD81 の細胞表面上での発現の downregulation 効果という新しいタイプの分子機構が関与している可能性を明らかにした。

・化合物スクリーニングで同定された化合物は、現在 HCV 治療薬として臨床研究に進んでいるレチノイン酸と最終作用機序は同一であるが、細胞での抗 HCV 能は本化合物がレチノイン酸を凌駕している。実際の治療に用いる際の低容量化と作用機序の違いから、レチノイド過剰摂取による副作用を回避する可能性が考えられる。今後さらに詳細な作用機序の解析を進め、同作用機序でのより効果の高い候補化合物の創製が望まれる。また、開発中の DNA ウイルス増殖阻害化合物が、DNA ウイルスである B 型肝炎ウイルス増殖を抑制するかを検討する。

・ビタミン D により誘導される抗菌ペプチドにも抗 HCV 作用を認めた。この作用もビタミン D 併用による C 型慢性肝炎の治療効果向上に関与していると考えられた。今後、免疫細胞をビタミン D により刺激し、誘導される抗菌ペプチドによる抗 HCV 活性を確認したい。

・ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞による 3 次元培養系は長期間の培養が可能であり、患者血清からの HBV 感染・複製の可能性が示された。3 次元環境での培養肝細胞は in vitro の非常に有用な HBV 感染モデルとなりうる。

・cDNA ライブラリー導入処理による培養肝癌細胞株の HBVpp に対する感染性の上昇は、現存肝癌培養細胞株に HBV 受容体若しくは付着因子が内在することを意味する。実際、PS1~SSN をプローブとした pull-down アッセイで、幾つかの相互作用因子を分離した。MS による分離した相互作用因子の同定作業を進めるとともに、処理/未処理細胞を用いた遺伝発現プロファイル解析を用いた遺伝子発現変化レベルでの検討及び二次元蛋白電気泳動法を用い

た蛋白レベルで解析を試みる。

・HepG2 2.2.15 細胞の各クローン株の HBV マーカー産生能が異なることを利用した HBV 増殖過程の検討、HBV-DNA 検出系を組み合わせたアッセイ系の構築など次の課題が明らかとなった。また、HEV 抗原が ELISA で測定できる抗原量になるまでに時間がかかるため、細胞毒性の影響、薬剤の分解などの問題が危惧される。さらに簡便で効率のよいスクリーニング系の構築が望まれる。

・トランスジェニックマウスでは十分な 4 因子の発現が得られなかったため、大量の 4 因子を発現させるにはノックインマウスを作成させる必要があることが明らかになった。

・Ad ベクターを用いた機能遺伝子の導入およびナノピラープレートを用いた三次元培養技術の導入によりヒト ES/iPS 細胞から分化誘導した肝細胞は、HCV 研究に使用可能であることが示唆された。

・ヒト iPS 細胞由来肝細胞分化誘導系を用いて HCV 感染・複製を解析した。HCVpv の感染は内胚葉細胞、肝幹前駆細胞の段階で観察されず、最終段階の iPS-hep 細胞でのみ成立した。一方、HCV レプリコンの複製は内胚葉細胞の段階から発現が見られ、分化誘導の初期に複製能は獲得されることが示唆された。各分化段階の細胞のアレイ解析を基にして、分化段階の進行と共に発現上昇する遺伝子の中から HCV 感染・複製に必須な遺伝子を探索できれば宿主因子をターゲットとした創薬につながることを期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) HH. Aly, K Shimotohno, M Hijikata, T Seya: In vitro models for the analysis of HCV life cycle, Microbiol. and Immunol., 2012, 56, 1, 1-9.

2) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells

- replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathog.* 2012;8(3):e1002561.
- 3) Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S, Sakamoto N, Izumi N: Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in IL28B with antiviral response. *Hepatology* 2012; 55(1):20-29.
- 4) Cheng J-C, Yeh YJ, Tseng CP, Hsu SD, Chang YL, Sakamoto N, Huang HD: Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(15):2621-2633.
- 5) Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Novel Cell Culture-Adapted Genotype 2a Hepatitis C Virus Infectious Clone. *J Virol.* 2012 86(19):10805-20.
- 6) Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, Wakita T. Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone. *Microbiol Immunol.* 2012 56(5):308-17.
- 7) Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K: Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Amphimedon* sp. *PLoS One*, 7: e48635, 2012
- 8) Iikura M, Furihata T, Mizuguchi M, Nagai M, Ikeda M, Kato N, Tsubota A, Chiba K. ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56(3):1407-13, 2012.
- 9) Kobayashi T, Hige S, Terashita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Nakanishi M, Ogawa K, Chuma M, Sakamoto N, Asaka M: Anemia and thrombocytosis induced by ribavirin monotherapy in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2012; 47(11):1228-1237.
- 10) Kondo M, Moriishi K, Wada H, Noda T, Marubashi S, Wakasa K, Matsuura Y, Doki Y, Mori M, Nagano H: Upregulation of nuclear PA28gamma expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Exp. Ther. Med.*, 3: 379-385, 2012
- 11) Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Izumi N: Data mining model using simple and readily available factors could identify patients at high risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2012;56(3):602-608.
- 12) Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Yatsuhashi H, Izumi N: Age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among early virological responders to peg-interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. *Antivir Ther* 2012; 17:35-43.
- 13) Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M: Identification of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agent Chemother* 2012; 56(3): 1315-1323.
- 14) Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Virus Genes*, 44(3):374-81, 2012.
- 15) Moriishi K, Matsuura Y: Exploitation of

- lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.*, 3: 54, 2012
- 16) Nichols DB, Fournet G, Gurukumar KR, Basu A, Lee JC, Sakamoto N, Kozielski F, Musmuca I, Joseph B, Ragno R, Kaushik-Basu N: Inhibition of hepatitis C virus NS5B polymerase by S-trityl-L-cysteine derivatives. *Eur J Med Chem* 2012; 49:191-199.
- 17) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Masaki,T., Kim,S., Wakita,T., Mishiro,S., and Kato,T. A Subclone of HuH-7 with Enhanced Intracellular Hepatitis C Virus Production and Evasion of Virus Related-Cell Cycle Arrest. *PLoS One* 7 (12), e52697, 2012.
- 18) Murayama,A., Sugiyama,N., Watashi,K., Masaki,T., Suzuki,R., Aizaki,H., Mizuochi,T., Wakita,T., and Kato,T. Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays. *J Clin Microbiol* 50 (6), 1943-1949, 2012.
- 19) Murayama,A., Kato,T., Akazawa,D., Sugiyama,N., Date,T., Masaki,T., Nakamoto,S., Tanaka,Y., Mizokami,M., Yokosuka,O., Nomoto,A., and Wakita,T. Production of infectious chimeric hepatitis C virus genotype 2b harboring minimal regions of JFH-1. *J Virol* 86 (4), 2143-2152, 2012.
- 20) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials*, 33, 4526-4534 (2012)
- 21) Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M: Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 2013; 57(1):46-58.
- 22) Raghwani, J., Thomas, X. V., Koekkoek, S. M., Schinkel, J., Molenkamp, R., van de Laar, T., Takebe, Y., Tanaka, Y., Mizokami, M., Rambaut, A. and Pybus, O. G. (2012). The origin and evolution of the unique HCV circulating recombinant form 2k/1b. *J Virol.* 2012 Feb;86(4):2212-20.
- 23) Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, Sugiyama M, Hung W, Govindarajan R, Korba B, Tanaka Y, Chu CK.
2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: In vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism of action. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013; 23(2): 503-6.
- 24) Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of Hepatitis C Virus Genotype 3a in Cultured Cells. *Gastroenterology.* 2013 144(1):56-58.
- 25) Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S: Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2012;42(10):958-965.
- 26) Sakamoto T, Tanaka Y, Kani S, Sugiyama M, Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the Dependence of Hepatitis B Virus Genotype G on Co-infection with Other Genotypes for Viral Replication. *J Viral. Hepat.*, 2012 in press.
- 27) Sakurai F, Furukawa N, Higuchi M, Okamoto S, Ono K, Yoshida T, Kondoh M, Yagi K., Sakamoto N, Katayama K, Mizuguchi H. Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a. *Virus Research* 2012;

- 165(2):214-218.
- 28) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. *Virus Res.*, 167(1):74-85,2012.
- 29) Sunbul M, Sugiyama M, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Khan A, Elkady A, Tanaka Y, Mizokami M. Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey. *Microbiol Immunol.* 2012 in press.
- 30) Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology.* 2012 432(1):29-38.
- 31) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction. *J. Hepatol.*, 57, 628-636 (2012)
- 32) Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Kishimoto K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kanda K., Hayakawae T., Furue MK., Mizuguchi H. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*, 34, 1781-1789 (2013)
- 33) Takeshita S, Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H, Matsuzaki T, Otani M, Muraoka T, Akiyama M, Miuma S, Ozawa E, Ikeda M, Kato N, Isomoto H, Tkashima F, Nakao K. Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells. *J Gastroenterol*, 47(2):195-202, 2012.
- 34) Tripathi LP, Kambara H, Moriishi K, Morita E, Abe T, Mori Y, Chen YA, Matsuura Y, Mizuguchi K: Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28gamma Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study. *J. Proteome Res.*, 11: 3664-3679, 2012
- 35) Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Development of hepatitis C virus production reporter assay systems using two different hepatoma cell lines. *J. Gen. Virol.*, 93(7):1422-31,2012.
- 36) Takeda M, Ikeda M, Mori K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication. *FEBS Open Bio.*, 2:279-283,2012.
- 37) Yamashita A, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Mar. Drugs*, 10:744-761,2012.
- 38) Yamashita A, Abdus K, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Thuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K: Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Marine Drugs* 2012; 10(4):744-761.

2. 学会発表および講演など

- 1) Y Abe, A H. Hussein, M Imamura, T Wakita, K Shimotohno, K Chayama, M Hijikata, Thromboxane A₂ synthase plays a key role in production of infectious HCV particles, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy,

- (2012, Oct. 5-9)
- 2) D Akazawa, M Moriyama, H Yokokawa, N Watanabe, T Date, K Morikawa, H Aizaki, K Ishii, T Kato, N Nakamura, T Wakita. Neutralizing Antibodies Induced by Cell Culture-Derived Hepatitis C Virus Was Effective Both *In Vitro* and *In Vivo*, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
 - 3) HH Aly, T Wakita. New HCV genotype 4a genotype clone, The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis C : Best Practice Based on Science" Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
 - 4) HH Aly, K Watashi, N Watanabe, M Mizokami, T Kato, T Wakita. Construction of Hepatitis C virus genotype 4a clone, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
 - 5) HH Aly, K Shimotohno, T Wakita, H Oshiumi, T Seya. HCV particles production from mouse hepatocytes, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
 - 6) Ariumi Y, Kuroki M, Inoue M, Hijikata M, Ikeda M, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. Dynamic Regulation of cytoplasmic mRNA-containing bodies in HCV systems. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
 - 7) T Ando, H Aizaki, M Sugiyama, M Mizokami, M Kuroda, T Wakita. Independent evolution of multi-dominant viral genome species observed in a single HCV carrier, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
 - 8) M Fukasawa, R Anai, Y shirasago, K Saito, Y Murakami, H Fukazawa, T Suzuki, T Wakita, J Chiba, K Hanada, Isolation and characterization of a mutant Hepatitis C virus adapted to mouse CD81, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
 - 9) Hara Y, Yanatori I, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Ikeda M, Kishi F, Kato N, Hino K. Hepatitis C virus protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
 - 10) Ishii K, Kanda T, Sugiura N, Kiyohara T, Yoshizaki S, Shimada T, Nakamura N, Nakashima K, Tada Y, Yokosuka O, Wakita T, Noda M, Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A between 2010 and 2011 in Japan, 14th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Shanghai International Convention Center, Shanghai, China (2012, June 22-25)
 - 11) Kasai H., Kawakami, K., Yamashita, A., Ikeda M., Kato, N., Enomoto, N., Matsuura, Y., Kusunoki, M., Moriishi, K. FKBP6 plays an important role in HCV replication through binding to HCV NS5A. 19th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. 2012. October 5-9.
 - 12) Kato T, Matsumura T, Sugiyama N, Murayama A, Wakita T, Imawari M. Anti-Hepatitis C Virus Effect of 25-hydroxyvitamin D₃ Targeting Infectious Virus Production. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
 - 13) S Kim, T Date, H Aizaki, H Watanabe, T Wakita. NS3 protease derived from genotype 1b Con1 attenuates viral replication, The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis C : Best Practice Based on Science" Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
 - 14) S Kim, T Date, H Aizaki, H Watanabe, T Wakita. NS3 protease derived from genotype 1b Con1 attenuates viral replication, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related

- Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
- 15) M Kuroki, M Inoue, M Hijikata, M Ikeda, T Wakita, K Shimotohno, N Kato, Y Ariumi: Can P-body associated host factors APOBEC3G and MOV10 restrict HCV infection? 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Venice, Italy, Oct 5-9, 2012
- 16) M Matsuda, R Suzuki, K Watashi, Hideki Aizaki, Y Matsuura, T Miyamura, T Suzuki, T Wakita. An alternative endocytosis pathway for the infectious entry of hepatitis c virus, The 10th JSH Single Topic Conference, “Hepatitis C : Best Practice Based on Science“, Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
- 17) Y Matsumoto, N Watanabe, K Watashi, R Suzuki, T Matsuura, T Suzuki, T Miyamura, K Wake, T Wakita, H Aizaki, Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
- 18) Molenkamp, R., Raghvani, J., Thomas, X., Koekkoek, S., Schinkel, J., van de Laar, T., Takebe, Y., Tanaka, Y., Mizokami, M., Rambaut, A. and Pybus, O. Origin and evolution of the unique hepatitis C virus circulating recombinant form 2k/1b. HCV 2012 (October 5, 2012, Venice).
- 19) Murayama A, Kato T, Sugiyama N, Wakita T. Infectious Virus Production with Hepatitis C Virus Genotype 2b Genome Harboring Minimal Regions of JFH-1. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
- 20) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara- Sugano M, Wakita T, Mishiro S, Kato T. Efficient hepatitis C virus production associated with enhanced virus assembly and evasion of cell cycle arrest. The 63nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 9-13, 2012. Boston, MA, USA.
- 21) A Muroi, S Takahama, M Arimoto, R Morishita, T Suzuki, T Wakita, Y Endo, T Sawasaki, Comprehensive screening of host proteins cleaved by HCV protease using wheat cell-free protein synthesis system, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
- 22) Y Okuno, N B Ngoc, M Denawa, H Kagechika, N Sakamoto, M Hagiwara. “Identification of novel compound with the anti-Hepatitis C activity, which promotes the expression of Gastrointestinal glutathione peroxidase”. The 1st Official Conference of the International Chemical Biology Society, October 4-5, 2012 USA
- 23) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with Li23 cell-based long-term replication of Hepatitis C virus RNA. 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
- 24) Sugiyama M, Tanaka Y, Nakanishi M, Mizokami M. The influence of specific mutations observed in core promoter region of HBV genotype D1 on viral replication. 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sept. 22-25, 2012. Oxford, England
- 25) R Suzuki, M Matsuda, K Watashi, Hideki Aizaki, Y Matsuura, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki. Identification of a host factor that interacts with hepatitis c virus NS2 protein and participates in the viral assembly, The 10th JSH Single Topic Conference, “Hepatitis C : Best Practice Based on Science“, Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
- 26) R Suzuki, M Matsuda, K Watashi, H Aizaki, Y Matsuura, T Suzuki, T Wakita. An alternative endocytosis pathway for the productive entry of Hepatitis C virus, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)