

感染症学（ウイルス学・寄生虫学分野）

1 構 成 員

	平成 28 年 3 月 31 日現在	
教授	1 人	
病院教授	0 人	
准教授	1 人	
病院准教授	0 人	
講師（うち病院籍）	0 人	(0 人)
病院講師	0 人	
助教（うち病院籍）	2 人	(0 人)
診療助教	0 人	
特任教員（特任教授、特任准教授、特任助教を含む）	1 人	
医員	0 人	
研修医	0 人	
特任研究員	1 人	
大学院学生（うち他講座から）	4 人	(1 人)
研究生	0 人	
外国人客員研究員	0 人	
技術職員（教務職員を含む）	0 人	
その他（技術補佐員等）	3 人	
合計	13 人	

2 教員の異動状況

鈴木 哲朗（教授）	(H22.4.1～現職)
石井 明（准教授）	(H9.5.1～19.3.31 助教授；H19.4.1～現職)
記野 秀人（助教）	(S53.6.16～H19.3.31 助手；H19.4.1～H28.3.31)
伊藤 昌彦（助教）	(H22.7.1～現職)
中島 謙治（特任助教）	(H27.4.1～H28.3.31)

3 研究業績

数字は小数 2 位まで。

	平成 27 年度	
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	10 編	(0 編)
そのインパクトファクターの合計	44.42	
(2) 論文形式のプロシーディングズ及びレター	2 編	
そのインパクトファクターの合計	0.00	
(3) 総説数（うち邦文のもの）	5 編	(4 編)
そのインパクトファクターの合計	1.01	
(4) 著書数（うち邦文のもの）	0 編	(0 編)

(5) 症例報告数 (うち邦文のもの)	0 編	(0 編)
そのインパクトファクターの合計	0.00	

(1) 原著論文 (当該教室所属の者に下線)

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Shi G, Ando T, Suzuki R, Matsuda M, Nakashima K, Ito M, Omatsu T, Oba M, Ochiai H, Kato T, Mizutani T, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of the 3' Untranslated Region in Encapsidation of the Hepatitis C Virus. PLoS Pathog. 12: e1005441 (2016). [7.56]
2. Kino H. Nylon mesh filtration technique for the collection of metacercariae from host tissue by digestion with artificial gastric juice. Parasitology International S1383-5769: 214-217 (2015). [1.86]

インパクトファクターの小計 [9.42]

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

1. Fukasawa M, Nagase S, Shirasago Y, Iida M, Yamashita M, Endo K, Yagi K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuniyasu H, Kondoh M. Monoclonal Antibodies against Extracellular Domains of Claudin-1 Block Hepatitis C Virus Infection in a Mouse Model. J Virol. 89: 4866-4879 (2015). [4.44]
2. Park C, Min S, Park EM, Lim YS, Kang S, Suzuki T, Shin EC, Hwang SB. Pim Kinase Interacts with Nonstructural 5A Protein and Regulates Hepatitis C Virus Entry. J Virol. 89: 10073-10086 (2015). [4.44]
3. Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, Yamashita A, Yasumoto J, Chen W, Okamoto T, Maekawa S, Watashi K, Wakita T, Ryo A, Suzuki T, Matsuura Y, Enomoto N, Moriishi K. Hepatitis B virus efficiently infects non-adherent hepatoma cells via human sodium taurocholate cotransporting polypeptide. Sci Rep. 5:17047 (2015). [5.58]
4. Kong L, Fujimoto A, Nakamura M, Aoyagi H, Matsuda M, Watashi K, Suzuki R, Arita M, Yamagoe S, Dohmae N, Suzuki T, Sakamaki Y, Ichinose S, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. Prolactin Regulatory Element Binding Protein Is Involved in Hepatitis C Virus Replication by Interaction with NS4B. J Virol. 90: 3093-3111 (2016). [4.44]
5. Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Sato M, Kanegae Y, Shi G, Watashi K, Aizaki H, Chiba J, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Single-domain Intrabodies against HCV Core Inhibit Viral Propagation and Core-induced NF- κ B Activation. J Gen Virol. 97: 887-892 (2016). [3.18]
6. Tanaka A, Nagayoshi M, Youichi T, Tanaka I, Kusunoki H, Watanabe S, Kuroda K, Takeda S, Ito M, Yanagimachi R. Fourteen children born following round spermatid injection: there is a future for human ROSI. Proc Natl Acad Sci USA, 112: 14629-14634 (2015). [9.67]

7. Shimazu T., Kino H. Metagonimus yokogawai (Trematoda: Heterophyidae): From Discovery to Designation of a Neotype. Korean J. Parasitology 53: 627-638 (2015) [1.15]
8. Pornrusectairatn S., Kino H., Shimazu T., Nawa Y., Scholz T., Ruangsittichai J., Saralamba N.T., Thaenkham U. A molecular phylogeny of Asian species of the genus Metagonimus (Digenea)—small intestinal flukes—based on representative Japanese populations. Parasitology Research 115:1123-1130 (2016). [2.10]

インパクトファクターの小計 [35.00]

(2-1) 論文形式のプロシーディングズ

- A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの
 1. 石井明、高塚正典、野ヶ山由浩、高橋聡、長谷川英男：尿検体中に見られた線虫について. Clinical Parasitology 26: 36-38 (2016).
- C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの
 1. 山田稔、石田夏樹、堀田欣一、今本栄子、記野秀人、中屋隆明、有菌直樹：大腸内視鏡検査下に発見・診断された鞭虫症の5例と摘出虫体を用いた遺伝子診断による虫種同定について. Clinical Parasitology 26: 28-31 (2016).

(3) 総 説

- A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの
 1. 鈴木哲朗、中島謙治、千田剛士、伊藤昌彦. 「C型肝炎治療法の進歩」ウイルス. 65巻, pp 239-243 (2015)
 2. 鈴木哲朗、石井孝司. 「A型肝炎ウイルスの疫学」新ウイルス性肝炎学—最新の基礎・臨床研究情報— 日本臨床増刊. pp 571-575 (2015).
 3. 伊藤昌彦、鈴木哲朗. 「CRISPR システムによるB型肝炎ウイルスゲノムの排除と転写抑制」月刊細胞 47: 566-570 (2015).
- C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの
 1. Masaki T, Suzuki T. NS5A phosphorylation: its functional role in the life cycle of hepatitis C virus. Future Virology 10: 751-762 (2015). [1.01]
 2. 山口貴史、伊藤昌彦、田中威づみ、御木多美登、伊熊慎一郎、永吉基、田中温、黒田恵司、竹田省、楠比呂志、渡邊誠二. 「ヒト卵子内円形精子細胞注入法(ROSI)における PLCZ1 による卵子活性化法の確立」 J Mamm Ova Res. 32: S11 (2015).

インパクトファクターの小計 [1.01]

4 特許等の出願状況

	平成 27 年度
特許取得数（出願中含む）	2 件

1. 出願番号：特願 2015-157111

発明の名称：質量分析を用いた B 型肝炎ウイルスの測定方法

発明人：鈴木哲朗 他.

出願人：浜松医科大学、愛媛大学

公開日：平成 27 年 8 月 7 日

2. 公開番号：特開 2015-173635

発明の名称：肝炎組織体、肝炎ウイルスの感染方法、肝炎組織体の製造方法、肝炎ウイルスの増殖方法、肝炎ワクチンの製造方法、スクリーニング方法、及びキット

発明人：鈴木哲朗、伊藤昌彦、中島謙治 他

出願人：浜松医科大学、東京工業大学

公開日：平成 27 年 10 月 5 日

5 医学研究費取得状況

	平成 27 年度
(1) 科学研究費助成事業（文部科学省、日本学術振興会）	6 件 (730 万円)
(2) 厚生労働科学研究費	0 件 (0 万円)
(3) 日本医療研究開発機構(AMED)による研究助成	6 件 (2,935 万円)
(4) 科学技術振興機構(JST) による研究助成	0 件 (0 万円)
(5) 他政府機関による研究助成	2 件 (360 万円)
(6) 財団助成金	1 件 (100 万円)
(7) 受託研究または共同研究	1 件 (227 万円)
(8) 奨学寄附金	2 件 (8,000 USD)

(1) 科学研究費助成事業（文部科学省、日本学術振興会）

1. 鈴木哲朗（代表者）基盤研究（B）「C 型肝炎ウイルスの選択的ゲノムパッケージング機構の解明」 400 万円（新規）
2. 鈴木哲朗（代表者）挑戦的萌芽研究「ウイルス複製の場へエネルギーを供給する機構の解析」 110 万円（継続）
3. 伊藤昌彦（代表者）挑戦的萌芽研究「CRISPR による B 型肝炎ウイルスの排除」 110 万円（継続）
4. 鈴木哲朗（分担者）基盤研究（B）「C 型肝炎ウイルス糖ペプチドを用いた中和抗体作製と新規診断技術への応用」 30 万円（継続）
5. 伊藤昌彦（分担者）基盤研究（B）「C型肝炎ウイルス粒子形成におけるゲノムパッケージングの分子機構」 50 万円（新規）
6. 伊藤昌彦（分担者）挑戦的萌芽研究「ウイルス複製の場へエネルギーを供給する機構の解析」 30 万円（継続）

(3) 日本医療研究開発機構(AMED)による研究助成

1. 鈴木哲朗(分担者) 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 「培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と予防診断法に関する研究」 120万円(継続)
2. 鈴木哲朗(分担者) 肝炎等克服緊急対策研究事業 「C型肝炎の病態の解明と肝癌発症制御法の確立に関する研究」 150万円(継続)
3. 鈴木哲朗(分担者) 肝炎等克服緊急対策研究事業 「HCVに関する抗ウイルス治療後、SVR後の病態に関する研究」 400万円(継続)
4. 鈴木哲朗(分担者) 肝炎等克服緊急対策研究事業 「ウイルス肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究」 400万円(新規)
5. 鈴木哲朗(分担者) B型肝炎創薬実用化等研究事業 「B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究」 1100万円(継続)
6. 鈴木哲朗(分担者) B型肝炎創薬実用化等研究事業 「B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究」 765万円(継続)

(5) 他政府機関による研究助成

1. 鈴木哲朗(分担者) 沖縄感染症研究拠点形成促進事業「ワクチンの有効性と安全性の解析」 230万円(新規)
2. 鈴木哲朗(代表者) ふじのくに地域・大学コンソーシアム学術研究助成「マイクロミニピッグを利用したウイルス性胃腸炎モデルの作製」 130万円(新規)

(6) 財団助成金

1. 鈴木哲朗 三井生命厚生財団 医学研究助成 100万円

(7) 受託研究または共同研究

1. 伊藤昌彦 家畜改良事業団「種雄牛繁殖能力評価技術開発活用事業、エリート精子の生化学的な特性解明」 227万円

(8) 奨学寄附金

1. 鈴木哲朗 Bristol-Myers-Squibb Investigator Sponsored Research 「Quantitative analysis of components of HCV replication complex: impact of antivirals」 8,000 USD

7 学会活動

	国際学会	国内学会
(1) 特別講演・招待講演回数	0件	0件
(2) シンポジウム発表数	1件	1件
(3) 学会座長回数	0件	2件
(4) 学会開催回数	0件	1件

(5) 学会役員等回数	0 件	2 件
(6) 一般演題発表数	3 件	

(1) 国際学会等開催・参加

3) 国際学会・会議等でのシンポジウム発表

1. 鈴木哲朗 「Involvement of activation of liver-enriched transcription factor CREBH in hepatic fibrosis induced by HCV infection」: The 2015 Italy-Japan Liver Workshop “Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: basic research to clinical practice” (2015年10月, ナポリ)

5) 一般発表

口頭発表

1. Takeshi Chida, Masahiko Ito, Tetsuro Suzuki 「Activation of liver-enriched transcription factor CREBH induced by HCV infection plays a key role in up-regulation of TGF- β 2 expression and fibrogenesis」: 第22回C型肝炎及び関連ウイルスに関する国際会議 (HCV2015)、2015年10月、ストラスブール、フランス

ポスター発表

1. Masahiko Ito, Masayoshi Fukasawa, Michinori Kohara, Tetsuro Suzuki, Lipidomic analysis of the livers in HCV-infected humanized mice by imaging mass spectrometry、第22回C型肝炎及び関連ウイルスに関する国際会議 (HCV2015)、2015年10月、ストラスブール、フランス
2. Masahiko Ito, Yuan Li, Suofeng Sun, Kenji Nakashima, Tetsuro Suzuki, LUC7L3/Luc7A/CROP as a negative regulator of enhancer II/basal core promoter of hepatitis B virus, 2015 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses、2015年10月、バードナウハイム、ドイツ

(1) 国内学会の開催・参加

1) 主催した学会名

1. 石井 明、記野秀人: 第20回静岡県寄生虫症研究会研究総会、2015年9月、浜松市

3) シンポジウム発表

1. 鈴木哲朗 「「C型肝炎ウイルス粒子が形成されるメカニズム」: BMB2015 (2015年12月、神戸)

4) 座長をした学会名

1. 鈴木哲朗 第62回日本ウイルス学会学術集会、2015年11月、福岡市
2. 鈴木哲朗 BMB2015、2015年12月、神戸市

(3) 役職についている国際・国内学会名とその役割

鈴木哲朗 日本ウイルス学会 理事 (広報担当、英文学会誌編集担当)

石井 明 日本寄生虫学会 評議員

8 学術雑誌の編集への貢献

	国内	外国
学術雑誌編集数（レフリー数は除く）	8件	0件

(1) 国内の英文雑誌の編集：

鈴木哲朗 Microbiology and Immunology、Associated editor、8件 PubMed/Medline 登録有、インパクトファクター 1.31

(3) 国内外の英文雑誌のレフリー

鈴木哲朗 PLOS Pathog; 1報、J Inf Dis; 1報、Sci Rep; 1報、Cancer Lett; 1報、Expert Opinion on Emerging Drugs; 1報、Antiviral Res; 1報、J Viral Meth; 1報

9 共同研究の実施状況

	平成 27 年度
(1) 国際共同研究	2件
(2) 国内共同研究	27件
(3) 学内共同研究	8件

(1) 国際共同研究

肝炎ウイルスの複製増殖機構

Laboratory of Molecular Genetics and Pathology of Hepatitis Viruses, Hepatology Unit, University Hospital of Pisa

Metagonimus 属吸虫の分子系統学的研究：

Department of Helminthology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Thailand

(2) 国内共同研究

肝炎ウイルスの複製増殖機構、病原性発現機構：

静岡大学創造科学技術大学院、国立感染症研究所ウイルス第二部、同細胞化学部、大阪大学微生物病研究所、神戸大学医学系研究科、東京大学消化器内科、同医科学研究所遺伝子解析施設、慶應義塾大学工学部、愛媛大学プロテオサイエンスセンター、理化学研究所横浜研究所、同基幹研究所、京都大学薬学研究科

ポリオーマウイルスの増殖機構、ウイルス検出技術の開発：

国立感染症研究所ウイルス第二部、国立長寿医療研究センター、神戸市環境保健研究所、静岡大学創造科学技術大学院、福島高専

マラリアに関する研究：

杏林大学、三重大学

広東住血線虫感染マウスの病態解析：東京医科歯科大学

哺乳類受精機構：

東京女子医科大学、国立成育医療センター研究所、東京農工大学農学部獣医学科、大阪大学微生物病研究所、順天堂大学医学部、東京大学大学院新領域創成科学研究科、セントマザー産婦人科

医院、家畜改良事業団

(3) 学内共同研究

坂口孝宣 (外科学第二)、小林良正 (内科学第二) : ウイルス性肝炎の研究

須田隆文 (内科学第二) ウイルス検出技術の開発

瀬藤光利 (解剖学講座細胞生物学) : C型肝炎のリピドーム解析

金山尚裕 (産婦人科)、佐野秀人、浦野哲盟 (医生理学) : 免疫系における PAI-1 の役割に関する研究

北川雅敏、大畑樹也 (分子生物学) : B型肝炎ウイルスの病原性発現機構

青戸一司 (医化学) : C型肝炎ウイルス産生マウスの作製と病原性発現機構解析

山本清二 (メディカルフォトリクス研究センター)、永田 年 (基礎看護学)、加藤秀樹 (動物実験施設) : 脳性マalaria発症機序の解明と薬物治療の効果判定システムの構築

夏目貴弘 (産学官共同研究センター) : 広東住血線虫感染マウスの脳 MRI 撮像及び定量解析の試み

10 産学共同研究

	平成 27 年度
産学共同研究	0 件

12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

1. C型肝炎ウイルス (HCV) の粒子形成機構 : ゲノムパッケージングシグナルの同定

この約 10 年間で HCV の生活環に関する基礎研究は大きな進展を遂げた。粒子形成過程の分子機構については、粒子を構成する構造タンパク質だけでなく NS2、NS5A などの非構造タンパク質が重要であること、粒子アセンブリー、分泌には、細胞の脂質代謝系が関与することなどが明らかになった。しかしながら、HCV のゲノムがどのようにして粒子内へパッケージングされるのかはまったくと言っていいほど明らかにされていなかった。我々は、1) HCV 粒子の中に含まれる HCV RNA は大部分全長サイズであること、2) HCV ゲノムの中で、3'UTR 配列(~200 塩基)がパッケージングに必要であり、特にその 3'末端側に存在する stem-loop 二箇所がゲノムパッケージングに重要であること、3) HCV Core タンパク質の塩基性アミノ酸クラスターは HCV RNA との結合、粒子産生に重要であることなどを明らかにした。(史 国利、中島謙治、伊藤昌彦、鈴木哲朗 他)

2. 細胞分化依存的に肝炎ウイルス生活環調節に関与する宿主因子の同定

肝臓の発生・分化過程においては、肝芽細胞 (肝幹細胞) からオーバル細胞を経て肝細胞と胆管上皮細胞へ分化することが知られているが、肝の上皮系細胞の分化過程と肝炎ウイルスの生活環の関係、ウイルス増殖に必要な分化要因などは未だ明らかになっていない。本研究では、HCV 高感受性の肝細胞癌株 HuH-7 にリプログラミング因子である OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28、NANOG を導入することで bidirectional に肝実質細胞や胆管上皮細胞に分化しうるオーバル細胞様細胞株 Hdo 細胞を樹立した。

Hdo 細胞は HCV サブゲノムレプリコンの複製能を欠損していたが、HBV の複製能は維持されていた。Hdo 細胞から肝実質細胞への分化誘導によりレプリコン複製能は回復することから、HCV RNA の複製には実質細胞系への肝分化の際に誘導もしくは抑制される宿主因子の関与が示唆された。マイクロアレイ、qRT-PCR、さらにノックダウン、強制発現解析を行った結果、既知の HCV 調節因子の発現は親細胞 HuH-7 と同等であったが、HCV 複製を抑制する新規因子として miR200a を同定した。miR200a は Hdo 細胞また肝芽細胞様細胞で高発現し HuH-7 細胞、iPS 由来肝細胞などでは低発現であった。HCV 複製 HuH-7 細胞へ miR200a を導入することにより顕著な HCV 複製抑制が認められた。Hdo 細胞は肝分化度により発現が変動しウイルス感染・複製に関わる宿主因子を同定するために有用であることが示された。(伊藤昌彦、鈴木哲朗 他)

3. HCV 感染による肝線維化誘導の分子機構

肝臓の線維化は、HCV、B 型肝炎ウイルス(HBV)感染やアルコール過剰摂取、脂肪肝などが原因で発症し、肝臓内でコラーゲンなどの細胞外基質が過剰に蓄積する。肝線維化が進行すると肝硬変や肝細胞がんに至る。肝線維化に TGF- β が密接に関連することがよく知られているが、上記原因因子がどのように TGF- β 発現を亢進またシグナルを活性化するかの詳細は明らかにされていない。また、TGF- β シグナル活性化による細胞外基質の蓄積誘導の分子機構も必ずしも十分解明されていない。

これまでの解析から、HCV 感染細胞では、HCV タンパク質による小胞体ストレス惹起によって肝特異的転写因子 CREBH が活性化され TGF- β 2 発現が誘導されることが示唆され、この TGF- β 2 が肝星細胞に作用して COL1A1 発現亢進など、線維化誘導へ繋がることが明らかとなった。更に詳細な解析を行い、CREBH 活性化による TGF- β 2 発現亢進が感染細胞及び近傍の肝星細胞の TGF- β receptor を介して TGF- β シグナル活性化、TGF- β 1 発現亢進へ繋がることも示された。(千田剛士、伊藤昌彦、鈴木哲朗 他)

4. HCV 感染による肝臓脂質代謝攪乱の分子機構

慢性 C 型肝炎患者においては、他の肝炎に比べ肝脂肪化の合併頻度が高く、抗 HCV 療法によるウイルス量の低減によりこの合併症も改善されることが報告されている。しかしながら、HCV 感染に伴う脂質代謝異常の全容、肝脂肪化の分子機構等は未だ十分には解明されていない。HCV を感染させたヒト肝臓キメラマウスにおける肝臓の脂質分子(PC, LPC, TG)の変動を、質量顕微鏡を用いて網羅的、包括的な解析を行い、フォスファチジルコリン(PC)がコントロールマウスと比較して HCV 感染マウスの肝臓において有意に低下していることを明らかにした。また HuH7.5.1 細胞において、HCV 感染によって、PC からリゾフォスファチジルコリン(LPC)への加水分解酵素である PLA2G4C の発現が顕著に亢進することを明らかにした。PLA2G4C の発現は HCV 蛋白 Core-p7 の発現によって誘導され、PLA2G4C プロモーターレポーターベクターによる発現解析から転写開始点から上流 114bp までの配列が転写活性に重要であることを示した。また、この領域に存在する c-Myc、NF κ B 結合予測サイトへの点変異の導入や c-Myc、NF κ B の活性化、ChIP アッセイの結果から、HCV 感染により c-Myc、NF κ B の活性化を介して PLA2G4C の発現が誘導されることが示唆された。本研究で明らかになった脂質分子種の変動は、膜の流動性、可塑性に影響を与える可能性

が考えられる。(伊藤昌彦、鈴木哲朗 他)

5. B型肝炎ウイルス (HBV) 複製におけるプレゲノム RNA スプライシングの役割

HBV の生活環において、核内で転写されたプレゲノム RNA (pgRNA) はプロセッシングを受け細胞質へ輸送されカプシドへパッケージングされる。HBV の複製増殖には粒子への unspliced pgRNA のパッケージングが必須である。一方、pgRNA の一部はスプライシングを受けることがよく知られており、その spliced pgRNA が HBV 複製を正に制御する可能性が示されている。しかしながらその分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。我々は spliced pgRNA から HBc 抗原の C 末端のシステイン残基一つが欠損したタンパク質 (HBc-delC) が産生されることを新規に見出した。HBc 抗原はウイルスの殻を形成する因子であることから、HBc-delC もウイルス粒子形成に関与していることが予想される。そこで、スプライシング欠損 HBV 複製細胞における HBc 多量体形成をウェスタンブロット法で評価したところ、野生型 HBV 複製細胞と比較して著しく障害されていることが明らかとなった。このことから spliced pgRNA 由来 HBc-delC の存在がウイルス粒子形成に促進的に働いていると考えられた。(中島謙治、孫 鎖鋒、伊藤昌彦、鈴木哲朗 他)

6. HBV 転写後過程を制御する宿主因子の同定と機能解析

HBV RNAs に存在して転写後調節に関与するとされているシスエレメント post-transcriptional regulatory element (PRE)への結合因子を探索、同定しその機能解析を行った。その結果、hnRNP(heterogenous ribonucleoprotein)U が、HBV ゲノム複製細胞でノックダウンすることによって HBV pgRNA レベルが有意に亢進する一方、同細胞で強制発現させることによって pgRNA レベルが有意に低下することを見出した。試験管内で合成した hnRNPU と PRE RNA を用いて、両者が直接結合することを AlphaScreen assay で明らかにし、HBV 複製細胞での免疫沈降/RT-PCR によって hnRNPU が細胞内で pgRNA と相互作用することを示した。さらに、HBV 複製細胞へアクトノマイシン D を添加、経時的に pgRNA 量を測定することにより、hnRNPU 発現によって pgRNA の分解が促進されることを見出した。

hnRNPU と同様に PRE と直接結合し、pgRNA レベルの低下に働く分子として AUF1 (AU-rich RNA binding factor 1; also known as hnRNPD)を見出した。hnRNPU との比較解析から、pgRNA 分解に対して AUF1 は hnRNPU と同様に分解促進に働くことが示された一方、pgRNA のスプライシングに対する影響は両者で大きく異なった。すなわち、hnRNPU は pgRNA のスプライシングを促進するのに対し、AUF1 は同スプライシングに抑制的に働くことがわかった。この hnRNPU の促進効果は PRE に依存的であり、AUF1 の抑制効果は PRE 非依存的であることを見出した。

hnRNPU、AUF1 の他に HBV 複製調節因子として PUF60(Poly(U)-binding splicing factor 60 kDa)を同定した。興味深いことに、PUF60 は転写及び転写後レベルで HBV の遺伝子発現に関わることが示された。HBV 複製細胞へ PUF60 発現ベクターを導入することにより、導入 1-2 日後には pgRNA レベルは上昇するが、その後 pgRNA また HBV 産生は低下傾向を示した。作用機序の解析から、PUF60 は core/pgRNA プロモーター特に enhancer II の活性を亢進させる一方、pgRNA の分解を誘導することがわかった。(中島謙治、孫 鎖鋒、伊藤昌彦、鈴木哲朗 他)

7. HBV の遺伝子発現制御機構

HBV Enhancer II/Basal core promoter(Enh II/BCP)領域は、pgRNA、HBc 抗原の発現に必須であるだけでなく、HBV 関連肝発がん例でこの領域の変異が蓄積することから癌化にも関与すると考えられている。質量分析とノックダウン解析から、HBV Enh II/BCP 領域に結合しプレゲノムプロモーター活性に関与する宿主因子を選抜した。その中からノックダウンによって HBV 転写活性が有意に上昇する因子として LUC7-like 3 (LUC7L3)を見出した。LUC7L3 のノックダウンによって HBV プレゲノムプロモーター活性は上昇し強制発現によって抑制された。このような LUC7L3 の効果には LUC7L3 の N 末端の zinc finger motif 領域が重要であることが明らかとなった。(李 媛、孫 鎖鋒、伊藤昌彦、中島謙治、鈴木哲朗 他)

8. ゲノム編集による HBV 排除

現在、慢性 B 型肝炎の治療には核酸アナログ製剤やインターフェロンによる治療が行われているが、HBs 抗原陰性、HBV DNA 陰性になった場合でも、核内に HBV covalently closed circular (ccc)DNA が存在するような潜伏感染も報告されている。本研究では、HBV cccDNA の完全排除、複製・粒子産生の抑制を目的として、CRISPR/Cas9 および CRISPRi の応用による持続複製細胞からの HBV 排除を試みた。効果的なガイド配列を決定するため、プレゲノムプロモーターから 4ヶ所 (pg1-4)、pol の活性中心に 4ヶ所 (pol1-4)の新規のガイド配列を設計した。これらの CRISPR/Cas9 プラスミドと HBV 発現プラスミドを細胞へ共導入したところ、pg3、pol1~3 によって HBV RNA レベル、また HBV プロモーター活性が顕著に低下することを見出した。細胞毒性は認められなかった。一方、Cas9 の発現は宿主ゲノムの非特異的な切断・変異導入の問題が考えられる。また、HBV キャリアの肝癌患者の肝細胞では非常に高率に HBV 遺伝子が宿主染色体に組み込まれていることが報告されており、Cas9 による DNA 切断は宿主染色体の不安定化要因にもなりうる。これらの問題点を解決するために、nuclease 活性を欠損させた dCas9 を標的配列に留まらせることで、転写をブロックする CRISPRi システムを用いて、HBV RNA の転写抑制を試みた。HBV ゲノム内の種々の転写制御領域をガイド配列としたが、その中で、pgRNA 転写開始点下流また Enh1/X プロモーターを標的とした CRISPRi が高い抗 HBV 活性を有することが示された。本研究により、CRISPR/Cas9 システムだけでなく、CRISPRi によって HBV pgRNA の低減、HBs 抗原、HBe 抗原の産生を抑制できることを明らかにした。今後、肝臓への遺伝子デリバリーなどの技術革新、CRISPR/Cas9 システムの更なる改良により、HBV cccDNA の排除を達成するためのより効果的で安全な治療法となることが期待される。(伊藤昌彦、鈴木哲朗 他)

9. マウスマラリア原虫赤血球型の異種間感染競争

自然界におけるマラリア原虫の複数種感染が通常観察される。さらに、PCR を基礎とする分子学的検査法を用いることで、従来の顕微鏡観察では検出されない複数種感染が検出されるようになった。混合感染が宿主における感染経過、病態、死亡率などに影響を与えることが推測されるが、原虫間での相互関係は十分解明されていない。本研究では、GFP 遺伝子導入 *Plasmodium yoelii* 17XL と mCherry 遺伝子導入 *P. berghei* ANKA を 129 マウスに同時に感染させ、単一赤血球に対する重複感染と感染赤血球数の変動を蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターで観察した。

フローサイトメーターにより GFP および mCherry の両方の蛍光を有する赤血球が認められ、経時的にその割合も増加した。さらに血液塗抹標本の蛍光顕微鏡像とギムザ染色像の比較により異なるステージの原虫が単一赤血球に感染しているものが観察された。自然界におけるヒトマラリア原虫の複数種感染は遺伝子検査により明らかにされているが、一つの赤血球に異種原虫が感染しているか否かは確認できない。また、病態との関連性も不明な点が多い。ネズミマラリア原虫は基本的にはヒトマラリア原虫と同様の生物学的性状を持っており、今回の観察過程はヒトマラリアでも生じていると推測できる。複数種感染マウスと抗マラリア剤効果との関連性を考察することでヒトマラリアの治療に有効な知見が得られると思われる。(石井 明 他)

13 この期間中の特筆すべき業績、新技術の開発

1. HCV の粒子形成機構の解析を行ってきたが、今回、HCV ゲノムがヌクレオキャプシドへ取り込まれるために必要なシスエレメント (パッケージングシグナル) を同定し PLOS Pathogens 誌に報告した。HCV に限らずプラス鎖 RNA ウイルスではこれまでパッケージング過程の解析が進んでいなかったが、我々は独自に開発した非複製型トランスパッケージングシステムを利用し初めてフラビウイルス科ウイルスのパッケージングシグナルを同定することに成功した。これにより「どのようにしてウイルスゲノムが選択的にウイルス粒子に取り込まれるか」というウイルス学の根源的な命題に答えが導かれるものと期待される。
2. 愛媛大学プロテオサイエンスセンターとの共同研究の成果として、抗体を用いないウイルス抗原定量技術に関する特許 1 件を出願した。

14 研究の独創性、国際性、継続性、応用性

肝炎ウイルスの持続感染者は、HCV と HBV を併せて、現在我が国で 350 万人にのぼる。両ウイルスは肝炎、肝硬変、肝細胞がんの主要因である。世界的には、HCV は 1.7 億人、HBV は 3 億人もの感染者が存在する。

HCV の粒子形成を制御する分子メカニズムは未だ不明な点が多い。上述のように我々は、粒子形成の初期過程で最も重要なゲノムパッケージングの機構を解析し、本年度、パッケージングに重要なシスエレメントを初めて明らかにし発表した。現在、初期過程の分子機構解析を進めるとともに、それに続くエンベロープ形成過程の機構解析を鋭意進めている。

「なぜ HCV はヒトの肝細胞で殖えるのか」という肝炎ウイルス研究におけるもっとも基本的な疑問に関して、肝臓で高発現する microRNA や脂質代謝系の関与が重要であることが報告されているが、それ以外にヒト肝特異的要因が存在する可能性は十分考えられる。我々は、HCV 感受性肝がん細胞株をリプログラミング化 (初期化) することにより HCV の感染、複製許容性が消失することを見出した。この細胞を肝細胞へ分化誘導することにより HCV 複製能は回復する。現在、この細胞系を使って HCV のライフサイクルに重要な肝細胞因子を探す実験を行っている。

ウイルス生活環の各プロセスでは、蛋白輸送、糖鎖修飾、脂質代謝、品質管理等を担う宿主因子群の関与が不可欠である。HCV 蛋白とこれらの機能因子、細胞内ネットワークとの相互作用を解析していくことで、HCV 生活環の理解が進むだけでなく新たな肝炎治療薬開発のための分子標的を見出すことが期待される。また、HCV をツールとして分子輸送システム、メンブレントラフィックの分

子機構の解明等、細胞生物学的にも意義のある研究を進めていきたいと考えている。

一方、HBVについても、現行治療薬の効果が限定的であることから、ウイルスライフサイクルに関する新知見を基盤とした新たな阻害剤開発が待望されている。我々は、HBVのゲノムDNA複製、転写、転写後RNAプロセッシングの各過程について宿主—ウイルス相互作用の詳細解析を進めている。

マラリアは今なお人類にとって最も重要な健康問題の一つである。アフリカ諸国では脳性マラリア罹患小児の十数%が死亡することが知られ、我が国においてもいまだに死亡例が報告されている。重症化を防ぐためには早期診断、早期治療が大切でありそのための病態発症機序解明が重要である。本研究グループは、マウスモデル解析にイメージング技術を取り入れたユニークなアプローチで脳性マラリアの発症機序の解析を進めている。