

201407002A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した
基礎的研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 孝宣

平成27（2015）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した
基礎的研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 孝宣

平成27（2015）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した基礎的研究	1
加藤 孝宣	

II. 分担研究報告

1. HCVワクチン用粒子作製を目的としたHCV複製可能細胞の探索	17
加藤 孝宣	
2. 感染中和抗体と感染中和機構の解析	25
脇田 隆字	
3. HCV 予防・治療ワクチンの霊長類モデルによる評価系の確立	29
明里 宏文	
4. 新規アジュバントによる HEV VLP に対する抗体誘導効果の検討	35
石井 孝司	
5. 日本脳炎ウイルス (JEV) Subviral 粒子を用いた JEV-C 型肝炎ウイルス二価ワクチンの開発に関する研究	39
鈴木 亮介	
6. マーモセットモデルにおけるHCV粒子ワクチンの有効性の評価	45
鈴木 知比古	
7. HCV粒子ワクチン製造用細胞株の探索 -正常ヒト肝細胞からの不死化細胞株樹立の試み-	51
中村 紀子	
8. 非炎症性核酸免疫アジュバントの開発	55
松本美佐子	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	59
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	65
-----------------	----

I. 総括研究報告

C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した基礎的研究

研究代表者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究要旨；本研究班では、細胞培養で作製したHCV J6/JFH-1株のウイルス粒子をワクチン抗原として用いることで新規HCVワクチンの樹立を目指した研究を行っている。本年度は小型霊長類であるマーモセットモデルにより、K3-SPGをアジュバントとして用いた時のHCV粒子ワクチンの有効性と安全性の検討を行った。その結果、K3-SPGをアジュバントとして用いた個体では中和活性を持つ抗HCV抗体の誘導と、複数のHCV株に反応する細胞性免疫の誘導が確認された。さらに新規HCV増殖が可能な非癌細胞由来細胞株の樹立、新規二価ワクチン開発の試み、新規アジュバントの確立とその評価、HCV感染評価のための新規動物モデルとなるHCV/GBV-Bキメラウイルスの検討等も行った。

研究分担者 脇田 隆字
国立感染症研究所ウイルス第二部
部長

研究分担者 松本美佐子
北海道大学大学院医学研究科
特任准教授

研究分担者 明里 宏文
京都大学霊長類研究所
人類進化モデル研究センター
教授

研究分担者 石井 孝司
国立感染症研究所ウイルス第二部
室長

研究分担者 鈴木 亮介
国立感染症研究所ウイルス第二部
主任研究官

研究分担者 鈴木 知比古
東レ株式会社医薬研究所
主席研究員

研究分担者 中村 紀子
株式会社鎌倉テクノサイエンス
主任研究員

A. 研究目的
C型肝炎ウイルス（HCV）感染は成人感染でも高率に慢性化するため、肝硬変から肝癌に至る慢性肝疾患の原因となり、世界中に多くの感染者が存在する。日本でも150万人以上の感染者がいると推定されており、その中には未だ医療機関での診療を受けていない感染者も多い。輸血後肝炎の減少により、新規感染者は減少すると考えられているが、医療従事者などハイリスク群での新規感染の報告は続いている。最近、HCVの複製を直接阻害する新規抗HCV薬が登場し、C型慢性肝炎に対する高い治療効果が期待されている。しかしこれらの薬剤による治療が、どの程度HCVによる肝癌発生を予防できるかは不明であり、また薬剤が高額なため漫然と使用されれば医療経済を圧迫しかねない。本研究によりHCVの感染予防ワクチンが実用化されれば、新規感染者やHCV感染が関わる肝癌発症数の減少が期待できる。
我々が2005年に報告したHCV JFH-1株とHuH-7細胞を用いた感染増殖システムにより、HCVの培養が可能となった。そこで、このシステムで得られた

ウイルス粒子を免疫原として用いることで、これまで不可能であったHCV粒子ワクチンを開発することを考えた。これまでの検討により、この培養細胞で産生したウイルス粒子を用いたワクチンをマウスへ接種することにより抗HCV抗体の誘導が可能であり、誘導された抗体が中和活性を持つことを確認した。また、少数ではあるがアカゲザルを用いた霊長類モデルでも検討を行い、生体での安全性を確認した上で、霊長類においても抗HCV抗体が誘導できることを確認している。

本年度の研究では医薬基盤研より強力なアジュバントであるK3-SPGの供与を受け、マームセットの霊長類モデルにおいて粒子ワクチン接種実験を行った。アジュバントと混合した粒子ワクチンにより、HCV感染を阻害する中和抗体が誘導されることが確認された。さらに複数の遺伝子型のHCV株に反応する細胞性免疫の誘導も検出された。また、非癌細胞由来細胞株によるHCV増殖系の樹立や、HCVの中和エピトープを他のウイルスの粒子抗原に組み込んだ二価ワクチンの開発にも取り組んでいる。

B. 研究方法

1. マームセットを用いたHCV粒子ワクチンの安全性と抗体誘導能の評価

HCV 粒子ワクチンとして、限外ろ過膜およびショ糖密度勾配遠心により精製した J6/JFH1 株の HCV 粒子を使用した。1回の投与量は、1匹あたり 60 pmol の HCV コアタンパク質に相当する HCV 粒子とし、アジュバントは、Alum (Imject Alum; Thermo SCIENTIFIC 社)、CpG アジュバントである K3 (5'-ATCGACTCTCGAGCGTTCTC-3') と Alum を混合したもの (Alum+K3)、医薬基盤研究所より供与を受けたβグルカンである SPG と K3 アジュバントの複合体 (K3-SPG) を用いて比較検討を行った。

小型霊長類動物モデルとしてマームセットを 6 頭用い、アジュバントと混合した粒子ワクチンの 2 回接種を行った。ワクチン接種開始 8 週後にマームセットの全採血と臓器摘出を行い、摘出臓器は安全性評価のために病理組織学的検査を行った。

マームセット血中のHCV抗体価は遺伝子型2aと

1bのE2タンパク質、遺伝子型1a, 1bおよび2aのコアタンパク質を用いたELISA法で定量した。さらに誘導された抗体の中和活性は培養細胞とHCV J6/JFH-1株を用いた感染系を用いて評価した。

2. ワクチン接種マームセットにおける細胞性免疫応答の確認

ワクチン接種マームセットの血液より分離、凍結保存したPBMCに、HCV コアペプチド (core-JFH; genotype 2a, core-1; genotype 1a+1b consensus) もしくはConcanavalin A (5 μg/ml) を添加して培養し、リアルタイムPCR法にてIFN-γ およびGAPDH mRNA 発現量を定量し、IFN-γ/GAPDH比を算出した。これらのデータを基に、同一サル個体におけるワクチン接種前後のIFN-γ mRNA相対値を算出した。

3. ワクチン用 HCV 粒子作製に適した培養細胞の探索

非癌細胞由来で HCV の複製と粒子産生が可能な培養細胞の同定のため、Vero 細胞を用いた検討を行った。HCV の効率的な複製に関わると報告されている miR-122, HCV のレセプターである CD81, Occludin, Claudin-1, SR-B1, 感染性ウイルス粒子産生への関与が報告されている ApoE それぞれを発現するレンチウイルスベクターを構築し、これらの因子を Vero 細胞に導入することで HCV ライフサイクル全体が再現できる非癌細胞由来培養細胞の樹立を試みた。

4. 正常ヒト肝細胞からの不死化細胞株樹立

正常肝細胞にアデノウイルスのE1遺伝子 (AdE1)、テロメラーゼ遺伝子 (hTERT)、SV40T抗原遺伝子 (SV40T) を導入することで不死化正常肝細胞株の樹立を試みた。正常ヒト肝細胞はLonza社のhNHepを使用し、肝細胞基本培地に肝細胞添加因子セットを添加した培地を使用し培養を行った。AdE1, hTERT, SV40T各遺伝子の導入はレンチウイルスベクターを用いて行った。SV40T遺伝子の発現ベクターについては人工エクジソン誘導発現系を挿入したレトロウイルスも作製した。

5. エンベロープ領域のペプチドによるHCV感染阻害活性

HCVエンベロープの全長をカバーする20アミノ酸の合成ペプチド（51種類）を合成し、そのペプチドで細胞を前処理することにより感染に重要なエンベロープ領域の同定を試みた。96well plateにHuH7.5.1細胞を播き、合成ペプチドの存在下でJFH-1ウイルスを感染させた。感染細胞の固定後に抗HCVコア抗体と蛍光二次抗体で染色してHCV陽性細胞数を計測した。

6. JEV subviral particleを用いた二価ワクチンの開発

日本脳炎ウイルス(JEV)はHCVと同様にフラビウイルス科であり、既にワクチンの安全性や有効性、生産手段が確立されている。そこでJEVのsubviral particle (SVP)を用いて、この粒子上にHCVの中和エピトープを提示させる事により、JEVとHCVの二価ワクチンの開発を試みた。HCVの中和エピトープ配列を挿入したJEV SVPを高発現する293T細胞株を樹立した。この細胞株の無血清培地の培養上清から限外ろ過およびゲル濾過クロマトグラフィーを用いてウイルス粒子の精製を行った。精製された抗原はアジュバント（Alum + CpG）とともにマウス腹腔内に接種し、接種後のマウス血清を用いてJEVおよびHCVに対する中和活性を評価した。

7. 新規アジュバントK3-SPGのマーモセットでの至適量と安全性の検討

医薬基盤研究所で開発された新規アジュバントK3-SPGは、TLR9のリガンドのCpGアジュバントで強力なインターフェロン誘導能を持つK3とβグルカンであるシゾフィラン（SPG）との複合体で、インフルエンザワクチンなどで強いアジュバント活性を持つことが報告されている。そこで本研究班ではHCV粒子ワクチンについても同様の強いアジュバント活性が得られるか、検討を行うこととした。しかし、我々が用いているマーモセットモデルにおけるこのアジュバントの至適量や安全性については明らかではない。そこで、抗原のモデルとして多量のVLPを調製できるE型肝炎ウイルス（HEV）を使用し、K3-SPGの至適量と安全性について検討を

行った。2.5 μgのHEVのVLPを10, 30, 90 μgのK3-SPGと混合し、マーモセット4頭に接種した。接種後、2週、4週、6週で採血を行い、抗HEV-IgGとIgMを測定した。

8. TLR3活性化RNA構造の同定とアジュバント機能

核酸認識自然免疫レセプターのひとつであるToll-like receptor 3 (TLR3) は、抗原提示能の高い骨髄系樹状細胞のエンドソームに高発現し、CTL/NK 細胞活性化のシグナルを伝達する事が知られている。そのためTLR3 リガンドは次世代のアジュバントとして期待されているが、このリガンドはTLR3だけでなく細胞質内のRIG-I/MDA5を活性化し強い炎症応答を誘導するため強い副反応を誘導する。そこで副作用が少なく効果的に細胞性免疫応答を誘導できる新規TLR3 アジュバントの開発を行った。40種類以上のRNA誘導体を作製し、TLR3を活性化するがRIG-I/MDA5を活性化しない誘導体をヒト及びマウス細胞を用いてスクリーニングした。選択した1種類のTLR3 リガンドを完全化学合成し、溶液中での安定性、TLR3とMDA5活性化能、細胞内取り込みを測定した。またin vivoにおけるサイトカイン誘導活性、NK/CTL活性化能、CTLの増殖活性化能についてマウスモデルを用いて検討した。

9. HCVワクチン評価のための新規霊長類モデルの確立

ワクチンの有効性や安全性の評価のためには動物モデルでの検討が必要である。しかしHCVは宿主域が狭く、チンパンジー以外の動物では感染とそれに伴う免疫反応を観察することは難しい。この感染動物モデルの不在が、HCVワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの有効性や安全性の評価、C型肝炎の病態解析の大きな障壁となっている。そこでHCVと近縁のGBV-Bと、新世界ザルであるマーモセットの感染モデルを用い、HCVとGBV-Cのキメラマウスを作製する事で、新規HCV感染霊長類モデルの樹立を試みた。HCV/GBV-Bキメラウイルスとして、GBV-BをベースにE1, E2領域をHCV由来遺伝子に置換したGB/HC E12および5'-UTRの一

部からコア, E1, E2領域を置換したGB/HC uCE12を構築し検討を行った。これらクローン由来ウイルスRNAをマーマセットに麻酔下で肝臓に直接接種した。その後、経時的に採血しウイルス複製増殖能を評価した。

(倫理面への配慮)

各種組換えDNAを用いた感染性ウイルスの作製および感染実験は、大臣確認申請を行い承認を受けた。本研究で使用した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。すべての動物実験は、それぞれの実験を行った施設の動物実験委員会の審査・承認を得た実験計画に基づき、倫理的配慮を行いながら実施した。マーマセットへのワクチン接種実験は、実験を行なった京都大学の動物実験委員会承認された実験計画に基づき、倫理的配慮を行いながら実験を実施した(承認番号2013-061, 研究課題名「HCV不活化ワクチン接種実験」)。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

C. 研究結果

1. マーマセットを用いたHCV粒子ワクチンの安全性と抗体誘導能の評価

6頭のマーマセットを用い、アジュバントとしてAlumを用いた群, Alum+K3を用いた群, K3-SPGを用いた群のそれぞれ2頭ずつにHCV粒子ワクチンを接種し検討を行った。その結果, K3-SPG投与群2頭において顕著な抗E2抗体価の上昇を認めたが, Alum群およびAlum+K3群ではそれぞれの2頭中1頭に軽度の抗体価の上昇が認められたのみであった。遺伝子型1b株のE2タンパク質, 遺伝子型1a, 1bおよび2aのコアタンパク質に対する抗体誘導も同様にEIAにて検討したところ, K3-SPG群ではこれらに対しても高い抗体価を示した。K3-SPG群のマーマセットから精製された抗体では、培養細胞でのHCV J6/JFH-1株の感染が濃度依存的に阻害されることが観察された。Alum群およびAlum+K3群のマーマセットから得られた抗体では感染阻害活性は検出されなかった。生化学的血液検査, 病理学的組織解析の結果ではこれらのマーマセットにおいてワクチン接種に関連した異常は認めなかった。

2. ワクチン接種マーマセットにおける細胞性免疫応答の確認

さらにワクチン接種マーマセットでの細胞性免疫誘導についても解析を行った。ワクチン接種マーマセットのPBMCに、ワクチンと同じ遺伝子型(genotype 2a)のHCV株由来コアペプチドを添加し刺激したところ, Alum+K3群およびK3-SPG群の各1頭で明らかなIFN- γ mRNAの発現誘導が認められた。またK3-SPG群ではgenotype 1由来のコアペプチドでも高い発現誘導が認められた。K3-SPG群では細胞性免疫応答が強く誘導された個体では抗体応答はやや弱く、抗体が強く誘導された個体では細胞性免疫が誘導されにくい傾向が認められた。Alum+K3群では2頭の個体において抗体応答もしくは細胞性免疫応答のどちらかが誘導されていたが、いずれもK3-SPG群と比較すると軽度であった。

3. ワクチン用HCV粒子作製に適した培養細胞の探索

Vero細胞にレンチウイルスベクターを用いてmiR-122を発現させたところ, Huh-7.5.1細胞と同程度のmiR-122の発現量が得られ, HCV RNA導入後に時間経過とともに細胞内コア抗原量の上昇が見られるようになり, HCVの複製が可能になっていると考えられた。さらにHCVのレセプターであるCD81, Occludin, Claudin-1, SR-B1をレンチウイルスベクターで導入することでHCVの感染も可能となった。また、この細胞にApoEを導入することにより感染性ウイルス粒子の産生も可能となった。

4. 正常ヒト肝細胞からの不死化細胞株樹立

正常ヒト肝細胞に AdE1 と hTERT もしくはSV40T をレンチウイルスベクターで導入し、培養を行った。SV40Tの導入により非導入細胞に比べて長期の培養が可能となった。AdE1+hTERTではさらに長期の生存が可能であったが、これらの細胞の著しい増殖は観察できず、細胞株の樹立はできなかった。人工エクジソン誘導発現系レトロウイルスでSV40Tを導入した細胞では、発現誘導に用いるponasterone Aで細胞が死滅し、こちらも細胞株の樹立は不可能であった。

5. エンベロープ領域のペプチドによるHCV感染阻害活性

HCVエンベロープ領域の合成ペプチドを用いた感染阻害活性の評価の結果, E1領域の2種のペプチドE1(282-301), E1(292-311)について感染阻害が観察された. 阻害は濃度依存的であり, 重複する領域の10アミノ酸の短いペプチドE1(292-301)でも感染阻害が観察された. また, 2種類をカバーする30アミノ酸のペプチドE1(282-311)についても同様の効果が観察された. 異なる遺伝子型の構造領域を持つキメラウイルス (TH株; 遺伝子型1b, S310株; 遺伝子型3a) を用いた感染実験でもこれらのペプチドによる阻害活性が観察された.

6. JEV subviral particle を用いた二価ワクチンの開発

HCV の中和エピトープ配列を挿入した JEV SVP を用いてアジュバントとともにマウスに接種し, 抗体誘導能について検討を行った. その結果, HCV の中和エピトープ配列を挿入していない WT の JEV SVP を免疫したマウスの血清では, JEV のみに対する中和活性が認められたが, HCV の中和エピトープ配列を挿入した JEV SVP を免疫したマウス血清では, JEV および HCV の両者に対する中和活性が観察された.

7. 新規アジュバントK3-SPGのマーモセットでの至適量と安全性の検討

HEVのVLPをK3-SPGとともに接種したマーモセットでは, すべての個体において抗原接種後12日にHEV IgM, IgG抗体の誘導が確認できた. K3-SPGの接種量については, 90 μ gを投与した個体で最も良好な抗体応答を認め, マーモセットモデルにおいてはこの量が至適量と考えられた. 有害事象はいずれのK3-SPG投与量においても観察されなかった.

8. TLR3活性化RNA構造の同定とアジュバント機能

新規の合成TLR3リガンド (sODN-dsRNA) は, 細胞外から効率よくエンドソームに移送されTLR3を活性化するが, RIG-I/MDA5は活性化しないこと

がヒトおよびマウス細胞による検討で明らかになった. このsODN-dsRNAをマウスの腹腔内に投与した場合, IFN- β , TNF- α , IL-6などの炎症性サイトカイン産生はほとんど誘導されなかった. 一方, 皮下投与では所属リンパ節でわずかのIFN- β , IL-6, IL-12産生が誘導された. マウス移植がんモデルでは, sODN-dsRNAはpoly(I:C)と同等のNK/CTL依存的癌退縮を誘導し, その活性はTLR3-TICAM-1依存的であることがノックアウトマウスでの解析から判明した. 更にがんを移植していないマウスにおいて, 抗原特異的CTLの増殖と活性化をTLR3-TICAM-1依存的に誘導した.

9. HCVワクチン評価のための新規霊長類モデルの確立

HCV/GBV-B キメラウイルスである GB/HC uCE12およびGB/HC E12のRNAを3頭のマーモセットの肝臓に接種し, その増殖能を検討した. 感染8週までは血漿中のウイルスRNAが断続的に検出され, これらのウイルスはマーモセットで複製可能と考えられた. しかし, その後の経過では, 接種後25週に1頭でウイルスRNAが1回陽性となったが, それ以降は全ての個体で陰性であった. 従って, これらのキメラウイルスはマーモセットでの持続感染が成立せず排除されたものと考えられた.

D. 考察

本研究では, HCV 粒子ワクチンの有効性と安全性評価を目的としている. 昨年度までの検討により HCV 粒子ワクチンは霊長類モデルにおいても抗 HCV 抗体の誘導が可能であることが示されていたが, 近交系でない霊長類モデルの場合は個体差の影響を受けやすく, 有意な結果を得るためには多量の抗原投与が必要となる懸念が生じていた. そこで本年度の検討では, 強力なアジュバントである K3-SPG を用いその有用性について検討を行った. アジュバントとしてアカゲザルで効果があった Alum と TLR9 リガンド CpG である K3, さらに K3 をヒトへの親和性を高めた β グルカンと複合体にした K3-SPG で比較した. その結果, K3-SPG をアジュバントとして用いた群で強い抗体誘導が見られ, さらにこれらのアジュバントを投与した個体では HCV

に対する細胞性免疫誘導も確認できた。また、これらのワクチン接種マウスの血液検査や解剖による病理組織学的検査の結果では、これまでのマウスやアカゲザルでの検討と同様にワクチンに由来すると思われる有害事象は確認されていない。以上のような結果は、K3-SPG と組み合わせた HCV 粒子ワクチンは抗 HCV 抗体と細胞性免疫の誘導が可能なワクチンとして臨床応用が期待できるものである。今後はさらにこれらの粒子ワクチンの接種個体数を増やし、さらに検討を進めている。

非癌細胞による HCV 培養系の構築について Vero 細胞を中心に検討を行ってきた。miR122 の強制発現により HCV の複製が可能になり、さらに HCV のレセプター分子を発現させることにより HCV の感染も可能となった。また、ApoE を発現させることにより、わずかではあるが感染性ウイルス粒子の産生も確認できた。今後、さらに HCV 複製に関わる宿主因子をこの細胞に補う事で、HCV の効率的な増殖が可能な非癌細胞 HCV 産生系の構築を目指す。別の方法として、正常肝細胞を不死化することによる HCV 増殖が可能な細胞株の樹立にも取り組んだが、アデノウイルスの E1 遺伝子やテロメラーゼ遺伝子、SV40T 抗原の導入では不死化正常肝細胞は得られなかった。

HCV のエンベロープ領域である E1 領域にウイルス感染に重要な領域 (aa 282-311) を明らかにした。この領域のペプチドを前処理することで HCV の感染阻害が観察されたことから、このペプチドが HCV 感染に必要な何らかの宿主因子に結合していると思われた。この領域の 30 アミノ酸の二次構造を予測すると、ヘアピン構造を形成して折り返しベータシート構造をとっており、この構造の宿主因子への結合がウイルス侵入に重要であると考えられる。この領域のペプチドはその構造と競合して感染をブロックしている可能性が考えられた。

また新たなワクチンとして、HCV の中和エピトープを挿入した JEV SVP を用いる方法を試みた。JEV SVP の発現系を用い、他の病原体の中和エピトープを挿入した SVP 粒子を効率良く調製する事が可能であった。この抗原を免疫したマウスの血清中に、JEV および HCV の両者に対して中和活性が認められた。今後、さらに長いアミノ酸配列や複数の中和

エピトープ挿入の可否についても検討したい。

マウスのワクチン接種実験で用いた新規アジュバントの至適量と安全性についても検討を行った。今回の検討では K3-SPG は優れた免疫誘導効果を有し、また霊長類モデルにおいても有害事象を起こさないことが示された。K3-SPG は 90 $\mu\text{g}/\text{head}$ で最も強い抗体誘導能を示し、その濃度で HCV 粒子ワクチンの接種を行った。

さらに新規アジュバントである sODN-dsRNA についても検討を行った。このアジュバントは効率的に TLR3 を活性化するが RIG-I/MDA5 は活性化しないため、NK/CTL 活性を誘導できるが副作用は引き起こさないことが確認された。本研究により NK/CTL 活性の誘導には全身的なサイトカイン産生ではなく、局所での Th1 型サイトカインの誘導が必要であることが示された。

ワクチンの有効性評価のためには、中和抗体の誘導能の評価だけでなく、慢性化阻止効果の評価も重要となる。しかし、現状では慢性化阻止能を評価できる実験系は存在しない。我々は HCV/GBV-B キメラウイルスを用いて、マウス慢性感染モデルの構築を行っている。本年度の検討では、作製したキメラウイルスクローンはマウス内で一過性の複製増殖は示したものの、その後排除されたことから急性肝炎モデルとしては使用可能なものの慢性肝炎モデルとしては不十分と考えられる。霊長類の慢性肝炎モデルの樹立のためには、これらキメラウイルスのマウス慢性感染モデルへの馴化、最適化が必要であると考えられる。今後、キメラウイルスをさらに改変することにより、よりマウス慢性感染モデルの構築を目指す。

E. 結論

1. 小型霊長類モデルであるマウスを用い、HCV 粒子ワクチンと新規アジュバントである K3-SPG の有効性と安全性の評価を行った。これらのワクチン接種を行ったマウスでは、感染阻害が可能な抗体誘導が確認された。ワクチン投与に関連した異常所見は認めなかった。

2. さらに上記のワクチン接種を行ったマウスにおいて、複数の遺伝子型のコアタンパク質に

反応する細胞性免疫の誘導が確認された。これらのワクチンは臨床応用が可能なHCVワクチンとして期待できる。

3. 非癌細胞であるVero細胞にレンチウイルスベクターを用いてmiR-122とHCVレセプター分子、ApoEを発現させることにより、HCVライフサイクル全体が再現可能な細胞株を樹立した。

4. 正常ヒト肝細胞にAdE1とhTERT, SV40Tをレンチウイルスベクターで導入し、不死化細胞の樹立を試みた。しかしこれらの因子の導入では、不死化細胞は得られなかった。

5. HCVのエンベロープであるE1領域のペプチドに感染阻害活性があることを見出した。これらの領域はウイルス侵入に重要な役割を担うと考えられ、E1タンパク質の機能解析によりHCVの侵入機構を明らかにできると考えられる。

6. JEVのエンベロープ蛋白質中にHCVの中和エピトープを挿入したsubviral粒子抗原を発現させ精製した。この抗原をマウスに免疫することにより、JEVおよびHCVの両者に対する中和抗体の誘導が確認できた。このシステムはHCVとJEVに対する二価ワクチンとして有望であると考えられる。

7. HEVのVLPを用いて、新規アジュバントであるK3-SPGの至適量を決定し、このアジュバントの高い抗体誘導効果と安全性を確認した。今後、HEVのVLP中にHCVの中和エピトープを挿入したキメラVLPを作製し、HEV/HCVの二価ワクチンの開発を目指す。

8. 新規アジュバントとしてTLR3-TICAM-1経路のみ活性化し、自然免疫応答を誘導するTLR3リガンド (sODN-dsRNA) を同定した。このアジュバントは化学合成が可能であり、今後ヒトへの適用を視野にいれ、大量合成・精製法の確立、霊長類およびヒトでの有効性と安全性の評価などを行う必要がある。

9. HCV感染評価のための新規動物モデルとしてHCV/GBV-Bキメラウイルスとマーマセツを用いた霊長類動物モデルによる感染系の構築を行った。このモデルでは、急性感染は可能であったが、今のところ持続感染は観察されていない。今後このキメラウイルスを用いた持続感染モデルの確立に向けて検討を続けて行く。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Daito T, Watashi K, Sluder A, Ohashi H, Nakajima S, Borroto-Esoda K, Fujita T, Wakita T. Cyclophilin Inhibitors Reduce Phosphorylation of RNA-dependent Protein Kinase to Restore Expression of IFN-stimulated Genes in HCV-infected Cells. *Gastroenterology*. 2014 Aug;147(2):463-72.

2) Fujie Y, Fusaki N, Katayama T, Hamasaki M, Soejima Y, Soga M, Ban H, Hasegawa M, Yamashita S, Kimura S, Suzuki S, Matsuzawa T, Akari H, Era T: New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. *PLoS ONE* 9, e113052, 2014.

3) Ishii A, K. Funami, M. Tatematsu, T. Seya, M. Matsumoto. 2014. Endosomal localization of Toll-like receptor 8 confers distinctive proteolytic processing on human myeloid cells. *J. Immunol.* 193(10):5118-5128. doi: 10.4049/jimmunol.1401375.

4) Jiang X., Kanda T., Wu S., Nakamoto S., Saito K., Shirasawa H., Kiyohara T., Ishii K., Wakita T., Okamoto H. and Yokosuka O. Suppression of La Antigen Exerts Potential Antiviral Effects against Hepatitis A Virus. *PLOS One*, 9, e101993 (2014)

5) Kasamatsu J., M. Azuma, H. Oshiumi, Y. Morioka, M. Okabe, T. Ebihara, M. Matsumoto,

- and T. Seya. 2014. INAM plays a critical role in IFN-gamma production by NK Cells interacting with polyinosinic-polycytidylic acid-stimulated accessory cells. *J. Immunol.* 193(10):5199-5207. doi: 10.4049/jimmunol.1400924.
- 6) Kasamatsu, J., S. Takahashi, M. Azuma, M. Matsumoto, A. Morii-Sakai, M. Imamura, T. Teshima, A. Takahashi, Y. Hirohashi, T. Torigoe, N. Sato, T. Seya. 2015. PolyI:C and mouse surviving artificially embedding human 2B peptide induce a CD4+ T cell response to autologous survivin in HLA-A*2402 transgenic mice. *Immunobiology.* 220(1):74-82. doi: 10.1016/j.imbio. 2014.08. 017.
- 7) Kim S, Date T, Yokokawa H, Kono T, Aizaki H, Maurel P, Gondeau C, Wakita T. Development of hepatitis C virus genotype 3a cell culture system. *Hepatology.* 2014 Dec;60(6):1838-50.
- 8) Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kato T, Nakayama K, Lai MM, Shimosegawa T. HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. *PloS One*, 9(6), e98521, 2014.
- 9) Leong, C. R., H. Oshiumi, M. Okamoto, M. Azuma, H. Takaki, M. Matsumoto, K. Chayama, T. Seya. 2015. A MAVS/TICAM-1-independent IFN-inducing pathway contributes to regulation of hepatitis B virus replication in the mouse hydrodynamic injection model. *J Innate Immun.* 7(1):47-58. doi: 10.1159/000365113.
- 10) Li T.C., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Haga K., Nakamura T., Ochiai S., Wakita T. and Johne R. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. *Journal of General Virology.* in press.
- 11) Li T.C., Yang, T., Shiota T., Yoshizaki S., Yoshida H., Saito M., Imagawa T., Malbas F., Lupisan S., Oshitani H., Wakita T. and Ishii K. Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90: 764-766 (2014)
- 12) Ma G, Yasunaga J-i, Akari H, Matsuoka M: TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, in press.
- 13) Maruyama A., H. Shime, Y. Takeda, M. Azuma, M. Matsumoto, T. Seya. 2015. Pam2 lipopeptides systemically increase myeloid-derived suppressor cells through TLR2 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* Jan 13. pii: S0006-291X(15)00033-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.011. [Epub ahead of print]
- 14) Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I-alpha in infectious virus production. *J Virol*, 88(13), 7541-7555, 2014.
- 15) Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 95:2658-2667 (2014).
- 16) Matsumoto, M., M. Tatematsu, F. Nishikawa, M. Azuma, N. Ishii, A. Morii-Sakai, H. Shime, T. Seya. 2015. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production in vivo. *Nat. Commun.* (in press)
- 17) Nakai, M., T. Seya, M. Matsumoto, K. Shimotohno, N. Sakamoto, H. H Aly. 2014. The J6JFH1 strain of hepatitis C virus infects human B

cells with low replication efficacy. *Viral. Immunol.* 27(6):285-294. doi: 10.1089/vim.2013.0140.

18) Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A: Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 66, 161-170, 2014.

19) Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H: Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host. *Scientific Reports*, in press.

20) Shimoda H, Saito A, Noguchi K, Terada Y, Kuwata R, Akari H, Takasaki T, Maeda K: Seroprevalence of Japanese encephalitis virus infection in captive Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Primates* 55, 441-445, 2014.

21) Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, Matsuura Y. Novel permissive cell lines for complete propagation of hepatitis C virus. *J Virol.* 2014 May;88(10):5578-94.

22) Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, Ishii K. Establishment of Hepatitis E Virus Infection-Permissive and -Nonpermissive Human Hepatoma, PLC/PRF/5, Subclones. *Microbiol Immunol.* 2014 Dec 10. doi: 10.1111/1348-0421.12219.

23) Shirasago Y, Sekizuka T, Saito K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuroda M, Abe R, Fukasawa M. Isolation and Characterization of A Huh.7.5.1-

Derived Cell Clone Highly Permissive to Hepatitis C Virus. *Jpn J Infect Dis.* 2014 Nov 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25420655.

24) Sugiyama N, Murayama A, Suzuki R, Watanabe N, Shiina M, Liang TJ, Wakita T, Kato T. Single strain isolation method for cell culture-adapted HCV by end-point dilution and infection. *PLoS One*, 9(5), e98168, 2014.

25) Sung PS, Murayama A, Kang W, Kim MS, Yoon SK, Fukasawa M, Kondoh M, Kim JS, Kim H, Kato T, Shin EC. Hepatitis C virus entry is impaired by claudin-1 downregulation in diacylglycerol acyltransferase-1-deficient cells. *J Virol*, 88(16), 9233-9244, 2014.

26) Takaki, H., H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya. 2014. Dendritic cell subsets involved in type I IFN induction in mouse measles virus infection models. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 53:329-333. doi: 10.1016/j.biocel.2014.05.001. Review

27) Tanida I, Shirasago Y, Suzuki R, Abe R, Wakita T, Hanada K, Fukasawa M. Caffeic acid, a coffee-related organic acid, inhibits the propagation of hepatitis C virus. *Jpn J Infect Dis.* (2015) in press.

28) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, Sugiyama M, Kojima S, Tanaka Y, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T. Dysregulation of Retinoic Acid Receptor Diminishes Hepatocyte Permissiveness to Hepatitis B Virus Infection through Modulation of NTCP Expression. *J Biol Chem.* (2015) in press.

29) Xeuatvongsa A., Komada K., Kitamura T., Vongphrachanh P., Pathammavong C., Phounphenghak K., Sisouk T., Phonekeo D., Sengkeopaseuth B., Som-Oulay V., Ishii K., Wakita T., Sugiyama M. and Hachiya M. Chronic Hepatitis B Prevalence among Children and Mothers: Results

from a Nationwide, Population-Based Survey in Lao People's Democratic Republic. *PLOS One*, 9, e88829 (2014)

30) Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Acute hepatitis B of genotype H resulting in persistent infection. *World J Gastroenterol*, 20(11), 3044-9, 2014.

31) Yamanaka A, Suzuki R, Konishi E. Evaluation of single-round infectious, chimeric dengue type 1 virus as an antigen for dengue functional antibody assays. *Vaccine*. 32:4289-4295 (2014).

32) 石井孝司 A 型肝炎, E 型肝炎 臨床と微生物 41: 72-78 (2014)

33) 石井孝司 環境中 A 型肝炎ウイルス遺伝子の検出と分子疫学的应用 臨床とウイルス 印刷中

2. 学会発表

1) Fujimoto A, Aizaki H, Matsuda M, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Suzuki T, Wakita T. Maintenance of HCV infectivity by down-regulating hepatic lipase expression. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff, Canada, Sep, 2014

2) Goto K, Fujimoto A, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. NS5A-associated membrane protein, embryonic lethal, abnormal vision, drosophila-like 1, regulates hepatitis C virus RNA synthesis and translation. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff, Canada, Sep, 2014

3) Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of a large outbreak of hepatitis A in Japan, 2014. The

10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China, August 25-27, 2014

4) Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of an outbreak of hepatitis A in Japan, 2014. The 11th Japan-Taiwan Symposium on New Technologies Applied to Public Health Including Foodborne Diseases and Drug Resistance. Taipei, Taiwan, September 11-12, 2014

5) Ishii K, Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y., Noda M., Wakita T. Molecular epidemiological analysis of recent hepatitis A in Japan and Asian countries. 10th Asia Pacific Travel Health Conference, Ho Chi Minh City, Viet Nam, May 7-11, 2014

6) Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Tada T., Shimada T., Nakashima K., Noda M., Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A in Japan. Blankenberge, Belgium, March 9-14, 2014

7) Ito M, Fukuhara T, Suzuki R, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Use of HuH7-derived, Bidirectional Oval-like cells to identify differentiation-dependent host factors that are involved in regulation of HCV lifecycle. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff, Canada, Sep, 2014

8) Iwamoto M, Watashi K, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Ohtani N, Koiwai O, Wakita T. Microtubule-dependent hepatitis B virus (HBV) replication revealed by chemical screening on an efficient HBV-replicating cell line. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles, USA, Sep, 2014

9) Kato T, Sugiyama N, Murayama A, T Matsumura, M Shiina, S Asabe, Wakita T, M Imawari. Antimicrobial Peptide LL-37 Deteriorate

Infectivity of Hepatitis C Virus. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.

10) Li T.C., Ochiai K., Yang T., Yoshizaki S., Takeda N., Ishii K., Wakita T. Characterization of a case of hepatitis E that imported from Spain. 10th Asia Pacific Travel Health Conference, Ho Chi Minh City, Viet Nam, May 7-11, 2014

11) Matsuda M, Nakanishi A, Li T-C, Suzuki R, Katano H, Wakita T, Suzuki T. Selective recognition of gangliosides by human polyomaviruses: Role of GD3 and GM3 in merkel cell polyomavirus infection. 7th International conference on HPV, Polyomavirus & UV in skin cancer. Novara, Italy, 2014.4.9-12

12) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Hepatitis C virus replication in a monkey kidney-derived cell line. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.

13) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Infection and Replication of Hepatitis C Virus in Vero cells Derived from Green Monkey Kidney. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 7-11, 2014. Boston, USA.

14) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Takemoto K, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Regulation of hepatitis C virus replication by liver X receptor is disrupted by a fungi-derived neoechinulin B. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff, Canada, Sep, 2014

15) Ohashi H, Watashi K, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Kamisuki S, Sugawara F, Wakita T. Flutamide Inhibits Hepatitis C Virus

Assembly through Disrupting Lipid Droplets. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff, Canada, Sep, 2014

16) Saga R, Fujimoto A, Watanabe N, Matsuda M, Hasegawa M, Watashi K, Aizaki H, Nakamura N, Konishi E, Kato T, Takeyama H, Wakita T, Suzuki R. Japanese encephalitis virus-subviral particles harboring HCV neutralization epitopes induce neutralizing antibodies against HCV. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff, Canada, Sep, 2014

17) Shi G, Ando T, Suzuki R, Ito M, Nakashima K, Wakita T, Suzuki T. HCV 3'UTR as a cis-acting element required for the viral RNA encapsidation. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff, Canada, Sep, 2014

18) Sugiyama R, Sugiyama N, Murayama A, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Wakita T, Kato T. Elucidation of effects on HCV propagation and ISG induction by amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.

19) Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Sato M, Kanegae Y, Watashi K, Aizaki H, Chiba J, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Single domain intrabodies against HCV core inhibit viral propagation and core-induced NF- κ B activation. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff, Canada, Sep, 2014.

20) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoic acid receptor plays an important role in mediating hepatitis B virus infection through regulation of NTCP expression. The 11th JSH Single Topic Conference, Hiroshima, Nov, 2014

- 21) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoid inhibitors abolish the host permissiveness to HBV infection by modulating NTCP expression. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles, USA, Sep, 2014.
- 22) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Wakita T. Retinoic acid receptor regulates the expression of NTCP transporter and plays an important role in mediating hepatitis B virus infection. FASEB 2nd International Conference on Retinoids. Itasca, USA, 2014.6.1-6.
- 23) Wakita T, Kong L, Aizaki H. Regulation of viral lifecycle in hepatitis C virus infection. Dynamic interplay between viruses and their hosts, Yokohama, Nov, 2014.
- 24) Wakita T. Cell culture models of hepatitis C virus. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014.
- 25) Watanabe N, Date T, Kono T, Aizaki H, Wakita T. Identification of an important envelope region by competitive inhibition experiment with envelope peptides. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014.
- 26) Watashi K, Iwamoto M, Sluder A, Matsunaga S, Ryo A, Morishita R, Kwon ATJ, Suzuki H, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokamai M, Wakita T. Characterization of a culture system reproducing the NTCP-mediated HBV entry and its application to drug development. International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles, USA, Sep, 2014.
- 27) Yokokawa H, Nakamura N, Higashino A, Suzuki S, Akari H, Kato T, Ishii K, Wakita T. Inactivated Hepatitis C Virus Particle Vaccine Induces Anti-HCV Antibodies in Common Marmosets. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.
- 28) 青柳東代, 相崎英樹, 藤本陽, 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, 脇田隆字. グリチルリチンによる抗HCV作用 - phospholipase A2およびAutophagyによるHCV分泌過程に与える影響-. 第24回抗ウイルス療法研究会総会, 富士吉田市, 2014年5月.
- 29) 青柳東代, 相崎英樹, 松本喜弘, 鈴木亮介, 渡士幸一, 市野瀬志津子, 松浦知和, 鈴木哲朗, 和氣健二郎, 脇田隆字. グリチルリチンによる抗C型肝炎ウイルス作用 -phospholipase A2 および AutophagyによるHCV分泌過程の制御-. 第50回日本肝臓学会総会, 東京, 2014年5月.
- 30) 石井朝子, 舟見健児, 立松恵, 瀬谷司, 松本美佐子. ヒトToll-like receptor 8 のリガンド認識機構の解析. 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 2014年6月19日.札幌 (北海道大学医学部学友会館フラテ) .
- 31) 石井孝司, 清原知子, 吉崎佐矢香, 八幡裕一郎, 河端邦夫, 金山敦宏, 山岸拓也, 高橋琢理, 有馬雄三, 木下一美, 齊藤剛仁, 松井珠乃, 大石和徳, 砂川富正, 脇田隆字: 2014年春季に日本で多発したA型肝炎の分子疫学的解析. 第62回日本ウイルス学会, 平成26年11月, 横浜.
- 32) 石井孝司: 日本におけるA型肝炎の現状について. 第29回関東甲信静支部ウイルス研究部会, 平成26年9月, 長野.
- 33) 石井孝司: 日本におけるA型肝炎の現状について. 第11回日本小児消化管感染症研究会, 平成27年

2月, 大阪.

34) 岩本将士, 渡士幸一, 九十田千子, Hussein Aly, 藤本陽, 鈴木亮介, 相崎英樹, 脇田隆字, 深澤征義, 小祝修, 楠原洋之. ヒトNTCP安定発現によるB型肝炎ウイルス(HBV)感染許容性の獲得とそれを用いたHBV侵入機構の解析. 第22回肝病態生理研究会, 東京, 2014年5月.

35) 岩本将士, 渡士幸一, 杉山真也, 鈴木亮介, 相崎英樹, 田中靖人, 溝上雅史, 大谷直子, 小祝修, 脇田隆字. 効率的な B 型肝炎ウイルス (HBV) 複製評価系を用いた微小管依存的な HBV 複製機構の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月.

36) 伊藤昌彦, 福原崇介, 鈴木亮介, 田川陽一, 松浦善治, 脇田隆字, 鈴木哲朗. HuH-7 由来オーバル細胞様細胞株 Hdo による HCV 生活環の調節に関わる分化関連宿主因子の同定. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月.

37) 大橋啓史, 渡士幸一, 中嶋翔, 金ソレイ, 鈴木亮介, 相崎英樹, 紙透伸治, 菅原二三男, 脇田隆字. C型肝炎ウイルス粒子の構築を阻害するflutamideの作用機序の解析. 第24回抗ウイルス療法研究会総会, 富士吉田市, 2014年5月.

38) 大橋啓史, 渡士幸一, 中嶋翔, 金ソレイ, 鈴木亮介, 相崎英樹, 紙透伸治, 菅原二三男, 脇田隆字. Aryl hydrocarbon receptor による脂肪滴形成及び C 型肝炎ウイルス粒子構築の制御. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月.

39) 岡本将明, 押海裕之, 松本美佐子, 瀬谷司. HCV RNAに対するIPS-1依存的なIII型IFN産生機構の解明. 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 2014年6月19日. 札幌 (北海道大学医学部学友会館フラテ) .

40) 河端邦夫, 清原知子, 石井孝司, 脇田隆字, 金山敦宏, 八幡裕一郎, 松井珠乃, 砂川富正, 大石和

徳: A型肝炎の家族内感染についての疫学的解析 (2014年上半期を中心に) . 第18回日本ワクチン学会 平成26年12月, 福岡.

41) 清原知子, 石井孝司, 杉山真也, 溝上雅史, 脇田隆字: 10-15歳児におけるHBs抗原保有率調査, 第18回日本ワクチン学会 平成26年12月, 福岡.

42) Lingbao Kong, 青柳春代, 松田麻未, 藤本陽, 渡士幸一, 鈴木亮介, 山越智, 堂前直, 鈴木健裕, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 相崎英樹. Prolactin regulatory element binding protein is involved in hepatitis C virus replication by interacting with NS4B. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月.

43) 嵯峨涼平, 藤本陽, 渡邊則幸, 松田麻未, 長谷川慎, 渡士幸一, 相崎英樹, 中村紀子, 小西英二, 加藤孝宣, 田島茂, 高崎智彦, 竹山春子, 脇田隆字, 鈴木亮介. 日本脳炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルス2価ワクチン抗原の発現と中和抗体の誘導. 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜, 2014年11月.

44) 史国利, 安東友美, 鈴木亮介, 松田麻未, 伊藤昌彦, 中島謙治, 脇田隆字, 鈴木哲朗. 3' UTR of HCV genome functioned as a cis-acting packaging signal. 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜, 2014年11月.

45) 塩田智之, 李天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之, 下島昌幸, 西條政幸, 脇田隆字, 石井孝司: E型肝炎ウイルス感染性規定因子宿主候補に関する研究, 第62回日本ウイルス学会, 平成26年11月, 横浜.

46) 志馬寛明, 松本美佐子, 瀬谷司. RNAアジュバントによるLy6G陽性細胞を介した抗がん作用. 第18回日本がん免疫学会総会. 2014年8月1日. 松山 (ひめぎんホール) .

47) Shime H, M. Matsumoto, T. Seya. Ly6G+ cell-mediated growth retardation of tumor in RNA adjuvant therapy. 第37回日本癌学会学術総会.

2014年9月25日. 横浜 (パシフィコ横浜) .

48) 杉山隆一, 杉山奈央, 村山麻子, 藤田めぐみ, 山田典栄, 脇田隆字, 加藤孝宣. NS5A-ISDRアミノ酸変異がHCV増殖に与える影響の解析. 第24回抗ウイルス療法研究会総会, 2014年5月.

49) 杉山隆一, 杉山奈央, 村山麻子, 藤田めぐみ, 山田典栄, 新田沙由梨, 脇田隆字, 加藤孝宣. NS5A-ISDRアミノ酸変異によるHCV増殖およびIFN感受性への影響. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 2014年11月10-12日, 横浜.

50) 鈴木紗織, 東濃篤徳, 森健一, 片貝祐子, 齊藤暁, 榎昇, 明里宏文: GBV-B感染マーマセツト/タマリンにおける慢性化移行には液性免疫応答の遅延が関与する. 第61回日本実験動物学会総会, 札幌, 2014年5月17日.

51) 高木宏美, 押海裕之, 松本美佐子, 瀬谷司. 樹状細胞における麻疹ウイルス感染によるI型IFN産生経路の解析. 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 2014年6月19日. 札幌 (北海道大学医学部学友会館フラテ) .

52) 立松恵, 小布施力史, 瀬谷司, 松本美佐子. TLR3を介したシグナル伝達におけるLRRC59の機能解析. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月25日. 横浜 (パシフィコ横浜) .

53) 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. HBV感染受容体NTCPの発現調節機構の解析およびこれを阻害する低分子化合物の抗HBV効果. 第24回抗ウイルス療法研究会総会, 富士吉田市, 2014年5月.

54) 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, 杉山 真也, 田中靖人, 溝上雅史, 脇田隆字. レチノイド阻害剤は NTCP 発現修飾を介して宿主細胞の B 型肝炎ウイルス感染感受性を消失させる. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月.

55) 中嶋翔, 渡士幸一, 紙透伸治, 竹本健二, Jesus Izaguirre-Carbonell, 鈴木亮介, 相崎英樹, 菅原二三男, 脇田隆字. 天然有機化合物 Neoechinulin B を利用した liver X receptor によるC型肝炎ウイルス産生制御機構の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜, 2014年11月.

56) 東濃篤徳, 鈴木紗織, 齊藤暁, 松岡和弘, 大出裕高, 片貝祐子, 岡林佐知, 森健一, 榎昇, 明里宏文: 小型霊長類モデルを用いたヘパチウイルスの持続感染における慢性肝炎発症に影響するウイルスゲノム変異解析, 第61回日本実験動物学会総会 札幌, 2014年5月17日.

57) 東濃篤徳, 鈴木紗織, 森健一, 大出裕高, 松岡和弘, 片貝祐子, 岡林佐知, 榎昇, 岩谷靖雅, 杉浦互, 明里宏文: 小型霊長類において持続感染したGBV-Bの変異解析, 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜, 2014年11月10日.

58) 福島慎二, 清原知子, 石井孝司, 中野貴司, 濱田篤郎: 不活化A型肝炎ワクチンの互換性研究〜エイムゲンとHAVRIX〜, 第18回日本ワクチン学会, 平成26年12月, 福岡.

59) 松田麻未, 鈴木亮介, 嵯峨涼平, 藤本陽, 渡士幸一, 相崎英樹, 森石恆司, 岡本 徹, 松浦善治, 黒田俊一, 脇田隆字. 遺伝子組換え酵母由来 B 型肝炎ウイルス様粒子の細胞表面への結合に関与する宿主因子の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月.

60) 村山麻子, 藤原圭, 脇田隆字, 加藤孝宣. C型肝炎ウイルスの細胞培養系を用いた第二世代NS5A阻害剤の抗ウイルス活性の評価. 第50回日本肝臓学会総会, 2014年5月29-30日, 東京.

61) 村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣. C型肝炎ウイルスが感染複製可能なペロ細胞株の樹立. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月25-27日, 横浜.

62) 山中敦史, Moi MengLing, 高崎智彦, 倉根一郎, 鈴木亮介, 小西英二. デング1型ウイルスの遺伝子型がヒトにおける中和・増強抗体応答に及ぼす影響. 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜, 2014年11月.

63) 横川寛, 中村紀子, 東濃篤徳, 鈴木紗織, 明里宏文, 加藤孝宣, 石井孝司, 脇田隆字. 培養細胞由来 HCV 粒子のマーモセットにおける抗 HCV 抗体誘導能の検討. 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜, 2014年11月.

64) 横川寛, 中村紀子, 東濃篤徳, 鈴木沙織, 明里宏文, 加藤孝宣, 石井孝司, 脇田隆字. 培養細胞由来C型肝炎ウイルス粒子のマーモセットにおけるワクチン効果の検討. 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日, 横浜.

65) 芳田剛, 齊藤暁, 松岡和弘, 大出裕高, 岩谷靖雅, 杉浦互, 保富康宏, 俣野哲朗, 三浦智行, 明里宏文: サル個体におけるサル指向性HIV-1の増殖効率を上昇させる要因, 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜, 2014年11月11日.

66) 芳田剛, 齊藤暁, 松岡和弘, 大出裕高, 岩谷靖雅, 保富康宏, 俣野哲朗, 三浦智行, 杉浦互, 明里宏文: サル指向性HIV-1の感染個体における増殖効率を上昇させる要因, 第28回日本エイズ学会学術集会 大阪, 2014年12月3日.

67) Chean Ring Leong, H.Oshiumi, M. Okamoto, M. Azuma, H. Takaki, M. Matsumoto, T. Seya. Inhibition of Hepatitis B virus replication by the Interferon-stimulated gene product of 20kDa protein (ISG20). 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2014年6月19日 札幌 (北海道大学医学部学友会館フラテ) .

68) 渡士幸一, Ann Sluder, 松永智子, 梁明秀, 森下了, 岩本将士, 九十田千子, 鈴木亮介, 相崎英樹, Katyna Borroto-Esoda, 田中靖人, 楠原洋之, 杉山真也, 溝上雅史, 脇田隆字. B型肝炎ウイルス

(HBV)Lタンパク質とNTCPの相互作用阻害による抗HBV戦略. 第24回抗ウイルス療法研究会総会 富士吉田市, 2014年5月.

69) 渡士幸一, Sluder Ann, 松永智子, 梁明秀, 森下了, 岩本将士, 九十田千子, 鈴木亮介, 相崎英樹, Borroto-Esoda Katyna, 田中靖人, 楠原洋之, 杉山真也, 溝上雅史, 脇田隆字. B 型肝炎ウイルス (HBV) large S タンパク質と NTCP の相互作用阻害による抗 HBV 戦略. 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜, 2014年11月.

70) 渡邊則幸, 伊達朋子, 河野環, 溝上雅史, 相崎英樹, 脇田隆字. E1ペプチドによるHCV感染阻害機構の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜, 2014年11月.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) WO2006/022422; 自立複製能を有する改変されたヒトC型肝炎ウイルスゲノムRNA; カナダ登録 (2014/11/18).

2) WO2007/037429; 新規組換え型ヒトC型肝炎ウイルス様粒子とその産生方法; 韓国登録 (2014/7/1).

3) WO2009/131203; C型肝炎ウイルス由来のキメラ遺伝子を含む核酸; 中国登録 (2014/7/2), 日本登録 (2014/8/8), 香港登録 (2014/11/7).

4) WO2010/074249; C型肝炎ウイルス由来の核酸並びにそれを用いた発現ベクター, 形質転換細胞及びC型肝炎ウイルス粒子; アメリカ登録 (2014/9/16), 中国登録 (2014/9/24).

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告