

# 感染症学（ウイルス学・寄生虫学分野）

## 1 構 成 員

	平成 27 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）	0 人	
医員	0 人	
研修医	0 人	
特任研究員	2 人	
大学院学生（うち他講座から）	5 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）	2 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～現職)
伊藤 昌彦（助教）	(H22.7.1～現職)

## 3 研究業績

数字は小数 2 位まで。

	平成 26 年度	
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	8 編	(0 編)
そのインパクトファクターの合計	29.36	
(2) 論文形式のプロシーディングズ及びレター	0 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）	1 編	(1 編)
そのインパクトファクターの合計	0.00	
(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)

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, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- $\alpha$  in Infectious Virus Production. J Virol. 88: 7541-7555 (2014). [4.65]
2. Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. J Virol Methods 207: 38-44 (2014). [1.88]
3. Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. J Gen Virol 95: 2658-2667 (2014). [3.53]
4. Lee J, Ahmed SR, Oh S, Kim J, Suzuki T, Parmar K, Park SS, Lee J, Park EY. A plasmon-assisted fluoro-immunoassay using gold nanoparticle-decorated carbon nanotubes for monitoring the influenza virus. Biosens Bioelectron. 64: 311-317 (2014). [6.45]
5. Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting cellular squalene synthase, an enzyme essential for cholesterol biosynthesis, is a potential antiviral strategy against hepatitis C virus. J Virol. 89: 2220-2232 (2015). [4.65]
6. Shirasago Y, Sekizuka T, Saito K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuroda M, Abe R, Fukasawa M. Isolation and Characterization of A Huh.7.5.1-Derived Cell Clone Highly Permissive to Hepatitis C Virus. Jpn J Infect Dis. 68: 81-88 (2015). [1.20]
7. Li TC, Iwasaki K, Katano H, Kataoka M, Nagata N, Kobayashi K, Mizutani T, Takeda N, Wakita T, Suzuki T. Characterization of self-assembled virus-like particles of Merkel cell polyomavirus. PLOS ONE. 10: e0115646 (2015). [3.53]
8. Fukumoto H, Li TC, Kataoka M, Hasegawa H, Wakita T, Saeki H, Suzuki T, Katano H. Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in Japan. J Clin Virol. 65: 76-82 (2015). [3.47]  
インパクトファクターの小計 [29.36]

(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

中島謙治、鈴木哲朗. 「進歩する C 型肝炎治療」 感染 免疫 炎症. 44 巻, pp 81-82 (2015)

4 特許等の出願状況

	平成 26 年度
特許取得数 (出願中含む)	1 件

1. 特許番号：特許第 5673894 号

発明の名称：糖鎖固定化親水性樹脂化合物、ウイルス除去用高分子基材、及び生体適合性材料

発明人：鈴木哲朗 他.

出願人：浜松医科大学、DIC

登録日：2015 年 1 月 9 日

国際出願移行（米国）

出願番号：14/415,379

移行手続日：2015 年 1 月 16 日

## 5 医学研究費取得状況

	平成 26 年度	
(1) 文部科学省科学研究費	6 件	(670 万円)
(2) 厚生労働科学研究費	6 件	(3,250 万円)
(3) 他政府機関による研究助成	0 件	( 万円)
(4) 財団助成金	0 件	( 万円)
(5) 受託研究または共同研究	1 件	(227 万円)
(6) 奨学寄附金その他（民間より）	2 件	(3.6 万 USD) (225 万円)

(1) 文部科学省科学研究費

- 鈴木哲朗（代表者）基盤研究（B）「C 型肝炎ウイルス粒子形成過程におけるゲノムパッケージングの分子機構」 260 万円（継続）
- 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」 140 万円（新規）
- 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」 160 万円（新規）
- 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」 50 万円（継続）
- 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」 30 万円（継続）
- 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（新規）

(2) 厚生労働科学研究費

- 鈴木哲朗（代表者）肝炎等克服緊急対策研究事業「C 型肝炎ウイルスの増殖制御機構解明と創薬のための分子基盤」 800 万円（継続）
- 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」 180 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 「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」 200万円（継続）
4. 鈴木哲朗（分担者）肝炎等克服緊急対策研究事業 「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（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」 1000万円（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」 650万円（継続）

(5) 受託研究または共同研究

1. 伊藤昌彦 家畜改良事業団「種雄牛側からの生産率向上技術開発事業、エリート精子の生化学的な特性解明」 227万円

(6) 奨学寄附金その他

1. 鈴木哲朗 Bristol-Myers-Squibb Investigator Sponsored Research 「Quantitative analysis of components of HCV replication complex: impact of antivirals」 36000 USD
2. 鈴木哲朗 感染症学研究助成, 225万円（ブリストルマイヤーズスクイブ社）

## 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	2件	1件
(3) 学会座長回数	0件	1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	6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 「Post-transcriptional Regulation of HBV Gene Expression」: 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop (2014年4月, 台北、台湾)
2. 鈴木哲朗 「Post-transcriptional Regulation of HBV Gene Expression」: The 2014 Italy-Japan Liver Workshop “Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links” (2014年11月, 広島)

5) 一般発表

口頭発表

1. 鈴木哲朗 「Selective Recognition of Gangliosides by Human Polyomaviruses: Role of GD3 and GM3 in Merkel Cell Polyomavirus Infection」: 7<sup>th</sup> International Conference HPV, Polyomavirus, UV in Skin Cancer (2014年4月, ノバーラ, イタリア)

## ポスター発表

1. Masahiko Ito, Takasuke Fukuhara, Ryosuke Suzuki, Yoshiharu Matsuura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki, Use of HuH7-derived, Bidirectional Oval-like Cells to Identify Differentiation dependent Host Factors That are Involved in Regulation of HCV Lifecycle, 第 21 回 C 型肝炎及び関連ウイルスに関する国際会議(HCV2014)、2014 年 9 月、カナダ・バンフ
  2. Guoli Shi, Tomomi Ando, Ryosuke Suzuki, Masahiko Ito, Kenji Nakashima, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki, HCV 3'UTR as a Cis-acting Element Required for the Viral RNA Encapsidation, 第 21 回 C 型肝炎及び関連ウイルスに関する国際会議(HCV2014)、2014 年 9 月、カナダ・バンフ
  3. Takahiro Masaki, Satoko Matsunaga, Hirotaka Takahashi, Kenji Nakashima, Yayoi Kimura, Masahiko Ito, Mami Matsuda, Asako Murayama, Takanobu Kato, Hisashi Hirano, Yaeta Endo, Stanley Lemon, Takaji Wakita, Tatsuya Sawasaki, Tetsuro Suzuki, Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- $\alpha$  in Infectious Virus Production, 第 21 回 C 型肝炎及び関連ウイルスに関する国際会議(HCV2014)、2014 年 9 月、カナダ・バンフ
  4. Tetsuro Suzuki, Kenji Nakashima, Masahiko Ito, Involvement of RNA-binding proteins HNRNPD and HNRNPU in degradation and splicing of HBV pregenome, 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 2014 年 9 月、アメリカ合衆国・ロサンゼルス
  5. Masahiko Ito, Yuan Li, Suofeng Sun, Tetsuro Suzuki, Identification of novel factors that are implicated in transcriptional regulation of Hepatitis B virus pregenome, 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 2014 年 9 月、アメリカ合衆国・ロサンゼルス
- (2) 国内学会の開催・参加
- 1) 主催した学会名  
石井 明、記野秀人：第 19 回静岡県寄生虫症研究会研究総会、2014 年 9 月、浜松市
  - 3) シンポジウム発表  
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」：第 87 回日本生化学会大会（2014 年 11 月、京都市）
  - 4) 座長をした学会名  
鈴木哲朗 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 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 評議員（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）	11 件	0 件

(1) 国内の英文雑誌の編集：

鈴木哲朗 Microbiology and Immunology、Associated editor、11 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 Proc Natl Acad Sci USA (1 回)、PLOS Pathog (3 回)、FASEB J (1 回)、Virology (1 回)、World J Gastroenterol (1 回)

石井 明 Acta Tropica (2 回)、Malaria Journal (1 回)

伊藤昌彦 immunology and cell biology (1 回)、molecular human reproduction (1 回)

## 9 共同研究の実施状況

	平成 26 年度
(1) 国際共同研究	1 件
(2) 国内共同研究	26 件
(3) 学内共同研究	7 件

(1) 国際共同研究

*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、慶應義塾大学理工学部、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、名古屋医療センター

ポリオーマウイルスの増殖機構：

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

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  
 山本清二（メディカルフォトンクス研究センター）、永田 年（基礎看護学）、加藤秀樹（動物実験施設）：脳性マラリア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 撮像および定量解析の試み

## 10 産学共同研究

	平成 26 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：

近年、HCV の生活環の分子機構が明らかになりつつあるが、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。本研究では、1) deep sequencing 解析より、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。

HCV 粒子形成に重要な NS5A リン酸化機構の解明：

HCV の粒子形成には、NS5A タンパク質のリン酸化が重要であることが知られているが、それを担うプロテインキナーゼは明らかにされていなかった。我々は HCV 産生に寄与する NS5A リン酸化キナーゼの同定を試みた。in vitro 合成した 410 種類のヒトプロテインキナーゼのうち 38 種類で AlphaScreen 法により NS5A 蛋白との強固な相互作用が認められた。その中で、7 種類のキナーゼが in vitro で NS5A リン酸化活性を有していた。これらをそれぞれノックダウンした HuH-7 細胞で HCV 産生を調べた所、CK1alpha, CK1e, CK2alpha2, PLK1 でノックダウンによる有意な HCV 産生低下を示した。CK1alpha の影響が最も大きくノックダウンによって 40 分の 1 以下まで HCV 産生は低下した。更に解析を進めた結果、CK1alpha は高リン酸化型 NS5A の産生に働き、細胞内において粒子形成の場への NS5A のリクルートに寄与することが明らかとなった。(史 国利、中島謙治、伊藤昌彦、鈴木哲朗 他)

### 2. オーバル細胞様細胞株 Hdo による HCV 生活環の調節に関わる分化関連宿主因子の同定

最近、ES 細胞や iPS 細胞から分化誘導により得られた肝様細胞が HCV 感受性を獲得することが示されているが、肝分化におけるどの過程が HCV の生活環を支持するために重要であるかは未だ明らかになっていない。本研究では、HCV 感受性細胞である肝細胞癌株 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。この Hdo 細胞は肝実質細胞への

分化誘導により、成熟肝細胞マーカーであるアルブミンの発現亢進、肝芽細胞マーカー $\alpha$ フェトプロテインの発現減少がみられた。一方、胆管上皮細胞への誘導により、胆管上皮マーカーEpCAM, CK19の発現が亢進し、極性を持つ胆管様構造が形成された。

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。一方、cDNA マイクロアレイおよび定量的 RT-PCR の結果から、miR122, cyclophilins, VAP-A/B and PI4KIII $\alpha$  などの HCV 複製に関与する既知の宿主因子の発現は HuH-7 と比べ差異は認められなかった。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。また、Hdo 細胞は、HCVcc および HCVpv に対する感染感受性が欠損していた。HCV 受容体関連因子のうち CD81 の発現低下が顕著であり、同強制発現により HCVpv の感染性は有意に回復した。また、Occludin mRNA の発現量には有意差はみられないが、タンパク分子量が 46 kDa と HuH7 の典型的な 59 kDa と比べて小さいことが明らかになった。本研究により、ヒト肝癌細胞をエピジェネティックにリプログラムすることで HCV 感受性が変化する示唆が示された。樹立した Hdo 細胞はリプログラミング、肝細胞誘導により発現が変動するウイルス感染・複製に重要な宿主因子を同定するための強力なツールとなる。(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

HCV 感染症における肝線維化誘導には TGF- $\beta$  の活性化が考えられるがその分子機構は十分明らかにされていない。本研究では、HCV 感染に伴う線維化関連分子の発現変動解析、また HCV 感染肝細胞と肝星細胞株の共培養系解析などを通じて HCV 感染からの肝線維化誘導の機構解明を目指している。これまでに以下の成績を得た。1) ヒト肝癌細胞株 HuH7 への HCV 感染または HCV Core-E1-E2-p7-NS2 発現により TGF- $\beta$ 2 プロモーター活性が亢進し、同 mRNA、蛋白発現が誘導された。2) TGF- $\beta$ 2 プロモーター領域の配列解析から同領域に肝特異的転写因子 CREBH の応答配列が存在することを見出し、実際の結合をゲルシフトアッセイで示した。3) 種々のプロモーター変異体の解析から、TGF- $\beta$ 2 プロモーター活性に CREBH 応答配列が重要であることを見出した。同活性は CREBH のノックダウンまたノックアウト細胞で減弱し、活性型 CREBH (CREBH-N)の強制発現で上昇した。4) HCV Core~NS2 発現によって CREBH のプロセッシング、活性化が進むことを見出し、このとき TGF- $\beta$ 2 プロモーター配列への CREBH 及び ATF2 の結合が亢進することをクロマチン免疫沈降法で示した。5) HCV 感染 HuH7 細胞単独、TWNT4 細胞単独に比べ、両細胞の共培養系で顕著な COL1A1 発現亢進を認めた。HCV 感染による COL1A1 発現誘導は HuH7 の TGF- $\beta$ 2 ノックアウトにより減弱した。

肝臓特異的に発現する転写因子 CREBH は小胞体ストレスに反応して前駆体が切断され活性型の CREBH-N となり標的遺伝子の発現調節に働くことが知られている。本研究の成績から、HCV 感染細胞では、HCV タンパク質による小胞体ストレス惹起によって CREBH が活性化され TGF- $\beta$ 2 発現が誘導されることが示唆され、この TGF- $\beta$ 2 が肝星細胞に作用して COL1A1 発現亢進など、線維化誘導へ繋がる可能性が考えられた。(千田剛士、伊藤昌彦、鈴木哲朗 他)

### 4. HCV 感染と肝臓脂質代謝



HCV 感染は肝硬変、肝細胞癌だけでなく、脂質や糖などの代謝異常をひき起こすことが知られている。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。また、このような代謝異常が慢性肝炎の進行に影響すること、HCV 感染肝においては、脂肪肝の共存により肝線維化の進行や肝細胞癌の合併が増強されることも示されている。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 感染に伴う脂質代謝異常の実態を明らかにするため、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 HCV 感染肝臓に特徴的な脂質発現変動を見出した。また、培養細胞系において HCV 感染により変動する脂質代謝遺伝子群をマイクロアレイ、定量的リアルタイム PCR 法により解析し、ある PLA2 が顕著に発現亢進すること、この遺伝子プロモーターの活性制御機構を明らかにした。(伊藤昌彦、鈴木哲朗 他)

#### 5. B 型肝炎ウイルス (HBV) 遺伝子発現における転写後調節機構

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。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 RNA が HBV 複製を正に制御する可能性が示されている。一方、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。すなわちスプライシングを含めた転写後調節は HBV の生活環で重大な意味を持つと考えられるが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、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。これまでに以下の成績を得た。1) PRE に結合し HBV 複製に影響を与える因子として hnRNP D (AUF1)および hnRNP U (SAF-A)を同定した。2) AUF1 あるいは SAF-A を HBV 複製細胞で過剰発現させることにより pgRNA の分解が促進し、HBV 産生は低下した。複製能欠損ゲノム (YMHD) の場合も同様に pgRNA レベルの低下を認めたが、さらに PRE を欠損させる (YMHD, delPRE)と AUF1、SAF-A による pgRNA 低下はキャンセルされた。3) 変異体解析から、AUF1、SAF-A による pgRNA 分解促進作用には両タンパク質の RNA 結合領域が重要であることが示された。4) HBV スプライシングに対しては、AUF1 は抑制的に、SAF-A は促進的に働いた。この効果は PRE 欠損ゲノム (前述; YMHD, delPRE) を用いた場合でも維持されていた。5) AUF1、SAF-A の部分欠損変異体解析から、両タンパク質において pgRNA 分解促進に重要な領域とスプライシング制御関連領域は一部異なることが示された。

AUF1 及び SAF-A は HBV PRE に結合し pgRNA の分解促進に働くと考えられた。また両者は、PRE 結合非依存的に pgRNA スプライシングの正または負の制御に関与していることが示唆された。(中島謙治、千田剛士、伊藤昌彦、鈴木哲朗 他)

#### 6. HBV の遺伝子発現制御機構

HBV Enhancer II/Basal core promoter(Enh II/BCP)領域は、プレゲノム RNA、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。しかしながら、HBV 遺伝子発現制御、病態発現に重要な宿主因子との相互作用は十分に

理解されていない。質量分析によって、HBV Enh II/BCP 領域に結合する因子群を同定し、さらに siRNA によるノックダウン解析から、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。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 遺伝子型 A 及び B のプレゲノムプロモーター活性は 2～3 倍まで上昇した。このとき、HBc 抗原の発現が実際に亢進することも確認した。HBV 遺伝子発現における LUC7L4 の制御機構を明らかにしたい。(李 媛、孫 鎖鋒、中島謙治、伊藤昌彦、鈴木哲朗 他)

## 7. 高感度ウイルス検出技術の開発

多くのウイルス感染症について、ウイルス抗原を検査する診断法が開発され実用化されているが、より高感度かつ迅速な診断技術の開発が求められている場合も少なくない。例えば、インフルエンザの診断ではイムノクロマト法による検査キットが開発され広く使われているが、検出感度の低さから、感染したウイルスがある程度以上まで殖えないと陽性判定にならない。本研究では、局所表面プラズモン共鳴反応を利用して、現行より早期診断が可能な高感度ウイルス検査法の開発を行った。局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム/量子ドットを用いたインフルエンザウイルス検出系を開発し、イムノクロマト法より 100 倍程度の高感度で季節性インフルエンザウイルス株を検出していることを明らかにした。(伊藤昌彦、鈴木哲朗 他)

## 8. 広東住血線虫感染マウスの脳 MRI 撮像および定量解析の試み

広東住血線虫は本来ネズミ類 (*Rattus* 属) の寄生虫で、成虫は肺動脈管内に寄生する。本線虫に対し非好適宿主であるヒトに感染した場合、幼若成虫が脳実質や脳クモ膜下腔などに寄生し、好酸球性髄膜炎を惹起する。脳炎の病理は、本線虫感染実験動物の組織切片の観察により考察されてきている。最近典型的な臨床症状を示す患者の CT や MRI による観察がなされ、脳炎発症機序を明らかにする上で重要な放射線医学的特徴が報告され始めた。本研究では、広東住血線虫感染による脳炎発症機序の理解を深めるため、本線虫第 3 期幼虫を感染させた非好適宿主マウスの脳脊髄液の経時的変化を非侵襲的に MRI で観察した。3.0T-MRI 装置と小動物イメージング用サドルコイルを用いて冠状断面にて雌性 BALB/c マウスの脳全体を fast spin echo 法にて撮像し、T2 強調画像を得た。容積測定のための自作プラグインを MRI 画像へ関心領域を設定する機能を有する医用画像閲覧ソフトウェアに追加したソフトウェアを開発し、得られた T2 強調画像上に対して脳脊髄液と脳実質の輪郭を抽出するために閾値処理を全画像に対して行い、全脳内の脳脊髄液と脳実質容積を算出した。投与後 28 日間の脳実質容積に対する脳脊髄液の占める割合%の経時的変化は、幼虫の投与数が大きいほど増大し、21 日に最大値が得られた。このデータを基に感染マウスの行動および病理組織病変との関連性を考察することで脳炎発症機序の一部が明らかになるとと思われる。(石井 明 他)

## 9. エリート精子の生化学的な特性解明、iTRAQ によるエリート精子関連蛋白質の網羅的定量解析

本邦の畜産業において、牛凍結精液を用いた人工授精受胎率は年々低下しており、雄牛側の要因が推測されている。これまでに精液性状不良牛、低受胎牛の精子、精漿、精巣で発現する蛋白質を網羅的に検査し、BSP 量の変動することを明らかにした。また、受胎率の高い種雄牛精液には、強い推進力を有するエリート精子が存在する割合が有意に高いことが示された。そこで、受胎率の高い種雄牛

と低い種雄牛の精子、精漿に存在するタンパク質を、iTRAQ 法を用いて網羅的に定量解析することで、エリート精子に影響を与えるタンパク質構成成分の同定を試みた。その結果、エリート精子率(受胎率)に差がある凍結精子の比較から、平均で 1.2 倍以上高低差がある 52 種、1.5 倍以上高低差がある 9 種の候補タンパク質を同定した。また、受胎率に差がある種雄牛の精漿の比較から、発現量が 1.2 倍以上低下したもの 6 種、発現量が 1.2 倍以上に上昇したもの 31 種の候補タンパク質を同定した。以上の結果から今後、種雄牛凍結精液の受胎率予測および受胎率向上のための添加物などの新たな手法を開発する。(伊藤昌彦)

### 13 この期間中の特筆すべき業績, 新技術の開発

1. 粒子形成に関与する HCV 非構造 (NS) タンパク質は、変異体解析等の結果から、NS2、NS3、NS5A と考えられている。これらは従来、前駆体タンパク質のプロセッシングやゲノム複製に働くことが知られていた。これまでに我々は、NS5A が脂肪滴近傍で HCV 粒子形成の初期段階に重要な働きをすることを示してきた。今回更に研究を進め、casein kinase 1alpha によってリン酸化された NS5A が、HCV 粒子形成の初期段階に重要な働きをすることを見出した (J Virol.(2014))。複製複合体で新生されたウイルスゲノム RNA がリン酸化 NS5A に捕捉され、さらに Core とともにゲノム RNA-NS5A-Core 複合体が作られる。これにより Core、HCV RNA の細胞内局所濃度が上がり、ヌクレオキャプシド形成が進行するというモデルを提唱している。得られた知見を基盤として、NS5 のリン酸化過程を標的とした新規阻害剤の探索に道が拓かれるものと期待される。
2. 産学共同研究の成果として出願中であったウイルス除去装置に関する特許 1 件が取得に至った。外国出願 (米国) への以降手続きを行った。

### 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で全くといってよいほど明らかにされていないのは、ゲノムパッケージングの機構である。「粒子にパッケージングされる RNA (核酸) にはどの程度選択性があるのか」「パッケージングを規定する RNA 要因 (パッケージングシグナル) は存在するか」といった疑問に答えを求めめるための研究を行っている。

「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。