

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

創薬と新規治療法開発に資する
ヒト肝細胞キメラマウスを用いた
肝炎ウイルス制御に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 26 年 (2014 年) 4 月

目 次

- . 総括研究報告
 - 創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた・・・1
肝炎ウイルス制御に関する研究
茶山 一彰

- . 分担研究報告
 - 1. 創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた・・・9
肝炎ウイルス制御に関する研究
吉里 勝利

 - 2. miR-122 による C 型肝炎ウイルス複製制御機構の解明・・・・・・・・・・14
金子 周一

 - 3. レプリコンを用いた C 型肝炎ウイルス増殖に關与する宿主分子の・・・18
網羅的解析、リバーシジェネティックスの構築に関する研究
土方 誠

 - 4. HCV 感染モデルマウスに対するインターフェロン- 遺伝子治療効果の・22
検討
高倉 喜信

 - 5. 次世代シーケンサーを用いた DAA 耐性 HCV の検討・・・・・・・・・・26
前川 伸哉

 - 6. HCV 感染の細胞特異性における Quasispecies の意義に関する検討・・・29
松浦 善治

 - 7. HCV 制御に關わる NK 細胞機能分子の解析・・・・・・・・・・32
大段 秀樹

 - 8. In vitro、in vivo 増殖系を用いた C 型肝炎ウイルス増殖のメカニズムの・36
解析と創薬への応用
脇田 隆字

9. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた新規抗 HCV 薬の効果判定	42
今村道雄	
. 研究成果の刊行に関する一覧表	47
. 研究成果の刊行物・別刷り	57

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス制御に関する研究

平成 25 年度総括報告書

研究代表者 茶山 一彰 広島大学大学院医歯薬保健学総合研究院 教授

研究要旨：われわれはヒト肝細胞キメラマウスを使用した C 型肝炎ウイルス（HCV）の感染系を確立して研究を行ってきた。本年度、このヒト肝細胞キメラマウスを用いた研究を中心にウイルス性肝炎の根治と病状緩和に有用な治療法を開発することを目的とし、創薬のシーズの探索、開発された薬剤の応用、肝炎モデルの創生の 3 点を中心に行い以下の知見を得た。

1. 創薬のシーズの探索

プロスタグランジン I 受容体アゴニストの HCV 感染阻害効果が見いだされた。HCV 感染における miR-122 の役割を解析し、miR-122 による HCV RNA の安定化には RISC 複合体が必須であり、特に RISC 複合体の中の Ago2 蛋白が、HCV RNA の安定化に必須であることを明らかとした。遺伝子型 2b の HCV 株のレプリコンを樹立し、さらにレプリコンゲノムに検出した適合変異を利用することにより、感染性ウイルスを作成することが可能となった。

2. 開発された薬剤の応用

次世代シーケンサーを用いて direct-acting antiviral agent (DAA) 末治療の HCV 患者の NS5A 領域を解析し、IL28B の遺伝子型と NS5A Y93 変異が関連していることを見出した。Telaprevir あるいは NS5A 阻害剤耐性型 HCV 感染マウスを作製し、薬剤治療効果を検討した。DAA を sequential に使用すると多剤耐性変異が出現することを見出した。長期持続型 IFN- γ 発現ベクターを HCV 感染マウスに hydrodynamic injection 法を用いて投与することにより、持続的に IFN- γ を遺伝子発現することが可能となり、高い抗 HCV 効果を得られることに成功した。肝移植後の HCV 再感染における NK 細胞のフェノタイプおよび quasispecies の意義を明らかにした。

3. 肝炎モデルの創生

HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスに NK 細胞を投与することにより肝炎モデルマウスの作製を試みている。また超免疫不全である NOG マウスに Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSVtk) 遺伝子を過剰発現させた TK-NOG マウスを用いた HCV 感染モデルを確立した。またマウスよりいくつかの利点を持つラットの肝臓をヒト化する技術の開発を行い、ラット肝芽細胞に特異的に障害を与えることが可能なトランスジェニックラットのファンダーを作製した。

【研究分担者】

吉里勝利 (株) フェニックスバイオ学術顧問	金子周一 金沢大学大学院医学系研究科教授
高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科教授	松浦喜治 大阪大学微生物研究所教授
脇田隆字 国立感染研究所ウイルス第二部部長	大段秀樹 広島大学大学院医学系研究科教授
土方 誠 京都大学ウイルス研究所准教授	前川伸哉 山梨大学大学院消化器内科学講師
今村道雄 広島大学大学院医学系研究科助教	

A. 研究目的

難治性のウイルス性肝炎患者に対する安全かつ有効な新規治療法の開発，あるいは問題となっている耐性ウイルスに対する対策が必要とされている．その克服のため，われわれはこれまでヒト肝細胞キメラマウスを使用した肝炎ウイルスの感染系を確立して研究を行ってきた．本研究は，このヒト肝細胞キメラマウスを用いて，ウイルス性肝炎の根治と病状緩和に有用な治療法を開発することを目的とし，(1) 創薬のシーズの探索，(2) 開発された薬剤の応用，(3) 肝炎モデルの創生，の3点を中心に行う．

B. 研究方法

(1) 創薬のシーズの探索に関する研究では，これまでに行ってきた研究である新規候補となる薬剤の抗ウイルス効果の検証あるいは肝炎ウイルスの感染による transcriptome の変化を網羅的に解析し，創薬のターゲットとなり得る分子の同定を行う．これらの発現解析には最近可能となった次世代シーケンサーによる網羅的発現解析を応用する．(2) 開発された薬剤の応用に関する研究では，HCV 培養系およびキメラマウスを使用して，野生型あるいは薬剤耐性型 HCV クローンを感染させ，各種 DAA 製剤に対する耐性ウイルスを作製し，それぞれに対してどのような薬剤が有効か，また，多剤併用でウイルスの完全な排除が可能かどうかについて検討し，IFN を使用しない治療法の確立を目指す．また有効

な drug delivery 技術の開発も試みる．さらに生体肝移植後の HCV 再感染のメカニズムの解明および治療法開発を試みる．(3) 肝炎モデルの創生に関する研究では，キメラマウスにヒトリンパ球が生着できる条件について検討を加える．さらに uPA/SCID マウス以外の肝炎モデル動物の構築も試みる．

C. 結果および考察

(1) 創薬のシーズの探索に関する研究

これまでトロンボキササン A_2 (TXA₂) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤によって感染性 HCV 産生が抑制されることを報告した．今年度は TXAS 阻害剤の抗 HCV 効果の分子機構の解明，また TXAS 阻害剤を投与したヒト肝細胞キメラマウスにおいて感染した HCV の感染伝播が回復していく現象が認められたのでその原因追及を目指した．JFH1 感染性粒子産生系において TXA₂ 受容体アゴニストとアンタゴニストの効果を検証したところ，双方とも全く効果を示さなかった．またキメラマウスの肝細胞や JFH1 感染性粒子産生系で用いられている HuH-7 細胞における TP の発現について検討したところ，これらの細胞では TP の発現がないことがわかった．このことから TXAS による感染性 HCV 産生の促進は TP を介さない未知の経路が関与していることがわかった (土方班員)．

HCV 感染における miR-122 の役割の解析を行った．培養細胞系での検討

から，miR-122 は，HCV の 5'UTR 領域に存在する結合部位への結合を介して HCV RNA を安定化することで HCV の蛋白合成を促進し，結果的に HCV 複製を促進することが明らかとなった．さらに miR-122 による HCV RNA の安定化には RISC 複合体が必須であり，特に RISC 複合体の中の Ago2 蛋白が，HCV RNA の安定化に必須であることを明らかとした（金子班員）．

創薬のシーズの探索に応用するため種々の遺伝子型の HCV 培養系の確立を試みた．本年度は遺伝子型 2b の HCV 株のレプリコンを樹立した．遺伝子型 2b 株のレプリコンゲノムに検出した適合変異を利用することにより，感染性ウイルスを作成することが可能となった（脇田班員）．

(2) 開発された薬剤の応用に関する研究

近年開発されている direct-acting antiviral agent (DAA) は著明な抗 HCV 効果を有するが耐性変異が問題となる．次世代シーケンサーシステムを用いて，C 型肝炎患者における NS5A 耐性変異の検討を行った．Daclatasvir (DCV) 未治療の対象 110 症例において DCV 耐性変異 Y93H は 30.9% (34/110) の症例に存在した．Y93H 症例はインターフェロン感受性関連因子であるコア番変異 ($p=0.03$)，IRRDR 変異数 ($p=0.01$)，IL28B SNP ($p=0.002$) と関連したが，特に IL28B SNP は Y93H 変異と独立して関連していることを見出した（前川班員）．ヒト肝細胞キメラマウスに関しては，

DAA 耐性 HCV 感染マウスを用いて telaprevir (TVR) あるいは NS5A 阻害剤耐性型 HCV 感染マウスを作製し薬剤治療効果を検討した．TVR + NS5A 阻害剤を併用投与すると両薬剤に対する 2 重耐性型 HCV が出現し breakthrough が生じ，さらに NS5B 阻害剤の投与により 3 重耐性型 HCV が出現した．DAA を sequential に使用すると多剤耐性変異型 HCV が出現するため注意が必要であることが示された（茶山，今村班員）．

ヒト肝細胞キメラマウスを用いて有効な drug delivery の開発を試みた．長期持続型 IFN- γ 発現ベクターを HCV 感染マウスに hydrodynamic injection 法を用いて投与することにより，持続的に IFN- γ を遺伝子発現することが可能となり，高い抗 HCV 効果を得られることに成功した．HCV の除去が確認されたマウスの肝臓において肝細胞の傷害はほとんど認められず，IFN- γ 遺伝子の持続的供給による安全かつ有効な HCV 治療法の開発の可能性が示された（高倉班員）．

HCV 関連肝疾患に対し，肝移植療法は有用な手段であるが，HCV 再感染が問題である．これまで生体肝移植後の HCV 再感染に対し，肝由来 Natural killer (NK) 細胞をレシピエントに投与することにより，ウイルス量の減少が得られることを報告していった．本年度はさらに HCV の感染抑制に働く NK 細胞のフェノタイプ解析を肝移植ドナー/レシピエントの肝臓内単核球

および末梢血単核球を用いて実施した。ドナーグラフト肝内在NK細胞のNKp46の発現強度には個体差があり，NKp46^{bright}細胞高含有率が肝移植後早期のHCV感染抑制に影響する可能性を確認した（大段班員）。また生体肝移植後のHCV再感染における遺伝子多型（Quasispecies）の意義を明らかにした。In vitroの感染系でHuh7に馴化したHCV（HCVcc/Huh7）とHep3Bに馴化したウイルス（HCVcc/Hep3B）を作製した。次世代シーケンスの結果，これらのウイルスは異なったQuasispeciesを保持しており，異なる宿主細胞株に感染した際に新たなQuasispeciesが出現することが明らかになった。HCVcc/Huh7はHuh7細胞に対してHCVcc/Hep3BはHep3B/miR-122細胞に対して高い感染性を示した。これらの成績からQuasispeciesは新しい宿主細胞に馴化するために重要な役割を果たしていることが示された（松浦班員）。

(3) 肝炎モデルの創生に関する研究

HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスにNK細胞を投与することにより肝炎モデルマウスの作製を試みている（茶山，今村班員）。また新規動物モデルとして超免疫不全であるNOGマウスにHerpes simplex virus type 1 thymidine kinase（HSVtk）遺伝子を過剰発現させたTK-NOGマウスを用いたHCV感染モデルを確立した（茶山，今村班員）。置換率が低値あったマウスにおいても，TK-NOGマウスはuPA-SCIDマウスよりも高い割合で感染が成立しており今

後，肝炎モデルとして発展させていく。

また創薬開発のツールとしてマウスよりいくつかの利点を持つラットの肝臓をヒト化する技術の開発を行った。本年度は，キメララット作成に必要なCre deleterラットの作成を試みた。京都大学中央動物実験センターよりユビキタスに発現するCAG-Cre Tgラット[W-Tg(CAG-cre)81Jmsk系統]受精卵の供給を受けてこの卵を発生させることによって必要なファンダーとすることにした。所定の手続きを経て入手した卵をWistar系統ラットの仮親内で発生させ19頭の産仔を離乳まで育成することができた。PCRによるジェノタイピングの結果，合計2頭のTg陽性個体を選別することができた。現在これらのTg陽性個体を育成し，コンディショナルDT-A BAC Tgラットと交配し繁殖させている（吉里班員）。

D. 考察

HCV培養系およびヒト肝細胞キメラマウスを用いて新規候補となる抗ウイルス剤あるいは新規治療法の開発を行った。また野生型あるいは種々の薬剤耐性型HCVクローンを用いることにより，各種DAA製剤に対する感受性あるいは耐性株出現の検討をin vitroおよびin vivoで行った。さらに肝炎モデルのマウスの作製は難治性ウイルス性肝炎に対する治療法開発につながるものとして期待される。

E. 結論

HCV 培養系およびヒト肝細胞キメラマウスを用いて，創薬のシーズの探索，開発された薬剤の応用，肝炎モデルの創生の検討が可能となった。

F. 健康危機情報

特になし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1) Shi N, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Zhang Y, Kosaka K, Okazaki A, Murakami E, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Takahashi S, Ochi H, Tateno-Mukaidani C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Gao M, Chayama K. Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. Gut. 2013 Jul;62(7):1055-61

2) Abe H, Hayes CN, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, Takahashi S, Ochi H, Chayama K. A Translational Study of Resistance Emergence Using Sequential Direct-Acting Antiviral Agents for Hepatitis C Using Ultra-Deep Sequencing. Am J Gastroenterol 108:1464-72, 2013

3) Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Nelson Hayes C, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. A novel

TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. Biochem Biophys Res Commun. 2013;441(1):230-5.

4) Abe Y., Aly H. H., Hiraga N., Imamura M., Wakita T., Shimotohno K., Chayama K., Hijikata M. Thromboxane A₂ Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers, Gastroenterology, 2013, 145, 658-667

5) Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura Y. Hum Gene Ther Clin Dev. 2014;25(1):28-39.

H . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

1) 特許登録：山口達哉、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人、下遠野邦忠、土方 誠、肝炎ウイルスの増殖方法、及びその利用、特許第 5327793 号、登録日：平成 25 年 8 月 2 日（土方班員）

2 . 実用新案登録 なし

3 . その他

1) 特許出願：山口達哉、土方 誠、臍臓由来体性幹細胞の製造方法、PCT/JP2013/074026、出願日 2013/09/06

2) 特許出願：山口達哉、土方 誠、腎臓由来体性幹細胞の製造方法、

PCT/JP2013/074028、出願日 2013/09/06

3) 特許出願：山口達哉、土方 誠、腸上皮由来体性幹細胞の製造方法、

PCT/JP2013/074032、出願日 2013/09/06

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成25年度）

創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた
肝炎ウイルス制御に関する研究

研究分担者 吉里勝利 株式会社フェニックスバイオ 学術顧問

研究要旨：次の3つの研究を行った。（1）肝炎ウイルスとヒト肝細胞の相互作用の解析。キメラマウスに HBVsAgL パーティクルを投与後、蛋白架橋剤 [3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl)propionate] を注入し肝臓組織を分離後その蛋白を2次元電気泳動法によって分析するという手法で、HBV 感染関連蛋白として GRP78 (HSPA5)を同定していた。本年度は本蛋白の役割を知るための研究を実施した。キメラマウス由来のヒト肝細胞を培養しその GRP78 遺伝子の発現を siRNA 処理によって低下させた後、HBV を感染させ感染9日での感染率を測定したところ処理しない細胞に比べて有意に低下していた。（2）キメララット作成。キメラマウスと補完的に利用できるキメララットの作製を昨年度に引き続き実施した。今年度はコビキタスに発現する CAG-Cre Tg ラットを繁殖させた。（3）生体内環境に近いヒト肝細胞培養法開発。HepG2 細胞をコラーゲンゲル中に3次的に分散させ、常時、新鮮培養液を灌流出来る装置で培養した（3次元フロー培養）。この方法で培養された肝細胞は灌流しない培養（ノンフロー培養）に比べてかなり高い増殖性を示した。

A. 研究目的

HCV の感染とそれを起因とする肝臓疾患の発症は、ウイルスと肝細胞の相互作用の結果であり、HCV 感染の初期の段階では、持続感染を成立させようとするウイルスと、これを排除しようとするヒト肝細胞の攻防が起きていると予想されるが、その詳細は不明である。ウイルスと肝細胞のこのような攻防の仕組みを明らかにするためのモデル実験系として、私達はヒト肝細胞で置換された肝臓を有するマウス(キメラマウス)を作製し、このマウスが上記仕組みの解明に有用・有効であることを明らかにして来た。本研究は、次の3つの目的を持って実施された。

目的1。肝炎ウイルスとヒト肝細胞の相互作用の解析。これまでの研究によって、GRP78 (HSPA5)が HBV とヒト肝細胞の相互作用に関わっていることを示す実験結果を得ている。本年度はこの蛋白質の機能を調べる研究を実施した。

目的2。キメラマウスと補完的に利用できるキメララットの作製研究。前年度に引き続きヒト肝細胞細胞で置換された肝臓を有

するキメララットの開発研究を実施した。目的3。生体内環境に近いヒト肝細胞培養法開発。私たちが開発した新しい細胞培養法（3次元コラーゲンゲルフロー培養法）でヒト肝細胞を培養してその性質を調べた。

B. 研究方法

目的1（肝炎ウイルスとヒト肝細胞の相互作用の解析）に関する研究。ヒト肝細胞の調製と培養は次の様に行った。Hispanic (2歳女児)由来のヒト肝細胞を移植し、キメラマウスを作製した。ヒト肝細胞移植後9-11週目のマウス肝臓から常法に従って肝細胞を分離し、ヒト肝細胞画分を得た。得られたヒト肝細胞をネガティブコントロール siRNA、HBV siRNA、GRP 78 siRNA をそれぞれコーティングした 96 穴プレート（サイトパスファインダー社製）に播種し、10%子牛血清を含む dHCGM 液で培養した。ノックダウン効果を検討するため、播種後2日目の細胞から RNA を回収し、GAPDH を内部標準としてリアルタイム PCR で GRP78 の発現量を解析した。HBV に対する効果を検

討するため、細胞を播種して4日目にHBVを接種した(5 Genome equivalent/cell, 4%PEG)。接種して2日後と3日後にそれぞれ培地を交換し、その後は、6日間培養を続け上清を回収した。上清中のHBsAg量を、ELISAで定量した。

目的2(キメラマウスと補完的に利用できるキメララットの作製研究)に関する研究。平成24年度研究によって、肝芽細胞特異的にdiphtheria toxinのドメインA(DTA)遺伝子を発現させるBAC Tgラットの作製することができた。今年度は、京都大学中央実験動物センターからユビキタスに発現するCAG-Cre Tgラットの受精卵を入手し、これを発生させ繁殖させることを行った。

目的3(生体内環境に近いヒト肝細胞培養法開発)に関する研究。ヒト肝細胞樹立株であるHepG2はATCC社から得た。コラーゲンゲル3次元培養装置は既報(平成25年度生化学会大会発表)の方法に従って作成した。コラーゲンゲルへの細胞の封入はコラーゲンゲルサンドイッチ法で行った。1mlの0.2%コラーゲンゲルをあらかじめ調製しておき、その上に 6×10^5 個の上記細胞を含む2mlの0.2%コラーゲンゲルを重畳し、培養液(10%子牛血清を含むDMEM液)を1ml/dayの流速で常時通液して6日間培養した。対照実験は、同様の培養条件で行ったが通液は行わず、ゲル上に1mlの新鮮培養液を添加し、この添加培養液を毎日交換した。6日目にゲルを倒立位相差顕微鏡で観察・写真撮影した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、遺伝子発現解析を実施した。キメラマウスに移植するヒト肝細胞は、海外から正式な手続きをもって購入した凍結ヒト肝細胞を用いた。動物実験においては、動物愛護ならびに福祉の観点から、必要最低限の供試動物を使用し、実験動物の生理、生態や習性等を理解し、動物に苦痛を与えないように最大限の配慮をした。

C. 結果

1. 肝炎ウイルス感染におけるGRP78の役割について。

私達はこれまでの研究によって、キメラマウスにHBVを感染させるとGRP78の遺伝子発現が低下することを示している。本年度は次の実験を実施した。GRP78に対するsiRNAを作成し、キメラマウスから調製したヒト肝細胞をこのsiRNAを導入したプレートで4日間培養した。この操作で肝細胞におけるGRP78遺伝子の発現レベルは対照群細胞と比較して5%以下に抑制された。このヒト肝細胞にHBVを感染させ一週間後に培養液中のウイルス量を定量したところ、siRNA処理群では対照群に比べておよそ半減しており、この減少は有意であった。この実験結果は、HBVの感染およびその増殖にGRP78が関与していることを示唆している。

2. キメララットの作製について

平成24年度の研究で、キメララット作成に必要なCre deleterラットの作成を試みた。Cre発現コンストラクトを受精卵前核期胚に注入したが、首尾よくこのコンストラクトを受け入れたファウンダーを得ることができなかった。そこで本年度は、京都大学中央動物実験センターに保存されているユビキタスに発現するCAG-Cre Tgラット[W-Tg(CAG-cre)81Jmsk系統]受精卵の供給を受けてこの卵を発生させることによって必要なファンダーとすることにした。所定の手続きを経て入手した卵をWistar系統ラットの仮親内で発生させ19頭の産仔を離乳まで育成することができた。PCRによるジェノタイプングの結果、合計2頭のTg陽性個体を選別することができた。現在これらのTg陽性個体を育成し、コンディショナルDT-A BAC Tgラットと交配し繁殖させている。

3. 生体内環境に近い培養系で培養されたヒト肝細胞の性質について。ヒト肝細胞を培養標準的な方法(プラスチック皿の表面に単層培養し適宜培養液を交換する方法)で培養しても増殖せず、正常な表現型発現も一週間程度に限られることが知られている。私たちは、キメラマウス肝臓で増殖させたヒト肝細胞をインビトロで有効に利用するために、従来の培養法の問題点を克服できる新しい培養法を開発することを目指している。本年度は、ヒト肝細胞としてHepG2細胞を用いて培養法の至適化実験を行った。研究方法の項で述べた方法(3次

元コラーゲンゲルフロー培養法)で本細胞を6日間培養した。対照実験では、培養液を通液しない3次元コラーゲンゲル培養法で同細胞を培養した。培養後コラーゲンゲルを鏡検し、視野当たりの細胞数を計測した。対照実験群に対してフロー培養群では細胞数が2.7倍増していることが判った。フロー培養法がヒト肝細胞の新しい培養法として利用できる可能性が出てきた。

D. 考察

私達はこれまでのキメラマウスを利用した研究によって、HBV感染に小胞体ストレス蛋白の1つとして知られているGRP78 (HSPA5)が関与している可能性を指摘してきた。本年度はこの可能性をより強固にするためにこの蛋白遺伝子発現を抑制した場合、HBVの感染効率に影響が出るかを調べた。GRP78遺伝子に対するsiRNAで処理されたヒト肝細胞では培養液に放出されるウイルス量がほぼ半減していた。この結果は、ウイルス感染によって肝細胞は小胞体ストレス状態になり、その状態はウイルス増殖にとって好環境になっている可能性を示唆している。今後、この考え方が正しいのか、ウイルス感染細胞で高発現することが知られているマーカー遺伝子の発現動態などを調べることによって検証していく必要がある。GRP78は、HBVの感染成立に必要な因子として働く(HBVレセプター補助機能)一方、感染成立後はウイルス増殖に対応する宿主因子として機能している可能性が考えられる。HCV感染に対しても同様な実験を実施したが有意な結果は得られなかった。HCV感染に対する顕著な効果を示す新薬が開発され、HBV感染患者に対する有効な治療法の開発が求められている。本研究によってGRP78をターゲットとしたHBV感染抑制法の可能性が出てきた。今後、この可能性についても詳細に検討する必要がある。

創薬開発のツールとしてキメラマウスは研究者の間で高い評価を得ている。一方、医薬品開発のための実験動物では、候補化合物の代謝パターンを調べるために充分量の血液サンプルを採取できることが望ましいがキメラマウスではその目的に十分には応えることができない。本研究ではキメラマウスと補完的に使用できるキメララット

の作製研究を実施した。本研究課題によってこのラット作成に必要な2系統のファンダー(肝芽細胞特異的にdiphtheria toxinのドメインA (DTA)遺伝子を発現するラットとCre deleter Tgラット)を作成することができた。今後これら2系統のファンダーを交配し目的のキメララットのための宿主作成を目指す予定である。

培養環境下でヒト肝細胞をその分化機能を維持させながら増殖させ、また、長期維持できる方法が開発されれば、医薬品開発のツールとしての価値が高い。本研究によって、ヒト肝細胞をコラーゲンゲル中で3次的に培養しかつ培養液を常時通液させればヒト肝細胞の増殖を促進させることができる可能性が出てきた。今後、キメラマウス由来のヒト肝細胞を用いてこの可能性を検証し、さらに分化機能なども詳細に調べ、3次元コラーゲンゲルフロー培養法の評価を行う予定である。

E. 結論

ヒト肝細胞へのHBV感染にGRP78 (HSPA5)がウイルス受容体の補助因子あるいは細胞内でのウイルス増殖に必要な宿主因子として関与して可能性を示唆する実験結果を得た。キメララット作成に必要な2系統のファンダー[肝芽細胞特異的にdiphtheria toxinのドメインA (DTA)遺伝子を発現するラットとCre deleter Tgラット]を作成することができた。生体内環境に近いヒト肝細胞培養法として3次元コラーゲンゲルフロー培養法の有用性を示唆する結果を得た。本研究は、石田雄二、齋藤夏美、大房健、塩田明、立野知世、及び吉里勝利によって行われた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, Murakami T, Tateno C, Yoshizato K, Kobayashi E. Transplantation of engineered chimeric liver with autologous hepatocytes and xenobiotic scaffold. *Ann Surg.* 2013;257(3):542-7.

(2) Tominaga K, Sasaki E, Sogawa M, Yamagami H, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe K, Watanabe T, Fujiwara Y, Kawada N, Yoshizato K, Arakawa T. Cytoglobin May Be Involved in the Healing Process of Gastric Mucosal Injuries in the Late Phase Without Angiogenesis. Tanaka F, Dig Dis Sci. 2013 Jan 10. [Epub ahead of print]

(3) Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Nov 8;441(1):230-5.

(4) Yoshizato K, Tateno C. A mouse with humanized liver as an animal model for predicting drug effects and for studying hepatic viral infection: where to next? Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2013 Nov;9(11):1419-35.

(5) Tachibana A, Tateno C, Yoshizato K. Repopulation of the immunosuppressed retrorsine-treated infant rat liver with human hepatocytes. Xenotransplantation. 2013 Jul-Aug;20(4):227-38.

(6) Shi N, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Zhang Y, Kosaka K, Okazaki A, Murakami E, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Takahashi S, Ochi H, Tateno-Mukaidani C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Gao M, Chayama K. Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. Gut. 2013 Jul;62(7):1055-61.

(7) Tateno C, Miya F, Wake K, Kataoka M, Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Kakuni M, Wisse E, Verheyen F, Inoue K, Sato K, Kudo A, Arii S, Itamoto T, Asahara T, Tsunoda T, Yoshizato K. Morphological and microarray analyses of human hepatocytes from xenogeneic host livers. Lab Invest. 2013 Jan;93(1):54-71.

2. 学会発表

齋藤 夏美, 足立 浩章, 田中 浩, 中田

悟, 河田 則文, 吉里 勝利. 常時通液環境下で培養されたヒト線維芽細胞の性質. 平成25年度日本生化学会大会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働省科学研究費肝炎等克服緊急対策研究事業
創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた
肝炎ウイルス制御に関する研究
分担研究報告書（平成 25 年度）

miR-122 による C 型肝炎ウイルス複製制御機構の解明

分担研究者 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科恒常性制御学 教授

研究要旨:肝特異的に発現するマイクロ RNA である miR-122 は HCV の複製に対して促進的に働くことが報告されている。そのため miR-122 に対するアンチセンス鎖を利用した抗 miR-122 療法は、HCV 複製を抑制することが知られており、実際抗 miR-122 療法による抗ウイルス効果は HCV 感染チンパンジーさらに HCV 感染患者においても証明され、今後の臨床応用が期待されている。しかしながら、miR-122 による HCV 複製機序は不明であったため今回その解明を行った。培養細胞系での検討から、miR-122 は、HCV の 5' UTR 領域に存在する結合部位への結合を介して HCV RNA を安定化することで HCV の蛋白合成を促進し、結果的に HCV 複製を促進することが明らかとなった。さらに miR-122 による HCV RNA の安定化には RISC 複合体が必須であり、特に RISC 複合体の中の Ago2 蛋白が、HCV RNA の安定化に必須であることを明らかとした。抗 miR-122 療法は、DAA 製剤で問題となっている薬剤耐性ウイルスが極めて出現しにくいことが知られており、今後 DAA 製剤との併用療法が期待される。

A. 研究目的

肝特異的に発現するマイクロ RNA である miR-122 は HCV の複製に促進的に働くことが報告されている。そのため miR-122 に対するアンチセンス鎖を利用した抗 miR-122 療法による抗ウイルス効果は、HCV 感染培養細胞系のみではなく、HCV 感染チンパンジー、さらには HCV 感染患者においても証明されている。そのため miR-122 を標的とした抗 miR-122 療法は、今後の C 型慢性肝炎の有効な新規治療法と考えられるが、miR-122 による HCV 複製制御機構は明らかではなかった。本年度は、miR-122 による HCV 複製制御機構を明らかにすることを目的とし以下の検討を行った。

B. 研究方法

1) miR-122 の HCV RNA 複製に対する影響を排除するため、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を有する NS5B の活性を有しな

い HCV RNA を作成した。また蛋白合成への影響も同時に評価するため HCV 遺伝子中に分泌型ルチフェラーゼを挿入した。この HCV RNA を miR-122 あるいは miR-122 アンチセンス鎖と共に肝癌細胞株 Huh-7.5 細胞に遺伝子導入し、HCV RNA の安定化作用の有無を northern blot 法にて、さらに蛋白に与える影響をルチフェラーゼ活性により評価した。

- 2) HCV 持続感染培養細胞を作成、高濃度 (EC50 の 10 倍濃度) の NS5B 阻害剤 (PSI-6130) を投与して、HCV RNA 合成を停止させ、直ちに miR-122 あるいは miR-122 アンチセンス鎖を投与し、HCV RNA の安定化作用の有無を検討した。
- 3) HCV 持続感染細胞を作成し、DICER、Ago1 から Ago4 蛋白に対する siRNA を投与して、HCV RNA 複製への影響を検討した。
- 4) Ago2 ノックアウト細胞に非複製 HCV RNA(1) で使用) を miR-122 あるいは miR-122 アンチセンス鎖と共に遺伝子導

入して、HCV RNA の安定化作用の有無を northern blot 法にて、さらに蛋白合成に与える影響をルチフェラーゼ活性により評価した。

(倫理面への配慮)

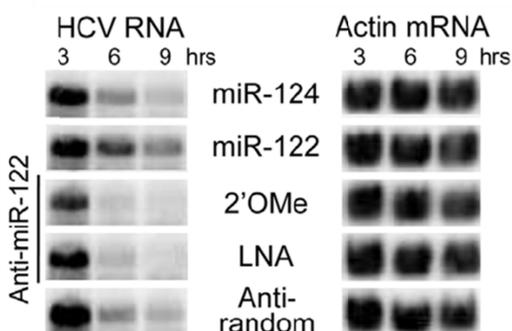
本研究では感染性粒子を産生する HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。

C. 研究結果

1) miR-122 の投与により非複製 HCV RNA は安定化され、miR-122 アンチセンス鎖の投与により、非複製 HCV RNA は不安定化された。(図 1) また miR-122 の投与により、非複製 HCV RNA からの蛋白合成は促成され、逆に miR-122 アンチセンス鎖の投与により、蛋白合成は抑制された。この結果から HCV RNA を安定化することで HCV の蛋白合成を促進し、結果的に HCV 複製を促進することが明らかとなった。

図 1

2) HCV 持続複製細胞においても miR-122 は HCV RNA を安定化し、逆に miR-122 アンチセンス鎖は HCV RNA を不安定化

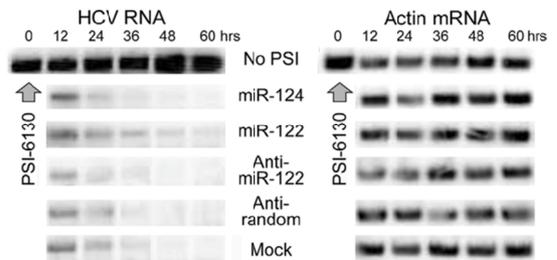


した。(図 2)

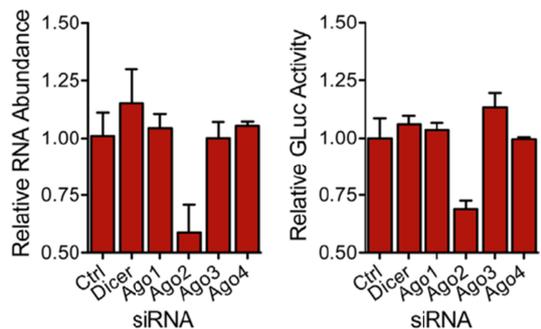
図 2

3) Ago2 蛋白の siRNA によるノックダウンにおいてのみ HCV 複製の抑制を認めた。(図 3)

図 3



4) Ago2 ノックアウト細胞では miR-122 による HCV RNA 安定化作用および蛋白合

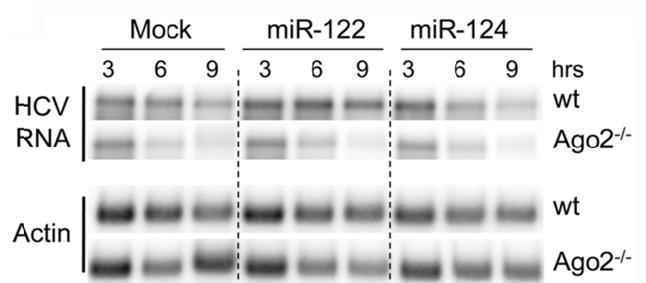


成促進作用は認めなかった。(図 4)

図 4

D. 考察

抗 miR-122 療法は DAA 製剤による抗ウイ



ルス療法で問題となっている薬剤耐性ウイルスが極めて出現しにくいことが知られている。しかしながら miR-122 非発現細胞においても HCV は複製することが知られており、抗 miR-122 療法単独での HCV の排除は困難と

考えられる。そのため抗 miR-122 療法と DAA 製剤の併用療法は DAA 製剤による薬剤耐性ウイルスの出現予防の点で極めて有用であり、今後検討を行う予定である。

E. 結論

- 1) miR-122 は HCV RNA を安定化することで HCV 複製を促進することが明らかとなった。
- 2) miR-122 による HCV RNA の安定化には Ago2 が必須であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A Seki, S Y akai, T Komura, A Nasti, K Yoshida, M Higashimoto, M Honda, S Usui, M Takamura, T Takamura, T Ochiya, K Furuichi, T Wada, S Kaneko. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. Hepatology 58(3):1133-42, 2013
- 2) T Shirasaki, M Honda, T Shimakami, R Horii, T Yamashita, Y Sakai, A Sakai, H Okada, R Watanabe, S Murakami, M Yi, SM Lemon, S Kaneko. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. J Virol 87(9):5270-86, 2013
- 3) T Ueda, M Honda, K Horimoto, S Aburatani, S Saito, T Yamashita, Y

Sakai, M Nakamura, H Takatori, H Sunagozaka, S Kaneko. Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling. Genomics 101(4):238-48, 2013

- 4) T Yamashita, M Honda, Y Nakamoto, M Baba, K Nio, Y Hara, SS Zeng, TH Kondo, H Takatori, T Yamashita, E Mizukoshi, H Ikeda, Y Zen, H Takamura, XW Wang, S Kaneko. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Hepatology 57(4):1484-97, 2013
- 5) Y Hodo, M Honda, A Tanaka, Y Nomura, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, E Mizukoshi, A Sakai, M Sasaki, Y Nakanuma, M Moriyama, S Kaneko. Association of Interleukin 28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. Clin Cancer Re 19(7):1827-37, 2013

2. 学会発表

- 1) Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Funaki M, Takabatake R, Lemon SM, and Kaneko S. Acyclic Retinoid, Peretinoin, Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Cell Culture, The 64rd AASLD2013, ワシントンDC, 2013年11月

- 2) Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C with advanced fibrosis via the TGF- signaling pathway. The 64th AASLD 2013, ワシントン DC , 2013 年 11 月

G. 所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

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）
創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた
肝炎ウイルス制御に関する研究
分担研究報告書（平成 25 年度）

レプリコンを用いた C 型肝炎ウイルス増殖に関する宿主分子の網羅的解析、
リバースジェネティックスの構築に関する研究

分担研究者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

研究要旨：前年度までに、トロンボキサン_{A2} (TXA₂) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤 Ozagrel が JFH1 感染性粒子産生系において HCV 感染性粒子産生阻害効果を示し、ヒト肝細胞キメラマウスにおいても患者血由来 HCV の感染増殖を阻害することを示してきた。今年度は TXAS 阻害剤の抗 HCV 効果の分子機構の解明、また TXAS 阻害剤を投与したヒト肝細胞キメラマウスにおいて感染した HCV の感染伝播が回復していく現象が認められたのでその原因追及を目指した。JFH1 感染性粒子産生系において TXA₂ 受容体 (TP) アゴニストとアンタゴニストの効果を検証したところ、双方とも全く効果を示さなかった。また、キメラマウスの肝細胞や JFH1 感染性粒子産生系で用いられている HuH-7 細胞における、TP の発現について検討したところ、これらの細胞では TP の発現がないことがわかった。このことから TXAS による感染性 HCV 産生の促進は TP を介さない未知の経路が関与していることがわかった。HCV の感染伝播が観察される Ozagrel 処理キメラマウスの血清を感染源として用いておこなった二次感染実験において、Ozagrel 処理をおこなった場合には、その感染伝播は抑制されなかった。このことから Ozagrel に対する抵抗性 HCV の出現が示唆された。以上の結果から、今後 TXAS による感染性 HCV 産生機構の解明による新規抗 HCV 薬剤標的の同定ならびに Ozagrel の至適投与量や他抗 HCV 薬との併用の検討をおこなう必要があると考えられた。

A. 研究目的

前年度までに、トロンボキサン A₂ (TXA₂) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤 Ozagrel が JFH1 感染性粒子産生系において HCV 感染性粒子産生阻害効果を示し、ヒト肝細胞キメラマウスにおいても患者血由来 HCV の感染増殖を阻害することを示してきた。また TXA₂ と相反する生理活性を有するプロスタグランジン I₂ (PGI₂) 受容体 (IP) アゴニストがキメラマウスを用いた抗 HCV 薬の評価系で同様の効果を示すことを明らかにしている。今年度は TXAS 阻害剤の抗 HCV 効果の分子機構の解明、また TXAS 阻害剤を投与したヒト肝細胞キメラマウスにおいて感染した HCV の感染伝播が回復してい

く現象が認められたのでその原因追及を目指した。

B. 研究方法

1. JFH1 感染性粒子産生系を用いて以下の点について解析した。
 - i. TXAS の基質であるプロスタグランジン H で組換え体 HCV 産生細胞を処理し、その細胞から産生される HCV 粒子の感染性を検討した。
 - ii. TP アンタゴニストで組換え体 HCV 産生細胞を処理し、その細胞から産生される HCV 粒子の感染性を検討した。
 - iii. TXAS 阻害剤存在下において TP アゴニストで組換え体 HCV 産生細胞を処理し、

その細胞から産生される HCV 粒子の感染性を検討した。

iv. 組換え体 HCV 産生細胞とヒト肝細胞キメラマウスの肝臓における TP 遺伝子の発現をそれぞれの総 RNA を用いた RT-PCR 法によって解析した。

2. 患者血清を用いて HCV を感染させたヒト肝細胞キメラマウスに、Ozagrel を投与した。その一ヶ月間後に採血し、得た血清を用いて、血清中の HCV を新たに未処理キメラマウスに感染させて、Ozagrel を投与した。Ozagrel を投与、あるいは未投与のマウスから、それぞれ一ヶ月間後に採血し、血清中の HCV ゲノム量を定量 RT-PCR によって測定した。

また、それぞれの血清中の HCVRNA ゲノムをサブクローン化し、その部分核酸配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いられているか不死化肝細胞はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認された研究に基づくものである。不死化肝細胞作製に用いた肝臓提供者へのインフォームド Consent や個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。また、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた実験はすべて広島大学において、広島大学の倫理委員会の承認のもとで実施されている。

C. 研究結果

1. 組換え体 HCV 産生細胞を TXAS の基質であるプロスタグランジン H で処理し、TXAS の活性を上昇させ、その細胞から産生される HCV 粒子の感染性を検討したところ、対照実験と比較して有為に感染性粒子の量が上昇していた。

2. 組換え体 HCV 産生細胞において TXAS によって産生されることが想定される TXA₂ の受容体 TP の働きを阻害する TP アンタゴニストで組換え体 HCV 産生細胞を処理したところ、対照実験と比較して、産生された HCV 粒子量は変化しなかった。

3. TXAS 阻害剤によって TXAS からの TXA₂ 産生を抑制し、その代わりに TXA₂ 受容体 TP を活性化することができる TP アゴニストで組換え体 HCV 産生細胞を処理した。その結果、細胞から産生された HCV 粒子の感染性は低下し、TP アゴニストは TXAS 阻害剤の効果を抑制できないことがわかった。

4. 組換え体 HCV 産生細胞とヒト肝細胞キメラマウスの肝臓では TP mRNA は全く検出することができなかった。

5. ヒト肝細胞キメラマウスに感染し、Ozagrel 投与下で少しずつ感染伝播していた HCV を二次的に新たなキメラマウスに感染させた。このマウスを再び Ozagrel で処理しても、Ozagrel による感染伝播抑制効果は認められなかった。

6. 5. において Ozagrel 抵抗性を示した HCV ゲノム塩基配列の一部について決定し、感受性を持つ HCV のものと比較した結果、複数のアミノ酸配列の変異を伴う塩基変異が認められた。

D. 考察

1. これまでに TXAS 阻害剤によって感染性 HCV 産生が抑制されることがわかってきたが、TXAS がどのようにその現象と関わっているのかは不明であった。前年度の研究から、TXAS の既知基質である PGH を加える事で感染性 HCV 産生が上昇することがわかった。このことは TXAS 活性により産生される TXA₂ が感染性 HCV 産生に関わるメディエーターである可能性を強く示唆した。TXA₂ は通常細胞表面上に存在する受容体分子 TP を介してそのシグナルと細胞内に伝えることが知られている。しかしながら、今年度の研究から、TP アゴニストやアンタゴニストは全く感染性 HCV 産生には影響しない事、そしてキメラマウスや感染性 HCV 産生細胞では TP 分子が産生されていないことがわかり、この感染性 HCV 産生に対する TXAS の機能は TP に依存しないものであることがわかった。また、このことは、ヒト肝細胞において TXA₂

は既知の TP を介したシグナル系以外のメカニズムで細胞にシグナルを伝える可能性が考えられた。

2. 患者血由来 HCV を感染させたヒト肝細胞キメラマウスに TXAS 阻害剤 Ozagrel を投与した時に、マウス血清中に増加してくる HCV には、感染性 HCV が含まれていることがわかり、その HCV には Ozagrel 抵抗性の変異型 HCV が含まれている可能性が考えられた。

E. 結論

感染性 HCV 産生における TXAS の機能はまだ不明であるが、TXAS によって産生される TXA₂ がその機能に重要であり、未知のシグナル系が関与していることがわかった。この未知のシグナル系を明らかにすることで、より特異性の高い抗 HCV 薬の標的分子を見出すことが可能であると考えられた。Ozagrel 投与ヒト肝細胞キメラマウスにおける抵抗性 HCV の出現から、この薬剤の至適投与量を検討する必要性と他の抗 HCV 薬剤との併用を検討する必要性が強く示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Abe Y., Aly H. H., Hiraga N., Imamura M., Wakita T., Shimotohno K., Chayama K., Hijikata M. Thromboxane A₂ Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers, *Gastroenterology*, 2013, 145, 658-667
- 2) Kuroki M., Ariumi Y., Hijikata M., Ikeda M., Dansako H., Wakita T., Shimotohno K., Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013, 430, 592-597

2. 学会発表

- 1) Yuichi Abe, Aly H. Hussein, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Kazuaki Chayama, Makoto Hijikata: Thromboxane A₂ Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus. 20th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, Oct 6-10, 2013
- 2) Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Type I and type III interferon play anti-viral roles cooperatively in human hepatocytes to prevent early infection spread of viruses. 20th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, Oct 6-10, 2013
- 3) 阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、平賀伸彦、今村道雄、脇田隆字、下遠野邦忠、茶山一彰、土方 誠：トロンボキサン A₂ 合成酵素は感染性 HCV 粒子形成を制御する、第 9 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、平成 25 年 6 月 29 日、広島、2013 年
- 4) 土方 誠、”C 型肝炎治療薬の新たな分子標的の探索” 第 13 回肝疾患フォーラム 学術集会、2013 年 11 月 9 日レルミエール、大阪
- 5) 津川陽司、加藤博己、藤田尚志、下遠野邦忠、土方誠：ヒト肝細胞の抗ウイルス初期応答において 型および 型インターフェロンは協調的に作用する、第 61 回日本ウイルス学会学術集会 平成 25 年 11 月 10-12 日、神戸 2013 年

6) 阿部雄一、長谷川輝、アリ・ハッサン・フセイン、平賀伸彦、今村道雄、脇田隆字、下遠野邦忠、茶山一彰、土方 誠：トロンボキサン A₂ 合成酵素は C 型肝炎ウイルスの感染性粒子形成を制御する、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸 2013 年 12 月 3-6 日

7) 赤堀祐一、岡村瞳、久島透嘉・土方 誠：C 型肝炎ウイルス感染検出培養細胞系の開発、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸 2013 年 12 月 3-6 日

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 特許登録：山口達哉、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人、下遠野邦忠、土方 誠、肝

炎ウイルスの増殖方法、及びその利用、特許第 5327793 号、登録日：平成 25 年 8 月 2 日

2. 実用新案登録
なし

3. その他

1) 特許出願：山口達哉、土方 誠、臍臓由来体性幹細胞の製造方法、

PCT/JP2013/074026、出願日 2013/09/06

2) 特許出願：山口達哉、土方 誠、腎臓由来体性幹細胞の製造方法、

PCT/JP2013/074028、出願日 2013/09/06

3) 特許出願：山口達哉、土方 誠、腸上皮由来体性幹細胞の製造方法、

PCT/JP2013/074032、出願日 2013/09/06

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）

創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた

肝炎ウイルス制御に関する研究

HCV感染モデルマウスに対するインターフェロン- γ 遺伝子治療効果の検討

研究分担者 高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 これまでの検討においてインターフェロン- α (IFN- α)抵抗性HCVを高レベルで感染させたヒト肝細胞キメラマウスを用いて、*in vivo*において持続的にIFN- γ を発現するIFN- γ 発現plasmid DNA (pDNA)をハイドロダイナミクス法を用いて遺伝子導入することで、強力な抗HCV効果が得られることを報告した。また、一過性にIFN- γ を発現するpDNAを用いた場合の抗HCV効果を予備的に評価した結果、弱い抗HCV効果が得られる可能性を見出していた。そこで、HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスの個体数を増やし、一過性IFN- γ 発現の意義を検討した。その結果、一過性発現を示すベクターを投与した4匹中1匹においてpDNA投与後早期に血清中HCV RNA量が検出限界以下にまで減少したが、リバウンド現象が認められた。また、残りの3個体においては投与後初期に血清中HCV RNA量が多少は減少する傾向が見られたものの、抗HCV効果はほとんど観察されなかった。持続的なIFN- γ 発現による肝障害の可能性について検討するために、血清中ALTのレベルについて経時的に測定したところ、投与後初期に一過性に上昇する傾向が認められたが観察終了時にはALTはもとのレベルに回復していた。また、投与後初期および観察終了時のマウスの肝臓切片を観察したところ、肝細胞への傷害はほとんど認められなかった。以上の結果はIFN- γ 遺伝子の持続的供給によって安全かつ有効なHCV治療が可能となることを示すものとする。

A . 研究目的

これまでの検討で、長期のIFN- γ 遺伝子発現を可能とするpDNAであるpCpG-IFN- γ をハイドロダイナミクス法により投与することで、持続的なIFN- γ の遺伝子発現が得られるとともに、HCV感染キメラマウスにおいて高い抗HCV効果が得られることを報告した。また、その効果発現におけるIFN- γ の遺伝子発現の持続性の意義について検討するために、予備的に一過性のIFN- γ 発現を

示す短期発現型のIFN- γ 発現pDNA、pCMV-IFN- γ をHCV感染キメラマウスに遺伝子導入することで、弱いながらも抗HCV効果が得られる可能性を報告していた。そこで本研究では短期発現型IFN- γ 発現pDNAの投与群、およびネガティブコントロールとして生理活性を持たないレポータータンパク質である *Gaussia luciferase* (gLuc)をコードしたpDNA、pCpG-gLucの投

与群の検体数を増やし、IFN- γ 遺伝子治療の有効性についてより詳細に評価するとともに、その発現の持続性がC型肝炎に対する治療効果に及ぼす影響について評価した。

また、持続的なIFN- γ 遺伝子発現による肝臓への傷害が懸念されたことから、pCpG-IFN- γ を投与された個体において経時的に血中のALT活性を測定することで肝傷害性について評価した。併せて肝臓から切片を作製しHE染色を行うことで、持続的なIFN- γ 遺伝子発現が肝臓に与える障害の有無についてより詳細に評価した。

B . 研究方法

pDNA: IFN- γ 発現pDNAとして、pCpG-IFN- γ およびpCMV-IFN- γ を用いた。別途gLucを発現するpDNA、pCpG-gLucを用いた。ヒト肝細胞キメラマウス: uPA-SCIDマウスにヒト肝細胞を移植することで作製した高置換キメラマウスを用いた。HCV感染モデル: 高置換キメラマウスにHCV genotype 1bを感染させることで治療抵抗性C型肝炎モデルマウスを作製した。ハイドロダイナミクス法を利用したマウスへの遺伝子導入と遺伝子発現の評価: naked pDNAをマウス体重の約10%に相当する容量の生理食塩水に溶解し、マウス尾静脈内に急速投与した。血中IFN- γ 濃度はELISA法により測定した。血中のgLuc量は、ルシフェラーゼアッセイにより測定した。抗HCV効果の評価: 経時的に採血し、real-time PCR法にて血中HCV RNA量を測定した。また、遺伝子導入から8週間後に肝臓を回収し、nested PCR法を用いて肝臓中HCV RNAの検出を行った。血清中ALT活性の評価: pCpG-IFN- γ を遺伝子導

入したマウスについて、遺伝子投与後、経時的に採血を行った後、和光純薬社のキットを用いてALT活性を測定した。肝臓の組織学的観察: pCpG-IFN- γ を遺伝子導入したマウスについて、肝臓の切片を作製後にHE染色、あるいは抗ヒトアルブミン抗体を用いた免疫組織染色を行った後、顕微鏡観察を行った。

C . 研究結果

これまでに、持続的なIFN- γ 遺伝子発現が得られるベクターであるpCpG-IFN- γ の投与によって抗HCV効果が得られることを報告している。そこで、比較対象としてpCpG-gLucを計4匹のHCV感染キメラマウスに投与したところ、投与した全個体で投与から8週間後まで持続的に血清中gLuc活性が得られた。また、pCpG-gLucの投与によっては血中HCVレベルは変動しなかった。

HCV感染キメラマウスに対して短期発現型IFN- γ 発現pDNAであるpCMV-IFN- γ を投与することで抗HCV効果が得られる可能性をこれまでに報告していた。そこで本研究では検体数を増やしてIFN- γ 発現の持続性が抗HCV効果に及ぼす影響についてさらに検討した。その結果、pCMV-IFN- γ の遺伝子導入を行った計4匹の個体のうち、治療開始前の血中HCVレベルが最も低かった個体において、血中HCV RNA量の減少が認められ、20日後以降は検出限界以下になったが、血清中にIFN- γ がほぼ検出されなくなった投与30日以降は再び血中HCV RNAが検出されるようになった。また同個体から治療開始70日後に回収した肝臓中か

らもHCV RNAが検出された。他の3個体においては投与後早期から一過性に血中IFN- γ 濃度が得られたものの、血中HCVレベルの低下はほとんど認められなかった。

pCpG-IFN- γ を遺伝子導入したマウスについて、経時的に血中のALT量を測定することで、肝障害を評価した。その結果、6匹中5匹において遺伝子投与3日後から7日後にかけて、血中ALTレベルが上昇したが、遺伝子導入から4週間後にはもとのレベルに回復していた。また、血中ALTレベルが上昇していた遺伝子導入3日後および経過観察を終了した導入8週間後に肝臓を回収し、切片を作製した後にHE染色を行い、肝臓における傷害性の有無を判定した。その結果、両時点においてヒト由来肝細胞、マウス由来肝細胞いずれにおいても明確な傷害は認められなかった。

D . 考察

本研究ではこれまでにI型IFN抵抗性HCV感染キメラマウスに対して、持続的なIFN- γ 発現を示すpDNAを導入することで優れた治療効果が得られることを既に報告していたが、今回は短期発現型IFN- γ およびレポータータンパク質発現pDNAの遺伝子導入を行い、抗HCV効果との相関関係を評価することで、IFN- γ の治療効果についてより厳密に検証した。

その結果、短期IFN- γ 発現pDNAの投与によって、血中HCVウイルス量の少なかった個体においてのみ抗HCV効果が得られたが、IFN- γ 濃度が検出限界以下にまで低下した後にリバウンド現象が見られたことから、長期的な抗HCV効果を得るにはIFN- γ を持

続的に発現させることが望ましいことが明らかとなった。また、生理活性を持たないレポータータンパク質であるgLucをコードしたpDNAの投与ではほとんど効果が得られなかったことから、IFN- γ 遺伝子導入により得られた抗HCV効果は、遺伝子導入の操作によるものではなく発現するIFN- γ によるものであることを確認した。

また、IFN- γ を肝臓で発現させることによる肝臓への傷害性が懸念され、血中のALTレベルの一過性の上昇が認められたが、時間経過とともに回復したことから、その程度は小さいものと考えられる。また、血中ALTレベルが上昇していたIFN- γ 遺伝子導入3日後の組織像を観察しても明確に肝傷害を示す像は得られなかったことから、肝障害の程度は非常に軽微であったものと考えられる。また、持続的にIFN- γ を作用させた、遺伝子導入8週間後の組織観察の結果からも明確な肝障害を示す像は得られなかった。これらの結果は、IFN- γ 遺伝子治療の安全性を示すものと考えられる。

これらの結果は、I型IFN抵抗性HCVに対するIFN- γ 遺伝子治療の有用性を示すものと考えられる。

E . 結論

IFN- γ を作用させることで高い抗HCV効果が得られるが、特に持続的なIFN- γ の作用が望ましいこと、また持続的なIFN- γ の作用によっても標的組織である肝臓への傷害性は小さいことが明らかとなった。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura Y. Long-term elimination of hepatitis C virus from human hepatocyte chimeric mice after interferon- γ gene transfer. Hum Gene Ther Clin Dev. 2013 in press
2. Uno S, Nishikawa M, Mohri K, Umeki Y, Matsuzaki N, Takahashi Y, Fujita H, Kadowaki N, Takakura Y. Efficient delivery of immunostimulatory DNA to mouse and human immune cells through the construction of polypod-like structured DNA. Nanomedicine. 2013 in press
3. Mukumoto H, Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, Takakura Y. Expression profile-dependent improvement of insulin sensitivity by gene delivery of interleukin-6 in a mouse model of type II diabetes. Mol Pharm. 2013. 10(10):3812-3821
4. Miyakawa N, Nishikawa M, Takahashi Y, Ando M, Misaka M, Watanabe Y, Takakura Y. Gene delivery of albumin binding peptide-interferon-gamma fusion protein with improved pharmacokinetic properties and sustained biological activity. J Pharm Sci. 2013. 102(9):3110-3118.

2. 学会発表

1. Watcharanurak K, Zang L, Nishikawa M, Yoshinaga K, Takahashi Y, Yamamoto Y, Saito K, Murakami Y, Takakura Y. “Upregulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 by interferon γ gene transfer and its effects on tumor growth in mice” 第 29 回 日本 DDS 学会、京都、2013 年 7 月
2. 安藤満、高橋有己、西川元也、平賀信彦、今村道雄、茶山一彰、高倉喜信 “ヒト肝細胞キメラマウスを用いたインターフェロン γ 遺伝子導入による治療抵抗性慢性 C 型肝炎治療 ” 第 29 回 日本 DDS 学会、京都、2013 年 7 月
3. Ando M, Takahashi Y, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura Y. “Long-term exposure of interferon γ overcame interferon α -resistance of hepatitis C in human hepatocyte chimeric mice” 5th Asian Arden Conference, Nagoya, Japan, August, 2013

H . 知的所有権の取得状況

特になし

厚生労働省科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた
肝炎ウイルス制御に関する研究
分担研究報告書(平成25年度)

次世代シーケンサーを用いた DAA 耐性 HCV の検討

分担研究者: 前川 伸哉

山梨大学大学院医学工学総合研究部・肝疾患地域先端医療システム学講座 講師

研究要旨: 近年多数開発されている DAA(Direct acting antiviral agents)は、従来の非特異的抗ウイルス剤であるインターフェロンと比して、C 型肝炎ウイルス(HCV)に対する強い抗ウイルス効果が示されている。本検討では、プロテアーゼ阻害薬 telaprevir(TVR)、また NS5A 阻害剤 daclatasvir(DCV)において、DAA 耐性 HCV の臨床的意義を明らかにすることを目的として deep sequence による HCV quasispecies の検討を行った。TVR に関して、IFN に感受性が低い IL28B minor type で変異ウイルス出現率が高い傾向あり、十分な薬剤投与が得られないと治療不成功に終わる可能性があると考えられた。また non-SVR 症例の一部では耐性 HCV の優位な状態が長く持続しており次世代 DAA 治療に対する注意が必要であった。DCV に関しては Y93H の頻度が高いことが確認され、治療導入に際して留意すべきことが考えられた。

A. 研究背景・目的

近年多数開発されている DAA(Direct acting antiviral agents)は、従来の非特異的抗ウイルス剤であるインターフェロンと比して、C 型肝炎ウイルス(HCV)に対する強い抗ウイルス効果が示されている。

一方で、一部の症例においては DAA 耐性 HCV が治療前から存在することが明らかになりつつあるが、これらが臨床的耐性にどのように関与するのか明らかとなっていない。さらに DAA 治療 non-SVR 症例において、non-SVR の原因となった DAA 耐性 HCV が宿主内でどのような動態を呈するのか、またこれらが次々世代の DAA 製剤への臨床的耐性に関与するのか明らかになって

はいない。

本検討では、既に上梓されているプロテアーゼ阻害薬 telaprevir(TVR)、また近い将来上梓されることが予想されている NS5A 阻害剤 daclatasvir(DCV)において、DAA 耐性 HCV の臨床的意義を明らかにすることを目的として deep sequence による HCV quasispecies の検討を行った。

B. 研究方法(2013年度)

(1)TVR を含む 3 剤併用療法(PEG-IFN/RBV/TVR)を施行した 21 症例において、治療前と治療開始後 12 時間後の TVR 耐性 HCV について、NS3 領域における deep sequence を行い臨床因子との関連を検討した。

(2) NS5A 阻害剤 DCV 無治療症例 110 症

例において、deep sequence を行い、DCV 耐性 HCV と関連する臨床的因子について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は梨大学における倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究成果

(1) TVR 治療開始前には僅かな耐性変異は殆どの症例に存在した(17/21, 81%)が、PEG-IFN/RBV/TVR 治療における SVR との明らかな関連は認めなかった。しかしながら治療 12 時間後に耐性変異はさらに増加し(20/21, 95%)、IL28TG/GG 症例において、耐性変異の増加をより強く認めた。

一方、non-SVR 症例の 5/8(62.5%)において、治療終了時に既知の TVR 耐性変異が優位となっていることが観察され、また 5 例中 2 例は治療終了後 1 年経過しても TVR 耐性変異の優位な状態が持続していた。

(2) DCV 未治療の対象 110 症例において、DCV 耐性変異 Y93H は deep sequence にて 30.9% (34/110) の症例に存在した。Y93H 症例はインターフェロン感受性関連因子であるコア番変異($p=0.03$)、IRRDR 変異数($p=0.01$)、IL28B SNP($p=0.002$)と関連したが、特に IL28B SNP は Y93H 変異と独立して関連していた。

D. 考察

TVR に関して、IFN に感受性が低い IL28B minor type で変異ウイルス出現率が高い傾向あり、十分な薬剤投与が得られないと治療不成功に終わる可能性があると考えられた。また non-SVR 症例の一部では耐性

HCV の優位な状態が長く持続しており次世代 DAA 治療に対する注意が必要であった。

また DCV に関しては Y93H の頻度が高いことが確認され、治療導入に際して留意すべきことが考えられた。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた Deep Sequence によって、わずかな DAA 耐性変異ウイルスを高感度に検出することが可能となった。今後、さまざまな DAA 剤の登場が見込まれる状況において、Deep Sequence を用いた解析の重要性は高まっていく可能性が考えられた。

F. 研究発表論文発表

I. 論文発表

1. Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T, Araki T, Enomoto N. Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoteric acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatol Res.* 2014 Feb 14. [Epub ahead of print]
2. Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Shindo H, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, Moriishi K.

- Inhibitory effects of caffeic Acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus.
PLoS One. 2013 Dec 17;8(12):e82299.
3. Maekawa S, Enomoto N.
Once-daily simeprevir in combination with pegylated-interferon and ribavirin: a new horizon in the era of direct-acting antiviral agent therapy for chronic hepatitis C.
J Gastroenterol. 2014 Jan;49(1):163-4.
 4. Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.
Deep-sequencing analysis of the association between the quasispecies nature of the hepatitis C virus core region and disease progression.
J Virol. 2013 Dec;87(23):12541-51.
 5. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.
IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication.
J Viral Hepat. 2013 Apr;20(4):281-9.
 6. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N.
Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C.
J Med Virol. 2013 Mar;85(3):449-58.
 7. Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.
Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C.
Hepatol Res. 2013 Aug;43(8):865-75.

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた
肝炎ウイルス制御に関する研究
分担研究報告書（平成 25 年度）

HCV 感染の細胞特異性における Quasispecies の意義に関する検討

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： C 型肝炎ウイルス(HCV)の慢性感染に伴う末期肝硬変および肝細胞癌に対する治療として肝臓移植が広く行われているが、肝移植後再発肝炎は難治性であり、再感染機構を解明する必要がある。本研究は、新しいグラフトへの再感染における HCV の遺伝子多型 (Quasispecies)の意義を明らかにすることを目的とした。In vitro の感染系で、Huh7 に馴化した HCV (HCVcc/Huh7)と Hep3B に馴化したウイルス (HCVcc/Hep3B)を作製した。次世代シーケンスの結果、これらのウイルスは異なった Quasispecies を保持しており、異なる宿主細胞株に感染した際に、新たな Quasispecies が出現することが明らかになった。HCVcc/Huh7 は Huh7 細胞に対して、HCVcc/Hep3B は Hep3B/miR-122 細胞に対して高い感染性を示した。これらの成績から、Quasispecies は新しい宿主細胞に馴化するために重要な役割を果たしていることが示された。HCV の Quasispecies は移植時のドナーグラフトや新規感染における感染成立に重要な役割を担う可能性が示唆された。

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。ペグ化 IFN とリバビリン、プロテアーゼ阻害剤の併用により治療効果に改善が認められているが、末期肝硬変や切除不能な肝癌に対する治療法は肝移植のみである。肝移植後再発 C 型肝炎は難治性であり、HCV の再感染機構を明らかにする必要がある。我々は、miR-122 を強制発現させた Hep3B 細胞 (Hep3B/miR-122 細胞)が Huh7 細胞と同程度に、遺伝子型 2a の JFH1 株由来の HCV 実験室株 (HCVcc)に感受性を示すことを明らかにした。本研究では HCVcc が増幅可能な細胞株である Huh7 細胞と Hep3B/miR-122 細胞、さらに in vivo モデルとしてヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HCV の感染特異性の決定における、Quasispecies の意義を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

In vitro で合成した JFH1 株由来の HCV RNA を Huh7.5.1 および Hep3B/miR-122 細胞に導入し、それぞれの細胞でウイルスを継代し、それぞれの細胞に馴化した HCVcc/Huh7 と HCVcc/Hep3B の遺伝子変化を、次世代シーケンサーで解析するとともに、HCVcc/Huh7 と HCVcc/Hep3B の感染性を評価した。さらに、それらのウイルスを異なる細胞に感染させた際の Quasispecies の変化を解析した。また、HCVcc/Huh7 および HCVcc/Hep3B を 2 種類のドナー由来のヒト肝細胞キメラマウスに接種し、Quasispecies の変化を検討した。

（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、個人情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

In vitro で合成した HCV RNA を導入後、Huh7.5.1 細胞では 18 日後に、Hep3B/miR-122 細胞では 55 日後に、 10^5 FFU/ml を超える感染性粒子が産生された。Huh7 に馴化したウイルス HCVcc/Huh7 と Hep3B に馴化したウイルス HCVcc/Hep3B にそれぞれ獲得変異が同定され、HCVcc/Huh7 は Huh7.5.1 細胞に、また、HCVcc/Hep3B は Hep3B/miR-122 細胞に高い感染性を示した。さらに、HCVcc/Hep3B と HCVcc/Huh7 を、それぞれ Huh7 細胞と Hep3B 細胞に再度馴化させたところ、新たな Quasispecies が出現した。出現した変異を導入した HCV RNA は細胞特異的な感染性の違いを認めなかったことから、細胞特異的な感染性には単一の変異ではなく、Quasispecies が重要な役割を演じていることが示唆された。また、HCVcc/Huh7 と HCVcc/Hep3B は 2 種類のドナー由来のヒト肝細胞キメラマウスに同等の感染性を示した。現在、Quasispecies の変化を解析中である。

D. 考察

HCV 感染における Quasispecies の役割を、Huh7 細胞と Hep3B/miR-122 細胞で検討した結果、HCV が細胞特異的に高い感染性を獲得するためには、Quasispecies が重要な役割を果たしていることが示された。また、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、in vivo での Quasispecies の変化を検討しており、In vivo における HCV の感染性における Quasispecies の意義をより詳細に明らかにすることができると考えられる。

E. 結論

HCV の Quasispecies は、肝移植時のドナーグラフトや新規の感染に重要な役割を担う可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J Virol* 2013;87:489-502
2. Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki T. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog* 2013;(doi: 10.1371/journal.ppat.1003589)
3. Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, Matsuura Y, Saitoh T, and Akira S. Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:12379-12384
4. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, and Takehara T. Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 2013;57:1705-1715
5. Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, Matsuura Y, Yamamoto M, and Takeda K. Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J Virol* 2013;87:9997-10003
6. Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Understanding the biological context of NS5A-host interactions in HCV infection: a

network-based approach. J Proteome Res 2013;12:2537-2551

2. 学会発表

1. 岡本 徹、岡本貴世子、森 嘉生、福原 崇介、森石恆司、松浦善治、C型肝炎ウイルスコア蛋白質の膜内配列切断の生物学的意義、第86回日本生化学会シンポジウム「非常識なプロテアーゼ反応：膜内部でのタンパク質切断」、横浜、9月11-13日、2013
2. Toru Okamoto, Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura. Co-chaperones involved in the replication of hepatitis C virus, Protein Homeostasis & Viral Infection: Mechanisms to Therapeutics, Bethesda, USA, September 18-19, 2013.
3. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in HCV propagation. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop “Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma : molecular basis and clinical links” Marsala, Italy, October 20-21, 2013.
4. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, Infectious Diseases in Elderly Symposium, Izmir, Turkey, October 25-29, 2013.
5. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, The 3rd International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction and Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation, Tainan, Taiwan, November 16-17, 2013
6. 松浦善治、C型肝炎ウイルスの複製と病原性発現に関する宿主因子の解析と創薬の可能性、第42回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー、東京、12月9日、2013
7. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Takashi Motomura, Mai Shiokawa, Chikako Ono, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. The American Society for Virology, 32nd Annual Meeting, University of Pennsylvania, University Park, July 20-24, 2013.
8. Toru Okamoto, Yukari Sugiyama, Chikako Ono, Sayaka Aizawa, Pham Duc Ngoc, Takahisa Kohwaki, Eiji Hirooka, Takasuke Fukuhara, Masahiro Yamamoto, and Yoshiharu Matsuura, Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
9. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Masami Wada, Chikako Ono, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
10. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, and Yoshiharu Matsuura, Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
11. 福原 崇介、塩川 舞、小野 慎子、山本 聡美、和田 真実、岡本 徹、野田 健司、吉森 保、松浦 善治、HCV感染により誘導されるオートファジーの性状、第61回日本ウイルス学会総会、神戸、11月10日-12日、2013
12. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、山本聡美、和田真実、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、miR-122 ノックアウト Huh7 細胞における HCV 増殖、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、11月10日-12日、2013
13. 和田真実、福原崇介、山本聡美、塩川舞、小野慎子、岡本徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生における VLDL 関連タンパク質の役割、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、11月10日-12日、2013

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働省科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
分担研究報告書(平成25年度)

創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた
肝炎ウイルス制御に関する研究

HCV制御に関わるNK細胞機能分子の解析

研究分担者 大段秀樹 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨 C型肝炎ウイルス(HCV)の感染抑制に働く自然免疫細胞Natural killer(NK)細胞のフェノタイプ解析を肝移植ドナー/レシピエントの肝臓内単核球および末梢血単核球を用いて実施した。その結果、ドナーグラフト肝内在NK細胞のNKp46の発現強度には個体差があり、NKp46^{bright}細胞高含有率が肝移植後早期のHCV感染抑制に影響する可能性を確認した。本研究は、NK細胞のHCV複製抑制にNKp46^{bright}細胞が関与し、そのメカニズムはHCV感染細胞との接触によるIFN- γ 産生を介した増幅抑制であることを*in vitro HCV replicon assay system*を用いて明らかとした。

A. 研究目的

肝移植後には免疫抑制療法のため獲得免疫であるT/B細胞応答性が抑制される。一方、自然免疫細胞であるマクロファージ、樹状細胞、Natural Killer(NK)細胞は、免疫抑制剤の影響を受けにくい。しかし、肝硬変・肝臓がんの患者ではNK細胞の数・活性ともに低下していることが報告されている。そこで我々は、肝移植術後のHepatitis C virus(HCV)再感染における肝臓内のNK細胞の関与を解析した。その結果、肝移植レシピエントのNK細胞活性は肝障害度に従って低下していることが分かった。すなわち、NKp46とNKG2Dの表出が肝障害度に関連して低下していた。また、NKp46^{bright}細胞の含有率が高いドナーグラフト肝の移植を受けた患者の術後1週間における血中HCV-RNA値の抑制な低下を確認した。

本研究では、NK細胞のNKp46分子がHCV増幅抑制に関与するメカニズムを*in vitro HCV replicon assay system*を用いて解析した。

B. 研究方法

1. HCV replicon 細胞を用いたNK細胞によるHCV複製抑制効果解析

広島大学病院で施行し、同意を得られた肝移植ドナー9例の摘出肝の臓器灌流液に含まれる肝内単核球を用いた。NK細胞はNK cell isolation Kitを用い、磁気ソーティング法で分離した。NK細胞のHCV増幅抑制効果について、HCV replicon 保持肝細胞株(Huh-7)をTargetとして*in vitro replicon assay system*で評価した。E:T ratio=4:1、Recombinant human IL-2(25IU/ml)の存在下で、肝内NK細胞とHCV replicon 保持肝細胞株を共培養し、48時間後のHCV replicon 細胞のルシフェラーゼ活性をルミ

ノメーターで測定した。また、培養上清中のサイトカインを CBA assay 法で測定した。

2 . 肝内 NK 細胞の NKp46 分子の HCV 抑制能評価

昨年度の研究で、肝局在 NK 細胞の活性化因子である NKp46 表出強度は個体差に富むことを突き止めた。また、ドナー肝グラフト内の NKp46^{bright} 細胞高含有率は肝移植術後 1 週間におけるレシピエント血中 HCV-RNA 値の低下と関連していた。そこで、anti-NKp46 ブロッキング抗体によって HCV 増幅抑制能が減弱するか否かを検討した。さらに、NK 細胞の他の活性化分子であり HCV 感染との関連が報告されている NKp30、NKG2D についても同様の検討を行った。

C . 研究結果

1 . HCV replicon 細胞を用いた NK 細胞による HCV 複製抑制効果解析

フローサイトメトリー (FCM) による NK 細胞 (CD56⁺CD3⁻) の NKp46 表出と HCV replicon 細胞のルシフェラーゼ活性抑制能との関係を解析した結果、NKp46^{bright} 細胞の存在比率が高いほどルシフェラーゼ活性抑制率も高く、両者には正の相関を認めた (図 1)。

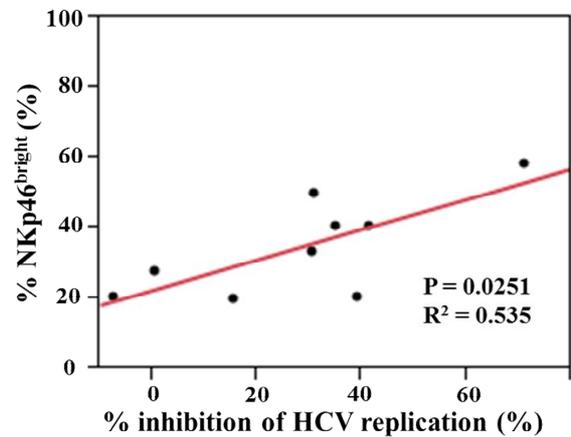


図 1 . 肝内 NK 細胞の HCV 増殖抑制能は NKp46^{bright} 分画比率と最もよく相関した

また、48 時間後の培養上清中に存在するサイトカインを CBA アッセイにより評価した。その結果、IFN- γ 産生とルシフェラーゼ活性抑制率には有意差をもって関連していることがわかった (図 2)。

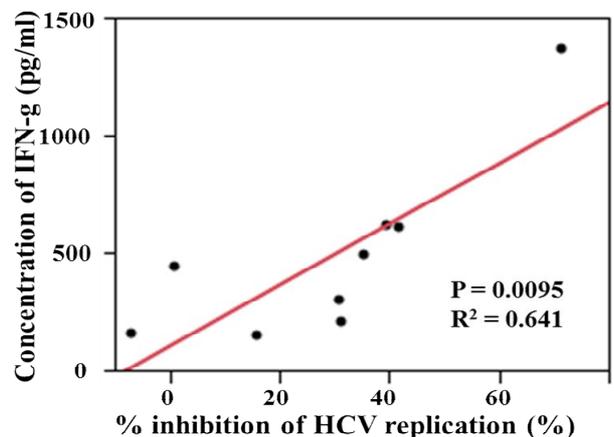


図 2 . H C V 増殖抑制能は IFN- γ 産生能と相関を認めた

2 . 肝内 NK 細胞の HCV 抑制能に関わる機能分子の解明

HCV の増幅抑制に NK 細胞の NKp46 分子の直接関与を確認するため、*in vitro* HCV replicon assay system に抗ヒト NKp46、NKp30、NKG2D モノクローナル抗体を添加した。その結果、各々のブロッキング抗体の添加により、ルシフェラーゼ活性抑制能の解除を認めた (図 3)。さらに、NKp46 とそ

の他の分子との相乗効果を検討し、NKG2Dとのコンビネーションにおいて有意な抑制の解除を示した(図4)。

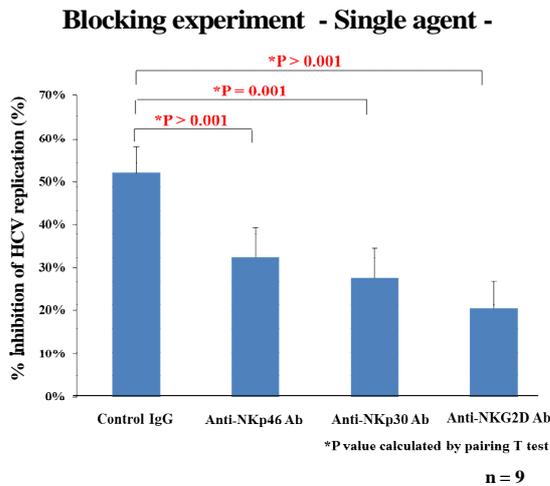


図3. Blocking抗体投与によりHCV増殖抑制能は有意に抑制された

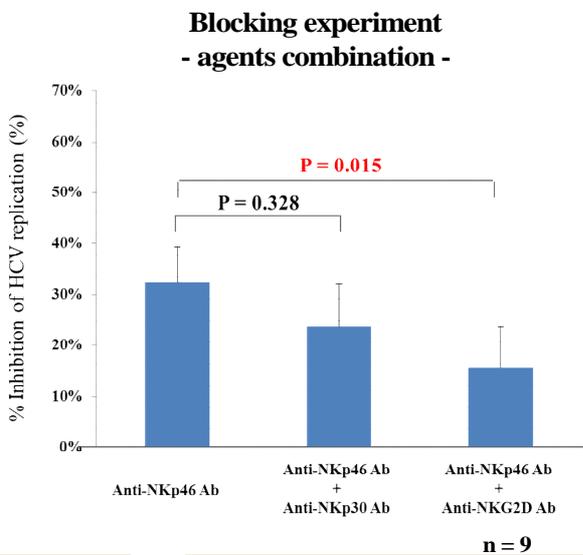


図4. 抗NKp46抗体と抗NKG2D抗体はHCV増殖抑制能に対して相乗的に作用した

D. 考察

NK細胞は、腫瘍細胞に対する傷害能やInterferon(IFN)産生能が高い。しかし、肝硬変・肝臓がんの患者ではNK細胞の数・活性ともに低下していることが報告されている。我々の検討でも、肝移植術後のHCV再感染防御における肝内のNK細胞の関与を解析したが、肝移植レシピエントのNK細胞の

活性化は自己の肝障害度に従って低下していることが分かった。またグラフト肝内のNK細胞のNKp46の表出強度が移植後のHCV増幅と深く関わるが、NKp46がHCV感染細胞と接触しIFN- γ を介しHCV増幅抑制効果を発揮する事が判明した。しかし、NKp46の発現に個体差が存在する理由は未だ明らかではない。IL-28B SNPは、HCVに対するIFN治療応答性に関与することが知られているが、今後、IL-28B SNPとNKp46の個体差が関連し、HCV感染制御やIFN治療への応答性を予測する指標となりうるか解析を進める予定である。

E. 結論

肝臓移植後のレシピエントのHCV再感染およびその抑制には、グラフト肝内のNK細胞上のNKp46分子の表出強度が移植後のHCV増幅と深く関わり、HCV抑制機構にはNK細胞のIFN- γ 産生が関わる事が解明された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohira M, Nishida S, Matsuura T, Muraoka I, Tryphonopoulos P, Fan J, Tekin A, Selvaggi G, Levi D, Ruiz P, Ricordi C, Ohdan H, Tzakis AG. Comparative analysis of T-cell depletion method for clinical immunotherapy-anti-hepatitis c effects of natural killer cells via interferon-gamma production. Transplant Proc. 2013.45(5):2045-2050.

2. Onoe T, Tanaka Y, Ide K, Ishiyama K, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tashiro

H, Ohdan H. Attenuation of Portal Hypertension by Continuous Portal Infusion of PGE1 and Immunologic Impact in Adult-to-Adult Living-Donor Liver Transplantation. Transplantation. 2013.95(12):1521-1527.

3.大段秀樹. State of the Art 肝免疫と肝臓外科 Liver Immunity and Surgery. Frontiers in Gastroenterology. 2013. 18(3):203-213.

2. 学会発表

1.谷峰直樹, 田中友加, 石山宏平, 井手健太郎, 田澤宏文, 寺岡義布史, 堀田龍一, 山下正博, 安部智之, 橋本慎二, 平田文宏, 森本博司, 清水誠一, 佐伯吉弘, 五十嵐友香, 田代裕尊, 大段秀樹. 硬変肝に局在する Natural Killer 細胞の機能抑制機構. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 2013.4.11-13. 福岡.

2. Ohdan H. Do Allograft Responses Effect HCV Recurrence? ILTS 19th. 2013.6.12-15. Sydney, Australia.

3. 御厨美洋, 田代裕尊, 天野尋暢, 小林剛, 石山宏平, 井手健太郎, 大平真裕, 安部智之, 橋本昌和, 大段秀樹. NAFLD 関連肝細胞癌における臨床病理と外科的治療成績 : C 型関連肝細胞癌との相違. 第 25 回日本肝胆膵外科学会. 2013.6.12-14. 宇都宮.

4.谷峰直樹, 田中友加, 安部智之, 石山宏平, 井手健太郎, 大平真裕, 田澤宏文, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝内在 NKp46 高発現 NK 細胞は移植後 HCV 再感染初期に抑制的機能を有する. 第 31 回日本肝移植研究会. 2013.7.4-5. 熊本.

5.田中友加, 大平真裕, 尾上隆司, 井手健

太郎, 石山宏平, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝移植後抗ドナーT 細胞応答に伴い産生される IFN- γ は術後 HCV-RNA 抑止に關与する. 第 31 回日本肝移植研究会. 2013.7.4-5. 熊本.

6.大平真裕, 石山宏平, 堀田龍一, 清水誠一, 田中友加, 田代裕尊, Andreas Tzakis, 西田正剛, 大段秀樹. 肝臓由来ナチュラルキラー細胞を用いた肝細胞癌肝移植に対する補助免疫療法 : 広島大学・マイアミ大学共同研究の臨床経過報告. 第 49 回日本移植学会総会. 2013.9.5-7. 京都.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

In vitro, in vivo増殖系を用いたC型肝炎ウイルス増殖のメカニズムの解析と 創薬への応用

研究分担者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆字

研究要旨 本研究ではC型肝炎ウイルス（HCV）の in vitro および in vivo 増殖系を用いたウイルス増殖メカニズムの解析をおこない、その結果を創薬へ応用することを目的とする。そのために、新たなウイルス培養増殖系の確立を目指す。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）新規感染者は激減したものの、その原因ウイルスであるHCVのキャリアは約100～200万人がいまだに存在すると推定されている。その多くが肝硬変から肝臓癌へ移行する。HCV感染に対する治療法はインターフェロンとリバビリンの併用療法が行われているが、その有効率は40-50%程度である。昨年新たな抗ウイルス薬としてプロテアーゼ阻害薬が承認され、治療の有効率は向上すると考えられるが、さらなる治療薬の開発が必要である。肝炎ウイルスに対する新たな治療法の開発は患者の予後を改善するのみならず、肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らすことにより、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与することが可能である。HCVの in vitro および in vivo 増殖系を用いたウイルス増殖メカニズムの解析をおこない、その結果を創薬へ応用することを目的とする。そのために、新たなウイルス培養増殖系の確立を目指す。

B. 研究方法

1. 遺伝子型 2b の HCV 感染性クローンの樹立
東京医科歯科大学の坂本先生(現北海道大学教授)より遺伝子型 2b のレプリコン及び全長遺伝子を分与していただいた。レプリコン構築に S2208I、A2217S および LSG 変異 (F438L、A15S、D559G) をそれぞれ導入した。レプリコン RNA を Huh7 細胞に導入して G418 による選択培養でコロニー形成実験をおこなった。樹立されたレプリコン細胞から適合変異を同定して、LSG 変異とともに全長遺伝子に導入してウイルス産生実験を Huh751 細胞で行った。

(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、遺伝子解析研究に関する倫理指針」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

遺伝子型 2b の HCV 株のレプリコンは野生型、S2208I、A2217S の変異挿入ではコロニー形成が見られなかったが、LSG 変異(F438L、A15S、D559G) の挿入によりコロニー形成が観察された。合計 15 クローンのレプリコン細胞を樹立してレプリコンゲノムの配列を決定した。すべてのレプリコン細胞において LSG 変異以外の新たな適合変異が検出された。適合変異は NS4B、NS5A、NS5B 領域に認められた。検出された 8 種類の適合変異を遺伝子型 2b 株の全長遺伝子に LSG 変異とともに導入してウイルス産生実験をおこなった。全長構築から試験管内で RNA を合成して、Huh751 細胞にトランスフェクションし、RNA 導入細胞を経代培養した。その結果感染性ウイルスの産生が確認された。

D. 考察

遺伝子型 2b 株のレプリコンゲノムに検出した適合変異を利用することにより、感染性ウイルスを作成することが可能となった。遺伝子型 2b は我が国では 1b、2a について感染が広がっているため、抗ウイルス薬の感受性や、耐性ウイルスの研究が必要である。今後、この実験系を用いて、臨床で使用されている抗ウイルス薬や開発中の薬剤に対する解析が可能となる。

E. 結論

遺伝子型 2b の感染性 HCV を作成することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Nov 1;440(4):515-20.
2. Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal Peptidase Complex Subunit 1 Participates in the Assembly of Hepatitis C Virus through an Interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog*. 2013 Aug;9(8):e1003589.
3. Maehama T, Fukasawa M, Date T, Wakita T, Hanada K. A class II phosphoinositide 3-kinase plays an indispensable role in hepatitis C virus replication. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Oct 11;440(1):150-156.
4. Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. Antiviral Activity of Glycyrrhizin against Hepatitis C Virus In Vitro. *PLoS One*. 2013 8(7):e68992.
5. Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N,

Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. *Gastroenterology*. 2013 145(2):447-455.e4.

2 . 学会発表および講演など

1. T Wakita. Hepatitis C virus replication models and vaccine development 2013 NCRTP PAC Meeting, Inn at Laurel Point, Victoria, BC, Canada (2013, 3.2-3)
2. T Wakita. Basic concepts of Hepatitis C. 2013 2nd Canadian Symposium on HepC Virus, Inn at Laurel Point, Victoria, BC, Canada (2013, 3.4)
3. T Wakita. Molecular Biology and Experimental Models of HCV. 19th Annual KASL Meeting, Sheraton Grande Walkerhill Hotel, Seoul, Korea (2013, 6.13 – 15)
4. H Yokokawa, M Moriyama, N Nakamura, A Higashino, H Akari, T Kato, K Ishii, T Wakita. Induction of neutralizing antibodies by vaccination with cell culture derived hepatitis C virus particles in primate model. 20th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, (2013, Oct. 6-10)
5. R Sugiyama, N Sugiyama, A Murayama, M Tasaka-Fujita, T Masaki, T Wakita, T Kato. Amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region in NS5A involves infectious virus production of hepatitis C virus. 20th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, (2013, Oct. 6-10)
6. S Nakajima, K Watashi, S Kamisuki, R Suzuki, H Aizaki, F Sugawara, T Wakita. Isolation of a natural compound which can reduce infectious HCV production by inhibiting of liver X receptor. 20th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, (2013, Oct. 6-10)
7. S Kim, T Date, H Yokokawa, T Kono, H Aizaki, C Gondeau, P Maurel, T Wakita. Infectious Genotype 3a Hepatitis C Virus in Cell Culture. 20th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, (2013, Oct. 6-10)
8. A Fujimoto, H Aizaki, M Matsuda, N Watanabe, K Watashi, R Suzuki, T Suzuki, T Miyamura, T Wakita. Dynamics of the cellular metabolome during hepatitis C virus infection. 20th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, (2013, Oct. 6-10)
9. T Wakita. Hepatitis C virus cell culture system and antiviral development. 17th International Symposium on the Cells of the Hepatic Sinusoid. Osaka International Convention Center, Osaka, Japan (2013, Sep. 23-25)
10. H Aizaki, N Watanabe, H Aoyagi, K Watashi, R Suzuki, S Kojima, T Matsuura, K Wake, T

- Suzuki, T, Wakita. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. 17th International Symposium on the Cells of the Hepatic Sinusoid. Osaka International Convention Center, Osaka, Japan (2013, Sep. 23-25)
11. 脇田隆字、安東友美、林和彦、杉山真也、石上雅敏、片野義明、後藤秀実、溝上雅史、黒田誠、相崎英樹、患者血清中におけるHCVゲノム多種性の存在形式、第49回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル、(2013, 6.6-7)、ワークショップ3「ウイルス肝炎の新潮流」
 12. 藤田めぐみ、加藤孝宣、村山麻子、山田典栄、脇田隆字、朝比奈靖浩、坂本直哉、HCV Core領域アミノ酸70/91変異株を用いた反応機序の解析、第49回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル、(2013, 6.6-7)
 13. 大東卓史、渡士幸一、Ann Sluder、中嶋 翔、Katyna Borroto-Esoda、藤田尚志、脇田隆字、シクロフィリンはPKRのリン酸化制御を介してC型肝炎ウイルスのインターフェロン感受性を修飾する、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
 14. 内田奈々子、渡士幸一、中嶋翔、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、千葉丈、脇田隆字、C型肝炎ウイルス分泌過程はphospholipase Dが関わる膜輸送により制御される、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
 15. 松田麻未、斎藤憲司、鈴木亮介、佐藤充、鐘ヶ江裕美、渡士幸一、相崎英樹、千葉丈、斎藤泉、脇田隆字、鈴木哲朗、細胞内発現抗体(イントラボディ)によるC型肝炎ウイルスの増殖抑制、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
 16. 後藤耕司、相崎英樹、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、山越智、四柳宏、森屋恭爾、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字、C型肝炎ウイルスNS5A結合膜蛋白E1Aのウイルス複製・翻訳スイッチング機構の解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
 17. 金ソルイ、伊達朋子、横川寛、河野環、相崎英樹、脇田隆字、C型肝炎ウイルス遺伝子型3aの培養細胞におけるウイルス感染実験系の確立、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
 18. 藤本陽、相崎英樹、松田麻未、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字、C型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の脂質代謝変化とHepatic Lipase発現制御、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
 19. 青柳春代、相崎英樹、松本喜弘、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、松浦知和、鈴木哲朗、宮村達男、和氣健二郎、脇田隆字、Phospholipase A2およびAutophagyによるC型肝炎ウイルス(HCV)分泌過程の制御—グリチルリチンによる抗HCV作用—、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)

20. 杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、政木隆博、脇田隆字、加藤孝宣、ISDRアミノ酸変異がHCV増殖に与える影響、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
21. 中嶋翔、渡士幸一、紙透伸治、竹本健二、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆字、Liver X Receptor 転写活性および感染性C型肝炎ウイルス粒子産生を阻害する天然化合物の同定、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
22. 渡邊則幸、伊達朋子、相崎英樹、脇田隆字、エンベロープペプチドを用いたHCV感染に重要なアミノ酸領域の探索、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
23. 鈴木亮介、石川知弘、小西英二、嵯峨涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字、プラスミドトランスフェクションによるトランスパッケージング型1回感染性フラビウイルス産生系の確立、第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、(2013, 12.3-6)

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス制御に関する研究
分担報告書（平成 25 年度）

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた新規抗HCV薬の効果判定
研究分担者 今村道雄 広島大学病院消化器・代謝内科 診療講師

研究要旨：uPA/SCID マウスにヒト肝細胞を移植したヒト肝細胞キメラマウスを用いてリバースジェネティクス的手法により，野生型あるいは direct-acting antiviral agent (DAA) 耐性変異型 C 型肝炎ウイルス(HCV)感染マウスを作製した．Telaprevir あるいは NS5A 阻害剤耐性型 HCV 感染マウス，に telaprevir+NS5A 阻害剤を併用投与すると両薬剤に対する 2 重耐性型 HCV が出現し breakthrough が生じ，さらに NS5B 阻害剤の投与により，3 重耐性型 HCV が出現した．DAA 製剤を sequential に使用すると，多剤耐性変異型 HCV が出現するため，注意が必要であることが示された．uPA/SCID マウスよりさらに免疫不全である NOG マウスに Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSVtk) 遺伝子を過剰発現させた TK-NOG マウスを用いてヒト肝細胞キメラマウスを作製し HCV を感染させた．TK-NOG マウスは uPA/SCID マウスに比べヒト肝細胞置換率が低値であっても HCV の感染率が高く，HCV 研究に有用な新規のヒト肝細胞キメラマウスに有用になると思われた．

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて direct-acting antiviral agent (DAA) 耐性変異型 HCV の出現あるいは genotype 間の治療効果を検討する．さらに uPA/SCID よりさらに免疫不全である NOG マウスを用いて新規ヒト肝細胞キメラマウスを作製する．

B. 研究方法

Genotype 1b HCV 感染性クローン KT9 の NS3 領域に telaprevir 耐性 V36A，NS5A 領域に NS5A 阻害剤耐性 L31V，Y93H を挿入したクローンの全長 cDNA を用いて *in vitro transcription* 法により HCV RNA を合成し，50 μ g の RNA をヒト肝細胞移植 uPA-SCID マウスの肝臓内に直接注入し感染マウスを作製後，種々の DAA を投与した．また超免疫不全である NOG マウスに Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSVtk) 遺伝子を過剰発現させた TK-NOG マウスに 6

mg/kg のガンシクロビル (GCV) を隔日で 2 回投与しマウス肝細胞のアポトーシスを惹起した．GCV 投与 1 週後にヒト肝細胞を経脾臓的に移植し 8 週後，HCV 陽性ヒト血清を静脈内注射し感染を惹起し，HCV 感染率，IFN の薬効を評価した．

C. 結果

Genotype 1b 型 C 型肝炎患者血清を投与し感染させたマウスに telaprevir W を投与したところ耐性変異である NS3 V36A 変異が出現した．また野生型 HCV クローン感染マウスに対し，telaprevir を投与したところ，やはり NS3 V36A 変異が出現し，HCV クローンからも耐性変異が出現することが見出された．Telaprevir 耐性である NS3 V36A 変異クローンを感染させたマウスに対し，telaprevir+NS5A 阻害剤を併用投与したところ，血中 HCV RNA は低下するものの陰性化は得られず，NS3 変異に加え NS5A 阻害剤耐性変異である NS5A Y93H 変異が出現した．

NS5A 阻害剤耐性である NS5A L31V 変異あるいは L31V+Y93H 変異型クローン感染マウスに対し, telaprevir+NS5A 阻害剤を併用投与したところ NS5A の変異に加え NS3 V36A 変異が出現し 2 重耐性型となり breakthrough が生じた。

HCV 感染では, 置換率が低値であったマウスにおいても, TK-NOG マウスは uPA-SCID マウスよりも高い割合で感染が成立した。抗ウイルス薬の薬効を評価したところ uPA-SCID マウスと同程度であった。

TK-NOG マウスへの GCV 投与 1 週後の ALT 値が高いほどヒト肝細胞移植 8 週後の血中ヒトアルブミン値 (ヒト肝細胞置換率) は高値であった。HCV 感染は高置換率マウス (70%以上) では TK-NOG (10/10 頭) および uPA-SCID マウス (50/53 頭) で同程度であったが, 低置換率マウス (70%未満) では uPA-SCID (1/5 頭) に比べ TK-NOG マウス (27/28 頭) において有意に高率であった。感染成立後のマウス血中 HCV RNA 量, IFN 投与による血中ウイルス低下量は TK-NOG および uPA-SCID マウスにおいてほぼ同程度であった。

D. 考察

DAA 製剤を sequential に使用すると, 多剤耐性変異型 HCV が出現するため, 注意が必要であることが示された。新規に作製された TK-NOG マウスを用いたヒト肝細胞は, 肝炎ウイルス研究に有用な動物モデルである。

E. 結論

HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて DAA 耐性ウイルスの検討が可能であった。TK-NOG マウスを用いて HCV 感染が可能なキメラマウスを作製した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shi N, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Zhang Y, Kosaka K, Okazaki A, Murakami E, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Takahashi S, Ochi H, Tateno-Mukaidani C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Gao M, Chayama K. Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *Gut*. 2013 Jul;62(7):1055-61
- 2) Abe H, Hayes CN, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, Takahashi S, Ochi H, Chayama K. A Translational Study of Resistance Emergence Using Sequential Direct-Acting Antiviral Agents for Hepatitis C Using Ultra-Deep Sequencing. *Am J Gastroenterol* 108:1464-72, 2013
- 3) Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Nelson Hayes C, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;441(1):230-5.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Shi N, Hiraga N, <u>Imamura M</u> , Hayes CN, Zhang Y, Kosaka K, Okazaki A, Murakami E, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Takahashi S, Ochi H,	Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice.	Gut	62	1055-61	2013
Abe H, Hayes CN, Hiraga N, <u>Imamura M</u> , Tsuge M, Miki D, Takahashi S, Ochi H, Chayama K.	A Translational Study of Resistance Emergence Using Sequential Direct-Acting Antiviral Agents for Hepatitis C Using Ultra-Deep Sequencing	Am J Gastroenterol	108	1464-72	2013
Kosaka K, Hiraga N, <u>Imamura M</u> , Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Nelson Hayes C, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K	A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections	Biochem Biophys Res Commun	441	230-5	2013
Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, Murakami T, Tateno C, Yoshizato K, Kobayashi E.	Transplantation of engineered chimeric liver with autologous hepatocytes and xenobiotic scaffold.	Ann Surg	257(3)	542-7	2013
Tanaka F, Tominaga K, Sasaki E, Sogawa M, Yamagami H, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe K, Watanabe T, Fujiwara Y, Kawada N, Yoshizato K, Arakawa T.	Cytoglobin May Be Involved in the Healing Process of Gastric Mucosal Injuries in the Late Phase Without Angiogenesis.	Dig Dis Sci.	Jan 10.	Epub ahead of print	2013

<p>Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K.</p>	<p>A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections.</p>	<p>Biochem Biophys Res Commun.</p>	<p>Nov;8 441(1)</p>	<p>230-5</p>	<p>2013</p>
<p><u>Yoshizato K,</u> Tateno C.</p>	<p>A mouse with humanized liver as an animal model for predicting drug effects and for studying hepatic viral infection: where to next?</p>	<p>Expert Opin Drug Metab Toxicol.</p>	<p>Nov;9(11)</p>	<p>1419-35</p>	<p>2013</p>
<p>Tachibana A, Tateno C, <u>Yoshizato K.</u></p>	<p>Repopulation of the immunosuppressed retrorsine-treated infant rat liver with human hepatocytes.</p>	<p>Xenotransplantation.</p>	<p>Jul-Aug; 20(4)</p>	<p>227-38</p>	<p>2013</p>
<p>Shi N, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Zhang Y, Kosaka K, Okazaki, Murakami E, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Takahashi S, Ochi H <u>Tateno-Mukaidani C Yoshizato K,</u> Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Gao M, Chayama K.</p>	<p>Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice.</p>	<p>Gut.</p>	<p>Jul;62(7)</p>	<p>1055-61</p>	<p>2013</p>

Tateno C, Miya F, Wake K, Kataoka M, Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Kakuni M, Wisse E, Verheyen F, Inoue K, Sato K, Kudo A, Arii S, Itamoto T, Asahara T, Tsunoda T, <u>Yoshizato K.</u>	Morphological and microarray analyses of human hepatocytes from xenogeneic host livers.	Lab Invest.	Jan;93(1)	54-71	2013
A Seki, S Y akai, T Komura, A Nasti, K Yoshida, M Higashimoto, M Honda, S Usui, M Takamura, T Takamura, T Ochiya, K Furuichi, T Wada, <u>S Kaneko.</u>	Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model.	Hepatology	58(3)	1133-42	2013
T Shirasaki, M Honda, T Shimakami, R Horii, T Yamashita, Y Sakai, A Sakai, H Okada, R Watanabe, S Murakami, M Yi, SM Lemon, <u>S Kaneko.</u>	MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells.	J Virol	87(9)	5270-86	2013
T Ueda, M Honda, K Horimoto, S Aburatani, S Saito, T Yamashita, Y Sakai, M Nakamura, H Takatori, H Sunagozaka, <u>S Kaneko.</u>	Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling.	Genomics	101(4)	238-48	2013
T Yamashita, M Honda, Y Nakamoto, M Baba, K Nio, Y Hara, SS Zeng, TH Kondo, H Takatori, T Yamashita, E Mizukoshi, H Ikeda, Y Zen, H Takamura, XW Wang, <u>S Kaneko.</u>	Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma.	Hepatology	57(4)	1484-97	2013

Y Hodo, M Honda, A Tanaka, Y Nomura, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, E Mizukoshi, A Sasaki, M Sasaki, Y Nakanuma, M Moriyama, <u>S Kaneko.</u>	Association of Interleukin 28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C.	Clin Cancer Res	19(7)	1827-37	2013
Abe Y., Aly H. H., Hiraga N., Imamura M., Wakita T., Shimotohno K., Chayama K., <u>Hijikata M.</u>	Thromboxane A ₂ Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers	Gastroenterology	145	658-667	2013
Kuroki M., Ariumi Y., <u>Hijikata M.</u> , Ikeda M., Dansako H., Wakita T.,	PML tumor suppressor protein is required for HCV production	Biochem. Biophys. Res. Commun.	430	592-597	2013
Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, <u>Takakura Y</u>	Long-Term Elimination of Hepatitis C Virus from Human Hepatocyte Chimeric Mice After Interferon- γ Gene Transfer.	Hum Gene Ther Clin Dev.	In press		2013
Uno S, Nishikawa M, Mohri K, Umeki Y, Matsuzaki N, Takahashi Y, Fujita H, Kadowaki N, <u>Takakura Y.</u>	Efficient delivery of immunostimulatory DNA to mouse and human immune cells through the construction of polypod-like structured DNA.	Nanomedicine	In press		2013
Mukumoto H, Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, <u>Takakura Y</u>	Expression profile-dependent improvement of insulin sensitivity by gene delivery of interleukin-6 in a mouse model of type II diabetes.	Mol Pharm.	10	3812-3821	2013
Miyakawa N, Nishikawa M, Takahashi Y, Ando M, Misaka M, Watanabe Y, <u>Takakura Y.</u>	Gene delivery of albumin binding peptide-interferon- γ fusion protein with improved pharmacokinetic properties and sustained	J Pharm Sci.	102	3110-3118	2013

	biological activity.				
Komatsu N, Motosugi U, <u>Maekawa S</u> , Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F,	Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging.	Hepatol Res.	Feb 14	In press	2014
Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Shindo H, <u>Maekawa S</u> , Enomoto N, Tsubuki M, Moriishi K.	Inhibitory effects of caffeic Acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus.	PLoS One.	17;8(12)	e82299.	2013
<u>Maekawa S</u> , Enomoto N.	Once-daily simeprevir in combination with pegylated-interferon and ribavirin: a new horizon in the era of direct-acting antiviral agent therapy for chronic hepatitis C.	J Gastroenterol	Jan;49(1)	163-4.	2014
Miura M, <u>Maekawa S</u> , Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y.	Deep-sequencing analysis of the association between the quasispecies nature of the hepatitis C virus core region and disease progression.	J Virol.	87(23)	12541-51.	2013
Shindo H, <u>Maekawa S</u> , Komase K, Miura M, Kadokura M,	IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication.	J Viral Hepat.	20(4)	281-9.	2013
Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, <u>Maekawa S</u> , Tokunaga K,	Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C.	J Med Virol.	85(3)	449-58.	2013

Komase K, <u>Maekawa S</u> , Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.	Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C.	Hepatology Res.	43(8)	865-75.	2013
Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, <u>Matsuura Y</u> .	Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation	J Virol	87	489-502	2013
Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, <u>Matsuura Y</u> , Wakita T, Suzuki T.	Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2	PLoS Pathog		doi:10.1371/journal.ppat.1003589	2013
Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, <u>Matsuura Y</u> , Saitoh T, Akira S.	Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus	Proc Natl Acad Sci U S A	110	12379-12384	2013
Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T,	Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN-λ in response to hepatitis C virus	Hepatology	57	1705-1715	2013

Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, <u>Matsuura Y</u> , Yamamoto M, Takeda K.	Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA	J Virol	87	9997-10003	2013
Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, <u>Matsuura Y</u> , Mizuguchi K.	Understanding the biological context of NS5A-host interactions in HCV infection: a network-based approach	J Proteome Res	12	2537-2551	2013
Ohira M, Nishida S, Matsuura T, Muraoka I, Tryphonopoulos P, Fan J, Tekin A, Selvaggi G, Levi D, Ruiz P, Ricordi C, <u>Ohdan H</u> , Tzakis AG.	Comparative analysis of T-cell depletion method for clinical immunotherapy-anti-hepatitis c effects of natural killer cells via interferon-gamma production.	Transplant Proc.	45(5)	2045-2050	2013
Onoe T, Tanaka Y, Ide K, Ishiyama K, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tashiro H,	Attenuation of Portal Hypertension by Continuous Portal Infusion of PGE1 and Immunologic Impact in	Transplantat ion..	95(12)	1521-1527	2013
<u>大段秀樹</u>	State of the Art 肝免疫と肝臓外科 Liver Immunity and Surgery.	Frontiers in Gastroenterology.	18(3)	203-213	2013
Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, <u>Wakita T</u> .	Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives.	Biochem Biophys Res Commun.	440(4)	515-20.	2013

Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, <u>Wakita T</u> , Suzuki T.	Signal Peptidase Complex Subunit 1 Participates in the Assembly of Hepatitis C Virus through an Interaction with E2 and NS2.	PLoS Pathog.	(8)	e1003589.	2013
Maehama T, Fukasawa M, Date T, <u>Wakita T</u> , Hanada K.	A class II phosphoinositide 3-kinase plays an indispensable role in hepatitis C virus	Biochem Biophys Res Commun.	440(1)	150-156.	2013
Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K,	Antiviral Activity of Glycyrrhizin against Hepatitis C Virus In Vitro.	PLoS One.	8(7)	e68992.	2013
Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, <u>Wakita T</u> .	Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice.	Gastroentero logy.	145(2):	447-455.e4.	2013