

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：森石恆司 山梨大学医学部 教授

分担課題名：ウイルス及び宿主因子を標的にした抗 HCV 剤の探索と開発

研究要旨：C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する DAA が登場し、高い SVR 率が現実のものとなってきたが、副作用の問題、耐性ウイルスの出現、ウイルス排除後の肝発がんなどの課題もあり、新規抗ウイルス剤や C 型肝炎疾患に対する治療薬の開発が今後も必要である。HCV 増殖および肝発癌に STAT3 の活性化が必要であることが報告されており、抗ウイルス剤および発癌阻止化合物としての標的分子の一つとして STAT3 が考えられる。本年度、HCV 予防治療薬候補として STAT3 リン酸化を抑制する TyrphostinA490 とその誘導体を検討した。TyrphostinA490 およびその誘導体 30 化合物の抗 HCV 効果スクリーニングした結果、HD31 が高い抗 HCV 効果を示した (EC50:1.5-5.2 μ M, SI:11.2-90.7)。遺伝子型 1b, 2a, 3a, 4a のレプリコン細胞に対して抗 HCV 効果が認められ、HCVcc 増殖も抑制した。また、HD31 の抗 HCV 活性は IFN 活性に依存しておらず、IFN および Daclatasvir に対して相加・相乗効果が認められた。さらにレプリコン細胞において、IL6 による STAT3 の Y705 に対するリン酸化を HD31 は抑制した。以上の成果から、HD31 は抗 HCV 効果および STAT3 活性化抑制効果をもつことが示唆され、抗 HCV 剤および抗発癌剤候補として期待される。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルスは、国内で約 200 万人に感染していると推定されている。高率に持続感染に移行し、慢性肝炎から肝脂肪化、肝硬変を経て、肝細胞癌を発症させ、本邦の肝がん死亡者の約 7 から 8 割は、HCV 感染に起因すると考えられている。抗 HCV 剤の開発が進み高い SVR 率が期待できるようになってきた反面、ウイルス排除後に肝がんに至る場合や耐性ウイルスの出現、副作用の問題などが解決されていない。また、高額な抗 HCV 剤治療費も負担となっており、より安価な抗 HCV 剤開発が求められている。肝線維化が進行した患者に対するウイルス排除の意義についても検討が必要である。

フラビウイルス科に属する HCV のウイルスゲノムにコードされている単一のポリプロテイン前駆体は、宿主およびウイルスプロテアーゼによって切断を受け、10 個のウイルス蛋白質としてそれぞれが機能する。C 末端側の領域に非構造蛋白質がコードされ、ウイルスゲノム複製に機能する。ウイルス複製過程で重要なウイルス蛋白質が薬剤標的となっており、NS3 に対する抗プロテアーゼ剤などが開発されてきた。複製複合体の一分分の

ウイルス蛋白質 NS5A はウイルス複製に必須の非構造蛋白質の一つである。それを標的にした化合物 Daclatasvir は非常に低濃度 (pM レベル) で抗 HCV 効果を発揮することが知られている。

本年度は、単なる抗ウイルス剤候補の化合物探索ではなく、抗発癌作用もあわせもつことが期待できる化合物同定を目指した。その薬剤標的分子候補の一つとして STAT3 が考えられる。STAT3 活性化 (Tyr705 番目のリン酸化) は JAK などのチロシンリン酸化酵素によって活性化され、HCV 増殖および発癌に関与していると考えられている。また、感染によって STAT3 のそのチロシンリン酸化が上昇し、それが tubulin の重合を介してウイルス複製に機能していることも示唆されている。今回、JAK 抑制剤である TyrphostinA490 およびその 30 誘導体の抗 HCV 活性を検討し、STAT3 リン酸化への影響も解析した。

B. 研究方法

遺伝子型 1b の N 株、遺伝子型 2a の JFH1 株、3a の S52 株、4a の ED43 株のサブゲノムレプリコン細胞を用いて、各化合物の抗 HCV 活性を検討した。Bicistronic に発現するルシフェラーゼ活性

を測定し、抗HCV効果を評価した。また、細胞毒性は、MTSアッセイを用いた。JFH1によるHCVccに対する抗HCV活性は、real time RT-PCRによってウイルスゲノムを定量し、検討した。脂溶性を示すClogP値はChem Bio Office Ultra 2008によって求めた。各化合物は既報の方法によって合成し、DMSOに溶解し、使用時に培養液に添加した。インターフェロン誘導能を検討するため、ISGに対するRT-PCRを行った。本実験で用いた化合物に対する既存抗HCV剤との併用効果をisobologramによってプロットし、さらにCalcuSynによってCombination Indexを求めた。また、IL6刺激によるSTAT3活性化に対する効果をWESTERN BLOTTINGで検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し山梨大学医学部倫理委員会規程に従って承認を得た。インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報に厳格に管理、保存した。動物実験は、山梨大学動物実験規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。遺伝子組み換え実験は、山梨大学遺伝子組み換え実験安全管理規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。放射線及び放射性同位元素を扱う実験は、山梨大学総合分析実験センター放射線障害予防規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。

C. 研究結果

Tyrphostinはケイヒ酸の基本構造にシアノ基とアミド結合隣接残基をもつもので、チロシンリン酸化酵素の特異的抑制剤群として知られている。Tyrphostin AG490およびその誘導体を用いて、1bおよび2aレプリコン細胞に対する抗HCV効果を検討した。その結果、カテコール基の水酸基数と位置が重要で、シアノ基の有無は抗HCV活性に重要ではなかった。アミド結合残基は単純な直鎖で炭素数8のものが一番活性が強かった。結局、カテコール基をもつシアノ基がない炭素数8のアミド結合隣接側鎖をもつHD31が高い抗HCV活性を示していた。HD31は遺伝子型1b, 2a, 3a, 4aのレプリコン細胞に対して抗HCV効果が認められ、HCVccの複製も同様に抑制し、EC50が1.5-5.2 μ M、SI値が11.2-90.7を示した。

Dactalavirおよびインターフェロン(IFN)に対して相加あるいは相乗作用を示し、Telaprevirに対してアンタゴニスト作用を示した。レプリコン細胞においてIL6刺激によるSTAT3のTyr705のリン酸化をHD31は抑制したことから、HD31は抗発癌作用も併せ持つことが期待された。

D. 考察

HD31は抗HCV効果およびSTAT3活性化抑制効果をもつことが示唆され、ウイルス排除および抗発癌剤として期待される。HD31によるSTAT3活性化とウイルス複製との関連性およびその抗HCV作用機構について、次年度検討する計画である。

E. 結論

Tyrphostin誘導体HD31は抗HCV剤化合物候補および抗発がん剤候補として期待された。今後、HD31の作用機序解明およびさらなる構造展開による抗HCV活性の検討は、新規HCV予防治療開発の進展に寄与するものと考えられる。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1 論文発表

- ① Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K: Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus. *J. Virol.*, 88: 13352-13366, 2014
- ② Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tani H, Roy SR, Tanaka J, Tsubuki M, Akimitsu N: PBDE: Structure-Activity Studies for the Inhibition of Hepatitis C Virus NS3 Helicase. *Molecules*, 19: 4006-4020, 2014
- ③ Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H: EFdA, a Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 Ex Vivo Infection of Langerhans Cells within

Epithelium. *J. Invest. Dermatol.*, 134: 1158-1161, 2014

- ④ Furuta A, Salam KA, Hermawan I, Akimitsu N, Tanaka J, Tani H, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Peng PW, Suzuki Y, Yamamoto N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N: Identification and biochemical characterization of halisulfate 3 and suvanine as novel inhibitors of hepatitis C virus NS3 helicase from a marine sponge. *Mar. Drugs*, 12: 462-476, 2014
- ⑤ Allen SJ, Mott KR, Matsuura Y, Moriishi K, Kousoulas KG, Ghiasi H: Binding of HSV-1 Glycoprotein K (gK) to Signal Peptide Peptidase (SPP) Is Required for Virus Infectivity. *PLOS one*, 9: e85360, 2014

2. 学会発表

- ① Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, and Moriishi K, Infection of equine hepacivirus in a closed colony of Japanese native horse, The 21st International meeting on Hepatitis C virus and related viruses. 2014.9.7-11, Banff, Canada.
- ② Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, and Moriishi K, Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, 2014, 9. 3- 6. Los Angeles, USA.
- ③ 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

- ④ 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
- ⑤ 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
- ⑥ 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
- ⑦ 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
- ⑧ 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

H. 知的所有権の出願・登録状況特になし。

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：森川賢一 北海道大学医学部 助教

分担課題名：肝炎ウイルスによりハイジャックされる宿主因子とウイルス発癌の解析

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）およびC型肝炎ウイルス（HCV）は、宿主免疫からの逃避および慢性感染化、自身の効率よい複製や宿主との共存のために感染細胞内の細胞性因子や各種シグナル経路を再構築することが知られている。そして、慢性肝炎から肝硬変へと進展し肝細胞癌の発症を促進する。本研究はHBVおよびHCVの肝炎ウイルスにおいて、DNA damage-binding protein 1 (DDB1)およびT-cell protein-tyrosine phosphatase (TC-PTP)といった宿主細胞性因子の肝発癌における関与とその病原性発現機構を分子レベルで解明し、宿主因子をターゲットにした新たな抗ウイルス肝癌薬開発へと発展する基礎形成を目的とする。

A. 研究目的

肝炎ウイルス感染は、高率に持続化し慢性肝炎から肝硬変、肝臓癌に至る疾患を引き起こす。現在HBV治療は逆転写酵素阻害剤の導入により、HCV治療はインターフェロン、リバビリンおよび直接作用型抗ウイルス剤の併用療法の進歩によって抗ウイルス療法が可能となったが、薬剤耐性ウイルスの出現や副作用、患者選択基準など課題は多く残されている。現在小児期にHBVワクチン投与をしていない我が国では新規HBV感染者数が増加し続けており、今後肝発癌への移行も憂慮されている。他方HCVでは患者全体が高齢化し肝硬変へと進展してきており、肝発癌が問題となっている。一旦肝癌を発症した場合、ラジオ波焼灼術等の局所療法、経カテーテル的肝動脈塞栓術、動注化学療法、経口抗癌剤などの化学療法があるが、肝癌発生母地である肝臓自体の機能が低下している点と高再発率などの理由により制御が難しく高率に死に至る。そのため本研究はウイルス発癌における細胞性因子、特にDDB1およびTC-PTPに着目し、その関与と病原性発現機構を分子レベルで解明し、宿主因子をターゲットにした新たな抗ウイルス由来肝細胞癌薬開発へと発展する基礎形成を目的としている。

B. 研究方法

DDB1およびTC-PTPを中心とした細胞性因子のウイルス肝癌発生への関与を解析する。

A. 培養細胞で選択的にHBVおよびHCV蛋白発現調節可能細胞株の作成

B. SILAC法またはiTRAQ法にて標識を行い、DDB1およびTC-PTPのみでなく蛋白発現量変化を網羅的・半定量的にプロテオーム解析することによりウイルス蛋白により調整される新規宿主蛋白を同定し解析する。

C. DDB1およびTC-PTPを含む候補蛋白の抽出

D. DDB1 および TC-PTP を中心とした同定蛋白の機能解析

平成26年度

A. HBVおよびHCV全長蛋白発現調節可能細胞株の作成

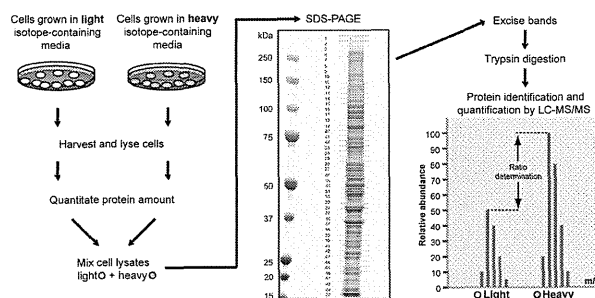
テトラサイクリントランスアクチベーター（tTA）を利用したTet-offの系を利用し、U2-OS細胞株またはHuh7細胞株を元にHBVおよびHCV全長蛋白を下流にもつプラスミドを発現調整可能な安定細胞株を樹立する。これらの細胞株は、培養上清のテトラサイクリンの有無によりHBV、HCV蛋白の発現を厳密に制御する事が可能となる。

平成26-27年度

B. SILAC法によるプロテオーム解析および候補蛋白の抽出

テトラサイクリンによりHBVおよびHCV全長蛋白質の発現調整を制御する。同細胞株を培養液中のテトラサイクリンの有無により、HBVおよびHCV全長蛋白非発現群と発現群に調整する。また同時に両群をSILAC法により標識するため一方を通常の培養液で、もう一方を標識アミノ酸含有培養液で細胞培養を行う。継代を繰り返す事により標識アミノ酸が天然の細胞内合成経路により蛋白質中に導入される。

<SILAC法の概要>



両方の細胞から蛋白質を抽出し等量ずつ混合したのちSDS-PAGEにて分離し、ゲルの各バンドをトリプシン消化して質量分析計により分析を行う。通常アミノ酸および標識アミノ酸でラベルされたペプチドは化学的に同一であるため、逆相クロマトグラフィーにおいて同時に溶出され、同時に質量分析される。得られた質量分析スペクトルにおける、通常および標識蛋白質に由来するペプチドのピーク強度の比率から、実験サンプル中の蛋白質の発現量変化を比較定量的に得ることが出来る。質量分析により網羅的・比較定量的に同定した蛋白を組織特異性、細胞内局在、生命情報学的手法を用いて選別を行う。

(倫理面への配慮)

臨床検体、ヒト遺伝子情報を用いた研究における個人情報保護、ならびに検体の使用や保管等に関しては「ヘルシンキ宣言(2008年10月修正)」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成24年2月3日改正)」を遵守して実

施する。

本研究における遺伝子組換え実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく「研究開発二種省令・研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」に準拠し遂行する。

C 型肝炎ウイルスを含む病原微生物の使用に当たっては、国立大学法人北海道大学病原微生物等安全管理規則に基づく実験計画の承認を得ている。

C. 研究結果

- I. B型肝炎ウイルス(HBV)およびC型肝炎ウイルス(HCV)に共通するウイルス発癌因子の同定および解析を行った。
- II. 同定タンパクのクローニングを行い、発現プラスミドを構築した。
- III. 同定タンパクの各種細胞株内での発現量をmRNAおよび蛋白質を比較検討した。

D. 考察

現在ウイルス肝癌の全ゲノム関連解析が行われているが、肝細胞癌発生へのウイルス複製増殖の影響、病原性、薬剤感受性など分子機構の詳細は不明な点が多い。本研究によりウイルス肝癌への細胞性因子の関与を分子レベルで詳細な検討を行う事により、ウイルスの増殖機構への影響や病原性の解析が進展することが期待される。さらに本研究は新たな抗ウイルス由来肝細胞癌薬の開発に直結する。本研究はウイルス肝癌研究領域にブレイクスルーをもたらすことと、ウイルス肝癌に苦しむ患者さんへの貢献が期待できる。

E. 結論

本研究によりウイルス肝癌への細胞性因子を抽出できた。特にDDB1、TC-PTPの関与を分子レベルで詳細な検討を行う事により、ウイルスの増殖機構への影響や病原性の解析が進展することが期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1 論文発表

1. Hiraide A, Hiroishi K, Shimazaki T, Eguchi J, Ishii S, Morikawa K, Sakaki M, Doi H, Omori R, Kajiwara A, Hayashi E, Shiina M, Hirayama Y, Imawari M. Increased expression of immuno-inhibitory molecules on peripheral blood lymphocytes may suppress disease progression in autoimmune hepatitis. *Hepatology Res.* 2015 in press.
2. Tsunematsu S, Chuma M, Kamiyama T, Miyamoto N, Yabusaki S, Hatanaka K, Mitsunashi T, Kamachi H, Yokoo H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Orimo T, Wakayama K, Ito J, Sato F, Terashita K, Nakai M, Tsukuda Y, Sho T, Suda G, Morikawa K, Natsuzaka M, Nakanishi M, Ogawa K, Taketomi A, Matsuno Y, Sakamoto N. Intratumoral artery on contrast-enhanced computed tomography imaging: differentiating intrahepatic cholangiocarcinoma from poorly differentiated hepatocellular carcinoma. *Abdom Imaging.* 2015 in press.
3. 森川賢一, 坂本直哉. 特集 今B型・C型肝炎をどう治療するか C型慢性肝炎の病態・自然経過と発癌. *消化器の臨床.* 2015 Feb; 18(1):53-58.
4. Welsch C, Haselow K, Gouttenoire J, Schneider M, Morikawa K, Martinez Y, Susser S, Sarrazin C, Zeuzem S, Antes I, Moradpour D, Lange CM. Hepatitis C virus variants resistant to macrocyclic NS3-4A inhibitors subvert IFN- β -induction by efficient MAVS cleavage. *J Hepatol.* 2014 Nov 21. pii: S0168-8278(14)00853-8. doi: 10.1016/j.jhep.2014.11.009. [Epub ahead of print]
5. Lange CM, Gouttenoire J, Duong FH, Morikawa K, Heim MH, Moradpour D. Vitamin D Receptor and Jak-STAT Signaling Crosstalk Results in Calcitriol-Mediated Increase of Hepatocellular Response to IFN- α . *J Immunol.* 2014 Jun 15; 192(12):6037-44.
6. Morikawa K, Gouttenoire J, Hernandez C, Dao Thi VL, Tran HT, Lange CM, Dill MT, Heim MH, Donz  O, Penin F, Quadroni M, Moradpour D. Quantitative proteomics identifies the membrane-associated peroxidase GPx8 as a cellular substrate of the hepatitis C virus NS3-4A protease. *Hepatology.* 2014 Feb; 59(2):423-33.

2. 学会発表

<国際学会 : Poster presentation >

1. Shimazaki T, Date T, Gouttenoire J, Quadroni M, Moradpour D and Morikawa K. THE

HEPATITIS B VIRUS MODULATES CELLULAR FACTORS IN THE DIRECTION OF SLOWDOWN OR STOP CELL CYCLE AND PROLIFERATION. The 11th JSH Single Topic Conference. Hiroshima, Japan, 20-21 Nov 2014.

2. Tran HT, Morikawa K, Rose Z, Dao Thi VL, Penin F, Heim MH, Donz  O, Quadroni M, Gouttenoire J, Moradpour D. Identification of OCIAD1 as Cellular Substrate of HCV NS3-4A Protease. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Boston, USA, 7-11 Nov 2014.
3. Tran HT, Morikawa K, Rose Z, Dao Thi VL, Penin F, Heim MH, Donz  O, Quadroni M, Gouttenoire J, Moradpour D. Identification of OCIAD1 as Cellular Substrate of HCV NS3-4A Protease. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, 7-11 Sep 2014.

<国内学会 : Oral presentation >

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 森川賢一, 島崎とも江, 吉田 仁. プロテオミクスによる宿主因子を標的とした肝炎ウ

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.

<国内学会：Poster presentation>

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

H. 知的所有権の出願・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：八木清仁 大阪大学大学院 教授

研究協力者：近藤昌夫、渡利彰浩、清水芳実、飯田愛未、川東祐美

分担研究課題：ヒト iPS 細胞を利用した HCV 侵入・複製に関わる宿主側因子の探索と治療薬候補物質の評価

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の肝細胞における感染・複製機構の解析はC型肝炎克服に向けた最重要課題であるものの、既存のヒト肝細胞初代培養系は利便性・汎用性に乏しく、依然としてヒト肝がん細胞株を用いた解析が主流となっている。またHCV治療薬であるインターフェロンは高額なものであり、より安価な治療薬の開発が求められる。本研究では、ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いてHCVの感染・複製を解析し、本細胞のHCV研究への応用の可否を検証すると同時に新たなHCV創薬ターゲットを同定すること、およびより安価に製造可能な新たなHCV治療薬候補分子を見出すことを目的とする。

また上記に加えHBVの感染・複製機構の解析を目的としてHBV受容体として同定されたNTCPの特異抗体作製を試みている。HBVの感染機構を解析するうえでNTCP抗体の取得は必須であるがHBVの侵入阻害活性を有する抗体は皆無である。平成26年度よりHCV受容体のclaudin-1抗体取得の際に成功したDNA免疫法を用いてNTCP特異抗体の作製を開始した。本実験は国立感染症研究所細胞化学部の深澤征義博士との共同研究として行った。

A. 研究目的

我が国には200万人余りのHCV感染者がいると推定されており、肝癌の80%はHCV感染者が占めている。現在HCV治療法のゴールドスタンダードとしてインターフェロン・リバビリン併用療法が実施されているが、難治性Ib型ウイルスの高ウイルス量患者に対する奏功率は50%に過ぎないこと、薬剤耐性ウイルスが出現しやすいこと、副作用発現により治療の中断を余儀なくされる患者がいることが臨床的大きな問題となっている。2005年感染研脇田らによりヒト肝癌細胞株を用いた2a型HCVの培養系が樹立され、HCV複製機構の解析およびHCVワクチン開発の端緒となったものの、依然として難治性Ib型HCVの培養系開発は立ち遅れている。肝細胞

は増殖性に乏しい上に培養系では急速に肝細胞としての性質を消失すること、多能性幹細胞からの肝細胞分化誘導系が構築されていないことから、ヒト肝細胞を用いたHCV感染・複製評価研究はヒト肝癌細胞株やヒト肝臓キメラマウスを利用したアプローチしか無く、ここにHCV研究の難しさがあると言える。

研究協力者水口裕之博士は、自身が代表を務める先端医療開発特区（スーパー特区）『ヒトiPS細胞を用いた新規in vitro毒性評価系の構築』において、独自の遺伝子導入技術を駆使したヒトiPS細胞の肝細胞分化誘導法開発を推進し、世界最高水準の肝細胞分化誘導法を確立している。また、当研究グループでは、in vitro・in vivoにおいて高い遺

伝子導入効率を有し、汎用性・利便性に優れたアデノウイルスベクターを用いて HCV ゲノム導入ベクターシステムを開発している。これまでの研究では水口裕之教授グループが確立したヒト iPS 細胞由来肝細胞誘導系を用いて、初発のヒト iPS 細胞から内胚葉細胞、肝幹前駆細胞を経由し肝細胞へ至る分化過程における HCV 感染能、複製能の変化を明らかとするため、HCV シュードタイプウイルス (HCVpv) による感染能解析、及び当研究グループで開発した HCV サブゲノム発現アデノウイルスベクターによる HCV 複製能解析を実施した。その結果、HCVpv の感染はヒト iPS 細胞、内胚葉細胞、肝幹前駆細胞の段階で観察されず、最終段階の iPS 細胞由来肝細胞のみで成立した。一方、HCV サブゲノムの複製は内胚葉細胞の段階から観察され、分化誘導の初期に HCV ゲノム複製能が獲得されることが示唆された。平成 25 年度から、新たな抗 HCV 薬創製におけるターゲット分子の創出に向けて、iPS 細胞由来肝細胞の各分化段階における遺伝子発現をアレイ解析することで、HCV 感染能、複製能に関わる新規宿主因子の同定を試みている。平成 26 年度は最終段階の iPS 細胞由来肝細胞で特に発現が上昇する遺伝子について絞り込みを行い、候補遺伝子について考察した。

また平成 26 年度から HCV と同様に多数の感染者が存在する HBV の感染・複製機構の解析を目的として、細菌 HBV の受容体として注目を集めている Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) の特異抗体の取得を開始している。NTCP は肝細胞において胆汁酸の取り込みを行っているトランスポーターと知られており、2012 年 HBV の受容体として機能していることが明らかとなった。これまで HBV の侵入を阻止する抗 NTCP 抗体は作製されていない。そこで本研究では当研究グループにおいて

HCV 受容体の claudin-1 抗体取得の際に成功した DNA 免疫法を用いて NTCP 特異抗体の作製を開始した。

B. 研究方法

B.2 hNTCP 抗体産生ハイブリドーマの樹立に向けた検討

B.2.1 免疫

hNTCP 発現プラスミドをマウス (BXSJ) 皮下に投与した。皮下免疫は、2 週間ごとに 10 週間継続した。その後、眼底採血により抗血清を採取した。フローサイトメトリー (FCM) 解析により、免疫マウス血清中の抗体価を測定した。抗体価上昇が観察された個体に対し、最終免疫 (ブースティング) を行った。

B.2.2 マウス抗血清を用いた ELISA

96 well plate に、hNTCP 発現プロテオリポソームを加え、4℃で一晩反応させた。その後、TBS-T で 3 回洗浄後、5% skim-milk/TBS-T、室温で 1 時間処理して Blocking を行った。次に TBS-T で 3 回洗浄後、マウス血清を原液で室温 1 時間処理した。TBS-T で 3 回洗浄後、goat-抗-mouse IgG-HRP 抗体 (Jackson) を室温 1 時間処理した。3 回 T-TBS で洗浄後、基質である TMB を加え、室温で 30min、反応させた。2M H₂SO₄ 液を 50ul 加え、プレートリーダーで吸光度を測定し、血清の結合性を評価した。ポジティブコントロールとして、市販のウサギ抗 hNTCP 抗体 (Abcam) を用いた。

B.2.3 マウス抗血清を用いた HBV 感染阻

害アッセイ

48well plate (Corning) に、HepG2 細胞およびHepG2-hNTCP-FLAG 細胞を 5×10^4 cells/well 播種し、2 日間培養した。マウス免疫血清を、50 倍希釈し、3 時間前処理した後、Hep2.2.15.7 由来の HBV を、37°C で 16 時間感染をかけた。PBS で 3 回洗浄したのち、genomic DNA を Blood/Cultured Cell Genomic DNA Extraction Kit (Farvogene) で回収し、HBV コア特異的プライマーで細胞表面上の HBV 量を評価した。

B 2.4 細胞融合

最終免疫後、in-house 細胞融合プロトコルに従い、マウス (Ms05, 07, 08, 11) からリンパ細胞を回収し、マウスミエローマ細胞 (P3U1) と細胞融合を行った。融合後の細胞を 96well plate 10 枚に播種し、培養培地 1*にて 8 日間、37°C、10% CO₂ 下で培養した。培養後、顕微鏡にてプレートを観察した。その後、培養上清を回収した。フローサイトメトリー (FCM) 解析によりハイブリドーマ中の抗体価を測定した

* 培養培地 1 : D-MEM (Wako, 044-29765)+10%FCS (Hyclone), 10% BM condimed H1 Hybridoma cloning supplement (Roche, 1088947), 1XHAT supplement (Invitrogen, 21060017), 1× Penicillin/Streptomycin (Wako, 168-23191), 1 × L-Glutamine (Wako, 073-05391)

(倫理面への配慮)

ヒト iPS 細胞の使用に際し大阪大学のヒト

ト組織・ヒト初代培養細胞研究審査を受け、承認されている。

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞由来細胞の各分化段階における発現遺伝子の解析

これまでの解析により、ヒト iPS-hep 細胞は HCV 感染受容体 (CD81, SR-BI, claudin-1, occludin) を発現していること、HCVpv の感染は内胚葉細胞、肝幹前駆細胞の段階で観察されず、最終段階の iPS-hep 細胞でのみ成立すること、HCV レプリコンの複製は内胚葉細胞の段階から発現が見られ、分化誘導の初期に複製能を獲得することが明らかとなった。ヒト iPS 細胞由来細胞の各分化段階であるヒト iPS 細胞、ヒト iPS 細胞由来内胚葉細胞、ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞、ヒト iPS-hep 細胞 (分化直後、および分化より 15 日間培養後) における遺伝子発現のマイクロアレイ解析を行った。

その結果を受けて、HCV 侵入活性と同パターンで発現が上昇する遺伝子群を絞り込み検討を行った。Table 1 に遺伝子名を示す。HBA1, 2, IGFBP1, HBB についてはヒト初代肝細胞での発現が低いこと、CES1, AADAC, HRG は既に HCV との関連が報告されていたことより候補から除外した。F5, F9 は血液凝固因子、CYP2C9, CYP3A4 は薬物代謝酵素、SLC2A2 はグルコーストランスポーターである。CYP2C9, CYP3A4 は HCV の侵入に関与する可能性は低い。HBV の受容体として同定された NTCP は solute carrier family のメンバー (SLC10A1) で胆汁酸の取り込み機能を有していることから SLC2A2 が HCV の侵入に関与していることも考えられる。またアデノウイルスの感染に血液凝固因子が必要であることが報告されている。F9 がアデノウイルスの fiber knob と結合し、肝細胞表面

のヘパラン硫酸プロテオグリカンと bridge を形成して肝細胞への指向性をもたらしている。アデノウイルスは非エンベロープ型ウイルスで HCV とは表面性状が異なるが、血液凝固因子が HCV 侵入に関与する可能性はあると考えられる。

2.1 hNTCP 安定発現 HepG2-hNTCP-FLAG 細胞の樹立

2.1.1 HepG2/NTCP-FLAG 細胞及び HepG2 cell lysate ウェスタンブロット解析

WB 解析の結果 HepG2/NTCP-FLAG 細胞ライセートをアプライしたレーンにおいて、50kD 付近に糖鎖が付加した NTCP と推測される特異バンドを検出した (Figure1)。以上より、供与された HepG2/NTCP-FLAG 細胞において NTCP が発現していると考えられる。

2.1.2 HepG2 - h NTCP-FLAG 細胞及び HepG2 細胞 免疫染色解析

免疫染色の結果、HepG2-hNTCP-FLAG 細胞において、hNTCP が極性を持って発現していることが分かった。また親株の HepG2 細胞では、全く染色像が見えず、空ベクターのみを導入した HepG2 細胞では染色像は非特異的に観察された (Figure 2)。

2.1.3 HepG2-hNTCP-FLAG 細胞及び HepG2 細胞を用いたトランスポーター活性の評価

hNTCP の基質である Taurocholate を用いてトランスポーター活性を評価した。その結果、親株の HepG2 細胞では全く取り込みが止められなかった。それに対し、hNTCP 遺伝子を安定発現した HepG2-hNTCP-FLAG

細胞では、共輸送体ナトリウムイオンの非存在下では取り込み活性が全く確認されないが、ナトリウムイオン存在下では、有意な基質の取り込みが確認された (Figure 3)。

2.2 マウス抗 NTCP 抗体樹立に向けた検討

2.2.1 hNTCP に対するマウス血清中の抗体価の評価

FCM によってマウスの抗血清解析を行なったところ、複数のクローンにおいて、微弱ながらシフトが確認された。(Figure4、Figure5)

2.2.2 プロテオリポソームを用いたマウス抗血清の結合性評価

免疫した抗血清を用いて、プロテオリポソームへの結合性を評価した。その結果、いくつかの抗体で市販の NTCP 抗体と同等か、それ以上の反応性を示すものがあつた (Figure 6)。

2.2.3 マウス抗血清をもちいた HBV 感染阻害の評価

免疫した抗血清を用いて、細胞表面への HBV の結合阻害活性を評価した。その結果、アッセイに用いた抗血清全てで、HBV の感染阻害活性が確認できた (Figure 7)。

D. 考察

iPS細胞から iPS-hep細胞に至る分化段階の最終段階においてHCV侵入が観察され、同パターンで発現が著しく上昇する遺伝子を検索し、血液凝固因子F5, F9、グルコーストランスポーターSLC2A2が候補として抽出された。今後、ノックダウン実験等によりHCV侵入に必須な宿主因子であるか否かを検証

していく必要がある。HCV複製能に関しては分化初期の段階から上昇が見られており、同パターンで発現上昇がみられる33遺伝子が抽出されてきている。この中には3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMGCS)、asialoglycoprotein receptor (ASGR2)などHCVとの関連が示されている遺伝子が含まれている。HCV複製に必須な宿主因子に関しても今後絞り込みを行う予定である。

NTCPは9回膜貫通蛋白質で肝特異的に発現するナトリウムタウロコール酸共輸送ペプチドで2012年HBVの受容体として機能することが報告された。iPS細胞からiPS-hep細胞までの分化段階で発現パターンを見ると、肝幹前駆細胞までは発現が見られず最終のiPS-hep細胞で初めて高発現していた。この結果よりHCVと同様にHBVに対しても肝細胞への分化の最終段階で侵入能を獲得することが予想される。本研究の目的はHBV侵入を阻害可能なN抗TCP抗体の作成であるが9回膜貫通蛋白であるNTCPの細胞外の領域は短い。したがって細胞外領域を認識する抗体の取得は困難が予想された。当研究グループでは4回膜貫通蛋白でHCVの受容体として機能するヒトclaudin-1に対する抗体の作成にDNA免疫法を用いて成功している。そこで同様の方法を用いて抗体作製を開始し、得られたマウス抗血清で種々検討を行った。その結果、抗HBV侵入活性を示した血清が得られ、引き続きモノクローナル抗体取得を開始したが安定なクローンを得ていない。次年度は引き続き抗ヒトNTCPモノクローナル抗体作製の検討を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

八木清仁、低分子化リグニンの新機能開発、生産と技術、66 (3) 106-109 (2014)

2. 学会発表

M. Iida, S. Nagase, M. Yamashita, Y. Shirasago, M. Fukasawa, M. Tada, A. Ishii, A. Watari, K. Yagi, and M. Kondoh, In vivo inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 monoclonal antibodies. The 41st Annual Meeting & Exposition of the controlled Release Society 2014年7月13日~16日 (Chicago, U.S.A.)

M. Iida, M. Yamashita, S. Nagase, M. Tada, Y. Sahirasago, M. Fukasawa, A. Watari, A. Ishii-Watabe, K. Yagi, and M. Kondoh, Anti-human claudin-1 antibodies inhibit a Hepatitis C Virus infection in vivo. 21st International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses (HCV2014) 2014年9月7日~11日 (Banff, Canada)

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

Table 1 Genes increasing expression with HCV entry activity

HBA1,2	hemoglobin, alpha 1 , 2
IGFBP1	Insulin-like growth factor binding protein 1
HBB	Hemoglobin, beta
F5	coagulation factor V
F9	coagulation factor IX
CES1	carboxylesterase 1
AADAC	arylacetamide deacetylase (esterase)
CYP2C9	cytochrome P450 2C9
HRG	histidine-rich glycoprotein
CYP3A4	cytochrome P450, 3A4
SLC2A2	solute carrier family 2 member 2

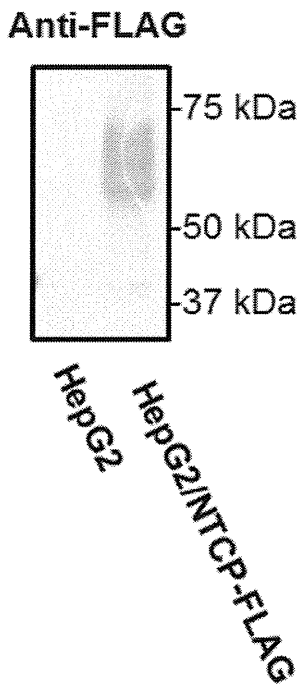


Figure 1 NTCP expression in HepG2 / NTCP-FLAG cells (WB) .

Lysates of HepG2, NTCP-FLAG-expressing HepG2 (HepG2/NTCP-FLAG) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysate of HepG2 was used as a negative control.

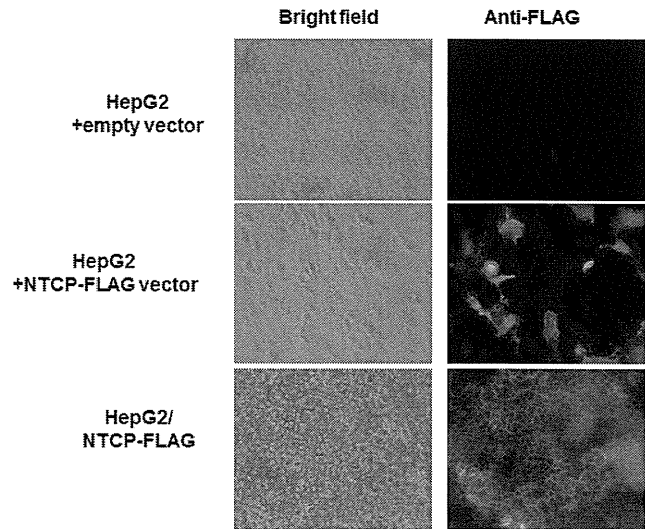
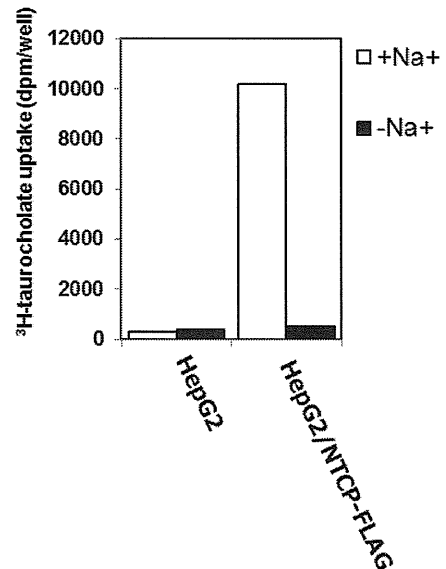


Figure 2 NTCP expression in HepG2 / NTCP-FLAG cells (ICC) .

Immunofluorescent analysis. HepG2/NTCP cells were incubated with mouse anti-FLAG antibody and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). The FITC labelled cells were detected under a immunofluorescent microscopy.

Figure 3 Transport activity of HepG2/NTCP-FLAG.

HepG2/NTCP cells were incubated ³H-taurocholate with or without sodium ion. After culturing for 2 minutes, cellular taurocholate were measured by scintillation detector.



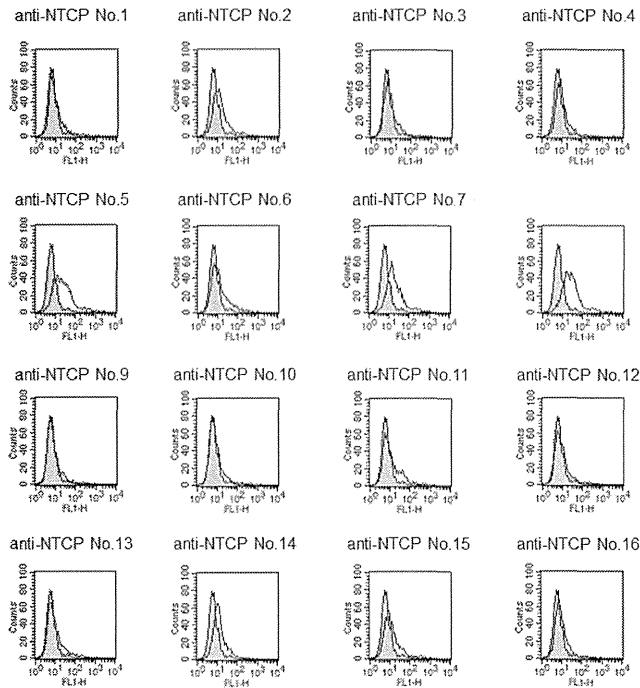


Figure 4 Screening of mouse sera producing anti-NTCP antibodies (FCM).

HepG2/NTCP-FLAG cells were incubated with a mouse sera and stained with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). The anti-NTVP antibodies-bound cells were detected by a flow cytometer. As a control, cells were incubated with HepG2.

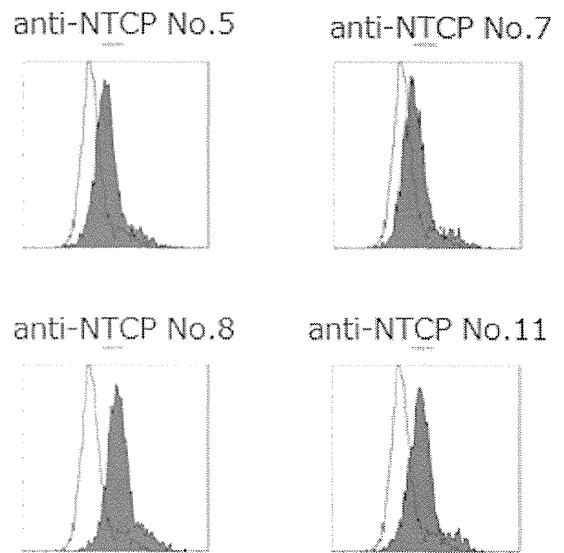


Figure 5 Screening of mouse sera producing anti-NTCP antibodies.

FACS analysis. HepG2/NTCP-FLAG cells were incubated with a mouse sera and stained with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). The anti-NTVP antibodies-bound cells were detected by a flow cytometer. As a control, cells were incubated with preimmune sera.

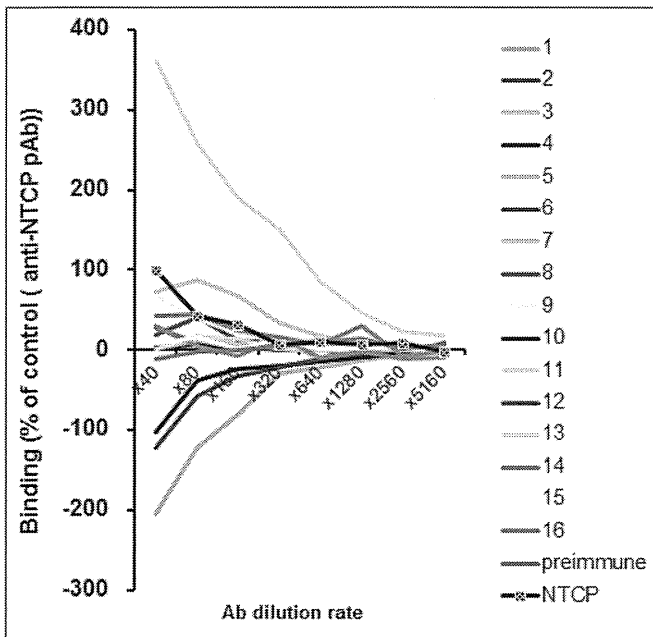


Figure 6 Screening of mouse sera producing anti-NTCP antibodies (ELISA) . The mouse sera were added to NTPCP-proteo-liposome-coated immunoplates. Anti-NTCP antibodies were detected by ELISA using HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). As a control, cells were incubated with pre immune sera (preimmune).

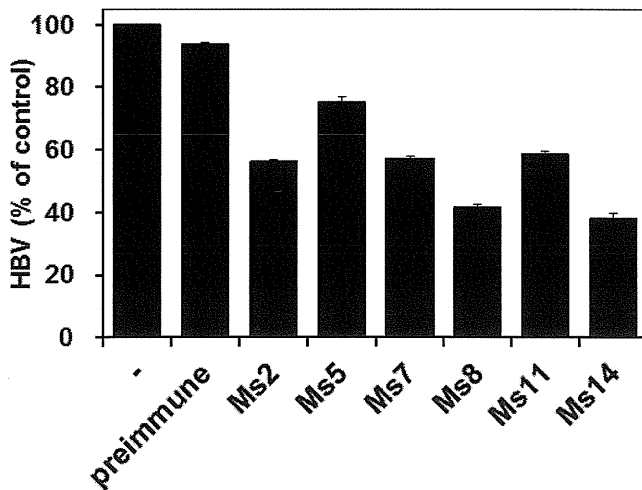


Figure 7 Mouse sera inhibited the entry step of HBV particles.

HepG2/NTCP-FLAG cells were infected with HBV contained culture supernatants of Hep2.2.15.7 cells supplemented with 3%DMSO and 4% polyethylene glycol 8000. Mouse sera incubated in 30 minutes prior to HBV infection. After culturing for 1 daya, cellular HBV DNA levels were detected by qPCR. Data ate shown as mean±SD, percentage of amount observed of non-treated group.

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Higuchi M, Mizuguchi H.	Hepatic differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by two- and three-dimensional culture systems in vitro.	M. Akashi, T. Akagi, M. Matsusaki	Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application	the Springer publishing	Japan	2014	147-158 水口
森川 賢一、坂本 直哉	C型慢性肝炎の病態・自然経過と発癌	ヴァンメディカル	消化器の臨床	ヴァンメディカル	東京	2015	53-58 森川

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
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.		[Epub ahead of print]	2015
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.	17(2)	217-228.	2015
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.	89(4)	2220-32.	2015
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.	61(2)	438-47.	2015
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.	10(12)	e1004534	2014
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.	9(11)	e113499.	2014

Shirasago Y, Sekizuka T, Saito K, Suzuki T, <u>Wakita T</u> , 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.		[Epub ahead of print]	2014
Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, <u>Wakita T</u> .	Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus.	J Gen Virol.	95(Pt 12)	2658-67.	2014
Kim S, Date T, Yokokawa H, Kono T, Aizaki H, Maurel P, Gondeau C, <u>Wakita T</u> .	Development of hepatitis C virus genotype 3a cell culture system.	Hepatology.	60(6)	1838-50.	2014
Munakata T, Inada M, Tokunaga Y, <u>Wakita T</u> , Kohara M, Nomoto A.	Suppression of hepatitis C virus replication by cyclin-dependent kinase inhibitors.	Antiviral Res.	108	79-87	2014
Ishibashi M, Morita N, Nomura-Kawaguchi C, Shimizu Y, <u>Wakita T</u> , Esumi M.	CLEC4M-positive and CD81-negative Huh7 cells are not susceptible to JFH-1 HCVcc infection but mediate transinfection.	Arch Virol.	159(11)	2949-55.	2014
Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, <u>Wakita T</u> , Kato N.	Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets.	Virology.	462-463	166-74.	2014
Ogura N, Watashi K, Noguchi T, <u>Wakita T</u> .	Formation of covalently closed circular DNA in Hep38.7-Tet cells, a tetracycline inducible hepatitis B virus expression cell line.	Biochem Biophys Res Commun.	452(3)	315-21.	2014
Choi JE, Hur W, Kim JH, Li TZ, Lee EB, Lee SW, Kang W, Shin EC, <u>Wakita T</u> , Yoon SK.	MicroRNA-27a Modulates HCV Infection in Differentiated Hepatocyte-Like Cells from Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells.	PLoS One.	9(5)	e91958.	2014
Daito T, Watashi K, Sluder A, Ohashi H, Nakajima S, Borroto-Esoda K, Fujita T, <u>Wakita T</u> .	Cyclophilin Inhibitors Reduce Phosphorylation of RNA-dependent Protein Kinase to Restore Expression of IFN-stimulated Genes in HCV-infected Cells.	Gastroenterology.	147(2)	463-72	2014
Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, <u>Wakita T</u> , Sawasaki T, Suzuki T.	Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- α in Infectious Virus Production.	J Virol.	88(13)	7541-55	2014

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, <u>Wakita T</u> , 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.	9(4)	e94460.	2014
Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, <u>Wakita T</u> , Matsuura Y.	Novel permissive cell lines for complete propagation of hepatitis C virus.	J Virol.	88(10)	5578-94.	2014
Mohammad J Islam, Keisuke Hikosaka, Hidenao Noritake, Mohammad K M Uddin, Mohammed B Amin, <u>Kazushi Aoto</u> , Yi-Xin Wu, Eiji Sato, Yoshimasa Kobayashi, Takaji Wakita, Naoyuki Miura.	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
<u>Iijima S</u> , Matsuura K, Watanabe T, Onomoto K, Fujita T, Ito K, Iio E, Miyaki T, Fujiwara K, Shinkai N, Kusakabe A, Endo M, Nojiri S, Joh T, Tanaka Y	Influence of Genes Suppressing Interferon Effects in Peripheral Blood Mononuclear Cells during Triple Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C.	PLoS One	10 (2)	e0118000.	2015
Hamada-Tsutsumi S, Iio E, Watanabe T, Murakami S, Isogawa M, <u>Iijima S</u> , Inoue T, Matsunami K, Tajiri K, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A, Joh T, Tanaka Y.	Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection.	PLoS One.	10(2)	e0118062.	2015
Kato N, Sejima H, Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, <u>Ikeda M</u> .	Genetic Characterization of Hepatitis C Virus in Long-Term RNA Replication Using Li23 Cell Culture Systems.	<i>PLoS One</i>	9(3)	e91156	2014
Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, <u>Ikeda M</u> , Kato N.	Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus <i>Cordyceps militaris</i> .	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	447(2)	341-5	2014
Dansako H, Hiramoto H, <u>Ikeda M</u> , Wakita T, Kato N.	Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets.	<i>Virology</i>	462-463	166-74	2014

Matsuno K, Ueda Y, Fukuda M, Onoda K, Waki M, <u>Ikeda M</u> , Kato N, Miyachi H.	Synthesis and inhibitory activity on hepatitis C virus RNA replication of 4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxy-2-propyl) aniline analogs.	<i>Bioorg Med Chem Lett.</i>	24(17)	4276-80	2014
Li T.C., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., <u>Ishii K.</u> , 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		2015
Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Kato T., Wakita T. and <u>Ishii K.</u>	Establishment of Hepatitis E Virus Infection-Permissive and -Nonpermissive Human Hepatoma PLC/PRF/5 Subclones.	Microbiology and Immunology	In press		2015
Jiang X., Kanda T., Wu S., Nakamoto S., Saito K., Shirasawa H., Kiyohara T., <u>Ishii K.</u> , Wakita T., Okamoto H. and Yokosuka O.	Suppression of La Antigen Exerts Potential Antiviral Effects against Hepatitis A Virus.	PLOS One	9	e101993	2014
Li T.C., Yang, T., Shiota T., Yoshizaki S., Yoshida H., Saito M., Imagawa T., Malbas F., Lupisan S., Oshitani H., Wakita T. and <u>Ishii K.</u>	Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines.	American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,	90	764-766	2014
Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., <u>Hijikata M.</u>	Critical role of interferon- α constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection	PLoS ONE	9	E89869	2014
Takayama K., Morisaki Y., Kuno S., Nagamoto Y., Harada K., Furukawa N., Ohtaka M., Nishimura K., Imagawa K., Sakurai F., Tachibana M., Sumazaki R., Noguchi E., Nakanishi M., Hirata K., Kawabata K., <u>Mizuguchi H.</u>	Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes.	Proc Natl Acad Sci USA.	111	16772-16777	2014
Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama- Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, <u>Moriishi K</u>	Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus.	<i>J. Virol.</i>	88	13352-13366	2014