

- hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression. **Eur J Immunol.** 43(11):2956-2968. 2013.
- 10) Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, **Honda M**, Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. **Hepatology.** 58(3):1133-1142. 2013.
- 11) Komura T, Sakai Y, **Honda M**, Takamura T, Wada T, Kaneko S. ER stress induced impaired TLR signaling and macrophage differentiation of human monocytes. **Cell Immunol.** 282(1):44-52. 2013.
- 12) Shirasaki T, **Honda M**, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. **J Virol.** 87(9):5270-5286. 2013.
- 13) Hodo Y, **Honda M**, Tanaka A, Nomura Y, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Sasaki M, Nakanuma Y, Moriyama M, Kaneko S. Association of interleukin-28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. **Clin Cancer Res.** 19(7):1827-1837. 2013.
- 14) Yamashita T, **Honda M**, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S. Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology.** 57(4):1484-1497. 2013.
2. 学会発表
- 1) **M Honda**, T Shirasaki, T Shimakami, A Sakai, R Horii, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, H Okada, M Nakamura, E Mizukoshi, S Kaneko. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. (□演 32242) 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (HCV2013). メルボルン 2013.
- 2) **M Honda**, T Shirasaki, T Shimakami, A Sakai, R Horii, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, H Okada, M Nakamura, E Mizukoshi, S Kaneko. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes (□演 Parallel 35: HCV Pathogenesis) The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD 2013). ワシントンD.C. 2013.
- G. 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
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

病態進展と幹細胞との関連解析

分担研究者：出澤 真理 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：我々の研究グループは間葉系幹細胞の数パーセントの比率で多能性幹細胞 Multilineage-differentiating stress enduring (Muse)細胞が含まれていることを見出した。この細胞は1細胞から3胚葉性の細胞への分化能と自己複製能を有し、かつ腫瘍性を持たない。骨髄や脂肪、皮膚、臍帯などの間葉系組織から多能性 (SSEA-3) と間葉系 (CD105) マーカー二重陽性細胞として精製可能である。すなわち生体に存在する腫瘍性を持たない多能性幹細胞である。本プロジェクトでは急性および慢性肝障害モデルにおけるMuse細胞の有効性を検討し、さらに生体内に投与したときの体内動態や分化能を探る。

A. 研究目的

幹細胞の解析を行い新規治療法の開発を目指す。ヒト臨床サンプルを用いて標的分子、および幹細胞の動態を解析し、実験モデルから得られた結果の検証を行う。

B. 研究方法

SCID マウス (10-12 週齢, 雄)の腹腔内に四塩化炭素 1.5 ml/Kg 投与し急性肝障害モデルを作成する。GFP-lentivirus で標識したヒト骨髄間葉系幹細胞を SSEA-3 を用いて FACS で Muse 細胞と Muse 細胞以外の間葉系幹細胞 (非 Muse 細胞) とに分け、四塩化炭素投与後 2 日の時点で尾静脈から投与する。投与細胞数はいずれも 2 万細胞とする。30 日にわたり体重等一般状態の他、肝機能酵素を計測し、組織学的検討を行う。

(倫理面への配慮)

(実験におけるヒト細胞使用に関しては

「東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会」より「ヒト骨髄および臍帯組織由来間葉系細胞の解析研究 (2008-82 号)」で承認をすでに受けている。遺伝子導入実験は「東北大学 遺伝子組み換え実験計画承認」を得ている (研研 76-20-35 号)。また動物実験委員会の承認に関しては 2011 医動-282、2011 医動-283、2011 医動-284、2011 医動-285 にて承認を得た上で実験を行っている。

C. 研究結果

移植 30 日後、肝臓内にヒトゴルジ体、および GFP 陽性の Muse 細胞が Hepparl, human albumin 陽性の肝細胞マーカー陽性細胞として肝臓内に生着していた他、Cytokeratin-7 陽性の胆管系細胞としても生着していることが確認された。一方非

Muse 細胞はそもそも、移植初期の1週以降から肝臓内にほとんど残存していなかった。このことから Muse 細胞は血管に投与されたのち、傷害された肝組織を認識し、生着の後、胚葉を超えて中胚葉から内胚葉系の自発的分化を行い、肝組織を構成する細胞に分化すると考えられた。

D. 考察

肝組織に生着した Muse 細胞は肝細胞のマーカーである Albumin, Hepar1 を発現していた。一方非 Muse 細胞は移植の初期段階から肝臓での生着が見られなかった。このことから、傷害組織を認識する能力に Muse 細胞と非 Muse 細胞の間に差があることが示唆された。また Muse 細胞は多能性を持ち、肝細胞への分化能力を示すが非 Muse 細胞にはそのような能力が無いことが分かっている (PNAS, 2010; PNAS, 2011)。従って間葉系幹細胞の中で数パーセントを占める多能性の Muse 細胞は肝組織再建に直接寄与すると期待される。今後は機能評価がより明確な他のモデル (脂肪肝、慢性肝硬変モデルなど) によって機能的評価を行うことが必要であると考えられる。

E. 結論

Muse 細胞は肝細胞などの肝構成細胞に自発的に分化することによって肝修復に寄与する一方、Muse 細胞以外の間葉系幹細胞にこのような能力は無いことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wakao S, Akashi H, Dezawa M. Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, that reside in human mesenchymal tissues. Spinal Surgery (in press).
- 2) Wakao S, Akashi H, Kushida Y, Dezawa M. Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues. Pathology International (in press).
- 3) Y. Kuroda, M. Dezawa. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent Muse cells, in basic research and regenerative medicine. Anat Rec. 297(1):98-110, 2014.
- 4) Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, Chazenbalk G, Aiba S, Dezawa M. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with non-tumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. Stem Cells Dev (in press).
- 5) Kanemaru SI, Kitani Y, Ohno S, Shigemoto T, Kojima T, Ishikawa S, Mizuta M, Hirano S, Nakamura T, Dezawa M. Functional regeneration of laryngeal muscle using bone marrow-derived stromal cells. Laryngoscope. 123(11):2728-34, 2013.
- 6) Aizawa-Kohama M, Endo T, Kitada M, Wakao S, Sumiyoshi A, Matsuse D, Kuroda Y, Morita T, Riera J.J, Kawashima R, Tominaga T, Dezawa M. Transplantation of bone marrow stromal cells-derived neural

- precursor cells ameliorates deficits in a rat model of complete spinal cord transaction. *Cell Transplantation*. 22(9):1613-25, 2013.
- 7) Kuroda Y, Wakao S, Kitada M, Murakami T, Nojima M, and Dezawa M. Isolation, culture and evaluation of Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse) cells. *Nature Protocols*. 8(7):1391-415, 2013.
- 8) Tsuchiyama K, Wakao S, Kuroda Y, Ogura F, Nojima M, Sawaya N, Yamazaki K, Aiba S, Dezawa M. Functional melanocytes are readily reprogrammable from multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells, distinct stem cells in human fibroblasts. *J Invest. Dermatol*. 133(10):2425-35, 2013.
- 9) Hayashi T, Wakao S, Kitada M, Ose T, Watabe H, Kuroda Y, Mitsunaga K, Matsuse D, Shigemoto T, Ito A, Ikeda H, Fukuyama H, Onoe H, Tabata Y, Dezawa M. Autologous engraftment of A9 dopaminergic neurons induced from mesenchymal stem cells in parkinsonian rhesus macaques. *J. Clin. Invest*. 123(1):272-84, 2013.
- 10) 出澤真理 「ヒト生体に内在する新たな多能性幹細胞 Muse細胞：細胞治療，予後の診断，創薬，病態解析への展開の可能性」 *人工臓器* 42(1):16-18, 2013.
- 11) 北田容章、出澤真理 「間葉系幹細胞・Muse細胞を用いた再生医療」 *再生医療叢書* 7:163-187, 2013.
2. 学会発表
- 1) 出澤真理 生体内修復機構を担う多能性幹細胞 Muse細胞の拓く再生医療の道，新学術領域「バイオアセンブラ」第6回公開シンポジウム，2014年3月17日，東北大学
- 2) 出澤真理 生体内修復機構を担うMuse細胞の拓く再生医療の道，第13回日本再生医療学会，2014年3月4日，京都
- 3) 出澤真理 ヒト生体に内在する多能性幹細胞 Muse細胞：再生医学と創薬の融合への道，第55回創薬薬理フォーラム，2014年1月24日，東京
- 4) 出澤真理 自己細胞および細胞バンクを用いた神経・筋肉変性疾患の根本的治療法の開発，彩都産学官連携シンポジウム，2014年1月21日，大阪
- 5) Mari Dezawa Discovery of intrinsic pluripotent stem cells, Muse cells, that reside in adult human mesenchymal tissues. Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic Reprogramming Asia-2013 Meeting, 2013年11月26日，東京大学
- 6) 出澤真理 生体に内在する非腫瘍性の多能性幹細胞 Muse細胞：ヒトは失われた機能を取り戻せるのか，第7回若手医療薬科学シンポジウム，2013年11月23日，東北大学
- 7) 出澤真理 ヒト生体に内在する新たなタイプの多能性幹細胞Muse細胞の発見と再生医療への応用について，第127回遠江医学会秋季大会，2013年11月17日，浜松
- 8) 出澤真理 自己細胞および細胞バンクを用いた神経・筋肉変性疾患の根本的治療法の開発，平成25年度医薬基盤研究所橋渡しセミナー（産学交流セミナー），2013年11月1日，東京
- 9) 出澤真理 ヒト生体に内在する新たな多能性幹細胞Muse細胞：組織修復恒常性の

- 役割, 第66回日本胸部外科学会定期学術集会, 2013年10月19日, 仙台
- 10) Mari Dezawa Discovery of Muse cells, novel pluripotent stem cells that reside in human mesenchymal tissues: implications for new concepts of regenerative homeostasis and stem cell failure. International Seminar Series of Norwegian Center for Stem Cell Research, 2013年10月16日, Oslo, Norway
 - 11) Mari Dezawa Discovery of Muse cells, novel pluripotent stem cells that reside in human mesenchymal tissues: implications for new concepts of regenerative homeostasis and stem cell failure. 10th Annual Norwegian Stem Cell Networking Meeting, 2013年10月14日, Oslo, Norway
 - 12) 出澤真理 間葉系組織に存在する多能性幹細胞(Muse細胞)の可能性, Bio Japan 2013, 2013年10月10日, 横浜
 - 13) Mari Dezawa Novel type of pluripotent stem cells (Muse cells) that reside in adult human mesenchymal tissues and their potential for cell-based therapy. ASahct2013 : International Symposium Anatomical Science for advance in health and clinical therapy, 2013年8月28日, 仙台
 - 14) 出澤真理 ヒト生体に内在する“多能性幹細胞”Muse細胞の発見, 創薬・探索研セミナー, 2013年8月2日, 大阪
 - 15) 出澤真理 生体に内在する多能性幹細胞 Muse細胞の発見: ヒトは失われた機能を取り戻せるのか, 東北大学萩友会関東交流会, 2013年7月15日, 東京
 - 16) 出澤真理 ヒト生体に内在する多能性幹細胞 Muse細胞の発見: 新たな概念 Regenerative homeostasisと stem cell failure の提唱, 北海道大学病院 高度先進医療支援センター臨床試験講演会, 2013年6月28日, 北海道大学
 - 17) 出澤真理 生体内に内在する多能性幹細胞 Muse細胞と regenerative homeostasis, 第102回日本病理学会総会, 2013年6月7日, 札幌
 - 18) 出澤真理 ヒト生体に内在する多能性幹細胞 Muse細胞: 組織修復恒常性の役割, 第28回日本脊髄外科学会, 2013年6月6日, 名古屋
 - 19) 出澤真理 ヒト生体に内在する多能性幹細胞 Muse細胞: 新たな概念 Regenerative homeostasisと stem cell failure の提唱, 第12回松本ボーンフォーラム, 2013年5月18日, 信州大学
 - 20) Mari Dezawa Discovery of Muse cells, intrinsic pluripotent stem cells in human mesenchymal tissues; are they a major player of regenerative homeostasis in our body? NIH-Tohoku University Intl. Symposium, 2013年5月9日, 仙台
 - 21) Mari Dezawa Intrinsic pluripotent stem cells, Muse cells, are a primary source of iPS cells in human fibroblasts. Seminar at Dept. Pediatrics/Human Development, College of Human Medicine, Michigan State University, 2013年4月26日, Michigan State University, USA
 - 22) Mari Dezawa Intrinsic pluripotent stem cells, Muse cells, are a primary source of iPS cells in human fibroblasts. AAA's Annual

Meeting at EB 2013, 2013年4月22日,
Boston, USA

23) 出澤真理 新規に発見された組織恒常性を担う生体内多能性幹細胞：Muse細胞, 日本医工学治療学会第29回学術大会, 2013年4月20日, 横浜

24) Mari Dezawa Discovery of intrinsic pluripotent stem cells, Muse cells in human mesenchymal tissues; are they a major player of regenerative homeostasis in the body? AsiaCORD meeting KOBE 2013, 2013年4月19日, 神戸

G. 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

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

病態進展の病理学的解析と制御法の開発

分担研究者：坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部 教授

研究要旨：肝細胞癌並びに背景肝の分子病理学的多様性を解明することで、発癌初期の分子異常を明らかにする。具体的には、背景肝障害の定量的評価、癌関連遺伝子異常・シグナル伝達異常・幹細胞マーカー発現に着目した解析を行う。本年度は、背景肝における線維成分の定量的評価が発癌リスク予測に有用である可能性が示唆された。LGR5に着目した典型的肝細胞癌の発生進展機構解析のため、LGR5下流遺伝子候補分子の探索を開始した。さらに、背景肝におけるLGR5の発現、分布、陽性細胞の動態を詳細に解析可能とする免疫組織染色に適用可能な抗LGR5抗体の作成を開始した。

A. 研究目的

肝細胞癌の多くは肝炎ウイルスの持続感染による慢性障害肝を背景に生じるが、中でもHCVからの発癌の多くが、前癌病変の異型結節ないし血管新生を伴わない早期肝細胞癌、その脱分化過程に相当する結節内結節型の肝細胞癌、そして転移能を有する進行肝細胞癌へと多段階的に発生・進展することが示されてきている。しかし、その詳細な分子機構、特に発癌初期の分子異常についてはほとんど明らかにされていない。本研究では、そのような肝細胞癌の分子病理学的多様性を解明することで、ウイルス陰性化後も肝細胞癌が顕在化することをより正確に予測、診断し、さらには適切な予防、治療を可能とすることを目指す。

B. 研究方法

1) 背景肝障害の定量と発癌リスク評価

①生検標本における膠原線維・弾性線維

定量とリスク評価

2) がん関連遺伝子異常・シグナル伝達異常と発癌・進展

- ①Bmi-1、c-Myc の発現亢進・動態解析
- ②その他癌関連遺伝子異常・シグナル伝達異常の分子病理学的検討

3) 幹細胞マーカー発現と発癌・進展

- ①LGR5 に着目した典型的肝細胞癌の発生進展機構解析
- ②各種幹細胞マーカーの発現パターンの解析と上記遺伝子変異・シグナル伝達異常との関連性の検討

(倫理面への配慮)

本研究計画では、癌組織で新たに生じた遺伝子の変化、発現の変化の解析を目的としており、三省合同指針にあるヒトゲノム・遺伝子解析研究は含まれない。ヒト由来の組織を用いた研究に当たっては、三省合同による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」及び科学

技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守すると共に、当大学の倫理審査委員会の承認を得て実施する（承認番号16-34-4）。

C. 研究結果

- 1) EVG 染色を行った肝生検標本をデジタル化し、コラーゲンとエラスチンの定量的な解析を行った（武蔵野赤十字病院との共同研究）。各線維成分の組織占有率は、F ステージと相関することが示された。さらに、発癌の有無との比較解析を行い、エラスチンが発癌リスクの指標として有用である可能性が示唆された。
- 2) β -catenin の遺伝子変異は約 40%と、C 型肝炎を背景とする肝細胞癌で最も高率に見られるが、我々は、 β -catenin の遺伝子変異をもつ肝細胞癌で LGR5/GPR49 遺伝子の発現が亢進していることを見出し、LGR5 の機能解析をすすめてきた。これまでに、LGR5 が癌細胞の生存能や肝細胞癌に特徴的な形態形成に関与していることを見出し、典型的な肝細胞癌の発生進展に関与している可能性を報告した。その機序をさらに詳細に解析するため、過剰発現系において発現の変化する遺伝子を、マイクロアレイにて解析を行った。さらに、蛋白レベルでの解析を可能とするため、LGR5 特異的なモノクローナル抗体の作成を開始した。

D. 考察

- 1) 症例数をさらに増やし、複数のコホー

トでの検討を行うことで、エラスチン定量の意義につき、さらに検討を行う予定である。

- 2) LGR5 の肝細胞癌における機能解析を継続して行う。さらに、背景肝における LGR5 の発現、分布、陽性細胞の動態を詳細に解析可能とするために、免疫染色に利用可能な特異抗体の作成をめざす。これにより、成人の幹細胞特異的マーカーとされる LGR5 の発癌への関与を明らかにする。

E. 結論

背景肝における線維成分の評価が発癌リスク予測に有用である可能性が示唆された。LGR5 に着目した典型的肝細胞癌の発生進展機構解析のため、LGR5 下流遺伝子候補分子の探索を開始した。さらに、LGR5 発現細胞の動態解析を可能とする免疫組織染色に適用可能な抗 LGR5 抗体の作成を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Abe T, Hashiguchi A, Yamazaki K, Ebinuma H, Saito H, Kumada H, Izumi N, Masaki N, Sakamoto M. Quantification of collagen and elastic fibers using whole-slide images of liver biopsy specimens. *Pathol Int.* 63, 305-10, 2013.
- 2) Fukuma M, Tanese K, Effendi K, Yamazaki K, Masugi Y, Suda M, Sakamoto M. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 regulates epithelial cell phenotype and survival of hepatocellular

carcinoma cells. Exp Cell Res. 319, 113-21,
2013.

2. 学会発表

なし

G. 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

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

卵巣摘出HCVトランスジェニックマウスの肝内酸化ストレス増強機構の解析

分担研究者：日野 啓輔 川崎医科大学肝胆膵内科学 教授

研究協力者：富山 恭行 川崎医科大学肝胆膵内科学

研究要旨： C型肝炎ウイルス（HCV）感染の閉経後女性は肝内酸化ストレスが増強することで肝発癌しやすくなるのではないかという仮説のもとに、卵巣摘出（ovariectomy, OVX）を行ったHCVトランスジェニックマウス（TgM）を用いて、OVXならびにHCVタンパクが酸化ストレスに及ぼす影響とその機序を検討した。コントロールマウス（C57BL/6）とTgMにSham手術あるいはOVXを行う4群を設定し比較検討した。OVXにより肝内活性酸素（ROS）の産生は亢進するが、OVX-TgMは他の3群に比べてROS産生が顕著であった。C57BL/6ではOVXにより抗酸化酵素（SOD2, GPx1）の発現も亢進するがOVX-TgMでは亢進せず、その機序としてTgMでは抗酸化酵素の発現調節の共役因子であるPGC1 α の誘導が弱く、さらにPGC1 α を制御するAMPK α の活性化が抑制されていた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）関連肝発癌には明らかな男女差が存在するが、女性も閉経後は経年的に肝発癌率が上昇し、高齢になると肝発癌率の男女差は殆どなくなってくる。一方、これまでの研究からHCV関連肝発癌に酸化ストレスが重要な役割を果たすことが明らかとなっている。そこで、HCV感染の閉経後女性は肝臓内の酸化ストレスが増強することで肝発癌しやすくなるのではないかという仮説のもとに、卵巣摘出（ovariectomy, OVX）を行ったHCVトランスジェニックマウス（TgM）を用いて、OVXならびにHCVタンパクが酸化ストレスに及ぼす影響とその機序について検討した。

B. 研究方法

HCV全遺伝子が組み込まれた雌のTgMとその同系であるC57BL/6マウスに対して4-6週齢でOVXあるいはSham手術を行う4群を設定し、6ヶ月齢でsacrificeを行い、血液ならびに肝組織の酸化ストレス状態について検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は川崎医科大学動物実験倫理委員会の承認を受けて行われた。

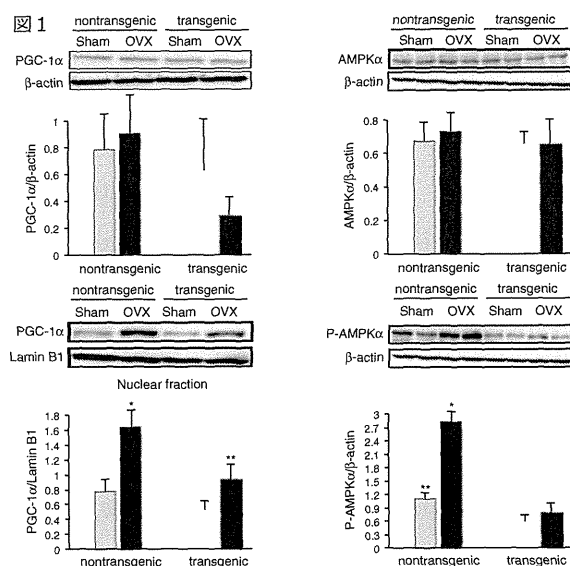
C. 研究結果

C57BL/6、TgMに関係なくOVXにより血清レプチンの上昇とともに摂餌量が増加し、体重、肝重量が増加する一方、子宮重量は減少した。興味深いことに血清ALT値はTgMでのみOVXで有意に上昇した。肝組織ではOVX-TgMに著明な肝脂肪化を認め、肝

内の中性脂肪含有量は他の3群に比べて有意に高かったが、いずれの群にも炎症は認めなかった。肝組織の ROS (superoxide) は C57BL/6、TgM に関係なく OVX により有意に上昇したが、OVX-TgM の肝内 ROS 産生量は他の3群に比べて顕著であった。肝内炎症性サイトカインの検討では IL-6 は C57BL/6、TgM に関係なく OVX により有意に上昇したが、IL-1 β や TNF α は OVX による明らかな変化を認めなかった。そこで OVX による ROS 産生に伴う代償性の抗酸化能を C57BL/6 と TgM で比較検討した。血清中の酸化ストレスに対する抗酸化能の指標 BAP (Biological Antioxidant Potential)/dROM (derivatives of reactive oxidative metabolites) 比は TgM で有意に低下した。肝内の抗酸化酵素 (superoxide dismutase 2; SOD2, glutathione peroxidase 1; GPx1) も C57BL/6 では OVX により有意に上昇したが、TgM では変化を認めなかった。そこで、抗酸化酵素の発現を制御する共役因子である proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α (PGC-1 α) とその上流に存在する adenosine monophosphate-activated protein kinase- α (AMPK α) の活性化を測定したところ、OVX により PGC-1 α は活性化されたがその程度は TgM で弱く、AMPK α の活性化は TgM では認められなかった (図 1)。

D. 考察

HCV 感染細胞を用いた実験から HCV は serine/threonine kinase のひとつである protein kinase B の活性化を介して



AMPK α の Thr172 のリン酸化を抑制することで AMPK α の活性化が抑制されることが報告されている (PNAS 2010)。一方、redox biology の観点からは細胞内が酸化状態の場合は kinase 活性が優位になることが明らかにされている。したがって、HCV タンパク存在下では酸化ストレス状態による kinase 活性優位の状態が引き起こされ、OVX による ROS 産生に対する代償性抑制機構としての AMPK α の活性化が抑制された可能性が考えられる。これら一連の結果は HCV 感染閉経後女性において経年的に肝内酸化ストレスが増強することを示しており、肝発癌上昇の一因ではないかと考えられる。

E. 結論

OVX-TgM では OVX による ROS 産生に対する抗酸化能が抑制されていた。その機序としてストレス応答性 kinase のひとつである AMPK α の活性化が抑制されることで、その下流に存在し、抗酸化酵素の発現を制御する PGC-1 α の活性化の程度が抑制されていることが一因と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomiyama Y, Nishina S, Hara Y, Kawase T, Hino K. Hepatic oxidative stress in ovariectomized transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein is augmented through suppression of AMPK α / PGC-1 α signaling. Hepatol Res doi; 10.1111/hepr.12254.
- 2) Hino K, Hara Y, Nishina S. Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery voice in hepatitis C. Hepatol Res doi; 10.1111/hepr.12247.

2. 学会発表

- 1) Tomiyama Y, Nishina S, Hara Y, Hino K. Ovariectomized transgenic mice expressing hepatitis C virus polyprotein develop hepatic steatosis through inactivation of AMPK/PGC1 α signaling. AASLD The liver Meeting Washington 2013.
- 2) 富山恭行、小山展子、佐々木 恭、仁科惣治、吉岡奈穂子、原 裕一、日野啓輔。HCVタンパクはエストロゲン欠乏起因性酸化ストレスに対する抗酸化機構を抑制する。第49回日本肝臓学会総会 東京 2013.

G. 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

特になし

HCVの長期複製により発現変動した宿主因子の細胞癌化に及ぼす影響

分担研究者：加藤 宣之 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）RNAの複製が細胞内で長期に及んだ場合において、細胞機能、特に細胞癌化にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。HCV研究にこれまで汎用されてきたヒト肝癌細胞株HuH-7とは異なる遺伝子発現プロファイルを示すヒト肝癌細胞株Li23由来の細胞を用いて本研究を行った。これまでに、全長HCV-RNA複製細胞を用いたcDNAマイクロアレイ解析などにより、HCV-RNAの長期複製により不可逆的に発現変動した9種類の宿主遺伝子を同定している。今年度は、全長HCV-RNAの長期複製による細胞機能の変化を引き続き解析するとともに、同定した9種類の宿主遺伝子のうち顕著な発現抑制が観察された*BASPI*と*CPB2*遺伝子について解析し、以下に示す成果を得た。(1) 全長HCV-RNA複製細胞を2年間継代培養すると、アポトーシス感受性になる傾向が認められた(2) *BASPI*と*CPB2*遺伝子のプロモーターアッセイを行い、プロモーター活性に必要な領域の同定を行った。脱メチル化剤処理による発現変動解析やメチル化配列特異的PCR解析により両遺伝子の発現抑制にメチル化が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の感染は肝がん患者の8割に認められており、HCVの持続感染状態であるC型慢性肝炎は肝細胞のがん化の重要な因子である。肝発がんを予防するためには、HCVを体内から排除して持続感染状態を脱することが必須である。C型慢性肝炎に対する治療もペグ化インターフェロン、リバビリンおよびテラプレビル（HCVプロテアーゼ阻害剤）による三剤併用療法により患者の70-80%は治癒するようになった。しかしながら、HCVの持続感染による発がん機構については、諸説あるものの未だ解明されていない。それは、HCV

が宿主において持続的に増殖した場合に、宿主がどのような影響を受けるかについてよく分かっていないためである。これまで、多くの研究者が、この問題の解明を試みて来たが、HCVが増殖する培養細胞株はヒト肝癌由来のHuH-7細胞株のみで手詰まり状態であった。ヒト肝置換キメラマウスも実験系として使われているものの、費用がかかるうえにHCVの増殖に個体差があることから発がんに関する研究にはあまり適していない。

2009年、我々は、HuH-7細胞株とは遺伝子発現プロファイルが異なるヒト肝癌細胞株Li23がHCVの増殖を許容することを見出

し報告した。そして、このLi23由来の細胞を用いることによりHCV 1b遺伝子型（0株）の全長HCV-RNA複製細胞株（ネオマイシン耐性遺伝子を有しているのが本来のHCVゲノム9.6kbより長く11 kbになっている。HCVゲノムと区別するため、「全長HCV-RNA」という言葉を使用している）として4種類（OL, OL8, OL11およびOL14細胞と名付けた）樹立することに成功した。

我々は、樹立したこれらの全長HCV-RNA複製細胞を用いることにより、これまでのHuH-7由来の細胞を用いた研究では得られなかった知見が新たに見出されるのではないかと考えた。また、これまでは、HCVの短期的な複製増殖に関与する多くの宿主因子の同定がなされて来た。我々は、このような方向の研究ではなく、HCVの複製増殖が長期に及んだ場合に宿主側に何らかの変化が生じ、それが蓄積して結果的には不可逆的な大きな変化になるのではないかという仮説を立てた。この仮説の検証を試み、これまでに、全長HCV-RNA複製細胞を用いたcDNAマイクロアレイ解析などにより、HCV-RNAの長期複製（2年以上）により不可逆的に発現変動した9種類の宿主遺伝子（発現亢進した *WISP3*, *TBC1D4*, *ANGPT1*, *SEL1L3* および *CDKN2C* 遺伝子と発現低下した *BASP1*, *CPB2*, *ANXA1* および *SLC1A3* 遺伝子）を同定した。本研究では、全長HCV-RNAの長期複製による細胞機能の変化を引き続き解析するとともに、同定した9種類の宿主遺伝子のうち顕著な発現抑制が観察された *BASP1* (Brain abundant, membrane attached signal protein 1) と *CPB2* (Carboxypeptidase B2) 遺伝子について解

析し、今年度は、以下に示すような研究成果を得た。

B. 研究方法

(1) 全長HCV-RNAの長期複製による細胞機能の変化の解析

細胞の増殖能の指標として細胞の倍加時間を測定した。

細胞の足場非依存性増殖能については、10 cm プレートを用いて0.35%の軟寒天中に 2×10^4 或は 4×10^4 個の細胞をまき、培養21~27日後に出現してくる細胞コロニーの数や大きさにより判定した。

細胞のアポトーシス感受性については、96ウェルプレートを用いてウェルあたり 3×10^3 個の細胞をまき、24時間後に、TNF- α (1.5 ng/mL 位までの各種濃度) と Cycloheximide (CHX) (2.5 μ g/mL までの各種濃度) を添加、12時間後にWST-1アッセイを行い、生存細胞数の相対的評価を行った。

(2) *BASP1* と *CPB2* 遺伝子の発現変動解析、遺伝子プロモーター解析およびDNAメチル化解析

細胞に脱メチル化剤である5-azacytidine (5-azaC) (2.5 μ M) やヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤である4-phenylbutyric acid (4-PBA) (1 mM) を添加して、48時間後にそれぞれの細胞からTotal RNAを調製した。これらのRNAを用いて、*BASP1* と *CPB2* のmRNAの発現レベルをLightCyclerを用いた定量的RT-PCR法により調べた。

Li23由来の全長HCV-RNA複製細胞OL8からDNAを調製して、*BASP1* と *CPB2* 遺伝子の転写開始点上流2 kbと転写開始点下流100 base

ほどを含むDNAフラグメントをPCR法により増幅した。得られたそれぞれのDNAフラグメント（約 2.1 kb）を市販の pGL4.10[luc2]ベクター（蛍ルシフェラーゼをコードしている）の *Nhe*I と *Hind*III サイトに導入した。それぞれ 2.1 kb より 5' 末端部から少しずつ短くした DNA フラグメントも作製して、同様に pGL4.10[luc2]ベクターに導入した。得られたプラスミドベクター (0.4 µg) を内部コントロール（レニラルシフェラーゼをコードしている）として用いた pRL-SV40 (0.4 ng) 或は pRL-CMV (0.4 ng) とともに FuGENE HD にて OL8 (0Y) 細胞（樹立時の OL8 細胞であることを示す）或は OL8 (2Y) 細胞（2 年継代培養したことを示す）に導入した。48 時間後に、蛍ルシフェラーゼとレニラルシフェラーゼを測定して、蛍ルシフェラーゼ値を補正した。

OL8 (0Y) 細胞と OL8 (2Y) 細胞から抽出調製した DNA を MethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit（タカラバイオ）を用いて bisulfite（重亜硫酸塩）処理して DNA の Cytosine を Uracil に変換した。処理した DNA を鋳型として、*BASPI* と *CPB2* 遺伝子プロモーター領域を TaKaRa EpiTaq™ HS（タカラバイオ）を用いて PCR を行い増幅した。増幅産物を T-ベクター pMD19（タカラバイオ）にクローニングし、それぞれ得られた 10 クローンについて塩基配列を決定した。これにより、どの CpG の C がメチル化されているかを決定し、それぞれの部位でのメチル化率を算出した。

（倫理面への配慮）

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているも

のである。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究結果

（1）全長 HCV-RNA の長期複製による細胞機能の変化の解析

全長 HCV-RNA 複製細胞の増殖能が長期継代によりどの程度変化するかを調べた。4 種類の細胞株（OL, OL8, OL11 および OL14）について調べた結果、細胞株の樹立時における倍加時間はいずれも 41 時間であったのに対して、継代 2 年後にはいずれも 28 時間と速まり、継代 3.5 年後には 25-28 時間となって明らかに増殖能が高まっていた。しかしながら、対照細胞株である OL8c と OL11c 細胞（それぞれ OL8 と OL11 細胞から HCV RNA を排除した治癒細胞）においても、倍加時間は作成時には 32 時間であったものが、2 年および 3.5 年継代後においては、それぞれ 23 時間と 22 時間と速まっていたため、HCV-RNA の複製が長期間続いたための効果とは言えない。ただ、HCV-RNA の複製が起こると細胞増殖能が低下するという現象が例外なく認められた。

次に、全長 HCV-RNA 複製細胞の長期継代によって足場非依存性増殖能に変化があるかどうかを検討した。従来より行われている常法に従って軟寒天中に一定量の細胞をまき約 3 週間後に出現してくるコロニー数に変化がないかどうかを調べた。まず、親株の Li23 細胞が軟寒天中で増殖性があるかどうかを汎用されている他のヒト肝癌細胞

胞株 (HepG2, HLE や HuH-7 など) と比較することにより調べた。その結果、Li23細胞は他のヒト肝癌細胞と比較して出現するコロニーの数や大きさに遜色なく、 4×10^4 個の細胞から数十個のコロニーが出現することを確認した。このような条件下で、全長 HCV-RNA 複製細胞である OL8(0Y) と OL8(2Y) の比較や治療細胞である OL8c(0Y) と OL8c(2Y) の比較を行った。その結果、2年継代しても出現してくるコロニー数や大きさには差が認められないことが分かった。

次に、細胞の長期継代によりアポトーシス感受性に差が生じるかどうかを調べた。まず、アポトーシス誘導剤として TNF- α と Cycloheximide (CHX) を用いて、OL8(0Y) 細胞がどの程度の薬剤濃度でアポトーシスを引き起こすかを調べた。HuH-7 細胞を用いた他の研究者の実験では、50 ng/mL の TNF- α と 5 μ g/mL の CHX でアポトーシスを誘導していたが、これらの濃度では Li23 由来の OL8(0Y) 細胞はほぼ全滅してしまうことが分かった。そのため、両薬剤の濃度を下げ、種々変更して、アポトーシスに対する濃度依存性がはっきり分かる条件を見つけるための実験を詳細に行った。その結果、OL8(0Y) 細胞の場合は、CHX を 1.25 μ g/mL に固定して、TNF- α を 0.1~1.5 ng/mL と可変にすると、TNF- α の濃度に依存したアポトーシスが薬剤添加 12 時間後に明白に認められることが分かった。TNF- α が 0.4 ng/mL では 50% 程度の細胞にアポトーシスが引き起こされていた。さらに、同じ条件で OL8(2Y) 細胞を処理すると 70% 以上の細胞でアポトーシスが誘導され、

OL8(0Y) 細胞と比較して明らかにアポトーシス感受性になっていることが分かった。このような現象には再現性もあることから、細胞の長期継代により変化したものであることが示唆された。

(2) *BASPI* と *CPB2* 遺伝子の発現変動解析、遺伝子プロモーター解析および DNA メチル化解析

全長 HCV-RNA 複製細胞を 2 年間継代培養すると顕著に発現レベルが低下する遺伝子として同定した *BAP1* と *CPB2* 遺伝子について、培養開始後、どの時点で発現レベルが低下するかについて昨年度検討した。その結果、*BASPI* の mRNA レベルは、培養開始半年後で既に 1/16 程度に低下し、その後も 3.5 年まで時間とともに徐々に低下していることが分かった。*CPB2* の mRNA レベルは、このようなパターンとは異なり培養開始半年後においては、ほとんど低下していないにも関わらず、半年~1 年後の間に急激に低下し、その後の低下は 3.5 年までほとんどないという発現レベルの変動パターンが得られた。これらの結果から、それぞれの遺伝子プロモーター領域におけるメチル化や脱アセチル化による可能性がまず考えられた。

この可能性を調べるために、本年度は、OL(0Y) 細胞や OL8(3.5Y) 細胞に 5-azaC (脱メチル化剤) や 4-PBA (HDAC 阻害剤) あるいは両剤の併用で添加し、2 日後に両遺伝子の mRNA の定量を行った。その結果、OL8(3.5Y) 細胞でのみ *BASPI* mRNA のレベルが 5-azaC 添加で 4 倍程度上昇することが分かった。4-PBA 添加による発現上昇は 2 倍程度認められたものの両細胞で共に認め

られたので、OL8(3.5Y)細胞における発現低下を説明できるものではなかった。また、5-azaC と 4-PBA を併用した場合でも 5-azaC の効果のみが観察され、4-PBA の効果は認められなかった。

CPB2 遺伝子の発現レベルも OL8(3.5Y)細胞でのみ 5-azaC 添加により 4 倍程度上昇することが分かった。4-PBA 添加による発現上昇は認められなかった。また、5-azaC と 4-PBA を併用した場合でも 5-azaC の効果のみが観察され、4-PBA の効果は認められなかった。これらの結果から、OL8 細胞の長期継代においては、両遺伝子のプロモーター領域のメチル化が発現レベルの低下に関わっているのではないかと予想された。

両遺伝子のプロモーターについては、*CPB2* 遺伝子についてのみラット肝臓や HepG2 細胞での報告があるものの詳細はよく分かっていない。今回、OL8(0Y)や OL8(2Y)細胞を用いて両遺伝子のプロモーター解析を行い、プロモーター活性に必要な領域の同定と長期継代によりプロモーター活性に変化がないかどうかを調べた。

まず、OL8(0Y)細胞から得られた両遺伝子の転写開始点から上流 2 kb 程度を含む DNA フラグメントをルシフェラーゼのレポーターアッセイ用ベクターに組み込んだものを作成した。同時に上流部を 5' 末端側から徐々に削った 6 種類の欠失体もそれぞれ作成した。これらのベクターをそれぞれ細胞内に導入して、レポーターアッセイを行った。その結果、*BASPI* 遺伝子の場合、両細胞間でプロモーター活性に大きな差はなく、-206 まで削っても活性が低下することはなかったが、-50 まで削ると活性が

ほとんどなくなった。この結果から、-206 と -50 の間に主な活性があることが分かった。*CPB2* 遺伝子の場合も両細胞間でプロモーター活性に差は認められなかった。この遺伝子の場合、-100 まで削っても活性の低下はなく、-50 まで削っても 30-50% の活性が維持されていたので、プロモーター活性は -100 よりも下流でコントロールされていることが分かった。

以上のプロモーターアッセイにより明らかになった両遺伝子のプロモーター活性領域を含むようにして、次にメチル化配列特異的 PCR (MSP) 解析を行った。*BASPI* 遺伝子については、-400~+300 まで、*CPB2* 遺伝子については、-700~+250 までを解析領域とした。OL8(0Y)と OL8(2Y)細胞からそれぞれ DNA を調製して、bisulfite 処理を行った。その後、解析する領域について PCR で増幅後 MSP 解析を行った。それぞれの CpG におけるメチル化率 (詳細は方法の欄に記載) を決定した。

その結果、*BASPI* 遺伝子については、全体に渡って、OL8(0Y)細胞よりも OL8(2Y)細胞でメチル化が進んでいることが分かった。しかしながら、プロモーター活性部位 (-206~-50) においては、メチル化の進行が OL8(2Y)細胞でもそれほど顕著ではないということも分かった。*CPB2* 遺伝子についても CpG 部位が少ないものの *BASPI* 遺伝子と同様の傾向が認められた。しかしながら、プロモーター活性部位 (-100~+76: +76 はプロモーターアッセイに使用した DNA フラグメントの 3' 端) のメチル化率は OL8(0Y)細胞と OL8(2Y)細胞間でほとんど差は認められなかった。

D. 考察

(1) 全長 HCV-RNA の長期複製による細胞機能の変化の解析

全長 HCV-RNA 複製細胞を長期に継代しても治癒細胞の長期継代と異なる細胞増殖能や足場非依存性増殖能の変化は認められなかった。しかしながら、アポトーシス感受性については、全長 HCV-RNA 複製細胞を長期に継代すると、予想とは異なりアポトーシス感受性になることが明らかになった。ただ、現時点では、治癒細胞の長期培養効果がどうなるかをまだ検討していないので、HCV-RNA の長期複製特異的に起こっている現象かどうかを確定できていない。細胞を長期に継代培養（増殖に有利なクローンの選択が起こる）ただけでアポトーシスに対する感受性が大きく変化するとは考えにくい。そのため、HCV-RNA 複製の何らかの影響が出ているのではないかと推察される。今後、他のアポトーシス誘導剤（アクチノマイシン D、デキサメサゾン、エトポシドなど）を用いた場合も同様の現象が認められるかどうかの検討を行う予定である。

(2) *BASPI* と *CPB2* 遺伝子の発現変動解析、遺伝子プロモーター解析および DNA メチル化解析

今年度の解析により *BASPI* と *CPB2* 遺伝子に生じた顕著な発現低下は DNA メチル化が少なくとも原因の 1 つであることが示唆される結果を得た。しかしながら、両遺伝子のプロモーター活性領域における CpG のメチル率を調べた結果、*BASPI* の場合は、2 年の継代培養でメチル化率が上昇しているものの顕著ではないことからこれだけで

発現低下を説明できるかどうかは、プロモーター活性領域に存在する CpG のどれが活性に寄与しているかどうかを明らかにする必要がある。次年度はこの点を明らかにするために、変異体を作成してさらに詳細なプロモーターアッセイを行う予定である。*CPB2* の場合は、プロモーター解析により得た活性領域には CpG が 1 カ所しかなく、メチル化率にも変化がなかったことから、脱メチル化剤により得られた発現上昇は、このプロモーター領域のメチル化の解除というよりも、このプロモーター活性に関与する転写因子の脱メチル化剤による活性化効果ではないかと推察される。確かに今回の解析で得られたプロモーター活性領域には、AP-1, HNF1- α , NF-Y および C/EBP 配列が存在することから、これらのどの因子がプロモーター活性に重要なのかを今後明らかにする予定である。そのような因子が同定されれば、長期培養による影響についてメチル化と合わせて考察することができ全体の解明につながるものと考えられる。

また、このような遺伝子の発現低下が及ぼす影響（細胞増殖やがん化）については、両遺伝子が発現しているヒト不死化肝細胞を用いた解析モデルを今後構築する予定である。

E. 結論

今年度、以下に示した 2 項目の成果を得た。(1) 全長 HCV-RNA 複製細胞を 2 年間継代培養すると、アポトーシス感受性になる傾向が認められた (2) *BASPI* と *CPB2* 遺伝子のプロモーターアッセイを行い、プロモーター活性に必要な領域の同定を行った。

脱メチル化剤処理による発現変動解析やメチル化配列特異的PCR解析により両遺伝子の発現抑制にメチル化が関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Dansako H, Yamane D, Welsch C, McGivern DR, Hu F, Kato N, Lemon SM. Class A scavenger receptor 1 (MSR1) restricts hepatitis C virus replication by mediating toll-like receptor 3 recognition of viral RNAs produced in neighboring cells. *PLoS Pathogens*, 9: e1003345 (2013).
- 2) Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Adenosine kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin. *Hepatology*, 58:1236-1244 (2013).
- 3) Ueda Y, Takeda M, Mori K, Dansako H, Wakita T, Kim HS, Sato A, Wataya Y, Ikeda M, Kato N. New preclinical antimalarial drugs potently inhibit hepatitis C virus genotype 1b RNA replication. *PLoS ONE*, 8: e72519 (2013).
- 4) Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem Biophys Res Commun*, 430:592-597 (2013).
- 5) Tanaka T, Kuroda K, Ikeda M, Wakita T, Kato N, Makishima M. Hepatitis C virus NS4B targets lipid droplets through hydrophobic residues in the amphipathic helices. *J Lipid Res*, 54:881-892 (2013).

6) Sato A, Saito Y, Sugiyama K, Sakasegawa N, Muramatsu T, Fukuda S, Yoneya M, Kimura M, Ebinuma H, Hibi T, Ikeda M, Kato N, and Saito H. Suppressive effect of the histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), on hepatitis C virus replication via epigenetic changes in host cells. *J Cell Biochem*, 114:1987-1996 (2013).

2. 学会発表

- 1) 瀬島 寛恵、森 京子、團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之. C型肝炎ウイルスの複製機構に関わるmicroRNAの探索. 第49回日本肝臓学会総会、東京、2013年6月.
- 2) 瀬島 寛恵、森 京子、佐藤 伸哉、團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之. Identification of microRNAs showing differential expression profiles in cell-based HCV RNA replication for 2 years. 第72回日本癌学会学術総会、横浜、2013年10月.
- 3) Sejima H, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Identification of two microRNAs showing decreased expression in cell-based HCV RNA replication for 2 years. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October, 2013.
- 4) Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through the association with core protein around lipid droplet. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October, 2013.

- 5) 瀬島 寛恵、森 京子、佐藤 伸哉、團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之. C型肝炎ウイルスのゲノム複製が2年間にわたることで発現レベルが変動したマイクロRNAの同定. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月.
- 6) 平本 洸貴、團迫 浩方、瀬島 寛恵、森 京子、佐藤 伸哉、池田 正徳、脇田 隆字、加藤 宣之. C型肝炎ウイルスのライフサイクルにおける宿主因子annexin A1の役割. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月.
- 7) 團迫 浩方、平本 洸貴、池田 正徳、脇田 隆字、加藤 宣之. Rab18はC型肝炎ウイルスの感染性粒子形成に重要な宿主因子である. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月.
- 8) 田中 寅彦、山本 真民、黒田 和道、脇田 隆字、池田 正徳、加藤 宣之、槇島 誠. C型肝炎ウイルスNS4Bの両親媒性ヘリックス内疎水性残基がウイルス複製に果たす役割. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月.

G. 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

特になし