

現制御機構の解析 第 29 回中国四国ウイルス研究会、山口、2014 年 6 月

93) 平本 洗貴、團迫 浩方、武田 緑、佐藤 伸哉、池田 正徳、脇田 隆字、加藤 宣之 C 型肝炎ウイルスの生活環における宿主因子 Annexin A1 の役割 第 29 回中国四国ウイルス研究会、山口、2014 年 6 月

94) Sejima H, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Analysis on regulation mechanism of genes whose expressions were reduced in long-term intracellular HCV-RNA replication. 73th annual meeting of the japanese cancer association, Yokohama, 2014 Sep.

95) 奥村 暢章、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、溝上 雅史、加藤 宣之 FOXA による HBV 複製制御機構の解明 第 18 回日本肝臓学会大会、神戸、2014 年 10 月

96) 上田 優輝、團迫 浩方、佐藤 伸哉、池田 正徳、加藤 宣之 臨床応用に向けた抗マリア薬候補 N-251 の抗 HCV 活性作用機序の解析 第 18 回日本肝臓学会大会、神戸、2014 年 10 月

97) 瀬島 寛恵、佐藤 伸哉、團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之 HCV-RNA の長期複製によって発現低下した BASP1 と CPB2 遺伝子の現制御機構の解析 第 18 回日本肝臓学会大会、神戸、2014 年 10 月

98) 武田 緑、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之 小胞輸送蛋白質 Rab13 は HCV 感染に必要な宿主因子である 第 18 回日本肝臓学会大会、神戸、2014 年 10 月

99) 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

100) 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

101) 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

102) 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

103) 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

104) 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

105) 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 HAV 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、平成 26 年 11 月、横浜

106) 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

107) 大西俊介、光武進、花松久寿、湯山耕平、酒井翔太、折戸智恵子、川原由佳子、吉村彩、高崎裕代、武田宏司、五十嵐靖之、橋野聡、坂本直哉 NAFLD およびインスリン抵抗性の発症におけるスフィンゴミエリン代謝系の関与 第 50 回日本肝臓学会総会、一般演題、東京、2014 年 5 月

108) 山本誠、小野木博、吉田優、細谷孝充、萩原正敏: 宿主リン酸化酵素を標的とした次世代抗ウイルス薬の開発 第 62 回日本ウイルス学会横浜 2014 年 11 月

109) 長谷川輝、岡村 瞳、赤堀祐一、津川陽司、仁尾泰徳、土方 誠、一価不飽和脂肪酸合成は HCV ゲノム複製に重要な役割を有する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、平成 26 年 11 月、横浜

110) 阿部雄一、土方 誠、朝長 毅、リン酸化プロテオミクス解析による C 型肝炎ウイルス増殖に必要なウイルスタンパク質リン酸化就職の網羅的探索、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、平成 26 年 11 月、横浜

111) 土方 誠、HCV 培養系開発から見出された新たな HCV 薬の標的、第 27 回広島肝臓研究会学術講演会、平成 26 年 5 月、広島

112) 水口裕之; 創薬応用を目指したヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の作製技術の現状と今後の課題・可能性、第 41 回日本毒性学会学術集会、神戸、2014 年 7 月

113) 高山和雄、三村菜摘、萩原康子、立花雅史、櫻井文教、神田勝弘、川端健二、水口裕之; ヒト多能性幹細胞由来肝細胞を用いた次世代型創薬の実現を目指した基盤技術創成、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、京都、2014 年 10 月

114) 水口裕之、高山和雄; 再生医療、創薬応用を目指した多能性幹細胞由来肝細胞の創出、第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月

- 115) 水口裕之; ヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導法の開発とその実用化に関する研究、BioJapan 2014 World Business Forus、2014 年 10 月
- 116) 國戸偉丸、櫻井文教、高山和雄、脇田隆字、立花雅史、水口裕之; ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞における C 型肝炎ウイルス作用後の宿主応答の解析、日本薬学会第 135 年会、神戸、2015 年 3 月
- 117) 山下篤哉、藤本雄介、田中智久、葛西宏威、児玉栄一、渡士幸一、脇田隆字、前川伸哉、榎本信幸、田中 淳一、森石恆司、海洋生物抽出物ライブラリーソースからの B 型肝炎ウイルス転写活性抑制化合物の探索、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜
- 118) 安本順、葛西宏威、土橋香織、渡士幸一、脇田隆字、田中智久、山下篤哉、森石恆司、HBV 感染による細胞内脂肪滴形成への影響、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜
- 119) 田中智久、陳文家、乙黒光姫、葛西宏威、山下篤哉、森石恆司、日本在来馬におけるウマヘパシウイルス感染第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜
- 120) 土橋香織、葛西宏威、田中智久、陳文家、渡士幸一、脇田隆字、山下篤哉、梁明秀、岡本徹、松浦善治、森石恆司、トリプシン・EDTA による NTCP 依存 HBV 感染の増強、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜
- 121) 天野稜大、山下篤哉、葛西宏威、田中智久、坂本直哉、前川伸哉、榎本信幸、津吹政可、森石恆司、Tyrphostin 類縁化合物の C 型肝炎ウイルス複製阻害活性の検討、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜
- 122) Moriishi K, Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection, The 2nd Japan-Italy Liver Workshop: "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: Molecular Basis and Clinical Links" 2014.11.18-19. Hiroshima
- 123) 土肥弘義、森川賢一、吉田 仁、肝硬変における液性免疫異常、第 40 回日本肝臓学会東部会、東京、28 Nov 2014.
- 124) 大森里紗、森川賢一、林栄一、荒井 潤、梶原 敦、宮下みゆき、魚住祥二郎、下間 祐、打越 学、土肥弘義、坂木 理、吉田 仁、当院で経験した B 型肝炎ウイルス再活性化 9 症例の検討、第 40 回日本肝臓学会東部会、東京、28 Nov 2014.
- 125) 荒井 潤、伊藤敬義、打越 学、下間 祐、宮下みゆき、森川賢一、江口潤一、吉田 仁、C 型慢性肝炎における DAA、ペグ IFN、リバビリン 3 剤併用療法と DAA2 剤併用療法における B 細胞 HCV RNA 及び ISG 発現動向の比較、第 40 回日本肝臓学会東部会、東京、27 Nov 2014.
- 126) 林 栄一、江口潤一、坂木 理、土肥弘義、大森里紗、梶原 敦、伊藤敬義、森川賢一、吉田 仁、石井成明、広石和正、井廻道夫、肝細胞癌に対する樹状細胞と抗 TIM-3 抗体を用いた免疫療法の検討、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、30 May 2014.
- 127) 荒井 潤、伊藤敬義、打越 学、下間 祐、宮下みゆき、森川賢一、江口潤一、吉田 仁、C 型慢性肝炎患者に対する TVR3 剤併用療法において B 細胞中 ISG 発現と治療前血清補体値は早期抗ウイルス状態確立に関連する、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、30 May 2014.
- 128) 森川賢一、島崎とも江、吉田 仁、プロテオミックスによる宿主因子を標的とした肝炎ウイルスによる新規創薬研究の可能性、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、29 May 2014.
- 129) 魚住祥二郎、馬場俊之、坂木 理、梶原 敦、荒井 潤、大森里紗、下間 祐、土肥弘義、打越 学、森川賢一、吉田 仁、肝硬変に合併した門脈血栓症に対してダナパロイドナトリウムによる血栓溶解療法の有効性に関する検討、JDDW2014(第 22 回日本消化器関連学会週間)(第 18 回日本肝臓学会大会)、神戸、24 Oct 2014.
- 130) 打越 学、伊藤敬義、荒井 潤、下間 祐、宮下みゆき、坂木 理、土肥弘義、魚住祥二郎、大森里紗、梶原 敦、森川賢一、江口潤一、吉田 仁、TVR3 剤併用療法後の C 型慢性肝炎 SVR 患者における B 細胞 HCV、B 細胞活性化因子および免疫グロブリン以上の変化、JDDW2014(第 22 回日本消化器関連学会週間)(第 18 回日本肝臓学会大会)、神戸、24 Oct 2014.
- 131) 梶原 敦、下間 祐、林 栄一、荒井 潤、大森里紗、宮下みゆき、魚住祥二郎、打越 学、土肥弘義、坂木 理、森川賢一、江口潤一、伊藤敬義、吉田 仁、当院における肝細胞癌に対する RFA 治療後の再発リスク検討についての因子、JDDW2014(第 22 回日本消化器関連学会週間)(第 18 回日本肝臓学会大会)、神戸、23 Oct 2014.
- 132) 下間 祐、伊藤敬義、江口潤一、柳川達郎、森川賢一、坂木 理、打越 学、土肥弘義、宮下みゆき、大森里紗、荒井 潤、梶原 敦、林 栄一、吉田 仁、肝表病変に対するラジオ波焼灼術の成績と工夫、JDDW2014(第 22 回日本消化器関連学会週間)(第 18 回日本肝臓学会大会)、神戸、23 Oct 2014.
- 133) 森川賢一、伊達朋子、吉田 仁、HCV NS3-4A 蛋白複合体による宿主自然免疫の攪乱、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、30 May 2014.

134) 打越 学、伊藤敬義、荒井 潤、下間 祐、宮下みゆき、森川賢一、江口潤一、吉田 仁. C型慢性肝炎における DAA、Peg-IFN、リバビリン3剤併用療法中の B 細胞活性化サイトカインの上昇と B 細胞異常関連因子の検討. 第 50 回日本肝臓学会総会. 東京, 30 May 2014.

G.知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 発明の名称：抗 RNA ウイルス作用を有するアニリン誘導体

出願番号：PCT/JP2009/052253

PCT 出願日：2009/2/4

出願人：株式会社キノファーマ

審査状況：日本（特許査定）、米国（2014 年特許取得）、韓国（審査請求済み）

2. 土方 誠、阿部雄一、山口達哉、内胚葉性幹細胞の製造方法、特願 2014-121780 号、登録日：平成 26 年 6 月 12 日

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし

II. 分担研究報告

肝炎ウイルスの複製増殖および病原性発現機構と薬剤感受性の解析

主任研究者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆字
分担研究課題：肝炎ウイルスの複製増殖および病原性発現機構と薬剤感受性の解析の総括

研究要旨 ウイルス複製増殖機構や病原性発現機構を理解するために、HCV の新規ウイルス培養系の開発と、ウイルス培養系を利用して、ウイルス複製増殖過程と病原性発現機構を解析する。さらに、抗ウイルス薬に対する感受性を解析する。HCV では増殖複製過程を詳細に解析し、関与する宿主因子を同定して、新たな治療標的を同定する。さらに、HCV 感染過程に必要な宿主因子を明らかにし、新規感染動物モデルを開発し、新規治療法および予防法開発に役立てる。

A. 研究目的

本研究ではHCV感染増殖機構や病原性発現機構を理解するためにHCVの新規ウイルス培養系の開発と、ウイルス培養系を利用して、ウイルス感染増殖過程と病原性発現機構を解析する。さらに、抗ウイルス薬に対する感受性を解析して、新規治療法および予防法開発に役立てる。

B. 研究方法

1. 遺伝子型 1b の全長 HCV レプリコン感染実験

遺伝子型 1b の NC-1 株の全長レプリコンを構築した。NC-1 レプリコン RNA を合成し、Huh7 細胞に導入し、G418 による薬剤選択培養をおこなった。レプリコン細胞の培養上清をアミコンで 30 倍に濃縮して Huh7.5.1 細胞に接種し、G418 による薬剤選択培養をおこなった。培養終了時に固定し、クリスタルバイオレット染色によりコロニー形成を確認した。また、感染して樹立したレプリコン細胞の上清を濃縮して新たな細胞に感染を繰り返した。

2. 遺伝子型 3aHCV 感染細胞の解析

サブジェノミック・レプリコン細胞から同定した適応変異を野生型 S310 株にそれぞれ導入した

全長コンストラクトを作製した。適応変異を導入した S310 株の全長 HCV RNA を合成し、Huh7.5.1 細胞に導入して経代培養を行った。感染性ウイルスを回収して薬剤感受性を検討した。また、ウイルス感染細胞内のコア蛋白質と脂肪滴の局在を免疫染色で確認した。

3. 遺伝子型 2b 感染性クローンの樹立

遺伝子型 2b LSG のサブジェノミックレプリコン細胞から得られた適応変異を、全長の遺伝子型 2b LSG にそれぞれの適応変異を導入して 9 つのプラスミドを作製した。その全長 RNA を合成し、Huh 7.5.1 細胞に導入し、長期経代培養した。上清中の HCV コア蛋白質と感染力価を定期的に測定した。細胞内のウイルスを HCV コア抗体を用いて免疫染色で確認した。上清中のウイルスが感染性ウイルスであることを調べるため、naïve な Huh7.5.1 細胞に感染させた。Huh7.5.1 で CD81 と E2 抗体の感染阻害効果を調べた。

4. 感染中和抗体の樹立と解析

HCV のリコンビナント E2 蛋白質を用いてファージディスプレイ法により単鎖抗体を樹立してその感染中和活性を検討した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 遺伝子型 1b の全長 HCV レプリコン感染実験

急性肝炎症例の血清から分離したウイルス遺伝子 (NC-1 および NC-1_EGSY) を用いて全長レプリコン構築を作成した。合成した RNA を Huh7 細胞にトランスフェクションして G418 による選択培養をおこなった。レプリコン細胞の培養上清をアミコンにより 30 倍に濃縮して Huh7.5.1 細胞に接種し、G418 で選択培養した。さらにその培養上清を新たな Huh7.5.1 細胞に接種して 5 回感染を繰り返した。RNA トランスフェクションにより 40 クロンのレプリコン細胞を樹立し、その中で上清中のコア蛋白質が上昇した 33 クロンの培養上清を naive 細胞に感染させた。その中で 11 クロンの培養上清が感染経代が可能となった。現在レプリコンゲノムの変異を確認中である。

2. 遺伝子型 3aHCV 感染細胞の解析

昨年度までに遺伝子型 3a の S310 株による HCV

感染系を樹立した。S310 の薬剤感受性を JFH-1 と比較検討したところ、プロテアーゼ阻害剤、VX-950 では 14 倍から 315 倍に EC50 が低下した。しかし、IFN, CsA, NS5A および NS5B 阻害剤では JFH-1 とほぼ同等の感受性であった。また、S310 感染細胞における細胞内の HCV コアと脂肪滴の局在を解析した。その結果、JFH-1 は脂肪滴の周りを囲むリング状の局在をした反面、S310 感染細胞では JFH-1 とは異なる局在であり、点状の局在を見せた。さらに S310 感染細胞における脂肪滴の面積は非感染細胞、JFH-1 感染細胞と比較して有意に増大していた。

3. 遺伝子型 2b 感染性クローンの樹立

レプリコンで同定した適応変異を持つ遺伝子型 2b LSG 株の全長 RNA を Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションし、長期間培養した結果、67 日目には LSG を含めた全 9 クロンの HCV コア蛋白質が放出された。LSG, S244G と G72R クロンの場合はコア蛋白質の放出が最初は低いものの 2 ヶ月めには上昇した。その他の 6 つのクローン (G72V, E330K, I131V, L191M, R192H と Q414L) では、RNA 導入後 8 日から培養上清中に HCV コア蛋白質が検出された。それらの感染力価を測った結果 HCV コアのレベルと相関した。細胞内のウイルスを HCV コア抗体を用いて免疫染色で確認した結果、同様の結果が得られた。

そのウイルスを使用し再感染実験を行った結果、1 回目より 2 回目はウイルスの感染効率が良くなり、2 回目より 3 回目の方がよりウイルスの感染能が亢進した。その結果から、感染細胞の培養を継続するとウイルス粒子の分泌効率が向上することが明らかとなった。

4. 感染中和抗体 の 樹立 と 解析

HCV のリコンビナント E2 蛋白質を用いてファージディスプレイ法により 3 種類の単鎖抗体を樹立した。これらの単鎖抗体は HCV 感染の阻害活性を有した。また、エピトープ解析から構造エピトープを認識することが推定された。そこで、抗体存在下に HCV 感染を繰り返すことにより耐性ウイルスを獲得しようとした。HCV1 などの線状エピトープを認識する中和抗体に対しては容易に耐性ウイルスが獲得できたが、単鎖抗体に対しては耐性ウイルスを獲得することは困難であった。他の構造エピトープを認識する抗 E2 抗体との比較から単鎖抗体も構造エピトープを認識していると考えられた。

D. 考察

HCV 感染増殖機構や病原性発現機構を理解するために HCV の新規ウイルス培養系の開発が重要である。本研究では遺伝子型 1b, 2b の新規感染実験系の開発と遺伝子型 3 ウイルスの解析をおこなった。

遺伝子型 1b の感染実験系は全長レプリコンを用いて構築した。レプリコン細胞を樹立して、培養上清中にコア蛋白質を分泌するクローンを選択して、さらに感染実験によるクローンの選抜を行った。11 クローンにおいては繰り返しの感染が可能であった。感染時には新たな細胞に感染させているため、感染性の差にはウイルス側の要因が影響すると考えられる。今後はレプリコンゲノムの変異の影響を解析していく予定である。

遺伝子型 3 の HCV 感染では脂肪肝の合併が多いことが臨床的に報告されている。我々が開発した

遺伝子型 3a の S310 株による感染実験系においても、その感染細胞においてコア蛋白質と脂肪滴の局在が JFH-1 株と異なる。また、非感染細胞や JFH-1 感染細胞と比べて、S310 感染細胞では脂肪滴の面積が増加することを見いだした。脂質代謝系遺伝子の変化も解析中だが、今のところ明らかな変化は見いだせていない。細胞内脂質量は細胞増殖に大きく影響されるので、今後も解析を進めていく。また、S310 株の薬剤感受性を JFH-1 株と比較したところ、プロテアーゼ阻害剤の感受性が大きく低下していた。NS5A や 5B 阻害剤の感受性には大きな差を認めなかったため、これらの阻害剤を治療に使用するか、遺伝子型 3 に特異的なプロテアーゼ阻害剤の開発が必要かもしれない。

遺伝子型 2b 株の研究においては、遺伝子型 1 と遺伝子型 2b で報告された適応変異 LSG をサブジェノミックレプリコンに導入することで、複製が見られた。適応変異なしでは遺伝子型 2b の複製が不可能であった。複製効率の良い全長 HCV を作製するために複製効率の良い HCV サブゲノムレプリコンを樹立した。得られたそれぞれの適応変異を遺伝子型 2b LSG の全長に導入することによって遺伝子型 2b で感染性ウイルス粒子産生が確認できた。遺伝子型 2b に対する薬剤感受性や遺伝子型 2b 特異的な抗 HCV 剤の開発に役に立つものと期待される。

現在 DAA として臨床に使用されている薬剤と開発中の薬剤はすべて HCV のゲノム増殖を標的としている。さらに治療効果を改善し、副作用を軽減するためにはウイルスのライフサイクルの他の過程を標的とする抗ウイルス薬の開発が必要と考えられる。また、HCV の予防ワクチンの開発のためにも感染中和抗体の研究が必要である。

我々は今回抗 E2 抗体をファージディスプレイ法で開発し、構造エピトープを認識する感染中和抗体を樹立した。構造エピトープを認識して、耐性ウイルスができにくいことからウイルス感染を阻害する抗ウイルス効果も期待できる。

E. 結論

遺伝子型 1b, 2a, 3a の新規感染実験系を樹立した。この実験系は HCV ライフサイクルの研究や病原性発現の分子機構解析、抗ウイルス剤の開発に役立つと考えられる。また、抗 E2 抗体に感染中和活性を見いだした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 Jan 20. [Epub ahead of print]
- 2) Masaki T, Arend KC, Li Y, Yamane D, McGivern DR, Kato T, Wakita T, Moorman NJ, Lemon SM. miR-122 Stimulates Hepatitis C Virus RNA Synthesis by Altering the Balance of Viral RNAs Engaged in Replication versus Translation. *Cell Host Microbe*. 2015 Feb 11;17(2):217-228.
- 3) Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting Cellular Squalene Synthase, an Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus. *J Virol*. 2015 Feb 15;89(4):2220-32.
- 4) Esumi M, Ishibashi M, Yamaguchi H, Nakajima S, Tai Y, Kikuta S, Sugitani M, Takayama T, Tahara M, Takeda M, Wakita T. Transmembrane serine protease TMPRSS2 activates hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2015 Feb;61(2):438-47.
- 5) Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, Matsuura Y. Amphipathic α -Helices in Apolipoproteins Are Crucial to the Formation of Infectious Hepatitis C Virus Particles. *PLoS Pathog*. 2014 Dec 11;10(12):e1004534.
- 6) Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Wakita T, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Inhibits Thapsigargin-Induced Apoptosis. *PLoS One*. 2014 Nov 19;9(11):e113499.
- 7) 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]
- 8) 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*. 2014 Dec;95(Pt 12):2658-67.
- 9) 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.
- 10) Munakata T, Inada M, Tokunaga Y, Wakita T, Kohara M, Nomoto A. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclin-dependent kinase inhibitors. *Antiviral Res*. 2014 Aug;108:79-87.
- 11) Ishibashi M, Morita N, Nomura-Kawaguchi C, Shimizu Y, Wakita T, Esumi M. CLEC4M-positive and CD81-negative Huh7 cells are not susceptible to JFH-1 HCVcc infection but mediate transinfection. *Arch Virol*. 2014 Nov;159(11):2949-55.
- 12) Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets. *Virology*. 2014 Aug;462-463:166-74.
- 13) Ogura N, Watashi K, Noguchi T, Wakita T. Formation of covalently closed circular DNA in Hep38.7-Tet cells, a tetracycline inducible hepatitis B virus expression cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Sep 26;452(3):315-21.
- 14) Choi JE, Hur W, Kim JH, Li TZ, Lee EB, Lee SW, Kang W, Shin EC, Wakita T, Yoon SK. MicroRNA-27a Modulates HCV Infection in Differentiated Hepatocyte-Like Cells from Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*. 2014 May 13;9(5):e91958.
- 15) 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.
- 16) 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- α in Infectious Virus Production. *J Virol*. 2014 Jul;88(13):7541-55.
- 17) Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, Sakasegawa N, Murakami Y, Chu PS, Usui S, Ishibashi Y, Wakayama Y, Taniki N, Murata H, Saito Y, Fukasawa M, Saito K, Yamagishi Y, Wakita T, Takaku H, Hibi T, Saito H, Kanai T. Prominent steatosis with hypermetabolism of the cell line permissive for years of infection with hepatitis C virus. *PLoS One*. 2014 Apr 9;9(4):e94460.
- 18) 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.
2. 学会発表
- 1) Wakita T. Cell culture models of hepatitis C virus. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 2) Saga R, Fujimoto A, Watanabe N, Matsuda M, Suzuki R, Hasegawa M, Watashi K, Aizaki H, Nakamura N, Konishi E, Kato T, Takeyama H, Wakita T. 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
- 3) 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
 - 4) Kato T, Sugiyama N, Murayama A, Matsumura T, Shiina M, Asabe S, Wakita T, Imawari M. Antimicrobial peptide LL-37 deteriorate infectivity of hepatitis C virus. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 5) Munakata T, Inada M, Tokunaga Y, Wakita T, Kohara M, Nomoto A. Suppression of hepatitis C virus replication by Cyclin-dependent kinase inhibitors. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 6) Takeda M, Ikeda M, Sato S, Dansako H, Wakita T, Kato N. Rab13 is an essential factor for HCV entry. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 7) 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
 - 8) 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
 - 9) 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
 - 10) 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. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 11) 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
 - 12) 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
 - 13) Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Human hepatoma HuH-7 cell line-derived RSc cells show higher viral

- productivity in response to infection with HCV-JFH-1 than Huh7.5 cells. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 14) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Hepatitis C virus replication in a monkey kidney-derived cell line. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 15) Hiramoto H, Dansako H, Takeda M, Satoh S, Wakita T, Ikeda M, Kato N. Annexin A1 negatively regulates HCV RNA replication. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 16) Yamaguchi H, Kuroda K, Wakita T, Esumi M. Role of golgi membrane protein 1 in hepatitis C virus replication. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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- α in infectious virus production. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 20) Ariumi Y, Kuroki M, Siddiqui R, Hijikata M, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX21 RNA helicase restricts HCV infection. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 21) 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. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 22) 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. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 23) Hmwe SS, Suda G, Sakamoto N, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Aizaki H, Wakita T. Construction of novel infectious genotype 2b culture system. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 24) 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

- 25)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、脇田隆宇。グリチルリチンによる抗 HCV 作用 - phospholipase A2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス(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、富士急、2014 年 5 月
- 26)杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、脇田隆宇、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、富士急、2014 年 5 月
- 27)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、脇田隆宇。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、富士急、2014 年 5 月
- 28)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、脇田隆宇。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
- 29)村山麻子、藤原圭、脇田隆宇、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、東京、2014 年 5 月
- 30)脇田隆宇、相崎英樹、渡士幸一。C 型肝炎ウイルス生活環全体を標的とした新規作用を有する抗ウイルス剤の探索。第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月
- 31)渡邊則幸、伊達朋子、河野環、溝上雅史、相崎英樹、脇田隆宇。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
- 32)白砂圭崇、関塚剛史、齊藤恭子、鈴木哲朗、脇田隆宇、花田賢太郎、黒田誠、安部 良、深澤征義。HCV に対して高感染感受性を有する Huh7.5.1 細胞亜株の樹立と性状解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 33)今村芽依、黒河健太、室井敦、高橋宏隆、竹田浩之、鈴木哲朗、脇田隆宇、澤崎達也。C 型肝炎ウイルス NS4B と相互作用する責任 E3 リガーゼの網羅的探索とその機能解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 34)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、脇田隆宇、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、横浜、2014 年 11 月
- 35)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、脇田隆宇。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
- 36)下池貴志、野島清子、脇田隆宇、岡田義昭。血液製剤における C 型肝炎ウイルスの不活化機構の解明。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 37)史国利、安東友美、鈴木亮介、松田麻未、伊藤昌彦、中島謙治、脇田隆宇、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
- 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、

- 脇田隆宇。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) 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、脇田隆宇、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
- 40) 武田緑、池田正徳、佐藤伸哉、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宣之。HCV ライフサイクルにおける小胞輸送蛋白質 Rab13 の役割。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 41) 山口裕美、黒田和道、脇田隆宇、江角真理子。Golgi membrane protein 1 (GOLM1) は C 型肝炎ウイルス感染に関与するか？第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 42) 瀬島寛恵、佐藤伸哉、團迫浩方、池田正徳、加藤宣之。長期にわたる HCV-RNA 複製による BASP1 と CPB2 遺伝子の発現低下の分子機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 43) 伊藤昌彦、福原崇介、鈴木亮介、田川陽一、松浦善治、脇田隆宇、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
- 44) 棟方翼、徳永優子、真田崇弘、脇田隆宇、野本明男、小原道法。C 型肝炎ウイルス感染時に TLR3 は IFN 非依存的に発現して抗ウイルス作用を示す。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 45) 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、脇田隆宇。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
- 46) 高橋宏隆、室井敦、竹田浩之、鈴木哲朗、脇田隆宇、澤崎達也。コムギ無細胞タンパク質アレイを用いた HCV プロテアーゼの網羅的基質探索。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 47) 池田恭介、室井敦、高濱正吉、根本圭一郎、高橋宏隆、竹田浩之、鈴木哲朗、脇田隆宇、澤崎達也。コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた HCV プロテアーゼにより切断される新規基質タンパク質 SGK495 の機能解析と SGK495 を標的とした抗 HCV 薬剤の開発。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 48) 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、脇田隆宇、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
- 49) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆宇、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、横浜、2014 年 11 月

50)白砂圭崇、谷田以誠、清水芳実、鈴木哲朗、
脇田隆宇、花田賢太郎、近藤昌夫、安部良、
深澤征義。Occludin のノックアウト肝細胞の
樹立と本細胞を用いた HCV 感染の解析。日本
薬学会第 135 年会、神戸、2015 年 3 月

51)國戸偉丸、櫻井文教、高山和雄、脇田隆宇、
立花雅史、水口裕之。ヒト iPS 細胞由来分化
誘導肝細胞における C 型肝炎ウイルス作用後
の宿主応答の解析。日本薬学会第 135 年会、
神戸、2015 年 3 月

G. 知的所有権の出願・登録状況

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 26 年度）

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究

分担研究者：三浦 直行 浜松医科大学医化学講座 教授（平成 26 年 12 月まで）
青戸 一司 浜松医科大学医化学講座 助教（平成 27 年 1 月より）
研究協力者：Mohammad Johirul Islam 浜松医科大学医化学講座
鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授
伊藤 昌彦 浜松医科大学感染症学講座 助教

分担研究課題：HCV 感染モデル動物の開発

研究要旨：これまでC型肝炎ウイルス（HCV）の病態を解析できる有用な小動物モデルは確立されていなかった。今回、RNA polymerase Iのpromoter/terminatorを用いて作出したトランスジェニックマウス（HCV増殖マウス）は、HCV RNAを高コピー数発現することに成功した。このマウスの肝臓ではウイルス性タンパク質の発現を免疫染色により確認できる。また、マウスの血清を添加したHuh7.5.1培養細胞ではHCVの感染性を示した。さらに、6ヶ月齢では慢性C型肝炎の代謝異常の指標である重度の脂肪肝変性を発症した。以上の結果から、HCV増殖マウスはHCVの解析ための有用な小動物モデルとなり得ることが期待できる。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は、肝炎、肝硬変、肝細胞癌の主要な原因ウイルスであり、脂肪肝などの代謝異常も誘発することが知られている。HCVのウイルスの病原性発現機構は依然として不明な点が多いが、その一因は病態解析に有用な小動物モデルが確立していないことにある。そこで、HCVモデルマウスとして、HCV全長遺伝子を発現するトランスジェニックマウス（HCV増殖マウス）と、HCVの感染成立が期待されるHCV感染感受性マウスの作成を行った。

B. 研究方法

遺伝子発現系としてRNA polymerase (Pol) Iのpromoter/terminatorを用いてトランスジェニックマウスを作成した。このマ

ウスでHCV RNAコピー数、Coreタンパク質に対する抗体染色、ウイルス粒子の産生、6あるいは12ヶ月齢のマウスでの病態観察を行った。

一方、HCV感染感受性マウスとして、Albuminプロモーター下でヒトCD81, occludin (OCLN)を発現するノックインマウスと、Irf7ノックアウトマウスの交配を繰り返して作成した。

（倫理面への配慮）

本研究のマウス作成では、浜松医科大学の組換えDNA実験安全委員会、動物実験委員会、浜松医科大学学長の承認を得て行った。動物愛護の精神に基づき、予め詳細な実験計画を立て、必要最小限のマウスの使用を心がけ、実験中に過度なストレスま

たは痛みを与えないように配慮した。マウスの安楽死法として、頸椎脱臼による物理的な中枢破壊を行った。

C. 研究結果

Pol I promoter/terminator の制御のもと完全長 HCV ゲノムを発現する 17 系統のトランスジェニックマウスの作出に成功した。その内、コピー数の多い 4 系統 (A~D 系統) と、コピー数の少ない 1 系統 (J 系統) を解析のために維持した。本年度は、5 系統の中で HCV ウイルスゲノム RNA を最も高発現した A 系統のマウスを用いて実験を行った。

このマウスは HCV の生活環のうち、ウイルス複製、粒子産生及び放出過程を解析できる可能性があるが、実際に HCV タンパク質、ウイルス粒子が産生されているかを調べた。Pol I promoter は各組織でユビキタスに働くにも関わらず、HCV タンパク質は肝臓で最も高発現した。これにより、HCV 産生において肝臓選択的な調節因子が関与することが示唆された。血中の HCV レベルは慢性 C 型肝炎患者と同等であり、血中ウイルスの感染性は Huh7.5.1 培養細胞での感染実験で示された。

また、最近承認された C 型肝炎治療薬 (NS5A 阻害薬、BMS-790052) をこの HCV 増殖マウスに投与したところ、投与後 24 時間で血中 HCV レベルの顕著な低下が観察された。本マウスモデルが治療薬の評価に有用であることが示された。

この HCV 増殖マウスでは、ALT/AST 値は正常であり肝臓の炎症は認められないものの、興味深いことに生後 6 ヶ月から肝臓

での脂肪の蓄積が観察され、加齢とともにその脂肪変性は進行した。

本年度中に多くの交配を繰り返して HCV 感染感受性マウス (Alb-hCD81-hOCLN;Irf7^{-/-}) を作成できた。

D. 考察

HCV 増殖マウスはウイルスゲノム複製と、感染性ウイルス粒子産生能力を持ち合わせている。マウスの有用性の確認にはさらなる解析が必要である。CRISPR ゲノム編集法による RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (NS5B RdRp) 遺伝子領域に変異を挿入したコントロールマウスの作成、コピー数と症状の関係、Alb-hCD81-hOCLN;Irf7^{-/-}マウスへの感染実験などを次年度に行う予定である。

E. 結論

作出した HCV 増殖マウスは、HCV 感染症解析の有用なモデル動物として使用することが期待できる。HCV 産生肝細胞における代謝およびシグナル伝達の異常と、HCV に関連した異常を治療する薬剤の開発の研究に生かせると考えられる。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Pol I-transcribed hepatitis C virus genome RNA replicates, produces an infectious virus and leads to severe hepatic steatosis

in transgenic mice. Biomedical Research,
in press.

2. 学会発表

- ① 三浦直行、則武秀尚、小林良正、梶村春彦、TGF α 、c-MYC、変異型CTNNB1遺伝子はHep3B腫瘍の性状を異なった状態にする、第21回肝細胞研究会、2014年6月27日・28日、東京
- ② 則武秀尚、Amin Mohammed、呉一心、佐藤英二、上里忠良、梶村春彦、三浦直行、TGF α 、c-MYC、変異CTNNB1遺伝子、およびその組み合わせはHep3B腫瘍の性状を異なって調節する、第66回日本

細胞生物学会大会、2014年6月11日～13日、奈良

- ③ Mohammad Islam, Keisuke Hikosaka, Hidenao Noritake, Mohammed Amin, Mohammad Uddin, Eiji Sato, Takaji Wakita, Naoyuki Miura. The HCV genome transgenic mice produce an infectious virus particle and lead to severe steatosis in liver. 第37回日本分子生物学会、2014年11月25日～27日、横浜

H. 知的所得権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 26 年度）

肝炎ウイルスの複製増殖および病原性発現機構と薬剤感受性の解析

分担研究者：名古屋市立大学大学院医学研究科病態医科学 飯島沙幸
研究協力者：名古屋市立大学大学院医学研究科病態医科学 田中靖人

分担研究課題：HBV キメラウイルスを用いたウイルス複製機構解析

研究要旨：HBV 感染の予後判断の基準の一つとして患者体内の HBV ゲノムコピー数が用いられているが HBV ウイルス複製の機序の詳細は明らかでないため指標として不十分である。本研究では主に HBV 複製に関与するウイルス側要因を中心に解析を行い、臨床現場に寄与可能な情報を得ることを目的とする。

HBV 複製効率に影響する HBV ゲノム内領域を抽出するため、ウイルス複製効率の高い遺伝子型 C と低い遺伝子型 A のゲノム配列を入れ替え、キメラウイルスを作製しウイルス複製解析を行った。その結果コアプロモータ配列後半領域のキメラウイルスで著しいウイルス複製の増強が確認され、この領域がウイルス複製に重要であることが示唆された。

A. 研究目的

HBV 感染による B 型肝炎の予後判断には患者血中の HBV ゲノム DNA コピー数が指標の一つとなっているが、HBV のウイルス複製の機序の詳細は明らかではなく、複製に関与するウイルス側要因と宿主側要因を明らかにすることは治療の側面からも重要である。

HBV は塩基配列の 8% の差異で決定される「遺伝子型」が報告されているもので 9 タイプ存在し (Genotype A-H, J)、世界的に遍在していることが確認されている。各遺伝子型でウイルス複製効率やウイルス蛋白発現量が異なり、それらと関連して病態進行が異なることが知られている。日本の HBV 感染患者ではウイルス複製効率の高い遺伝子型 B, C の割合が高い。一方で 2000 年以後国内の B 型急性感染成人例で感染例が増加し問題となっている遺伝子型 A はウイルス複製効率が低く、慢性化しやすい特徴がある。本研究ではこれらの遺伝子型の差異を利用し HBV 複製メカニズムに関わるウイルス側因子の解析を試みた。

臨床例の解析等から、ウイルス複製効率に重要とされる HBV ゲノム領域は主に (i) コアプロモータ領域 (CP: nt1575-1849) (ii) プレコア領域 (PreC: nt1814-1901) (iii) コア領域 (nt1902-2448)、の三つである。この領域に注目し、複製効率の低い遺伝子型 A をベースに複製効率の高い遺伝子型 C ゲノム配列と入れ替え、A/C キメラクロンを作製した。このキメラクロンのウイルス複製効率を解析し、複製効率に関与する HBV ゲノム配列部位 (cis-element) の絞り込みを行った。

B. 研究方法

複製効率の低い遺伝子型 A の中で Ae_US clone を選択し、これをベースに複製効率の高い遺伝子型 C の C_AT clone ゲノム配列と組換えを行った。(i) CP 領域を前後に分け (a) CP 全域 : CP mutant (b) 前側 nt1413-1630: EnhII-BCP mutant (c) 後ろ側 : nt1605-1814 BCP mutant の各領域を入れ替えた三つのキメラウイルスを作製した。また (ii) プレコア領域のゲノム配列入れ替えを行い、この部位のキメラウイルスを作製した。これらのクローンを Huh7 細胞にトランスフェクシ

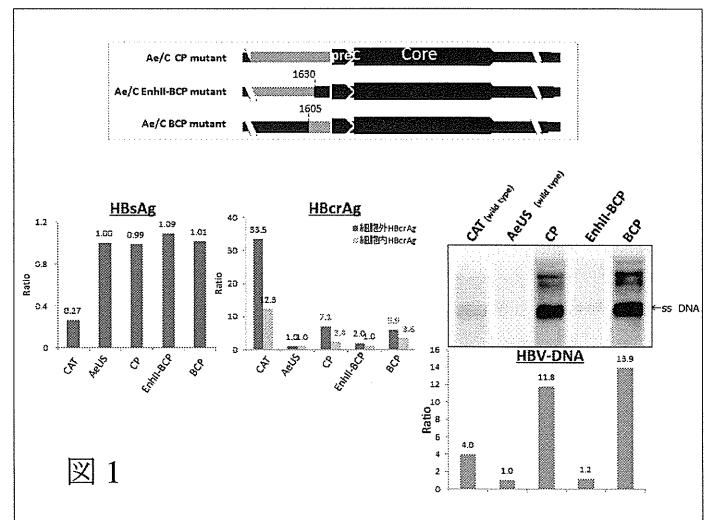


図 1

ョンし、72 時間後サンプルを回収した。培養上清中の S 抗原 (HBsAg) 量, Core 関連抗原 (HBcrAg) 量と細胞内の HBcrAg 量を ELISA 法にて測定し、ウイルス複製効率を比較するためサザンブロット法にて core 粒子内の HBV-DNA を検出した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。

C. 研究結果

野生型 Ae_US クローンと作製した A/C クローン間で上清中 HBsAg 産生量に殆ど差は認められなかった。一方培養上清中・細胞内 HBcrAg 量は CP, BCP mutant の双方で野生型 Ae_US より増加が確認された。また HBV-DNA 量は HBcrAg 量同様に CP, BCP mutant で著しく増加し野生型 Ae_US の 10 倍前後検出された (図 1)。配列置換部位からウイルス複製に重要な部位が CP 領域の後半部位:nt1605-1814 に存在することが示唆され、複製効率に関わる配列部位を絞り込むためこの領域の点変異体キメラウイルスを網羅的に作製し解析を行った。しかし各キメラウイルスでウイルス複製効率の変動は認められなかった。

次に(ii)プレコア領域(PreC:nt1814-1901)のキメラウイルスを作製しウイルス複製解析を行った。この領域は pregenomic RNA が Core 粒子内に取り込まれる際に必須の NRA 二次構造であるイプシロンループが存在する。この領域の A/C キメラウイルスでは複製への影響は認められず、野生型 Ae_US クローンと同様の結果となった。

D. 考察

キメラウイルスの解析結果を総合するとウイルス複製に重要な領域が nt1605-1773 に存在することが示唆される。また、点変異体の解析結果から、各部位が独立して機能しているのではなく、いくつかの領域が協同して機能している可能性が考えられた。

培養細胞ウイルス産生系において細胞内 HBcrAg 量はウイルス複製に相関する傾向

にあり (Sugiyama et al., 2006)、HBcrAg 産生量がウイルス複製の何らかの律速段階と関連するとも考えられる。しかし今回作製した CP mutant, BCP mutant では①HBcrAg 量の増加率以上のウイルス複製の増強が確認され、②野生型 Ae_US、C_AT clone 以上の複製効率を示した。①の結果から、このキメラウイルスの複製では HBcrAg 産生以外のウイルス側因子の関与がの可能性が考えられる。また②の結果より、Ae_US 配列内に新たに形成された塩基配列は従来の機能の著しい増強 (あるいは複製増強に関わる新たな機能の獲得) をしたと推測される。

プレコア領域内のイプシロンループは構造シミュレーション解析の結果、遺伝子型 A と遺伝子型 C の塩基配列を入れ替えても構造に影響はほとんどないことが確認された。Core 粒子への RNA パッケージングは重要なステップであるのでこの領域は遺伝子型間で保存性が高く複製への影響は低いと考えられる。

E. 結論

遺伝子型の塩基配列の入れ替えにより複製効率に著しい影響が生じたため、ウイルスゲノム配列に直接的にかかわる HBV 複製のメカニズムが存在し、その配列領域は CP 領域内の後半 nt1605-1773 内に存在することが示唆された。今後はこの領域の機能的意義を明らかにするため、ウイルスのライフサイクルのどの段階に影響するか解析を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表