

201227015B

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

C型肝炎ウイルスの非構造蛋白5Aを標的とした
新規治療法の開発に関する研究

平成22年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 政木 隆博（平成22年4月～平成23年8月）
村山 麻子（平成23年9月～平成25年3月）

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

C型肝炎ウイルスの非構造蛋白5Aを標的とした
新規治療法の開発に関する研究

平成22年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 政木 隆博（平成22年4月～平成23年8月）
村山 麻子（平成23年9月～平成25年3月）

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 総合研究報告 -----	1
C型肝炎ウイルスの非構造蛋白 5 A を標的とした新規治療法の開発に関する研究 政木隆博・村山麻子	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	15
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	17

I . 総合研究報告

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

研究代表者

政木隆博(平成 22 年 4 月～平成 23 年 8 月)

国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

村山麻子(平成 23 年 9 月～平成 25 年 3 月)

国立感染症研究所 ウイルス第二部 研究員

研究要旨：本研究は、HCV のリン酸化蛋白質 NS5A を標的とした新規治療法の開発を目的としている。網羅的解析および HCV 培養細胞増殖系を用いた解析により HCV の生活環に関わる 3 種類のプロテインキナーゼを同定した。これらのプロテインキナーゼが NS5A の細胞内局在を規定することにより、HCV の粒子形成過程に関与していることを明らかにした。さらに、これらのプロテインキナーゼの特異的阻害剤には抗 HCV 作用があることを見いだした。薬剤の評価のために様々な遺伝子型の NS5A に対する抗 HCV 薬の効果を評価する系を樹立し、その系を用いて NS5A 阻害薬の評価を行った。遺伝子型 1a、1b の NS5A を持つウイルスは第一世代の NS5A 阻害薬(BMS-790052)には感受性が高く、遺伝子型 2a、2b の NS5A を持つウイルスは感受性が低かった。しかし、第二世代の NS5A 阻害薬は、いずれの遺伝子型のウイルスの増殖も低濃度で阻害した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染者は現在日本で約200万人いると推定されている。感染後は持続感染により肝炎が慢性化し、肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症することが知られており、公衆衛生上きわめて重要な問題となっている。肝発癌を防ぐためにはウイルス排除が重要である。現在の主な治療法はペグインターフェロンとリバビリンの併用療法であるが、その効果は血中ウイルス量、ウイルスの遺伝子型や患者自身の持つ遺伝子変異によっても大きく異なる。したがって、

従来の抗HCV薬と異なる作用点をもつ新規治療法の開発は厚生労働行政上急務である。

HCVの非構造蛋白質であるNS5Aはリン酸化蛋白質であり、NS5Aのリン酸化はウイルスゲノム複製や感染性ウイルス粒子形成に重要であることが報告されている。したがって、NS5Aのリン酸化を制御するプロテインキナーゼ(PK)の同定は、HCV生活環を理解する上で重要であり、また新たな創薬ターゲットになりうると考えられる。

本研究は、NS5Aを標的とした新規治療法の開発を目的とした研究である。平成22年度はNS5Aのリン酸化に関与する責任PKの同

定とHCVゲノム複製を制御するNS5A蛋白質結合ペプチドの開発・取得を行った。平成23年度はNS5Aをリン酸化するPKのHCV生活環への関与および、そのメカニズムの解析を行った。また、PK特異的阻害剤の抗HCV効果の検討も行った。平成24年度は薬剤の評価のために、様々な遺伝子型のNS5Aに対する効果を評価できる抗HCV薬評価系を樹立し、その系を用いてNS5A阻害薬の評価を行った。

B. 研究方法

1) NS5A蛋白質と強く相互作用するプロテインキナーゼの探索

JFH-1株(遺伝子型2a)のNS5A蛋白質をコムギ胚芽無細胞転写・翻訳系で合成し精製した。また、404種類のヒトPKを包括するcDNAライブラリーから同様の方法で精製PKを取得した。精製NS5Aと精製PKの相互作用はハイスループットな定量解析が可能であるAlphaScreen法を用いて解析した。

2) *in vitro* リン酸化アッセイ

NS5A蛋白質に対するリン酸化能の評価は、精製PKを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在化において精製NS5A蛋白質と混和し、SDS-PAGEで展開後、オートラジオグラフィーを用いてリン酸化NS5A蛋白質のバンドを検出することにより行った。

3) PKのノックダウンがHCV粒子産生に与える影響の解析

HuH-7細胞にPKのsiRNAを導入し、2日後にHCV RNAを導入し、さらに3日間培養の後、細胞、培養上清を回収した。細胞内、培養上清のコア抗原量はCLEIA法で測定した。

4) PKのノックダウンがHCV侵入過程に与える影響の解析

HCV侵入過程の解析はHCVのエンベロープ蛋白質を持ったシュードウイルス(HCVpp)を用いた。HuH-7細胞にPKのsiRNAを導入し、2日後にHCVppを感染させ、さらに3日間培養の後、細胞を回収した。HCVppの侵入効率は細胞抽出液のルシフェラーゼの値を比較することにより評価した。

5) PKのノックダウンがHCVゲノム複製に与える影響の解析

HCVゲノム複製能はサブゲノミックレプリコンを用いて解析した。HCVレプリコンRNA導入細胞のPKの発現をsiRNAによりノックダウンし、HCVゲノム複製能に与える影響を解析した。HCVゲノム複製能は細胞抽出液のルシフェラーゼの値を比較することにより評価した。

6) PKのノックダウンがHCV粒子形成過程に与える影響の解析

HCV粒子形成能を解析するために、全長HCV RNA導入細胞におけるPKの発現をsiRNAによりノックダウンした。細胞中でのコア抗原量に対する感染力価の比

(Specific Infectivity) を計算することにより感染性ウイルス粒子の形成効率を評価した。

7). PK のノックダウンが NS5A の細胞内局在に与える影響の解析

HuH-7 細胞に PK に対する shRNA を発現するベクターを導入し、1 日後に HCV を multiplicity of infection (moi)=5 で感染させた。この shRNA 発現ベクターを細胞に導入すると、その細胞では同時に mCherry も発現するため、mCherry の発現により shRNA 発現細胞を見分けることができる。感染 3 日後に細胞を固定し、抗コア抗体および抗 NS5A 抗体で染色した。

8). PK のノックダウンが NS5A のリン酸化状態に与える影響の解析

HCV 感染細胞および HCV 感染 PK ノックダウン細胞の細胞抽出液中の NS5A 蛋白質のリン酸化状態をウエスタンブロッティング法により解析した。

9). PK による NS5A のリン酸化部位の同定

HCV 感染細胞および HCV 感染 PK ノックダウン細胞の細胞抽出液から NS5A 蛋白質を抗 NS5A 抗体を用いて精製し、質量分析法により解析した。

10). PK 阻害剤の HCV 増殖抑制効果の検討

HCV RNA を細胞に導入し、4 時間後に各 PK 阻害剤を 0-30 μ M の濃度で添加した。3 日後の培養上清のコア抗原量を測定し、薬剤

無添加時の培養上清のコア抗原量と比較し、各 PK 阻害剤の抗 HCV 効果を評価した。

11). HCV ゲノム複製を制御する NS5A 結合環化ペプチドの取得

大腸菌発現システムを利用し、JFH-1 株 NS5A 蛋白質の domain I 領域を発現させ、精製した。この精製 NS5A 蛋白質を用いて東京大学先端科学技術研究センターと共同でスクリーニングを行い、11 種類の NS5A 結合ペプチドを取得した。次に、取得ペプチドを Protein Transduction Kit (Jena Bioscience) を用いて HCV サブゲノミックレプリコン細胞に導入し、各 NS5A 結合環化ペプチドの抗 HCV 作用を解析した。

12). NS5A を各遺伝子型のウイルス株由来の配列に置換した JFH-1 キメラウイルスゲノムの作製

HCV JFH-1 株の全長を組み込んだプラスミド(pJFH1)の NS5A 領域を PCR 法により H77 株(遺伝子型 1a)、Con1 株(1b)、J6CF 株(2a)、MA 株(2b)由来の配列に置換したコンストラクトを作製した。

13). NS5A を各遺伝子型のウイルス株由来の配列に置換した JFH-1 キメラウイルスの増殖能の検討

全長の各キメラウイルスの合成 RNA を Huh-7.5.1 細胞にトランスフェクションし、継時的に細胞、培養上清を回収した。細胞内、培養上清のコア抗原量は CLEIA 法で測定した。培養上清の感染性は感染 3 日後の感染フ

オーカスの測定により決定した。さらに細胞中でのコア抗原量に対する感染力価の比 (Specific Infectivity) を計算することにより感染性ウイルス粒子の形成効率を評価した。

14). NS5A 阻害剤の HCV 増殖抑制効果の検討

HCV RNA を細胞に導入し、4 時間後に各 NS5A 阻害剤を 0、0.5、5、50、500、5000 (pM) の濃度で添加した。2 日後の細胞内のコア抗原量を測定し、薬剤無添加時の細胞内のコア抗原量と比較し、各 NS5A 阻害剤の抗 HCV 効果を評価した。細胞傷害性は CellTiter96 を用いて評価した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は国立感染症研究所内のバイオリスク管理委員会、組換え DNA 実験委員会等の承認を受けて行った。組換え HCV の作製は遺伝子組換え生物等の第二種使用等にあたるため「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号) の規定に従って申請を行い、承認を得た(大臣確認通知番号 大 20-9 平成 18 年 1 月 23 日付 17 国文科振第 47 号、及び平成 18 年 8 月 10 日付 18 国文科振第 16 号)。

C. 研究結果

1. HCV 生活環に関与する PK の同定

1-1. NS5A と強く相互作用する PK の同定

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

1-2. NS5A に対するリン酸化能の評価

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

1-3. HCV の感染性粒子産生に関わる PK の同定

9 種類の PK のうち、ヒト肝癌由来細胞株において発現が認められなかったり、ノックダウンにより著しい細胞障害を示したプロテインキナーゼを除外し、7 種類のプロテインキナーゼを以降の解析の対象とした。その結果、3 種類の PK (PK-1, PK-2, CK2 α 2) のノックダウンにより、HCV のウイルス産生が阻害された。

1-4. 同定された PK のノックダウンが HCV 侵入、複製、粒子形成に与える影響の解析

同定された PK が HCV のライフサイクルのどこに関わるかを明らかにするために、HCV 侵入過程は HCVpp を用いて、HCV ゲノム複製は HCV レプリコンシステムを用いて、感染性ウイルス粒子形成は Single-Cycle Virus Production Assay を用いて解析した。PK-1, PK-2, CK2 α 2 それぞれのノックダウンにより、HCVpp の侵入過程は影響を受け

なかった。HCV の受容体(CD81、Claudin-1、Occludin)をノックダウンした場合は細胞の感染許容性は効率よく低下した。次にゲノム複製について検討したが、3種類のPKのノックダウンにより、HCVのゲノム複製は影響を受けなかった。しかし、いずれのPKのノックダウンでも感染性ウイルス粒子形成は阻害されたことから、これらのPKはウイルス粒子形成過程において重要であることが示唆された。

1-5. PKのノックダウンがNS5Aの細胞内局在に与える影響の解析

PK-1、PK-2およびCK2 α 2のうち、ノックダウンした時に最もHCV産生に影響があったPK-1について、NS5Aの細胞内局在への影響を解析した。siRNA非導入細胞ではNS5Aは細胞内で脂肪滴周辺におけるコア蛋白質との共局在が観察された。しかし、PK-1のノックダウン細胞では、NS5Aとコアの共局在がなくなり、NS5Aの細胞内分布が脂肪滴周辺から細胞質全体へと変化していたことから、CK1 α はNS5Aの細胞内局在にも関与していることが示唆された。

1-6. PKのノックダウンがNS5Aのリン酸化状態に与える影響の解析

PK-1について培養細胞内においてもNS5Aのリン酸化に関与するかを調べるために、PK-1ノックダウン細胞にHCVを感染させ、細胞内のNS5Aのリン酸化状態を解析した。PK-1ノックダウン細胞では、コントロールsiRNA導入細胞と比べて、高リ

ン酸化型NS5Aの発現が低下していた。

1-7. PKによるリン酸化部位の同定

HCV感染細胞およびHCV感染PK-1ノックダウン細胞中のNS5A蛋白質をそれぞれ質量分析法により解析した。ドメインIとドメインIIの間の3箇所のセリン残基がPK-1ノックダウン細胞由来のNS5Aではリン酸化されていなかったことから、それらのセリン残基がPK-1によるリン酸化部位である可能性が示唆された。

1-8. PK阻害剤のHCV増殖抑制効果の検討

同定したPK(PK-1、PK-2、CK2 α 2)に対する阻害剤の抗HCV効果を検討した。4種類のPK阻害剤(D4476、IC261、PF670462、DMAT)において、30 μ M投与時のHCVコア抗原の分泌はそれぞれ1/12.7、1/2.6、1/3.2、1/8.4に低下した。また、この抗HCV効果は0-30 μ Mの範囲で濃度依存的であり、この範囲では明らかな細胞傷害性は認められなかった。

2. HCVゲノム複製を制御するNS5A結合環化ペプチドの取得

2-1. NS5A結合ペプチドのスクリーニング

精製NS5A蛋白質を用いてスクリーニングを行い、11種類のNS5A結合環化ペプチドを取得した。

2-2. NS5A結合ペプチドのHCV増殖抑制効果の検討

11種類のペプチドのうち、9種類のペプ

チドにおいて HCV ゲノム複製の抑制効果が見られた。その抑制効果はコントロールと比べていずれも 30-50%程度であった。顕著な細胞傷害性を示した環化ペプチドはなかった。

3. 様々な遺伝子型の NS5A に対する効果を評価できる抗 HCV 薬評価系の樹立および NS5A 阻害薬の評価

3-1. NS5A を各遺伝子型のウイルス株由来の配列に置換した JFH-1 キメラウイルスの増殖能の検討

JFH-1 株、および NS5A を各遺伝子型のウイルス株由来の配列に置換したキメラ JFH-1 株(JFH-1/5A-H77、JFH-1/5A-Con1、JFH-1/5A-J6、JFH-1/5A-MA)の HCV RNA は細胞内で複製し、感染性ウイルスを産生した。細胞内コア抗原量は、トランスフェクション 2 日後はいずれの NS5A 置換ウイルスでも JFH-1 と同レベルであった。

培養上清中のウイルス量は JFH-1/5A-J6、JFH-1/5A-MA が JFH-1 より高く、JFH-1/5A-H77 は JFH-1 と同程度であり、JFH-1/5A-Con1 は JFH-1 より低値であった。さらに細胞中での感染性ウイルス粒子の形成効率を評価したところ、JFH-1/5A-J6、JFH-1/5A-MA は JFH-1 より高く、JFH-1/5A-H77 は JFH-1 と同程度であり、JFH-1/5A-Con1 は JFH-1 より低値であった。

3-2. 第一世代の NS5A 阻害剤の HCV 増殖抑制効果の検討

上記で作製した NS5A を各遺伝子型に置

換した JFH-1 ウイルスを用いて、第一世代の NS5A 阻害剤として知られる BMS-790052 のウイルスの遺伝子型による抗 HCV 効果の違いについて検討した。その結果、BMS-790052 は遺伝子型 1a、1b のウイルスの複製は低濃度で抑制したが、遺伝子型 2a、2b のウイルスに対しては、高濃度でも抑制効果は低かった。BMS-790052 はいずれの濃度でも細胞傷害性は示さなかった。

3-3. 第二世代の新規 NS5A 阻害剤の HCV 増殖抑制効果の検討

三種類の新規 NS5A 阻害剤 (ACH-02、ACH-10、ACH-83)を用いて同様の検討を行った。いずれの薬剤でも遺伝子型 1 のキメラ株に対する抗 HCV 効果は BMS-790052 と同様に高かった。ACH-10 では遺伝子型 2 のキメラ株でも、遺伝子型 1 のキメラ株と同程度の高い感受性を示した。ACH-83 も同様に遺伝子型 2 のキメラ株は遺伝子型 1 のキメラ株と同程度の高い感受性を示した。しかし、ACH-02 は上記二種類よりは遺伝子型 2 のキメラ株に対する効果がやや低かった。ACH-02、ACH-10、ACH-83 はいずれの濃度でも細胞傷害性は示さなかった。

D. 考察

NS5A 蛋白質は HCV の複製増殖やインターフェロン感受性、病原性発現などに関与する多機能蛋白質である。リン酸化蛋白質であり、NS5A のリン酸化はウイルスゲノム複製や感染性ウイルス粒子の形成に重要な役割

を担うことが報告されている。現在までに AKT、p70S6K、MEK、CK1、CK2 など数種類の PK が NS5A のリン酸化に関与するものとして報告されている。しかし、いずれの報告においても解析対象の PK はごく限られた数であり、また、HCV 生活環への関与についても十分な検討がなされていない。

今回われわれは 404 種類のヒト PK を対象として網羅的に解析し、NS5A 蛋白質に対するリン酸化能を有し、かつ、HCV 生活環に関与する PK を同定すること試みた。同定された 3 種類の PK の中には CK2 の触媒サブユニットである CK2 α 2 が含まれていたが、CK2 は NS5A 蛋白質のリン酸化と HCV 粒子形成に関与することが報告されており、本解析結果の妥当性が高いことを示している。

今回の解析により同定された 3 種類の PK(PK-1、PK-2、CK2 α 2)については、いずれも siRNA によるノックダウンによりウイルス産生量が低下した。これらの PK の作用点解明のために HCV 生活環のそれぞれの過程について検討した結果、これらの PK は細胞内でのウイルス粒子形成過程に関与することが示唆された。

さらに、メカニズムについて解析した。感染細胞内では NS5A とコア蛋白質は相互作用することにより粒子形成の場である脂肪滴周辺膜で共局在するが、この相互作用は HCV 粒子形成に重要であることが知られている。NS5A およびコア蛋白質の局在、相互作用には、NS5A 蛋白質のリン酸化が重要であると考えられている。PK-1 ノックダウン細胞では、コントロールと比較して、高リン

酸化型 NS5A の発現が低下していた。さらに、PK-1 ノックダウン細胞では、NS5A とコア蛋白質の共局在がなくなり、NS5A の細胞内分布が脂肪滴周辺から細胞質全体へと変化していた。細胞内での NS5A とコアの相互作用は HCV 粒子形成に重要であることから、PK-1 は NS5A とコア蛋白質の相互作用に直接的、または NS5A のリン酸化状態の変化などを通して間接的に関わっていると考えられる。

今回の解析で 4 種類の PK 特異的阻害剤に抗 HCV 効果があることが明らかとなった。今後、これらの PK 阻害剤について、抗 HCV 薬としての実現可能性を検討するためには、他の抗 HCV 薬(インターフェロン、プロテアーゼ阻害剤等)との併用効果や、薬剤の耐性変異の出現についても検討する必要がある。

HCV ゲノム複製を阻害する NS5A 結合ペプチドの取得を目指して環化ペプチドのスクリーニングを行った。スクリーニングで得られた 11 種類の NS5A 結合ペプチドのうち、9 種類において HCV ゲノム複製の有意な抑制効果を認めたが、いずれも 30-50% 程度の抑制率であり、この方法では強力な抑制効果のあるものは得られなかった。

NS5A 阻害剤は、培養細胞での HCV 複製を強力に抑制することから注目されている。これらの薬剤の評価には、培養細胞での HCV 感染増殖系が有用であるが、このシステムで利用できるウイルス株は限られてお

り、遺伝子型の影響や薬剤耐性変異の評価は難しかった。そこで、様々な遺伝子型の NS5A について抗 HCV 効果を評価するために、HCV JFH-1 株の NS5A 領域を他の HCV 株に入れ換えたキメラ株を作製した。その結果、いずれの遺伝子型の NS5A を持ったキメラ株も細胞内で同レベルの複製がみられたことから、このキメラウイルスは抗 HCV 薬評価系として利用可能であると考えられた。

この HCV 薬評価系を用いて NS5A 阻害剤の株特異的な抗ウイルス活性を評価した。第一世代の NS5A 阻害剤として知られる BMS-790052 は現在日本で第三相臨床試験が行われている薬剤である。この薬剤は、遺伝子型 1 の NS5A を持つキメラ株には低濃度で抗ウイルス効果を示すが、遺伝子型 2 の NS5A 領域を持つキメラ株には抗ウイルス効果が低かった。BMS-790052 の耐性変異としてすでに報告のある 2007 番目の M 変異が遺伝子型 2a の J6CF 株と遺伝子型 2b の MA 株に存在し、この変異が JFH-1/5A-J6 および JFH-1/5A-MA が BMS-790052 に対して感受性が低い原因であると考えられた。さらに、HCV 配列データベースにおける探索の結果、この変異は遺伝子型 2 のウイルス株の多くに存在することから(遺伝子型 2a: 84.2%、2b: 79.0%)、遺伝子型 2a、2b のほとんどのウイルス株は BMS-790052 に感受性が低いと考えられた。

一方で、第二世代の NS5A 阻害剤について同様の評価を行ったところ、3 種類の新規 NS5A 阻害剤が、遺伝子型 1 のキメラ株と同

様に、遺伝子型 2 のキメラ株に対しても低濃度で高い抗ウイルス効果を示したことから、これらの薬剤は、遺伝子型に関わらず高い抗 HCV 効果のある薬剤として期待できる。また、これらの新規 NS5A 阻害剤は先述の 2007 番目の M の変異により影響は受けないと考えられるが、今後、多くのウイルス株を用いてウイルス株による感受性の差や薬剤耐性に関わる変異の同定など、さらに詳細な検討が必要と考えられる。

さらに、本研究で樹立した NS5A 置換キメラウイルスを用いた薬剤評価系は、同様の手法により培養細胞増殖系のない多くの HCV の遺伝子型についても新規薬剤の効果が評価可能であり、有用であると考えられる。

本研究により HCV ゲノム複製、粒子形成に関与する PK が同定され、さらに PK 阻害剤に HCV 阻害効果がみとめられたことにより、これらの結果はゲノム複製、粒子形成の制御を標的とした治療法への応用が可能である。本研究で樹立した NS5A を置換したキメラウイルスを用いた薬剤評価系を用いることにより、培養細胞増殖系のない HCV の遺伝子型についても新規薬剤の効果が評価可能である。本研究は、将来的に医療サービスの向上、国民の健康増進につながるとともに、肝癌発症率の低下に伴う医療費削減を介して行政へ貢献できると考える。

E. 結論

網羅的手法および HCV 培養細胞増殖系を用いた解析により感染性 HCV 産生に関与す

る3種類のプロテインキナーゼ(PK-1、PK-2、CK2α2)を同定した。これらのPKは、NS5Aとコアの共局在に重要なNS5Aのリン酸化を通して、HCVの粒子形成過程を制御することを明らかにした。また、PKの特異的阻害剤は培養細胞でのHCVの増殖を抑制した。

JFH-1株のNS5A領域を他のHCV株に入れ換えたキメラ株を用いて、様々な遺伝子型のNS5Aを評価可能な抗HCV薬評価系を樹立し、NS5A阻害薬のウイルス株特異的効果を検討した。第一世代のNS5A阻害薬は遺伝子型1のウイルスの複製は低濃度で抑制したが、遺伝子型2のウイルスの複製は高濃度でも抑制しなかった。第二世代のNS5A阻害薬は、いずれの遺伝子型のウイルスの複製も低濃度で阻害した。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Masaki T, Kim S, Wakita T, Mishiro S, Kato T. A Subclone of HuH-7 with Enhanced Intracellular Hepatitis C Virus Production and Evasion of Virus Related-Cell Cycle Arrest. PLoS One. 2012;7(12):e52697.

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) 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. 2012 50(6):1943-9.

4) Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1. J Virol. 86(4): 2143-2152, 2012.

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 Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) Pathway in Degradation of Hepatitis C Virus Envelope Proteins and Production of Virus Particles. J Biol Chem, 286: 37264-37273, 2011.

- 6) Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology*, 54: 425-433, 2011.
- 7) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jul 8;410(3):404-9.
- 8) Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology* 2011;410:38-47.
- 9) 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* 2010;84:5824-5835.
- 10) 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、遠藤弥重太、脇田隆宇、澤崎達也、鈴木哲朗. HCV NS5A蛋白質のリン酸化に関する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索. *消化器内科*, 51巻、PP.627-631、2010.
- 11) 鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博. C型肝炎ウイルスの複製と粒子形成. *ウイルス*, 60巻、PP.87-92、2010.
2. 学会発表
- 1) 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.
- 2) 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. 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 9-13, 2012. Boston, USA.
- 3) 村山麻子、三代俊治、脇田隆宇、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 29-30 日、札幌.

4) 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 13-15 日、大阪.

5) 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 11-14 日、福岡.

6) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.

7) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara- Sugano M, Wakita T, Kato T. Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency. 18th International Symposium

on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.

8) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Nomoto A, Wakita T, Kato T. Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.

9) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara- Sugano M, Wakita T, Kato T. HuH-7 subclone that supports high HCV production due to high virus assembly. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.

10) Watanabe N, Murayama A, Date T, Kato T, Aizaki H, Wakita T. Identification and analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.

11) Matsumura T, Kato T, Tasaka-Fujita M, Murayama A, Masaki T, Wakita T, Imawari M. 25-hydroxy- vitamin D

inhibits hepatitis C virus replication and production of the infectious viruses. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 4-8, 2011. San Francisco, USA.

12) 加藤孝宣、村山麻子、政木隆博、相崎英樹、脇田隆字. 国内献血検体を用いたC型肝炎ウイルス陽性血漿パネルの作製とウイルス量測定法の評価. 第47回日本肝臓学会総会、2011年6月、東京.

13) 加藤孝宣、政木隆博、脇田隆字. HCV JFH-1 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. シンポジウム 10: C型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.

14) 村山麻子、三代俊治、脇田隆字、加藤孝宣. C型肝炎ウイルス粒子の産生効率の良い HuH-7 細胞サブクローンの分離と同定. 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.

15) Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Kato T, Endo Y, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Identification of novel hepatitis C virus NS5A-associated protein kinases. 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Tokyo, 2010.9.10-14.

16) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Kato T, Watanabe H, Wakita T. Effects of NS5A replacement in HCV JFH-1 genome on viral replication and infectious particle production in cell culture. 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Tokyo, 2010.9.10-14.

17) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Tomonaga M, Masaki T, Kato T, Wakita T, Suzuki T. Role of ERAD pathway in quality control of HCV envelope proteins and maturation of the viral particles. 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Tokyo, 2010.9.10-14.

18) 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆字、鈴木哲朗. HCV NS5A蛋白のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの同定と機能解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.11.7-9.

19) 岡本有加、政木隆博、村山麻子、加藤孝宣、渡邊治雄、脇田隆字. HCV JFH-1株におけるNS5Aの置換がウイルス増殖に及ぼす影響の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.11.7-9.

20) Saeed Mohsan、鈴木亮介、渡邊則幸、政木隆博、加藤孝宣、脇田隆字、鈴木哲朗.

Role of ERAD pathway in life cycle of hepatitis C virus. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.11.7-9.

21) 加藤孝宣、岡本有加、村山麻子、政木隆博、脇田隆字. HCVの増殖適応変異とその意義. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.11.7-9.

22) 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、宮村達男、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆字、鈴木哲朗. HCV NS5A蛋白のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索. 第46回日本肝臓学会総会、山形、2010.5.27-28.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

なし。

3.その他

なし。

Ⅱ. 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

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
Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Masaki T, Kim S, Wakita T, Mishiro S, 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
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.	86(19)	10805-20	2012
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(6)	1943-9.	2012
Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T.	Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1.	J Virol	86(4)	2143-2152	2012
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 Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) Pathway in Degradation of Hepatitis C Virus Envelope Proteins and Production of Virus Particles.	J Biol Chem	286	37264-3727 3	2011

Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T.	In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis.	Hepatology	54	425-433	2011
Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T.	Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2.	Biochem Biophys Res Commun	410	404-409	2011
Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.	Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein.	Virology	410	38-47	2011
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
政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、遠藤弥重太、脇田隆宇、澤崎達也、鈴木哲朗	HCV NS5A蛋白質のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索	消化器内科	51巻	627-631	2010
鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博	C型肝炎ウイルスの複製と粒子形成	ウイルス	60巻	87-92	2010