

HCV 感染に対する治療用ワクチンに関する研究

研究分担者 保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

研究協力者 塩釜ゆみ子 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 特任研究員

**研究要旨：**C型肝炎ウイルス（HCV）の免疫学的な感染病態の解析および治療用ワクチンの開発に向けて、HCVに対するDNAワクチンとワクシニアウイルスを用いたprime/boost法についての検討を行った。HCVの非構造蛋白領域遺伝子を組み込んだHCV-DNAワクチン（HCV-N25）と同じく非構造蛋白領域遺伝子を組み込んだリコンビナントワクシニアウイルス（rVV-N25）を作製した。これらDNAワクチンとワクシニアウイルスをprime/boost法でC57BL/6マウスに免疫し、脾臓での特異的細胞性免疫能の誘導についてELISPOT法を用いて検討したところ、HCVに対する高いIFN- $\gamma$ 産生細胞の誘導が認められた。またC型肝炎モデルマウスにprime/boost法にて免疫したところ、HCV-DNAまたはrVV-N25単体で免疫したマウスに比べ特異的細胞性免疫の増強が見られた。さらに肝臓中のHCVコア蛋白発現量が有意に減少しており、DNAワクチンとワクシニアウイルスを用いたprime/boost法が治療用ワクチンの投与プロトコールとしてより有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）はヒトに慢性感染症を引き起こす病原体であり、その病態は肝炎から肝硬変、肝癌へと進行する。この進行における生体のウイルスに対する免疫反応の詳細は不明であり、HCVに対する免疫反応の解析や、それによる治療法の確立が強く望まれている。研究者らはベクターに対する反応が無く、目的とした抗原に対してのみ免疫反応が誘導されるDNAワクチンを用い、HCV感染モデルマウスにおける治療効果を報告した。本研究ではこの結果をもとにDNAワクチンとHCV遺伝子組み込みワクシニアウイルスを用い、HCVに対する免疫反応の解析と、治療用ワクチンの開発を行うことを目的とした。

B. 研究方法

(1) マウス

poly(I:C)を投与することで、任意の時期にHCV遺伝子を誘導発現できるトランスジェニック（HCV-Tg）マウス（CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>, RzCN5-15<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>）（図1A）、C56BL/6マウスを用いた。HCV-Tgマウスはpoly(I:C)を投与後、HCV蛋白を3ヶ月間持続的に発現させた後に、実験に使用した。CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>マウスはHCV遺伝子の一部を、RzCN5-15<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>マウスは全長をコードしている。

(2) HCV遺伝子発現ワクチンの作製

すべてのHCV遺伝子領域を含むpBMSF7CプラスミドベクターからPCR法と制限酵素反

応を用いて、HCVの複製に関与している非構造蛋白領域（NS2-5）の遺伝子領域を pCAGGSプラスミドベクターにそれぞれ組み込むことにより作製したHCV-DNAワクチン（HCV-N25）をprimeワクチンとして使用した（図1A）。これらのワクチンのコントロールとしてHCV遺伝子領域を含まないDNAワクチン（empty）をコントロールとして使用した。また、DNAワクチンに組み込んだ配列と同じ配列をワクシニアウイルス LC16m8株に組み込んだ組換えワクシニアウイルス（rVV）であるrVV-N25をboostワクチンとして使用した（図1A）。

### （3）免疫方法

25  $\mu$  lのPBSに懸濁した100  $\mu$  gのDNAワクチンをマウスの下腿部筋肉に投与後、エレクトロポレーション（50 V, 99 msec, 8 times）を2週毎に2回投与した。さらにboostとしてワクシニアウイルスをDNA投与後2週間目にワクシニアウイルス $1 \times 10^8$  pfu/50  $\mu$  lで皮下投与した。最終投与後2週目に脾臓、肝臓を回収し解析を行った。

### （4）ELISPOT法による特異的細胞性免疫誘導能の測定

赤血球溶血処理を行った脾細胞（ $1 \times 10^5$ ）または、脾細胞を磁気ビーズ（Miltenyi Biotec）を用いて分離したCD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>細胞（ $2 \times 10^5$ ）を予めマイトマイシン処理を行った刺激細胞（HCVの各遺伝子部位を過剰発現した腫瘍細胞（EL-4/E2, /NS2, /N3-4A））（ $1 \times 10^4$ ）で刺激し、37  $^{\circ}$ C、5 % CO<sub>2</sub>インキュベーター中で48時間培養、HCV抗原特異的IFN- $\gamma$ 産生細胞をELISPOT法により測定した。

### （5）肝臓の解析

ワクチンを投与した後、肝臓を回収し、肝臓組織抽出液の作製並びにホルマリン固定を行った。肝臓組織抽出液中のHCVコア蛋白発現量は市販のHCV抗原ELISAキット（Ortho Clinical Diagnostics）を用いて定量した。ホルマリン固定した肝臓片はパラフィン包埋後、組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

### （倫理面への配慮）

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

## C. 研究結果

### （1）HCV 遺伝子発現 DNA（HCV-N25）ワクチンとワクシニアウイルス（rVV-N25）の作製

pCAGGSプラスミドベクターにHCVの非構造蛋白遺伝子領域を組み込んだHCV-DNAワクチン（HCV-N25）および組換えワクシニアウイルス（rVV-N25）を作製した

（図1A）。マウスへのワクチン投与スケジュールは図1Bに示した。

### （2）ELISPOT法によるprime/boostワクチンの細胞性免疫誘導能についての検討

HCV-N25ワクチンおよびrVV-N25を投与したC57BL/6マウスより脾臓を採取し、脾細胞中のHCV抗原特異的IFN- $\gamma$ 産生細胞をELISPOT法により測定した。コントロール群由来の脾細胞は刺激後、何ら特異的なスポットを示さなかったが、HCV-N25投与群由来の脾臓細胞では、EL-4/E2, /NS2, /N3-4A細胞による刺激後に、顕著にIFN- $\gamma$ を産生することを確認した（図2）。また、prime/boost群においても同様にEL-4/E2, /NS2, /N3-4A細胞に対し、IFN- $\gamma$ を産

生することを確認した。

(3) HCV部分長遺伝子発現C型肝炎モデルマウスを用いた *in vivo*におけるHCV特異的細胞性免疫誘導能の評価

HCV 蛋白を3ヶ月間持続的に発現させた CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>マウスに prime/boost ワクチンを投与し、脾臓細胞中の HCV 抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞を ELISPOT 法により測定したところ、C56BL/6 マウスを用いた場合と異なり、HCV-N25 群および prime/boost 群由来の脾臓細胞で EL-4/N3-4A 細胞に対する反応のみが見られた (図 3 A)。EL-4/N3-4A 細胞に対する特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞数は HCV-N25 のみを投与した群に比べ、rVV-N25 による prime/boost ワクチンを行った群の方が有意に高かった。さらに、肝臓中の HCV コア蛋白発現量を測定したところ、empty 投与群に比べワクチン投与群全てにおいて、肝臓中コア蛋白発現量が減少しており、prime/boost 群が最もコア蛋白発現量を減少させていることを確認した (図 3 B)。また、肝臓の形態学的検索を行ったところ、HCV 蛋白を3ヶ月間持続的に発現させた CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>マウスの肝臓では、肝細胞の膨化や索状配列の乱れなどの形態学的異常が多数観察されるが、ワクチン投与群においてこれらの異常が改善され、特に prime/boost 群でその改善が顕著であったことを確認した (図 3 C)。

(4) HCV全長遺伝子発現C型肝炎モデルマウスを用いた *in vivo*におけるHCV特異的細胞性免疫誘導能の評価

CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>マウスを用いた場合と同様に、HCV の全長遺伝子をコードして

いる RzCN5-15<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>マウスにワクチンを投与し、脾臓細胞中の特異的 IFN- $\gamma$  産生能を測定した (図 4 A)。CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>マウスに投与した場合と異なり、prime/boost 法によるワクチン投与を行っても特異的細胞性免疫の増強は見られなかった。しかしながら、肝臓中のコア蛋白発現量は HCV-N25 ワクチン投与群に比べて、rVV-N25 投与群と prime/boost 投与群では有意に減少しており (図 4 B)、形態学的検索においても prime/boost 群で改善が見られた (図 4 C)。

#### D. 考察

HCV 感染症は肝炎から、肝硬変、肝癌へと進行する慢性感染症疾患である。現在用いられている治療法においても治療効果を得られない患者は多く、新規の治療法、治療薬の開発は急務となっている。一方、HCV 感染症は慢性感染症であり、病態の進行には長期の時間が必要である。さらに進行せずに寛快する例もあることから、生体の免疫反応での病態制御は可能であると考えられる。組み換えウイルスワクチンによる手法は目的とする抗原に比較しベクターウイルスに対する免疫反応が大きく、頻回投与が困難であることが問題である。一方、DNA ワクチンはベクターに対する免疫反応が誘導されないが、組み換えウイルスワクチンと比較すると十分な免疫反応が得られないことが多く報告されている。prime/boost ワクチンはこの両者の欠点を補い、現在考えられているワクチン投与方法では最も期待されている。本研究においてもどちらか一方の免疫以上に prime/boost

は効果的であることが認められた。以上の事から、この手法をさらに詳細に検討することが今後の治療に新たな展開を与える可能性が示唆された。

#### E. 結論

HCV の非構造蛋白領域を発現する DNA ワクチン (HCV-N25) および組み換えワクシニアウイルス (rVV-N25) を用いた prime/boost ワクチン接種法は C 型肝炎モデルマウスを用いた実験の結果より、HCV-N25 または rVV-N25 ワクチン単独投与に比べても治療用ワクチンの投与プロトコールとして更なる有用性がある可能性が示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Watanabe K., Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. *Vaccine* in press
- 2) Kobiyama K., Aoshi T., Narita H., Kuroda E., Hayashi M., Tetsutani K., Koyama S., Mochizuki S., Sakurai K., Katakai Y., Yasutomi Y., Saijo S., Iwakura Y., Akira S., Coban C. and Ishii KJ. A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nano-particulate TLR9 agonist. *Proc.Natl.Acad Sci. USA* in press

- 3) Wada T, Kohara M, Yasutomi Y.DNA vaccine expressing the non-structural proteins of hepatitis C virus diminishes the expression of HCV proteins in a mouse model. *Vaccine* 2013;31;5968-5974.
- 4) Kitagawa H, Kawano M, Yamanaka K, Kakeda M, Tsuda K, Inada H, Yoneda M, Sakaguchi T, Nigi A, Nishimura K, Komada H, Tsurudome M, Yasutomi Y., Nosaka T, Mizutani H. Intranasally administered antigen 85B gene vaccine in non-replicating human Parainfluenza type 2 virus vector ameliorates mouse atopic dermatitis. *PLoS One.* 2013 8(7): e66614
- 5) Shimozawa N, Ono R, Shimada M, Shibata H, Takahashi I, Inada H, Takada T, Nosaka T, Yasutomi Y.Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species. *Differentiation.* 2013 85:131-139.
- 6) Tajiri K, Shimojo N, Sakai S, Machino-Ohtsuka T, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Tsujimura Y, Kimura T, Sato A, Yasutomi Y., Aonuma K.Pitavastatin regulates helper T-cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013, 27:413-424.
- 7) .Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y., Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H.TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency

- virus type 1. J Gen Virol. 2013 Jun;94(Pt 6):1318-24.
- 8) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. Arch Virol. 2013,158:1209-20.
- 9) Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, Ishii KJ, Horii T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. Hum Vaccin Immunother. 2013(2) 283-290.
- 10) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. Microbes Infect. 2013 5:56-65.
- 3) 加藤誠一 保富康宏 松尾和浩. BCGウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチン第3回感染症若手フォーラム 長崎 2014
- 4) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏. 抗酸菌分泌抗原を組み込んだ弱毒エイズウイルスの霊長類カニクイザルにおける細胞性免疫反応の解析第61回日本ウイルス学会 神戸 2013年11月10日-12日
- 5) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏. 産地別SPFカニクイザルを用いたサル免疫不全ウイルスのエイズ病態に関する研究第27回日本エイズ学会 熊本 2013年11月20 - 22日
- 6) 保富康宏 インフルエンザウイルス感染におけるヘルパーT細胞 (Th) の病態への関与 「シンポジウム：もっと効くインフルエンザワクチンを目指して」 第54回日本臨床ウイルス学会 2013年6月8-9日 倉敷
- 7) 保富康宏 教育講演：「ワクチン開発のストラテジー：HIVワクチン・結核ワクチン開発の経験から」 ワクチン開発に必要な研究を取り巻く環境の重要性 第17回日本ワクチン学会 2013年11月30日-12月1日 津

## 2. 学会発表

- 1) Watanabe K, Matsuo K, Yasutomi Y. Intranasal immunization with recombinant vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed mycobacteria-specific immunity. 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年, 千葉
- 2) TSUJIMURA Yusuke, YASUTOMI Yasuhiro. The recognition mechanisms of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, in vivo 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年, 千葉

## 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  
なし

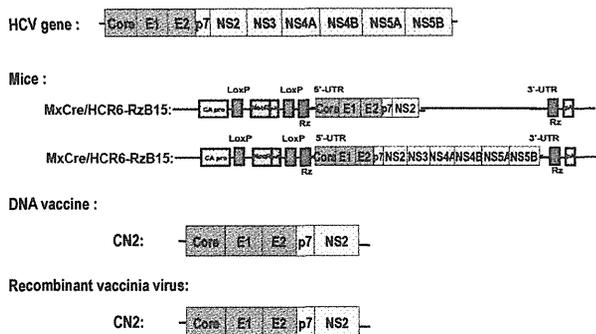


図1A. C型肝炎モデルマウスとHCV遺伝子発現DNAワクチンおよび組み換えワクシニアウイルス

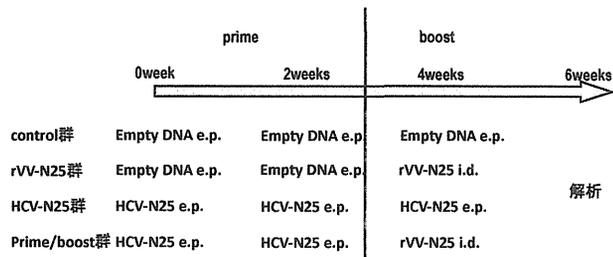


図1B. Prime/boostワクチン投与スケジュール

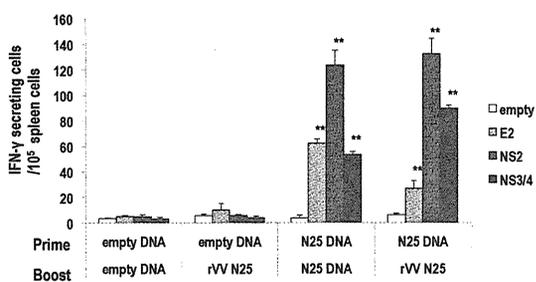


図2. C56BL/6マウスにおけるprime/boostワクチン投与後の特異的細胞性免疫の評価

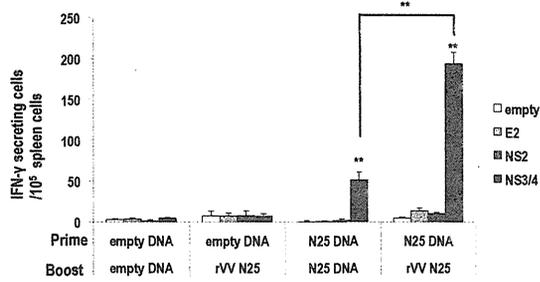


図3A. CN2-29(+/-)/MxCre(+/-)マウスにおけるprime/boostワクチン投与後の特異的細胞性免疫の評価

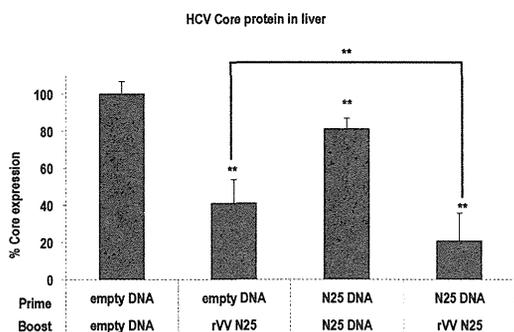


図3B. CN2-29(+/-)/MxCre(+/-)マウスにおけるprime/boostワクチン投与後のHCVコア蛋白発現量の評価

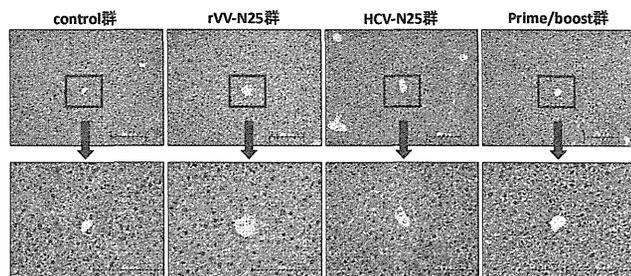


図3C. CN2-29(+/-)/MxCre(+/-)マウス肝臓における形態学的検索

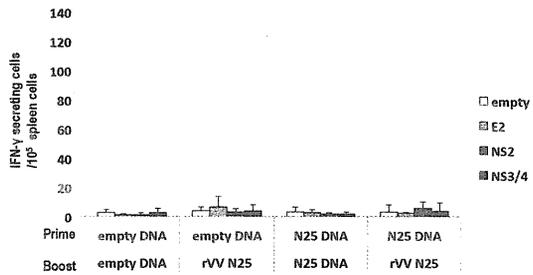


図4A. RzCN5-15<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>マウスにおけるprime/boostワクチン投与後の特異的細胞性免疫の評価

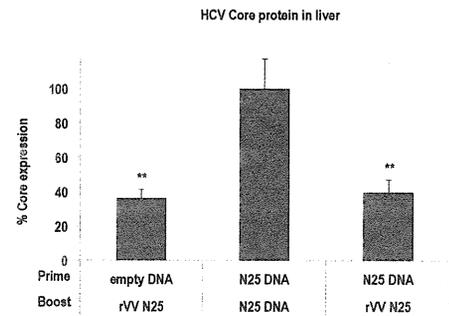


図4B. RzCN5-15<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>マウスにおけるprime/boostワクチン投与後のHCVコア蛋白発現量の評価

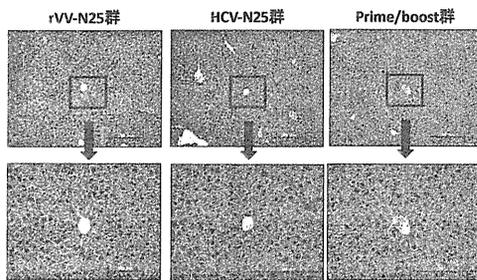


図4C. RzCN5-15<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>マウス肝臓における形態学的検索

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（平成25年度）

ツパイ自然感染モデルでの発症・治療評価

小原 恭子 鹿児島大学 教授

**研究要旨：**ツパイの全ゲノム解析を行い、C型肝炎ウイルス(HCV)レセプター分子は他の分子に比べヒトホモログとの相同性が高く、Missing Link となっている可能性が明らかとなった。また、ツパイの飼育・繁殖法が確立した。成獣のツパイに HCV genotype1b, 2a, 4a のウイルスを接種し、血中のウイルス量と ALT を経時的に 6 ヶ月程度経過を観察している。いずれの遺伝子型 HCV を接種したツパイにおいても HCV の一過性増殖が観察された。また、ALT の一過性上昇も見られたが、特に genotype 2a と 4a を接種したツパイでの高い上昇が見られ、肝炎を起こしていると考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルスの自然感染動物モデルはチンパンジーのみであり、動物での感染実験は難しい。ヒト肝臓キメラマウスは免疫系に不備があり、病原性解析ができない。ツパイがこれらに変わる動物実験モデルとなれば、基礎研究やワクチン・創薬において極めて強力なツールとなる。そこで、本研究では、ヒトに近いゲノム情報を持つツパイを C型肝炎の実験動物として樹立する。これを用いれば C型肝炎の病態解析が進み、治療ワクチンの開発に大きく貢献すると期待される。

B. 研究方法

ツパイ肝臓から DNA を精製し、全ゲノムの配列を次世代シーケンサーで決定した。独自のプログラムを用いた相同性解析から、各遺伝子 ORF の配列を決定した。

生後約 1 年のツパイに HCV genotype1b,

2a, 4a のウイルスを  $5 \times 10^4$ –  $2 \times 10^8$  腹腔内に接種した。

また、免疫力の弱い新生児のツパイにも genotype 4a ( $5 \times 10^4$ ) の HCV を腹腔内に接種した。HCV を接種したツパイは 2 週間おきに 0.5mL ずつ採血し、HCV-RNA 量を定量 PCR で測定すると共に、ALT 値を測定した。

（倫理面への配慮）

ヒト肝臓細胞を用いた宿主遺伝子発現解析については、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(H16. 12. 28)、組換え DNA 実験については、組換え DNA 実験指針(H14. 1. 31)に基づき、実施する。遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、鹿児島大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会の承認を得ている(H24年5月；承認番号24002 ウイルスの病原性に関わる宿主因子の検討)。動物実験については、「研究機関等における動

物実験等の実施に関する基本指針」

(H18.6.1)に従う。

### C. 研究結果

研究代表者と共にツパイ全ゲノムの解析を進め2匹のツパイに関して全ゲノム情報が明らかとなった。その結果、遺伝子により相同性が異なり、分子群により異なる進化をしている可能性が考えられた。HCV 感染レセプターである、CD81, SR-BI, cloudin1, occuludin 1はヒトのホモログと相同性が高く Missing Link となっている可能性が明らかとなった。

ツパイの飼育・繁殖法が確立し、15匹中15匹の♀が出産できた。

成獣のツパイに HCV genotype1b, 2a, 4a のウイルスを接種し6ヶ月程度経過を観察している。いずれの遺伝子型を接種したツパイにおいても HCV の一過性増殖が観察された。また、ALT の一過性上昇も見られたが、特に genotype 2a と 4a を接種したツパイでの高い上昇が見られ、肝炎を起こしていると考えられた。

さらに、新生児のツパイに最も増殖の良かった genotype 4a を接種して経過を観察している。

### D. 考察

ツパイの HCV レセプター分子がヒトホモログに高い相同性を示した事に一致して HCV genotype1b, 2a, 4a のいずれもツパイにおいて増殖能を示した。しかしながら、これらのウイルスの増殖は一過性である事がほとんどであった。さらに、HCV をツパイで継代し、馴化する必要があると考えら

れた。

また、ウイルスの接種法についても皮下接種が良いという報告もあり、接種法の検討を行う。

### E. 結論

ツパイの全ゲノム配列を決定し、その特徴を明らかにした。また、ツパイの飼育・繁殖法を確立した。さらに HCV genotype 1b, 2a, 4a がツパイに感染する事が明らかとなった。今後は新生児への接種も検討し、HCV を効率良く持続感染する動物を樹立する予定である。

### F. 研究発表

1) Kasama, Y., Mizukami, T., Kusunoki, H., Peveling-Oberhag, J., Nishito, Y., Ozawa, M., Kohara, M., Mizuoichi, T., Tsukiyama-Kohara, K. B-cell-intrinsic Hepatitis C virus expression leads to B-cell-lymphomagenesis and induction of NF- $\kappa$ B signalling. *PLOS One*, 2014 accepted.

2) Katsume A, Tokunaga Y, Hirata Y, Munakata T, Saito M, Hayashi H, Okamoto K, Ohmori Y, Kusanagi I, Fujiwara S, Tsukuda T, Aoki Y, Klumpp K, Tsukiyama-Kohara K, El-Gohary A, Sudoh M, Kohara M. A Serine Palmitoyltransferase Inhibitor Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Human Hepatocytes. *Gastroenterology* 2013, 145(4):865-73.

3) Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Kimura K, Saito M, Kohara M. 4E-BP1 regulates the differentiation of white adipose tissue. *Genes Cells*. Jul;18(7):602-607, 2013.

4) Nakagawa S, Hirata Y, Kameyama T, Tokunaga Y, Nishito Y, Hirabayashi K, Yano J, Ochiya T, Tateno C, Tanaka Y, Mizokami M, Tsukiyama-Kohara K, Inoue K, Yoshiba M, Takaoka A, Kohara M. Targeted induction of interferon- $\lambda$  in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. *PLOS One*. 8(3) e59611, 2013.

5) Salem NE, Saito M, Kasama Y, Ozawa M, Kawabata T, Harada S, Suda H, Asonuma K, El-Gohary A, Tsukiyama-Kohara K. Genomic polymorphisms in 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 24-reductase promoter sequences. *Microbiol Immunol*. Mar;57(3) 179-184, 2013.

## 2. 学会発表

- 1) K. Tsukiyama-Kohara, Y. Amako, M. Kohara, Chronic hepatitis C virus model in *Tupaia belangeri* (招待講演), Symposium HCV Animal models and vaccine development, 2013年 5月 (エストニア).
- 2) 小原 恭子, 「C型肝炎ウイルス誘導性酸化ストレスによる肝細胞腫瘍原性亢進」(招待講演), 第24回日本生体防衛学会, 2013年 7月 (熊本).
- 3) 笠間由里、小原道法、小原恭子, C型肝炎ウイルスのBリンパ腫発症要因の解明, 第50回日本ウイルス学会九州支部会, 2013年 9月 (長崎大学 医学部).
- 4) EZZIKOURI S, Nishimura T, Ozawa M, Kohara M and Tsukiyama-Kohara K. Efficacy of French maritime pine bark extract pycnogenolR to hepatitis C virus replication. ウィルス学会九州支部会, 2013年 9月 (長崎大学医学部).
- 5) Tsukiyama-Kohara, K, Hirata, Y., Sanada T, Yamamoto N., Yasui F, Kohara, M,

Development of *tupaia nelangeri* for small animal infection model of hepatitis B virus, according to the genomid research, HBV2013, 2013年 10月 (上海).

- 6) 金澤伯弘、川畑淑子、永野希織、小原道法、小澤真、小原恭子. ツパイとヒトとの遺伝的相同性の検証, 第156回日本獣医学会学術集会, 2013年 9月 (岐阜大学).
- 7) 徳永優子、平田雄一、小原恭子、小原道法, 宿主因子阻害剤NA808と直接的複製阻害剤の併用による抗HCV活性, 第72回日本癌学会学術総会, 2013年 10月 (パシフィコ横浜).
- 8) 笠間由里、小原道法、小原恭子, C型肝炎誘発性リンパ腫発症モデルマウスの網羅的解析, 第72回日本癌学会学術総会, 2013年 10月 (パシフィコ横浜).
- 9) Tsukiyama-Kohara, K, Kasama, Y, Kohara, M, Critical factors in HCV related B-cell lymphoma development characterized by comprehensive analysis of B-lymphoma cells in the HCV transgenic mice, 20th HCV Symposium, 2013年 10月 (オーストラリア).
- 10) Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. Tumorigenicity induced by hepatitis C virus. (招待講演) 第4回新学術領域 発がんスパイラル国際シンポジウム 2月 (札幌)

## 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  
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（平成25年度）

病態解析と細胞性免疫誘導能の高いアジュバントの開発  
押海 裕之、北海道大学大学院医学研究科、講師

研究要旨：III型インターフェロンは、ペグインターフェロンとリバビリンの併用療法の治療成績と高い相関があることが知られている。我々は今回、マウス動物モデルを用い、HCV感染時の新たなIII型インターフェロン産生経路を発見し、またIII型インターフェロンが樹状細胞に及ぼす影響を詳細に解明した。また、我々は、I型やIII型のインターフェロン産生に重要なRiplet分子がHCVのNS3-4Aプロテアーゼによって分解されることを解明した。これは、Riplet分子の分解を阻害することが、アジュバント効果を高める為に重要であることを示している。

A. 研究目的

HCV に対する治療用ワクチンの開発に於いて、自然免疫を活性化させるアジュバントの開発は非常に重要である。しかし、HCV はウイルス自身がヒトの体内で持続感染するために、ヒトの自然免疫応答を抑制することが知られている。この HCV による自然免疫抑制の詳細なメカニズムを解明し、これを解除することで、肝炎患者において、効果的に自然免疫を活性化できるアジュバントの開発を行うことを目的とした。

また、近年、III 型インターフェロンがペグインターフェロンとリバビリンの併用療法の治療成績と高い相関があることが報告されるなど非常に注目されている。今回、この III 型インターフェロンが自然免疫応答に与える影響を詳細に調べ、アジュバント効果に対する影響を検討した。

B. 研究方法

ヒト肝臓由来の細胞と遺伝子型 1 b の

HCV ウイルスのレプリコンと、遺伝子型 2a のヒト培養細胞に感染可能な HCV JFH1 株を用いた。また、マウス動物モデルとして、自然免疫応答に關与する遺伝子のノックアウトマウスを用い、HCV の RNA をマウス肝臓内へ導入するためにハイドロダイナミック法を用いた。

（倫理面への配慮）

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行い、遺伝子組換え実験も北海道大学の遺伝子組換え実験指針に基づいて行った。本年度の研究に於いては、ヒトのサンプルを用いておらず、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

ヒト肝細胞の HuH-7 株由来の細胞と、遺伝子型 1b と 2a の HCV ウイルス、またはレプリコンを用い、HCV の NS3-4A プロテアーゼが、Riplet ユビキチンリガーゼの活

性中心である RING フィンガードメインを切断することを発見した。この Riplet ユビキチンリガーゼは、HCV 感染時の自然免疫応答において I 型インターフェロンや III 型インターフェロン産生に必須であることから、HCV の NS3-4A による Riplet 分子の切断が、宿主の自然免疫応答の抑制に大きな役割を果たしていると考えられる。

HCV 感染時の III 型インターフェロン産生経路としてこれまで、ヒトの BDCA3 陽性の樹状細胞において TLR3 依存的な経路が重要であると報告されていた。我々はマウス動物モデルを用い、ヒトの BDCA3 陽性樹状細胞に相当するマウス CD8 陽性樹状細胞では、TLR3 依存的経路以外にも、RIG-I 依存的な経路が働くこと、また、この経路が生体内に於いて非常に重要であることを解明した。

一方で、III 型インターフェロンの重要生が注目されているものの、I 型インターフェロンとの相違点については未だ十分に解明されていない。我々は今回、III 型インターフェロンは T 細胞や NK 細胞の細胞傷害活性を誘導せずに、肝細胞内のウイルスの排除を促す働きを持つことを解明した。また、III 型インターフェロンによるパラクラインやオートクラインが III 型インターフェロンの十分な産生に非常に重要であることも解明した。

#### D. 考察

C 型肝炎患者では HCV ウイルスが持続感染するために自然免疫応答が抑制されている。そのためワクチンにとって重要なアジュバントは肝炎患者では十分に働くことが

できない。今回、HCV の NS3-4A プロテアーゼが、自然免疫応答活性化に重要な Riplet ユビキチンリガーゼを切断することを解明したことから、現在承認されているテラプレビル等のプロテアーゼ阻害剤は、担にウイルスの排除を促すだけでなく、肝炎患者の自然免疫応答の抑制を解除し、ワクチンに使用するアジュバントの効果を高めることが期待される。

III 型インターフェロンによるオートクラインやパラクラインが、細胞による III 型インターフェロンの十分な産生に非常に重要であることを証明し、TLR3 ではなく RIG-I 経路を活性化することを解明した。このことから、III 型インターフェロンが、TLR3 をターゲットとしたアジュバントではなく、RIG-I をターゲットとしたアジュバントの効果を高める働きをすると期待される。

#### E. 結論

HCV ウイルスによる宿主自然免疫抑制メカニズムとして新たに、HCV の NS3-4A による Riplet ユビキチンリガーゼ切断というメカニズムを解明した。

III 型インターフェロンの新たな産生メカニズムと新たな作用機序を解明した。これらの知見をもとに、ワクチンに使用するアジュバント開発の為に重要な知見を得ることが出来た。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Suzuki T, Oshiumi H, Miyashita M, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Cell-type

- specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA. PLoS One 8(12): e83639 2013
- 2) Shime H, Kojima A, Maruyama A, Saito Y, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor models. J. Innate. Immu. Oct29 Epub ahead of pring 2013
  - 3) Takaki H, Honda K, Atarashi K, Kobayashi F, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Shingai M, Seya T. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon  $\beta$ -induction restricts the response to measles infection in CD150 Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. Mol. Immunol. 57(2): 100-110 2014.
  - 4) Takaki H, Takeda M, Tahara M, Shingai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I IFN production against measles virus in a mouse infection model. J.Immunol. 191 (9): 4740-4747 2013
  - 5) Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, Seya T. A distinct role of Riplet-mediated K63-linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. PLoS Pathog. 9(8) e1003533 2013
  - 6) Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, Seya T. Toll-IL-1-receptor containing adaptor molecule-1: a signaling adaptor linking innate immunity to adaptive immunity Prog Mol Biol Transl Sci 117:487-510 2013
2. 学会発表
- 1) Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Hepatitis C virus degrades Riplet ubiquitin ligase to escape host innate immune response. International Congress of Immunology Milan (Italy) 2013
  - 2) Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Hepatitis C virus NS3-4A protease cleaves Riplet ubiquitin ligase to abrogate RIG-I-mediated type I interferon production. 日本免疫学会 千葉 2013
  - 3) Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 is essential for type III interferon production by hepatocyte and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. 日本免疫学会 千葉 2013
- G. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得  
該当無し
  2. 実用新案登録  
該当無し
  3. その他  
該当無し

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（平成25年度）

中和活性を持つ抗 HCV E1 モノクローナル抗体のエピトープ解析と中和エピトープ  
を有するウイルス粒子産生系の確立に関する研究

鈴木 亮介 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

**研究要旨：**これまでC型肝炎ウイルス(HCV)に対する中和抗体の評価には、レトロウイルス表面にHCVのエンベロープ蛋白質を被せた偽ウイルス(HCVpp)が汎用されてきた。しかしながらHCVppは培養細胞由来のHCV(HCVcc)とは粒子構造や感染機構が異なる事が明らかとなりつつある事から、我々はより適切にHCV中和抗体の評価をする事が可能な1回感染性トランスパッケージング型HCV粒子(HCVtcp)産生系を確立し、これを用いて中和活性を有する抗体を探索した。その結果、遺伝子型の異なるHCVtcpに対して中和活性を示す抗E1モノクローナル抗体を見いだした。この抗体のエピトープ領域を解析し、さらに同定されたエピトープ配列に対する抗体を誘導する為の抗原を効率良く調製する為に、このエピトープ配列を表面に有するウイルス粒子産生系を確立した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は、持続感染化し肝臓癌に至る重大な感染症であり、現在のウイルス保因者数は世界で1.7億人、国内で150万人以上と言われている。その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝癌へと移行し、肝癌による死亡者数は国内で年間3万人を超えている。有効な新規治療薬が開発され治療成績も改善されつつあるが、治療費は高額であり、また難治療の症例も依然として存在する。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少したが、医療従事者や薬物常用者等のハイリスク者に向けた予防的ワクチンの開発が望まれている。ウイルスに対する効果的なワクチンは細胞性免疫と液性免疫の両者を誘導する事が重要と考えられ、そのうちの液性免疫で

は、感染を阻害しうる中和抗体を効率良く誘導する事が必要である。その為、血清あるいは抗体の正確な中和アッセイ系および中和エピトープ解析はワクチン開発において必要不可欠である。これまでHCVに対する中和抗体の評価には、レトロウイルス表面にHCVのエンベロープ蛋白質を被せた偽ウイルス(HCVpp)が汎用されてきた。しかしながらHCVppはレトロウイルス由来の蛋白質を含み、また肝細胞以外の細胞を用いて作製される事から、培養細胞由来のHCV(HCVcc)とは粒子構造や感染機構が大きく異なる事が明らかになりつつある。そこで我々はより適切なHCV中和抗体の評価が可能な1回感染性トランスパッケージング型HCV粒子(HCVtcp)産生系を、遺伝子型の異なる複数の株を用いて確立した。これらを

用いた評価系により、様々な抗体、血清の中和活性の評価を行ない、中和活性の認められたモノクローナル抗体のエピトープを解析した。さらにそのエピトープを有するウイルス粒子の効率の良い産生系の確立を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 抗体および血清の中和活性の評価

HCV の E1 および E2 に反応するマウスモノクローナル抗体およびウサギ抗血清を段階希釈し、遺伝子型の異なる複数の株由来の HCV エンベロープ蛋白質を持つ感染性 HCVtcp とそれぞれ混合し、室温で 1 時間反応させた後に Huh7.5.1 細胞に添加した。2 日後の培養上清の Luc の活性を測定し、コントロール群と比較する事により、感染中和活性を評価した。

### 2. 中和抗体のエピトープの同定

中和活性を示した抗体のエピトープを同定する為に、HCV エンベロープ蛋白質由来のアミノ酸配列をオーバーラップさせて合成した 20aa のペプチド鎖をプレートに固相化させ、抗体を反応させる事により抗体のエピトープを決定した。

### 3. 中和エピトープを有するウイルス粒子の産生

同定されたエピトープ配列を日本脳炎ウイルス (JEV) の E 蛋白質に挿入し、prM-E 領域を発現させる事により、HCV エピトープ配列を持った JEV subviral particle を産生させた。

(倫理面への配慮)

本研究で使用するヒト由来の細胞は過去

に樹立された株であり、倫理面での問題は無いと考えられる。その他のヒト材料は使用していない。また、動物実験は行っていない。

## C. 研究結果

### 1. 中和活性を有する抗体の同定

HCV の E1 および E2 に反応するマウスモノクローナル抗体およびウサギ抗血清について感染中和活性を評価した結果、遺伝子型の異なる複数の株の HCVtcp に対して中和活性を示す E1 モノクローナル抗体を見いだした。

### 2. 中和抗体のエピトープの同定

中和活性を示した抗体をオーバーラップペプチドに反応させ、抗体と強く反応する 12 アミノ酸の領域を明らかにした。

### 3. 中和エピトープを有するウイルス粒子の産生

同定されたエピトープ配列に対する抗体を誘導する為の抗原を効率良く調製する為に、JEV の subviral particle 産生系を利用した。JEV の E 蛋白質中にエピトープ配列を挿入したプラスミドを作製し、293T 細胞に導入して発現させたところ、エピトープ配列が挿入された subviral particle が培養上清に分泌される事を確認した。

## D. 考察

HCV 中和エピトープ解析については E2 蛋白質について多く報告されているものの、E1 蛋白質の中和エピトープについては報告が少なく、我々が同定したエピトープ領域については未報告である。このエピトープに反応する抗体を効率良く誘導する抗原

を調製する為に、中和エピトープ配列を持ったフラビウイルス粒子を 293T 細胞で発現させ、粒子の培養上清への分泌が確認された。今後、この抗原を精製してマウスに免疫し、中和活性を持つ抗体が誘導できるかどうかを評価する。

## E. 結論

適切な HCV の中和抗体の評価が可能な 1 回感染性トランスパッケージング型 HCV 粒子 (HCVtcp) 産生系を用い、幅広い遺伝子型の HCV に対して中和活性を有する抗 E1 モノクローナル抗体を見いだした。この抗体のエピトープ領域を同定し、さらにこのエピトープ配列を有する JEV subviral particle の産生に成功した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T. Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. *J Gen Virol.* 95:60-65 (2014)
- 2) 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.* 440:515-20 (2013)
- 3) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T,

Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. *J Biol Chem.* 288:31715-31727 (2013)

- 4) 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.* 9(8): e1003589 (2013)
- 5) Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, 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*, 8(7):e68992, (2013)

### 2. 学会発表

- 1) 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。日本分子生物学会第 36 回年会，神戸，2013 年 12 月 3-6 日。
- 2) 青柳東代、相崎英樹、松本喜弘、松田麻未、Su Su Hmwe、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和氣健二郎、宮村達男、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作用一. 日本分子生物学会第36回年会, 神戸, 2013年12月3-6日.
- 3) 鈴木亮介、小西英二、石川知弘、嵯峨涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字. 日本脳炎ウイルスレプリコンを用いたトランスパッケージング型1回感染性フラビウイルス粒子産生系の開発. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
  - 4) 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. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
  - 5) 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. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
  - 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. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
  - 7) 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. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
  - 8) 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作用一. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
  - 9) 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. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
  - 10) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、脇田隆字. B型肝炎ウイルス侵入阻害剤の同定及びNTCPを介する感染阻害機構. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
  - 11) 史国利、安東友美、鈴木亮介、伊藤昌彦、脇田隆字、鈴木哲朗. The RNA structures located at 3' end of HCV genome act as cis-elements in selective packaging of its genome into the infectious particles. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
  - 12) 岩本将士、渡士幸一、九十田千子、アリフセイン、鈴木亮介、相崎英樹、小祝修、楠原洋之、脇田隆字. ヒト

- NTCP安定発現細胞株におけるB型肝炎ウイルス侵入機構の解析. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
- 13) 伊藤昌彦、伊藤徳臣、福原崇介、鈴木亮介、田川陽一、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗. 肝細胞癌株のリプログラミングによるHCV感受性および腫瘍原性の低下. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
- 14) 渡士幸一、Guoxin Liang、岩本将士、丸澤宏之、喜多村晃一、村松正道、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字. シチジンデアミナーゼAID誘導を介した抗B型肝炎ウイルス細胞内免疫応答機構の解明. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
- 15) 鈴木亮介. C型肝炎ウイルスの粒子形成に重要な新規NS2結合宿主因子の同定. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 教育セミナー 神戸, 2013年11月10-12日.
- 16) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Takemoto K, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Analysis of bioactivity of fungal-derived natural products based on a virus infection system. The 2nd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity. Yokohama, Japan. 2013.10.28-29
- 17) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly H H, Suzuki R, Aizaki H, Koiwai O, Kusuvara H, Wakita T. Mechanistic analysis on hepatitis B virus entry in an NTCP-overexpressing cell line. International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai, China. 2013.10.20-23.
- 18) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Kitamura K, Muramatsu M, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai, China. 2013.10.20-23.
- 19) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Wakita T. A Retinoid Derivative Inhibits Hepatitis B Virus Entry Mediated by NTCP. International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai, China. 2013.10.20-23.
- 20) Suzuki R. Endocytosis pathway for entry of hepatitis C virus. Italy-Japan Liver Workshop, Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links. Trapani, Italy. 2013.10.20-21.
- 21) Ito M, Ito N, Fukuhara T, Suzuki R, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Loss of susceptibility to HCV infection and decreased tumorigenicity mediated by reprogramming of human hepatoma cells. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia. 2013.10.6-10.
- 22) Shi G, Ando T, Suzuki R, Ito M, Wakita T and Suzuki T. Possible mechanism for selective packaging of HCV genome into

the infectious particles. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia. 2013.10.6-10.

23) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Isolation of a natural compound which can reduce infectious HCV production by inhibiting of liver X receptor. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia. 2013.10.6-10.

24) 山中敦史、鈴木亮介、小西英二. キメラ Dengue ウイルス 様粒子 抗原の中和及び感染増強試験における有用性評価. 日本熱帯医学会第54回大会, 長崎, 2013年10月3-5日.

25) Aizaki H, Watanabe N, Aoyagi H, Watashi K, Suzuki R, Kojima S, Matsuura T, Wake K, Suzuki T, Wakita T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. 17th International Symposium on cells of the Hepatic Sinusoid. Osaka, Japan. 2013.9.23-25.

26) Suzuki R, Konishi E, Ishikawa T, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T. Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with a DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. Keystone Symposia, Positive Strand RNA Viruses, Boston, U.S.A. 2013.4.28-5.3.

#### 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

なし。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表