

図11. WT,HCV Tgマウスへの脾臓樹状細胞移入実験

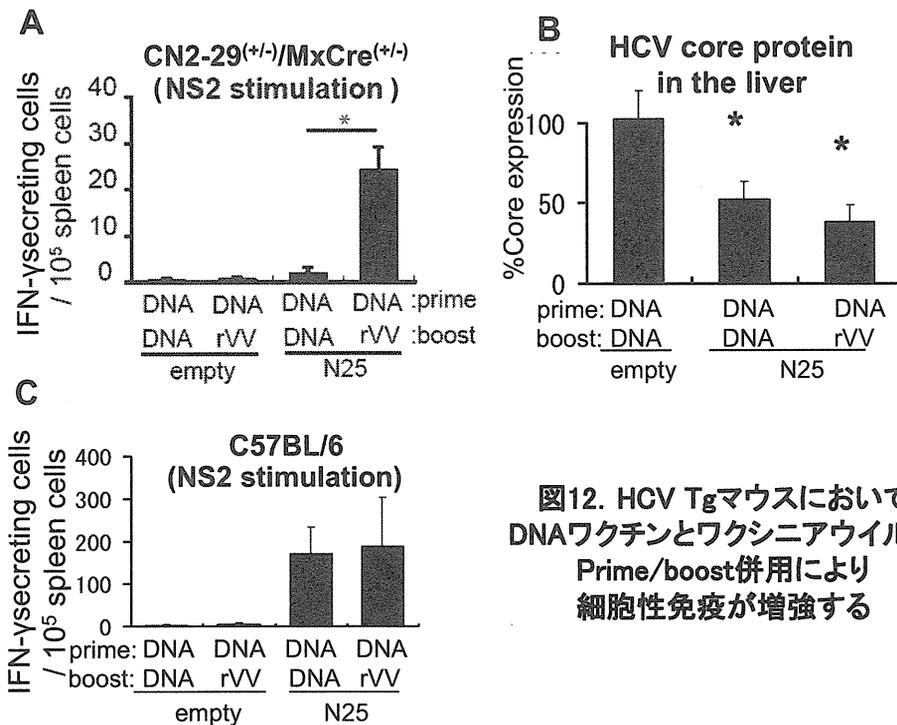


図12. HCV Tgマウスにおいて DNAワクチンとワクシニアウイルス Prime/boost併用により 細胞性免疫が増強する

平成 22 年度～24 年度 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型肝炎ウイルスのトランスパッケージング型粒子の産生、感染機構の解析、および中和  
抗体の評価

鈴木 亮介 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

**研究要旨：**複数の遺伝子型／株由来の構造蛋白質を用い、C型肝炎ウイルス（HCV）の 1 回感染性トランスパッケージング型粒子（HCVtcp）の産生系を確立した。HCV感染の初期過程の解析には、これまでレトロウイルス表面にHCVのエンベロープ蛋白質を被せた偽ウイルス（HCVpp）が汎用されて来たが、抗CD81抗体および抗ApoE抗体による感染中和を調べたところ、HCVppはHCVtcpや培養細胞由来のHCV（HCVcc）とは粒子構造や感染機構が異なる可能性が示唆され、HCVtcpはHCV本来の性質を保持した感染初期過程の解析に有用なツールであると考えられた。そこでHCVtcpを用いてウイルスの細胞侵入過程であるエンドサイトーシス経路を解析し、HCV感染経路として新たにクラスリン非依存性エンドサイトーシス経路の存在を明らかにした。またHCVエンベロープ蛋白質であるE1およびE2に対するモノクローナル抗体あるいはウサギ抗血清の中和活性の評価に用い、遺伝子型の異なるHCVtcpに対して中和活性を示すモノクローナル抗体を見いだした。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は、持続感染化し肝臓癌に至る重大な感染症であり、現在のウイルス保有者数は世界で 1.7 億人、国内で 150 万人以上と言われている。その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝癌へと移行し、肝癌による死亡者数は国内で年間 3 万人を超えている。有効な新規治療薬が開発され治療成績も改善されつつあるが、難治療の症例も未だ存在する事から、さらに新しい治療法の開発も求められており、そのためにも HCV の生活環についてのより詳細な理解が必要不可欠である。

これまでHCV生活環の中でも感染初期段階であるウイルスの細胞侵入過程の解析や中和抗体の評価には、レトロウイルス表面にHCVのエンベロープ蛋白質を被せた偽ウイルス（HCVpp）が用いられてきた。しかしHCVppは肝臓由来ではない細胞で作製され、またそのウイルス粒子中にレトロウイルス由来の蛋白質を含む事から、培養細胞由来のHCV（HCVcc）とは部分的に異なる性質を有する事が明らかになりつつある。

本研究では、HCVワクチン等により免疫誘導された抗体の感染中和活性を正しく評価する為に、HCVpp と同様に 1 回感染性で

ありながら、よりHCV本来の性質に近いと考えられるトランスパッケージング型HCV粒子(HCVtcp)の産生系を確立し、抗CD81抗体および抗ApoE抗体による感染中和をHCVppおよびHCVccと比較した。またHCVtcpを用いてHCV感染におけるエンドサイトーシス経路について解析し、さらに抗HCVエンベロープ抗体の感染中和活性の評価を行った。

## B. 研究方法

複数の遺伝子型/株由来のHCVの遺伝子配列を用い、coreからNS2領域を発現するプラスミドを作製した。一方で、JFH-1株のレプリコン（構造蛋白質領域を欠損し、EMCV-IRESおよびF luc遺伝子を挿入したもの）cDNAをpolI promoter/terminator間に挿入したレプリコンプラスミドを作製した。これらの2種類のプラスミドをHuh7.5.1細胞へトランスフェクションしてHCVtcpを作製した。HCVtcpとHCVpp、HCVccについて、Huh7.5.1細胞への感染における抗CD81抗体および抗ApoE抗体の影響を調べた。またHCVに対して感受性が高いHuh7細胞およびHuh7.5.1細胞について、各エンドサイトーシス経路に重要な宿主因子をsiRNAによりノックダウンし、HCVtcp感染後3日目の細胞内のルシフェラーゼ活性を調べる事により、HCV感染に関わるエンドサイトーシス経路の解析を行った。

さらにHCVのE1およびE2に反応するマウスモノクローナル抗体およびウサギ抗血清についての感染中和活性の評価の為に、段階希釈した各種抗体または抗血清とHCVtcp

を室温で1時間反応させ、その後ウイルス液をHuh7.5.1細胞に添加し、感染させた。2日後にLuc活性を測定し、コントロール群と比較する事により、抗体の感染中和活性を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験は行っていない。

## C. 研究結果

遺伝子型1a、1b、2a、3a由来の構造蛋白質を用いたHCVtcpの産生が認められた。HCVtcpとHCVpp、HCVccについて、抗CD81抗体および抗ApoE抗体による感染中和を調べたところ、抗CD81抗体はHCVtcp、HCVppおよびHCVccの感染を中和したが、HCVtcpとHCVccはHCVppに比べて著しく高い感受性を示した。また抗ApoE抗体はHCVtcpとHCVccの感染を中和したものの、HCVppの感染は中和しなかった。

エンドサイトーシス経路の解析では、クラスリン依存性およびカベオリン依存性エンドサイトーシスに関与する3つの分子（クラスリン、カベオリン、ダイナミン）のノックダウンを行った。Huh7細胞ではクラスリンおよびダイナミンのノックダウンによりHCVtcp感染の抑制が認められた。しかしながらHuh7.5.1では感染の抑制は認められなかった。マクロピノサイトーシスに関与する2つの宿主因子（PAK1およびCTBP1）をノックダウンしてもHuh7.5.1では感染の抑制は認められなかった。

HCVのE1およびE2に反応するマウスモノクローナル抗体およびウサギ抗血清につい

て感染中和活性を評価した結果、中和活性を持つモノクローナル抗体を見いだした。このモノクローナル抗体は、遺伝子型の異なる複数の株のHCVtcpに対しても中和活性を示した。

#### D. 考察

HCVtcpとHCVppは粒子構造や感染機構が異なる事から、細胞侵入過程においても違いがある可能性が示唆された。HCVtcpはHCVppのように他のウイルス蛋白を利用しておらず、またHCVが増殖可能な肝臓由来の細胞で作製する事から、HCVppに比べてよりHCV本来の性質を反映した解析ツールであると考えられた。

このHCVtcpを用いて細胞侵入経路の解析を行ったところ、Huh7細胞ではクラスリン依存性エンドサイトーシス経路によって細胞侵入するが、Huh7.5.1細胞においては、クラスリン依存性およびカベオリン依存性エンドサイトーシスではなく、またマクロピノサイトーシス経路でもない、他の経路によって細胞侵入している可能性が示唆された。

本研究による複数の遺伝子型／株由来のHCVtcpを用いる事により、迅速、簡便な感染中和アッセイのスクリーニングが可能になり、幅広い遺伝子型に対して活性を示す中和抗体の探索が期待される。

#### E. 結論

HCVppに比べて、よりHCV本来の性質を反映した解析ツールと考えられるHCVtcpを、多くの株を用いて作製する事が可能と

なった。これらを用いた細胞侵入経路の解析により、従来報告されているクラスリン依存性エンドサイトーシスに加え、HCVがクラスリン非依存性エンドサイトーシス経路により細胞侵入している可能性が示唆された。また、抗体の感染中和活性の評価を行い、中和活性を有するモノクローナル抗体を見いだした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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*. 432:29-38 (2012)
- 2) Murayama A, Sugiyama N, Watashi K, Masaki T, Suzuki R, Aizaki H, Mizuochi T, Wakita T, Kato T. Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays. *J Clin Microbiol*. 50:1943-1949 (2012)
- 3) 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*. 8:e1002561. (2012)
- 4) Winkelmann ER, Widman DG, Suzuki R, Mason PW. Analyses of mutations selected by passaging a chimeric flavivirus identify mutations that alter infectivity and reveal an interaction between the structural proteins and the nonstructural glycoprotein NS1. *Virology*. 421:96-104 (2011)
- 5) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H,

- Wakita T, Suzuki T. Role of the ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J. Biol. Chem.* 286: 37264-37273 (2011)
- 6) Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology.* 52: 411-420 (2010)
- 7) Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J. Virol.* 84: 5824-5835 (2010)
2. 学会発表
- 1) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Identification of the signal peptidase complex subunit 1 as a novel host factor that participates in the assembly of hepatitis C virus. The 11<sup>th</sup> Awaji international forum on infection and immunity. Awaji, Japan. 2012. 9. 11-14.
- 2) Matsumoto Y, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Matsuura T, Suzuki T, Miyamura T, Ichinose S, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro. The 11<sup>th</sup> Awaji international forum on infection and immunity. Awaji, Japan. 2012. 9. 11-14.
- 3) Uchida N, Saeed M, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Characterization of anti-HCV release inhibitors targeting phospholipase D. 19<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy 2012.10.5-9.
- 4) Matsumoto Y, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Matsuura T, Suzuki T, Miyamura T, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro. 19<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy 2012.10.5-9.
- 5) Uchida N, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Chiba J, Wakita T. Phospholipase D regulates membrane trafficking during Hepatitis C virus egress. 19<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy 2012.10.5-9.
- 6) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. An alternative endocytosis pathway for the productive entry of Hepatitis C virus. 19<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy 2012.10.5-9.
- 7) Ito M, Suzuki R, Wakita T, Suzuki T. Permissivity of HuH-7-derived oval-like cells to HCV infection and replication. 19<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy 2012.10.5-9.
- 8) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and participates in the assembly of the virus through an interaction with E2 and NS2. The 34<sup>th</sup> Infection, immunity and their control for health: Mucosal barrier, pathogen and vaccine. Sapporo, Japan. 2012. 10. 16-19.
- 9) Aly H.H, Suzuki R, Oshiumi H, Wakita T, Seya T. Overcoming host restriction barriers for HCV infection in mouse. The 34<sup>th</sup> Infection, immunity and their control for health: Mucosal barrier, pathogen and vaccine. Sapporo, Japan. 2012. 10. 16-19.
- 10) 伊藤昌彦、鈴木亮介、福原崇介、松浦善治、脇田隆字、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。日本ウイルス学会第60回学術集会、大阪、2012年11月13-15日。
- 11) 渡士幸一、内田奈々子、大東卓史、清原知子、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字。IL-1およびTNF-alphaのB型肝炎ウ

- イルス感染阻害効果. 日本ウイルス学会第60回学術集会, 大阪, 2012年11月13-15日.
- 12) 松田麻未、鈴木亮介、渡士幸一、相崎英樹、松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆字. C型肝炎ウイルスの一過性感染性粒子を用いた細胞内侵入機構の解析. 日本ウイルス学会第60回学術集会, 大阪, 2012年11月13-15日.
- 13) 松本喜弘、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、松浦知和、鈴木哲朗、宮村達男、和氣健二郎、脇田隆字、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. 日本ウイルス学会第60回学術集会, 大阪, 2012年11月13-15日.
- 14) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and participates in the viral assembly. The 10<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”. Tokyo, Japan. 2012.11. 21-22.
- 15) Matsuda M, Suzuki R, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T. An alternative endocytosis pathway for the infectious entry of Hepatitis C virus. The 10<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”. Tokyo, Japan. 2012.11. 21-22.
- 16) Ito M, Suzuki R, Wakita T, Suzuki T. Epigenetic reprogramming of HuH-7 cells shift cellular permissivity to HCV. The 10<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”. Tokyo, Japan. 2012.11. 21-22.
- 17) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Phospholipase D is a cellular regulator during Hepatitis C virus egress and a possible target for antiviral strategy. The 10<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”. Tokyo, Japan. 2012.11. 21-22.
- 18) Aizaki H, Matsumoto Y, Goto K, Watashi K, Suzuki R, Fukasawa M, Hanada K, Sato S, Takahashi N, Matsuura Y, Motojima K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.
- 19) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Identification and functional analysis of small molecules inhibiting the late step of hepatitis C virus life cycle. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.
- 20) Takebe Y, Uenishi R, Tani H, Suzuki R, Takagi M, Hase S, Liao H, Tsuchiura T, Shinya K, Wakita T, Matsuura Y, Patel A. Small molecules that elicit strong anti-HCV activity through down-modulation of HCV entry receptor. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.
- 21) Fukasawa M, Shirasago Y, Saito K, Murakami Y, Fukazawa H, Suzuki T, Suzuki R, Wakita T, Hanada K, Chiba J. Isolation of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.
- 22) Goto K, Kimura T, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Miyamura T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. Identification of novel NS5A-associated proteins in the host-cell membrane fraction and their role in HCV life cycle. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.
- 23) Uchida N, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Chiba J, Wakita T. Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus

- life cycle. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.
- 24) Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, Aizaki H. Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with NS2. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.
- 25) Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita K, Aizaki H. Identification of host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. 2011 9. 11-16.
- 26) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. 2011 9. 11-16.
- 27) Matsumoto Y, Watashi K, Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. 2011 9. 11-16.
- 28) Suzuki R, Alazawa D, Ishii K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Entry mechanisms of hepatitis C virus examined by trans-complemented particles. 9th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses. Atlanta, GA, USA 2010. 5. 17-23.
- 29) Suzuki R, Alazawa D, Ishii K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Efficient production of trans-complemented hepatitis C virus particles: Use for study of viral entry process. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Yokohama, Japan 2010. 9. 10-14.
- 30) 鈴木亮介、齋藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗. C型肝炎ウイルスの *trans*-packaging型粒子を用いた感染機構の解析. 日本ウイルス学会第58回学術集会, 徳島, 2010年11月7-9日.
- 31) 鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗. 分割ユビキチン法を利用したHCV NS2と結合する宿主因子の探索およびウイルス粒子形成への関与. 第33回日本分子生物学会年会, 神戸市, 2010年12月7-10日.

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

1) 発明の名称：新規組換え型ヒトC型肝炎ウイルス様粒子とその産生方法

出願人：国立感染症研究所、財) 東京都医学研究機構、東レ株式会社

発明者：脇田隆字、石井孝司、鈴木哲朗、鈴木亮介、宮村達男、田邊純一、曾根三郎  
特許番号：1930416、登録国：E P。

2) 発明の名称：C型肝炎ウイルス粒子高生産系

発明者：脇田隆字、石井孝司、鈴木哲朗、鈴木亮介、宮村達男、田邊純一、曾根三郎  
特許番号：1956087、登録国：E P

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表  
(2010年4月1日～2013年3月31日迄)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasui F. et al. (小原)	Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication	<i>J.Med. Virol.</i>	85	241-249	2013
Watanabe T. et al. (小原)	Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- $\alpha$ in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene	<i>Gut</i>	In press		2013
Kasama Y. et al. (小原)	Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3	<i>Virus Res.</i>	163	405-409	2012
Saito M. et al. (小原)	Hepatitis C virus induces overexpression of 3 $\beta$ -hydroxysterol $\Delta$ 24-reductase through Sp1	<i>J. Med. Virol.</i>	84	733-746	2012
Weng L. et al. (小原)	Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase	<i>Gene</i>	496	79-84	2012
Konishi H. et al. (小原)	An orally available, small-molecule interferon inhibits hepatitis C virus replication	<i>Sci. Comm.</i>	2:259	1-9	2012
Kubota N. et al. (小原)	HSC90 is required for nascent hepatitis C virus core protein stability in yeast cells	<i>FEBS letter</i>	30:586	2318-2325	2012

Wang Q. et al. (小原)	PA from an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus activates viral transcription and replication, and induces apoptosis and interferon expression	<i>Virology Journal</i>	8:9	106-118	2012
Hirata Y. et al. (小原)	Self-enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis	<i>PLoS Pathog.</i>	8(8)	e1002860	2012
Aoki J. et al. (小原)	Kinetics of Peripheral Hepatitis B Virus-specific CD8+ T Cells in Patients with Onset of Viral Reactivation	<i>J. Gastroenterology</i>	In press		2012
Weng L. et al. (小原)	Different mechanisms of hepatitis C virus RNA polymerase activation by cyclophilin A and B in vitro	<i>Biochim Biophys Acta.</i>	1820(12)	1886-92	2012
Inoue K. et al. (小原)	Impairment of interferon regulatory factor-13 activation by hepatitis C virus core protein basic region 1	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	428(4)	494-499	2012
Sekiguchi S., Kimura K. et al. (小原)	Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver	<i>PLoS ONE</i>	7(12)	e51656	2012
Oshiumi, H. et al. (瀬谷)	Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus.	<i>Arch. Immunol. Therap. Exp.</i>	In press		2013
Toscano, F. et al. (瀬谷)	Cleavage of TLR3 by cathepsins generates two fragments that remain associated to form a functional receptor.	<i>J. Immunol.</i>	190	764-773	2013

Seya T. et al. (瀬谷)	TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis.	<i>Oncoimmunol.</i>	1	917-923	2012
Seya T. et al. (瀬谷)	TAMable tumor-associated macrophages in response to innate RNA sensing.	<i>Oncoimmunol.</i>	1	1000-1001	2012
Oshiumi, H. et al. (瀬谷)	Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. (review)	<i>J. Biochem. (Tokyo).</i>	151	5-11	2012
Aly, H. H. et al. (瀬谷)	In vitro models for analysis of the hepatitis C virus life cycle.	<i>Microbiol. Immunol.</i>	56(1)	1-9	2012
Yamazaki, S. et al. (瀬谷)	Dendritic cells from oral cavity induce Foxp3+ regulatory T cells upon antigen stimulation.	<i>PLoS ONE</i>	7(12)	e51665	2012
Shime H. et al. (瀬谷)	Toll-like receptor3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors.	<i>Proc Natl Acad Sci USA.</i>	109	2066-2071	2012
Abe, Y. et al. (瀬谷)	Toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice.	<i>J. Virol.</i>	86	185-194	2012
Azuma M. et al. (瀬谷)	Cross-presentation and antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C largely depend on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c+/CD8a+ dendritic cells.	<i>Oncoimmunol.</i>	1	581-592	2012
Yoshida, T. et al. (保富)	Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection.	<i>Archiv. Virol.</i>	In press		2013
Karamatsu K. et al. (保富)	Single systemic administration of Ag85B of mycobacteria DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma.	<i>J Asthma Allergy</i>	5	71-79	2012

Yoshida T. et al. (保富)	CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins	<i>Archives Virol</i>	15	363-368	2012
Tajiri K. et al. (保富)	Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis.	<i>J. Immunol</i>	189	2043-2053	2012
Uchida A. et al. (保富)	Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43.	<i>Brain</i>	135	833-846	2012
Saito A. et al. (保富)	Geographical genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque ( <i>Macaca fascicularis</i> ).	<i>J.Gen.Virol.</i>	93	594-602	2012
Higashino A. et al. (保富)	Whole-genome sequencing and analysis of the Malaysian cynomolgus macaque ( <i>Macaca fascicularis</i> ) genome.	<i>Genome Biol.</i>	Epub		2012
Tachibana S. et al. (保富)	<i>Plasmodium cynomolgi</i> genome sequences provide insight into <i>Plasmodium vivax</i> and their monkey malaria clade.	<i>Nature Genetics</i>	44	1051-1055	2012
Suzuki R. et al. (鈴木)	Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection.	<i>Virology</i>	432	29-38	2012
Murayama A. et al. (鈴木)	Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays.	<i>J Clin Microbiol.</i>	50	1943-1949	2012

Ando T. et al. (鈴木)	Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA.	<i>PLoS Pathog.</i>	8	E1002561	2012
Yoshikawa K. et al. (小原)	Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance	<i>Bioconjugate Chemistry</i>	22	42-49	2011
Arai M. et al. (小原)	Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA	<i>Arch. Virol.</i>	156	295-304	2011
Kimura K. et al. (小原)	Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury	<i>Journal of Leukocyte Biology</i>	89	433-442	2011
Kimura K. et al. (小原)	An experimental mouse model for hepatitis C virus	<i>Experimental Animals</i>	60	93-100	2011
Takano T. et al. (小原)	Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes	<i>J. Hepatology</i>	55	512-521	2011
Chiyo T. et al. (小原)	Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice	<i>Virus Res.</i>	160	89-97	2011
Satoh M. et al. (小原)	Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1	<i>J. Infect Dis.</i>	204	1172-1180	2011

Sancho-Shimizu, V., R. et al. (瀬谷)	Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency	<i>J. Clin. Invest.</i>	121	4889-4902	2011
Oshiumi, H. et al. (瀬谷)	The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection.	<i>J. Immunol.</i>	187	5320-5327	2011
Miyashita, M. et al. (瀬谷)	DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling.	<i>Molec. Cell. Biol.</i>	31	3802-3819	2011
Wakita, T. et al. (瀬谷)	Will there be an HCV meeting in 2020? Summary of the 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. (review)	<i>Gastroenterology</i>	141	e1-5	2011
Aly, H. H. et al. (瀬谷)	Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus.(HCV)	<i>PLoS ONE.</i>	6(6)	e21284	2011
Ogawa, T. et al. (瀬谷)	Natural killer cells recognize Friend retrovirus infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions <i>in vivo</i> .	<i>J. Virol.</i>	85	5423-5435	2011
Yamazaki S. et al. (瀬谷)	TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides <i>In Vivo</i> .	<i>PLoS ONE</i>	6(4)	e18833	2011
Seya T. et al. (瀬谷)	Natural killer cell activation secondary to innate pattern sensing. (review)	<i>J. Innate Immunity.</i>	3	1421-1426	2011
Sawahata, R. et al. (瀬谷)	Failure of mycoplasmal lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2.	<i>Microbes Infect.</i>	13	350-358	2011

Matsumoto, M. et al. (瀬谷)	Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. (review)	<i>Rev. Med. Virol.</i>	21	67-77	2011
Watanabe A. et al. (瀬谷)	Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation.	<i>J. Biol. Chem.</i>	286	10702-10711	2011
Takaki H. et al. (瀬谷)	Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- $\gamma$ -inducing potential	<i>Mol. Immunol.</i>	48	497-504	2011
Yabu, M. et al. (瀬谷)	IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid.	<i>Int. Immunol.</i>	23	29-41	2011
Iwasaki, Y., et al. (保富)	Long-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. <i>Frontiers Microbiol.</i>	<i>Frontiers Microbiol.</i>	in press		2012
Matsuo, K. et al. (保富)	<i>Mycobacterium bovis</i> bacille Calmette-Guérin as a vaccine vector for global infectious disease control.	<i>Tuberculosis Res. Treat.</i>	Epub		2011
Chono, H. et al. (保富)	<i>In vivo</i> safety and persistence of endoribonuclease gene-transduced CD4 <sup>+</sup> T cells in cynomolgus macaques for HIV-1 gene therapy model.	<i>PloS One</i>	Epub		2011
Li Xing. et al. (保富)	Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain.	<i>J. Virol</i>	85	1117-1124	2011
Chono, H. et al. (保富)	Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific <i>E. coli</i> mRNA interferase.	<i>Human Gene Ther.</i>	22	35-43	2011

Winkelmann ER, et al. (鈴木)	Analyses of mutations selected by passaging a chimeric flavivirus identify mutations that alter infectivity and reveal an interaction between the structural proteins and the nonstructural glycoprotein NS1.	<i>Virology</i>	421	96-104	2011
Saeed M, et al. (鈴木)	Role of the ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles.	<i>J. Biol. Chem.</i>	286	37264-37273	2011
Satoh K. et al. (小原)	Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice	<i>J. Med. Virol.</i>	82(9)	1545-1553	2010
Nuriya H. et al. (小原)	Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based <i>in situ</i> hybridization	<i>J. Clin. Microbiol.</i>	48(11)	3843-3851	2010
Kasama Y. et al. (小原)	Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas <i>in vivo</i>	<i>Blood</i>	116(23)	4926-4933	2010
Weng L. et al. (小原)	Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype specific manner	<i>J. Virology</i>	84(22)	11761-11770	2010
Oshiumi H. et al. (瀬谷)	The ubiquitin ligase rplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection.	<i>Cell host microbe.</i>	8	496-509	2010

Oshiumi H. et al. (瀬谷)	Hepatitis C virus (HCV) core protein promotes viral replication by abrogating IFN- $\beta$ -inducing function of DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase.	<i>PLoS ONE.</i>	5	e14258	2010
Ebihara, T. et al. (瀬谷)	Identification of a polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation.	<i>J. Exp. Med.</i>	207	2675-2687	2010
Tatematsu, M. et al. (瀬谷)	A molecular mechanism for Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation.(TICAM-1).	<i>J. Biol. Chem.</i>	285	20128-20136	2010
Azuma, M. et al. (瀬谷)	The peptide sequence of diacyl lipopeptides determines dendritic cell TLR2-mediated NK activation.	<i>PLoS ONE</i>	5	e12550	2010
Akazawa, T. et al. (瀬谷)	Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion.	<i>Cancer Sci.</i>	101	1596-1603	2010
Oshiumi, H. et al. (瀬谷)	DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN- $\beta$ inducing potential.	<i>Eur. J. Immunol.</i>	40	940-948	2010
Sasai, M. et al. (瀬谷)	Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor of the Toll-like receptor 3/4 pathway.	<i>Molec. Immunol.</i>	47	1283-1291	2010
Seya, T. et al. (瀬谷)	Pattern-recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. (review)	<i>Cancer Sci.</i>	101	313-320	2010

.Yoshida,T.et al. (保富)	Characterization of natural killer cells in tamarins: a technical basis for studies of innate immunity.	<i>Frontiers Microb iol.</i>	in press		2011
Yasutomi Y. et al. (保富)	Establishment of Specific Pathogen-Free Macaque Colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research.	<i>Vaccine</i>	B	75-77.	2010
Fujimoto,K.et al. (保富)	Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys.	<i>Comp.Med.</i>	60	51-53.	2010
Cueno,M.E.et al. (保富)	Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant.	<i>Transgenic Res.</i>	19	889-895	2010
Moriishi K.et al. (鈴木)	Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus.	<i>Hepatology.</i>	52	411-420	2010
Masaki T.et al. (鈴木)	Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription.	<i>J. Virol.</i>	84	5824-5835	2010

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# Synthetic Lipophilic Antioxidant BO-653 Suppresses HCV Replication

Fumihiko Yasui,<sup>1</sup> Masayuki Sudoh,<sup>2</sup> Masaaki Arai,<sup>3</sup> and Michinori Kohara<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Cell Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Setagaya-ku, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Kamakura Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Kanagawa, Japan

<sup>3</sup>Biologics Research Department, Advanced Medical Research Laboratories, Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Osaka, Japan

The influence of the intracellular redox state on the hepatitis C virus (HCV) life cycle is poorly understood. This study demonstrated the anti-HCV activity of 2,3-dihydro-5-hydroxy-2,2-dipentyl-4,6-di-*tert*-butylbenzofuran (BO-653), a synthetic lipophilic antioxidant, and examined whether BO-653's antioxidant activity is integral to its anti-HCV activity. The anti-HCV activity of BO-653 was investigated in HuH-7 cells bearing an HCV subgenomic replicon (FLR3-1 cells) and in HuH-7 cells infected persistently with HCV (RMT-tri cells). BO-653 inhibition of HCV replication was also compared with that of several hydrophilic and lipophilic antioxidants. BO-653 suppressed HCV replication in FLR3-1 and RMT-tri cells in a concentration-dependent manner. The lipophilic antioxidants had stronger anti-HCV activities than the hydrophilic antioxidants, and BO-653 displayed the strongest anti-HCV activity of all the antioxidants examined. Therefore, the anti-HCV activity of BO-653 was examined in chimeric mice harboring human hepatocytes infected with HCV. The combination treatment of BO-653 and polyethylene glycol-conjugated interferon- $\alpha$  (PEG-IFN) decreased serum HCV RNA titer more than that seen with PEG-IFN alone. These findings suggest that both the lipophilic property and the antioxidant activity of BO-653 play an important role in the inhibition of HCV replication. *J. Med. Virol.* 85:241–249, 2013. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** BO-653; antioxidant activity; chemical structure; HCV replication; chimeric mice

## INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) causes persistent infection, leading to chronic liver diseases including chronic

hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. In 2009, the number of patients with HCV infection worldwide was estimated to be 130–170 million [Lavanchy, 2009]. Recent years have seen the development of several promising treatments for patients infected with HCV. The addition of a protease inhibitor (boceprevir or telaprevir) to polyethylene glycol-conjugated interferon- $\alpha$  (PEG-IFN) and ribavirin improved dramatically the sustained virological response rates in treatment-naive patients with genotype 1 infections. However, the sustained virological response rate of triple therapy with a telaprevir-based regimen in null responders treated with PEG-IFN/ribavirin is only 30% [Fontaine and Pol, 2011; Kumada et al., 2012]. There is concern that high-risk groups such as patients with the *IL28B* minor allele (rs8099917 SNP; GT/GG), the elderly, or those with fibrosis will be resistant to the triple therapy [Suppiah et al., 2009; Tanaka et al., 2009]. Therefore, new therapeutic strategies are required to treat HCV infection.

Chronic HCV infection is closely associated with oxidative stress. Oxidative stress reflects an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the activity of intracellular antioxidant systems. The cumulative evidence from experimental

Grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; Grant sponsor: Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Science of the National Institute of Biomedical Innovation of Japan; Grant sponsor: Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

Conflict of interest: Dr. Sudoh is an employee of Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. The other authors declare no potential conflicts of interest.

\*Correspondence to: Michinori Kohara, Department of Microbiology and Cell Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6, Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan. E-mail: kohara-mc@igakuken.or.jp

Accepted 9 October 2012

DOI 10.1002/jmv.23466

Published online 28 November 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).