

- 27) Takeda M, Ikeda M, Airumi Y, Wakita T, Kato N. Development of HCV reporter-assay systems using two hepatoma cell lines and analysis of the factors determining sensitivity to HCV infection. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
- 28) Y Tsugawa, H Kato, T Fujita, K Shimotohno, M Hijikata: Critical role of Interferon alpha constitutively produced in-human hepatocytes in response to virus infection. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 11-14 September 2012
- 29) Y Tsugawa, M Hijikata: Hepatocyte-specific innate immune systems in response to RNA virus infection. The 10th International Student Seminar. Kyoto, 5-8 March 2012.
- 30) Y Tsugawa, H Kato, T Fujita, K Shimotohno, M Hijikata: Hepatocyte-specific innate immune systems in response to viral infection. 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Venice, Italy, Oct 5-9, 2012
- 31) T Wakita. Hepatitis C Virus Replication Models and Anti-viral Development. The 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR) Sapporo, Japan (2012, 4. 16-19)
- 32) T Wakita. Basic concepts of Hepatitis C, 1st Asian Conference on Hepatitis B and C, HIV and Influenza, Beijing Marriott Hotel City Wall, Beijing, China (2012, 5. 18-19)
- 33) T Wakita. Production of cell culture adapted HCV strain, International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Cancer, Peking University Center for Infectious Diseases Research, Beijing, China (2012, 6. 21)
- 34) T Wakita. Independent Evolution of Multi-dominant Viral Genome Species 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)
- 35) T Wakita, T Date, S Kim, T Kato, Novel Cell Culture-Adapted Hepatitis C Virus Infectious Clone, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
- 36) N Watanabe, T Date, H Aizaki, T Wakita. The role of envelope N-glycans in HCV lifecycle, The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis C : Best Practice Based on Science" Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
- 37) N Watanabe, T Date, A H Hussein, H Aizaki, T Wakita. Neutralization antibody induction by immunization with E2 proteins purified from different cells, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
- 38) Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Iio E, Shinkai N, Matsuura K, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, Tanaka Y. Immune restoration Hepatitis B associated with anti-retroviral therapy for human immunodeficiency virus. 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sept. 22-25, 2012. Oxford, England.
- 39) K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita. Phospholipase D is a cellular regulator during hepatitis c virus egress and a possible target for antiviral strategy, The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis C : Best Practice Based on Science", Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
- 40) K Watashi, N Uchida, M Saeed, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Characterization of anti-HCV release inhibitors targeting Phospholipase D, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
- 41) Ueda Y, Mori K, Dansako H, Kim HS, Wataya Y, Ikeda M, Kato N. Potent anti-HCV activities found in preclinical anti-malarial drugs is promptly

exerted through oxidative stress. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy

42) Yagi, K., Yoshida, T., Yamane, S., Takayama, K., Watari, H., Kondoh, M., Sakurai, F., Sakamoto, N., Matsuura, Y., Mizuguchi, H., Yagi, K. Evaluation of HCV infection and replication using human iPSC cell-derived hepatocytes. HCV 2012. October 5-9. Venice, Italy.

43) Yeh YJ, Tseng CP, Hsu SD, Chang YL, Sakamoto N, Huang HD, Cheng JC: Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication. J Hepatol 2011; in submission.. 19th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Oct-5-2012, Venice, Italy

44) 藤田めぐみ、脇田隆宇、加藤孝宣. HCV genotype1b 株キメラウイルスを後板 HCV core 領域 70/91 変異株の解析、第 48 回日本肝臓学会総会、ホテル日航金沢、(2012, 6.7-8)、ワークショップ 18 「C 型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略」

45) 石田雄二、柳愛美、吉美康美、山崎ちひろ、横道博、渡士幸一、脇田隆宇、茶山一彰、立野知世. ヒト肝細胞キメラマウス由来の初代培養ヒト肝細胞への HBV 感染、第 48 回日本肝臓学会総会、ホテル日航金沢、(2012, 6.7-8)

46) 坂田幸太郎、原詳子、鈴木哲朗、渡邊則幸、相崎英樹、高谷大輔、松本武久、脇田隆宇、小嶋聡一. C 型肝炎ウイルス NS3 プロテアーゼによる TGF- β I 型受容体を介した TGF- β シグナルの活性化、第 48 回日本肝臓学会総会、ホテル日航金沢、(2012, 6.7-8)

47) 清原知子、脇田隆宇、石井孝司、B 型肝炎ワクチン力価測定法の比較、第 16 回日本ワクチン学会学術集会、パシフィコ横浜、(2012, 11.17-18)

48) 渡士幸一、内田奈々、大東卓史、史与原知子、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆宇、IL1 および TNF- α の B 型肝炎ウイルス感染阻害活性、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)

49) 松田麻未、鈴木亮介、渡士幸一、相崎英樹、

松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆宇、1 回感染性 *trans*-packaging 型 C 型肝炎ウイルス粒子を用いたエンドサイトーシス経路の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)

50) 阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、今村道雄、脇田隆宇、下遠野邦忠、茶山一彰、土方誠、C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染性粒子形成において重要な宿主因子、トロンボキサン A2 (TXA2) 合成酵素の同定と機能解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)

51) 白砂圭崇、齊藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、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、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)

52) 松本喜弘、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆宇、相崎英樹、グリチルリチンの C 型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス作用の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)

53) 渡邊則幸、伊達朋子、Hussein Hassan、相崎英樹、脇田隆宇、異なる細胞を用いて作製した E2 タンパク質の中和抗体誘導効果、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)

54) 伊藤昌彦、鈴木亮介、福原崇介、松浦善治、脇田隆宇、鈴木哲朗、HuH-7 由来オーバル様細胞における HCV 感受性の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)

55) 下池貴志、野島清子、脇田隆宇、岡田義昭、血液製剤における C 型肝炎ウイルスの不活化の検討、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)

56) 津川 陽司、土方 誠：ヒト肝細胞における抗ウイルス自然免疫応答機構の解析、第 8

回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島、平成24年7月6日

57) 土方 誠: C型肝炎ウイルス培養系開発過程で最近わかったこと、国立感染症研究所肝炎セミナー、国立感染症研究所、東京平成24年年10月31日

58) 津川陽司、加藤博己、藤田尚志、下遠野邦忠、土方誠: ヒト肝細胞における抗ウイルス自然免疫応答機構の解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪2012年11月13-15日

59) 有海康雄、黒木美沙緒、井上万里子、土方誠、池田正徳、脇田隆字、下遠野邦忠、加藤宣之: P-body 因子と HCV のクロストーク、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪2012年11月13-15日

60) Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Constitutively produced Interferon γ functions in prevention of viral infection in human hepatocytes、第35回日本分子生物学会年会、福岡2012年12月11~14日

61) 西宏威、河上國洋、平田有佳理、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、岡本徹、松浦善治、楠木正己、森石恆司 新規宿主因子 FKBP6 による HCV 複製制御機構の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13日~15日

62) 藤本雄介、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、森石恆司 海綿動物 *Amphimedon* sp. 抽出画分による HCVNS3 プロテアーゼ・ヘリカーゼ活性阻害の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13日~15日

63) 山下篤哉、沈暉、葛西宏威、藤本雄介、森石恆司 Caffeic acid phenethyl ester とその類縁化合物による HCV ゲノム複製阻害効果の検討 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13日~15日

64) 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆字、加藤 宣之 Li23 細胞を用いた新しい JFH-1 株 HCV 感染レポーターアッセイ系の開発と感受性を規定する因子の検討 第16回日本肝臓学会大会、

神戸、2012年10月。

65) 池田 正徳、是永 匡紹、武田 緑、有海 康雄、日野 啓輔、加藤 宣之 IL28B SNPs の制限酵素法による判定法と比較 第16回日本肝臓学会大会、神戸、2012年10月

66) 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆字、加藤 宣之 2種類肝細胞株 (HuH-7 と Li23) を用いた JFH-1 株 HCV 感染レポーターアッセイシステムの開発と感染効率を規定する宿主因子の検討 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月

67) 池田 正徳、是永 匡紹、武田 緑、有海 康雄、日野 啓輔、加藤 宣之 新規 IL28B SNP (rs8113007) の HCV に対する IFN 応答性の検討 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月

68) 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆字、加藤 宣之 異なる2種類のヒト肝癌細胞株を用いた HCV 感染レポーターアッセイ系の開発と HCV 感染への感受性を規定する因子の検討 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月

69) 池田 正徳、武田 緑、是永 匡紹、有海 康雄、日野 啓輔、加藤 宣之 IL28B SNP rs8113007 による C 型慢性肝炎患者の治療効果予測 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月

70) 上田 優輝、森 京子、池田 正徳、加藤 宣之 抗マalaria薬として開発中の化合物に見出された強力な抗 HCV 活性 第48回日本肝臓学会総会、石川、2012年6月

71) 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之 C型肝炎ウイルスのゲノム複製が長期間に及ぶことで発現レベルに変動を来した宿主遺伝子の同定 第48回日本肝臓学会総会、石川、2012年6月

72) 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之 3年半にわたる C 型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現が不可逆的に変動した宿主遺伝子の同定 第27回中国四国ウイルス研究会、鳥取、2012年6月

- 73) 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之 3年半にわたるC型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現が変動した9個の宿主遺伝子の同定 第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月
- 74) 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之 長期にわたるC型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現レベルに変動を来した宿主遺伝子の同定 第60回日本ウイルス学会学術総会、大阪、2012年11月
- 75) 上田 優輝、森 京子、團迫 浩方、金 惠淑、綿矢 有佑、池田 正徳、加藤 宣之 強力な抗HCV活性が見出された抗マalaria薬として開発中の化合物 第27回中国四国ウイルス研究会、鳥取、2012年6月
- 76) 上田 優輝、森 京子、團迫 浩方、金 惠淑、綿矢 有佑、池田 正徳、加藤 宣之 抗マalaria薬として開発中の化合物に見出された強力な抗HCV活性 第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月
- 77) 上田 優輝、森 京子、團迫 浩方、金 惠淑、綿矢 有佑、池田 正徳、加藤 宣之 酸化ストレスを介して強い抗HCV活性を示す抗マalaria薬として開発中の化合物 第60回日本ウイルス学会学術総会、大阪、2012年11月
- 78) 武部 豊、田中靖人、溝上雅史³ Jayna Raghvani⁴、Richard Molenkamp⁵、Oliver G. Pybus HCV 組換え型流行株 (CRF01_2k/1b) の起源とその進化. 第60回日本ウイルス学会 (Nov. 13-15, 2012, 大阪).
- 79) Masatoshi Hagiwara, "New chemical therapeutics of congenital genetic disorders targeting pre-mRNA." 文部科学省最先端基盤事業「化合物ライブラリーを活用した創薬等先端研究・教育基盤の整備」国際シンポジウム. 2012. 6月京都
- 80) 村山麻子、三代俊治、脇田隆字、加藤孝宣. C型肝炎ウイルス産生効率の良いHuH-7細胞サブクローンの同定と解析. 第19回肝細胞研究会、2012年6月、札幌.
- 81) 藤田めぐみ、脇田隆字、加藤孝宣. HCV genotype 1b 株キメラウイルスを用いた HCV core 領域アミノ酸 70/91 変異株の解析. ワークショップ 18: C型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略 第48回日本肝臓学会総会、2012年6月、金沢.
- 82) 村山麻子、加藤孝宣、杉山奈央、脇田隆字. C型肝炎ウイルス遺伝子型2b株とJFH-1株のキメラウイルスを用いた抗ウイルス薬評価系の樹立. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.
- 83) 村山麻子、杉山奈央、岡本有加、政木隆博、脇田隆字、加藤孝宣. NS5A 領域置換 HCV キメラ株を用いた NS5A 阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価. 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月、福岡
- 84) 新海登、田中靖人、松浦健太郎、溝上雅史. B型慢性肝炎患者における核酸アナログ中止症例の検討～中止後長期観察例、プレコア/コアプロモーター変異をふまえて～. 第48回日本肝臓学会総会. 平成24年6月、石川.
- 85) 田中靖人. ウイルス性肝炎・肝硬変における検査の進歩. 日本臨床検査自動化学会第44回大会. 平成24年10月、横浜.
- 86) 柏木有美、可児里美、都築祐二、松浦健太郎、五藤孝秋、大橋実、脇本幸夫、田中靖人. リアルタイム PCR 法を用いた Abbott m2000 system による HBV-DNA 定量測定 of 基礎的検討. 第59回日本臨床検査医学会学術集会. 平成24年11月、京都.
- 87) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H.、Generation of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by transduction of FOXA2 and HNF1 α 、International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting、神奈川、2012年6月

88) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Tachibana M., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H., Type I collagen promotes hepatic maturation from human pluripotent stem cells in 3D co-culture with Swiss 3T3 cell sheet. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, 神奈川、2012年6月

89) 高山和雄、稲村 充、川端健二、形山和史、櫻井文教、古江-楠田美保、水口裕之、SOX17、HEX、HNF4 α 遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から成熟肝細胞の効率良い分化誘導、第 85 回大会日本組織培養学会、京都、2012年5月

90) 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、古江(楠田)美保、川端健二、水口裕之、Swiss 3T3 細胞との積層 3 次元共培養下におけるヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の肝細胞成熟化・促進機構の解析、第 85 回大会日本組織培養学会、京都、2012年5月

91) 高山和雄、川端健二、稲村 充、櫻井文教、古江-楠田美保、水口裕之、c/EBP α および c/EBP β 遺伝子による TGFBR2 遺伝子発現制御を介した肝幹前駆細胞の運命決定、第 19 回大会肝細胞研究会、北海道、2012年6月

92) 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、岡野光夫、櫻井文教、立花雅史、古江-楠田美保、川端健二、水口裕之、ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の Swiss 3T3 細胞との積層 3 次元共培養下における成熟化・促進機構の解析、第 19 回肝細胞研究会、北海道、2012年6月

93) 高山和雄、稲村 充、川端健二、菅原道子、菊池きよ美、櫻井文教、古江-楠田美保、水口裕之、FOXA2 および HNF1 α 遺伝子導入によるヒト ES/iPS 細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞への分化誘導、第 39 回日本毒性学会学術年会、宮城、2012年7月

94) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、古江-楠田美保、川端健二、水口裕之、ヒト ES/iPS 細胞から肝幹前駆細胞への分化における転写因子 HEX の機能解明、第 62 回日本薬学会近

畿支部総会・大会、兵庫、2012年10月

95) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Tashiro K., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H., Generation of mature hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction, 第 27 回日本薬物動態学会年会、千葉、2012年11月

96) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之、ヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化過程における転写因子 HEX の機能解明、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11-14日

97) 高山和雄、川端健二、田代克久、神田勝弘、櫻井文教、古江-楠田美保、水口裕之、Nanopillar プレートを用いたヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価への応用、第 12 回日本再生医療学会総会、神奈川、2013年3月

98) 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之、転写因子 HEX によるヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化機構の解明、第 12 回日本再生医療学会総会、神奈川、2013年3月

G. 知的所有権の出願・登録状況

特許出願

1) 出願番号：特願 2011-194082

発明の名称：C型肝炎ウイルスの増殖を抑制する医薬組成物

発明者：坂本直哉、渡辺守、北詰晶子、萩原正敏、奥野友紀子

特許出願人：東京医科歯科大学

提出日：平成 23 年 9 月 6 日

2) 発明の名称：抗ウイルス組成物

①発明者：萩原正敏、奥野友紀子、細谷孝充、小野木博、吉田優

②日本出願日：2012年3月15日(特願 2012-58340)

③出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学、株式会社キノファーマ

④発明の内容の概略：宿主細胞の蛋白質リン酸化酵素を阻害し抗ウイルス活性を示す新規化合物に関する特許

3) 発明の名称：スクリーニング方法、タンパク質の不安定性及び/又は安定性を誘導する物質、及び、タンパク質の活性評価

①発明者：萩原正敏、喜井勲、細谷孝充、隅田有人、吉田優

②日本出願日：2012年6月6日(特願2012-129094)

③出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学

II. 分担研究報告

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（平成 24 年度）

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 隆字

分担研究課題：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

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。

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、治療薬開発に役立てる。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。

分担研究としてはHBV、HCV、HEVのウイルス増殖機構の解析、抗ウイルス活性を有する化合物の同定などを進めるとともに、研究班に参加する研究分担者の研究をまとめ、研究者間の共同研究を推進する。

B. 研究方法

1. 遺伝子型 2a の新規 HCV レプリコンの樹立と解析

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 PCR およびクローニングにより分離し、遺伝子配列を決定し、JFH-2 株と命名した。構造領域以外の HCV 遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子と EMCV IRES 遺伝子により JFH-2 サブジェノミックレプリコンを構築した。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をおこなった。培養終了時に固定し、クリスタルバイオレット染色によりコロニー形成を確認した。さらに、コロニーを形成するレプリコン細胞をクローニングシリンダーによりクローニングした。レプリコン細胞で複製するレプリコン RNA のコピー数を定量し、ノーザンブロットにより解析した。さらに、RT-PCR 法により cDNA を増幅してレプリコンゲノム配列を決定し、変異の有無を確認した。レプリコン細胞で発現する HCV タンパク質を免疫染色およびウエスタンブロット法により解析した。レプリコンゲノムに確認した変異を JFH-2 サブジェノミックレプリコン構築に挿入して、コロニー形成能およびルシフェラーゼレポーターレプリコンにおける一過性複製能を検討した。

2. 遺伝子型 2a の新規 HCV 感染性クローンの樹立

レプリコンの解析から同定した最も複製効率増強効果の高かった適合変異 (2217AS) を J6 の構造遺伝子を導入した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。培養上清中のコアタンパク質、経代時の細胞の免疫染色を実施した。経代終了時の培養上清の感染力価を測定し、新たな Huh7.5.1 細胞へ感染した。この感染を 3 回繰り返した後に培養上清中のウイルス遺伝子の配列を決定し、適合変異を同定した。同定した適合変異をさらに全長遺伝子に組換えて構築を作成した。

(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、個人情報に厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 遺伝子型 2a の新規 HCV レプリコンの樹立と解析

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の Huh7 細胞におけるコロニー形成能は 10ug の RNA トランスフェクションにより数コロニーの形成 (1cfu/ug RNA 以下) であった。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の複製していた。ノーザンブロット解析により約 8Kb のレプリコン RNA を確認した。また、ウエスタンブロット法により、レプリコン細胞で特異的に発現する NS3 タンパク質を検出した。従って、JFH-2 レプリコンは Huh7 細胞において複製が可能と考えられた。さらに、細胞内で増殖するレプリコンゲノムの配列を解析すると、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。1547FL, 1651TN, 2280QR は複数のレプリコン細胞から見いだした。また、2217AS, 2222HQ は NS5A の ISDR 領域内に同定された。そこで、これらの変異を、野生型 JFH-2 サブジェノミックレプリコン構築にそれぞれ挿入して、そのコロニー形成能を解析した。その結果、2217AS 変異のみがコロニー形成を 6,000 倍程度増強した。その他の変

異は増強効果がないか、あっても数倍から数十倍程度であった。さらに、ルシフェラーゼによるレポーターレプリコンアッセイにおいても、2217AS 変異のみが一過性複製も増強した。

2. 遺伝子型 2a の新規 HCV 感染性クローンの樹立

レプリコンの実験で同定された 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もトランスフェクション直後は検出限界程度であったが、最終的に 4,000-13,000ffu/ml まで上昇した。最終的な培養上清を新たな細胞に感染させ、ふたたびコアタンパク質濃度と感染力価の上昇を待つことを 3 回繰り返した。3 回繰り返し感染後の培養液からウイルスゲノムを検出してそ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後から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。

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、標的の解析を進める。

現在 HCV のライフサイクル研究には遺伝子型 2a の JFH-1 株が広く用いられているが、その他に培養細胞で効率よく感染増殖可能なウイルス株は存在しない。今年度は JFH-1 とは別の劇症肝炎症例から新たに JFH-2 株を分離し、レプリコンの樹立を行い、さらに感染性クローンの樹立に成功した。JFH-1 株は適合変異なしに培養細胞で感染増殖が可能であったが、他の HCV 株ではレプリコンの段階で適合変異なしに増殖可能なものは他になく、さらに感染性クローンとして効率よく経代培養できるウイルス株は存在しない。この点から、今回樹立した JFH-2 株は野生型の配列では培養細胞での複製はみられないが、適合変異の導入により、まずレプリコンで複製が可能となった。さらに、2217AS 変異を導入した全長遺伝子を用いることにより感染性ウイルスの作成にも成功した。2217AS 変異のみでは感染複製増殖は可能ではなく、新たな適合変異が 7 カ所あるいは 9 カ所同定された。これらのすべての変異が効率のよい感染複製増殖に必要なかどうかは不明であるため、今後さらに最低限必要な変異およびその機能的な意義についての解析を進める必要がある。

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。本実験系によりこれまで 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と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

2. 学会発表

- 1) T Wakita. Hepatitis C Virus Replication Models and Anti-viral Development. The 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR) Sapporo, Japan (2012, 4. 16-19)
- 2) T Wakita. Basic concepts of Hepatitis C, 1st Asian Conference on Hepatitis B and C, HIV and Influenza, Beijing Marriott Hotel City Wall, Beijing, China (2012, 5. 18-19)
16. T Wakita. Production of cell culture adapted HCV strain, International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Cancer, Peking University Center for Infectious Diseases Research, Beijing, China (2012, 6. 21)
- 3) T Wakita. Independent Evolution of Multi-dominant Viral Genome Species 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)
- 4) 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)
- 5) N Watanabe, T Date, H Aizaki, T Wakita. The role of envelope N-glycans in HCV lifecycle, The 10th JSH Single Topic Conference, “Hepatitis C : Best Practice Based on Science“ Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) Hussein H Aly Ibrahim, 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)
- 10) K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita. Phospholipase D is a cellular regulator during hepatitis c virus egress and a possible target for antiviral strategy, The 10th JSH Single Topic Conference, “Hepatitis C : Best Practice Based on Science“, Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) T Wakita, T Date, S Kim, T Kato, Novel Cell Culture-Adapted Hepatitis C Virus Infectious Clone, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
- 15) 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)
- 16) K Watashi, N Uchida, M Saeed, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Characterization of anti-HCV release inhibitors targeting Phospholipase D, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
- 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) 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)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) N Watanabe, T Date, A H Hussein, H Aizaki, T Wakita. Neutralization antibody induction by immunization with E2 proteins purified from different cells, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)

- 22) A H Hussein, K Watashi, N Watanabe, M Mizokami, T Kato, T Wakita. Construction of Hepatitis C virus genotype 4a clone, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
- 23) A H Hussein, K Shimotohno, T Wakita, H Oshiumi, T Seya. HCV particles production from mouse hepatocytes, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
- 24) 藤田めぐみ、脇田隆宇、加藤孝宣. HCV genotype1b 株キメラウイルスを後板 HCV core 領域 70/91 変異株の解析、第 48 回日本肝臓学会総会、ホテル日航金沢、(2012, 6.7-8)、ワークショップ 18 「C 型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略」
- 25) 石田雄二、柳愛美、吉美康美、山崎ちひろ、横道博、渡士幸一、脇田隆宇、茶山一彰、立野知世. ヒト肝細胞キメラマウス由来の初代培養ヒト肝細胞への HBV 感染、第 48 回日本肝臓学会総会、ホテル日航金沢、(2012, 6.7-8)
- 26) 坂田幸太郎、原詳子、鈴木哲朗、渡邊則幸、相崎英樹、高谷大輔、松本武久、脇田隆宇、小嶋聡一. C 型肝炎ウイルス NS3 プロテアーゼによる TGF- β I 型受容体を介した TGF- β シグナルの活性化、第 48 回日本肝臓学会総会、ホテル日航金沢、(2012, 6.7-8)
- 27) 清原知子、脇田隆宇、石井孝司、B 型肝炎ワクチン力価測定法の比較、第 16 回日本ワクチン学会学術集会、パシフィコ横浜、(2012, 11.17-18)
- 28) 渡士幸一、内田奈々、大東卓史、史与原知子、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆宇、IL1 および TNF- α の B 型肝炎ウイルス感染阻害活性、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
- 29) 松田麻未、鈴木亮介、渡士幸一、相崎英樹、松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆宇、1 回感染性 *trans*-packaging 型 C 型肝炎ウイルス粒子を用いたエンドサイトーシス経路の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
- 30) 阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、今村道雄、脇田隆宇、下遠野邦忠、茶山一彰、土方誠、C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染性粒子形成において重要な宿主因子、トロンボキサン A2 (TXA2) 合成酵素の同定と機能解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
- 31) 白砂圭崇、齊藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、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、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
- 32) 松本喜弘、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆宇、相崎英樹、グリチルリチンの C 型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス作用の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
- 33) 渡邊則幸、伊達朋子、Hussein Hassan、相崎英樹、脇田隆宇、異なる細胞を用いて作製した E2 タンパク質の中和抗体誘導効果、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
- 34) 伊藤昌彦、鈴木亮介、福原崇介、松浦善治、脇田隆宇、鈴木哲朗、HuH-7 由来オーバル様細胞における HCV 感受性の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
- 35) 下池貴志、野島清子、脇田隆宇、岡田義昭、血液製剤における C 型肝炎ウイルスの不活化の検討、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
- G. 知的所有権の出願・登録状況
なし

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

分担研究者： 土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

分担研究課題：患者由来HCVの感染増殖に機能する肝細胞因子の解析

研究要旨 前年度までに、トロンボキサン A₂ (TXA₂) 合成酵素 TXAS 阻害剤 Ozagrel が JFH1 感染性粒子産生系において用量依存的な感染性粒子産生阻害効果を示し、またヒト肝臓キメラマウスに感染させた患者血由来 HCV の感染伝播を効率良く抑制できることを明らかにしてきた。今年度はさらに Ozagrel による感染性 HCV 粒子産生系阻害機構の詳細を明らかにし、さらに効率良い阻害効果を示す薬剤の標的を見出すことを目指した。まず、Ozagrel 処理した JFH1 感染性粒子産生細胞から培養上清中に産生された粒子を浮遊密度勾配超遠心法により解析したところ、感染性粒子画分の粒子量が著しく低下していることがわかった。またこの細胞内で形成されている HCV 粒子の量とその感染性を検討したところ、量的には未処理細胞に比較して大きな変化がなかったが、感染性が著しく低下していた。これらのことから Ozagrel は JFH1 感染性粒子産生細胞内における感染性粒子の形成を阻害している可能性が考えられた。また TXAS の産物であり、シグナル分子である TXA₂ の効果を検討するために、細胞膜に存在する TXA₂ 受容体 (TP) に対するアゴニストおよびアンタゴニストを用いて、その感染性 HCV 粒子産生に対する効果を検討したが、これらは全く効果を示さなかった。このことから TXAS による感染性 HCV 粒子形成には TP 非依存的な TXA₂ シグナル系、あるいは TXA₂ からの誘導体が関与する可能性が考えられた。これらの作用機序の解明は感染性 HCV 粒子産生の抑制という新規の効果をもつ抗 HCV 薬剤の開発に有用であると考えられた。

A. 研究目的

独自に開発した患者由来の C 型肝炎ウイルス(HCV) の感染増殖細胞培養系では立体培養したヒト不死化肝細胞を用いている。平面培養では得られなかった効率で感染増殖や感染性粒子産生がおこなわれる原因を解明することにより、このウイルスの生活環に関わる細胞側因子の詳細を明らかにして、これを効果的に抑制する薬剤を抗 HCV 薬候補として同定することを目的とした。これまでに感染性 HCV 粒子の産生を阻害する薬剤としてトロンボキサン A₂ (TXA₂) 合成酵素 TXAS 阻害剤 Ozagrel を同定している。今年度はさらに Ozagrel による感染性 HCV 粒子産生系阻害機構の詳細を明らかにし、さらに効率良い阻害効果を示す薬剤の標的を見出すことを目指した。

B. 研究方法

1. 前年度までに、トロンボキサン A₂ (TXA₂) 合成酵素 TXAS 阻害剤 Ozagrel が JFH1 感染性粒子産生系において用量依存的な感染性粒子産生阻害効果を示し、またヒト肝臓キメラマウスに感染させた患者血由来 HCV の感染伝播を効率良く抑制できることを明らかにしてきた。感染性 HCV 粒子産生のどの過程において TXAS が関与するのかを以下の 3 点について解析した。i. Ozagrel で未処理あるいは処理した細胞の培養上清中の HCV 粒子の浮遊密度をシヨ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 で未処理あるいは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 で未処理あるいは処理した細胞内にお

る感染性 HCV 粒子産生量を細胞の凍結融解により得た細胞内ウイルス様粒子を用いて検討した。

2. 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。

(倫理面への配慮)

この研究で用いられているか不活化肝細胞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研究に基づくものである。不活化肝細胞作製に用いた肝臓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. 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。
2. Ozagrel 未処理あるいは処理した細胞内において感染性 HCV 粒子産生に関与する脂肪滴への 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。
3. 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。
4. 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。

5. 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。

D. 考察

1. Ozagrel 処理した細胞の培養上清中の組換え体 HCV は、その大部分が非感染性の粒子であり、またその量は未処理のものと大きな相違はなかったことから、Ozagrel は感染性粒子の産生のみを阻害していると考えられた。
2. Ozagrel 処理した細胞中の HCV core タンパク質と NS5A タンパク質の局在は感染性粒子産生の場として知られる脂肪滴に認められ、未処理のものと相違はなかったことから、Ozagrel はこれら HCV タンパク質の細胞内局在には変化を与えないことがわかった。
3. Ozagrel 処理した細胞中で形成されている組換え体 HCV 量は、未処理のものと相違はなかったが、感染性が著しく減少していたことから、Ozagrel 処理は細胞内で感染性 HCV 粒子の形成あるいは成熟を阻害している可能性が示唆された。
4. TP アゴニストやアンタゴニストは Ozagrel の効果を抑制したり、再現することがなかったため、Ozagrel の効果は TP には依存しないシグナル系が関与している可能性が考えられた。

E. 結論

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。またこの過程における TXAS 作用機序についての詳細は不明であるが、少なくともその酵素反応産物 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た。この新たなシグナル経路の中

に、特異的にしかも効率良く感染性 HCV 粒子産生を阻害することが可能になる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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata, Tsukasa Seya: In vitro models for the analysis of HCV life cycle, *Microbiol. and Immunol.*, 2012, 56, 1, 1-9.

2. 学会発表

1) Yoji Tsugawa and Makoto Hijikata: Hepatocyte-specific innate immune systems in response to RNA virus infection. The 10th International Student Seminar. Kyoto, 5-8 March 2012.

2) Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Critical role of Interferon alpha constitutively produced in-human hepatocytes in response to virus infection. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 11-14 September 2012

3) Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Hepatocyte-specific innate immune systems in response to viral infection. 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Venice, Italy, Oct 5-9, 2012

4) Misao Kuroki, Mariko Inoue. Makoto Hijikata,

Masanori Ikeda Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Nobuyuki Kato, Yasuo 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

5) 津川 陽司、土方 誠: ヒト肝細胞における抗ウイルス自然免疫応答機構の解析、第8回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島、平成24年7月6日

6) 土方 誠: C型肝炎ウイルス培養系開発過程で最近わかったこと、国立感染症研究所肝炎セミナー、国立感染症研究所、東京平成24年年10月31日

6) 津川陽司、加藤博己、藤田尚志、下遠野邦忠、土方誠: ヒト肝細胞における抗ウイルス自然免疫応答機構の解析、第60回日本ウイルス学会学術集会。大阪2012年11月13-15日

7) 有海康雄、黒木美沙緒、井上万里子、土方誠、池田正徳、脇田隆字、下遠野邦忠、加藤宣之: P-body因子とHCVのクロストーク、第60回日本ウイルス学会学術集会。大阪2012年11月13-15日

8) Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Constitutively produced Interferon $\alpha 1$ functions in prevention of viral infection in human hepatocytes、第35回日本分子生物学会年会。福岡2012年12月11~14日

H. 知的取得権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし。
2. 実用新案登録 特になし。
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（平成24年度）

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

分担研究者：田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科

研究協力者：村上 周子 名古屋市立大学大学院医学研究科

杉山 真也 国立国際医療研究センター

分担研究課題：HBV 増殖機構の解析と新規治療法の開発

研究要旨：培養細胞株は3次元化して培養し組織化させることでその性質が変化することが知られている。スフェロイドと呼ばれる組織様の細胞塊による培養系を用いて、ヒト肝細胞キメラマウスの肝組織より単離した肝細胞によるB型肝炎ウイルス（HBV）の3次元培養実験を行った。培地にウイルス粒子を含むHBV感染患者血清を添加してHBVを感染させた（ $>10^5$ copies/ml）。その結果、培養上清中にHBs抗原の増加を認めた。約1ヶ月間の培養期間を通じた上清中のHBV-DNA量は 10^5 - 10^6 copies/mlであり、長期培養下で感染の持続を確認した。今後、HBV培養系の実用化に向けた改良を重ねるとともに、この系を用いてHBV各種変異体の感染効率の違いや新規抗ウイルス薬のスクリーニングなどについても検討を行いたい。

A. 研究目的

3次元培養系におけるB型肝炎ウイルス（HBV）の感染・複製の可能性について検討している。今年度は、ヒト肝細胞キメラマウスの肝組織より単離した肝細胞を用いてスフェロイド形成による3次元培養を行い、患者血清からのHBV感染・複製を試みた。

B. 研究方法

- 1) 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。
- 2) 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) 3次元培養系に患者血清を 10^5 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。

（倫理面への配慮）

患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については

米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

C. 研究結果

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。

D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞による3次元培養は、肝組織より単離した初代培養であるため、より生体に近い状態での検討が期待できる。今年度の研究で用いたスフェロイド培養系では、約1ヶ月間は細胞塊の形状を維持している。この培養系を用いた長期間での培養実験により、各種変異体の感染効率の違いやHBV感染・複製様式、粒子放出過程などが解析できる。また、患者血清からの感染が可能であり、同一の感染源に関して、キメラマウス、キメラマウス肝細胞を用途に応じて選択、あるいはin vivoとin vitroの比較検討も行えるため、検体別の多様な解析が期待できる。引き続き、HBV培養上清からのin vitroにおけ

る再感染実験を検討中である。今後、この系を用いた感染防御実験（特にワクチンエスケープミュータントに関して）、標的分子薬剤の探索研究や新規治療法の開発研究の可能性を検討していきたい。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y, Murakami S, Attia FM, Hassan AA, Hassan MF, Shedid MM, Abdel Reheem HB, Khan A, Mizokami M. Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt. *J Med Virol.* 2012; 84(4): 587-95.
- 4) 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.
- 5) 渡邊綱正, 菅内文中, 楠本茂, 新海登, 飯尾悦子, 松浦健太郎, 日下部篤宣, 宮木知克, 野尻俊輔, 田中靖人. 多剤耐性変異を認めた悪性リンパ腫合併 B 型慢性肝炎に対しテノフォビルが著効した一例. *肝臓.* 2012; 53(1): 35-41.
- 6) 杉浦時雄, 遠藤剛, 伊藤孝一, 鈴木伸宏, 齋藤伸治, 田中靖人. 高ウイルス量妊婦へのラミブジン投与による B 型肝炎ウイルス母子感染予防. *肝臓.* 2012; 53(10): 610-614.
- 7) 新海登, 田中靖人, 杉山真也, 溝上雅史. 【B 型肝炎の抗ウイルス療法の進歩と耐性】核酸アナログ耐性変異パターン解析とその対策. *消化器内科.* 2012; 54(5): 582-585.

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Iio E, Shinkai N, Matsuura K, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, Tanaka Y. Immune restoration Hepatitis B associated with anti-retroviral therapy for human immunodeficiency virus. 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sept. 22-25, 2012. Oxford, England.
- 3) 新海登, 田中靖人, 松浦健太郎, 溝上雅史. B 型慢性肝炎患者における核酸アナログ中止症例の検討～中止後長期観察例、プレコア/コアプロモーター変異をふまえて～. 第 48 回日本肝臓学会総会. 平成 24 年 6 月, 石川.
- 4) 田中靖人. ウイルス性肝炎・肝硬変における検査の進歩. 日本臨床検査自動化学会第 44 回大会. 平成 24 年 10 月, 横浜.
- 5) 柏木有美, 可児里美, 都築祐二, 松浦健太郎, 五藤孝秋, 大橋実, 脇本幸夫, 田中靖人. リアルタイム PCR 法を用いた Abbott m2000 system による HBV-DNA 定量測定の基礎的検討. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会. 平成 24 年 11 月, 京都.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

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

分担研究者：森石恆司 山梨大学医学部 教授
研究協力者：葛西宏威 山梨大学医学部 助教
山下篤哉 山梨大学医学部 助教

分担課題名：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

研究要旨：C 型肝炎ウイルス (HCV) の NS5A と結合する FK506 binding protein 8 (FKBP8) はウイルス複製に必須であることを我々は 2006 年に報告している。本研究では、抗 HCV 化合物の標的因子となる宿主蛋白質同定をめざし、FKBP8 に関連した内在因子の同定を試みた。その結果、レプリコン細胞株によって FKBP8 の依存度が異なることを明らかにし、宿主蛋白質因子 FKBP6 が HCV 複製に重要な役割を担うことを明らかにした。さらに、抗 FKBP8 化合物 DM-CHX が抗 HCV 化合物のリード化合物候補になり、その誘導体も抗 HCV 活性を持つことを明らかにした。これらの成果は、新規抗 HCV 薬開発に繋がるものと考えられる。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染者は、世界で二億人、国内で約 200 万人いると推定されている。HCV は、一旦感染すると高率に持続感染に移行し、慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌を高い確率で発症させる。本邦の肝癌の約 8 割は、HCV 感染に起因するとされ、先進国に多い高ウイルス量タイプのウイルス遺伝子型 1 の感染者に対しての治療法は完全に確立されたとは言えない。現行で最も有効な治療法であるインターフェロン/リバビリンによる併用療法の著効率は約 50%程度に留まるが、新規 NS3 プロテアーゼ抑制剤の登場により、より高い著効率が報告されている。しかしながら、副作用や耐性ウイルスを出現されることから、予断の許さない状況が続くと思われ、今後も抗 HCV 剤開発は必要と考えられる。

フラビウイルス科に属する HCV はプラス鎖 RNA ゲノムを持つエンベロープウイルスである。そのウイルスゲノムに単一のポリプロテイン前駆体がコードされており、宿主およびウイルスプロテアーゼによって切断を受け、10 個のウイルス蛋白質に成熟する。C 末端側 2/3 の領域に非構造蛋白質がコードされ、ウイルスゲノム複製に機能する。NS5A はウイルス複製に必須の非構造蛋白質の一つであるが、それを標的にした化合物は

非常に低濃度で抗 HCV 効果を発揮することが報告されている。

以前、我々はウイルスゲノム複製に宿主蛋白質 FKBP8 が必要であることを報告している。このタンパク質は NS5A に結合し、Hsp90 と共にウイルス複製の場である membranous web へリクルートされ、ウイルスタンパク質のフォールディングに機能する。FKBP8 との結合に NS5A 内の 121 番目の Val (あるいは Ile) が重要で、このアミノ酸残基を Ala に置換すると、ウイルス複製は完全に抑制される。FK506 結合タンパク質 (FKBP)

ファミリーが分類されるイムノフィリンで 3 つの TPR をもつものは、FKBP8, FKBP51, FKBP52, FKBP36, そして Cyclophilin 40 が知られている。平成 24 年度の本研究で新規内在性標的因子を同定することを目的として、FKBP ファミリー中で、FKBP8 以外の新規宿主因子の同定を試み、FKBP8 あるいは新規標的因子に対する抗 HCV 剤開発を試みた。

B. 研究方法

遺伝子型 1b の 0 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