

NKp46 が重要な役割を果たす事が明らかとなりつつある。ここでは NK 細胞が HCV の肝細胞内 replication を抑制する過程において、NKp46 による認識を必要とする事を明らかとした。

NK 細胞の NKp46 の表出強度は、宿主の肝予備能と深く関連する事も示された。この関連は、HCV 感染/非感染を問わず、ウイルス因子以外の制御機構が存在する事が示唆された。一方で、ドナー肝 NK 細胞移入レシピエントにおいて IL-28B SNP と移植後早期の HCV RNA 量に有意な関連が確認された。今後、IL-28B SNP と肝内在 NK 細胞の NKp46 表出強度との間に、何らかの関連があるか否か、興味を持たれる。

本研究では、肝癌合併 C 型肝炎ウイルス感染ヒト肝細胞キメラマウスモデルが作製された。今後、NK 細胞を用いた抗腫瘍療法・抗 HCV 療法において、肝癌細胞の存在が NK 細胞の NKp46 表出強度および機能に如何に影響するかを解析する予定である。

E. 結論

肝臓移植後のレシピエントの HCV 再感染およびその抑制には、グラフト肝内の NK 細胞の NKp46 の表出強度が移植後の HCV 増幅と深く関わり、HCV 抑制機構には NK 細胞の IFN- γ 産生に依存することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Wang C, Wang H, Ide K, Wang Y, Van Rooijen N, Ohdan H, Yang YG. Human CD47 expression permits survival of porcine cells in immunodeficient mice

that express SIRP α capable of binding to human CD47. *Cell Transplant*. 2011. 20:1915-1920.

2. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. *J Surg Res*. 2011. 167(1): e29-37.

3. Tashiro H, Ishiyama K, Ohira M, Igarashi Y, Tahara H, Ide K, Onoe T, Tanaka Y, Ohdan H. Impact of adjuvant immunotherapy using liver allograft-derived lymphocytes on bacteremia in living-donor liver transplantation. *Transplantation*. 2011. 92(5):575-80.

4. Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Takahashi S, Itamoto T, Chayama K, Ohdan H. Impact of pegylated interferon therapy on outcomes of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma after curative hepatic resection. *Ann Surg Oncol*. 2012. 19(2):418-425.

5. Ide K, Tanaka Y, Onoe T, Banshodani M, Tazawa H, Igarashi Y, Basnet NB, Daskali M, Tashiro H, Ohdan H. Evidence for the immunosuppressive potential of calcineurin inhibitor-sparing regimens in liver transplant recipients with impaired renal function. *J Transplant*. 2011. Online only.

6. Kuroda S, Tashiro H, Igarashi Y,

- Tanimoto Y, Nambu J, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tanaka Y, Ohdan H. Rho inhibitor prevents ischemia-reperfusion injury in rat steatotic liver. *J Hepatol*. 2011. 56(1):146-152.
7. Iwako H, Tashiro H, Amano H, Tanimoto Y, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Nambu J, Mikuriya Y, Abe T, Ohdan H. Prognostic significance of antithrombin III levels for outcomes in patients with hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Ann Surg Oncol*. 2012. 19(9):2888-2896.
8. Oshita A, Tashiro H, Amano H, Kobayashi T, Onoe T, Ide K, Takaki S, Takahashi S, Arihiro K, Chayama K, Ohdan H. Safety and feasibility of diet-treated donors with steatotic livers at the initial consultation for living-donor liver transplantation. *Transplantation*. 2012. 93(10):1024-1030.
9. Tashiro H, Ide K, Amano H, Kobayashi T, Onoe T, Ishiyama K, Kuroda S, Tazawa H, Kono H, Aikata H, Takahashi S, Chayama K, Ohdan H. Surgical treatment for portosystemic encephalopathy in patients with liver cirrhosis: Occlusion of portosystemic shunt in combination with splenectomy. *Hepatol Res*. 2012. 43(3):249-254.
10. Ohira M, Nishida S, Tryphonopoulos P, Tekin A, Selvaggi G, Moon J, Levi D, Ricordi C, Ishiyama K, Tanaka Y, Ohdan H, Tzakis AG. Isolation of interleukin-2-stimulated liver natural killer cells for treatment of liver transplantation with hepatocellular carcinoma. *Cell Transplant*. 2012. 21(7):1397-1406.
11. Kajitani K, Tanaka Y, Arihiro K, Kataoka T, Ohdan H. Mechanistic analysis of the antitumor efficacy of human natural killer cells against breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2012. 134(1):139-155.
12. Ohira M, Nishida S, Matsuura T, Muraoka I, Tryphonopoulos P, Fan J, Tekin A, Selvaggi G, Levi D, Ruiz P, Ricordi C, Ohdan H, Tzakis AG. Comparative analysis of T-cell depletion method for clinical immunotherapy-anti-hepatitis c effects of natural killer cells via interferon-gamma production. *Transplant Proc*. 2013. 45(5):2045-2050.
13. Onoe T, Tanaka Y, Ide K, Ishiyama K, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tashiro H, Ohdan H. Attenuation of Portal Hypertension by Continuous Portal Infusion of PGE1 and Immunologic Impact in Adult-to-Adult Living-Donor Liver Transplantation. *Transplantation*. 2013. 95(12):1521-1527.
14. 大段秀樹. State of the Art 肝免疫と肝臓外科 Liver Immunity and Surgery. *Frontiers in Gastroenterology*. 2013. 18(3):203-213.

2. 学会発表

1. Teraoka Y, Ide K, Tahara H, Basnet N, Morimoto H, Ohdan H. Genetic induction of mouse CD47 on rat insulinoma cells prevents macrophage-mediated xenograft rejection through CD47-SIRP α inhibitory signaling in mice. American Transplant Congress 2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.
2. Igarashi Y, Ohdan H. Liver sinusoidal endothelial cells expressing carbohydrates render reactive immature B cells tolerant through PD-1/PDL-1 pathway. American Transplant Congress 2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.
3. Hotta R, Tanaka Y, Doskali M, Ohira M, Hiraga N, Chayama K, Ohdan H. A possible adoptive immunotherapy with PBMC-Derived CD56+ cells for preventing HCV re-infection after liver transplantation. American Transplant Congress 2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.
4. Tanaka Y, Tashiro H, Takanashi S, Chayama K, Ohdan H. Cellular Alloreactivity prior to interferon-based antiviral therapy is predictive of chronic rejection in liver transplantation recipients with recurrent hepatitis. American Transplant Congress 2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.
5. Banshodani M, Onoe T, Tahara H, Igarashi Y, Tanaka Y, Ide K, Ohdan H. Specific suppression of allospecific T cells via the PD-1/PD-L1 pathway in an allogeneic liver endothelium repopulation model. American Transplant Congress 2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.
6. Tazawa H, T Irei, Y Tanaka, Igarashi Y, Yamashita M, Tashiro H, Ohdan H. Pivotal role of invariant NKT cell - B cell interaction in antibody production against transplant-associated carbohydrate epitopes. Basic Science Symposium. 2011.6.2-3. Boston, USA.
7. Ohdan H. Adoptive immunotherapy for inducing anti-HCC and anti-HCV activity after liver transplantation. 21st World congress of the international association of surgeons, gastroenterologists and oncologists. 2011.11.9-12. 東京.
8. Onoe T, Tanaka Y, Hashimoto S, Ide K, Banshodani M, Igarashi Y, Kobayashi T, Amano H, Tashiro H, Ohdan H. Continuous portal infusion of PGE1 attenuates portal hypertension and alloimmune responses in adult-to-adult living donor liver transplantation. CAST 2011. 2011.9.25-28. ソウル, 韓国.
9. Tanaka Y, Tashiro H, Ide K, Onoe T, Ishiyama K, Ohdan H. Tailoring immunosuppressive therapy on the basis of immune monitoring by a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living-donor liver transplantation. CAST

2011. 2011. 9. 25-28. ソウル, 韓国.
10. Araki K, Tanaka Y, Ohdan H. A novel method for intracellular profiling of stat activation pattern in T cells responding to allostimulation. CAST 2011. 2011. 9. 25-28. ソウル, 韓国.
11. 井手健太郎, 尾上隆司, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 寺岡義布史, 堀田龍一, 山下正博, 橋本慎二, 平田文宏, 森本博司, 田代裕尊, 大段秀樹. 胆汁中 CX3CL1 測定による移植肝グラフトの評価. 第 111 回日本外科学会定期学術集会. 2011. 5. 26-28. 東京.
12. 田代裕尊, 相方浩, 谷本新学, 天野尋暢, 大下彰彦, 小林剛, 茶山一彰, 大段秀樹. C 型慢性肝炎関連肝細胞癌切除後の PEG-IFN 療法による予後改善効果. 第 47 回日本肝臓学会総会. 2011. 6. 2-6. 3. 東京.
13. 堀田龍一, 田中友加, Marlen Doskali, 五十嵐友香, 安部智之, 森本博司, 寺岡義布史, 山下正博, 田澤宏文, 番匠谷将孝, 井手健太郎, 尾上隆司, 田代裕尊, 大段秀樹. 末梢血からリモデリングした活性化 CD56+細胞の HCV 増殖抑制効果. 第 29 回日本肝移植研究会. 2011. 7. 22-7. 23. 仙台.
14. 五十嵐友香, 大段秀樹. 肝類洞内皮細胞は PDL-1/PD-1 pathway を介し B 細胞の糖鎖抗原特異的抗体産出を抑制する. 第 47 回日本移植学会総会. 2011. 10. 4-6. 仙台.
15. 堀田龍一, 石山宏平, 大平真裕, 五十嵐友香, 田中友加, 井手健太郎, 尾上隆司, 田代裕尊, 大段秀樹. HCC を合併した肝移植患者に対する術後補助療法の確立—活性化 NK 細胞療法の臨床経過報告—. 第 29 回日本肝移植研究会. 2011. 7. 22-7. 23. 仙台.
16. 寺岡義布史, 井手健太郎, 森本博司, 田中友加, 尾上隆司, 石山宏平, 五十嵐友香, 田澤宏文, 大段秀樹. レシピエント種 CD47 遺伝子導入によるマクロファージ性拒絶抑制効果の in vivo 検証. 第 29 回日本肝移植研究会. 2011. 7. 22-7. 23. 仙台.
17. 田代裕尊, 茶山一彰, 大段秀樹. ドナー由来活性化リンパ球細胞療法による生体肝移植後の敗血症予防. 第 29 回日本肝移植研究会. 2011. 7. 22-7. 23. 仙台.
18. 安部智之, 田代裕尊, 尾上隆司, 石山宏平, 井手健太郎, 田澤宏文, 大段秀樹. 生体肝移植後に発生した NODAT 症例についての検討. 第 48 回日本移植学会総会. 2012. 9. 20-22. 愛知.
19. 谷峰直樹, 田中友加, 安部智之, 堀田龍一, 五十嵐友香, 石山宏平, 田代裕尊, 大段秀樹. C 型肝炎患者における Natural Killer 細胞の活性化委レセプターの表出は肝予備能に依存して低下する. 第 48 回日本移植学会総会. 2012. 9. 20-22. 愛知.
20. 天野尋暢, 田代裕尊, 小林剛, 黒田慎太郎, 田澤宏文, 楠部潤子, 御厨美洋, 安部智之, 尾上隆司, 大段秀樹. 肝細胞癌術後多発再発に対する治療戦略. 第 67 回日本消化器外科学会. 2012. 7. 18-20. 富山.
21. 黒田慎太郎, 田代裕尊, 五十嵐友香, 楠部潤子, 御厨美洋, 小林剛, 天野尋暢, 田澤宏文, 安部智之, 田中友加, 大段秀樹. Rho キナーゼ阻害剤は脂肪肝の虚血再灌流障害を軽減する. 第 112 回日本外科学会定期学術集会. 2012. 4. 12-14. 千葉.
22. 田代裕尊, 天野尋暢, 小林剛, 尾上隆司, 石山宏平, 井手健太郎, 大段秀樹. 肝

- 細胞癌に対する外科治療と術後補助療法. 第 112 回日本外科学会定期学術集会. 2012. 4. 12-14. 千葉.
23. 谷峰直樹, 田中友加, 石山宏平, 井手健太郎, 田澤宏文, 寺岡義布史, 堀田龍一, 山下正博, 安部智之, 橋本慎二, 平田文宏, 森本博司, 清水誠一, 佐伯吉弘, 五十嵐友香, 田代裕尊, 大段秀樹. 硬変肝に局在する Natural Killer 細胞の機能抑制機構. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 2013. 4. 11-13. 福岡.
24. Ohdan H. Do Allograft Responses Effect HCV Recurrence? ILTS 19th. 2013. 6. 12-15. Sydney, Australia.
25. 御厨美洋, 田代裕尊, 天野尋暢, 小林剛, 石山宏平, 井手健太郎, 大平真裕, 安部智之, 橋本昌和, 大段秀樹. NAFLD 関連肝細胞癌における臨床病理と外科的治療成績: C 型関連肝細胞癌との相違. 第 25 回日本肝胆膵外科学会. 2013. 6. 12-14. 宇都宮.
26. 谷峰直樹, 田中友加, 安部智之, 石山宏平, 井手健太郎, 大平真裕, 田澤宏文, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝内在 NKp46 高発現 NK 細胞は移植後 HCV 再感染初期に抑制的機能を有する. 第 31 回日本肝移植研究会. 2013. 7. 4-5. 熊本.
27. 田中友加, 大平真裕, 尾上隆司, 井手健太郎, 石山宏平, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝移植後抗ドナー T 細胞応答に伴い産生される IFN- γ は術後 HCV-RNA 抑止に関与する. 第 31 回日本肝移植研究会. 2013. 7. 4-5. 熊本.
28. 大平真裕, 石山宏平, 堀田龍一, 清水誠一, 田中友加, 田代裕尊, Andreas Tzakis, 西田正剛, 大段秀樹. 肝臓由来ナチュラルキラー細胞を用いた肝細胞癌肝移植に対する補助免疫療法: 広島大学・マイアミ大学共同研究の臨床経過報告. 第 49 回日本移植学会総会. 2013. 9. 5-7. 京都.
- G. 知的所有権の取得状況
特になし

厚生労働省科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
(分担) 研究報告書(平成23~25年度)
創薬と新規治療法に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた
肝炎ウイルス制御に関する研究

In vitro, in vivo増殖系を用いたC型肝炎ウイルス増殖のメカニズムの解析と創薬への応用

研究分担者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆字

研究要旨: 本研究ではC型肝炎ウイルス(HCV)のin vitroおよびin vivo増殖系を用いたウイルス増殖メカニズムの解析をおこない、その結果を創薬へ応用することを目的とする。そのために、新たなウイルス培養増殖系の確立を目指す。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)新規感染者は激減したものの、その原因ウイルスであるHCVのキャリアは約100~200万人がいまだに存在すると推定されている。その多くが肝硬変から肝臓癌へ移行する。HCV感染に対する治療法はインターフェロンとリバビリンの併用療法が行われているが、その有効率は40-50%程度である。昨年新たな抗ウイルス薬としてプロテアーゼ阻害薬が承認され、治療の有効率は向上すると考えられるが、さらなる治療薬の開発が必要である。肝炎ウイルスに対する新たな治療法の開発は患者の予後を改善するのみならず、肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らすことにより、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与することが可能である。HCVのin vitroおよびin vivo増殖系を用いたウイルス増殖メカニズムの解析をおこない、その結果を創薬へ応用することを目的とした。そのために、新たなウイルス培養増殖系の確立を目指した。

B. 研究方法

1. 新規キメラマウスによるHCV感染実験

重度複合免疫不全マウスのNOGマウスとウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベータートランスジェニックマウス(AL-uPAマウス)のすべての表現型を有するマウス(uPA-NOGマウス)にヒト肝細胞を移植し、肝細胞の生着後、肝炎ウイルスを接種した。

2. 遺伝子型キメラHCV感染実験

遺伝子型1bのCon1株のNS3プロテアーゼ領域およびNS5b領域をそれぞれ遺伝子型2aのJFH-1株に組換えたキメラレプリコンおよびウイルス構築を作成した。プラスミドからウイルスRNAを合成してHuh7細胞またはHuh7.5.1細胞にトランスフェクションし、レプリコン増殖およびウイルスの産生を観察した。

3. 遺伝子型2bのHCV感染性クローンの樹立

東京医科歯科大学の坂本先生(現北海道大学教授)より遺伝子型2bのレプリコン及び全長遺伝子を分与していただいた。

レプリコン構築に S2208I、A2217S および LSG 変異 (F438L、A15S、D559G) をそれぞれ導入した。レプリコン RNA を Huh7 細胞に導入して G418 による選択培養でコロニー形成実験をおこなった。樹立されたレプリコン細胞から適合変異を同定して、LSG 変異とともに全長遺伝子に導入してウイルス産生実験を Huh751 細胞で行った。

(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、遺伝子解析研究に関する倫理指針」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、個人情報厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 新規キメラマウスによる HCV 感染実験

NOGマウスは、重度複合免疫不全マウスで、2種類の免疫不全マウスを結びつけて作製されたマウスである。一つは、NOD/ShiJic-*scid*マウスで、やせ形糖尿

病モデルマウスであるNOD/Shiマウスに、CB-17-*scid*系統の*scid* (*Prkdc^{scid}*) 突然変異遺伝子を10世代戻し交配によって導入した系統である。もう一つがIL2レセプターガンマ鎖ノックアウトマウスで、X染色体のIL2レセプターガンマ鎖遺伝子の第7,8エクソンを破壊することによって作製された、ヒトのXSCIDモデルマウスである。このIL2レセプターガンマ鎖ノックアウトマウスのIL2レセプターガンマ鎖*null*遺伝子を、NOD/ShiJic-*scid*マウスへ戻し交配によって導入したものがNOGマウスであり、実中研で樹立された。マウスアルブミンプロモーターによりウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターを発現するトランスジェニックマウスが樹立された (AL-uPAマウス)。このマウスは生後肝不全を発症する。AL-uPAマウスはNODマウスをもとに作製され、さらにNOGマウスと戻し交配し、ホモ化したものがuPA-NOGマウスである (Suemizu et al, BBRC 2008 377:248-252)。このuPA-NOGマウスを実験の末水博士より供与いただいた。凍結ヒト初代培養肝細胞をuPA-NOGマウスに経脾臓的に移植して作製したヒト肝細胞移植uPA-NOGマウスにHCVを接種したところ持続的な感染が成立した。

2. 遺伝子型キメラ HCV 感染実験

遺伝子型 1b の NS3 を遺伝子型 2a の JFH-1 株に組換えたレプリコン構築 (pSGR_JFH_N3PCon1) および NS5b を組換えた構築 (pSGR_JFH_N5bSLCon1) は Huh7 細胞で増殖可能であったが、その複製効率は JFH-1 株よりも低く、適合変異が必要であった。レプリコン実験で同定した適合変異を導入した全長キメラウイルス

構築（pJFH_N3PCon1 および pJFH_N5bSLCon1）を作成した。全長ウイルス RNA を Huh7.5.1 細胞に導入したところ pJFH_N3PCon1 はウイルスゲノム複製は観察されたが感染性ウイルス粒子産生は見られなかった。pJFH_N5bSLCon1 は複製増殖が可能で感染性ウイルス粒子も産生された。

全長キメラウイルス構築を用いて抗ウイルス薬の効果を観察すると、NS3 プロテアーゼ領域を Con1 に組換えるとプロテアーゼ阻害剤の感受性が高くなった。また NS5b 領域を組換えると遺伝子型 1b と同様の感受性を示した。したがって、これらのキメラウイルス構築は遺伝子型 1b のプロテアーゼ阻害剤およびポリメラーゼ阻害剤の感受性の検討に適していると考えられた。

3. 遺伝子型 2b の HCV 感染性クローンの樹立

遺伝子型 2b の HCV 株のレプリコンは野生型、S2208I、A2217S の変異挿入ではコロニー形成が見られなかったが、LSG 変異（F438L、A15S、D559G）の挿入によりコロニー形成が観察された。合計 15 クローンのレプリコン細胞を樹立してレプリコンゲノムの配列を決定した。すべてのレプリコン細胞において LSG 変異以外の新たな適合変異が検出された。適合変異は NS4B、NS5A、NS5B 領域に認められた。検出された 8 種類の適合変異を遺伝子型 2b 株の全長遺伝子に LSG 変異とともに導入してウイルス産生実験をおこなった。

全長構築から試験管内で RNA を合成して、Huh751 細胞にトランスフェクションし、RNA 導入細胞を経代培養した。その結果感染性ウイルスの産生が確認された。

D. 考察

新たなキメラマウスを用いて HCV の感染実験を試みた。ウイルスの持続感染が成立した。また、新たなキメラウイルス構築はプロテアーゼ阻害剤やポリメラーゼ阻害剤の検討に適していると考えられた。遺伝子型 2b 株のレプリコンゲノムに検出した適合変異を利用することにより、感染性ウイルスを作成することが可能となった。遺伝子型 2b は我が国では 1b、2a について感染が広がっているため、抗ウイルス薬の感受性や、耐性ウイルスの研究が必要である。今後、この実験系を用いて、臨床で使用されている抗ウイルス薬や開発中の薬剤に対する解析が可能となる。

E. 結論

1. 新規キメラマウスを用いて HCV の感染実験をおこなった。HCV はマウス肝臓に持続的に感染が成立した。
2. 新規キメラウイルス構築の培養細胞における複製増殖、薬剤感受性を検討した。
3. 遺伝子型 2b の感染性 HCV を作成することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表
1. Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Nov 1;440(4):515-20.
 2. Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal Peptidase Complex Subunit 1 Participates in the Assembly of Hepatitis C Virus through an Interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog*. 2013 Aug;9(8):e1003589.
 3. Maehama T, Fukasawa M, Date T, Wakita T, Hanada K. A class II phosphoinositide 3-kinase plays an indispensable role in hepatitis C virus replication. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Oct 11;440(1):150-156.
 4. Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. Antiviral Activity of Glycyrrhizin against Hepatitis C Virus In Vitro. *PLoS One*. 2013 8(7):e68992.
 5. Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. *Gastroenterology*. 2013 145(2):447-455. e4.
 6. Sekiguchi S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F, Tsukiyama-Kohara K, Wakita T, Tanaka T, Miyasaka M, Mizuno K, Hayashi Y, Hishima T, Matsushima K, Kohara M. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS One*. 2012;7(12):e51656.
 7. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. *Microbes Infect*. 2013 15(1):45-55.
 8. 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. e7.
9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. Weng L, Kohara M, Wakita T, Shimotohno K, Toyoda T. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene*. 2012 496(2):79-87.
 14. 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*. 2012 86(4):2143-52.
 15. Salim MT, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M. Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 415(4):714-9.
 16. Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. *PLoS One*. 2011;6(10):e26620.
 17. Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus reveals a novel early

- control in acute immune response. *PLoS Pathog.* 2011 7(10):e1002289.
18. 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.* 2011 286(43):37264-73.
 19. 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 410(3):404-9.
 20. Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 2011 92(Pt 9):2082-7.
 21. Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, Wakita T. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine.* 2011 29(29-30):4821-8.
 22. 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.* 2011 54(2):425-33.
 23. Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2011 141(1):128-40. e1-2.
 24. Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One.* 2011;6(6):e21284.
 25. 2. 学会発表および講演など

1. 脇田隆字、安東友美、林和彦、杉山真也、石上雅敏、片野義明、後藤秀実、溝上雅史、黒田誠、相崎英樹、患者血清中におけるHCVゲノム多様性の存在形式、第49回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル、(2013, 6.6-7)、ワークショップ3「ウイルス肝炎の新潮流」
2. 藤田めぐみ、加藤孝宣、村山麻子、山田典栄、脇田隆字、朝比奈靖浩、坂本直哉、HCV Core領域アミノ酸70/91変異株を用いた反応機序の解析、第49回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル、(2013, 6.6-7)
3. 大東卓史、渡士幸一、Ann Sluder、中嶋 翔、Katyna Borroto-Esoda、藤田尚志、脇田隆字、シクロフィリンはPKRのリン酸化制御を介してC型肝炎ウイルスのインターフェロン感受性を修飾する、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
4. 内田奈々子、渡士幸一、中嶋翔、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、千葉丈、脇田隆字、C型肝炎ウイルス分泌過程はphospholipase Dが関わる膜輸送により制御される、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
5. 松田麻未、斎藤憲司、鈴木亮介、佐藤充、鐘ヶ江裕美、渡士幸一、相崎英樹、千葉丈、斎藤泉、脇田隆字、鈴木哲朗、細胞内発現抗体 (イントラボディ)によるC型肝炎ウイルスの増殖抑制、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
6. 後藤耕司、相崎英樹、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、山越智、四柳宏、森屋恭爾、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字、C型肝炎ウイルスNS5A結合膜蛋白ELAVL1のウイルス複製・翻訳スイッチング機構の解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
7. 金ソルイ、伊達朋子、横川寛、河野環、相崎英樹、脇田隆字、C型肝炎ウイルス遺伝子型3aの培養細胞におけるウイルス感染実験系の確立、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
8. 藤本陽、相崎英樹、松田麻未、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字、C型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の脂質代謝変化とHepatic Lipase発現制御、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
9. 青柳春代、相崎英樹、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、Phospholipase A2およびAutophagyによるC型肝炎ウイルス(HCV)分泌過程の制御-グリチルリチンによる抗HCV作用-、第61回日

- 本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
10. 杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、政木隆博、脇田隆字、加藤孝宣、ISDRアミノ酸変異がHCV増殖に与える影響、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
 11. 中嶋翔、渡士幸一、紙透伸治、竹本健二、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆字、Liver X Receptor 転写活性および感染性C型肝炎ウイルス粒子産生を阻害する天然化合物の同定、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
 12. 渡邊則幸、伊達朋子、相崎英樹、脇田隆字、エンベロープペプチドを用いたHCV感染に重要なアミノ酸領域の探索、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
 13. 鈴木亮介、石川知弘、小西英二、嵯峨涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字、プラスミドトランスフェクションによるトランスパッケージング型1回感染性フラビウイルス産生系の確立、第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、(2013, 12.3-6)
 14. 脇田隆字、「新型シーケンサで展開するウイルスゲノム研究」、ランチョンセミナー、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (2011, 12.14)
 15. 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆字、HCV感染に伴う宿主細胞の脂質代謝の変化と代謝産物のメタボロミクス解析、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)、シンポジウム1「ウイルス肝炎・肝癌制圧の分子基盤」
 16. 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、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)、シンポジウム1「C型肝炎治療の新たな展開」
 17. 鈴木哲朗、脇田隆字、HCV JFH-1 株のチンパンジー感染実験で得られた適応変異株の機能解析、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)、パネルディスカッション4「肝疾患動物モデルとtranslational research」
 18. 武田緑、池田正徳、有海康雄、脇田隆字、加藤宜之、2種類のヒト肝細胞株を用いたHCV感染レポーターアッセイ系の開発、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)、
 19. 相崎英樹、多田有希、松本喜弘、後藤耕司、渡士幸一、鈴木亮介、田中純子、鈴木哲朗、岡部信彦、脇田隆字、1999年から2009年における日

- 本のC型急性肝炎の発生状況、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)
20. 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、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)
 21. 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、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)
 22. T Wakita. Hepatitis C virus replication models and vaccine development 2013 NCRTP PAC Meeting, Inn at Laurel Point, Victoria, BC, Canada (2013, 3.2-3)
 23. T Wakita. Basic concepts of Hepatitis C. 2013 2nd Canadian Symposium on HepC Virus, Inn at Laurel Point, Victoria, BC, Canada (2013, 3.4)
 24. T Wakita. Molecular Biology and Experimental Models of HCV. 19th Annual KASL Meeting, Sheraton Grande Walkerhill Hotel, Seoul, Korea (2013, 6.13 - 15)
 25. H Yokokawa, M Moriyama, N Nakamura, A Higashino, H Akari, T Kato, K Ishii, T Wakita. Induction of neutralizing antibodies by vaccination with cell culture derived hepatitis C virus particles in primate model. 20th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, (2013, Oct. 6-10)
 26. R Sugiyama, N Sugiyama, A Murayama, M Tasaka-Fujita, T Masaki, T Wakita, T Kato. Amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region in NS5A involves infectious virus production of hepatitis C virus. 20th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, (2013, Oct. 6-10)
 27. S Nakajima, K Watashi, S Kamisuki, R Suzuki, H Aizaki, F Sugawara, T Wakita. Isolation of a natural compound which can reduce infectious HCV production by inhibiting of liver X receptor. 20th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, (2013, Oct. 6-10)

28. S Kim, T Date, H Yokokawa, T Kono, H Aizaki, C Gondeau, P Maurel, T Wakita. Infectious Genotype 3a Hepatitis C Virus in Cell Culture. 20th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, (2013, Oct. 6-10)
29. A Fujimoto, H Aizaki, M Matsuda, N Watanabe, K Watashi, R Suzuki, T Suzuki, T Miyamura, T Wakita. Dynamics of the cellular metabolome during hepatitis C virus infection. 20th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, (2013, Oct. 6-10)
30. T Wakita. Hepatitis C virus cell culture system and antiviral development. 17th International Symposium on the Cells of the Hepatic Sinusoid. Osaka International Convention Center, Osaka, Japan (2013, Sep. 23-25)
31. H Aizaki, N Watanabe, H Aoyagi, K Watashi, R Suzuki, S Kojima, T Matsuura, K Wake, T Suzuki, T Wakita. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. 17th International Symposium on the Cells of the Hepatic Sinusoid. Osaka International Convention Center, Osaka, Japan (2013, Sep. 23-25)
32. Wakita T, Date T, Kim S, Kato T. Novel cell culture-adapted Hepatitis C virus infectious clone, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy (2012, Oct. 5-9)
33. Kim S, Date T, Aizaki H, Watanabe H, Wakita T. NS3 protease derived from genotype 1b Con1 attenuates viral replication, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy (2012, Oct. 5-9)
34. T Wakita. Hepatitis C Virus Infection and Replication, annual meeting of Prof. Juei-Low Sung's Research Foundation, Taipei, Taiwan (2011, 8. 6)
35. T Wakita. HCV RNA replication and drug development. The 8th APASL Single Topic Conference Beijing, China (2011, 10. 7)
36. T Wakita. Hepatitis C virus replication in vitro and persistent infection in vivo:

- mechanistic analysis and antiviral development, Singapore-Japan Forum on Emerging Concepts in Microbiology, National University of Singapore, Singapore (2011 Nov 15-16)
37. T Wakita. Hepatitis C virus replication in vitro and persistent infection in vivo: mechanistic analysis and antiviral development, Challenges to overcome Emerging Infectious Diseases in South-eastern Asia, Siran Kaikan, Kyoto University. Kyoto (2012 Jan 13)
38. T Wakita. Hepatitis C virus replication models and anti-viral development, The 1st International Symposium on Latent TGF-beta Activation Reaction, RIKEN Kobe Inst, Ctr. For Delop Biol, Auditorium, Kobe (2012 Feb 25)
39. Takebe, Y., Uenishi, R., Tani. H., Suzuki, R., Hase, S., Akazawa, D., Takagi, M., Tsuchiura, T., Nagasawa, K., Suzuki, T., Irie, K., Shinya, K., Wakita, T., Matsuura, Y., Patel, A., Small molecules that elicit anti-HCV activity through down-modulation of HCV entry receptors, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
40. N Watanabe, K Futai, H Suga, T Wakita, E2 binding peptide identified by RAPID system inhibited HCV infection, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
41. K Goto, T Kimura, K Watashi, R Suzuki, S Yamagoe, T Miyamura, K Moriya, H Yotsuyanagi, K Koike, T Suzuki, T Wakita, H Aizaki, Identification of novel NS5A-associated proteins in the host-cell membrane fraction and their role in HCV life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
42. R Suzuki, T Suzuki, K Saito, M Matsuda, K Watashi, Y Matsuura, T Wakita, H Aizaki, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SIGNAL PEPTIDASE COMPLEX 1 THAT INTERACTS WITH HEPATITIS C VIRUS NS2 PROTEIN AND IS INVOLVED IN THE VIRAL ASSEMBLY, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

43. J Law, D Hockman, S Frey, R Khoshy, T Wakita, J Bukh, C Rice, M Houghton, Does a vaccine derived from a single HCV strain elicit broadly cross-neutralising antibodies in humans?, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
44. Y Okamoto, T Masaki, A Murayama, T Wakita, T Kato, Development of chimeric hepatitis C virus expressing NS5A from strains of genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
45. M Fukasawa, Y Shirasago, K Saito, Y Murakami, H Fukazawa, T Suzuki, R Suzuki, T Wakita, K Hanada, J Chiba, Isolation of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
46. H Yokokawa, D Akazawa, M Moriyama, N Nakamura, T Kato, K Ishii, T Wakita, Development of purification method for HCV particles using chromatographic technique, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
47. M Esumi, S Kikuta, H Yamaguchi, S Nakajima, M Ishibashi, T Wakita, Serum and trypsin inhibitors inhibit the early step of hepatitis C virus infection, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
48. M Moriyama, D Akazawa, H Yokokawa, K Nishimura, N Nakamura, H Mochizuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, Immunological memory response to induce neutralizing immunoglobulin in HCV particles-immunized mice, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
49. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses.

- Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
50. N Uchida, K Watashi, R Suzuki, H Aizaki, J Chiba, T Wakita, Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
26. N Watanabe, A Murayama, M Saeed, T Date, T Kato, H Aizaki, T Wakita, Identification and analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
51. Y Okamoto, T Masaki, A Murayama, A Nomoto, T Wakita, T Kato, Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
52. R Suzuki, K Saito, M Matsuda, K Watashi, Y Matsuura, T Wakita, T Suzuki, H Aizaki, Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
53. A Murayama, N Sugiyama, S Yoshimura, M Ishihara-Sugano, T Wakita, T Kato, Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
54. H Aizaki, Y Matsumoto, K Goto, K Watashi, R Suzuki, M Fukasawa, K Hanada, S Sato, N Takahashi, Y Matsuura, K Motojima, T Miyamura, T Suzuki, T Wakita, Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
55. Y Matsumoto, K Watashi, R Suzuki, T Matsuura, T Suzuki, T Miyamura, K Wake, T Wakita, H Aizaki, Antiviral activity of glycyrrhizic acid against hepatitis C virus in vitro, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention

Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

56. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
57. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Screening of small molecules affecting the production of hepatitis B virus, 2011 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct 9-12, Holliday Inn Walt Disney World Resort, FL USA

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生労働省科学研究費補助金 (肝炎等克服緊急対策研究事業)
創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス制御に関する研究
(分担) 報告書 (平成 23~25 年度)

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた新規抗HCV薬の効果判定
研究分担者 今村道雄 広島大学病院消化器・代謝内科 診療講師

研究要旨：ヒト肝細胞キメラマウスを用いてリバースジェネティクスの手法により、野生型あるいは direct-acting antiviral agent (DAA) 耐性変異型 C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染マウスを作製した。患者血清およびクローンを用いて HCV 感染させたマウスではいずれにおいても telaprevir の投与により耐性変異が生じ、薬剤耐性 HCV はウイルスの selection および mutation いずれからも出現し得ることを見出した。Genotype 1b 型 HCV 感染マウスへのプロテアーゼ阻害剤、NS5A 阻害剤、非核酸型ポリメラーゼ阻害剤の単独投与では耐性変異による breakthrough が生じるが、これらの薬剤を組み合わせて投与することによりウイルスの排除が得られたが、genotype 2 型 HCV には有効性は低かった。その原因として、2 型 HCV にはすでにこれら薬剤に対する耐性変異を有している症例が存在することを見出した。NS5A 阻害剤耐性型 HCV 感染マウスに telaprevir+NS5A 阻害剤を併用投与すると両薬剤に対する 2 重耐性型 HCV が出現し breakthrough が生じ、さらに NS5B 阻害剤の投与により、3 重耐性型 HCV が出現した。DAA 製剤を sequential に使用すると、多剤耐性変異型 HCV が出現するため、注意が必要であることが示された。uuPA/SCID マウスよりさらに免疫不全である NOG マウスに Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSVtk) 遺伝子を過剰発現させた TK-NOG マウスを用いてヒト肝細胞キメラマウスを作製し HCV を感染させた。TK-NOG マウスは uPA/SCID マウスに比べヒト肝細胞置換率が低値であっても HCV の感染率が高く、HCV 研究に有用な新規のヒト肝細胞キメラマウスに有用になると思われた。

A. 研究目的

- 1) C 型肝炎ウイルス(HCV)感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて direct-acting antiviral agent (DAA) 単独あるいは併用投与における耐性株の出現、ウイルス排除効果、genotype 間の治療効果を検討する。
- 2)
- 3) uPA/SCID よりさらに免疫不全である NOG マウスを用いて新規ヒト肝細胞キメラマウスを作製する。

B. 研究方法

- 1) Genotype 1b, 2a, 2bの患者血清を感染させたマウスにプロテアーゼ阻害剤、NS5A阻害剤、非核酸型ポリメラーゼ阻害剤を単独あるいは併用により4週間経口投与し、治療効果を検討した。
- 2) Genotype 1b HCV感染性クローンKT9のNS3領域にtelaprevir耐性V36A、NS5A領域にNS5A阻害剤RCI耐性L31V、Y93Hを挿入したクローンの全長cDNAを用いて*in vitro transcription*法によりHCV RNAを合成し、50 µgのRNAをヒト肝細胞キメラマウスの肝臓内に直接注入し感染マウスを作製後、種々のDAAを投与した。