

2014230/5A

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

肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）

C型肝炎の病態の解明と肝癌発症制御法の確立に関する研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松浦善治

平成 27 (2015) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書

C型肝炎の病態の解明と肝癌発症制御法の確立に関する研究

松浦善治 2

II. 分担研究報告書

HCV増殖と病原性におけるシグナルペプチドペプチダーゼの役割

松浦善治 13

脂肪肝と肝細胞癌の発症機構の解析

堤 武也 16

HCV感染による肝線維化誘導の機構

鈴木哲朗 18

HCV感染症における樹状細胞のアポトーシス回避機構の検討

考藤達哉 20

HCV感染による肝がん発症機構の解析

森石恆司 22

C型肝炎の病態の解明と肝癌発症制御法の確立に関する研究

武富紹信 25

HCV感染による細胞内遺伝子の発現変化と病原性

勝二郁夫 29

HCVコア蛋白質発現マウスにおける肝炎発症機構の解析に関する研究

山本雅裕 32

HCV関連遺伝子発現アデノウイルスベクターシステムの開発

及び班員へのベクター供給

鐘ヶ江 裕美 35

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 38

IV. 研究成果の刊行物・別冊 (別添) 43

総括研究報告書

C型肝炎の病態の解明と肝癌発症制御法の確立に関する研究

研究代表者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：シグナルペプチドペプチダーゼ (SPP)を欠損させたコア蛋白質発現マウスでは、SPP 阻害剤の処理によってコア蛋白質の分解が促進され、インスリン抵抗性や脂肪肝の改善が観察された。コア蛋白質を発現するマウスの肝臓や培養細胞では、ミトコンドリア外膜に局在する Bnip3 がコア蛋白質と相互作用することで不安定化され、オートファジーの誘導が抑制されることが示唆された。HCV 感染により肝特異的転写因子 CREBH の活性化と小胞体ストレス依存的な TGFβ2 の発現制御機構が示唆された。CREBH の欠損マウスを作製し、CREBH が直接制御する遺伝子群として Cyp2b ファミリー分子群を見出し、コア蛋白質の発現によって、Cyp2b ファミリー分子群のプロモーターが活性化することを見出した。樹状細胞は生理条件下ではアポトーシス傾向にあるが、C 型肝炎患者ではその傾向がさらに強いことが示された。HCV 感染によって、ホメオボックス遺伝子の一部に発現上昇が観察され、発癌や前癌状態の指標になることが示唆された。初回肝切除を受けた HCV 陽性肝細胞癌を解析し、上皮間葉転換関連分子と肝細胞癌の予後予測因子として同定した FABP5 との発現に相関が認められ、FABP5 発現抑制株では E-cadherin や ZO-1 の発現が亢進し、N-cadherin, Vimentin, Snail の発現低下や β-catenin の核内移行阻害が認められた。HCV 感染細胞では、コレステロールエステル合成酵素 ACAT2、胆汁酸取り込みに関与する OATP や NTCP の発現上昇が認められ、細胞外からの遊離脂肪酸の取り込み量が増加しており、CD36, FATP-1, -3, -5, -6 の発現亢進も観察された。HCV の病原性発現に関与する複数の宿主遺伝子に対する TALEN、ZFN、CRISPR/Cas9 システムに対応可能なアデノウイルスベクターを作製し班員に供給した。

研究分担者

鐘ヶ江裕美 東京大学・助教

堤 武也 東京大学・助教

A. 研究目的

鈴木哲朗 浜松医科大学・教授

C型肝炎ウイルス(HCV)に有効な薬剤の開発により、C型慢性肝炎患者からのウイルス排除に関しては良好な成果が得られつつある。しかしながら、HCVの *in vivo* ならびに *in vitro* の解析系は限定されており、病原性の発症機序の解析は進んでいない。特に、化学療法によってHCVを生体から排除できたとしても肝発癌の危惧は払拭できず、今後は肝癌への進展を制御する新しい治療法の確立が重要となる。本研究では、*in vitro* および *in vivo* の感染モデルを構築し、HCV感染による慢性持続性感染、線維化、脂肪化、そして

考藤達哉 国際医療研究センター・室長

森石恆司 山梨大学・教授

武富紹信 北海道大学・教授

勝二郁夫 神戸大学・准教授

山本雅裕 大阪大学・教授

発癌のメカニズムを解明し、慢性 C 型肝炎から肝細胞癌への進展を阻止できる新しい治療法の開発を基礎、臨床の両面から検討することを目的とする。

B. 研究方法

(松浦) HCV の複製を許容するヒト肝癌細胞株 Huh7 細胞から CRISPR/Cas9 を用いて SPP 遺伝子を欠損させて、HCV 増殖の影響を検討した。さらに、SPP 欠損マウスを作製し、CoreTg と交配することによって、コアタンパク質が誘導する病原性発現への影響を検討した。

(堤) すでに樹立された HCV コア蛋白を恒常的に発現する肝癌細胞株 HepG2 細胞を主に用いて研究を行った。必要に応じて、オートファジー誘導剤である rapamycin やプロテアソーム阻害剤である MG132 により細胞を処理し、mRNA や蛋白発現の解析を行った。また、当研究室で以前に樹立した CoreTg から摘出した肝臓についても同様の解析を行った。

(鈴木) pGL4.1 ベクターに同プロモーター遺伝子またはその変異体遺伝子を挿入し作製した種々のレポータープラスミドを作製し肝癌細胞株へトランスフェクションし細胞内ルシフェラーゼ活性を測定した。

Collagen type 1A1 (COL1A1) 等の mRNA 発現は定量 RT-PCR で、蛋白発現はウエスタンブロット、免疫染色法で解析した。遺伝子ノックアウトには siRNA を、ノックアウト細胞作製には CRISPR-Cas9 システムを利用した。HCV 感染または非感染 Huh7 細胞とヒト肝星細胞株 TWNT4 を等量混和し共培養系を作製した。

(考藤) C 型慢性肝炎患者、非感染者末梢血から DC サブセット (BDCA3+DC, PDC, MDC) を分離し、培養液中に静置し 24 時間後のアポトーシスを評価した。この際に様々な生理活性物質を添加し、アポトーシス改善効果、HCV や PolyIC 刺激による IFN 産生能を評価した。更に DC での遺伝子発現プロファイルを PCR-Array を用いて比較した。

(森石) Huh 7 細胞に HCV を既報の方法に準じて感染させ、細胞内 RNA を調整し、qRT-PCR によって定量した。また、感染細胞を抗 HCV 剤 (Telaprevir と Daclatasvir) によって処理し、ウイルス排除した。mUb 化 H2 量をウエスタンブロット法によって解析

した。クロマチン沈降法によって HoxB9 プロモーター領域の mUb 化 H2A 量を解析した。(武富) 北海道大学病院消化器外科学 I で初回肝切除を受けた HCV 陽性肝細胞癌 90 症例を解析した。各種肝癌細胞株を用いて FABP5 タンパクの発現レベルを解析し、FABP5 発現と肝癌細胞株の増殖・浸潤・遊走能との相関関係を検討した。

(勝二) 蛍光レポーター (BODIPY) 結合遊離脂肪酸 (Free Fatty Acid: FFA) を Huh-7.5 細胞培養液中に添加し、HCV の感染の有無あるいは HCV レプリコンの複製の有無による肝細胞内への FFA 取り込み活性に及ぼす影響を経時的に解析した。HCV を Huh-7.5 細胞に感染させ、FFA 取り込み関連分子の発現量の経時的变化を real time PCR 法で解析した。また、コレステロール代謝関連遺伝子および胆汁酸代謝関連遺伝子の発現量の経時的变化を解析した。

(山本) Huh7.5.1 細胞に HCV を感染させ、肝臓高発現 ATF6 ファミリー分子 [CrebH] の活性化について in vitro で解析した。また、CrebH の活性化が持続した際の生体内での影響を解析する為、活性化型 CrebH (CrebH-DC) 発現マウスを Cas9/CRISPR を用いたゲノム編集により作製し、CrebH-DC の生体への影響について検討した。

(鐘ヶ江) アデノウイルス (AdV) から発現する微量の VA RNA による細胞遺伝子発現への影響の検討は、VA 欠失 AdV と従来の AdV を用いたマイクロアレー解析により行った。特に発現が低下していた遺伝子については、VA RNA 量依存的な発現量の推移を qPCR により定量した。班員供給用の AdV や Cas9 発現 AdV の作製は既報に従って行うとともに遺伝子サイズの大きな cDNA 発現用には「ヘルパー依存型 AdV」として当研究室オリジナルの方法により作製を行った。

C. 研究結果

(松浦) 遺伝子編集技術を用いて miR-122、オートファジー関連因子、さらに、コア蛋白質の成熟に関与する SPP の欠損細胞株を樹立し、HCV の感染環や病原性に及ぼす影響を検討した。SPP 遺伝子の欠損や阻害剤処理によりコア蛋白質の分解が促進され、感染性粒子の産生だけでなく、マウスモデルではインスリン抵抗性や脂肪肝の改善が

観察された。

(堤) トランスジェニックマウスと培養細胞の系において、StatinによってHCVにより誘発された肝脂肪化、脂肪組成異常、ミトコンドリア機能・形態異常が改善された。コア蛋白発現 HepG2 細胞では、オートファジーの誘導が抑制されており、ミトコンドリア外膜に局在する Bnip3 (BCL/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3)の発現が低下し、HCV レプリコン細胞やコアトランスジェニックマウスの肝臓でも低下が観察され、コア蛋白質が Bnip3 と相互作用し、Bnip3 の安定性を減弱していることが示唆された。

(鈴木) HCV 感染による肝線維化誘導に関連して、HCV 感染に伴う肝特異的転写因子 CREBH の活性化と CREBH による小胞体ストレス依存的な TGFβ2 の発現制御機構を明らかにした。

(考藤) HCV や HCV が複製している肝癌細胞を認識して、BDCA3⁺DC は IFN-λ を、PDC は IFN-αβ を産生することが明らかになった。HCV は CD81 を介して BDCA3⁺DC に侵入し、エンドゾームの TLR3/TRIF によって認識されて IFN-λ を誘導することが示された。IL28B SNP major の健常者から分離した BDCA3⁺DC は、IL28B SNP minor の DC よりも多量の IFN-λ を産生し、IFN-λ の量依存的に肝細胞の ISG を誘導することが示された。DC は生理条件下ではアポトーシス傾向にあるが、C 型慢性肝炎患者ではその傾向がさらに強いことが示され、また、BDCA3⁺DC のアポトーシスを抑制し、IFN 産生能を回復できる候補物質を同定した。

(森石) コア蛋白質を発現するマウスの肝臓、HCV 感染細胞、および、レプリコン細胞の微量質量分析法によって、コア蛋白質の発現や HCV の複製によって、トリアシルグリセリドとリン脂質領域に変動に一定のパターンが認められた。HCV の感染や HCV 蛋白質の発現によって、ホメオボックス遺伝子の一部に発現上昇が見られ、発がんおよび前がん状態の指標になることが示唆された。

(武富) 初回肝切除を受けた HCV 陽性肝細胞癌 90 症例を解析した。累積生存における多変量解析では、AFP-L3 が 10%以上である症例のハザード比(HR)が 2.82 (p=0.01)であったのに対し、Fatty acid binding protein 5

(FABP5) 陽性群では HR が 5.32 (p<0.0001) であった。FABP5 は肝細胞癌の悪性度に強く関連し、従来のバイオマーカーを凌駕する強力な予後予測因子であることが明らかになった。次に、各種肝癌細胞株における FABP5 の発現レベルを解析した結果、HLE, HLF, Li7 細胞では発現が高く、HepG2, KIM-1, Hep3B 細胞では低く、FABP5 の発現を抑制した Li7 細胞株では増殖・浸潤・遊走能の低下が、FABP5 を過剰発現させた HepG2 細胞株ではこれらの上昇が観察された。さらに、PCR array 法で浸潤に関わる分子の発現を検討したところ、上皮間葉転換関連分子と FABP5 の発現に相関が認められ、FABP5 発現抑制株では E-cadherin や ZO-1 の発現が亢進し、N-cadherin, Vimentin そして Snail の発現低下や、β-catenin の核内移行阻害が認められた。

(勝二) HCV コア蛋白質による過酸化水素消去酵素 Peroxiredoxin (Prx) family への影響を解析した。HCV コア蛋白質による Prx 1 の分解誘導にユビキチンリガーゼ E6AP の関与が示唆された。また、HCV 感染によって、コレステロールエステル合成酵素 ACAT2、胆汁酸取り込みに関与する Organic anion transporter protein (OATP)、そして、Sodium/Taurocholate Co-transporting Polypeptide (NTCP)の発現上昇が認められた。さらに、HCV 感染細胞では細胞外からの Free Fatty Acid (FFA)の取り込み量が増加しており、CD36, FATP-1, -3, -5, -6 の発現亢進の関与が示唆された。

(山本) HCV コア蛋白質発現マウスの肝臓を種々のストレス誘導剤で刺激し、その破砕液と自然免疫細胞であるマクロファージと共培養した結果、マクロファージの炎症反応が増強されることを見出した。肝臓で高発現している ER ストレスセンサーの CREBH を欠損させたマウスを作製し、CREBH が直接制御する遺伝子群として Cyp2b ファミリー分子群を見出した。また、コア蛋白質の発現によって、Cyb2b ファミリー分子群のプロモーターが活性化することを見出した。そこで、CREBH が恒常的に活性化するノックインマウスを作製し、Cyb2b ファミリー遺伝子群が高発現していることを確認した。また、内因性の肝炎マウスモデルとして、Mdr2 欠損マウスが胆汁鬱滞性肝炎を発症することを確認した。

(鐘ヶ江) miR122 など 5 種類の遺伝子をノックアウトするためのアデノウイルスベクター(AdV)を作製し供給した。また、HCV に対する shRNA を発現する AdV を作製したところ、VA 欠失 AdV は VA 保持 AdV と比べ高い HCV 複製抑制効率を示すことを明らかにし、VA 欠失 AdV は miR-122 などの small RNA 発現ベクターとして有用性が高いことを証明した。また、AdV の遺伝子編集技術への応用を検討し、HCV の病原性発現に関与する複数の宿主遺伝子に対する TALEN や ZFN を発現する AdV を作製し班員に供給するとともに、CRISPR/Cas9 システムに対応可能な AdV を開発した。

D. 考察

遺伝子編集技術を用いてコア蛋白質の成熟に関与する SPP を欠損させたコア蛋白質発現マウスでは、SPP 阻害剤の処理によってコア蛋白質の分解が促進され、インスリン抵抗性や脂肪肝の改善が観察された。(松浦)

コア蛋白質を発現するトランスジェニックマウスの肝臓や培養細胞では、ミトコンドリア外膜に局在する Bnip3 がコア蛋白質との相互作用することで不安定化され、オートファジーの誘導が抑制されることが示唆された。(堤)

HCV 感染による肝線維化誘導に関連して、HCV 感染に伴う肝特異的転写因子 CREBH の活性化と CREBH による小胞体ストレス依存的な TGF β 2 の発現制御機構を明らかにした。(鈴木)

DC は生理条件下ではアポトーシス傾向にあるが、C 型肝炎患者ではその傾向がさらに強いことが示され、さらに、BDCA3⁺DC のアポトーシスを抑制し、IFN 産生能を回復できる候補物質を同定した。(考藤)

HCV 感染や HCV 蛋白質の発現によって、ホメオボックス遺伝子の一部に発現の上昇が観察され、発癌や前癌状態の指標になることが示唆された。(森石)

初回肝切除を受けた HCV 陽性肝細胞癌を PCR array 法で解析し、上皮間葉転換関連分子と肝細胞癌の予後予測因子として昨年度に報告した FABP5 との発現に相関が認められ、FABP5 発現抑制株では E-cadherin や ZO-1 の発現が亢進し、N-cadherin, Vimentin, Snail の発現低下や β -catenin の核内移行阻

害が認められた。(武富)

HCV 感染細胞では、コレステロールエステル合成酵素 ACAT2、胆汁酸取り込みに関与する OATP や NTCP の発現上昇が認められ、細胞外からの遊離脂肪酸の取り込み量が増加しており、CD36, FATP-1, -3, -5, -6 の発現亢進も観察された。(勝二)

肝臓で高発現している ER ストレスセンサーの CREBH の欠損マウスを作製し、CREBH が直接制御する遺伝子群として Cyp2b ファミリー分子群を見出し、コア蛋白質の発現によって、Cyb2b ファミリー分子群のプロモーターが活性化することを見出した。さらに、CREBH が恒常的に活性化するノックインマウスで Cyb2b ファミリー遺伝子群の高発現を確認した。また、内因性の肝炎マウスモデルとして、Mdr2 欠損マウスが胆汁鬱滞性肝炎を発症することを確認した。(山本)

アデノウイルスベクター(AdV)の遺伝子編集技術への応用を検討し、HCV の病原性発現に関与する複数の宿主遺伝子に対する TALEN や ZFN を発現する AdV を作製し班員に供給するとともに、CRISPR/Cas9 システムに対応可能な AdV を開発した。(鐘ヶ江)

E. 結論

1. SPP を欠損させたコア蛋白質発現マウスでは、SPP 阻害剤の処理によってコア蛋白質の分解が促進され、インスリン抵抗性や脂肪肝の改善が観察された。
2. コア蛋白質を発現するマウスの肝臓では、Bnip3 がコア蛋白質との相互作用することでオートファジーの誘導が抑制される。
3. HCV 感染に伴う肝特異的転写因子 CREBH の活性化と CREBH による小胞体ストレス依存的な TGF β 2 の発現制御機構を明らかにした。
4. DC は生理条件下ではアポトーシス傾向にあるが、C 型肝炎患者ではその傾向がさらに強いことが示された。
5. HCV 感染によって、ホメオボックス遺伝子の発現上昇が観察され、発癌や前癌状態の指標になることが示唆された。
6. HCV 陽性肝細胞癌では上皮間葉転換関連分子と FABP5 との発現に相関が認められた。
7. HCV 感染細胞では遊離脂肪酸の取り込

み量の増加が観察された。

8. ER ストレスセンサーの CREBH の欠損マウスを作製し、CREBH が直接制御する遺伝子群として Cyp2b ファミリー分子群を同定した。

9. HCV の病原性発現に関与する複数の宿主遺伝子に対する遺伝子編集可能な AdV を作製し班員に供給した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, and Matsuura Y. Amphipathic α -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. PLoS Pathogens, 2014 DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534
2. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, and Matsuura Y. Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus. J. Virol. 2014; 88: 5578-5594
3. Ogishi M, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Gatanaga H, Ode H, Sugiura W, Moriya K, Oka S, Kimura S, Koike K. Deconvoluting the composition of low-frequency hepatitis C viral quasispecies: Comparison of genotypes and NS3 resistance-associated variants between HCV/HIV coinfecting patients and HCV mono-infected patients in Japan. Plos One 2015 in press
4. Sekine S, Ito K, Watanabe H, Nakano T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Miyoshi H, Fujinaga H, Shinzawa S, Koike K, Horie T. Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein. Toxicol Appl Pharmacol 2015 in press
5. Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, Moriya K, Tsutsumi T, Koike K, Akatsuka T. Effect of the infectious dose and the presence of hepatitis C virus core gene on mouse intrahepatic CD8 T cells. Hepatol Res 2014;44: E240-252
6. 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. 88: 7541-7555, 2014.

7. 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: 2220-2232, 2015,
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. 95: 2658-2667, 2014.
9. Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. J Virol Methods 207: 38-44, 2014.
10. Lee J, Ahmed SR, Oh S, Kim J, Suzuki T, Parmar K, Park SS, Lee J, Park EY. A plasmon-assisted fluoro-immunoassay using gold nanoparticle-decorated carbon nanotubes for monitoring the influenza virus. Biosens Bioelectron. 64: 311-317, 2014.
11. Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, Suzuki T, Lee J, Park EY. Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection. Biosens Bioelectron. 58:33-39, 2014.
12. 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 hepatitis C virus. J. Virol., 88: 13352-13366, 2014
13. 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
14. 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
15. 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
 16. 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
 17. Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuzaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*. 2014 Feb;35(2):272-81.
 18. Kamiyama T, Yokoo H, Kakisaka T, Orimo T, Wakayama K, Kamachi H, Tsuruga Y, Yamashita K, Shimamura T, Todo S, Taketomi A. C Multiplication of alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence-II is a powerful predictor of prognosis and recurrence in hepatocellular carcinoma patients after a hepatectomy. *Hepatology Res*. 2014 in press
 19. Alam MT, Nagao-Kitamoto H, Ohga N, Akiyama K, Maishi N, Kawamoto T, Shinohara N, Taketomi A, Shindoh M, Hida Y, Hida K. Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker. *Cancer Sci*. 2014, 105(12) 1533-40.
 20. Sakai H, Kado S, Taketomi A, Sakane F. Diacylglycerol Kinase δ Phosphorylates Phosphatidylcholine-specific Phospholipase C-dependent, Palmitic Acid-containing Diacylglycerol Species in Response to High Glucose Levels. *J Biol Chem* 2014, 289(38) 26607-17.
 21. Aoki, Y., Sugiyama, M., Murata, K., Yoshio, S., Kurosaki, M., Hashimoto, S., Yatsushashi, H., Nomura, H., Jong-Hon, K., Takeda, T., Naito, S., Kimura, T., Yamagiwa, Y., Korenaga, M., Imamura, M., Masaki, N., Izumi, N., Kage, M., Mizokami, M., and Kanto, T. Association of serum IFN- λ 3 with inflammatory and fibrosis markers in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2014 (in press)
 22. Oze, T., Hiramatsu, N., Yakushijin, T., Miyazaki, M., Iio, S., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Inui, Y., Hijioka, T., Inada, M., Tamura, S., Yoshihara, H., Inoue, A., Imai, Y., Miyagi, T., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Kanto, T., Kasahara, A., Hayashi, N. and Takehara, T., Using early viral kinetics to predict antiviral outcome in response-guided pegylated interferon plus ribavirin therapy among patients with hepatitis C virus genotype 1. *J Gastroenterol* 2014; 49: 737-4.
 23. Morishita, N., Hiramatsu, N., Oze, T., Harada, N., Yamada, R., Miyazaki, M., Yakushijin, T., Miyagi, T., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Kanto, T. and Takehara, T., Liver stiffness measurement by acoustic radiation force impulse is useful in predicting the presence of esophageal varices or high-risk esophageal varices among patients with HCV-related cirrhosis. *J Gastroenterol* 2014; 49: 1175-1182.
 24. Ratnoglik, SL., Jang, DP., Aoki, C., Sudarmono, P., Shoji, I., Deng, L., and Hotta, H. Induction of cell-mediated immune responses in mice by DNA vaccines that express hepatitis C virus NS3 mutants lacking serine protease and NTPase/RNA helicase activities., *PLoS One*, 2014, 9 (6): e98877.
 25. Ratnoglik, SL., Aoki, C., Sudarmono, P., Komoto, M., Deng, L., Shoji, I., Fuchino, H., Kawahara, N., and Hotta, H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology*, 2014, 58 (3): 188-94.
 26. Adianti, M., Aoki, C., Komoto, M., Deng, L., Shoji, I., Wahyuni, T., Lusida, M., Soetjipto, S., Fuchino, H., Kawahara, N., and Hotta, H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. *Microbiology and Immunology*, 2014, 58 (3): 180-7.
 27. Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, Shoji I, Wilcox CS, Lai EY, Han F. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, 21 (1): 1-16.

28. Ma JS, Sasai M, Ohshima J, Lee Y, Bando H, Takeda K, Yamamoto M (2014) Selective and strain-specific NFAT4 activation by the *Toxoplasma gondii* polymorphic dense granule protein GRA6. *J Exp Med* 211: 2013-2032
29. Meunier E, Dick MS, Dreier RF, Schurmann N, Kenzelmann Broz D, Warming S, Roose-Girma M, Bumann D, Kayagaki N, Takeda K, Yamamoto M, Broz P (2014) Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature* 509: 366-370
30. Haldar AK, Piro AS, Pilla DM, Yamamoto M, Coers J (2014) The E2-like conjugation enzyme Atg3 promotes binding of IRG and Gbp proteins to Chlamydia- and *Toxoplasma*-containing vacuoles and host resistance. *PLoS One* 9: e86684
31. Lystad A H, Ichimura Y, Takagi K, Yang Y, Pankiv S, Kanegae Y, Kageyama S, Suzuki M, Saito I, Mizushima T, Komatsu M, and Simonsen A. Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures. *EMBO Rep* 2014;15:557-565.
32. Kondo S, Yoshida K, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Adenovirus-encoding virus-associated RNAs suppress HDGF gene expression to support efficient viral replication. *PLoS One* 2014 9;e108627.
33. Suzuki M, Kondo S, Pei Z, Maekawa A, Saito I, and Kanegae Y. Preferable sites and orientations of transgene inserted in the adenovirus vector genome: the E3 site may be unfavorable for transgene position. *Gene* 2015:1-9.
- 2. 学会発表**
1. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
2. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
3. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
4. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic α -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of HCV. 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
5. Sayaka Aizawa, Toru Okamoto, Takahisa Kouwaki, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura, Processing of core protein by signal peptide peptidase participates in propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014
6. Yoshiharu Matsuura, Toru Okamoto, Takasuke Fukuhara, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
7. 山本聡美、福原崇介、小野慎子、和田真実、塩川舞、岡本徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスの感染におけるアポリポタンパク質受容体の役割、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
8. 和田真実、福原崇介、中村昇太、小野慎子、山本聡美、塩川舞、岡本徹、小池和彦、松浦善治、アポリポタンパク質の両親媒性 α ヘリックスはHCVの感染性粒子産生に寄与する、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
9. 岡本徹、相澤清香、杉山由加理、幸脇貴久、福原崇介、森石恆司、小池和彦、松浦善治、C型肝炎ウイルスの病原性発現におけるシグナルペプチドペプチダーゼの役割、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
10. 福原崇介、山本聡美、小野慎子、和田真実、岡本徹、茶山一彰、松浦善治、HCVのQuasispeciesは増殖性に関与する、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
11. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko

- Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic α -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
12. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
 13. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014
 14. Masato Ogishi, Hiroshi Yotsuyanagi, Takeya Tsutsumi, Hiroyuki Gatanaga, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike. Next-generation sequencing revealed the prevalence of multi-geo/subtypic multiple infection of hepatitis C virus in hemophiliac patients in Japan. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2014, Boston, MA, USA, November 7-11, 2014
 15. Takeya Tsutsumi, Kazuya Okushin, Kenichiro Enooku, Hidetaka Fujinaga, Kyoji Moriya, Hiroshi Yotsuyanagi, Kazuhiko Koike. Expression of Bnip3, a mitophagy-related gene, is decreased in cells expressing the core protein of hepatitis C virus. 21st International Meeting on HCV and Related Viruses, Banff, September 7-11, 2014.
 16. Hidetaka Fujinaga, Seiko Shinzawa, Kazuya Okushin, Kenichiro Enooku, Takeya Tsutsumi, Kyoji Moriya, Hiroshi Yotsuyanagi, Kazuhiko Koike. Liver lesion in HCV core gene transgenic mice is ameliorated in lipid metabolism, mitochondria function and intrahepatic cardiolipin composition by fluvastatin treatment. 21st International Meeting on HCV and Related Viruses, Banff, September 7-11, 2014.
 17. Kenichiro Enooku, Kazuya Okushin, Hidetaka Fujinaga, Takeya Tsutsumi, Kyoji Moriya, Hiroshi Yotsuyanagi, Hitoshi Ikeda, Kazuhiko Koike. Mitochondrial isoenzyme of creatine kinase may be a novel serum predictive marker for hepatocarcinogenesis in patients with chronic hepatitis who did not have HCC. 21st International Meeting on HCV and Related Viruses, Banff, September 7-11, 2014.
 18. Tomohisa Tanaka, Hirotake Kasai, Atsuya Yamashita, and Kohji Moriishi, 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.
 19. Kaori Dobashi, Hirotake Kasai, Tomohisa Tanaka, and Kohji Moriishi, 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.
 20. 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
 21. 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
 22. 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へ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
 23. 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
 24. 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
 25. Kohji Moriishi, 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
- 26.武富紹信：「肝臓に対するこれからの外科治療」． 県北肝疾患研究会、2014年2月18日、福島、特別講演（第一三共）
 - 27.武富紹信：「肝臓に対するこれからの外科治療」． 第929回市立札幌病院 学術研修会・がん診療連携拠点病院研修会、2014年3月13日、札幌、特別講演
 - 28.武富紹信：「肝細胞癌に対する分子標的治療～外科医はどう使いこなすか～」． 第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日、京都、ランチョンセミナー（バイエル薬品）．
 - 29.武富紹信：「HCC に対する肝移植後管理」． 第26回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2014年6月11日、和歌山、教育セミナー．
 - 30.武富紹信：「データベース報告：NCD データに基づいた肝切除術におけるリスク評価」． 第69回日本消化器外科学会総会、2014年7月16日、郡山、パネルディスカッション．
 - 31.武富紹信：「肝胆膵がん」． 第52回日本癌治療学会総会、2014年8月28日、横浜、Meet in PAL．
 - 32.武富紹信：「肝胆膵癌の標準治療」． 第52回日本癌治療学会総会、2014年8月29日、横浜、教育セッション．
 - 33.武富紹信：「これからの肝臓外科治療」． 平成26年第5回江別医師会研修会、2014年9月18日、江別、特別講演．（中外製薬）
 - 34.武富紹信：「肝細胞癌に対する集学的治療」． 宮崎肝臓治療講演会、2014年10月9日、宮崎、特別講演．
 - 35.大畑多嘉宣、横尾英樹、柿坂達彦、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、武富紹信 「肝細胞癌における FABP5 の新規バイオマーカーとしての有用性」 第114回日本外科学会定期学術集会、京都 4月3-5日、2014
 - 36.大畑多嘉宣、横尾英樹、柿坂達彦、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、武富紹信 「FABP5 は EMT を介し肝細胞癌の進展を促進する」 第25回日本消化器癌発生学会総会/第8回国際消化器癌発生会議、福岡 11月13-14日、2014
 - 37.Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Tatsuhiko Kakisaka, Yosuke Tsuruga, Hirofumi Kamachi, Akinobu Taketomi. Fatty Acid Binding Protein 5 Indicates Poor Prognosis Through Epithelial-Mesenchymal Transition In Hepatocellular Carcinoma International Liver Cancer Association 8th Annual Conference, Kyoto Japan, September 5-7, 2014
 - 38.Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Akinobu Taketomi. Clinical significance of Fatty Acid Binding Protein 5 in hepatocellular carcinoma The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, September 25-27, 2014
 - 39.Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Tatsuhiko Kakisaka, Yosuke Tsuruga, Hirofumi Kamachi, Akinobu Taketomi. Fatty Acid Binding Protein 5 promotes tumor progression through epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma AASLD2014, Boston USA, November7-11, 2014
 - 40.Kanto T, Yoshio S, Sugiyama M, Mizokami M. Natural killer cells as immunological sentinels against HBV infection. The 2nd Japan-Italy Liver workshop, Hepatitis, setatosis and hepatocellular carcinoma: molecular basis and clinical links. Hiroshima, Japan, 2014.
 - 41.Yoshio S, Kanto T, Shouji H, Mano Y, Sugiyama M, Mizokami M. Human BDCA3+ dendritic cells enhance NK cell-mediated non-cytopathic inhibition of HBV replication. (Distinguished poster presentation) The 11th JSH Single Topic Conference, Hepatitis B-recent progress in Basic and Clinical research, Hiroshima, Japan, 2014
 - 42.Yoshio S, Kanto T, Sugiyama M, Shouji H, Mano Y, Aoki Y, Nishida N, Korenaga M, Murata K, Mizokami M. Distunct helper roles of dendritic cell subsets in NK cell-dependent HBV suppression in bystander infected cells. The Liver Meeting AASLD 65th Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA, 2014
 - 43.Deng L, Gan X, Shinozaki K, Shoji I, Hotta H. Peroxiredoxin 1 is a novel binding partner of HBx and a positive regulator of hepatitis B virus transcription. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA , September 3-6, 2014.
 - 44.Deng L, Hayashi M, Shinozaki K, Chen M, Shoji I, Hotta H. Interaction between HBx and lysine methyltransferase SMYD3, a novel HBx-interacting protein. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B

- Viruses. Los Angeles, USA , September 3-6, 2014.
45. Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV induces Bim/Bax-mediated apoptosis through the ROS/JNK signaling pathway. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
 46. Matsuoka Y, Deng L, Asahi A, Aoki C, Shoji I, Hotta H. HCV dysregulates Smad2/3- and Smad1/5-signaling pathways of the TGF- β superfamily. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
 47. Sianipar IR, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. Physical and functional interaction between an OTU deubiquitinase and HCV NS5A protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
 48. Matsui C, Shoji I, Sianipar IR, Minami N, Deng L, Hotta H. Determinants of specific interaction between hepatitis C virus NS5A and HNF-1 α protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
 49. Deng L, 甘 翔, 篠崎健太, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質の新規結合因子抗酸化酵素ペルオキシレドキシニン1(Prdx1)の同定と機能解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 50. 林美和子, Deng L, 篠崎健太, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質とヒストンメチル基転移酵素 SMYD3 の相互作用の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 51. 松岡陽子, Deng L, 朝日朱美, 青木千恵, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による TGF- β スーパーファミリーにおける Smad2/3 と Smad1/5/9 経路の脱制御とその分子機序の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 52. 甘 翔, Deng L, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスによるミトコンドリア介在性アポトーシス誘導機構の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 53. 松井千絵子, 勝二郁夫, Sianipar IR, 南 奈苗, Deng L, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 α 蛋白質の選択的分解機構. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 54. Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. HCV NS5A interacts with lysine methyltransferase SMYD3 and transcriptionally activates the protein disulfide isomerase gene *AGR3*. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 55. Sianipar I R, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. HCV NS5A protein physically and functionally interacts with an OTU deubiquitinase. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 56. 勝二郁夫, 松井千絵子, Sianipar IR, 南奈苗, Deng L, 堀田博. C型肝炎ウイルスによる HNF-1 α 蛋白質の選択的分解機構の解析. 第37回日本分子生物学会年会. 横浜, 11月25-27日, 2014年.
 57. 笹井 美和, 馬 知秀, 大嶋 淳, Youngae Lee, 竹田 潔, 山本 雅裕, *Toxoplasma gondii* GRA6 selectively activates NFAT4 to induce chemokine CXCL2 and CCL2, 第43回日本免疫学会学術集会, 京都, 12月10-12日, 2014年
 58. 大嶋 淳, 笹井 美和, 馬 知秀, Youngae Lee, 竹田 潔, 山本 雅裕, Role of mouse autophagy proteins in IFN- γ -mediated cell-autonomous responses against *Toxoplasma gondii*, 第43回日本免疫学会学術集会, 京都, 12月10-12日, 2014年
 59. Youngae Lee, 大嶋 淳, 笹井 美和, 馬 知秀, 山本 雅裕, Human ATG16L1 and GBPs are dispensable for IFN- γ -dependent anti-*Toxoplasma gondii* responses, 第43回日本免疫学会学術集会, 京都, 12月10-12日, 2014年
 60. 山本 雅裕, 大嶋 淳, Youngae Lee, 笹井 美和, インターフェロン- γ ;誘導性 GTPase によるトキソプラズマ原虫殺傷機構について, 第87回日本生化学会大会, 京都, 10月15-18日, 2014年
 61. Masahiro Yamamoto, NFAT4 activation by the *Toxoplasma gondii* polymorphic effector protein GRA6 maximizes the parasite virulence in a strain-specific manner, The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Nara, Japan, September 23-26, 2014
 62. 山本 雅裕, トキソプラズマ原虫と宿主の免疫学的攻防, 平成26年度 遺伝子病制御研究所研究集会, 北海道, 7月3-4日, 2014年
 63. Yamamoto M, Ma JS, Ohshima J, Sasai M,

- Activation of host NFAT by a *Toxoplasma gondii* polymorphic dense granule protein plays an important role in virulence mediated by the local infection, 18th Annual Woods Hole ImmunoParasitology Conference, MA, USA, April 27-30, 2014
64. 山本 雅裕、大嶋 淳、馬 知秀、笹井 美和、IFN- γ 依存的抗トキソプラズマ応答におけるオートファジー蛋白質の役割、第 83 回日本寄生虫学会大会、愛媛、3 月 27-28 日、2014
65. Yoshioka T, Maekawa A, Suzuki M, Kondo S, Kanegae Y, and Saito I. Development of a novel adenovirus vector for cancer-specific and stable expression: mini-adenovirus vector (mini-AdV). The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
66. Maekawa A, Pei Z, Kondo S, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
67. Kondo S, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Dually safer adenovirus vector lacking virus-associated RNA genes with significantly low immune responses. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
68. Suzuki M, Kondo S, Saito I, and Kanegae Y. Best insertion sites and orientation for the single and double expression unit in the adenovirus vector genome. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
69. Suzuki M, Kondo S, Yamasaki M, Kanegae Y, Nomoto A, and Saito I. Development of new methods to detect the replication HBV genome in the cells infected with adenovirus vector expressing pregenome RNA. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Virus, UCLA, Los Angeles, September 3-6
70. 近藤小貴、鈴木まりこ、前川文、斎藤泉、鐘ヶ江裕美、近藤小貴、アデノウイルス感染初期における virus-associated RNA の役割、第 62 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、11 月 10-12 日、2014
71. 鈴木まりこ、近藤小貴、山崎学、鐘ヶ江裕美、野本明男、斎藤泉、アデノウイルスベクターを用いた効率的な HBV ゲノム複製解析システムの開発：cocally closed circular DNA (CCC) の検出、第 62 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、11 月 10-12 日、2014
72. 近藤小貴、鈴木まりこ、山崎学、鐘ヶ江裕美、野本明男、斎藤泉、アデノウイルスベクターを用いた定量的 HBV 複製 ccc 及び rc ゲノム検出法の開発、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、11 月 25-27 日、2014

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

HCV 増殖と病原性におけるシグナルペプチドペプチダーゼの役割

研究分担者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：シグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)は、小胞体に局在する膜貫通型のペプチダーゼで、C型肝炎ウイルス(HCV)のコアタンパク質の成熟に必須であり、粒子形成に関与することが報告されているが、その詳細な検討はされていない。本研究では、SPPのウイルス増殖や病原性発現における役割を検討するため、SPP欠損肝細胞株とSPP欠損マウスを作製した。SPP欠損肝細胞株では感染性ウイルスの放出が完全に阻害され、SPPはHCV粒子放出に必須の宿主因子であることが示された。また、 γ セクレターゼ阻害剤の1つであるLY-411575がSPP阻害剤としても機能し、HCV粒子産生を阻害することが明らかとなった。また、コアタンパク質を発現するトランスジェニックマウス(CoreTg)にLY-411575を投与すると、インスリン抵抗性や脂肪肝を改善させた。さらに、CoreTgからSPPを1対欠損させると、インスリン抵抗性や脂肪肝を発症しなかった。以上の成績から、SPPはHCVの粒子産生だけでなく、病原性発現にも関与する事が明らかとなった。LY-411575のようなSPP阻害剤はHCVの増殖と病原性発現の両方を制御できる新規の抗HCV治療薬となる可能性がある。

A. 研究目的

HCVに感染すると高率に慢性化し、肝硬変を経て肝細胞癌を発症する。peg化IFNとリバビリンの併用により治療効果に改善が認められているが、遺伝子型1b型の高ウイルス価の難治性C型肝炎患者に対する著効率は50%程度である。ウイルスのプロテアーゼやポリメラーゼ阻害剤が有用であることが明らかとなってきているが、耐性ウイルスの出現は明白であり、HCV増殖に必須の宿主因子を標的とすることが抗ウイルス治療において、最も有用な手段であると考えられる。シグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)はHCVのコアタンパク質の切断に関わる宿主因子であり、SPPによる切断を受けない組換えHCVは感染性ウイルスが放出できない。また、コアタンパク質を発現するコアトランスジェニックマウス(CoreTg)は2型糖尿病につながるインスリン抵抗性、脂肪肝を経て、肝癌を発症することから、HCV感染による病原性にコアタンパク質が深く関与している事が考えられる。そこで、宿主因子としてSPPに着目し、SPPによるHCVの増殖とHCVが誘導する病原性発現の影響を検討した。

B. 研究方法

HCVの複製を許容するヒト肝癌細胞株Huh7細胞からCRISPR/Cas9を用いてSPP遺伝子を

欠損させて、HCV増殖の影響を検討した。アルツハイマー病で原因となるアミロイド β (A β)はアミロイド β 前駆タンパク質(APP)が γ セクレターゼによって切断されて産生されるが、この γ セクレターゼの酵素活性中心のアミノ酸配列はSPPと相同性があり、 γ セクレターゼ阻害剤はSPPの酵素活性も阻害できる可能性がある。そこで、 γ セクレターゼ阻害剤のLY-411575のHCVの増殖や病原性発現への影響を検討した。さらに、SPP欠損マウスを作製し、CoreTgと交配することによって、コアタンパク質が誘導する病原性発現への影響を検討した。

(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する。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、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、個人情報情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

樹立したSPP欠損Huh7細胞株では、HCVの増殖が著しく減弱し、特に感染性HCVの放出が完全に阻害された。また、SPP欠損細

胞株に SPP の発現を回復させると、感染性粒子産生が回復することから、SPP が HCV の感染性粒子形成に必須な宿主因子であることが明らかとなった。また、 γ セクレターゼ阻害剤の LY-411575 の処理によっても粒子産生が阻害されることから、LY-411575 が SPP の活性を阻害することが示唆された。SPP 欠損細胞株におけるコアタンパク質の発現は親細胞に比べて、顕著に抑制されており、未成熟なコアタンパク質はプロテアソームによって速やかに分解されることが明らかとなった。コアタンパク質の不安定化は LY-411575 処理によっても再現された。したがって、SPP 遺伝子の発現制御や阻害剤の処理によって、コアタンパク質の発現を抑制できることが示された。また、コアタンパク質を発現する CoreTg に LY-411575 を経口投与しても体重変動や肝障害は示さなかったが、肝臓内におけるコアタンパク質の発現量は顕著に減少しており、インスリン抵抗性や脂肪肝を改善できることが示された。さらに、SPP 遺伝子を 1 対欠損させたした CoreTg はインスリン抵抗性や脂肪肝を発症しなかった。

D. 考察

HCV のコアタンパク質が SPP により切断されることはコアタンパク質の安定的な発現に必須であり、HCV の増殖だけでなく、病原性発現にも密接に関与していることが明らかとなった。SPP 欠損細胞で HCV の感染性粒子の放出が完全に阻害されたことから、LY-411575 のような SPP 阻害剤は、新規抗 HCV 薬となる可能性が示唆された。

E. 結論

SPP 阻害剤は HCV のコアタンパク質をプロテアソーム依存的な分解に誘導し、HCV の増殖だけでなく、病原性の発現を抑制できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, and Matsuura Y. Amphipathic α -Helices in

apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles.

PLoS Pathogens 2014; DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534

2. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, and Matsuura Y. Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus. *J. Virol.* 2014; 88: 5578-5594

2. 学会発表

1. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
2. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
3. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
4. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic α -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of HCV. 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
5. Sayaka Aizawa, Toru Okamoto, Takahisa Kouwaki, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura, Processing of core protein by signal peptide peptidase participates in propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014
6. Yoshiharu Matsuura, Toru Okamoto,

- Takasuke Fukuhara, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
7. 山本聡美、福原崇介、小野慎子、和田真実、塩川舞、岡本徹、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの感染におけるアポリポタンパク質受容体の役割、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 8. 和田真実、福原崇介、中村昇太、小野慎子、山本聡美、塩川舞、岡本徹、小池和彦、松浦善治、アポリポ蛋白質の両親媒性 α ヘリックスは HCV の感染性粒子産生に寄与する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 9. 岡本徹、相澤清香、杉山由加理、幸脇貴久、福原崇介、森石恆司、小池和彦、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの病原性発現におけるシグナルペプチドペプチダーゼの役割、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 10. 福原崇介、山本聡美、小野慎子、和田真実、岡本徹、茶山一彰、松浦善治、HCV の Quasispecies は増殖性に関与する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 11. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic α -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
 12. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
 13. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

脂肪肝と肝細胞癌の発症機構の解析

研究分担者 堤 武也 東京大学医学部 感染症内科 特任助教

研究要旨： HCV 感染は、ミトコンドリアの形態異常、機能異常をきたすことが知られており、コア蛋白によるミトコンドリア傷害の機序については、少しずつ解明されてきている。正常な細胞においては、傷害されたミトコンドリアはマイトファジーにより除去されるが、HCV 感染細胞では、このマイトファジーが抑制されていることが示唆される。そこで、HCV によるマイトファジー抑制の機序について解析した。コア蛋白発現細胞において、ミトコンドリア外膜に局在し、マイトファジー受容体である Bnip3 の発現が低下していた。さらにコア蛋白と Bnip3 との相互作用、Bnip3 の分解亢進が認められた。これらの結果から、HCV コア蛋白が Bnip3 の発現を調節することでマイトファジーを抑制している可能性が示唆された。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染は、ミトコンドリア機能障害による脂質代謝異常や酸化ストレス誘導を惹起することにより、脂肪肝や肝細胞癌の発症に深く関与していると考えられる。我々はこれまでに HCV のコア蛋白が *in vivo* においてミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアの形態異常、機能異常を引き起こすことを報告した。正常な細胞においては、傷害されたミトコンドリアはオートファジーの系により除去されるが、コア蛋白発現細胞では、ミトコンドリアのオートファジー（マイトファジー）が阻害されている可能性が示唆される。実際に、オートファジー関連蛋白をノックアウトすると、マウスにおいて発癌促進が認められることから、コア蛋白がマイトファジーを抑制することで肝発癌に寄与していることが考えられる。今回の研究では、マイトファジー抑制機序の解明、そしてそれに基づいた肝細胞癌発症予防の治療法の開発を目的として研究を行う。

B. 研究方法

すでに樹立された HCV コア蛋白を恒常的に発現する肝癌細胞株 HepG2 細胞を主に用いて研究を行った。必要に応じて、オートファジー誘導剤である rapamycin やプロテアソーム阻害剤である MG132 により細胞を処理し、mRNA や蛋白発現の解析を行った。また、当研究室で以前に樹立したコ

ア蛋白を発現するトランスジェニックマウスから摘出した肝臓についても同様の解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、「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」に則り、東京大学の医学研究倫理審査委員会に申請し、承認を得ている。

C. 研究結果

HCV コア蛋白発現 HepG2 細胞では、オートファジー誘導の抑制が認められた。マイトファジー受容体であるミトコンドリア外膜蛋白である Bnip3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3) の発現がコア発現細胞において低下していた。HCV 複製レプリコン細胞やコア遺伝子トランスジェニックマウス肝臓においても同様に Bnip3 の低下が認められた。シクロヘキシミドを用いた検討から、コア発現細胞では Bnip3 蛋白の安定性の低下が認められた。更に、免疫沈降法により、コア蛋白と Bnip3 の相互作用が認められた。また HCV 複製細胞において Bnip3 を siRNA によりノックダウンしたところ、HCV NS5A 蛋白の発現増加が認められ、Bnip3 が HCV 複製にも関与している可能

性が示唆された。

D. 考察

HCV コア蛋白は Bnip3 との相互作用によりその分解を亢進させ、マイトファジーを抑制していることが推測される。今後は、この相互作用の形式や Bnip3 分解亢進の機序を解明し、その結果を踏まえマイトファジー抑制を解除する治療方策を検討する予定である。

E. 結論

1. HCV コア蛋白はオートファジーを抑制する。
2. HCV コア蛋白は Bnip3 と相互作用し、その分解を亢進する。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ogishi M, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Gatanaga H, Ode H, Sugiura W, Moriya K, Oka S, Kimura S, Koike K. Deconvoluting the composition of low-frequency hepatitis C viral quasispecies: Comparison of genotypes and NS3 resistance-associated variants between HCV/HIV coinfecting hepophiliacs and HCV mono-infected patients in Japan. Plos One 2015 in press
2. Sekine S, Ito K, Watanabe H, Nakano T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Miyoshi H, Fujinaga H, Shinzawa S, Koike K, Horie T. Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein. Toxicol Appl Pharmacol 2015 in press
3. Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, Moriya K, Tsutsumi T, Koike K, Akatsuka T. Effect of the infectious dose and the presence of hepatitis C virus core gene on mouse intrahepatic CD8 T cells. Hepatol Res 2014;44: E240-252

2. 学会発表

1. Masato Ogishi, Hiroshi Yotsuyanagi, Takeya Tsutsumi, Hiroyuki Gatanaga, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike. Next-generation sequencing revealed the prevalence of multi-genotype/subtypic multiple infection of hepatitis C virus in hemophiliac patients in Japan. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2014, Boston, MA, USA, November 7-11, 2014
2. Takeya Tsutsumi, Kazuya Okushin, Kenichiro Enooku, Hidetaka Fujinaga, Kyoji Moriya, Hiroshi Yotsuyanagi, Kazuhiko Koike. Expression of Bnip3, a mitophagy-related gene, is decreased in cells expressing the core protein of hepatitis C virus. 21st International Meeting on HCV and Related Viruses, Banff, September 7-11, 2014.
3. Hidetaka Fujinaga, Seiko Shinzawa, Kazuya Okushin, Kenichiro Enooku, Takeya Tsutsumi, Kyoji Moriya, Hiroshi Yotsuyanagi, Kazuhiko Koike. Liver lesion in HCV core gene transgenic mice is ameliorated in lipid metabolism, mitochondria function and intrahepatic cardiolipin composition by fluvastatin treatment. 21st International Meeting on HCV and Related Viruses, Banff, September 7-11, 2014.
4. Kenichiro Enooku, Kazuya Okushin, Hidetaka Fujinaga, Takeya Tsutsumi, Kyoji Moriya, Hiroshi Yotsuyanagi, Hitoshi Ikeda, Kazuhiko Koike. Mitochondrial isoenzyme of creatine kinase may be a novel serum predictive marker for hepatocarcinogenesis in patients with chronic hepatitis who did not have HCC. 21st International Meeting on HCV and Related Viruses, Banff, September 7-11, 2014.

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

HCV 感染による肝線維化誘導の機構

研究分担者 鈴木哲朗 浜松医科大学 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）感染症における線維化誘導には TGF- β の活性化が考えられるがその分子機構は十分明らかにされていない。本研究では、HCV 感染に伴う線維化関連分子の発現変動解析、転写因子活性化解析などを通じて HCV 感染からの肝線維化誘導の機構解明を目指した。HCV 感染に起因する肝臓特異的転写因子 CREBH の活性化の分子機構について解析を進めた。また、HCV 感染による TGF β 2 発現誘導において HCV タンパク質発現による CREBH の活性化亢進が重要な役割を担うことを示す知見を得た。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)に対する有効な阻害剤の開発が進んでおりC型慢性肝炎患者からのウイルス排除が現実的になりつつある。しかしながら、HCVによる病態発症機序の解析は進んでいない。HCV感染によって誘発される肝臓の線維化が進行すると肝硬変、肝細胞癌の発症へ繋がることから、肝線維症の制御は不可逆的な肝不全を防ぐために非常に重要である。HCV感染症における線維化誘導にはTGF- β の活性化が考えられるがその分子機構は十分明らかにされていない。本研究では、HCV感染に伴う線維化関連分子の発現変動解析、またHCV感染肝細胞と肝星細胞株の共培養系解析などを通じてHCV感染からの肝線維化誘導の機構解明を目指す。

B. 研究方法

HCV感染にはHCVcc（JFH-1またはJ6/JFH-1）及びヒト肝癌細胞株HuH7を用いた。プロモーター活性はルシフェラーゼレポーターアッセイで評価した。pGL4.1ベクターに同プロモーター遺伝子またはその変異体遺伝子を挿入し作製した種々のレポータープラスミドを作製し肝癌細胞株へトランスフェクションし細胞内ルシフェラーゼ活性を測定した。Collagen type 1A1 (COL1A1)等のmRNA発現は定量RT-PCRで、蛋白発現はウエスタンブロット、免疫染色法で解析した。遺伝子ノックアウトにはsiRNAを、ノックアウト細胞作製にはCRISPR-Cas9システムを利用した。HCV感染または非感染HuH7細胞とヒト肝星細胞株TWNT4を等量混和し共培養系を作製した。

（倫理面への配慮）

すでに樹立された培養細胞株を使った研究であり倫理面の手続きは要しない。

C. 研究結果

昨年度、HCV感染に伴って細胞内でのTGF- β 特にTGF- β 2のmRNA発現亢進が顕著であることを報告した。今回、培養上清中のTGF- β 2タンパク質も上昇することを見出した。また、TGF- β 活性化因子であるTHBS1のmRNA発現もHCV感染後3日で約10倍まで上昇した。

HCV感染またはHCV Core-E1-E2-p7-NS2発現によりTGF- β 2プロモーター活性が亢進すること、プロモーター部分欠損変異体の解析から、HCVによる活性化には肝臓特異的転写因子CREBHの応答配列（CREBH-RE）が重要であることを見出しているが、今年度、CREBHとTGF- β 2プロモーターとの結合をゲルシフトアッセイで解析した。In vitro合成したCREBHはTGF- β 2プロモーター上のCRE配列及びCREBH-RE配列と効率よく結合することを見出した。さらに、CREBHの全長または活性型の発現ベクターを作製し、CREBH高発現によってTGF- β 2プロモーター活性及び実際のTGF- β 2発現が亢進することを見出した。さらにCREBHのloss-of-functionの解析を以下のように行った。HCV感染またはHCV Core-E1-E2-p7-NS2発現に伴うTGF- β 2の高発現がCREBHドミナントネガティブ体の強制発現によってキャンセルされた。siRNAでCREBHをノックダウンした細胞またCRISPR/cas9システムでCREBHをノックアウトした細胞ではHCV蛋白発現によるTGF- β 2

プロモーター活性の亢進が顕著に低下した。

D. 考察

本研究では、慢性肝疾患に対する新たな治療法の開発に資するため、HCV感染からの肝線維化発症のメカニズムを解明することを目指している。

細胞外基質の発現調節に働くサイトカインであるTGF β 2の発現がHCV感染によって亢進すること、それにはCREBHが関与する可能性が考えられることをプロモーターアッセイなどから示してきた。本年度は、HCV感染からのCREBH活性化の分子機構について解析を進め、またHCV感染によるTGF β 2発現誘導におけるCREBHの役割を明らかにする知見を得た。

肝臓特異的に発現する転写因子CREBHは小胞体ストレスに反応して前駆体が切断され活性型のCREBH-Nとなり標的遺伝子の発現調節に働くことが知られている。本研究の成績から、HCV感染細胞では、HCVタンパク質による小胞体ストレス惹起によってCREBHが活性化されTGF β 2発現が誘導されることが示唆され、このTGF β 2が肝星細胞に作用してCOL1A1発現亢進など、線維化誘導へ繋がる可能性が考えられた。

E. 結論

HCV感染に伴う肝特異的転写因子CREBHの活性化とCREBHによるTGF β 2発現亢進を明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.** 88: 7541-7555, 2014.

2. 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: 2220-2232, 2015,
3. 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.
4. Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. **J Virol Methods** 207: 38-44, 2014.
5. Lee J, Ahmed SR, Oh S, Kim J, Suzuki T, Parmar K, Park SS, Lee J, Park EY. A plasmon-assisted fluoro-immunoassay using gold nanoparticle-decorated carbon nanotubes for monitoring the influenza virus. **Biosens Bioelectron.** 64: 311-317, 2014.
6. Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, Suzuki T, Lee J, Park EY. Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection. **Biosens Bioelectron.** 58:33-39, 2014.

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。