

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

HCV NS5Aと宿主因子の相互作用及び細胞癌化に及ぼす影響の解析

分担研究者：堀田 博 神戸大学大学院医学研究科 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)感染において宿主遺伝子の発現が著しく脱制御されることが知られており、細胞癌化機序のひとつとして重要視されている。メチルトランスフェラーゼSMYD3はヒストンH3のK4やヒストンH4のK5、K20等をメチル化し、クロマチンの構造変換を引き起こすことによって、様々な原癌遺伝子や細胞周期調節遺伝子及び癌細胞の浸潤・転移に係る遺伝子の発現制御に関与している。また、SMYD3は乳癌をはじめ肝細胞癌、大腸癌、前立腺癌などで過剰発現していることも知られている。一方、HCVの非構造タンパク質NS5Aは非常に多機能であり、様々な宿主遺伝子の発現を促進または抑制し、さらに細胞内シグナル伝達を攪乱させることが知られている。本研究では、タンデムタグ付加NS5A発現細胞の抽出液を用いてアフィニティークロマトグラフィー/質量分析法により新規NS5A結合宿主因子候補として同定されたSMYD3が、HCV感染細胞やHCVレプリコン細胞内で実際にNS5Aと結合していることを実証した。そして、欠失変異体を用いたマッピング解析により、NS5Aのドメイン2及びSMYD3のN末端34アミノ酸領域が、両者の結合に重要であることを明らかにした。SMYD3のN末端34アミノ酸は宿主因子Hsp90との結合に関与すること、及び、この領域を欠失したSMYD3変異体のメチルトランスフェラーゼ活性が亢進することが報告されている。NS5AがN末端34アミノ酸領域に結合することによってSMYD3のメチルトランスフェラーゼ活性にどのような影響を及ぼすかはHCVの病原性を考える上で興味深い。また、本研究により、乳癌で発現亢進が見られるBCMP11遺伝子の転写をNS5Aが促進すること、及びその促進効果はSMYD3との共発現によりさらに増強することが明らかになった。HCVによる発癌や病原性発現に、NS5AとSMYD3の相互作用を介したBCMP11遺伝子の転写亢進がどのように関わっているかは今後の重要な検討課題であると考えられる。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染においては、宿主遺伝子の発現が著しく脱制御されることが知られており、細胞癌化の機序のひとつとして重要視されている。また、HCVの非構造タンパク質NS5Aは非常に多機能であ

り、様々な宿主遺伝子の発現を促進または抑制し、さらに細胞内シグナル伝達を攪乱させることが知られている。

我々はこれまでに、タンデムタグ・アフィニティークロマトグラフィー/質量分析法により、HCV NS5Aがヒストンメチルトラ

ンスフェラーゼSMYD3と結合することを見出した。SMYD3は乳癌をはじめ肝細胞癌、大腸癌、前立腺癌などで過剰発現していることが知られている。また、SMYD3はヒストンH3のK4やヒストンH4のK5、K20等をメチル化し、クロマチンの構造変換を引き起こすことによって、様々な原癌遺伝子や細胞周期調節遺伝子及び癌細胞の浸潤・転移に係る遺伝子の発現制御に関与することが報告されている。

本研究では、HCV NS5AとSMYD3について詳細に解析し、両者の結合領域をマッピングするとともに、SMYD3が宿主遺伝子の発現に及ぼす影響について解析した。

B. 研究方法

(1) ウイルスと細胞：HCV J6/JFH-1株及びHuh7.5細胞(ロックフェラー大学C.M. Rice教授より分与)を感染実験に用いた。他に、HCV全長ゲノムRNA(0株;岡山大学・加藤宣之教授より分与)及びサブゲノムRNA(Con1株;ハイデルベルグ大学R. Bartenschlager教授より分与)が自律複製するレプリコン細胞をも用いた。

(2) NS5AとSMYD3の結合の解析：発現プラスミドを用いてHuh7.5細胞に一過性に発現させたSMYD3あるいは内在性SMYD3と、HCV感染やゲノム複製により発現するNS5Aとの結合を、それぞれの特異抗体を用いた免疫共沈法により解析した。また、NS5AやSMYD3の欠失変異体を発現するプラスミドを作製し、NS5AとSMYD3の結合に必要な領域を解析した。

(3) NS5AとSMYD3の細胞内局在の解析：Huh7.5細胞に一過性に発現させたSMYD3

(一部の実験では内在性発現SMYD3)と、HCV感染・複製により発現するNS5Aの細胞内局在について、蛍光抗体法及びproximity ligation assay (PLA)法により解析した。

(4) NS5A及びSMYD3が宿主遺伝子発現に及ぼす影響の解析：NS5Aを構成的に発現する細胞、その中でSMYD3 mRNAに対するshRNAを構成的に発現する細胞、及び、それぞれの対照となる細胞を作製し、RNAを回収して、DNAマイクロアレイ解析により、それぞれの細胞における遺伝子発現量の比較検討を行った。

また、ルシフェラーゼレポーターアッセイによるプロモーター活性の測定及び定量的RT-PCR法によるmRNA量の比較定量により、候補となる宿主遺伝子発現に及ぼすNS5A及びSMYD3の影響について解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換えHCVの使用は神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認及び文部科学大臣の確認を得た。ウイルス感染実験は、微生物学研究室において、遺伝子組換え実験及びバイオセーフティーに関する法令及び指針等に準拠して実施した。

C. 研究結果

(1) NS5AとSMYD3の結合の確証：まず、発現プラスミドを用いてHuh7.5細胞にNS5AとSMYD3を一過性に発現させ、それぞれの特異抗体を用いた免疫共沈法により、両タンパク質の結合を確認した。次いで、HCV感染細胞及びHCV RNAレプリコン複製細胞に、発現プラスミドによりSMYD3を一過性に発現させ、免疫共沈法により、両タ

ンパク質の結合を明らかにした。さらに、鋭敏な PLA 法を用いて、HCV RNA レプリコン複製細胞で発現する NS5A と内在性 SMYD3 の結合を明らかにした。

(2) NS5A と SMYD3 の相互の結合領域の同定：NS5A のドメイン 1、ドメイン 2+3、及びドメイン 3 を発現プラスミドにより一過性に発現させ、同じく一過性発現させた全長 SMYD3 との結合の有無を免疫共沈法により検討した。その結果、NS5A のドメイン 2+3 は NS5A と結合するが、ドメイン 1 及びドメイン 3 は SMYD3 と結合しなかった。この結果より、NS5A のドメイン 2 が SMYD3 との結合に重要であることが明らかになった。

次に、SMYD3 のメチルトランスフェラーゼ活性の調節に重要であることが示されている N 末端 34 アミノ酸領域を欠失する変異 SMYD3 発現プラスミド、及び N 末端側 1~247 アミノ酸発現プラスミドを作製し、NS5A 発現プラスミドと共に Huh7.5 細胞にトランスフェクトし、免疫共沈法により NS5A との結合を検討した。その結果、SMYD3 の N 末端 34 アミノ酸領域が NS5A との結合に重要であることが明らかになった。

(3) NS5A と SMYD3 の細胞内局在の解析：まず、HCV RNA レプリコン複製細胞において、HCV 複製により発現する NS5A と内在性 SMYD3 が細胞質に共局在することを、PLA 法により確認した。

次いで、発現プラスミドを用いて NS5A と SMYD3 を Huh7.5 細胞に一過性に発現させ、両タンパク質の細胞内局在について解析した。その結果、それぞれ単独発現により、NS5A は細胞質に限局して、また、

SMYD3 は細胞質と核の両方に存在することが示された。そこで、NS5A と SMYD3 を共発現させると、NS5A は単独発現時と同じく細胞質に限局してみられたが、SMYD3 は核内には全く見られなくなり、NS5A と共に細胞質に局在することが明らかになった。

(4) NS5A 構成的発現により発現が亢進する宿主遺伝子の同定：NS5A を構成的に発現する Huh7.5 細胞及び対照細胞を作製し、NS5A により発現調節されると考えられる宿主遺伝子をマイクロアレイ法で検討した。その結果、NS5A により発現促進される遺伝子の候補として、Breast cancer membrane protein 11 (BCMP11) が同定された。

そこで、BCMP11 遺伝子プロモーターを上流に持つルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて解析した。その結果、BCMP11 遺伝子プロモーターは NS5A により活性化され、ここに SMYD3 が共発現するとさらに増強されることが明らかになった。

また、BCMP11 mRNA の発現量は、HCV 急性感染や HCV 持続的複製によって、また、NS5A の単独発現によって、有意に増加することが明らかになった。

D. 考察

SMYD3 は乳癌や大腸癌、肝細胞癌で発現亢進することが知られている。本研究において、タンDEMタグ付加 NS5A 発現細胞の抽出液を用いてアフィニティークロマトグラフィー/質量分析法により新規 NS5A 結合宿主因子候補として同定された SMYD3 が、HCV 感染細胞や HCV レプリコン細胞内で実際に NS5A と結合していることを実証した。

そして、NS5A と SMYD3 の結合に関わる領域を、欠失変異体を用いたマッピング解析により同定した。その結果、NS5A のドメイン2がSMYD3と結合することが明らかになった。一方、SMYD3のNS5A結合領域は、N末端34アミノ酸残基であると考えられた。この領域は宿主因子Hsp90との結合に関与すること、及び、この領域を欠失したSMYD3変異体のメチルトランスフェラーゼ活性が亢進することが報告されている。NS5AがN末端34アミノ酸領域に結合することによって、SMYD3のメチルトランスフェラーゼ活性にどのような影響を及ぼすかはHCVの病原性を考える上で重要であり、現在それらの機能解析を進めている。

また、本研究において、乳癌で発現亢進が見られるBCMP11遺伝子の転写をNS5Aが促進すること、及びその促進効果はSMYD3との共発現によりさらに増強することが明らかになった。HCVによる発癌や病原性発現に際して、NS5AとSMYD3の相互作用を介したBCMP11遺伝子の転写亢進がどのように関わっているかについても、今後更に詳細に解析を進める必要があると考えられる。

E. 結論

HCV感染細胞において、NS5AとヒストンメチルトランスフェラーゼSMYD3が結合することが明らかになった。また、NS5AとSMYD3の相互作用により、発癌への関与が示唆されているBCMP11遺伝子の転写が亢進することが明らかになった。NS5AとSMYD3の相互作用がHCV発癌にどのように関与しているかは今後の重要な検討課題で

あると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ratnoglik S L, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*, (in press)
- 2) Adianti M, Aoki C, Komoto M, Deng L, Shoji I, Wahyuni T S, Lusida MI, Soetjipo, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. *Microbiol Immunol*, (in press)
- 3) Wahyuni TS, Tumewu L, Permanasari AA, Apriani E, Adianti M, Rahman A, Widyawaruyanti A, Lusida MI, Fuad A, Soetjipo, Nasronudin, Fuchino H, Kawahara N, Shoji I, Deng L, Aoki C, Hotta H. Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus. *Virol J*, 10(1): 259, 2013.
- 4) El-Shamy A, Shindo M, Shoji I, Deng L, Okuno T, Hotta H. Polymorphisms of the core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 58: 555-563, 2013.
- 5) Shimizu YK, Hijikata M, Oshima M, Shimizu K, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H, Hotta H. Isolation of human monoclonal antibodies to the envelope E2 protein of

- hepatitis C virus and their characterization. *PLoS ONE*, 8(2): e55874, 2013.
- 6) Widasari DI, Yano Y, Utsumi T, Heriyanto DS, Anggorowati N, Rinonce HT, Utoro T, Lusida MI, Soetjipto, Asmara W, Hotta H, Hayashi Y. Hepatitis E virus infection in two different regions of Indonesia with identification of swine HEV genotype 3. *Microbiol Immunol*, 57: 692-703, 2013.
- 7) Rinonce HT, Yano Y, Utsumi T, Heriyanto DS, Anggorowati N, Widasari DI, Lusida MI, Soetjipto, Prasanto H, Hotta H, Hayashi Y. Hepatitis B and C virus infection among hemodialysis patients in yogyakarta, Indonesia: Prevalence and molecular evidence for nosocomial transmission. *J Med Virol*. 5(8): 1348-1361, 2013.
- 8) Utsumi T, Yano Y, Lusida MI, Nasronudin, Amin M, Juniastuti, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Detection of highly prevalent hepatitis B virus co-infection with HIV in Indonesia. *Hepato Res*, 43: 1032-1039, 2013.
- 9) Sugimoto K, Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Ando K, Kim KI, Tanaka Y, Yano Y, Kim SK, Hasegawa Y, Fujinami A, Ohta M, Takashi H, Hotta H, Hayashi Y, Kudo M. Factors of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy and mechanism of viral clearance. *Dig Dis*, 31(5-6): 421-425, 2013.
- 10) Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Kim KI, Sugimoto K, Kim SK, Tanaka Y, Hatae T, Hasegawa Y, Fujinami A, Ohta M, Hotta H, Kudo M. Prediction of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C genotypes 2a and 2b and high viral load. *Dig Dis*, 31(5-6): 426-433, 2013.
- 11) Sugimoto K, Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Fujioka H, Kim KI, Tanaka Y, Yano Y, Kim SK, Hasegawa Y, Fujinami A, Ohta M, Hatae T, Hotta H, Hayashi Y, Kudo M. Outcome of double-filtration plasmapheresis plus interferon treatment in nonresponders to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy. *Dig Dis*, 31(5-6): 434-439, 2013.
- ## 2. 学会発表
- 1) Hotta H. HCV infection, glucose metabolism disorder and liver cancer. 2013 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction and 2013 Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation. Tainan, Taiwan. November 16-17, 2013.
- 2) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. HCV NS5A interacts with SMYD3 and upregulates SMYD3-mediated expression of AGR3 mRNA. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 3) Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV upregulates Bim through ROS/JNK signaling pathway leading to Bax-mediated apoptosis. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 4) Ratnoglik SL, Jiang DP, Aoki C, Sudarmono P, Deng L, Shoji I, Hotta H.

- Development of a prophylactic and therapeutic vaccine against Hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 5) Matsui C, Shoji I, Minami N, Sianipar I R, Deng L, Hotta H. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α by hepatitis C virus NS5A protein. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 6) Aoki C, Hartati S, Hanafi M, Kardono LBS, Mirawati ST, Dewi BE, Sudarmono P, Shimizu Y, Hotta H. Various statins at high concentrations enhance HCV virion release from the infected cells. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 7) Hotta H, Aoki C, Ratnoglik SL, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N. Antiviral activity of chlorophyll derivatives, pheophorbide a, chlorin e6 and mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6), against hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 8) 森順子, 姜大鵬, 定岡知彦, 山西弘一, 堀田博, 森康子. HCV非構造タンパク質NS3遺伝子を発現する組換え水痘ワクチンの作製. 第28回ヘルペスウイルス会, 淡路, 2013年5月.
- 9) 西瀬 雄子, 斎藤 貴史, 勝見 智大, 富田 恭子, 佐藤 智佳子, 石井 里佳, 奥本 和夫, 渡辺 久剛, 今井 康陽, 堀田 博, 上野 義之. C型肝炎ウイルス1bのNS3領域蛋白質2次構造を基にしたサブグループ分類と肝細胞癌発生の関連性に関する前向き研究 (第3報). 第49回日本肝臓学会総会, 東京, 2013年6月.
- 10) 矢野 嘉彦, 金 守良, 瀬尾 靖, 斎藤 雅也, 平野 仁崇, 谷 聡, 菅野 雅彦, 林 祥剛, 堀田 博, 東 健. 慢性C型肝炎に対する3剤併用療法の治療効果と治療予測因子の検討・NS3領域変異を含めて. 第49回日本肝臓学会総会, 東京, 2013年6月.
- 11) 金 守良, El-Shamy A, 堀田 博. 2型高ウイルス量C型慢性肝炎に対するPEG-IFN/RBV併用療法(併用療法)の治療効果, 及びそれに関連するウイルス因子、宿主因子の検討. 第49回日本肝臓学会総会, 東京, 2013年6月.
- 12) 勝二郁夫, DENG Lin, 松井千絵子, 堀田博. HCV感染による糖代謝障害の分子機序. 第61回日本ウイルス学会学術集会. シンポジウム, 神戸, 2013年11月.
- 13) DENG Lin, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染によるBax活性化の分子機序の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013年11月.
- 14) 青木千恵, 清水洋子, Pratiwi Sudarmono, Muhammad Hanafi, Leonardus Kardono, 堀田博. *Aspergillus terreus* 抽出液及びそれに含まれるロバスタチンは高濃度でC型肝炎ウイルス感染性粒子産生を促進する. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013年11月.
- 15) Suratno Lulut Ratnoglik, 青木千恵, 河本真理, Pratiwi Sudarmono, Lin Deng, 勝二

郁夫, 渕野裕之, 川原信夫, 堀田博. Chlorophyll 分解産物 Pheophorbide a、Chlorin e6 及び半合成誘導体 Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) はC型肝炎ウイルス増殖を阻害する. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月.

16) 松井千絵子, 勝二郁夫, 南奈苗, Sianipar Imelda Rosalyn, DENG Lin, 堀田博. HCV NS5A と Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 α の相互作用と病態生理. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013年11月.

17) 松岡陽子, 朝日朱美, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による Smad1/Smad5経路の脱制御とその分子機序について. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013年11月.

18) 森順子, 姜大鵬, 定岡知彦, 山西弘一, 堀田博, 森康子. HCV非構造タンパク質 NS3遺伝子を発現する組換え水痘ワクチンウイルスの作製. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013年11月.

19) 竹内健司, 孫 雪東, 千原一泰, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博, 定清直. HCV非構造タンパク質NS3遺伝子を発現する組換え水痘ワクチンウイルスの作製. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013年11月.

出願人: 国立大学法人神戸大学

出願日: 2013/02/19

出願番号: 特願2013-30477

2) 発明の名称: 抗C型肝炎ウイルス剤

発明者: 堀田博

出願人: 国立大学法人神戸大学

出願日: 2013/09/27

出願番号: 特願2013-200930

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

特許出願

1) 発明の名称: 免疫原性ポリペプチド表層
発現ビフィズス菌

発明者: 白川利朗、堀田博、片山高嶺

HCVの長期持続感染により生じた宿主遺伝子異常と代謝異常の細胞癌化に及ぼす影響

分担研究者：杉山 和夫 慶應義塾大学医学部 特任准教授

研究要旨：HCVを標的とした新たな薬剤が次々と開発され、慢性C型肝炎の治療成績は飛躍的に向上しつつあるが、HCV治癒後も肝癌の危険が残っている。HCVの長期持続感染後の肝細胞に起こる代謝異常、遺伝子異常を *in vitro* で明らかにするために、メタボロームおよびマイクロアレイによる統合的包括的解析を行った。まず、1年以上感染持続可能なHCV持続感染培養細胞(HPI細胞)を樹立した。HPI細胞では脂肪滴の著明な蓄積、コレステロールおよびデスモステロールの増加、脂肪酸の増加、ペントースリン酸経路促進によるNADPHの増加、TCA回路の促進を伴うアミノ酸増加など全体的な代謝亢進状態が認められた。また、HPI細胞では、糖・脂質代謝に重要なG6PD、MTHFD2、SCD、PCK2、ASNS、GPT2など、転写因子nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)の標的遺伝子群を恒常的に活性化させることで代謝亢進状態を維持するとともに、酸化ストレスを抑えることでHCVが持続感染しやすい状態にしていると考えられた。

A. 研究目的

従来のインターフェロン、リバビリン療法に加え、プロテアーゼ阻害剤、非構造領域蛋白質(NS5A)阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤などHCVを標的とした新たな薬剤が次々と開発され、慢性C型肝炎の治療成績は飛躍的に向上しつつある。一方、HCVの完全治癒後も代謝異常や肝細胞癌が起きることはまれではなく、治癒症例に対しても注意深く観察する必要がある。

本研究では、HCV治癒後に起こりうる肝発癌危険因子を予測するために、1年以上感染持続可能な *in vitro* HCV 持続感染培養細胞系を樹立し、この細胞に起きた代謝異常、遺伝子異常を明らかにすることを目的とした。また、近年、転写因子 nuclear

factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)が抗酸化、細胞増殖に関連する従来の標的遺伝子に加え、糖・脂質代謝にも関連することが報告されている。そこで今回、HCV 持続感染培養細胞において Nrf2 の関与を調べた。

B. 研究方法

1. RNAトランスフェクションとHCV持続感染培養肝細胞の樹立

遺伝子型1b型の構造領域(core-NS2)および2a型の非構造領域(NS3-NS5B)からなるキメラHCVのRNAを作成し、培養肝細胞Huh7.5細胞へトランスフェクションした。HCV持続感染培養肝細胞の樹立は段階希釈法により行った。

2. HCV持続感染培養肝細胞における脂肪滴、脂質解析

細胞内の脂肪滴の確認はOil-Red染色、BODIPY染色で行った。細胞内脂質成分の解析はBlightとDyerの方法で行った。

3. メタボロミクスとマイクロアレイ解析による統合的包括的解析

細胞内の脂質代謝を包括的に解析するためにLC-TOFMS解析(Human metabolome tech.)を行った。また、水溶性代謝産物の代謝を包括的に解析するためにCE-TOFMS解析(Human metabolome tech.)を行った。同時に、これらの代謝経路を触媒する酵素のmRNA発現をマイクロアレイ法(3D-gene、Toray)によって、統合的包括的解析した。代謝経路のマッピングはKEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)によって行った。さらに、発現差が認められた酵素に関してはwestern blotにより蛋白レベルでの確認を行った。

4. Nrf2のノックダウン実験

Nrf2遺伝子による代謝およびHCV感染の影響を調べるために、Nrf2遺伝子に対するsiRNAを培養肝細胞へトランスフェクションしNrf2のノックダウン実験を行った。
(倫理面への配慮)

ウイルス感染実験、DNA 組み換え実験に関しては以下のように各種法令にのっとり、適切な施設、および、適切な実験方法(P2レベル)、その安全性に細心の注意を払い行った。組み換えDNA実験については組み換えDNA実験指針に基づき実施した。遺伝子組み換え生物等の第二種使用等については、遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律、同施

行規則(平成15年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号)、研究開発などに関わる遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置などを定める省令(平成16年文部科学省・環境省令第一号)その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組み換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じて行った。組み換えウイルスの作成と使用に関しては大臣確認をとっている。また、本研究の組換え実験は慶應義塾大学医学部による機関内承認を得ている。なお、本研究はヒトサンプルもしくはヒトを対象とする臨床研究ではないので、人権保護、インフォームドコンセントなど倫理的配慮の問題はないと判断した。

C. 研究結果

1. HCV持続感染培養肝細胞の樹立

遺伝子型1b型の構造領域(core-NS2)および2a型の非構造領域(NS3-NS5B)からなるキメラHCVのRNAを培養肝細胞Huh7.5細胞へトランスフェクションし溶解感染させたあとで、生き残った細胞から段階希釈法により持続感染している細胞クローンを選択し、HPI細胞と名付けた(図1)。

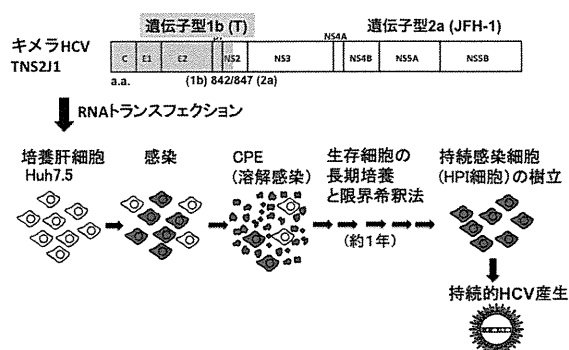


図1. キメラHCV持続感染培養肝細胞(HPI細胞)の樹立方法

この細胞からは全長のHCV RNAおよび蛋白質が検出され、また、1年以上HCVを保持しており(図2)、HCV持続感染培養肝細胞が樹立できたと考えられた。

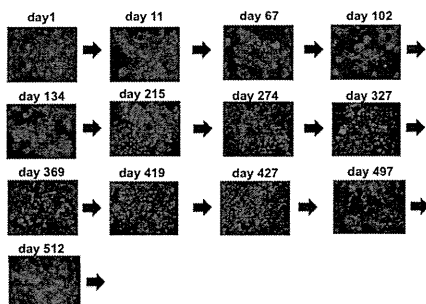


図2. HPI細胞樹立後の長期間のHCV感染維持

2. HCV持続感染培養肝細胞における著しい脂肪滴の蓄積

HPI細胞には著しい脂肪滴の蓄積が認められた(図3)。また、HCV急性感染の報告と同様、HCV coreとNS5A蛋白質との共局在が認められた。脂質解析の結果、脂肪滴の成分であるコレステロール、コレステロールエステルおよびトリグリセロールが有意に増加していることが確認された(図4)。

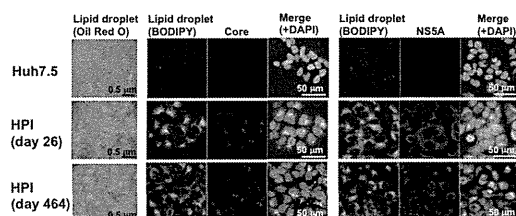


図3. キメラHCV持続感染培養肝細胞では脂肪滴の著明な蓄積が認められた。

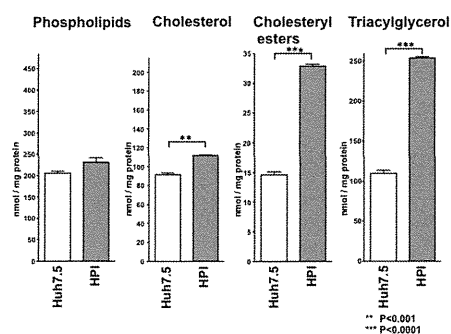


図4. HPI細胞では脂肪滴の主成分が増加

3. メタボローム解析による糖・脂質代謝異常の解析

このようなHPI細胞における脂肪滴蓄積の背景にある糖・脂質代謝異常を明らかにするためにメタボロミクス、マイクロアレイ解析による統合的包括的解析を行った。

その結果、コレステロール合成の律速酵素であるHMGCRの発現亢進を伴ったコレステロールおよびデスモステロール(コレステロールの前駆体)の増加が認められた(論文校正中)。また、ACACA、ELOVL5、PNPLA3の発現亢進を伴った中鎖脂肪酸および長鎖脂肪酸の増加も認められた。これらの代謝産物は脂肪滴の成分として利用されているものと考えられた。

一方、HPI細胞ではペントースリン酸系の律速酵素であるG6PDの発現亢進、および、その代謝産物6PG、S7Pの増加も認められた(論文校正中)。ペントースリン酸系は解糖系の代替経路でありNADPHを産生する経路として重要である。NADPHはコレステロールとトリグリセロールの還元的生合成、および、酸化ストレスに対する中和物質として重要である。実際、Huh7.5細胞に比べてNADPHの増加が確認された。さらに、その下流に位置しプリン合成系で重要な働きをするMTHFD2の発現亢進およびプリン増加も認められた。また、HPI細胞ではエネルギー合成の中心的代謝経路であるTCA回路の代謝産物(Citrate、2OG、Fumarate、Malateなど)も増加し、実際ATPも増加していた。また、グルタミン以外のほとんどのアミノ酸が増加していた。

以上より、HPI細胞は高エネルギー状態を維持しながら、脂質、糖、アミノ酸合成

を促進させ、脂肪滴という形で過剰エネルギーを蓄積していると考えられた。

4. Nrf2標的遺伝子の発現亢進

HPI細胞における上記の統合的包括的解析において、転写因子Nrf2の標的遺伝子における転写活性化が認められた。すなわち、標的遺伝子G6PD、MTHFD2、ME1、SCD、ASNS、PCK2が転写レベルで2倍以上に発現亢進しており、蛋白質レベルでもそれらの発現亢進を確認することができた(図5)。なお、Nrf2標的遺伝子として解毒、抗酸化に参与することがわかっているNQO1およびGCLCの発現の亢進も認められた。

HPI細胞ではNrf2およびその活性型であるリン酸化Nrf2の発現亢進は認められなかったが、核内のリン酸化Nrf2の発現量の亢進が認められ(図6)、何らかの原因で活性化したNrf2がその標的遺伝子を転写活性化していると考えられた。

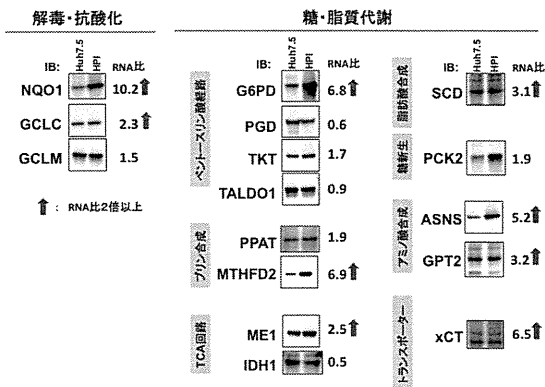


図5. HPI細胞ではNrf2の標的遺伝子群の発現が亢進していた。

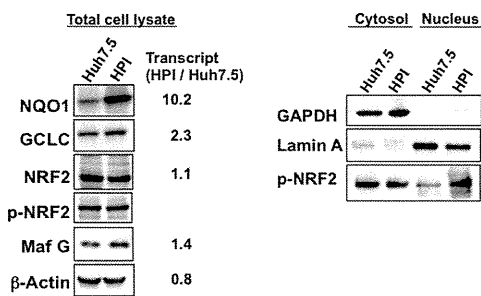


図6. HPI細胞における核内のリン酸化Nrf2蛋白質の増加

次に、インターフェロンによりHPI細胞からHCVを排除した治癒細胞(CuHPI細胞)を作成しNrf2およびその標的遺伝子の発現をみたところ、治癒細胞においても標的遺伝子が恒常的に発現亢進していることがわかり(図7)、Nrf2の活性化およびその標的遺伝子の発現亢進はHCVの感染によるものではなく、HPI細胞自体に起きた恒常的变化によるものと考えられた。

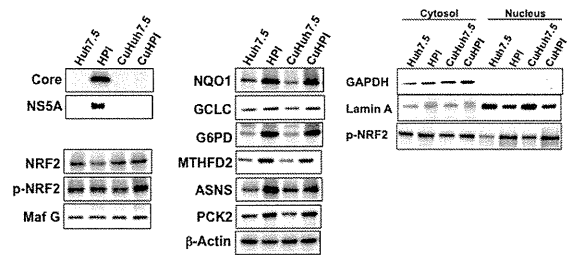


図7. Nrf2の標的遺伝子群はHCVを排除した治癒細胞でも恒常的に発現亢進していた。

5. Nrf2標的遺伝子ノックダウンによるHCV感染の抑制

Nrf2がHCV持続感染を促進しているかどうかを確かめるためにHPI細胞に対してNrf2のノックダウンを行った。その結果、遺伝子によって程度は異なるもののNQO1、GCLC、G6PD、ASNSなどのNrf2遺伝子の発現が低下し、さらに、HCV蛋白質core、NS5Aの発現が著しく抑制された(図8)。また、免疫染色観察でもNrf2をノックダウンさせた細胞では対照に比較して、脂肪滴の著明な減少とHCV感染の低下が確認された(図9)。これらのことはNrf2またはその標的遺伝子が脂肪滴の蓄積とHCVの持続感染に促進的に働いていることを示している。

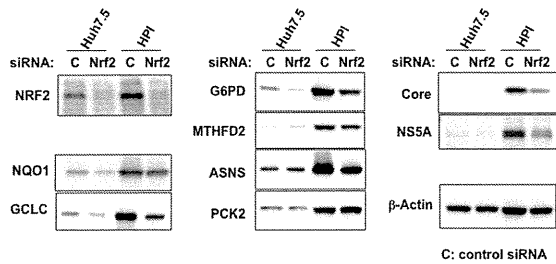


図8. Nrf2のノックダウンによるNrf2標的遺伝子蛋白質とHCV蛋白質(Core, NS5A)の減少(ウエスタンブロット)

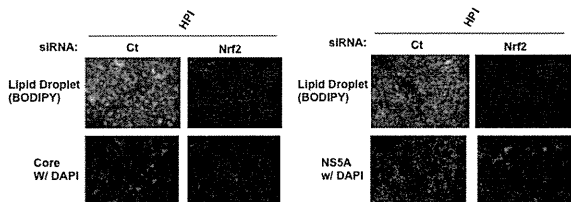


図9. Nrf2のノックダウンによる脂肪滴とHCV蛋白質(Core, NS5A)の減少(蛍光免疫染色)

D. 考察

C型肝炎には肝細胞が脂肪蓄積を起こすという臨床的特徴がある。一方、HCVは、肝細胞への感染やウイルス放出時に細胞の脂質輸送系を利用していることが実験的に示されており、HCV感染によって引き起こされた脂質代謝異常は感染細胞をHCV複製や産生に有利な状態にしていると考えられている。本研究の結果、HCV持続感染培養肝細胞においても、長期培養の結果、細胞内脂肪滴の著明な蓄積と糖脂質代謝異常が認められたことから、*in vitro*のHCV持続感染成立のために糖脂質代謝が重要であることが示された。

転写因子Nrf2は本来、抗酸化・解毒関連遺伝子や癌細胞増殖関連遺伝子を制御することが知られており、多くの癌でその活性化型であるリン酸化Nrf2(p-Nrf2)の発現亢進が報告されている。一方、Nrf2が糖・脂質代謝関連遺伝子も制御することが近年示されている。本研究で樹立したHCV持続感

染培養肝細胞(HPI細胞)では活性型のNrf2蛋白質(リン酸化Nrf2)が核内に集積し、その標的遺伝子が恒常的に転写活性化することで、抗酸化亢進(NQO1遺伝子による)、細胞増殖促進(MTHFD2遺伝子による)、糖・脂質代謝を促進していると考えられた(図10)。

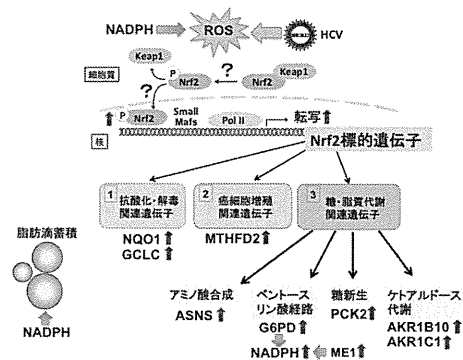


図10. Nrf2による細胞増殖促進、糖脂質代謝亢進およびHCV持続感染の維持

特にペントースリン酸経路の律速酵素であるG6PDの発現亢進により産生増加したNADPHはコレステロール、トリグリセロールなどの脂質の還元的生合成に利用され脂肪滴を蓄積させHCV感染複製を促進していると考えられた。また、NADPHはHCV感染によって生じた酸化ストレス(ROS)を抑制することでもHCV持続感染を成立させていると考えられた。

Nrf2は定常状態ではKelch-like ECH-associated protein 1(KEAP1)と結合することでユビキチン化されほとんど分解されるが、細胞がROSや毒物などのストレスを受けるとリン酸化されp-Nrf2となり、KEAP1と結合しなくなり核に移行する。核に移行したp-Nrf2は共役因子であるSmall Mafと二量体を形成することで、標的遺伝子の転写を活性化することが知られている。はじめの感染に用いたHuh7.5細胞は、元来、肝細胞癌由来の細胞でありNrf2やp-Nrf2の

量は多い。しかし、HCV感染直後の溶解感染細胞およびHPI細胞ではHuh7.5細胞に比較して、細胞内Nrf2の発現量および核内p-Nrf2の発現量がより増加しており、溶解感染との差は明らかではないものの、少なくとも持続感染においてもNrf2が活性化していることが示された。

Nrf2標的遺伝子や核内p-Nrf2の発現量増加は、HCVを排除した治癒細胞でも認められており、HCV持続感染細胞ではゲノムまたはエピゲノムなど何らかの恒常的変化が抗酸化状態および脂質代謝を亢進させHCV持続感染に対して寛容な状態を維持していると考えられた。今後、原因となるゲノム変異などを明らかにするために、エクソーム解析やmRNAシーケンス解析を行う予定である。また、HPI細胞は、限界希釈法により選択した細胞であるため、これらの変化はこの細胞でのみ認められる特異な現象である可能性もあるので、プライマリー肝細胞を用いたHCV持続感染培養細胞を樹立する必要もある。臨床的なHCV持続感染成立にもNrf2が寄与しているかどうかは最も興味のある問題であり、将来的にはC型肝炎肝や肝癌におけるNrf2の発現を調べることは意義があると考えられる。また、Nrf2やその標的遺伝子に対する分子標的治療が、HCV感染を抑制するとともにHCV肝癌に有効である可能性が示唆された。

E. 結論

長期培養可能なHCV持続感染持続培養を樹立した。この細胞は脂肪滴蓄積を伴う糖・脂質代謝異常を示し、恒常的に発現亢進したNrf2標的遺伝子が代謝異常とHCV

持続感染に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) Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Kurihara C, Irie R, Yokoyama H, Shimamura K, Usui S, Ebinuma H, Saito H, Watanabe C, Komoto S, Kawaguchi A, Nagao S, Sugiyama K, Hokari R, Kanai T, Miura S, Hibi T. Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: Mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* 59(1), 154-69, 2014.
- 2) Sato A, Saito Y, Sugiyama K, Sakasegawa N, Muramatsu T, Fukuda S, Yoneya M, Kimura M, Ebinuma H, Hibi T, Ikeda M, Kato N, 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(9), 1987-96, 2013.
- 3) Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. HCV infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross-talk between hepatocytes and stellate cells. *J Virol* 87(14), 8169-8178, 2013.
- 4) Chu PS, Nakamoto N, Ebinuma H, Usui S, Saeki K, Matsumoto A, Mikami Y, Sugiyama K, Tomita K, Kanai T, Saito H, Hibi T. C-C motif chemokine receptor 9 positive macrophages activate hepatic stellate cells and promote liver fibrosis in

mice. Hepatology 58(1), 337-350, 2013.

2. 学会発表

- 1) 齋藤 英胤、齋藤 義正、杉山 和夫:
Epigenetics作用薬を用いたC型肝炎ウイルスの制御 ヒストン脱アセチル化阻害薬の有用性. 第49回日本肝臓学会総会, 東京, 2013.6.
- 2) 杉山和夫、海老沼浩利、酒瀬川典子、齋藤義正、金井隆典、日比紀文、齋藤英胤: Nrf2/sMaf転写因子複合体はHCVによる肝細胞脂肪蓄積に關与する. 第72回日本癌学会総会, 横浜, 2013.10.
- 3) 杉山和夫: メタボローム・トランスクリプトーム統合的解析によるC型肝炎肝脂肪蓄積の機構解明. 第17回日本肝臓学会大会, 東京, 2013.10. (シンポジウム)
- 4) 酒瀬川典子、杉山和夫、海老沼浩利、中本伸宏、村上優子、齋藤英胤、金井隆典: HCV持続感染細胞における転写因子Nrf2に制御される遺伝子群の発現解析. 第61回日本ウイルス学会, 神戸, 2013.11.

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

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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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	岡野栄之、 出澤真理	再生医療叢 書 7 神経系	朝倉書店	日本	2013	163-187
仁科惣治、 日野啓輔	酸化ストレスと NASH	竹原徹郎、 持田 智	HEPATOLO GY PRACTICE NASH・アル コール性肝 障害	文光堂	東京	2013	30-34
仁科惣治、 日野啓輔	鑑別すべき疾患	沖田 極	新しい診断 と治療の ABC 44 肝 硬変	最新医学社	大阪市	2013	83-91

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
M Honda, (金子、本多)	Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes.	Hepatology	-	-	(in press)
T Terashima, (金子、本多)	Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib.	Hepatol Res	-	-	(in press)
M Honda, (金子、本多)	Peretinoin, an acyclic retinoid, improves the hepatic gene signature of chronic hepatitis C following curative therapy of hepatocellular carcinoma.	BMC Cancer	-	-	(in press)
H Takayama, (金子)	Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P gene via an AMPK-FoxO3a Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes.	J Biol Chem	289(1)	335-345	2014
SS Zeng, (金子、本多)	The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma.	J Hepatol	60(1)	127-134	2014
E Kobayashi, (金子)	A new cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days.	Nat Med	19(11)	1542-1546	2013

M Higashimoto, (金子、本多)	Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression.	Eur J Immunol	43(11)	2956-2968	2013
H Takamura, (金子)	Evaluation of eligibility criteria in living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma by α -SMA-positive cancer-associated fibroblasts.	Oncol Rep	30(4)	1561-1574	2013
A Seki, (金子、本多)	Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model.	Hepatology	58(3)	1133-1142	2013
F Arihara, (金子)	Increase in CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis.	Cancer Immunol Immunother	62(8)	1421-1430	2013
K Kimura, (金子)	Histidine augments the suppression of hepatic glucose production by central insulin action.	Diabetes	62(7)	2266-2277	2013
T Shirasaki, (金子、本多)	MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells.	J Virol	87(9)	5270-5286	2013
T Ueda, (金子、本多)	Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling.	Genomics	101(4)	238-248	2013
T Yamashita, (金子、本多)	Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma.	Hepatology	57(4)	1484-1497	2013
E Mizukoshi, (金子)	Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma.	Hepatology	57(4)	1448-1457	2013
Y Hodo, (金子、本多)	Association of interleukin-28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C.	Clin Cancer Res	19(7)	1827-1837	2013
T Otda, (金子)	Proteasome dysfunction mediates obesity-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver.	Diabetes	62(3)	811-824	2013
T Oze, (金子)	A multicenter survey of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan.	Hepatol Res	43(1)	35-43	2013

T Yamashita, (金子)	Treatment strategies for hepatocellular carcinoma in Japan.	Hepato Res	43(1)	44-50	2013
Nishida N, (本多)	New susceptibility and resistance HLA-DPA1/DPB1 alleles to hepatitis B virus-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia', submitted to PLOS Genetics, on which you are listed as an author.	PLoS One	-	-	(in press)
Takeshita Y, (本多)	The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial.	Diabetologia	-	-	(in press)
Spaniel C, (本多)	MicroRNA-122 abundance in hepatocellular carcinoma and non-tumor liver tissue from Japanese patients with persistent HCV versus HBV infection.	PLoS One	-	-	(in press)
Miyahara K, (本多)	Pro-angiogenic cytokines for prediction of outcomes in patients with advanced hepatocellular carcinoma.	Br J Cancer	109(8)	2072-2078	2013
Komura T, (本多)	ER stress induced impaired TLR signaling and macrophage differentiation of human monocytes.	Cell Immunol	282(1)	44-52	2013
Wakao S, (出澤)	Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, that reside in human mesenchymal tissues.	Spinal Surgery	-	-	(in press)
Wakao S, (出澤)	Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues.	Pathology International	-	-	(in press)
Ogura F, (出澤)	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)
Y. Kuroda, (出澤)	Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent Muse cells, in basic research and regenerative medicine.	Anat Rec	297(1)	98-110	2014
Kanemaru SI, (出澤)	Functional regeneration of laryngeal muscle using bone marrow-derived stromal cells.	Laryngoscope	123(11)	2728-2734	2013
Aizawa-Kohama M, (出澤)	Transplantation of bone marrow stromal cells-derived neural precursor cells ameliorates deficits in a rat model of complete spinal	Cell Transplantation	22(9)	1613-1625	2013

	cord transaction.				
Kuroda Y, (出澤)	Isolation, culture and evaluation of Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse) cells.	Nature Protocols	8(7)	1391-1415	2013
Tschiyama K, (出澤)	Functional melanocytes are readily reprogrammable from multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells, distinct stem cells in human fibroblasts.	J Invest Dermatol	133(10)	2425-2435	2013
Hayashi T, (出澤)	Autologous engraftment of A9 dopaminergic neurons induced from mesenchymal stem cells in parkinsonian rhesus macaques.	J Clin Invest	123(1)	272-284	2013
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
Abe T, (坂元)	Quantification of collagen and elastic fibers using whole-slide images of liver biopsy specimens.	Pathology International	63	305-310	2013
Fukuma M, (坂元)	Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 regulates epithelial cell phenotype and survival of hepatocellular carcinoma cells.	Experimental Cell Res	319	113-121	2013
Tomiyaama Y, (日野)	Hepatic oxidative stress in ovariectomized transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein is augmented through suppression of AMPK/PGC-1alpha signaling.	Hepatology Res	-	-	(in press)
Nishida N, (日野)	New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia.	PLOS One	-	-	(in press)
Hino K, (日野)	Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery voice in hepatitis C.	Hepatology Res	-	-	(in press)
Hino K, (日野)	Iron metabolic disorder in chronic hepatitis C: Mechanisms and relevance to hepatocarcinogenesis.	J Gastroenterol Hepatology	28 Suppl 4	93-98	2013
Tomiyaama Y, (日野)	Risk factors for survival and the development of hepatocellular carcinoma in patients with primary biliary cirrhosis.	Intern Med	52	1553-1559	2013

Korenaga K, (日野)	Clinical usefulness of non-protein respiratory quotient measurement in non-alcoholic fatty liver disease.	Hepatol Res	43	1284-1294	2013
Nakamura M, (日野)	First jejunal vein oriented mesenteric excision for pancreatoduodenectomy.	J Gastroenterol	48	989-995	2013
Kawanaka M, (日野)	Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with vitamins E and C: a pilot study.	Hepatic Medicine: Evidence and Research	5	11-16	2013
Dansako H, (加藤)	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
Mori K, (加藤)	Adenosine kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin.	Hepatology	58	1236-1244	2013
Ueda Y, (加藤)	New preclinical antimalarial drugs potently inhibit hepatitis C virus genotype 1b RNA replication.	PLoS ONE	8	e72519	2013
Kuroki M, (加藤)	PML tumor suppressor protein is required for HCV production.	Biochemical and Biophysical Research Communications	430	592-597	2013
Tanaka T, (加藤)	Hepatitis C virus NS4B targets lipid droplets through hydrophobic residues in the amphipathic helices.	Journal of Lipid Research	54	881-892	2013
Sato A, (加藤)	Suppressive effect of the histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), on hepatitis C virus replication via epigenetic changes in host cells.	Journal of Cell Biochemistry	114	1987-1996	2013
Adianti M, (堀田)	Anti-hepatitis C virus compounds obtained from <i>Glycyrrhiza uralensis</i> and other <i>Glycyrrhiza</i> species.	Microbiol Immunol	-	-	(in press)
El-Shamy A, (堀田)	Polymorphisms of the core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma.	Hepatology	58	555-563	2013
Shimizu YK, (堀田)	Isolation of human monoclonal antibodies to the envelope E2 protein of hepatitis C virus and their characterization.	PLoS ONE	8(2)	e55874	2013