

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 23～25 年度 総合研究報告書

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・・・11
肝炎ウイルス制御に関する研究
吉里 勝利

 - 2. C型肝炎ウイルス NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスの複製能と・・・21
感染性粒子産生能に関する検討
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関与する宿主分子の・・・26
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・・・32
検討とインターフェロン- 肝臓ターゲティング法の開発
高倉 喜信

 - 5. 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV、・・・39
HBV 遺伝子変異の解析
前川 伸哉

 - 6. HCV 感染における遺伝子多型の意義・・・45
松浦 善治

 - 7. HCV 制御に関わる NK 細胞機能分子の解析・・・52
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・・・62

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 76
今村道雄

- . 研究成果の刊行に関する一覧表 83

- . 研究成果の刊行物・別刷り 91

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23～25年度総合研究報告書

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。平成23-25年の3年間において、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

ヒト肝細胞キメラマウスを用いて Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) の阻害剤であるエゼチミブや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。また IL28B 遺伝子とインターフェロン (IFN) 治療効果および IFN 誘導遺伝子発現量の関連あるいは Zinc-finger nuclease (ZEN) を用いて肝癌細胞株における IL28B 遺伝子のアレル特異的なノックアウト方法を確立した。HCV 感染マウスに対する IFN 投与による肝臓内遺伝子発現をマイクロアレイにて網羅的に検討し、IFN シグナルの反応性低下と共に、抗原呈示反応に関与する遺伝子の IFN 反応性の低下を認めた。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。細胞培養・チンパンジー感染クローンである遺伝子型 Ia H77 株の p7 と NS2 の間に分泌型ルチフェラーゼを挿入し、簡便な RNA 複製モニタリング、および抗ウイルス剤スクリーニングシステムを構築した。genotype 1b 型の Con1 株の NS3 プロテアーゼ領域および NS5b 領域をそれぞれ遺伝子型 2a の JFH-1 株に組換えたキメラレプリコンおよびウイルス構築を作成し、さらに遺伝子型 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した。

2. 開発された薬剤の応用

新規抗 HCV 療法として、プロテアーゼ阻害剤、NS5A 阻害剤および NS5B 阻害剤を併用し IFN 製剤を使用しない経口剤のみによるウイルス排除法、あるいはヒト末梢血単核球分画から培養・増殖させた NK/NKT 細胞を用いた HCV 感染阻害法の開発を行った。次世代シーケンサーを用いて、direct-acting antiviral agent (DAA) 未治療の 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。また HCV クローンを用いた reverse-genetics の手法を用いて 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。

3. 肝炎モデルの創生

HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスにヒトリンパ球を投与することにより肝炎モデルマウスの作製を試みた。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。

【分担研究者】

吉里勝利

株式会社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

ヒト肝細胞キメラマウスを用いて種々の薬剤の抗ウイルス効果を検討し，新規抗 HCV 薬の候補として以下の薬剤を同定した．Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) が HCV の receptor であり，その阻害剤であるエゼチミブが HCV の感染阻害に有効

であることを見いだした（茶山，今村班員）。アラキドン酸カスケードの産物であるプロスタノイドの各受容体に対するアゴニストあるいはアンタゴニストを用いて感染性組換え体 HCV 産生系を処理することで PGI₂ の受容体である IP のアゴニストの一部がこの系によって産生される組み換え体 HCV 粒子の感染性を抑制することを見出し，このアゴニストが，感染した HCV の感染伝播を抑制する効果があることを見出した。さらに 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 感染マウスを用いて HCV 感染あるいは IFN 投与による肝臓内遺伝子発現をマイクロアレイにて網羅的に検討し，創薬のターゲットとなり得る遺伝子の探索を行った。HCV 感染により抗原提示反応に関与す遺伝子の IFN 反応性の低下を認めた（茶山，今村班員）。またヒト肝細胞キメラマウスに HCV 血清を接種，早期

(3, 7, 14 日後)の肝細胞の遺伝子発現 PCR アレイを用いて解析したところ，その発現パターンは接種した HCV によって大きく異なっていることを見出した。肝臓中のウイルス量が非常に少ない感染初期段階でも多数の遺伝子発現が有意に変化していた事が判明しており，以上の事から HCV は感染の早い時期からヒト肝細胞の遺伝子発現に大きく影響している事が示された（吉里班員）。

IL28B 遺伝子型は IFN の治療効果に関与していることが明らかとなっている。そのメカニズムを解明するため IL28B 遺伝子型 (rs8099917) の異なる肝細胞を移植したヒト肝細胞キメラマウスを用いて，IFN 誘導遺伝子 (ISGs) 発現量を検討した。IL28B TG の肝臓は TT の肝臓に比べ，IFN 投与後の肝内 ISGs 発現量が低いため，抗ウイルス効果が弱いことを見いだした（茶山，今村班員）。さらに詳細に IL28B 遺伝子の生物学的特徴を明らかにするため，Zinc-finger nuclease (ZEN) を用いた肝癌細胞株 (Huh7 細胞) における IL28B 遺伝子のアレル特異的なノックアウト方法を確立した（松浦班員）。

次世代シーケンサーを用いた deep sequencing によって，HCV の解析を行った。HCV 感染マウスに telaprevir を単独投与すると投与前，ごくわずかに存在していた耐性株が増加し breakthrough が生じたが，HCV クローンを感染させたマウスからも耐性株の出現による breakthrough が生じた。これらの結果は薬剤耐性株がウイルスの mutation によっても生じ得ることを示すものである（茶山，今村班員）。

細胞培養・チンパンジー感染クローンである遺伝子型 1a H77 株の p7 と NS2 の間に分泌型ルチフェラーゼを挿入し、簡便な RNA 複製モニタリング、および抗ウイルス剤スクリーニングシステムを構築した。この系を基に、既知の NS3/4A 阻害剤耐性に関わる NS3 プロテアーゼ領域の変異を含む計 25 種類の変異体ウイルスを作成した。25 種類の変異体ウイルスに関して、4 種類の NS3/4A 阻害剤、Ciluprevir (BILN2061)、Boceprevir (SCH 503024)、Danoprevir (ITMN-191)、Vaniprevir (MK7009) に対する感受性を測定した (金子班員)。

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 培養系および感染性 HCV の確立を試みた。Genotype 1b 型 HCV 培養系を用いてプロテアーゼ阻害剤あるいは NS5B 阻害剤の治療効果を検討するため、genotype 1b 型の Con1 株の NS3 プロテアーゼ領域および NS5b 領域をそれぞれ遺伝子型 2a の JFH-1 株に組換えたキメラレプリコンおよびウイルス構築を作成した (脇田班員)。さらに genotype 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を用いた deep sequencing によって、C 型肝炎患者および HCV 感染マウスにおける変異株の解析を行った。C 型肝炎患者の解析により、HCV コア 70 番アミノ酸変異の quasispecies は γ -GTP 等の臨床背景因子とともに肝発癌と密接に関連していることが明らかとなった。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)。HCV 感染マウスに telaprevir を単独投与すると投与前、ごくわずかに存在していた耐性株が増加し breakthrough が生じたが、HCV クローンを感染させたマウスからも耐性株の出現による breakthrough が生じた。これらの結果は薬剤耐性株がウイルスの mutation によっても生じ得ることを示すものである (茶山、今村班員)。またヒト肝細胞キメラマウスを用いて DAA 併用療法の効

果を検討した。Genotype 1b 型 HCV 感染マウスへのプロテアーゼ阻害剤, NS5A 阻害剤, 非核酸型ポリメラーゼ阻害剤の単独投与では耐性変異による breakthrough が生じるが, これらの薬剤を組みあわせて投与することによりウイルスの排除が得られたが, genotype 2 型 HCV には有効性は低かった。その原因として, 2 型 HCV にはすでにこれら薬剤に対する耐性変異を有している症例が存在することを見出した(茶山, 今村班員)。さらに 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。キメラマウスを用いて有効な drug delivery の開発を試みた。持続的な遺伝子発現が可能である pDNA 骨格 (pCpG-mcs: InvivoGen) にヒト IFN- γ cDNA を挿入した pCpG-huIFN- γ 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。リンパ球を用いた HCV 感染阻害法の開発を試みた。ヒト末梢血単核球分画から培養・増殖させた NK/NKT 細胞をヒト肝細胞キメラマウスに投与することで HCV 感染が抑制されることを見いだした(大段班員)。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)。さらに生体肝移植後の 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る 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

スの作製を試みた(茶山,今村班員).またこれまで用いていたuPA-SCIDマウスとは異なるuPA-NOGを用いた肝炎ウイルス感染モデルの作製を試みた.uPA-NOGマウスに経脾臓的にヒト肝細胞を移植したキメラマウスにHCVを接種することにより感染が成立した(脇田班員).本マウスでは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(茶山,今村班員).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.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;62:1055-61
- 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) Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 18(2); 281-5, 2012

Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host IL28B polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology* 54(3); 764-71, 2011

5) Hiraga N, Imamura M, Abe H, Nelson Hayes C, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wild type clone

in vivo. *Hepatology* 54:781-8, 2011

6) Tsuge M, Fujimoto Y, Hiraga N, Zhang Y, Ohnishi M, Kohno T, Abe H, Miki D, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Miya F, Tsunoda T, Chayama K. Hepatitis C virus infection suppresses the interferon response in the liver of the human hepatocyte chimeric mouse. *PLoS One.* 2011;6(8):e23856.

7) Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of Hepatitis C Virus by Short Term NS3-4A and NS5B Inhibitor Combination Therapy in Human Hepatocyte Chimeric Mice. *J Hepatol.* 2011;54(5):872-8.

8) Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo. *J Hepatol.* 2011;55:11-8.

9) 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

10) Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura

Y. Hum Gene Ther Clin Dev. 2Long-term elimination of hepatitis C virus from human hepatocyte chimeric mice after interferon- γ gene transfer.2014;25(1):28-39.

2 . 学会発表

- 1) Michio Imamura, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes, Nobuhiko Hiraga, Tomokazu Kawaoka, Masataka Tsuge, Yoshiiku Kawakami, Hiroshi Aikata, Shoichi Takahashi, Kazuaki Chayama. Deep sequencing analysis of hepatitis C virus quasipieces in patients treated with telaprevir in combination with peginterferon and ribavirin. The 10th JSH Single Topic Conference, Tokyo. November 21, 2012
- 2) 今村 道雄, 阿部 弘美, 平賀 伸彦, 越智 秀典, 茶山 一彰. C型肝炎ウイルスの感染およびIFN治療におけるIL28B遺伝子多型の影響. 第77回インターフェロン・サイトカイン学術集会 2012年6月21日,神戸
- 3) Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi T, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Chayama K. Rapid Emergence of Telaprevir Resistant Hepatitis C Virus Strain From Wild Type Clone in Vivo. 12th AASLD, San Francisco. November 4, 2011
- 4) Imamura M, Abe H, Hiraga N, Tsuge M,

Takahashi S, C. Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Impact of Viral Amino Acid Substitutions and Host IL28B polymorphism on Replication and Susceptibility to Interferon of Hepatitis C Virus. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011

H. 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）
分担研究報告書（平成23-25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：ヒト肝細胞キメラマウスを利用した肝炎ウイルス制御に関する研究で以下の成果を得た。（１）HCV 感染初期における HCV の増殖動態は同一感染源（共に genotype 1b）でも、同一のヒト肝細胞中で異なる速度で増殖する場合があることを示した。（２）HCV は肝臓中のウイルス量が非常に少ない感染初期段階でも、多数の遺伝子発現が有意に変化することが再現性良く示された。（３）キメラマウス中でのヒト肝細胞と肝炎ウイルスの相互作用を解析する新しい手法で HBV 感染関連蛋白質の 1 つとして GRP78 (HSPA5) を同定し、この蛋白質が HBV の感染と増殖を制御している可能性を示した。（４）キメラマウスと補完的に利用できる新しい型のキメララットの作製を実施し、このために必要なファンダーの作成を完了した。（５）比較的良好に生体内環境を再現できる新しい培養法（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するとその増殖能が顕著に改善されることを示した。

A. 研究目的

本研究はヒト肝細胞キメラマウスを利用した肝炎ウイルス制御機構解明の一環として次の5つ目的を持って実施された。

（１）キメラマウスを利用するので宿主（ヒト肝細胞）とウイルスのゲノタイプを同一にした条件下で、ウイルス感染増殖に関わる患者個人の因子（宿主因子）の影響を調べることが可能である。このキメラマウスの優位性を利用して、同じゲノタイプの HCV を異なる患者から分離し、これらを同一ヒト肝細胞で作製されたキメラマウスに感染させその増殖動態を調べた。

（２）慢性的な HCV 感染は、ヒト肝細胞の遺伝子発現パターンを大きく変化させる事が示されている。HCV はこのような変化を誘導することで、自身の増殖に有利な環境を作り出していると考えられている。一方で、

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。キメラマウスでは HCV 感染初期でヒト肝細胞の遺伝子発現にどのような影響が出ているのかを調べることが可能である。感染初期にお

ける HCV 感染応答性遺伝子の発現プロファイルを調べた。

（３）インビボでヒト肝細胞とウイルスの相互作用に関わる蛋白質を明らかにすることはウイルス感染防止法を開発することにも貢献できる。HBV 表面蛋白質とヒト肝細胞をキメラマウス肝臓内で接触させ、架橋剤で固定し、両者の複合体形成に関わるヒト肝細胞蛋白質を同定する研究を実施した。

（４）創薬開発の視点に立てば、ラットはマウスと比較して、実験動物としていくつかの優れた特性を持つ。キメラマウスと補完的に利用できる新しい型のキメララットの作製を実施した。

（５）研究用のヒト肝細胞は肝炎ウイルス感染増殖制御に関する研究に必須のツールであるが同一条件の実験に必要な充分量の健康なヒト肝細胞を入手する機会は限定的である。キメラマウス肝臓で増殖させたヒト肝細胞はこの条件を満たすことができる。この意味で将来的に利用価値が高まると期待されるキメラマウスから分離したヒト肝細胞を良好な条件で培養できる方法を開発するための研究を行った。具体的には、比較的良好に生体内環境を再現できる新しい培養法（3次元コラーゲンゲルフロー培養法）でヒ

ト肝細胞を培養しその増殖動態を調べた。

B. 研究方法

上記研究目的別にその研究方法を述べる。

(1) 異なる患者由来の同じゲノタイプ (genotype b) をもつ HCV のキメラマウス肝臓での増殖。African American (5y, boy) 由来のヒト肝細胞を移植し、ヒト肝細胞キメラマウス (キメラマウス) を作製した。作製されたキメラマウスを 2 つのグループに分け、それぞれのグループに対して、異なる HCV 感染源 (感染源 1 と 2、共に genotype 1b) を、1 頭あたり 10^4 コピーずつ接種した。接種後 3、7、14 日目に剖検を行い (感染源 1: 各時点 4 匹ずつ、感染源 2: 各時点 3 匹ずつ) 血液と肝臓を採取した。得られた血液と肝臓中の HCV RNA 量を、リアルタイム PCR で定量した。

(2) 感染初期における HCV 感染応答性遺伝子の発現プロファイルの調査。(1) で得られた肝臓中での GRP78, IRF7, HIF1 α , PPAR γ , PGC1- β , TFAM, BAK, BAX, BclXL, PPAR α 及び γ , PGC1 α 及び β の発現レベルを GAPDH の発現レベルを内部標準としたリアルタイム PCR で定量した。各遺伝子のプライマーは、ヒト特異的に設計されており、マウスとヒト cDNA ライブラリーを鋳型とした際、ヒト cDNA ライブラリー特異的に増幅断片が得られる事を確認した。また、RT-PCR array (Reverse Transcription-PCR array) を用いて、酸化ストレス関連及び脂質代謝関連の 87 遺伝子の発現を検討した。なお、PCR array では、プライマーはヒト特異的ではないためヒトとマウスのキメラ全体のレスポンスを観察する目的で実施した。

(3) 肝炎ウイルスとヒト肝細胞の相互作用の解析 [GRP78 (HSPA5) の機能調査]。私達は既にキメラマウスに HBVsAgL パーティクルを投与し、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。本研究では、この蛋白質の HBV 感染増殖における機能解析の一環としてこの遺伝子に対する siRNA を利用した GRP78 遺伝子発現抑制実験を行なった。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、GRP78 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、6 日間培養した後、上清を回収した。上清中の HBsAg 量を、ELISA で定量した。

(4) キメララットの作製。ジフテリア毒素を発現させたヒト細胞は強い障害を受けることが知られている。私達は、ラットの肝細胞に必要なに応じて (コンディショナルに) この遺伝子を発現させることができる Tg ラット (diphtheria toxin-Tg ラット) を作製し、ヒト肝細胞のホストとして利用することを計画している。次の 2 つの事を行った。(1) albumin/ α -fetoprotein 遺伝子座に由来するラットゲノム由来プロモータを利用して、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 ラットを作製した。albumin/ α -fetoprotein 遺伝子座をコードするラット由来の BAC クローン、CH230-239P9 を入手した。Red/ET Recombination (大腸菌内での能動型相同組み換え反応) を利用して、ラット ALB 遺伝子の全コード領域を削除し、flox-cLuc レポータカセット、DTA 遺伝子、2A peptide、および Gluc レポーターをタンデムに連結させたトランスジーンにより置換させて、組換え BAC 型肝芽細胞特異的 DTA 発現ベクターを構築した。制限酵素によりこの組換え BAC 型 DTA 発現ベクターを直鎖化させた後、パルスフィールドゲル電気泳動により直鎖化された DNA フラグメントを分離させ、受精卵へのマイクロインジェクションに適した高純度の BAC 発現コンストラクトを精製した。過排卵誘起した Wistar 系統ラット (日本チャールスリバー社) の交配により得られた受精卵

前核期胚にマイクロインジェクション法により BAC 発現コンストラクトを注入した。この受精卵を偽妊娠ラットに移植した。これらの仮親ラットが分娩した産子を仮親に離乳期まで育成させた。離乳した全ての個体の尾部組織から抽出したゲノム DNA 断片と³²P]ラベル化プローブのハイブリダイゼーションにより、Tg ラットファウンダーを同定した。(2) 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。

(5) 生体内環境に近いヒト肝細胞培養法開発。生体内環境を再現できる新しい培養法(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その増殖動態を調べた。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 1 ml/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) 感染初期における HCV 増殖動態。感染源の異なる genotype1b HCV のキメラマウス肝臓内での増殖。肝臓中と血中の HCV RNA 量を調べたところ、感染源1と2の増殖

スピードは大きく異なっていた。感染源1の場合は、接種後14日目になってようやくウイルスが検出されたのに対して、感染源2では接種3日目で既にウイルスが検出され、接種7日目にはほぼプラトーに達していた。同じドナー由来の肝細胞に対して、同じ genotype1b である感染源1と感染源2を接種した際に、増殖スピードが大きく異なるという結果は、平成23年度及び24年度の研究で再現性が確認できた。

(2) HCV 感染初期におけるホストの遺伝子発現プロファイル。HCV 感染初期におけるヒト肝細胞における遺伝子発現プロファイルを酸化ストレス関連及び脂質代謝関連の87遺伝子に注目して解析を行った。HCV 感染後の発現が、非感染個体に対して2倍以上に増加もしくは0.5倍以下に減少した遺伝子産物は18であった。これらについてプロファイル別に次の4つのカテゴリーにタイプングした。感染後少なくとも2週間発現が持続的に上昇する遺伝子：ApoE, Cat。期間中持続的に発現が減少する遺伝子：Cyba, Ctsb, Dnm2, Ercc2, Gpx3, Idh1, Prdx6, Ptgs1, Sod1, Sod3, Txnip。感染後一週間までは発現が亢進するが、その後低下する遺伝子：Aass, Gstk1, Scd1。感染後1週間までは発現が減少するが、その後、上昇する遺伝子：Gpx2, Ncf2。この RT-PCR array は、ヒト検体用であるが、ヒト特異的に増幅するものではないため、ヒト・肝細胞キメラマウスの肝臓では、ホストであるマウス細胞の遺伝子発現変動が合わせて観察されている可能性が高い。このため RT-PCR array の中でヒトとマウスの配列をそれぞれ特異的に増幅可能なプライマー設計が可能で、かつ、ヒト及びマウスの鋳型を用いて特異性が確認出来た遺伝子産物である HSP90 及び Cytoglobin について、ヒト・マウスそれぞれの遺伝子産物量と HCV タイトーの関連を定量的 RT-PCR にて解析した。その結果、ヒト HSP90 は非感染群と比較して有意な変動を示さなかったが Cytoglobin は、ヒト及びマウスのいずれの Cytoglobin も、HCV 感染群において非感染群に比べて発現が減少することが分かった。

(3) 肝炎ウイルスとヒト肝細胞の相互作用の解析[GRP78 (HSPA5)の機能調査]。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。本研究では次の実験を行った。GRP78に対するRNAi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。

(4) キメララットの作製

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BAC Tg ラットの作製。過排卵誘起したWistar系統ラットの交配により得られた受精卵前核期胚、合計314個にマイクロインジェクション法によりBAC発現コンストラクトを注入した。マイクロインジェクションを受けたラット受精卵を顕微鏡下で観察してダメージなく発現コンストラクトを注入できた受精卵、264個を得、これらを偽妊娠ラットに移植することができた。これらの仮親ラットが分娩した産子を仮親に哺育させることにより、合計98頭の個体を離乳まで育成することができた。BAC発現コンストラクトを導入した初期胚からの産子数、離乳数が良好であったことから、組換えBAC型DTA発現コンストラクト自体による、ラット受精卵の発生、分化への悪影響はなかったと考えられる。これらの離乳した個体から、導入遺伝子を持つTgラットファウンダーとして合計10頭を得ることができた。これらのトランスジェニックラットファウンダーに導入した発現コンストラクトのコピー数は、1コピーから30コピーであった。 Cre deleterラットの作出。研究方法で述べたように、受精卵へのマイクロインジェクションに適した高純度のCre発現コンストラクトの精製物を調整した。これを(1)と同様の方法で、Wistar系統ラット由来の受精卵前核期胚、合計254個に注入し、159個を偽妊娠ラットに移植することができた。その結果、合計46頭の個体を離乳まで育成することができたが、サザンブロットハイブリダイゼーションによりTgラッ

トファウンダーのスクリーニングを行ったが、1頭もファウンダーを得ることができなかった。そのため、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[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頭の産子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DTA BAC Tgラットと交配し繁殖させている。

(5) 生体内環境に近い培養系で培養されたヒト肝細胞の増殖能。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細胞を使用し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検鏡し、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倍に増加していた。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

本研究によって、同一ゲノタイプのHCVが、クローンが異なると同一ヒト肝細胞から構築されているキメラマウス肝臓中で異なるスピードで増殖することが示された。使用したキメラマウスには、同じドナー由来のヒト肝細胞を移植しており、その原因は感染源(ウイルス)にあると考えられる。感染源1と2は共にgenotype 1bであり、これらウイルスがどのような仕組みで異なる増殖スピードを示すのかは不明である。詳細な塩基配

列の比較と、配列をスワップさせたキメラウイルスの作製等を行う必要があると考えられるが、今後の課題である。ウイルス感染によって誘導されるヒト遺伝子発現の変化を、平成23年度と24年度に渡って調べたが、再現性に問題があった。非再現性の原因は現時点で不明であり、今後、特に私達の観点から関心の高い遺伝子に関して再調査したいと考えている。

平成23年度と24年度の両年度に渡ってHCV感染初期における酸化ストレス及び資質代謝関連の遺伝子の発現動態をReverse Transcription-PCR array法で調べた。感染初期(3日)では、HCV RNAのタイトルは低く、大部分のヒト肝細胞はHCVに非感染であると考えられるにも拘らず、かなりの遺伝子(本実験では18遺伝子)がその発現レベルを変動させていた。どのような分子がこれらの変化を誘導しているかは不明だが、軽度の感染細胞が放出するウイルスタンパク質を含む因子あるいは、軽度感染細胞が周囲の細胞にウイルス感染を知らせる因子による誘導と推測されが、軽度感染肝細胞が、低量のウイルスそのもの、あるいは、少数の感染細胞が発する異常を知らせるシグナルを感知し“準備”していることを窺わせ興味深い。このウイルスに対する肝細胞の“preconditioning (priming)”の仕組みに関しては、今後、研究を展開したいと考えている。

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。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ホスト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、この可能性に関し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系統のファウンダー(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系統のファウンダーを交配し目的のキメララットのためのホスト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次元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

ホストとなるヒト肝細胞の遺伝的背景が一緒であっても、HCVの増幅スピードは感染源依存的に大きく異なり得ることを示した。また、HCVは感染の極く初期からヒト肝細胞の酸化ストレス及び脂質代謝関連遺伝子発現変化を誘導することも示した。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の

ウイルス増殖に必要な宿主因子として関与している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)を作成した。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

平成23年度

1. Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Aug 19; 412(1):74-9.

2. Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- β -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. *J Cell Physiol*. 2011 Oct; 226(10):2535-42.

3. Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama H, Ikeda K, Yoshizato K, Kawada N. Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. *Am J Pathol*. 2011 Aug; 179(2):1050-60.

4. Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo. *Hepatology*. 2011 Sep 2;54(3):781-8.

5. Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host interleukin-28b

polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2011 Sep 2;54(3):764-71.

6. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. *J Surg Res*. 2011 May 1;167(1):e29-37.

7. Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T, Miya F, Tsunoda T, Yoshizato K. Growth hormone-dependent pathogenesis of human hepatic steatosis in a novel mouse model bearing a human hepatocyte-repopulated liver. *Endocrinology*. 2011 Apr;152(4):1479-91.

8. Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo. *J Hepatol*. 2011 Jul;55(1):11-8.

9. Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol*. 2011 May; 54(5):872-8.

平成24年度

1. Fujiwara S, Fujioka H, Tateno C, Taniguchi K, Ito M, Ohishi H, Utoh R, Ishibashi H, Kanematsu T, Yoshizato K. A novel animal model for in vivo study of liver cancer metastasis. *World J Gastroenterol*. 2012 Aug 7;18(29):3875-82.

2. Iizuka M, Ogawa T, Enomoto M, Motoyama H, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Induction of microRNA-214-5p in human and rodent liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012 Aug 1;5(1):12.

3. Tatsumi K, Ohashi K, Tateno C, Yoshizato K, Yoshioka A, Shima M, Okano T. Human hepatocyte propagation system in the mouse livers: functional maintenance of the production of coagulation and anticoagulation factors. *Cell Transplant*. 2012;21(2-3):437-45.
 4. Ohashi K, Tatsumi K, Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Yoshizato K, Okano T. Liver tissue engineering utilizing hepatocytes propagated in mouse livers in vivo. *Cell Transplant*. 2012;21(2-3):429-36.
 5. Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology*. 2012 Aug;56(2):555-66.
 6. Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut*. 2012 Nov;61(11):1600-9.
 7. Yoshizato K, Tateno C, Utoh R. Mice with liver composed of human hepatocytes as an animal model for drug testing. *Curr Drug Discov Technol*. 2012 Mar;9(1):63-76. Review.
- 平成 25 年度
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
(分担)総合研究報告書(平成 23~25 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

NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性 C 型肝炎ウイルスの特性解析と miR-122 による
C 型肝炎ウイルス複製制御機構の解明

研究分担者 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: C 型慢性肝炎に対して、複数の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤の使用が開始されたが、薬剤耐性ウイルスによる breakthrough 肝炎の発症が懸念される。Breakthrough 肝炎の病態を考える際、その複製能、感染性粒子産生能を理解することが重要である。我々は、これら进行评估するために、分泌型ルチフェラーゼを培養細胞感染クローン遺伝子型 Ia の H77 遺伝子中に挿入し、細胞培養系での簡易的な複製能モニタリングシステムを構築した。さらに NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性変異体ウイルス計 25 種を作成し、複製能を検討した所、大部分の耐性ウイルスの複製能は、野生型より低く、野生型を上回ることにはなかった。また培養細胞感染系を用いて、これらの耐性変異体ウイルスの感染粒子産生能を検討した。その結果大部分の変異体は、複製能と同様に野生型に比べて低い感染性粒子産生能を示し、野生型を上回ることにはなかった。耐性ウイルスの複製能・感染性粒子産生能が、野生型を上回らないことを示した今回の結果は、breakthrough 肝炎患者の病態を考慮する際極めて重要と考えられた。また肝特異的マイクロ RNA である miR-122 は、HCV 複製を促進するため、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 感染チンパンジーおよび HCV 感染患者において抗ウイルス効果を示すことが報告されている。我々は miR-122 による HCV 複製制御機構の解明を行った。その結果、miR-122 は HCV RNA との結合を介して HCV RNA を安定化し、HCV RNA からの蛋白合成を促進し、結果的に HCV 複製を促進すること、さらに miR-122 による HCV RNA の安定化には Ago2 蛋白が必須であることも明らかとした。抗 miR-122 療法は、耐性ウイルスが出現しづらいことが知られており、今後 NS3/4A プロテアーゼ阻害剤を中心とした DAA_s 製剤との併用により、DAA_s 製剤耐性ウイルスの出現を抑制できる可能性が考えられ、今後検討を行う。

A. 研究目的

本邦でも C 型慢性肝炎の治療薬として、複数の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤の使用が開始された。ペグインターフェロンとリバビリンとの併用により、高い治療効果が期待される反面、NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスの出現、選択による breakthrough 肝炎の発症が懸念される。breakthrough 肝炎の病態を考える際、耐性ウイルスの RNA 複製能、感染性粒子産生能を理解することが極めて重要である。

今回我々は、複数の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスの特性を明らかにするた

めに、まず、培養細胞感染クローンである遺伝子型 Ia H77 株を用いた、簡易的な薬剤感受性、複製能モニタリングシステムの構築を行った。さらに同系に、NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性に関わることが報告されている変異を挿入し、NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルス 25 種を作成し、これらのウイルスの複数の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤に対する感受性、RNA 複製能を検討した。また同時にこれらの NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスの感染性粒子産生能も検討した。

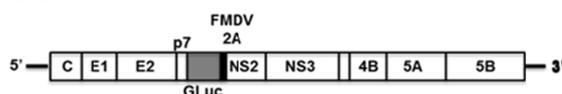
また肝特異的に発現するマイクロ RNA である miR-122 は HCV の複製に促進的に働くこ

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 型慢性肝炎の有力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。そのため 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) 培養細胞感染クローンである H77 株の p7 と非構造蛋白 NS2 の間に分泌型ルチフェラーゼである Gaussia luciferase (以下 GLuc)、さらに GLuc の C 端側での切断のために Foot Mouse Disease Virus 2A (FMDV2A) 蛋白を挿入しその複製を検討した。(H77S.3/GLuc2A、図 1)

図 1



- 2) 既報から、NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性に寄与することが報告されている NS3 プロテアーゼ領域の変異 25 種類を個別に H77S.3/GLuc2A に挿入し、合計 25 個の耐性ウイルスを作成した。これらの耐性ウイルスに関して、4 種類の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤 Boceprevir、Danoprevir、Vaniprevir、Ciluprevir に対する薬剤感受性を、EC50 を算出することで検討した。また耐性ウイルスの複製能を、野生型と比較検討した。
- 3) 培養細胞感染クローンである H77 株に、NS3/4A 阻害剤耐性に関わることが報告されている変異を一つずつ挿入した耐性変異体ウイルス 25 種類を作成した。これら変異体ウイルス RNA をヒト肝癌細胞株

(Huh7.5)細胞に遺伝子導入し、96 時間後にメディアムを回収し、naïve Huh7.5 に感染させた。さらにその 72 時間後に FFU assay を行い、1ml あたりの感染性粒子産生能を算出した。

- 4) 各々の耐性ウイルスの RNA 複製能と感染性粒子産生能を比較した。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) Ago2 ロックアウト細胞に非複製 HCV RNA(5)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)

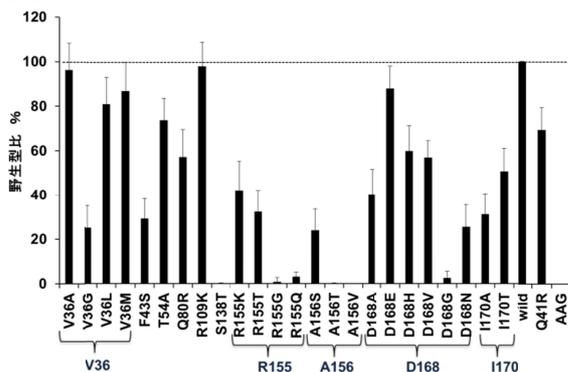
本研究では感染性粒子を産生しうる HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確

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) H77S.3/GLuc2A を肝癌細胞株に遺伝子導入したところ、良好な複製を示した。また GLuc の活性は、定量 PCR 法にて測定した HCV RNA 量と良好な相関を示した。
- 2) 次に合計 25 個の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性変異をこの GLuc を含んだウイルスに挿入し、耐性ウイルスを作成した。これらの耐性ウイルスに対して、4 種類の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤 (Boceprevir、Danoprevir、Vaniprevir、Ciluprevir) に対する感受性を検討した所、ほぼ既報と一致するような薬剤耐性が確認された。))
- 3) さらに、これらの耐性ウイルスの複製能を GLuc assay を用いて測定し、野生型に対して比較検討した (図 2)。V36A/L/M、Q41R、R109K、D168E、I170A の変異体ウイルスに関しては、野生型と同等の複製能を示したが、他のウイルスに関しては、野生型に比べて弱い複製能であった。

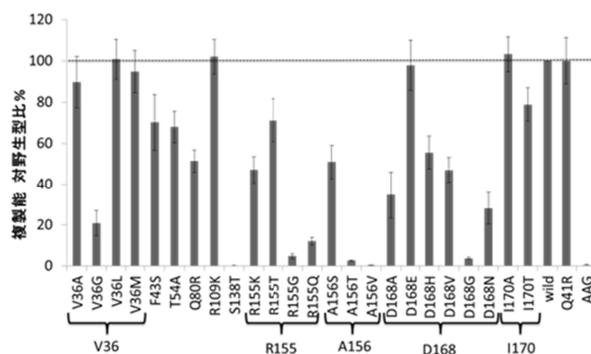
図 2



- 4) FFU assay にて測定した各変異体ウイルスの感染性粒子産生能を測定し、野生型との比較を行った。その結果、V36A/L/M、Q41R、R109K、D168E、I170A に関しては野生型と同等の感染性

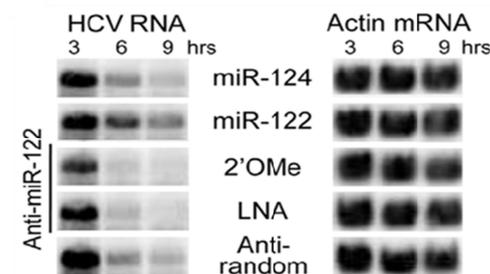
粒子産生能を示したが、他の大部分の変異体ウイルスは、野生型に比べて低い感染性粒子産生能を示した (図 3)

図 3



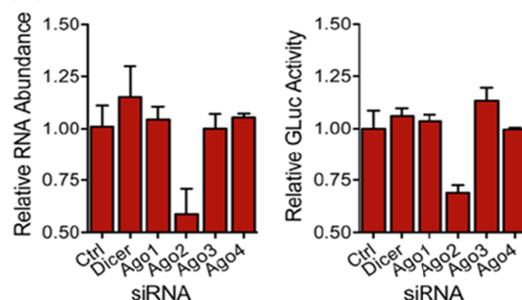
- 5) miR-122 の投与により非複製 HCV RNA は安定化され、miR-122 アンチセンス鎖の投与により、非複製 HCV RNA は不安定化された。(図 4) また miR-122 の投与により、非複製 HCV RNA からの蛋白合成は促成され、逆に miR-122 アンチセンス鎖の投与により、蛋白合成は抑制された。この結果から HCV RNA を安定化することで HCV の蛋白合成を促進し、結果的に HCV 複製を促進することが明らかとなった。

図 4



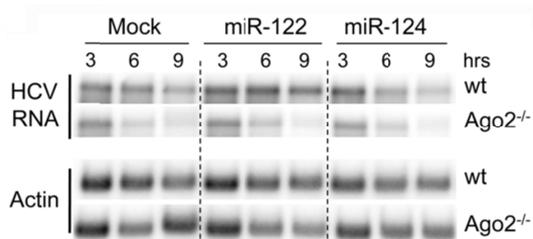
- 6) Ago2 蛋白の siRNA によるノックダウンにおいてのみ HCV 複製の抑制を認めた。(図 5)

図 5



- 7) 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6)

図6



D. 考察

臨床的に breakthrough 肝炎を発症し、NS3/4A 阻害剤耐性ウイルスが出現しても、治療終了後自然消失し、野生型が優位になることが知られている。大部分の NS3/4A 阻害剤耐性ウイルスの RNA 複製能と感染性粒子産生能は野生型より低いという今回の培養細胞系を用いた検討は、この臨床的知見に合致するものであった。

また抗 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) 分泌型ルチフェラーゼ GLuc を HCV 遺伝子中に挿入することで、簡易的な HCV 複製モニタリングシステムを構築した。
- 2) NS3/4A プロテアーゼ阻害剤耐性変異体ウイルスは、野生型の RNA 複製能や感染性粒子産生能を上回ることはな

く、大部分は、野生型より低い RNA 複製能や感染性粒子産生能を示した。

- 3) 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。また 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 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

- 4) H Okada, M Honda, JS Campbell, Y Sakai, T Yamashita, Y Takebuchi, K Hada, T Shirasaki, R Takabatake, M Nakamura, H Sunakozaka, T Tanaka, N Fausto, S Kaneko. Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. Cancer Res 72(17):4459-71, 2012
- 5) M Honda, K Takehana, A Sakai, Y Tagata, T Shirasaki, S Nishitani, T Muramatsu, T Yamashita, Y Nakamoto, E Mizukoshi, Y Sakai, T Yamashita, M Nakamura, T Shimakami, M Yi, SM Lemon, T Suzuki, T Wakita, S Kaneko; Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition Impairs Interferon Signaling through mTOR and FoxO pathways in Patients with Chronic Hepatitis C. Gastroenterology 141(1):128-140. 2011

G. 知的所有権の取得状況

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）
（分担）研究報告書（平成23～25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

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

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：ヒト不死化肝細胞の中空系による簡便な立体培養法で患者由来のC型肝炎ウイルス(HCV)の感染増殖を再現する実験系を独自に開発してきた。立体培養下で発現が変化する遺伝子をマイクロアレイ法によって解析し、アラキドン酸カスケードに関連するいくつかの遺伝子の発現が変動していることを見出した。また、このカスケードの上流酵素であるシクロオキシゲナーゼ1の阻害剤とトロンボキサン₂ (TXA₂) 合成酵素(TXAS)阻害剤が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すことを見出した。また、TXAS阻害剤やTXA₂と拮抗的に機能するプロスタグランジンI受容体アゴニストはヒト肝細胞キメラマウスにおいても患者血由来HCVの感染増殖を阻害した。TXAS阻害剤の抗HCV効果の分子機構を解析した結果、細胞内における感染性HCV粒子産生を阻害していることがわかった。また、TXASはその産物であるTXA₂によってTXA₂受容体を介さない未知のシグナル系によって感染性HCV粒子産生に関わっていることが明らかとなった。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が、その原因のひとつは薬剤抵抗性HCVの出現によるものであることが考えられた。本研究によりTXAS阻害薬およびIPアゴニストが感染性HCV産生阻害による新規抗HCV薬剤となることが明らかとなった。

A. 研究目的

これまでに、患者由来のC型肝炎ウイルス(HCV)の感染増殖細胞培養系としてヒト不死化肝細胞の立体培養系を独自に開発している。この系では平面培養では得られなかった効率で感染増殖や感染性粒子産生がおこなわれる。このことをもとに、このウイルスの生活環に関わる細胞側因子の詳細を明らかにして、これを効果的に抑制する薬剤を抗HCV薬候補として同定することを目的とした。

B. 研究方法

1. 独自に樹立したヒト不死化肝細胞を立体培養することにより種々の患者血清由来HCVの感染増殖を効率良くおこな

うことが可能になることから、この細胞の立体培養下における遺伝子発現パターンをマイクロアレイ法によって解析した。そして通常培養と比較して立体培養において変化する遺伝子群の解析結果からHCVの感染増殖と関連する細胞内反応系候補としてアラキドン酸カスケード(AAC)を同定した。

2. 組換え体HCV(JFH1)感染性粒子産生実験系にAACに含まれる酵素の阻害剤等で処理し、その細胞内あるいは培地中に放出されるHCV RNA量、そして培地中のHCV感染性を検証した。
3. トロンボキサン₂ (TXA₂) 合成酵素(TXAS)阻害剤Ozagrelの作用機序を明らかにするためにOzagrel、TXASの既知基

質プロスタグランジン H₂ (PGH₂)、TXA₂ 受容体アゴニストやアンタゴニストを JFH1 感染性粒子産生系に対して加えて、TXAS 活性による感染性 HCV 産生の分子機構の解析をおこなった。

4. ヒト肝臓キメラマウスに患者血由来遺伝子型 1b の HCV を感染させた後、培養細胞系で抗 HCV 効果が認められた薬剤で処理し、その感染増殖に対する効果を検討した。

(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. 不死化肝細胞を中空系あるいはメビオールゲルによる立体培養法を用いて培養した場合と通常の培養皿による培養法を用いた場合におけるその遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイ法によって解析したところ、プロスタグランジン (PG)D 合成酵素 (PGDS) と TXAS の mRNA 量が 2 つの方法に共通して立体培養時に上昇し、それとは逆に PGI と PGE 合成酵素の mRNA 量が減少していることがわかった。
2. 上記の結果から立体培養によって AAC の最終産物が増加することが推定されたため、まず AAC が HCV の生活環に与するか否かを組換え体 HCV (JFH1) 感染性粒子産生実験系を用いて、AAC の律速酵素、シクロオキシゲナーゼ I の阻害剤の効果を検討した。その結果、細胞内に存在する、あるいは培地中に放出さ

れた HCV RNA は全く変化せず、複製や培地中への粒子産生には大きな変化はないことがわかった。しかしながら培地に存在するウイルス様粒子の感染性がこの阻害剤により濃度依存的に抑制されることがわかった。

3. 立体培養時に上昇する PGDS 遺伝子は組換え体 HCV 産生細胞では発現が認められなかったので同様の挙動を示した TXAS 遺伝子の mRNA に対する siRNA を用いてこの細胞を処理するとやはり 2. の結果と同様に HCV の複製や培地中への粒子産生には大きな変化はなかったが培地中の感染性が著しく低下することがわかった。
4. 3. 同様の実験を TXAS 活性阻害剤である Ozagrel を培地に加えておこなったが siRNA と全く同様の結果が得られた。
5. Ozagrel で処理そして未処理の HuH-7 細胞から抽出された総脂肪酸のマス解析の結果、アラキドン酸を含む、検出されたすべての脂肪酸の組成は Ozagrel の処理によって変化していないことがわかった。
6. JFH1 感染性粒子産生系に PGH₂ を過剰に添加したところ、細胞中や培地中の HCV RNA は変化がなく、培養上清中に産生される感染性 HCV の量が増加することがわかった。
7. 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、対照実験に比較して、産生された HCV 粒子量は変化しなかった。
8. 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。

9. 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。
10. ヒト肝臓キメラマウスに患者血由来遺伝子型 1b の HCV を感染させた後、これに Ozagrel ならびに TXA₂ と相反する効果を有する PGI の受容体(IP)に対するアゴニストを投与し、その感染増殖に対する効果を検討した結果、Ozagrel ならびに IP アゴニストは効率良く HCV の増殖を抑制することがわかった。
11. 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 を新たなキメラマウスに感染させ、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。
12. 11.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. ヒト不死化肝細胞の立体培養によって変化が認められた AAC の TXAS は感染性粒子産生に重要な細胞因子であり、TXAS 活性阻害によって感染性粒子産生が抑制される事がわかった。
2. 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。
3. 2.で示唆された 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。

4. 脂肪酸組成の解析では未処理細胞との大きな変化は認められなかったことから、少なくとも Ozagrel の効果が、その処理のために細胞内の脂肪酸組成が著しく変化することによるものではないことが考えられた。
5. ヒト肝臓キメラマウスに感染させた患者血由来遺伝子型 1b の HCV の感染伝播を Ozagrel ならびに IP アゴニストは効率良く抑制したことからこれらの薬剤が抗 HCV 薬剤の新たな候補となることが考えられた。
6. 5.の結果からヒトの肝臓においても TXA₂ と PGI は相反する効果を示す事が考えられた。
7. 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

TXAS 阻害薬と IP アゴニストは HCV 粒子産生細胞に働きかけ感染性粒子産生を抑制する働きを有することが示唆された。したがって、これらの薬剤は抗 HCV 薬の候補と考えられ、またこれらの効果によって変化する細胞因子は抗 HCV 薬剤開発の新たな標的となることが期待された。これらの薬剤はすでに他の疾患治療に使用されているものであり、早期に治療への応用が期待できるものと考えられた。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.
- 3) Aly H.H., Shimotohno K., Hijikata M., Seya T.: In vitro models for the analysis of HCV life cycle, *Microbiol. and Immunol.*, 2012, 56, 1, 1-9.
- 4) Wakita T., Suzuki T., Evans M.J., Shimotohno K., Chayama K., Matsuura Y., Hijikata M., Moriishi K., Seya T., Enomoto N., Koike K., Kato N., Kanto T., Hotta H.: Will there be an HCV meeting in 2020? summary of the 17th international meeting in hepatitis C virus and related viruses, *Gastroenterology*, 2011, 141(1), E1-E5.
- 5) Ariumi Y., Kuroki M., Kushima Y., Osugi K., Hijikata M., Maki M., Ikeda M., Kato N.: Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets, *J. Virol.*, 2011, 85(14), 6882-6892.

2. 学会発表

- 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. 20th International

symposium on hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, Oct 6-10, 2013

- 2) Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijikata M.: 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

- 8) Hijikata M.: Modulation of infectious hepatitis C virus production by prostanoid. 科学技術戦略推進費「アジア・アフリカ科学技術協力の戦略的推進 国際共同研究の推進」事業「鳥インフルエンザ治療薬の国際共同開発研究」国際シンポジウム, Challenges to overcome Emerging Infectious Diseases in South-eastern Asia, Kyoto, Japan, January 13, 2012.

9) Tsugawa Y. and Hijikata M.: Hepatocyte-specific innate immune systems in response to RNA virus infection. The 10th International Student Seminar. Kyoto, 5-8 March 2012.

10) Abe Y., Aly H., Imamura M., Wakita T., Shimotohno K., Chayama K., Hijikata M.: Thromboxane A₂ synthase plays a key role in production of infectious HCV particles. The 7th International symposium of institute network. Seoul, Korea, Aug. 22-24th, 2012

11) Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijikata M.: Critical role of Interferon alpha constitutively produced in human hepatocytes in response to virus infection. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 11-14 September 2012

12) Abe Y., Aly H., Imamura M., Wakita T., Shimotohno K., Chayama K., Hijikata M.: Thromboxane A₂ synthase plays a key role in production of infectious HCV particles. 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Venice, Italy, Oct 5-9, 2012

13) Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijikata M.: Hepatocyte-specific innate immune systems in response to viral infection. 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Venice, Italy, Oct 5-9, 2012

14) Kuroki M., Inoue M., Hijikata M., Ikeda M., Wakita T., Shimotohno K., Kato N., Ariumi Y.: Can P-body associated host factors APOBEC3G and MOV10 restrict HCV infection? 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Venice, Italy, Oct 5-9, 2012

15) 津川 陽司、土方 誠：ヒト肝細胞における抗ウイルス自然免疫応答機構の解析、第8回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島、平成24年7月6日

16) 土方 誠：C型肝炎ウイルス培養系開発過程で最近わかったこと、国立感染症研究所肝炎セミナー、国立感染症研究所、東京平成24年年10月31日

17) 津川陽司、加藤博己、藤田尚志、下遠野邦忠、土方誠：ヒト肝細胞における抗ウイルス自然免疫応答機構の解析、第60回日

本ウイルス学会学術集会．大阪2012年11月13-15日

18) 阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、今村道雄、脇田隆字、下遠野邦忠、茶山一彰、土方誠：C型肝炎ウイルス(HCV)の感染性粒子形成において重要な宿主因子、トロンボキサン A₂(TXA₂)合成酵素の同定と機能解析、第60回日本ウイルス学会学術集会．大阪2012年11月13-15日

19) 有海康雄、黒木美沙緒、井上万里子、土方誠、池田正徳、脇田隆字、下遠野邦忠、加藤宣之：P-body 因子とHCVのクロストーク、第60回日本ウイルス学会学術集会．大阪2012年11月13-15日

20) Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijikata M.: Constitutively produced Interferon α functions in prevention of viral infection in human hepatocytes、第35回日本分子生物学会年会．福岡2012年12月11~14日

21) Kushima Y., Abe Y., Wakita T., Shimotohno K., Hijikata M.: Novel targets for anti HCV drugs preventing infectious virus particle production. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference, The Latest Advances in Liver Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics, Chiba, Japan, March 1-3, 2011.

22) Abe Y., Aly H.H., Wakita T., Shimotohno K., Hijikata M.: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production. The 6th International symposium of institute network. Tokyo, Japan, June 9-10, 2011

23) Abe Y., Wakita T., Shimotohno K., Hijikata M.: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus particle production. 18th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, USA, Sept 8-12, 2011

24) Abe Y., Aly H.H., Wakita T., Hijikata M.: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production.

平成23年12月12-15日、横浜、2011年

25) 阿部雄一、下遠野邦忠、脇田隆字、土方 誠：HCV粒子の感染性獲得に關与する

肝細胞内シグナルの解析、第7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23年7月1日、広島、2011年

26) 土方誠：プロスタノイドによるHCVの感染性粒子産生制御、平成23年度北海道大学遺伝子病制御研究所 研究集会『感染、免疫、炎症、発癌』、平成23年12月4-5日、札幌 2011

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、膵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

4) 特許出願：発明者 土方誠、アリハサン フセイン、山口達哉、上皮系体性幹細胞の製造方法、出願日 2012/3/25、出願番号 PCT/JP2012/057468

5) 特許出願：発明者 土方誠、アリハサン フセイン、山口達哉、上皮性体性肝細胞の製造方法、出願日 2011年3月25日、出願番号 特願2011-67112

6) 特許出願：発明者 土方誠、阿部雄一、脇田隆字、茶山一彰、C型肝炎ウイルスの感染抑制剤、出願日2011年9月30日、出願番号 PCT/JP2011/072682

作成上の留意事項

1. 「A. 研究目的」について

・厚生労働行政の課題との関連性を含めて記入すること。

2. 「B. 研究方法」について

(1) 実施経過が分かるように具体的に記入すること。

(2) 「(倫理面への配慮)」には、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意(インフォームド・コンセント)に関わる状況、実験に動物に対する動物愛護上の配慮など、当該研究を行った際に実施した倫理面への配慮の内容及び方法について、具体的に記入すること。倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記すること。

なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、疫学研究に関する倫理指針(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、遺伝子治療臨床研究に関する指針(平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成18年厚生労働省告示第425号)、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(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続を行うこと。

3. 「C. 研究結果」について

・当該年度の研究成果が明らかになるように具体的に記入すること。

4. その他

(1) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。

(2) 文字の大きさは、10～12ポイント程度とする。

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23～25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と 肝臓特異的インターフェロン- γ 治療法の開発

分担研究者 高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 インターフェロン- α (IFN- α)抵抗性HCVを感染させたヒト肝細胞キメラマウスに対して、持続的にIFN- γ を発現するIFN- γ 発現plasmid DNA (pDNA)あるいは一過性にIFN- γ を発現するIFN- γ 発現pDNAをハイドロダイナミクス法を用いて遺伝子導入した。持続性のIFN- γ 発現pDNAの遺伝子導入により血清中HCV RNA量は検出限界以下となりその効果は持続した。一方で、一過性発現の場合には4匹中1匹においてのみ血清中HCV RNA量が減少したが、血中HCVのリバウンドが観察された。持続的なIFN- γ 発現による肝障害の可能性について検討したところ、投与後初期に一過性に血清ALTの上昇が認められたが観察終了時にはもとのレベルに回復していた。また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考えられる。

併せて、IFN- γ の肝臓特異的な作用発現を目的として、マウスIFN- γ とヘパラン硫酸結合ドメイン (heparin binding domain; HBD)との融合タンパク質を設計し、これを発現するpDNAを構築し、その動態制御能について評価した。また、IFN- γ に肝臓指向性を持つことが知られているアポリポrotein A-I (ApoA-I)と融合することで効率的なIFN- γ の肝臓デリバリーに関する検討も行った。

A . 研究目的

これまでに例数は少ないものの、長期のIFN- γ 遺伝子発現を可能とするpDNA、pCpG-IFN- γ を投与し、持続的にIFN- γ を作用させることでHCV感染キメラマウスにおいて高い抗HCV効果が得られる可能性が

あることを報告していた。そこで、本研究では検体数を増やすことで持続的なIFN- γ 遺伝子発現のC型肝炎に対するin vivoにおける治療有効性を検証した。併せて、IFN- γ 遺伝子発現の持続性がC型肝炎に対する治療効果に及ぼす影響について評価するため

に一過性のIFN- γ 発現を示すIFN- γ 発現pDNA (pCMV-IFN- γ) をHCV感染キメラマウスに遺伝子導入した。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肝傷害性について評価した。

また、肝臓特異的なIFN- γ の作用発現による治療有効性の向上を目的に、以下の2つのアプローチについて検討した。肝臓を遺伝子導入部位とし、遺伝子導入部位近傍のIFN- γ 濃度を選択的に増大し、全身循環中のIFN- γ 濃度を低く抑えることを目指し、細胞外マトリクスであるヘパラン硫酸糖に結合親和性を持つことが知られている

extracellular superoxide dismutase由来C末端ヘパラン硫酸結合ドメイン (HBD)をIFN- γ のC末端に融合することで遺伝子導入された細胞で産生・分泌後、細胞表面に留まる機能を賦与した。また、肝硬変などの併発により肝臓への遺伝子導入が困難な場合を想定して、肝臓以外の部位に肝臓指向性IFN- γ を遺伝子導入することによる、遺伝子治療法の開発に着手した。IFN- γ を肝臓指向性が高い高比重リポタンパク質(HDL)の主要な構成タンパク質であるApoA-Iとの融合タンパク質とし、肝臓指向性IFN- γ をデザインした。

B . 研究方法

1. 持続型IFN- γ 発現pDNAを用いた抗HCV効果の検討

pDNA : 持続的な遺伝子発現が可能であるpDNA骨格(pCpG-mcs: InvivoGen)にヒトIFN- γ cDNAを挿入したpCpG-huIFN- γ を用いた。pCpG-IFN- γ およびpCMV-IFN- γ を用いた。別途GFPを発現するpDNA

(pEGFP-N1)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。血中ヒト血清アルブミン濃度を測定することでヒト肝細胞置換率を確認した。HCV感染モデル: 高置換キメラマウスにI型IFN抵抗性を示す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。pEGFP-N1を投与した個体については肝臓の凍結切片を作製した。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。肝傷害性の評価: 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。別途、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。

2. 細胞表面付着型IFN- γ 発現pDNAの構築

pDNA : HBDをIFN- γ のC末端に融合した。このとき、IFN- γ に融合するHBD数が1から3までの3種類の融合タンパク質IFN- γ -(HBD)₁₋₃をデザインし、融合タンパク質発現pDNA (pCpG-muIFN- γ -(HBD)_n : n = 1~3)を構築した。IFN- γ 発現量の定量: 構築したpDNAを培養細胞に導入し、上清中および細胞画分の各融合IFN- γ 発現量をELISA法により測定した。IFN- γ 生物活性の

評価：IFN-gamma activated site (GAS) 駆動性のルシフェラーゼ発現pDNA

(pGAS-Luc) を遺伝子導入したB16-BL6細胞を用いて生物活性を評価した。細胞表面滞留性の評価：抗IFN- γ 抗体を用いて免疫蛍光染色法を行うことで、融合IFN- γ の細胞表面滞留性を評価した。マウスへの遺伝子導入と生物活性および体内動態の評価：ハイドロダイナミクス法を用いてマウス肝臓に各pDNAを遺伝子導入した。IFN- γ 血中濃度をELISA法により測定した。HBD融合IFN- γ 発現pDNAを遺伝子導入したマウスに対して、HBDとヘパリン硫酸の相互作用を阻害可能するヘパリンを静脈内投与し、血中に遊離するIFN- γ 量を測定することでHBD融合IFN- γ の細胞外マトリクスとの結合性を評価した。抗腫瘍効果と有害作用の評価：M5076細胞を用いて肝転移モデルマウスを作製し、各IFN- γ 発現pDNAを投与し、肝臓中結節数を評価することで抗腫瘍効果を判定した。別途、体重を指標にIFN- γ が全身で非特異的に作用することによる有害作用を評価した。

3. 肝臓指向性IFN- γ 発現pDNAの構築

pDNA：ApoA-IをマウスIFN- γ のC末端に融合することでApoA-I融合IFN- γ 発現pDNA

(pCpG-IFN- γ -ApoA-I) を構築した。ApoA-I融合IFN- γ のIFN- γ 活性評価：IFN- γ 依存的にホタルルシフェラーゼを発現する

pGAS-Lucを遺伝子導入したマウスメラノーマ細胞株B16-BL6細胞を用いてIFN- γ 活性を評価した。肝臓中IFN- γ 活性の評価：マウス下肢筋肉へ遺伝子導入した後、1日後に肝臓を回収し、IFN- γ の標的遺伝子であるSuppresser of Cytokine Signaling 1 (SOCS1)の

mRNA量を測定することでIFN- γ 活性を評価した。

C . 研究結果

HCV感染モデルマウスに対するIFN- γ 遺伝子治療効果治療効果の検討

まず、GFP発現pDNAを用いてヒト肝細胞およびマウス肝細胞の遺伝子発現に対する寄与について評価を行った。その結果、キメラマウスの肝臓中のヒト由来肝細胞およびマウス由来肝細胞の両者において遺伝子発現が得られたが、ヒト由来肝細胞においてより多数のGFP発現細胞が観察され、その発現も強かった。

HCV感染キメラマウスに対して短期発pCMV-IFN- γ 発現pDNAを投与した。遺伝子導入を行った4匹の個体の内、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たが、投与30日以降に再び血中HCV RNAが検出された。また、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HCV感染キメラマウスに投与した。その結果、遺伝子導入3日後よりウイルス価の減少が認められ、14日後以降は検出限界以下、もしくは、著しくウイルス価が減少することが明らかとなった。また、投与から8週間が経過後に肝臓を回収し、HCV RNA量を定量したところ検出されなかったことから、肝臓からのHCVの除去が示唆された。

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、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、4週間後にはもとのレベルに回復していた。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後にHE染色切片を作製し傷害性の有無を判定したが、明確な傷害は認められなかった。

細胞表面接着型インターフェロン- γ の治療効果の検討

新規デザインしたHBD融合IFN- γ の生物活性と細胞表面付着能を培養細胞の系で評価した。その結果、HBD融合IFN- γ の細胞表面への付着能はHBD数の増加に伴い増加することを確認した。また、HBD融合IFN- γ が天然型IFN- γ と同程度のIFN- γ 生物活性を保持していることも確認した。次に、ハイドロダイナミクス法を用いてマウスに遺伝子導入したところ、培養細胞での結果と同様に、HBD数に依存した細胞表面への付着が増加する傾向が認められた。HBD融合IFN- γ 発現pDNA投与マウスに対してヘパリンを静脈内投与したところ、ヘパリン投与により血清中IFN- γ 濃度が30倍程度上昇したことから、HBD融合IFN- γ が細胞外マトリクスと相互作用することで血中濃度が低く抑えられているものと考えられた。肝転移腫瘍モデルマウスにおいて抗腫瘍効果と有害作用の評価を行ったところ、天然型IFN- γ 発現pDNA投与群では抗腫瘍効果が得られたが同時に体重も減少した。一方、HBD融合IFN- γ 発現pDNAを投与した群では、体重減少することなく天然型IFN- γ と同等の抗腫瘍効果が得られた。

ApoA-I融合インターフェロン- γ の肝臓指向性の検討

ApoA-I融合IFN- γ の生物活性を評価した結果、天然型IFN- γ と比較して約31%の生物活性を保持していることが明らかとなった。マウス下肢筋肉にApoA-I融合IFN- γ 発現pDNAを遺伝子導入した後、ApoA-I融合IFN- γ の血清中濃度と肝臓中のSOCS1発現を測定することでApoA-I融合IFN- γ の肝臓指向性を評価した。その結果、ApoA-I融合IFN- γ -遺伝子を導入したマウスにおいて血清中IFN- γ 濃度は天然型IFN- γ 遺伝子を導入したマウスより低い、肝臓中でのSOCS1mRNA発現の誘導は同等かそれ以上であることが認められた。

D. 考察

本研究では、I型IFN抵抗性HCV感染キメラマウスを用いてIFN- γ 発現pDNAの治療有効性を検証した。

その結果、持続的にIFN- γ を発現することで著しくウイルス価が減少する、あるいは、検出限界以下に至ることが明らかとなった。また、一度ウイルス価が検出限界まで低下したマウスにおいて、観察終了までの8週に渡り再燃が認められなかった。一方で、短期IFN- γ 発現pDNAの投与による抗HCV効果は非常に弱く、有意な抗HCV効果が得られた固体においてもHCVの再発も観察された。これらの結果は、I型IFN抵抗性HCVに対する持続的なIFN- γ 遺伝子治療の有用性を示すものと考えられる。

GFPを用いた遺伝子導入効率の検討において、ヒト由来肝細胞およびマウス由来肝細胞の両者において遺伝子発現が得られた

が、これは本法を用いることでヒト由来肝細胞へも遺伝子導入が可能であることを示す結果である。また、特にヒト由来肝細胞において良好な遺伝子発現が得られたことから、本遺伝子導入法の有用性が示された。また、IFN- γ を持続的に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、組織観察の結果からは明確な肝障害を示す像は得られなかったことから、IFN- γ 遺伝子治療の安全性は高いと考えられる。

IFN- γ をHBDとの融合タンパク質とすることによりその生物活性を保持しつつその体内動態を制御できることが明らかとなった。また、HBD融合IFN- γ は*in vivo*における癌細胞の増殖を天然型IFN- γ と同様に抑制可能である一方で、有害事象が観察されなかったことから、HBD融合IFN- γ の有用性が証明された。

ApoA-I融合IFN- γ は天然型IFN- γ と比較して、その生物活性は若干低下するものの、その血中濃度で比較すると天然型IFN- γ より効率的に肝臓で生物活性を得られる可能性が示された。この結果はIFN- γ とApoA-Iを融合することで効率的なIFN- γ の肝臓デリバリーが達成可能になることを示すものとする。

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。以上の結果は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。また、HBD融合IFN- γ およびApoA-I融合IFN- γ の利用により肝臓特異的なIFN- γ 作用が誘導され、これらが肝炎治療のための有用なアプローチになる可能性が示された。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. 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 γ fusion protein with improved pharmacokinetic properties and sustained biological activity. *J Pharm Sci.*, 2013. 102(9):3110-3118
5. Watcharanurak K, Nishikawa M, Takahashi Y, Takakura Y. "Controlling the kinetics of interferon transgene expression for improved gene therapy." *J Drug Target.*, 2012. 20(9): 764-769
6. Watcharanurak K, Nishikawa M, Takahashi Y, Kabashima K, Takahashi R, Takakura Y. Regulation of immunological balance by sustained interferon- γ gene transfer for acute phase of atopic dermatitis in mice. *Gene Ther.*, 2013. 20(5):538-544
7. Ando M, Takahashi Y, Nishikawa M, Watanabe Y, Takakura Y. Constant and steady transgene expression of interferon- γ by optimization of plasmid construct for safe and effective interferon- γ gene therapy. *J Gene Med.*, 2012. 14(4):288-295
8. Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Development of safe and effective nonviral gene therapy by eliminating CpG motifs

from plasmid DNA vector. *Front Biosci (Schol Ed)*., 2012. 4:133-141

9. Takahashi Y, Nishikawa M, Takiguchi N, Suehara T, Takakura Y. Saturation of transgene protein synthesis from mRNA in cells producing a large number of transgene mRNA. *Biotechnol Bioeng.*, 2011. 108(10):2380-2389

2. 学会発表

1. Mitsuru Ando, Yuki Takahashi, Hanae Mukumoto, Makiya Nishikawa, Yoshihiko Watanabe and Yoshinobu Takakura. "Design and hydrodynamic gene transfer of 'sticky' IFN γ for liver-directed gene therapy." 14th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy May, 2011, Seattle, WA, USA
2. 三坂真之、宮川典子、西川元也、高橋有己、安藤 満、渡部好彦、高倉喜信. "血中滞留化と活性保持を両立するインターフェロン誘導体の開発" 日本薬剤学会第26年会、東京、2011年 5月
3. Kanitta Watcharanurak, Makiya Nishikawa, Yuki Takahashi, Kenji Kabashima, Rei Takahashi and Yoshinobu Takakura. "Regulation of immunological balance by sustained interferon- γ gene transfer for atopic dermatitis in mice." 第27回日本DDS学会学術集会、東京、2011年 6月
4. 高倉喜信、安藤 満、高橋有己、西川元也 "各種肝疾患治療を目指したインターフェロン体内動態の時空制御の試み" 第7回広島肝炎プロジェクト研究センターシンポジウム、広島、2011年7月
5. Yoshinobu Takakura. "Optimization of interferon- γ cancer gene therapy by regulating transgene expression profile or controlling the tissue distribution of transgene product" 38th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society(National Harbor, Maryland USA), July 30 - August 3 (2011)
6. 戎浦規文、高橋有己、西川元也、高倉喜信 "抗原タンパク質の発現プロファイル依存的な抗原特異的免疫応答の解析" 第21回アンチセンスシンポジウム + 第11回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム 合同シンポジウム、大阪、

2011年9月

7. Yuki Takahashi, Yuriko Matsui, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura. “Kinetic comparison of gene silencing profile of siRNA and shRNA-expressing plasmid DNA in vivo.” 7th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (September 8-10, Copenhagen, Denmark)
8. Yuki Takahashi, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura. “Depletion of tumor-associated macrophages can enhance the anticancer effect of interferon- γ gene therapy”第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月
9. 高橋有己、安藤 満、西川元也、渡部好彦、高倉喜信 “細胞表面接着型インターフェロンを利用した標的特異的作用型遺伝子治療システムの開発” 第61回日本薬学会近畿支部総会・大会、神戸、2011年10月
10. 高倉喜信. “ウイルス性肝炎および肝がん治療を目的としたインターフェロン遺伝子デリバリー” 日本薬学会第132年会、札幌、2012年3月
11. 安藤 満、高橋有己、西川元也、高倉喜信. “機能性ペプチド融合によるIFN- γ 時空間制御” 日本薬学会第132年会、札幌、2012年3月
12. Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura Y. “Long-term elimination of human hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice after single administration of plasmid DNA expressing human interferon- γ ” 15th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (May 16-19, Philadelphia, PA, USA)
13. 高橋有己、西川元也、高倉喜信. “体内動態と生体応答の制御に基づくインターフェロン癌遺伝子治療法の開発” 日本薬剤学会第27年会、神戸、2012年5月
14. 安藤 満、高橋有己、山下拓真、西川元也、高倉喜信 “肝炎・肝がん治療を目的としたインターフェロン遺伝子治療の最適化” 第8回広島肝炎プロジェクト研究センターシンポジウム、広島、2012年7月
15. 安藤 満、高橋有己、西川元也、渡部好彦、高倉喜信. “ヘパラン硫酸結合ドメインの融合による細胞表面付着型インターフェロン γ の開発と遺伝子デリバリーによる疾患治療” 第34回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、京都、2012年11月
16. Ando M, Takahashi Y, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura Y. “Complete elimination of hepatitis C virus by sustained nonviral gene delivery of human interferon- γ in human hepatocyte chimeric mice” Globalization of Pharmaceuticals Education Network Meeting 2012 Nov, 2012, Melbourne, Australia
17. 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
18. 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
19. 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)
(分担) 研究報告書(平成23~25年度)
創薬と新規治療法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

次世代シーケンサーを用いた肝病態進展と抗ウイルス治療効果と関連する
ウイルス遺伝子変異の解析

研究分担者 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：肝炎ウイルスは宿主内で多様な quasispecies を形成することにより、肝病態進展・肝発癌・抗ウイルス治療反応性に関与することが考えられてきたが、病態形成における quasispecies の関与を詳細に検討することは技術的に従来困難であった。このような中、次世代シーケンサーを用いた deep sequencing 技術を導入することによって詳細な quasispecies 解析が可能となったことから、本研究班ではウイルス性肝炎における quasispecies と病態との関連を検討した。

H23 年度は HCV 感染における core aa70 変異・野生型の混在状態と病態進行・肝発癌との関連について、H24 年度は HCV の core aa70 の解析に加えて HBV 感染における preS 領域の変異と欠失の混在状態と病態進展について、H25 年度は DAA(direct antiviral agents)治療における DAA 耐性変異 HCV の混在状態と治療反応性の関連について検討を行った。その結果、各病態形成における quasispecies の重要な関与が明らかとなった。

共同研究者氏名

榎本信幸

山梨大学医学部第一内科 教授

A. 研究背景・目的

肝炎ウイルスは宿主内で多様なウイルスゲノムの混在状態、すなわち quasispecies を形成することにより、肝病態進展・肝発癌・抗ウイルス治療反応性に関与することが考えられている。一方、病態形成における quasispecies の関与を詳細に検討す

ることは技術的に従来困難であった。このような中、次世代シーケンサーを用いた deep sequencing 技術を導入することによって詳細な quasispecies 解析が可能となったことから、本研究班ではウイルス性肝炎における quasispecies と病態との関連を検討した。

B. 研究方法

(2011 年度)

次世代シーケンサー Roche GS

Junior を用いた deep sequence により genotype1b HCV 82 例(HCC 群 27 例、LC 群 30 例、CH 群 25 例)を対象とし、コア aa70 の配列をダイレクトシーケンスと Roche GS Junior Sequencer を用いた Deep sequencing により比較検討した。

(2012 年度)

(1)HCV コア aa 70 野生型と変異型が大きく(5%以上)混在する 9 症例において、70 番アミノ酸残基と、コア全域配列がどのように関連するのか、系統樹を用いて検討した。

(2)病態の大きく異なる HBV 感染患者(inactive carrier 12 症例 vs. HCC 12 症例)において、PreS/S 領域を次世代シーケンサーによって deep sequence を行い、肝病態との関連を検討した。

(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

(2011 年度)

HCV-1b 持続感染 82 例における検討において、コア aa 70 はダイレクトシーケンスでは R または Q あるいは H として判定された。一方、deep sequence によって、コア aa 70 のアミノ酸に混在を 5% 以上に認めるものは、13.4%(11/82)であった(HCC:3/25、LC:5/30、HCC:3/27)。しかしバックグラウンド以上に有意な混在を示すものは 80/82(97.5%)に上り、コア aa 70 は、大部分の症例において混在状態であった。

(2012 年度)

(1)コア 70 番アミノ酸残基を含むコア全体配列の系統樹解析により、一人の患者に多数存在する HCV クロームは 70 番アミノ酸残基(野生型か変異型か)によって大きく 2 群に分別されることが示された。すなわちコア領域全体の配列はコア 70 番の配列に強く関連することが明らかとなった。

(2)Inactive carrier 12 症例と HCC 12 症例における PreS/S 領域を次世代シーケンサーによって詳細に検討すると、特に PreS2 の大きな欠失と PreS2 の開始コドンの quasispecies に顕著な違いが認められ、inactive carrier においては、殆ど認められなかったのに比べて HCC 症例では多数例においてこれらの変異や欠失の population が有意に多かった。またこれらの HBs 抗原量は PreS/S 領域の変異が多くなるにつれて、低下する傾向を示した。

(2013 年度)

(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

本研究により、一方、C型慢性肝疾患において、コアaa70の混在状態と経時的变化はG-GTP等の臨床背景因子とともに肝発癌と密接に関連していることが明らかとなった。

HBVにおいてはPreS/S領域における変異・欠失のquasispecies populationと肝病態、HBs抗原量が密接に関連していることが考えられた。

DAA治療においては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。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた deep sequence 解析は宿主体内における quasispecies を正確にかつ短時間で解析する優れた方法であることが示された。また実際に同方法を用いた解析により、ウイルス性肝炎における様々な病態、すなわち肝炎進展・肝発癌・抗ウイルス治療反応性において、ウイルス quasispecies は重要な関与をしていることが明らかとなり、肝炎研究において必須の解析技術であることが明らかとなった。

F. 研究発表論文発表 1 . 論文発表

1. Miura M, Maekawa S, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Ohmori T, Kanayama A, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Kitamura T, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N. Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis. *Hepatol Int.* 2011 August 17.
2. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Kadokura M, Sueki R, Miura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S,

- Enomoto N. Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. *Hepatol Int.* 2011 August 17.
3. Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of genotype 2b hepatitis C virus in association with the response to peginterferon and ribavirin therapy. *PLoS One.* 2011;6(9):e24514. Epub 2011 Sep 15.
 4. Takaya D, Yamashita A, Kamijo K, Gomi J, Ito M, Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Watanabe Y, Arai R, Umeyama H, Honma T, Matsumoto T, Yokoyama S. A new method for induced fit docking (genius) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2011 Nov 15;19(22):6892-905. Epub 2011 Sep 16.
 5. Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatol Int.* 2011 Mar 20.
 6. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol.* 2011 Mar;54(3):439-48.
 7. Sueki R, Maekawa S, Miura M, Kadokura M, Komase K, Shindo H, Kanayama A, Ohmori T, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Correlation between pretreatment viral sequences and the emergence of lamivudine resistance in hepatitis B virus infection. *J Med Virol.* 2012 Sep;84(9):1360-8.
 8. Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of Both Protease and Helicase Activities of Hepatitis C Virus NS3 by an Ethyl Acetate Extract of Marine Sponge *Amphimedon* sp. *PLoS One.* 2012;7(11):e48685.
 9. Maekawa S, Sakamoto M, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Komatsu N, Shindo K, Kanayama A, Ohmori T, Amemiya F, Takano S, Yamaguchi T, Nakayama Y, Kitamura T, Inoue T, Okada S, Enomoto N. Comprehensive analysis for viral elements and IL28B polymorphisms in response to peginterferon plus ribavirin therapy in hcv-1b infection. *Hepatology.* 2012 May 10.
 10. Yamashita A, Salam KA, Furuta A, Matsuda

- Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Mar Drugs*. 2012 Apr;10(4):744-61.
11. 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 gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatol Res*. 2014 Feb 14. [Epub ahead of print]
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
- 1 . 学会発表
1. 三浦美香、前川伸哉、末木良太、門倉信、小馬瀬一樹、進藤浩子、進藤

邦明、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸 . ワークショップ : 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV 遺伝子変異の解析 第 47 回 日本肝臓学会大会 . 東京 . 平成 23 年 6 月 2 日
6 月 3 日

2. 三浦美香、前川伸哉、末木良太、門倉信、小馬瀬一樹、進藤浩子、進藤邦明、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸 . ポスター : 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV 遺伝子変異の解析 第 15 回 日本肝臓学会大会 . 福岡 . 平成 23 年 10 月 20 日
10 月 21 日 .

特許権等知的財産権の取得及び申請状況:
なし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（分担）研究報告書（平成23～25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 感染における遺伝子多型の意義

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： HCV の実験室株が増殖可能な Huh7 細胞の IL28B 遺伝子欠損細胞を作製した。また、Huh7 細胞に馴化した HCV (HCVcc/Huh7) と Hep3B 細胞に馴化したウイルス (HCVcc/Hep3B) を作製し、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 *in vitro* で解析した。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。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。C 型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療の効果予測因子として IL28B 遺伝子の多型が報告されたが、そのメカニズムは不明である。HCV 研究で汎用される Huh7 細胞の IL28B 遺伝子人工ヌクレアーゼ欠損させることで、IL28B 遺伝子多型と IFN 感受性の相関を解明する。一方、末期肝硬変や切除不能な肝臓に対する治療法は肝移植のみであり、肝移植後再発 C 型肝炎は難治性で、HCV の再感染機構を明らかにする必要がある。肝臓特異的な miR-122 を発現させることで新しい HCV 感受性細胞株を樹立し、これらの細胞株と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、遺伝子多型 (Quasispecies) の意義を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

Genotyping として rs8099917 の SNP を解析した。細胞のクローン間の差を減らすために、Huh7 細胞をクローニングし、HCV の感染性が親細胞株と同等のクローン

(Huh7-7) を以下の実験に用いた。IL28B を標的とした Zinc-finger nuclease (ZFN) の mRNA は *in vitro* で合成して細胞に導入後、228 クローンの細胞を単離し、IL28B 遺伝子に変異が挿入されているクローンについて詳細に遺伝子解析を行った。*In vitro* 合成した JFH1 株由来の全長 RNA を、Huh7.5.1 細胞と Hep3B 細胞に miR-122 を発現させた Hep3B/miR-122 細胞に導入して継代することにより、それぞれの細胞に馴化した高力価のウイルス、HCVcc/Huh7 と HCVcc/Hep3B を作製し、それらの遺伝子変異を、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、個人情報厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

Rs8099917 の SNP を指標にして、Huh7 細胞の IL28B 遺伝子が存在する 19 番染色体を検討したところ、Major allele が 1 本と Minor allele が 2 本の計 3 本からなることが明らかとなった。ZFN を導入後にクローニングした 228 種類の細胞を解析したところ、IL28A または IL28B のいずれかに変異が導入されているクローンが 104 クローンあった。そのうち、59 クローンには IL28A に変異が挿入されていたため除外し、45 クローンに対して詳細な解析を行った。現在までに 18 クローンで解析を行い、12 クローンには何らかの変異が確認された。しかし、エクソンにフレームシフトを起こさない変異が 8 クローン存在したため、最終的に Major allele のノックアウトが 1 クローン、Minor allele の 1 本の Allele のみのノックアウトが 3 クローン樹立できた。Major allele のノックアウト細胞においては、IL28B の mRNA の発現を誘導させたところ、Major allele 由来の mRNA が誘導されないことが確認された。

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

Hetero-genotype である Huh7 細胞において、IL28B 遺伝子の Major allele のみがノックアウトされたクローンが樹立された。引き続き Minor allele のノックアウト細胞も樹立し、IL28B 遺伝子多型と IFN 感受性の相関メカニズムを明らかにしたい。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 で解析を検討しており、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

ZFN によって、IL28B 遺伝子ノックアウト Huh7 細胞株を樹立した。

HCV の Quasispecies は、肝移植時のドナーグラフトや新規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 Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, and Matsuura Y. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J Virol* 2011; 85: 13185-13194.
- 2 Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T,

- Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, and Suzuki T. Role of the ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J Biol Chem* 2011; 286: 37264-37273.
- 3 Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi M, and Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One* 2011; 6: e15967.
 - 4 Fukuhara T, Tani H, Shiokawa M, Goto Y, Abe T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, and Matsuura Y. Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus. *Microbes Infect* 2011; 13: 405-412.
 - 5 Motomura T, Taketomi A, Fukuhara T, Mano Y, Takeishi K, Toshima T, Harada N, Uchiyama H, Yoshizumi T, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, and Maehara Y. The Impact of IL28B Genetic Variants on Recurrent Hepatitis C in Liver Transplantation : Significant Lessons from a Dual Graft Case. *Am J Transplant* 2011; 11: 1325-1329.
 - 6 Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J Hepatol* 2011; 54: 432-438.
 - 7 Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T., and Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology* 2011; 410: 38-47.
 - 8 Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, and Matsuura Y. Expression of miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with HCV. *J Virol* 2012; 86: 7918-7933.
 - 9 Abe T, Fukuhara T, Wen X, Ninomiya A, Moriishi K, Maehara Y, Takeuchi O, Kawai T, Akira S, and Matsuura Y. CD44 participates in the IP-10 induction in cells replicating HCV RNA through an interaction with TLR2 and hyaluronan. *J Virol* 2012; 86: 6159-6170.
 - 10 Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. *J Virol* 2012; 86: 1382-1393.
 - 11 Fukuhara T, and Matsuura Y. Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection. *J Gastroenterol* 2012; doi:10.1007/s00535-012-0661-5.
 - 12 Moriishi K, and Matsuura Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front Microbiol* 2012; doi:10.3389/fmicb.2012.00054.
 - 13 Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, and Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology* 2012; 432: 29-38.
 - 14 Kobayashi F, Yamada S, Taguwa S, Kataoka C, Naito S, Hama Y, Tani H, Matsuura Y, and Sugahara K. Specific interaction of the envelope glycoproteins E1 and E2 with liver heparan sulfate involved in the tissue tropism infection by hepatitis C virus. *Glycoconj J* 2012; 29: 211-220.
 - 15 Tripathi L.P, Kambara H, Moriishi K, Morita E, Abe T, Mori Y, Chen Y.A, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28 γ Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study. *J Proteome Res* 2012; 11: 3664-3679.
 - 16 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)
- 17 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
 - 18 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
 - 19 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
 - 20 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. 松浦善治: 基調講演：C型肝炎・肝癌制圧の分子基盤：第47回日本肝臓学会総会、東京、6月2日-3日、2011.
 2. 松浦善治: 特別講演：C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関する宿主因子：第48回日本ウイルス学会九州支部総会、門司、8月26日-27日、2011.
 3. 松浦善治: 特別講演：C型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に関する宿主因子 ～細胞内蛋白質分解システムの関与について～：第10回 Hepatitis Expert Meeting、東京、8月27日、2011.
 4. Fukuhara T, Shiokawa M, Ninomiya A, Kambara H, Katoh H, Morita E, Wataru Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells.：第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日、2011.
 5. Ninomiya A, Abe T, and Matsuura Y. Induction of IFN by inoculation of recombinant baculovirus in mouse embryonic fibroblasts suppresses transgene expression. 第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日、2011.
 6. Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki. Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. 第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日、2011.
 7. Katoh H, Mori Y, Kambara H, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through the interaction with viral proteins and RNA. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日-16日、2011.
 8. Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ohara Y, Ono C, and Matsuura Y. miR122 participates in the determination of cell tropism of hepatitis C virus. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日-16日、2011.
 9. Tanaka T, Matsuura Y, and Kamitani W. Circumvention of the translational shut-off in cells infected with SARS coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日-16日、2011.
 10. Tanaka T, Matsuura Y, and Kamitani W. Circumvention of the translational shut-off in cells infected with SARS coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA. The American Society for Virology, 30th

- Annual Meeting, University of Minnesota, Minnesota, July 16-20, 2011.
11. Katoh H, Mori Y, Kambara H, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through the interaction with viral proteins and RNA. The American Society for Virology, 30th Annual Meeting, University of Minnesota, Minnesota, July 16-20, 2011.
 12. Fukuhara T, Shiokawa M, Ninomiya A, Kambara H, Katoh H, Morita E, Wataru Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. The American Society for Virology, 30th Annual Meeting, University of Minnesota, Minnesota, July 16-20, 2011.
 13. Abe T, Fukuhara T, Morita E, and Matsuura Y. Annexins negatively regulate HCV RNA replication. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, September, 8-12, 2011.
 14. Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Morita E, Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, September, 8-12, 2011.
 15. Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of HCV through an interaction with NS2. Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, and Aizaki H. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, September, 8-12, 2011.
 16. Kawakami K, Kasai H, Yamashita A, Kato I, Matsuura Y, Kusunoki M, and Moriishi K. Regulation of HCV replication by Hsp90 through FKBP8-dependent and -independent pathways. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, September, 8-12, 2011.
 17. 松浦善治, C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関与する宿主因子第 132 回日本薬学会年会、札幌、3月28-30日、2012
 18. Yoshiharu Matsuura, Expression of miR122 and lipid metabolism determine the cell tropism of hepatitis C virus, 7th International Virus Assembly Symposium, Menorca, May, 13-17, 2012.
 19. 松浦善治, C型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略～HCVの増殖を制御する宿主側因子について～: 第48回日本肝臓学会総会、金沢、6月7-8日、2012
 20. Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Yoshiharu Matsuura, miR122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of hepatitis C virus infection. The American Society for Virology, 31st Annual Meeting, University of Wisconsin-Madison, Madison, July 21-25, 2012.
 21. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of mouse liver cell lines susceptible to hepatitis C virus infection, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
 22. Mai Shiokawa, Takasuke Fukuhara, Chikako Ono, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of human liver-specific factors in a complete propagation of hepatitis C virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
 23. Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
 24. Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Masaru Arimoto, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura. miR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of HCV infection. 19th

- International Meeting on HCV and Related Viruses, Venice, October, 5-9, 2012.
25. Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus, The 34th Naito Conference, 札幌, 10月16日-19日, 2012
 26. Yoshiharu Matsuura: Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, The 34th Naito Conference, 札幌, 10月16日-19日, 2012
 27. 塩川 舞、福原崇介、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生に關与するヒト肝臟特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 28. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本 徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臟細胞株の樹立、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 29. 福原崇介、塩川 舞、小野慎子、山本聡美、寒原裕登、加藤大志、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、C型肝炎ウイルスの細胞親和性は miR-122 の発現と脂質代謝系によって規定される、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 30. 加藤大志、岡本 徹、福原崇介、寒原裕登、森田英嗣、森 嘉生、神谷 亘、松浦善治、日本脳炎ウイルスコアタンパク質による Stress Granule 抑制機構の解析、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 31. 松田麻未、鈴木亮介、渡土幸一、相崎英樹、松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆字、C型肝炎ウイルスの一過性感染性粒子を用いた細胞内侵入機構の解析、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 32. Yoshiharu Matsuura, miR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of hepatitis C virus infection: The 10th JSH Single Topic Conference, 東京, 11月21-22日, 2012.
 33. 塩川 舞、福原崇介、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關与するヒト肝臟特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
 34. 福原崇介、本村貴志、塩川 舞、小野慎子、寒原裕登、岡本 徹、調 憲、前原喜彦、松浦善治、C型肝炎ウイルスの細胞親和性における Quasispecies の意義、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
 35. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本 徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臟細胞株の樹立、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
 36. 葛西宏威、河上國洋、平田有佳理、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、岡本 徹、松浦善治、楠木正己、森石恆司、HCV複製に關わる新規宿主因子 FKBP6 : FKBP6 は NS5A と結合し HCV 複製を制御する、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
 37. 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
 38. 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.
 39. 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.
 40. 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.
41. 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
 42. 松浦善治, C型肝炎ウイルスの複製と病原性発現に關与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
 43. 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.
 44. 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.
 45. 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.
 46. 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.
 47. 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
 48. 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
 49. 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 . 知的所有權の出願・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23-25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 Natural killer (NK) 細胞の、C型肝炎ウイルス (HCV) に対する感染防御機構は未だ十分に理解されていない。本研究では、肝移植時に得られる肝内および末梢血NK細胞のフェノタイプとHCVウイルス増幅抑制のメカニズムを解析した。その結果、ドナー肝グラフト内在性のNKp46^{bright} 細胞高含有率が高ければ肝移植後早期のHCV RNA量の上昇が遅延した。NKp46^{bright} 細胞はHCV感染細胞と接触することでIFN- γ 産生が亢進し、HCV増幅抑制効果を発揮した。また、HCV感染肝細胞癌の存在が、如何にNK細胞の抗腫瘍・ウイルス活性に影響をするかを解析する目的で、肝癌合併HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスモデルを作成した。

A . 研究目的

当施設では、現在、肝臓移植の原疾患の約 50%はC型ウイルス (HCV) 性肝硬変が占めているが、術後 HCV ウイルスの再感染は必発であり高率に肝硬変へ移行する。

肝移植後には免疫抑制療法のため獲得免疫である T/B 細胞の応答が抑制される。一方、ウイルス、細菌や腫瘍に対する自然免疫応答を司るマクロファージ、樹状細胞、Natural Killer(NK)細胞は、免疫抑制剤の

影響を受けにくい。特に NK 細胞は、カルシニューリン抑制薬の使用下においても、抗腫瘍活性や Interferon(IFN)産生能を維持する。しかし、肝硬変・肝臓がんの患者では NK 細胞の量・機能ともに低下していることが報告されている。我々は、HCV 合併 HCC での肝移植症例に対し、未成熟 natural killer (NK) 細胞を活性化させ移入する養子療法を臨床導入し、癌再発の有意な低下

とウイルス量の減少を認めた。

しかし、NK 療法後の抗 HCV 効果は、個人差によるばらつきが大きく、本研究ではレシピエントの IL-28B SNP がそれに関与するかどうかを解析した。また、肝臓内に豊富に存在する NK 細胞の存在比率および機能が移植後の HCV ウイルス感染抑制に寄与するかどうかを確認するため、肝移植のレシピエントおよびドナーの肝内 NK 細胞の表面マーカーの検索を行い、術後の HCV ウイルス量の変化との関係を解析し、NK 細胞が HCV 増幅抑制に関与するメカニズムを *in vitro* で評価した。

NK 細胞は腫瘍細胞上の特定抗原や液性因子によって活性化が促進あるいは抑制される。しかし、HCV 感染 HCC から NK 細胞に如何なるシグナルが伝達されるかは明らかではない上、HCV 感染 HCC 合併動物モデルはこれまでに存在しない。そこで、ヒト肝臓癌生着マウスモデルとして、ヒト肝細胞キメラマウスの有用性について検討した。

B . 研究方法

1 . 肝臓移植レシピエントの IL-28B SNP と術後血清 HCV ウイルス量の解析

2006 年 1 月から 2012 年 9 月までに広島

大学病院で施行した C 型肝硬変を原疾患とし同意の得られた 37 例の肝移植症例レシピエントを対象とした。このうち、NK 療法施行群は 14 例、コントロール症例 (NK 療法非施行群) 23 例であった。術後の血清中 HCV-RNA 量の推移と IL-28B SNP 変異の関係を解析した。

2 . 肝臓内 NK 細胞フェノタイプ解析

広島大学病院で施行した C 型肝硬変を原疾患とし、同意の得られた肝移植症例を対象とした。レシピエント 13 例、健常人コントロールとしてドナー 9 例を対象に肝臓内リンパ球として摘出肝の臓器灌流液、および、末梢血中の NK 細胞を中心とするリンパ球関連マーカーをフローサイトメトリーで解析し、肝予備能と NK 細胞表面分子の関連について検討を行った。肝予備能は Child-Pugh を用いて比較的良好な A、B 群と予備能が低下した C 群の 2 群に分類した。また、肝移植術後の血清中 HCV-RNA 量の推移との関連性について解析した。

3 . HCV レプリコン細胞を用いた 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臓内単核球を用いた。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 ウィルス増幅抑制効果について、HCV レプリコン保持肝細胞株(Huh-7)を Target cell 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、肝臓内 NK 細胞と HCV レプリコン保持肝細胞株を共培養し、48 時間後の HCV レプリコン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。

4. 肝臓内 NK 細胞の NKp46 分子の HCV 抑制能評価

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。また、ドナー肝移植術後の 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。

5. 肝癌合併 C 型肝炎ウイルス感染ヒト肝細胞キメラマウスモデル作製

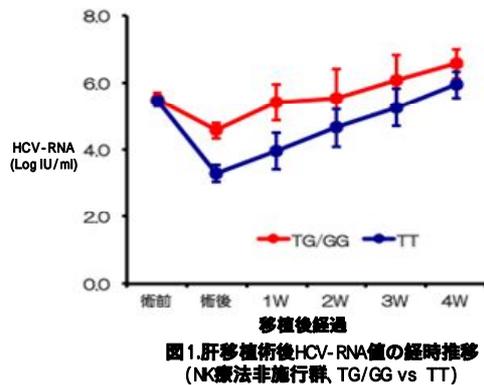
フェニックスバイオ社のヒト肝細胞キメラマウス (14~16 週齢) を用い、ヒト肝細胞癌株 (Huh7) を 0.25×10^6 、 0.5×10^6 、 1.0×10^6 cells/マウスの割合で、経門脈的に注入した。また、マウスの NK 細胞による細胞傷害性の可能性を考慮し、癌細胞の移入前日に抗アジアロ GM1 投与群も合わせて検討した。判定は、血清中のヒトアルファフェトプロテイン (hAFP) 値、アルブミン量を ELISA で解析した。また、癌移入後 14 日目における肝臓内の腫瘍の生着を組織学的に検索した。

C. 研究結果

1. 肝臓移植レシピエントの IL-28B SNP と術後血清 HCV ウィルス量の解析

広島大学病院で施行した、肝移植後活性化 NK 細胞療法を実施し、術後の HCV の抑制

効果について報告した。しかし、NK 療法後の抗 HCV 効果には個体差を認めており、NK 療法の効果にレシピエントの IL-28B SNP が関与しているか否かを解析した。その結果、NK 療法を行っていない群では、肝移植後の血清 HCV-RNA 値の推移において、TT グループが TG/GG にくらべやや低い傾向にあった（図 1）。



NK 療法実施群では、TT 群で有意に術後のウイルス量が抑制されていることがわかった。さらに、TT 症例 8 例のうち、3 例に術後ウイルスの消失を認めしたが、TG/GG 群では消失症例は認めなかった（図 2）。以上のことから、宿主であるレシピエントの IL-28B SNP の違いによって NK 細胞療法の効果に違いがある可能性が示唆された。

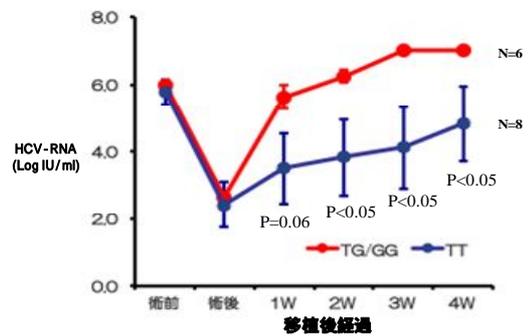


図 2. 肝移植術後 HCV-RNA 値の経時推移 (NK療法施行群, TG/GG vs TT)

2. 肝臓内 NK 細胞フェノタイプ解析

レシピエントおよびドナーの末梢血と肝灌流液中のリンパ球解析はフローサイトメトリーで実施した。項目は、Natural Killer 細胞の表面抗原 (CD3, CD56) とともに活性化因子 (NKp30, 44, 46, NKG2D)、抑制性受容体 (CD158a, CD158b)、アポトーシス誘導分子 (Fas-L, TRAIL)、IL-2 レセプター (CD25, CD122) 等の表出について評価した。その結果、末梢血 NK 細胞では、レシピエントとドナー間で有意な差は認めなかったが、肝内 NK 細胞において、活性化因子である NKp46 と NKG2D の表出が、健常ドナーにくらべ低下しており、またレシピエントの肝予備能の低下に伴って減少することを確認した。さらに、ドナー肝の NKp46 の発現強度と肝移植後レシピエントの血清中 HCV-RNA 量との関係を確認すると、NKp46 強発現ドナー肝を移植されたレシピエントで

は、術後 1 週間目に HCV ウイルス量が発現ドナー肝を移植されたレシピエントに比べ抑制されていた。しかし、この差は術後経過とともに消失していることから、ドナー肝 NK 細胞上の NKp46 分子は、肝移植術後早期におけるウイルスの entry や replication の抑制に関連する可能性が考えられた (図 3)。

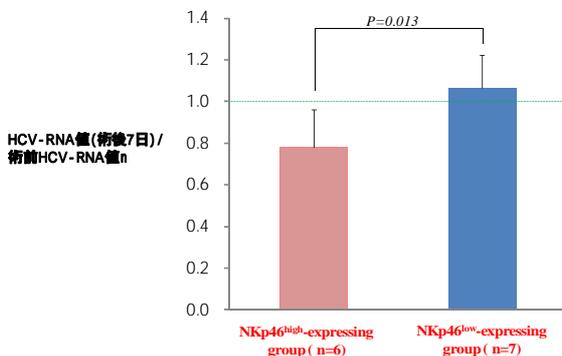


図 3 . ドナー肝グラフト内のNKp46発現は術後早期のHCVウイルス再感染に影響する可能性がある

3. HCV レプリコン細胞を用いた 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によるNK細胞のNKp46の表出とHCVレプリコン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 4)。

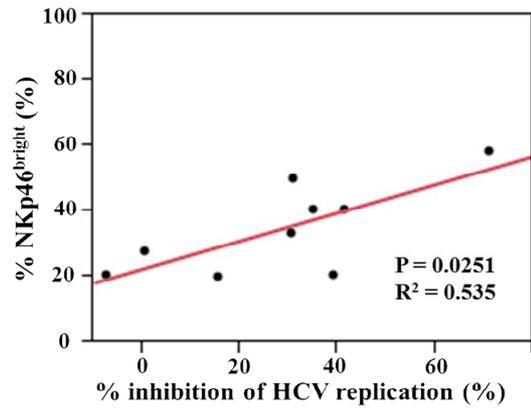


図 4 . 肝内NK細胞のHCV増殖抑制能はNKp46^{bright}分画比率と最もよく相関した

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は有意差をもって関連していることがわかった (図 5)。

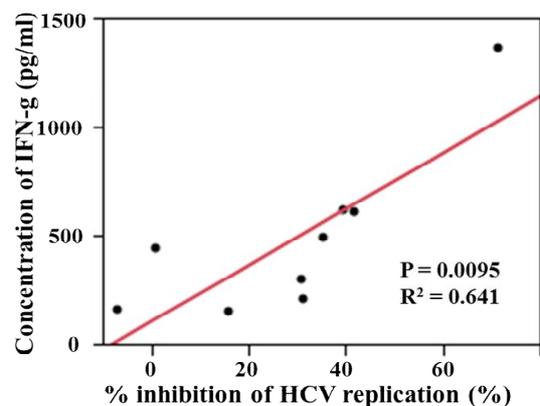


図 5 . H C V 増殖抑制能はIFN- γ 産生能と相関を認めた

4 . 肝臓内NK細胞のHCV抑制能に関わる機能分子の解明

HCVのウイルス増幅抑制にNK細胞のNKp46分子の直接関与を確認するため、*in vitro replicon assay*に抗ヒトNKp46モノクローナル抗体を添加した。また、その他のHCV抑制

にかかわる活性化分子としてNKp30やNKG2Dについても同様のブロッキングアッセイを行った。その結果、各抗体の添加により、ルシフェラーゼ活性抑制能の解除を認めた（図6）。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7）。

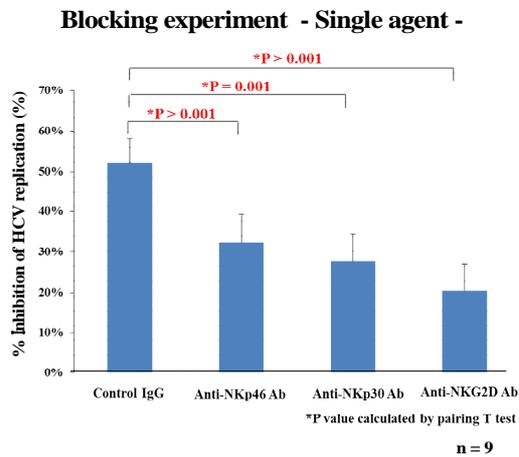


図6. Blocking抗体投与によりHCV増殖抑制能は有意に抑制された

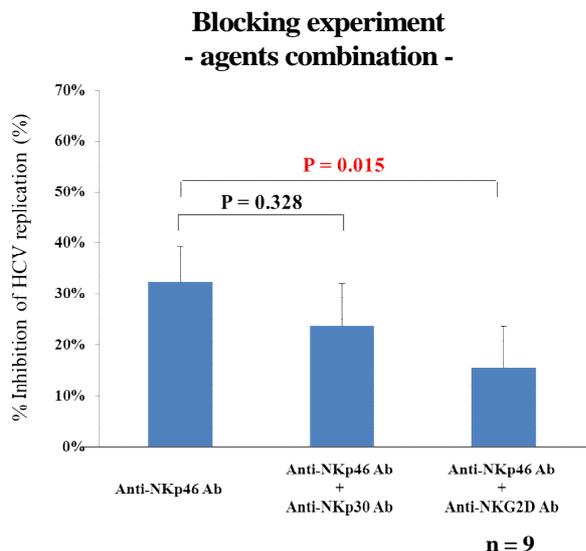


図7. 抗NKp46抗体と抗NKG2D抗体はHCV増殖抑制能に対して相乗的に作用した

胞キメラマウスモデル作製

Huh7はAFP産生のヒト肝臓癌株である。そこで、Huh7移入前と、移入後7、14日目における血清中のhAFP値をHOPE LABORATORIES社のMICROWELL ELISAキットを用いて測定した。その結果、正常ヒト肝細胞で置換したヒト肝細胞キメラマウスは、hAFPの産生を認めなかったが、 1.0×10^6 cellsのHuh7を移入した群では、全例において14日目のhAFPの増加を認めた（図8）。そのうち、14日目において高値（300ng/ml）を呈したマウスは、組織学的にも肝臓内への腫瘍の生着を認めた（図9）。

5. 肝癌合併C型肝炎ウイルス感染ヒト肝細胞

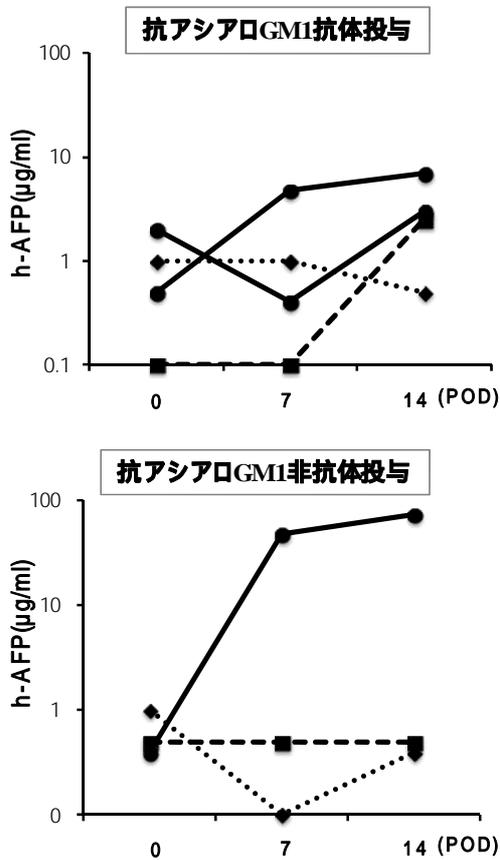


図8 Huh-7移入前後における血中hAFP値の推移
(—: 1×10^6 cells, --: 0.5×10^6 cells,: 0.25×10^6 cells)

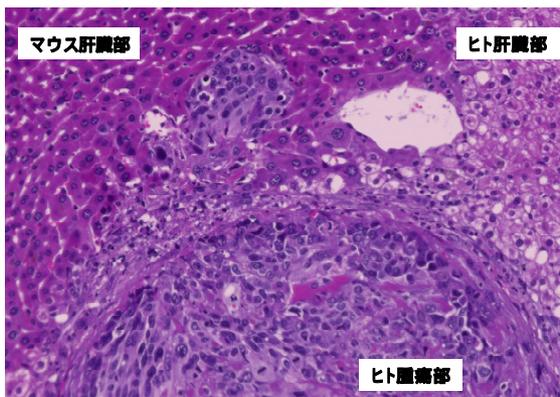


図9. Huh-7移入14日における肝組織(HE染色 x10倍)

D. 考察

一般的に、NK細胞は抗原刺激を必要とせずウイルス感染細胞や腫瘍細胞を破壊すると考えられている。その機構において、ヒ

トNK細胞に最も多い促進性受容体であるNKp46が重要な役割を果たす事が明らかとなりつつある。ここではNK細胞がHCVの肝細胞内 replication を抑制する過程において、NKp46による認識を必要とする事を明らかとした。

NK細胞のNKp46の表出強度は、宿主の肝予備能と深く関連する事も示された。この関連は、HCV感染/非感染を問わず、ウイルス因子以外の制御機構が存在する事が示唆された。一方で、ドナー肝NK細胞移入レシピエントにおいてIL-28B SNPと移植後早期のHCV RNA量に有意な関連が確認された。今後、IL-28B SNPと肝内在NK細胞のNKp46表出強度との間に、何らかの関連があるか否か、興味を持たれる。

本研究では、肝癌合併C型肝炎ウイルス感染ヒト肝細胞キメラマウスモデルが作製された。今後、NK細胞を用いた抗腫瘍療法・抗HCV療法において、肝癌細胞の存在がNK細胞のNKp46表出強度および機能に如何に影響するかを解析する予定である。

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細胞のNKp46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 産生に依存することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Wang C, Wang H, Ide K, Wang Y, Van Rooijen N, Ohdan H, Yang YG. Human CD47 expression permits survival of porcine cells in immunodeficient mice that express SIRP capable of binding to human CD47. *Cell Transplant*. 2011. 20:1915-1920.
2. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. *J Surg Res*. 2011. 167(1): e29-37.
3. Tashiro H, Ishiyama K, Ohira M, Igarashi Y, Tahara H, Ide K, Onoe T, Tanaka Y, Ohdan H. Impact of adjuvant immunotherapy using liver allograft-derived lymphocytes on bacteremia in living-donor liver transplantation. *Transplantation*. 2011. 92(5):575-80.
4. Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Takahashi S, Itamoto T, Chayama K, Ohdan H. Impact of pegylated interferon therapy on outcomes of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma after curative hepatic resection. *Ann Surg Oncol*. 2012. 19(2):418-425.
5. Ide K, Tanaka Y, Onoe T, Banshodani M, Tazawa H, Igarashi Y, Basnet NB, Doskali M, Tashiro H, Ohdan H. Evidence for the immunosuppressive potential of calcineurin inhibitor-sparing regimens in liver transplant recipients with impaired renal function. *J Transplant*. 2011. Online only.
6. Kuroda S, Tashiro H, Igarashi Y, Tanimoto Y, Nambu J, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tanaka Y, Ohdan H. Rho inhibitor prevents ischemia-

- reperfusion injury in rat steatotic liver. *J Hepatol*. 2011. 56(1):146-152.
- 7 . Iwako H, Tashiro H, Amano H, Tanimoto Y, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Nambu J, Mikuriya Y, Abe T, Ohdan H. Prognostic significance of antithrombin III levels for outcomes in patients with hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Ann Surg Oncol*. 2012. 19(9):2888-2896.
8. Oshita A, Tashiro H, Amano H, Kobayashi T, Onoe T, Ide K, Takaki S, Takahashi S, Arihiro K, Chayama K, Ohdan H. Safety and feasibility of diet-treated donors with steatotic livers at the initial consultation for living-donor liver transplantation. *Transplantation*. 2012. 93(10):1024-1030.
9. Tashiro H, Ide K, Amano H, Kobayashi T, Onoe T, Ishiyama K, Kuroda S, Tazawa H, Kono H, Aikata H, Takahashi S, Chayama K, Ohdan H. Surgical treatment for portosystemic encephalopathy in patients with liver cirrhosis: Occlusion of portosystemic shunt in combination with splenectomy. *Hepatol Res*. 2012. 43(3):249-254.
10. Ohira M, Nishida S, Tryphonopoulos P, Tekin A, Selvaggi G, Moon J, Levi D, Ricordi C, Ishiyama K, Tanaka Y, Ohdan H, Tzakis AG. Clinical-scale isolation of interleukin-2-stimulated liver natural killer cells for treatment of liver transplantation with hepatocellular carcinoma. *Cell Transplant*. 2012. 21(7):1397-1406.
11. Kajitani K, Tanaka Y, Arihiro K, Kataoka T, Ohdan H. Mechanistic analysis of the antitumor efficacy of human natural killer cells against breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2012. 134(1):139-155.
- 12 . 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.

13. 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.

14. 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. Teraoka Y, Ide K, Tahara H, Basnet N, Morimoto H, Ohdan H. Genetic induction of mouse CD47 on rat insulinoma cells prevents macrophage-mediated xenograft rejection through CD47-SIRP α inhibitory signaling in mice. American Transplant Congress

2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.

2. Igarashi Y, Ohdan H. Liver sinusoidal endothelial cells expressing carbohydrates render reactive immature B cells tolerant through PD-1/PDL-1 pathway. American Transplant Congress 2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.

3. Hotta R, Tanaka Y, Doskali M, Ohira M, Hiraga N, Chayama K, Ohdan H. A possible adoptive immunotherapy with PBMC-Derived CD56+ cells for preventing HCV re-infection after liver transplantation. American Transplant Congress 2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.

4. Tanaka Y, Tashiro H, Takanashi S, Chayama K, Ohdan H. Cellular Alloreactivity prior to interferon-based antiviral therapy is predictive of chronic rejection in liver transplantation recipients with recurrent hepatitis. American Transplant Congress 2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.

5. Banshodani M, Onoe T, Tahara H,

- Igarashi Y, Tanaka Y, Ide K, Ohdan H. Specific suppression of allospecific T cells via the PD-1/PD-L1 pathway in an allogeneic liver endothelium repopulation model. American Transplant Congress 2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.
6. Tazawa H, T Irei, Y Tanaka, Igarashi Y, Yamashita M, Tashiro H, Ohdan H. Pivotal role of invariant NKT cell - B cell interaction in antibody production against transplant-associated carbohydrate epitopes. Basic Science Symposium. 2011.6.2-3. Boston, USA.
7. Ohdan H. Adoptive immunotherapy for inducing anti-HCC and anti-HCV activity after liver transplantation. 21st World congress of the international association of surgeons, gastroenterologists and oncologists. 2011.11.9-12. 東京.
8. Onoe T, Tanaka Y, Hashimoto S, Ide K, Banshoudani M, Igarashi Y, Kobayashi T, Amano H, Tashiro H, Ohdan H. Continuous portal infusion of PGE1 attenuates portal hypertension and alloimmune responses in adult-to-adult living donor liver transplantation. CAST 2011. 2011.9.25-28.ソウル, 韓国.
9. Tanaka Y, Tashiro H, Ide K, Onoe T, Ishiyama K, Ohdan H. Tailoring immunosuppressive therapy on the basis of immune monitoring by a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living-donor liver transplantation. CAST 2011. 2011.9.25-28.ソウル, 韓国.
10. Araki K, Tanaka Y, Ohdan H. A novel method for intracellular profiling of stat activation pattern in T cells responding to allostimulation. CAST 2011. 2011.9.25-28.ソウル, 韓国.
11. 井手健太郎, 尾上隆司, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 寺岡義布史, 堀田龍一, 山下正博, 橋本慎二, 平田文宏, 森本博司, 田代裕尊, 大段秀樹. 胆汁中 CX3CL1 測定による移植肝グラフトの評価. 第 111 回日本外科学会定期学術集会. 2011.5.26-28. 東京.
12. 田代裕尊, 相方浩, 谷本新学, 天野尋

- 暢, 大下彰彦, 小林剛, 茶山一彰, 大段秀樹. C 型慢性肝炎関連肝細胞癌切除後の PEG-IFN 療法による予後改善効果. 第 47 回日本肝臓学会総会. 2011.6.2-6.3. 東京.
13. 堀田龍一, 田中友加, Marlen Doskali, 五十嵐友香, 安部智之, 森本博司, 寺岡義布史, 山下正博, 田澤宏文, 番匠谷将孝, 井手健太郎, 尾上隆司, 田代裕尊, 大段秀樹. 末梢血からリモデリングした活性化 CD56 + 細胞の HCV 増殖抑制効果. 第 29 回日本肝移植研究会. 2011.7.22-7.23. 仙台.
14. 五十嵐友香, 大段秀樹. 肝類洞内皮細胞は PDL-1/PD-1 pathway を介し B 細胞の糖鎖抗原特異的抗体産出を抑制する. 第 47 回日本移植学会総会. 2011.10.4-6. 仙台.
15. 堀田龍一, 石山宏平, 大平真裕, 五十嵐友香, 田中友加, 井手健太郎, 尾上隆司, 田代裕尊, 大段秀樹. HCC を合併した肝移植患者に対する術後補助療法の確立 - 活性化 NK 細胞療法の臨床経過報告 -. 第 29 回日本肝移植研究会. 2011.7.22-7.23. 仙台.
16. 寺岡義布史, 井手健太郎, 森本博司, 田中友加, 尾上隆司, 石山宏平, 五十嵐友香, 田澤宏文, 大段秀樹. レシピエント種 CD47 遺伝子導入によるマクロファージ性拒絶抑制効果の in vivo 検証. 第 29 回日本肝移植研究会. 2011.7.22-7.23. 仙台.
17. 田代裕尊, 茶山一彰, 大段秀樹. ドナー由来活性化リンパ球細胞療法による生体肝移植後の敗血症予防. 第 29 回日本肝移植研究会. 2011.7.22-7.23. 仙台.
18. 安部智之, 田代裕尊, 尾上隆司, 石山宏平, 井手健太郎, 田澤宏文, 大段秀樹. 生体肝移植後に発生した NODAT 症例についての検討. 第 48 回日本移植学会総会. 2012.9.20-22. 愛知.
19. 谷峰直樹, 田中友加, 安部智之, 堀田龍一, 五十嵐友香, 石山宏平, 田代裕尊, 大段秀樹. C 型肝炎患者における Natural Killer 細胞の活性化委レセプターの表出は肝予備能に依存して低下する. 第 48 回日本移植学会総会. 2012.9.20-22. 愛知.
20. 天野尋暢, 田代裕尊, 小林剛, 黒田慎太郎, 田澤宏文, 楠部潤子, 御厨美洋, 安部智之, 尾上隆司, 大段秀樹. 肝細胞癌術後多発再発に対する治療戦略. 第 67 回日本消化器外科学会. 2012.7.18-20. 富山.
21. 黒田慎太郎, 田代裕尊, 五十嵐友香, 楠部潤子, 御厨美洋, 小林剛, 天野尋暢,

田澤宏文，安部智之，田中友加，大段秀樹。
Rho キナーゼ阻害剤は脂肪肝の虚血再灌流
障害を軽減する。第 112 回日本外科学会定
期学術集会。2012.4.12-14。千葉。

22. 田代裕尊，天野尋暢，小林剛，尾上隆
司，石山宏平，井手健太郎，大段秀樹。肝
細胞癌に対する外科治療と術後補助療法。
第 112 回日本外科学会定期学術集会。
2012.4.12-14。千葉。

23. 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。

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

25. 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。

26. 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。

27. 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。

28. 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した。そのために、新たなウイルス培養増殖系の確立を目指した。

B. 研究方法

1. 新規キメラマウスによる HCV 感染実験

重度複合免疫不全マウスの NOG マウスとウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベータートランスジェニックマウス（AL-uPA マウス）のすべての表現型を有するマウス（uPA-NOG マウス）にヒト肝細胞を移植し、肝細胞の生着後、肝炎ウイルスを接種した。

2. 遺伝子型キメラ HCV 感染実験

遺伝子型 1b の Con1 株の NS3 プロテアーゼ領域および NS5b 領域をそれぞれ遺伝子型 2a の JFH-1 株に組換えたキメラレプリコンおよびウイルス構築を作成した。プラスミドからウイルス RNA を合成して Huh7 細胞または Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションし、レプリコン増殖およびウイルスの産生を観察した。

3. 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

1. 新規キメラマウスによる HCV 感染実験

NOGマウスは、重度複合免疫不全マウスで、2 種類の免疫不全マウスを結びつけて作製されたマウスである。一つは、NOD/ShiJic-*scid*マウスで、やせ形糖尿病モデルマウスである NOD/Shiマウスに、CB-17-*scid*系統の *scid* (*Prkdc^{scid}*) 突然変異遺伝子を 10 世代戻し交配によって導入した系統である。もう一つが IL2レセプターガンマ鎖ノックアウトマウスで、X染色体の IL2レセプターガンマ鎖遺伝子の第7、8エクソンを破壊することによって作製された、ヒトの XSCIDモデルマウスである。この IL2レセプターガンマ鎖ノックアウトマウスの IL2レセプターガンマ鎖 *null* 遺伝子を、NOD/ShiJic-*scid*マウスへ戻し交配に

よって導入したものが NOGマウスであり、実中研で樹立された。マウスアルブミンプロモーターによりウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーターを発現するトランスジェニックマウスが樹立された (AL-uPAマウス)。このマウスは生後肝不全を発症する。AL-uPAマウスは NODマウスをもとに作製され、さらに NOGマウスと戻し交配し、ホモ化したものが uPA-NOGマウスである (S uemizu et al, BBRC 2008 377:248-252)。この uPA-NOGマウスを実験の末水博士より供与いただいた。凍結ヒト初代培養肝細胞を uPA-NOGマウスに経脾臓的に移植して作製したヒト肝細胞移植 uPA-NOGマウスに HCV を接種したところ持続的な感染が成立した。

2. 遺伝子型キメラ HCV 感染実験

遺伝子型 1b の NS3 を遺伝子型 2a の JFH-1 株に組換えたレプリコン構築 (pSGR_JFH_N3PCon1) および NS5b を組換えた構築 (pSGR_JFH_N5bSLCon1) は Huh7 細胞で増殖可能であったが、その複製効率は JFH-1 株よりも低く、適合変異が必要であった。レプリコン実験で同定した適合変異を導入した全長キメラウイルス構築 (pJFH_N3PCon1 および pJFH_N5bSLCon1) を作成した。全長ウイルス RNA を Huh7.5.1 細胞に導入したところ pJFH_N3PCon1 はウイルスゲノム複製は観察されたが感染性ウイルス粒子産生は見られなかった。pJFH_N5bSLCon1 は複製増殖が可能で感染性ウイルス粒子も産生された。

全長キメラウイルス構築を用いて抗ウイルス薬の効果を観察すると、NS3 プロテアーゼ領域を Con1 に組換えるとプロテアーゼ阻害剤の感受性が高くなった。また NS5b 領域を組換えると遺伝子型 1b と同様の感受性を示した。したがって、これらのキメラウイルス構築は遺伝子型 1b のプロテアーゼ阻害剤およびポリメラーゼ阻害剤の

感受性の検討に適していると考えられた。

3. 遺伝子型 2b の HCV 感染性クローンの樹立
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

新たなキメラマウスを用いて HCV の感染実験を試みた。ウイルスの持続感染が成立した。また、新たなキメラウイルス構築はプロテアーゼ阻害剤やポリメラーゼ阻害剤の検討に適していると考えられた。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。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

1. 新規キメラマウスを用いて HCV の感染実験をおこなった。HCV はマウス肝臓に持続的に感染が成立した。
2. 新規キメラウイルス構築の培養細胞における複製増殖、薬剤感受性を検討した。
3. 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.
 6. Sekiguchi S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F, Tsukiyama-Kohara K, Wakita T, Tanaka T, Miyasaka M, Mizuno K, Hayashi Y, Hishima T, Matsushima K, Kohara M. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS One*. 2012;7(12):e51656.
 7. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. *Microbes Infect*. 2013 15(1):45-55.
 8. Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. *Gastroenterology*. 2013 144(1):56-58.e7.
 9. Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol*. 2012 86(19):10805-20.
 10. Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology*. 2012 432(1):29-38.
 11. Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002561.
 12. Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, Wakita T. Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone. *Microbiol Immunol*. 2012 56(5):308-17.
 13. Weng L, Kohara M, Wakita T, Shimotohno K, Toyoda T. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene*. 2012 496(2):79-87.
 14. Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1. *J Virol*. 2012 86(4):2143-52.
 15. Salim MT, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M. Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by

- novel phenanthridinone derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 415(4):714-9.
16. Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. *PLoS One*. 2011;6(10):e26620.
 17. Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog*. 2011 7(10):e1002289.
 18. Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J Biol Chem*. 2011 286(43):37264-73.
 20. Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 410(3):404-9.
 21. Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2011 92(Pt 9):2082-7.
 22. Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, Wakita T. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine*. 2011 29(29-30):4821-8.
 23. Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology*. 2011 54(2):425-33.
 24. Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2011 141(1):128-40,140.e1-2.
 25. Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One*. 2011;6(6):e21284.
- 2 . 学会発表および講演など
1. 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」
2. 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)
 3. 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)
 4. 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)
 5. 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)
 6. 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ELAVL1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)
 7. 金ソレイ、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)
 8. 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)
 9. 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)
 10. 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)
 11. 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)

12. 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)
13. 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)
14. 脇田隆字、「新型シーケンサで展開するウイルスゲノム研究」、ランチョンセミナー、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(2011, 12.14)
15. 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆字、HCV感染に伴う宿主細胞の脂質代謝の変化と代謝産物のメタボロミクス解析、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3) シンポジウム1「ウイルス肝炎・肝癌制圧の分子基盤」
16. 加藤孝宣、政木隆博、脇田隆字、HCV JFH-1キメラ株を用いたNS5a阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21) シンポジウム1「C型肝炎治療の新たな展開」
17. 鈴木哲朗、脇田隆字、HCV JFH-1株のチンパンジー感染実験で得られた適応変異株の機能解析、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21) パネルディスカッション4「肝疾患動物モデルとtranslational research」
18. 武田緑、池田正徳、有海康雄、脇田隆字、加藤宜之、2種類のヒト肝細胞株を用いたHCV感染レポーターアッセイ系の開発、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)
19. 相崎英樹、多田有希、松本喜弘、後藤耕司、渡士幸一、鈴木亮介、田中純子、鈴木哲朗、岡部信彦、脇田隆字、1999年から2009年における日本のC型急性肝炎の発生状況、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)
20. 加藤孝宣、村山麻子、政木隆博、相崎英樹、脇田隆字、国内献血検体を用いたC型肝炎ウイルス陽性血漿パネルの作製とウイルス量測定法の評価、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)
21. 村山麻子、三代俊治、脇田隆字、加藤孝宣、C型肝炎ウイルス粒子の産生効率の良いHuH-7細胞サブクローンの分離と同定、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)
22. 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)
23. T Wakita. Basic concepts of Hepatitis C. 2013 2nd Canadian Symposium on HepC Virus, Inn at Laurel Point, Victoria, BC, Canada (2013, 3.4)
24. T Wakita. Molecular Biology and Experimental Models of HCV. 19th Annual KASL Meeting,

- Sheraton Grande Walkerhill Hotel, Seoul, Korea (2013, 6.13 – 15)
25. 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)
 26. 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)
 27. 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)
 28. 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)
 29. 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)
 30. 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)
 31. 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)
 32. Wakita T, Date T, Kim S, Kato T. Novel cell culture-adapted Hepatitis C virus infectious clone, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy (2012, Oct. 5-9)
 33. Kim S, Date T, Aizaki H, Watanabe H, Wakita T. NS3 protease derived from genotype 1b Con1 attenuates viral

- replication, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy (2012, Oct. 5-9)
34. T Wakita. Hepatitis C Virus Infection and Replication, annual meeting of Prof. Juei-Low Sung's Research Foundation, Taipei, Taiwan (2011, 8. 6)
 35. T Wakita. HCV RNA replication and drug development. The 8th APASL Single Topic Conference Beijing, China (2011, 10. 7)
 36. T Wakita. Hepatitis C virus replication in vitro and persistent infection in vivo: mechanistic analysis and antiviral development, Singapore-Japan Forum on Emerging Concepts in Microbiology, National University of Singapore, Singapore (2011 Nov 15-16)
 37. T Wakita. Hepatitis C virus replication in vitro and persistent infection in vivo: mechanistic analysis and antiviral development, Challenges to overcome Emerging Infectious Diseases in South-eastern Asia, Siran Kaikan, Kyoto University. Kyoto (2012 Jan 13)
 38. T Wakita. Hepatitis C virus replication models and anti-viral development, The 1st International Symposium on Latent TGF-beta Activation Reaction, RIKEN Kobe Inst, Ctr. For Delop Biol, Auditorium, Kobe (2012 Feb 25)
 39. Takebe, Y., Uenishi, R., Tani. H., Suzuki, R., Hase, S., Akazawa, D., Takagi, M., Tsuchiura, T., Nagasawa, K., Suzuki, T., Irie, K., Shinya, K., Wakita, T., Matsuura, Y., Patel, A., Small molecules that elicit anti-HCV activity through down-modulation of HCV entry receptors, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 40. N Watanabe, K Futai, H Suga, T Wakita, E2 binding peptide identified by RAPID system inhibited HCV infection, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 41. K Goto, T Kimura, K Watashi, R Suzuki, S Yamagoe, T Miyamura, K Moriya, H Yotsuyanagi, K Koike, T Suzuki, T Wakita, H Aizaki, Identification of novel NS5A-associated proteins in the host-cell membrane fraction and their role in HCV life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 42. R Suzuki, T Suzuki, K Saito, M Matsuda, K Watashi, Y Matsuura, T Wakita, H Aizaki, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SIGNAL PEPTIDASE COMPLEX 1 THAT INTERACTS WITH HEPATITIS C VIRUS NS2 PROTEIN AND IS INVOLVED IN THE VIRAL ASSEMBLY, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 43. J Law, D Hockman, S Frey, R Khoshy, T Wakita, J Bukh, C Rice, M Houghton, Does a

- vaccine derived from a single HCV strain elicit broadly cross-neutralising antibodies in humans?, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
44. Y Okamoto, T Masaki, A Murayama, T Wakita, T Kato, Development of chimeric hepatitis C virus expressing NS5A from strains of genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 45. M Fukasawa, Y Shirasago, K Saito, Y Murakami, H Fukazawa, T Suzuki, R Suzuki, T Wakita, K Hanada, J Chiba, Isolation of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 46. H Yokokawa, D Akazawa, M Moriyama, N Nakamura, T Kato, K Ishii, T Wakita, Development of purification method for HCV particles using chromatographic technique, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 47. M Esumi, S Kikuta, H Yamaguchi, S Nakajima, M Ishibashi, T Wakita, Serum and trypsin inhibitors inhibit the early step of hepatitis C virus infection, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 48. M Moriyama, D Akazawa, H Yokokawa, K Nishimura, N Nakamura, H Mochizuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, Immunological memory response to induce neutralizing immunoglobulin in HCV particles-immunized mice, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 49. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 50. N Uchida, K Watashi, R Suzuki, H Aizaki, J Chiba, T Wakita, Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
 26. N Watanabe, A Murayama, M Saeed, T Date, T Kato, H Aizaki, T Wakita, Identification and analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
 51. Y Okamoto, T Masaki, A Murayama, A Nomoto, T Wakita, T Kato, Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

52. R Suzuki, K Saito, M Matsuda, K Watashi, Y Matsuura, T Wakita, T Suzuki, H Aizaki, Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
53. 3A Murayama, N Sugiyama, S Yoshimura, M Ishihara-Sugano, T Wakita, T Kato, Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
54. H Aizaki, Y Matsumoto, K Goto, K Watashi, R Suzuki, M Fukasawa, K Hanada, S Sato, N Takahashi, Y Matsuura, K Motojima, T Miyamura, T Suzuki, T Wakita. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
55. Y Matsumoto, K Watashi, R Suzuki, T Matsuura, T Suzuki, T Miyamura, K Wake, T Wakita, H Aizaki, Antiviral activity of glycyrrhizic acid against hepatitis C virus in vitro, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
56. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita. Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
57. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Screening of small molecules affecting the production of hepatitis B virus, 2011 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct 9-12, Holliday Inn Walt Disney World Resort, FL USA

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 23~25 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

分担研究者 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: ヒト肝細胞キメラマウスを用いてリバーシ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. 患者血清およびクローンを用いて HCV 感染させたマウスではいずれにおいても telaprevir の投与により耐性変異が生じ, 薬剤耐性 HCV はウイルスの selection および mutation いずれからも出現し得ることを見出した. Genotype 1b 型 HCV 感染マウスへのプロテアーゼ阻害剤, NS5A 阻害剤, 非核酸型ポリメラーゼ阻害剤の単独投与では耐性変異による breakthrough が生じるが, これらの薬剤を組み合わせて投与することによりウイルスの排除が得られたが, genotype 2 型 HCV には有効性は低かった. その原因として, 2 型 HCV にはすでにこれら薬剤に対する耐性変異を有している症例が存在することを見出した. 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. uuPA/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

- 1) 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) 単独あるいは併用投与における耐性株の出現, ウイルス排除効果, genotype 間の治療効果を検討する.
- 2)
- 3) uuPA/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

- 1) Genotype 1b, 2a, 2bの患者血清を感染させたマウスにプロテアーゼ阻害剤, NS5A阻害剤, 非核酸型ポリメラーゼ阻害剤を単独あるいは併用により4週間経口投与し, 治療効果を検討した.
- 2) 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RCI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 µgのRNAをヒト肝細胞キメラ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.

3) 超免疫不全マウスNOGをベースにした新規のヒト肝細胞移植TK-NOGマウスを用いて、HBVおよびHCV感染ヒト肝細胞移植TK-NOGマウスのウイルス感染率、抗ウイルス薬の薬効を評価した。

C. 結果

1) Genotype 1b型C型肝炎患者血清を投与し感染させたマウスに200 mg/kgのtelaprevir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。NS5A阻害剤+第二世代protease阻害剤あるいはNS5A阻害剤+非核酸型NS5B阻害剤の併用療法により、genotype 1b型HCV感染マウスからのマウス血中HCV RNAは開始1週間には陰性化し、4週間の投与中、再上昇を認めなかった。治療終了後も血中ウイルス陰性化は継続し、HCVは排除されたものと思われた。一方、genotype 2aあるいは2b型感染マウスでは、血中HCV RNAはほとんど低下しなかった。これらマウスのHCVをdirect sequenceにて検討したところ、治療前、genotype 2a型では、NS3 A156G、NS5A L31M、NS5B I482LおよびV484A変異、genotype 2b型ではNS3 A156GおよびD168A、NS5A L31M、NS5B I482L、V484AおよびV499Aと第2世代プロテアーゼ阻害剤、NS5A阻害剤、非核酸型ポリメラーゼ阻害剤の耐性変異を有していた。

2) 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変異が出現し二重耐性型となりbreakthroughが生じた。さらにこのマウスに非核酸型ポリメラーゼ阻害剤を投与したところ、一旦は血中HCV RNAの低下を認めしたがHCVは再燃し、この際、三重耐性変異が出現していた。

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併用療法はgenotype 1b型HCVに対して有用な治療法であった。一方、genotype 2型ではプロテアーゼ阻害剤、NS5A阻害剤、非核酸型ポリメラーゼ阻害剤の効果はやや弱い。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;62:1055-61

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) Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. Nat Med 18(2); 281-5, 2012

Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of

viral amino acid substitutions and host IL28B polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. Hepatology 54(3); 764-71, 2011

5) Hiraga N, Imamura M, Abe H, Nelson Hayes C, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wild type clone in vivo. Hepatology 54:781-8, 2011

6) Tsuge M, Fujimoto Y, Hiraga N, Zhang Y, Ohnishi M, Kohno T, Abe H, Miki D, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Miya F, Tsunoda T, Chayama K. Hepatitis C virus infection suppresses the interferon response in the liver of the human hepatocyte chimeric mouse. PLoS One. 2011;6(8):e23856.

7) Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of Hepatitis C Virus by Short Term NS3-4A and NS5B Inhibitor Combination Therapy in Human Hepatocyte Chimeric Mice. J Hepatol. 2011;54(5):872-8.

8) Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo. J Hepatol. 2011;55:11-8.

2 . 学会発表

1) Michio Imamura, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes, Nobuhiko Hiraga, Tomokazu Kawaoka, Masataka

Tsuge, Yoshiiku Kawakami, Hiroshi Aikata, Shoichi Takahashi, Kazuaki Chayama. Deep sequencing analysis of hepatitis C virus quasipieces in patients treated with telaprevir in combination with peginterferon and ribavirin. The 10th JSH Single Topic Conference, Tokyo. November 21, 2012

2) 今村 道雄, 阿部 弘美, 平賀 伸彦, 越智 秀典, 茶山 一彰. C型肝炎ウイルスの感染およびIFN治療におけるIL28B遺伝子多型の影響. 第77回インターフェロン・サイトカイン学術集会 2012年6月21日, 神戸

3) Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi T, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A,

Inaba T, Chayama K. Rapid Emergence of Telaprevir Resistant Hepatitis C Virus Strain From Wild Type Clone in Vivo. 12th AASLD, San Francisco. November 4, 2011

4) Imamura M, Abe H, Hiraga N, Tsuge M, Takahashi S, C. Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Impact of Viral Amino Acid Substitutions and Host IL28B polymorphism on Replication and Susceptibility to Interferon of Hepatitis C Virus. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011

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, 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	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
Hayes CN, Imamura M, Aikata H, <u>Chayama K</u>	Genetics of IL28B and HCV-response to infection and treatment.	Nat Rev Gastroenterol Hepatol	9(7)	406-17	2012
<u>Chayama K</u> , Hayes CN, <u>Imamura M</u> .	Impact of interleukin-28B genotype on in vitro and in vivo systems of hepatitis C virus replication	Hepatol Res	42(9)	841-53	2012
Miki D, Ohishi W, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Tsuge M, Imamura M, Kamatani N, Nakamura Y, <u>Chayama K</u> .	Serum PAI-1 is a novel predictor for response to pegylated interferon- α -2b plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C virus infection.	J Viral Hepat	19(2)	e126-e133	2012
Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL.	Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor	Nat Med	18(2)	281-5	2012
Hiraga N, Abe H, <u>Imamura M</u> , Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Nakamura Y, Kamatani N, <u>Chayama K</u>	Impact of viral amino acid substitutions and host IL28B polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus.	Hepatology	54(3)	764-71	2011

Hiraga N, <u>Imamura M</u> , Abe H, Nelson Hayes C, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, <u>Chayama K</u> .	Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wild type clone in vivo.	Hepatology	54(3)	781-88	2011
<u>Chayama K</u> , Hayes CN, Hiraga N, Abe H, Tsuge M, <u>Imamura M</u> .	Animal model for study of human hepatitis viruses.	J Gastroenterol Hepatol.	26	13-18s	2011
Tsuge M, Fujimoto Y, Hiraga N, Zhang Y, Ohnishi M, Kohno T, Abe H, Miki D, <u>Imamura M</u> , Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Miya F, Tsunoda T, <u>Chayama K</u> .	Hepatitis C virus response in the liver of the human hepatocyte chimeric mouse.	PLoS One.	6	e23856.	2011
Tsuge M, Takahashi S, Hiraga N, Fujimoto Y, Zhang Y, Mitsui F, Abe H, Kawaoka T, <u>Imamura M</u> , Ochi H, Hayes CN, <u>Chayama K</u> .	Effects of hepatitis B virus infection on the interferon response in immunodeficient human hepatocyte chimeric mice.	J Infect Dis	2	224-8	2011
Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, <u>Imamura M</u> , <u>Chayama K</u> , Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, <u>Wakita T</u> , Kato T.	In Vivo adaptation of hepatitis C virus for efficient virus production and evasion of apoptosis.	Hepatology	54(2)	425-33	2011
Ohara E, Hiraga N, <u>Imamura M</u> , Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Tanaka S, <u>Chayama K</u> .	Elimination of Hepatitis C Virus by Short Term NS3-4A and NS5B Inhibitor Combination Therapy in Human Hepatocyte Chimeric Mice.	J Hepatol	54(5)	872-8	2011
Abe H, <u>Imamura M</u> , Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, <u>Chayama K</u> .	ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo.	J Hepatol	55(1)	11-8	2011
Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, Murakami T, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , 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, <u>Yoshizato K</u> , Arakawa T.	Cytoglobin May Be Involved in the Healing Process of Gastric Mucosal Injuries in the Late Phase Without Angiogenesis.	Dig Dis	Jan 10.	Epub ahead of print	2013

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, <u>Yoshizato K</u> , Sasaki T, Chayama K.	A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections.	Biochem Biophys Res Commun	Nov;8441(1)	230-5	2013
<u>Yoshizato K</u> , 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	Nov;9(11)	1419-35	2013
Tachibana A, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> .	Repopulation of the immunosuppressed retrorsine-treated infant rat liver with human hepatocytes.	Xenotransplantation	Jul-Aug;20(4)	227-38	2013
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 Tateno-Mukaidani C <u>Yoshizato K</u> , 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	Jul62(7)	1055-61	2013
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, Arie S, Itamoto T, Asahara T, Tsunoda T, <u>Yoshizato K</u> .	Morphological and microarray analyses of human hepatocytes from xenogeneic host livers.	Lab Invest	Jan93(1)	54-71	2013
Fujiwara S, Fujioka H, Tateno C, Taniguchi K, Ito M, Ohishi H, Utoh R, Ishibashi H, Kanematsu T, <u>Yoshizato K</u> .	A novel animal model for in vivo study of liver cancer metastasis.	World J Gastroenterol	Aug718(29)	3875-82	2012
Izuka M, Ogawa T, Enomoto M, Motoyama H, <u>Yoshizato K</u> , Ikeda K, Kawada N.	Induction of microRNA-214-5p in human and rodent liver fibrosis.	Fibrogenesis Tissue Repair	Aug15(1)	12	2012
Tatsumi K, Ohashi K, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Yoshioka A, Shima M, Okano T.	Human hepatocyte propagation system in the mouse livers: functional maintenance of the production of coagulation and anticoagulation factors.	Cell Transplant	21(2-3)	437-45	2012

Ohashi K, Tatsumi K, Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Yoshizato K, Okano T.	Liver tissue engineering utilizing hepatocytes propagated in mouse livers in vivo.	Cell Transplant	21(2-3)	429-36	2012
Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Ohdan H, Chayama K.	Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse.	Hepatology	Aug 56(2)	555-66	2012
Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, <u>Yoshizato K</u> , Ikeda K, Kawada N.	MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis.	Gut	Nov 61(11)	1600-9	2012
<u>Yoshizato K</u> , Tateno C, Utoh R.	Mice with liver composed of human hepatocytes as an animal model for drug testing.	Curr Drug Discov Technol	Mar 9(1)	63-76	2012
Sekiya Y, Ogawa T, <u>Yoshizato K</u> , Ikeda K, Kawada N.	Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b.	Biochem Biophys Res Commun	Aug 19 412(1)	74-9	2011
Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, <u>Yoshizato K</u> , Ikeda K, Kawada N.	Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- β -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation.	J Cell Physiol	Oct 226(10)	2535-42	2011
Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama H, Ikeda K, <u>Yoshizato K</u> , Kawada N.	Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice.	Am J Pathol	Aug 179(2)	1050-60	2011
Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K.	Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo.	Hepatology	Sep 2 54(3)	781-8	2011
Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K.	Impact of viral amino acid substitutions and host interleukin-28b polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus.	Hepatology	Sep 2 54(3)	764-71	2011
Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, <u>Yoshizato K</u> .	Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure.	J Surg Res	May 167(1)	e29-37	2011

Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T, Miya F, Tsunoda T, <u>Yoshizato K.</u>	Growth hormone-dependent pathogenesis of human hepatic steatosis in a novel mouse model bearing a human hepatocyte-repopulated liver	Endocrinology	Apr 152(4)	1479-91	2011
Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, <u>Yoshizato K.</u> , Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K.	ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo	J Hepatol	Jul 55(1)	11-8	2011
Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, <u>Yoshizato K.</u> , Tanaka S, Chayama K.	Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice.	J Hepatol	May 54(5)	872-8	2011
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 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)	11484-97	2013
H Okada, M Honda, JS Campbell, Y Sakai, T Yamashita, Y Takebuchi, K Hada, T Shirasaki, R Takabatake, M Nakamura, H Sunakozaka, T Tanaka, N Fausto, <u>S Kaneko.</u>	Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development.	Cancer Res	72(17)	4459-71	2012
M Honda, K Takehana, A Sakai, Y Tagata, T Shirasaki, S Nishitani, T Muramatsu, T Yamashita, Y Nakamoto, E Mizukoshi, Y Sakai, T Yamashita, M Nakamura, T Shimakami, M Yi, SM Lemon, T Suzuki, T Wakita, <u>S Kaneko;</u> Hokuriku Liver Study Group.	Malnutrition Impairs Interferon Signaling through mTOR and FoxO pathways in Patients with Chronic Hepatitis C.	Gastroenterology	141(1)	128-140	2011
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., Shimotohno K., Kato N.	PML tumor suppressor protein is required for HCV production	Biochem. Biophys. Res. Commun.	430	592-597	2013
Aly H.H., Shimotohno K., <u>Hijikata M.</u> , Seya T.	In vitro models for the analysis of HCV life cycle.	Microbiol. and Immunol.	56(1)	1-9	2012
Wakita T., Suzuki T., Evans M.J., Shimotohno K., Chayama K., Matsuura Y., <u>Hijikata M.</u> , Moriishi K., Seya T., Enomoto N., Koike K., Kato N., Kanto T., Hotta H.	Will there be an HCV meeting in 2020? Summary of the 17 th International Meeting in Hepatitis C Virus and Related Viruses	Gastroenterology	141(1)	E1-E5	2011
Ariumi, Y. Misao Kuroki M., Kushima Y., Osugi K., <u>Hijikata M.</u> , Maki M., Ikeda M., Kato N.	Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets.	J. Virol.,	85(14)	6882-6892	2011
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 polyiod-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(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 biological activity.	J Pharm Sci.	102(9)	3110-3118	2013
Watcharanurak K, Nishikawa M, Takahashi Y, <u>Takakura Y.</u>	Controlling the kinetics of interferon transgene expression for improved gene therapy	J Drug Target	20(9)	764-769	2012
Watcharanurak K, Nishikawa M, Takahashi Y, Kabashima K, Takahashi R, <u>Takakura Y.</u>	Regulation of immunological balance by sustained interferon- γ gene transfer for acute phase of atopic dermatitis in mice.	Gene Ther	20(5)	538-544	2013
Ando M, Takahashi Y, Nishikawa M, Watanabe Y, <u>Takakura Y.</u>	Constant and steady transgene expression of interferon- γ by optimization of plasmid construct for safe and effective interferon- γ gene therapy.	J Gene Med	14(4)	288-295	2012

Takahashi Y, Nishikawa M, <u>Takakura Y.</u>	Development of safe and effective nonviral gene therapy by eliminating CpG motifs from plasmid DNA vector	Front Biosci (Schol Ed)	4	133-141	2009
Takahashi Y, Nishikawa M, Takiguchi N, Suehara T, <u>Takakura Y.</u>	Saturation of transgene protein synthesis from mRNA in cells producing a large number of transgene mRNA.	Biotechnol Bioeng	In press		2011
Miura <u>Maekawa S</u> , Sato M, Komatsu N, Tatsumi A, Takano S, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N.	Deep sequencing analysis of variants resistant to the NS5A inhibitor docalatasvir in patients with genotype 1b hepatitis C virus infection.	Hepatol Res.	Feb	In press	2014
Komatsu N, Motosugi U, <u>Maekawa S</u> , 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 gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging.	Hepatol Res.	Feb	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, 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.	87(23)	12541-51.	2013

Shindo H, <u>Maekawa S</u> , 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.	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, 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.	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.	Hepatol Res.	43(8)	865-75.	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, 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.	85(3)	449-58.	2013
Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, <u>Maekawa S</u> , Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K.	Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge Amphimedon sp.	PLoS One.	7(11)	e48685.	2012

Sueki R, <u>Maekawa S</u> , Miura M, Kadokura M, Komase K, Shindo H, Kanayama A, Ohmori T, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N.	Correlation between pretreatment viral sequences and the emergence of lamivudine resistance in hepatitis B virus infection.	J Med Virol.	84(9)	1360-8.	2012
Yamashita A, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, <u>Maekawa S</u> , Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K.	Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star <i>Alloeocomatella polycladia</i> .	Mar Drugs.	10(4)	744-61.	2012
<u>Maekawa S</u> , Sakamoto M, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Komatsu N, Shindo K, Kanayama A, Ohmori T, Amemiya F, Takano S, Yamaguchi T, Nakayama Y, Kitamura T, Inoue T, Okada S, Enomoto N.	Comprehensive analysis for viral elements and interleukin-28B polymorphisms in response to pegylated interferon plus ribavirin therapy in hepatitis C virus 1B infection.	Hepatolog y.	56(5)	1611-21.	2012
Miura M, <u>Maekawa S</u> , Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Ohmori T, Kanayama A, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Kitamura T, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N.	Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C.	Hepatol Int.	6(1)	386-396.	2012
Shindo H, <u>Maekawa S</u> , Komase K, Sueki R, Miura M, Kadokura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Okada SI, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Enomoto N.	Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients.	Hepatol Int.	6(2)	482-490.	2012

Takaya D, Yamashita A, Kamijo K, Gomi J, Ito M, <u>Maekawa S</u> , Enomoto N, Sakamoto N, Watanabe Y, Arai R, Umeyama H, Honma T, Matsumoto T, Yokoyama S.	A new method for induced fit docking (GENIUS) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors.	Bioorg Med Chem.	19(22)	6892-905.	2011
Kadokura M, <u>Maekawa S</u> , Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N.	Analysis of the complete open reading frame of genotype 2b hepatitis C virus in association with the response to peginterferon and ribavirin therapy.	PLoS One.	6(9)	e24514.	2011
Kadokura M, <u>Maekawa S</u> , Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N.	Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy.	Hepatol Int.	5(3)	789-99.	2011
Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, <u>Maekawa S</u> , Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M.	Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors.	J Hepatol.	54(3)	439-48.	2011
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, <u>Matsuura Y</u> , Hayashi N, Mizokami M, Takehara 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
Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, <u>Matsuura Y</u> .	Expression of miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with HCV.	J.Virol.	86	7918-7933	2012
Abe T, Fukuhara T, Wen X, Ninomiya A, Moriishi K, Maehara Y, Takeuchi O, Kawai T, Akira S, <u>Matsuura Y</u> .	CD44 participates in the IP-10 induction in cells replicating HCV RNA through an interaction with TLR2 and hyaluronan.	J.Virol.	86	6159-6170	2012
Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, <u>Matsuura Y</u> .	Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122.	J.Virol.	86	1382-1393	2012
Fukuhara T, <u>Matsuura Y</u> .	Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection.	J. Gastroenterol.		doi:10.1007/s00535-012-0661-5.	2012

Moriishi K, <u>Matsuura Y.</u>	Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection.	Front. Microbiol.		doi:10.3389/fmicb.2012.00054.	2012
Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, <u>Matsuura Y.</u> , Saito I, Wakita T, Suzuki T.	Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection.	Virology	432	29-38	2012
Kobayashi F, Yamada S, Taguwa S, Kataoka C, Naito S, Hama Y, Tani H, <u>Matsuura Y.</u> , Sugahara K.	Specific interaction of the envelope glycoproteins E1 and E2 with liver heparan sulfate involved in the tissue tropism infection by hepatitis C virus.	Glycoconj. J.	29	211-220	2012
Tripathi L.P, Kambara H, Moriishi K, Morita E, Abe T, Mori Y, Chen Y.A, <u>Matsuura Y.</u> , Mizuguchi K.	Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28 γ Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study.	J. Proteome Res.	11	3664-3679	2012
Kondo M, Moriishi K, Wada H, Noda T, Marubashi S, Wakasa K, <u>Matsuura Y.</u> , Doki Y, Mori M, Nagano H.	Upregulation of nuclear PA28 γ expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma.	Exp. Ther. Med.	3	379-385	2012
Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, <u>Matsuura Y.</u>	Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus.	J.Virol.	85	13185-13194	2011
Katoh H, Mori Y, Kambara H, Abe T, Fukuhara T, Morita E, Moriishi K, Kamitani W, <u>Matsuura Y.</u>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through an interaction with viral proteins and RNA.	J.Virol.	85	10976-10988	2011
Kambara H, Tani H, Mori Y, Abe T, Katoh H, Fukuhara T, Taguwa S, Moriishi K, <u>Matsuura Y.</u>	Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus.	Virology	412	211-219	2011

Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi M, Matsuura Y.	Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules.	PLoS One	6	e15967	2011
Fukuhara T, Tani H, Shiokawa M, Goto Y, Abe T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, <u>Matsuura Y.</u>	Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus.	Microbes Infect.	13	405-412	2011
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, <u>Ohdan H.</u>	Attenuation of Portal Hypertension by Continuous Portal Infusion of PGE1 and Immunologic Impact in Adult-to-Adult Living-Donor Liver Transplantation.	Transplantation..	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
Tashiro H, Ide K, Amano H, Kobayashi T, Onoe T, Ishiyama K, Kuroda S, Tazawa H, Kono H, Aikata H, Takahashi S, Chayama K, <u>Ohdan H.</u>	Surgical treatment for portosystemic encephalopathy in patients with liver cirrhosis: Occlusion of portosystemic shunt in combination with splenectomy.	Hepatol Res.	43(3)	249-254	2013
Iwako H, Tashiro H, Amano H, Tanimoto Y, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Nambu J, Mikuriya Y, Abe T, <u>Ohdan H.</u>	Prognostic significance of antithrombin III levels for outcomes in patients with hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy.	Ann Surg Oncol.	19	2888	2012
Oshita A, Tashiro H, Amano H, Kobayashi T, Onoe T, Ide K, Takaki S, Takahashi S, Arihiro K, Chayama K, <u>Ohdan H.</u>	Safety and feasibility of diet-treated donors with steatotic livers at the initial consultation for living-donor liver transplantation.	Transplantation.	93	1024	2012

Ohira M, Nishida S, Tryphonopoulos P, Tekin A, Selvaggi G, Moon J, Levi D, Ricordi C, Ishiyama K, Tanaka Y, <u>Ohdan H</u> , Tzakis AG.	Clinical-scale isolation of interleukin-2-stimulated liver natural killer cells for treatment of liver transplantation with hepatocellular carcinoma.	Cell Transplant	21(7)	1397-1406	2012
Kajitani K, Tanaka Y, Arihiro K, Kataoka T, <u>Ohdan H</u> .	Mechanistic analysis of the antitumor efficacy of human natural killer cells against breast cancer cells.	Breast Cancer Res Treat.	134	139	2012
Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Takahashi S, Itamoto T, Chayama K, <u>Ohdan H</u> .	Impact of pegylated interferon therapy on outcomes of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma after curative hepatic resection.	Ann Surg Oncol.	19(2)	418-425	2012
Kuroda S, Tashiro H, Igarashi Y, Tanimoto Y, Nambu J, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tanaka Y, <u>Ohdan H</u> .	Rho inhibitor prevents ischemia-reperfusion injury in rat steatotic liver.	J Hepatol.	56(1)	146-152	2012
Wang C, Wang H, Ide K, Wang Y, Van Rooijen N, <u>Ohdan H</u> , Yang YG.	Human CD47 expression permits survival of porcine cells in immunodeficient mice that express SIRP α capable of binding to human CD47.	Cell Transplant	20	1915-1920	2011
Tashiro H, Ishiyama K, Ohira M, Igarashi Y, Tahara H, Ide K, Onoe T, Tanaka Y, <u>Ohdan H</u> .	Impact of adjuvant immunotherapy using liver allograft-derived lymphocytes on bacteremia in living-donor liver transplantation.	Transplantation.	92(5)	575-580	2011
Ide K, Tanaka Y, Onoe T, Banshodani M, Tazawa H, Igarashi Y, Basnet NB, Doskali M, Tashiro H, <u>Ohdan H</u> .	Evidence for the immunosuppressive potential of calcineurin inhibitor-sparing regimens in liver transplant recipients with impaired renal function.	J Transplant			2011
Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, <u>Ohdan H</u> , Yoshizato K.	Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure.	J Surg Res.	167(1)	e29-37	2011

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 replication.	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, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, <u>Wakita T.</u> , Aizaki H.	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.	Gastroenterology.	145(2):	447-455.e4.	2013
Sekiguchi S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F, Tsukiyama-Kohara K, <u>Wakita T.</u> , Tanaka T, Miyasaka M, Mizuno K, Hayashi Y, Hishima T, Matsushima K, Kohara M	Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver	PLoS One.	7(12)	e51656.	2012
Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, <u>Wakita T.</u> , Fukazawa H.	Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle.	Microbes Infect.	15(1)	45-55.	2013
Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, <u>Wakita T.</u>	Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells.	Gastroenterology.	144(1)	56-58.e7	2013

Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, <u>Wakita T.</u>	Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone.	J Virol.	86(19)	10805-20.	2012
Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, <u>Wakita T.</u> Suzuki T.	Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection.	Virology.	432(1)	29-38.	2012
Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, <u>Wakita T.</u> Suzuki T.	Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA.	PLoS Pathog.	8(3)	e1002561.	2012
Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, <u>Wakita T.</u>	Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone.	Microbiol Immunol.	56(5)	308-17.	2012
Weng L, Kohara M, <u>Wakita T.</u> Shimotohno K, Toyoda T.	Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase.	Gene.	496(2)	79-87.	2012
Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, <u>Wakita T.</u>	Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1.	J Virol.	86(4)	2143-52.	2012
Salim MT, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, <u>Wakita T.</u> Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M.	Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novelphenanthridinone derivatives.	Biochem Biophys Res Commun.	415(4)	714-9.	2011
Sugiyama M, Tanaka Y, <u>Wakita T.</u> Nakanishi M, Mizokami M.	Genetic Variation of theIL-28B Promoter Affecting Gene Expression.	PLoS One.	6(10)	e26620.	2011
Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, <u>Wakita T.</u> Meurs EF.	Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response.	PLoS Pathog.	7(10)	e1002289.	2011

Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, <u>Wakita T</u> , Suzuki T.	Role of the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles.	J Biol Chem.	286(43)	37264-73.	2011
Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, <u>Wakita T</u> , Kato T.	Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2.	Biochem Biophys Res Commun.	410(3)	404-9.	2011
Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, <u>Wakita T</u> , Suzuki T.	Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus.	J Gen Virol.	92(Pt 9)	2082-7.	2011
Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, <u>Wakita T</u> .	Production and characterization of HCV particles from serum-free culture.	Vaccine.	29(29-30)	4821-8.	2011
Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, <u>Wakita T</u> , Kato T.	In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis.	Hepatology.	54(2)	425-33.	2011
Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, <u>Wakita T</u> , Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group.	Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C.	Gastroenterol.	141(1)	128-40, 140.e1-2.	2011

Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, <u>Wakita T</u> , Shimotohno K, Seya T.	Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV).	PLoS One.	6(6)	e21284.	2011
--	---	-----------	------	---------	------