

10.細胞化学部

部長 花田 賢太郎

概要

細胞化学部の設置目的は、「感染症その他の特定疾病に関する細胞化学的及び細胞生物学的研究に関することをつかさどる」ことであり、細菌、ウイルス、プリオン等の病原体による感染症の発症要因を主にその宿主細胞の面から解析する方向で研究に取り組んでいる。病原体の感染において重要な役割を担っている生体膜に関連する研究には力を入れており、また、伝達性海綿状脳症(TSE)検査に関する調査・研究も行っている。生化学、細胞生物学および体細胞遺伝学という基盤は維持しながらも、進展著しいゲノム科学やゲノム編集技術を取り入れて、従来に増して所内外の共同研究を活用しつつ感染宿主細胞側の研究を推進している。本年度の研究・業務の概略を以下に記載する。

プリオン病研究においては、ヒト培養細胞を用いて一か月程度で定型 BSE (C-BSE) プリオンの感染性を検出することに予備的に成功した。従来、病原性プリオンの感染性検出には動物を用いた長期感染実験を必要としていたが、今回見出した培養細胞を用いた検出系は簡略な代替法になりえるかもしれない。また、非定型 BSE (L-BSE) プリオンを脳内接種したカニクイザルは C-BSE プリオンを脳内接種したサルよりも短い潜伏期間を経て発症することを昨年度までに報告しており、一方で、経口摂取でのリスク評価に資するデータも得べく研究を続けている。L-BSE プリオンを含むウシ脳乳剤をサルへ経口投与して約 30 ヶ月経過しているが、神経症状等は未だ呈していない。

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染に必須な細胞受容体の一つであるヒト Claudin-1 の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体を作製し、本抗体はタイトジャンクションへの Claudin-1 の分布や機能には影響を与えずに HCV の細胞感染阻止をすることを明らかにした。また、コーヒー由来の有機酸の幾つかは、培養細胞系における HCV 感染初期過程を阻害することを見出した。さまざまな病原体感染と関連の深い宿主細胞膜脂質であるスフィンゴ脂質の研究についても、偏性細胞寄生細菌が宿主スフィンゴ脂質輸送系をハイジャックするメカニズムの観点

からの新たな進展があった。

当部では、哺乳動物培養細胞を用いた研究に遺伝学的手法を積極的に取り入れている。本年度は昨年度に引き続いて、人工ヌクレアーゼを利用したゲノム編集技術の導入と改良に取り組み、複数のヒト培養細胞で目的遺伝子を破壊した変異細胞株を作製することに成功した。また、病原体の感受性に関わる宿主遺伝子を広範囲に見出す実験系の開発の一環として、志賀毒素感受性に関わる遺伝子群をレンチウイルスベクター-shRNA ライブラリーを利用した探索によって効率的に同定しつつある。一方で、ヒトパピローマウイルス粒子産生に関わる宿主因子の同定を目的とした探索細胞も構築した。

ワクチンなどの生物医薬の生産に利用されている培養細胞のゲノム配列を決定することには数多くの意義がある。例えば、細胞の効率的な品質管理手法を開発したい場合や、ゲノム編集技術を駆使して細胞を改良したい場合などで、当該細胞のゲノム情報は今やなくてはならない基盤的情報になろうとしている。このような背景から、当部では病原体検出やワクチン生産に汎用されている Vero 細胞のゲノム配列を決定する研究も新規に開始し、いくつか重要な進展をみた。

TSE 行政検査の全国的な精度管理を行うために、試験標準品の調製と配送および試験結果の取りまとめと解析を行い、厚労本省へ報告した。平成 25 年度から、生物学的製剤の承認前検査において国家検定項目にはない物理化学的な内容の試験を担当することになった。世界保健機構 (WHO) を通じたワクチンの国際的な品質規制支援活動も行った。

業績 調査・研究

I. プリオン病に関する研究

(1) ヒト培養細胞を用いた感染性プリオンの検出
現在でも病原性プリオンの感染性検出には動物を用いた長期感染実験を必要としており、培養細胞を用いた代替検出系の開発が望まれている。当部では、ヒト由来の株化培養細胞を用いて効率良く BSE プリオンを増殖・検出

する系の開発を目指し、これまでに複数の有望な細胞株を選択した。これらの細胞は従来型ウシ海綿状脳症（C-BSE）プリオンを含有する脳ホモジネートとインキュベーションした後、数回の細胞継代を経ても異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）が検出された。しかし、この検出された PrP^{Sc} が系に最初に添加したプリオンの単なる残存物である可能性を除外できないという課題が残っていた。そこで、C-BSE 由来プリオンに晒した後に数代継代したヒト培養細胞（ドナー細胞）にネオマイシン耐性遺伝子を導入した未感染の薬剤耐性ヒト培養細胞（レシピエント細胞）を後から混ぜて共培養を行い、ネオマイシン添加によりドナー細胞を除去してからレシピエント細胞における PrP^{Sc} の存在の有無を調べたところ、PrP^{Sc} が検出された。これらの結果は、ドナー細胞からレシピエント細胞に移った C-BSE 由来プリオンが増殖していることを示唆している。本系での長期持続感染には未だ成功していないが、引き続き検討中である。[中村優子、萩原健一、花田賢太郎]

(2) カニクイザルへ伝播後の L-BSE プリオンに関する研究

カニクイザル（霊長類モデル）への脳内接種実験において、ウシ L-BSE プリオンが霊長類へ伝播可能であることが示されたが、異種動物間の伝播によってプリオンの性状・病原性が変化するか否かという点が未知の課題として残った。今回、L-BSE プリオンを伝播させたカニクイザルの脳ホモジネートを近交系マウスへ接種し、サルへの伝播前後において L-BSE プリオンの特性変化の有無を解析した。マウスへの病原性を指標とする経過観察と生化学・病理分析の結果、霊長類モデルへの伝播前後で L-BSE プリオンの特性は変化しないと判断された。[萩原健一；佐藤由子（感染病理部）；小野文子（予防衛生協会、千葉科学大学）；柴田宏昭（医薬基盤研）]

(3) L-BSE プリオンのヒトへの経口感染のリスク評価等を目的とした研究

先の研究において、L-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザルは C-BSE プリオンを脳内接種したサルよりも短い潜伏期間を経て発症した。一方、ヒトが経口的に L-BSE プリオンを摂取した場合の感染リスクや感染が起こる場合のプリオンの体内分布、病理・生化学的特徴等については未解明である。これらの点を調べることを目的として、L-BSE プリオンを含むウシ脳乳剤をカニクイザル（2頭）へ経口投与した。約 30 ヶ月経過し、神経症状等は未だ呈していない（H26 年 3 月時点）。[萩原健一；柴田宏昭（医薬基盤研）；大藤圭子（予防衛生協会）、小

野文子（予防衛生協会、千葉科学大学）]

II. 肝炎ウイルスに関する研究

(1) 抗ヒト Claudin-1 モノクローナル抗体による C 型肝炎ウイルス感染阻害

昨年度 4 種のマウス抗ヒト Claudin-1 モノクローナル抗体を樹立した。Huh7.5.1 細胞への C 型肝炎ウイルス（HCV）感染系において、これら 4 種の抗体が感染阻止能を示す事が明らかとなった。また一方で、タイトジャンクションへの Claudin-1 の分布や機能には、本抗体が影響を与えないこともわかった。これらの結果から、Claudin-1 を標的とした抗 HCV 戦略の可能性が示された。[深澤征義、花田賢太郎；近藤昌夫、八木清仁（阪大）]

(2) C 型肝炎ウイルス持続感染肝細胞株における脂肪滴・中性脂質の蓄積

C 型肝炎ウイルス（HCV）と脂質代謝は密接に関連していることが知られている。構造タンパク質領域を 1b の遺伝子型に置換した HCV-JFH1 キメラ株を Huh7.5 細胞に感染させて樹立した持続感染株の解析を行った。本持続感染細胞株は、細胞内に脂肪滴の蓄積が見られること、中性脂質（トリグリセリド、コレステリルエステル、コレステロール）の含量が有意に上昇していることが明らかとなった。[深澤征義、齊藤恭子；杉山和夫（慶應義塾大）]

(3) B 型肝炎ウイルス産生における脂質代謝変動の解析

B 型肝炎ウイルス（HBV）ゲノムを導入した細胞における脂質代謝変動の検討を行った結果、1) リン脂質合成・脂肪酸代謝回転の亢進、2) コレステロール生合成の亢進、3) オレイン酸の中性脂質への取り込み亢進、4) アラキドン酸の中性脂質への取り込み低下、を見出した。[深澤征義、花田賢太郎；渡士幸一、脇田隆字（ウイルス 2 部）；田中靖人（名市大）]

(4) コーヒー含有有機酸の HCV 粒子産生抑制効果

コーヒー抽出水溶性成分中の有機酸に注目して HCV 粒子産生に影響を与えるかどうかを培養細胞への HCV 感染実験系をもちいて検討した。その結果、幾つかの有機酸が HCV 粒子産生に対して抑制的に働くことがわかった。HCV pseudo particles を用いた培養細胞への感染実験から、これら有機酸は HCV の細胞内侵入から HCV ポリプロテイン翻訳に関わる初期過程を阻害していることが示唆された。[谷田以誠、白砂圭崇、深澤征義、花田賢太郎；鈴木亮介、脇田隆字（ウイルス 2 部）]

(5) HCV 感染における Vimentin の細胞内分布変化

Vimentin は HCV core と相互作用するタンパク質である。そこで、HCV 感染時の Vimentin の細胞内分布について解析を行った。非感染 Huh7.5.1-8 細胞では、Vimentin は細胞周辺部に太いバンドルがみられ、核周辺部に近づくにつれ、細い網目状の走行が認められた。HCV core が細胞内に点在している HCV core 陽性細胞では、Vimentin が形成する Cage-like な構造の中に HCV core が点在していた。HCV core が細胞質内に増加した細胞では、線維状の Vimentin がかなり減少していた。HCV core が細胞質全体に分布している細胞では Vimentin はほとんど細胞内に認められなかった。[谷田以誠、深澤征義、花田賢太郎；脇田隆字（ウイルス 2 部）]

(6) NS4B 蛋白質の細胞内分布の解析

HCV の RNA 複製に関与する生体膜の生化学的特徴を明らかにするため、RNA 複製複合体形成の足場となる HCV の NS4B 蛋白質の細胞内分布を解析した。NS4B 蛋白質を恒常的に発現するヒト培養肝細胞を分画したところ、同蛋白質はミトコンドリア画分に濃縮された。別の手法によっても同様の細胞内分布を示すかどうか、確認を行っている。[齊藤恭子、深澤征義、花田賢太郎]

(7) スクアレン合成酵素阻害剤の抗 HCV 機序の解析

我々はこれまでに、スクアレン合成酵素阻害剤が HCV 産生を阻害することを見出している。同薬剤が HCV RNA や非構造蛋白質の安定性に影響を及ぼす可能性を調べるため、RNA 複製能欠変異を有する HCV サブゲノミックレプリコン RNA を細胞に導入し、同薬剤存在及び非存在下で、レプリコン上の *luc* 遺伝子から発現するルシフェラーゼの活性と非構造蛋白質の量的変化を調べた。その結果、両条件下での量的変化に大きな差はなかった。従って、スクアレン合成酵素阻害剤の抗 HCV 機序は、HCV RNA や非構造蛋白質の安定性低下ではないと結論した。[齊藤恭子、深澤征義、花田賢太郎]

III. 感染症に関わる宿主細胞因子の遺伝学的研究

(1) レンチウイルス shRNA ライブラリーによる志賀毒素関連因子の探索

志賀毒素はスフィンゴ糖脂質 Gb3 を受容体として細胞内に侵入し、最終的に細胞死を引き起こす。前年度はレンチウイルス shRNA ライブラリーを用いたゲノムワイドスクリーニングにより、発現抑制で志賀毒素に耐性を示す遺伝子候補を絞ることが出来た。本年度はそのうち 60 種類以上の shRNA をそれぞれ発現させた細胞株を樹立し、志賀毒素に対して耐性を示すか検討した。その結果、多くの shRNA において耐性の再現性が得られた。た

だしオフターゲット効果によるものが多く存在すると考えられ、現在その中からオンターゲット遺伝子があるか検討している。[山地俊之、堀江亜矢、花田賢太郎；関塚剛史、竹内史比古、黒田誠（病原体ゲノム解析センター）]

(2) TALEN による遺伝子ノックアウト細胞株の構築

糖脂質輸送タンパク FAPP2 及び上記の志賀毒素耐性遺伝子候補のうち 2 種類の遺伝子において、ゲノム編集法の 1 種 TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) 法による、遺伝子破壊 HeLa 細胞株の樹立に成功した。現在、志賀毒素に対する耐性、及び志賀毒素受容体であるスフィンゴ糖脂質代謝への影響について検討している。[山地俊之、花田賢太郎]

(3) HPV16 ウイルス粒子産生に関わる宿主因子の探索

HPV16 ウイルス構造タンパク質 L1、L2 の mRNA 産生を制御する P670 プロモーターの下流に薬剤耐性遺伝子を組み込んだレポータープラスミドを作製した。またヒトケラチノサイト cDNA 発現プラスミドライブラリーを構築した。これらのレポーター・ライブラリーを用いた P670 プロモーター活性化に関わる宿主細胞因子のスクリーニングに向けた条件検討を行い、最適な薬剤濃度・添加時期などを決定した。さらにスクリーニングに利用する細胞の一つとして HPV16 エピソームを安定に保持した U2OS 細胞を樹立した。[前濱朝彦、花田賢太郎；終元巖（病原体ゲノム解析研究センター）]

(4) CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術の導入

ゲノム編集技術として、CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)と Cas9 エンドヌクレアーゼ(CRISPR associated endonuclease)を用いた技術を導入した。TALENs 法に比べて、遺伝子破壊用のプラスミドの作製が容易であることが大きな利点である。さらに、CRISPR/Cas9 技術をもとに目的遺伝子に対して double guide DNAs を用いて、遺伝子内 2 箇所の DNA 切断を同時に行なうことでより容易に遺伝子破壊細胞株の検出が可能になることを示した。[谷田以誠、山地俊之、深澤征義、花田賢太郎]

IV. スフィンゴ脂質に関する研究

(1) CERT と VAP の相互作用の制御に関する研究

セラミド輸送タンパク質 CERT はセラミドを小胞体からゴルジ体へと輸送するタンパク質である。CERT は小胞体膜タンパク質である VAP と結合し、この相互作用によって小胞体膜中に存在するセラミドの認識効率を上げていると考えられている。本年度は CERT と VAP の相互作用に関する研究成果をまとめ、論文として発表した。

CERT の 315 番目のセリン残基がリン酸化されることにより CERT-VAP 間の結合が強化されること、そのリン酸化によってスフィンゴミエリン生合成が促進されること、リン酸化は細胞膜上のスフィンゴミエリンが分解される等の刺激に応じて亢進すること、などの知見を記述した。

[熊谷圭悟、花田賢太郎]

(2) CERT と IncD の相互作用に関する研究

偏性細胞内寄生細菌 *Chlamydia trachomatis* が宿主細胞内で増殖する際に、宿主細胞由来の CERT と *C. trachomatis* 由来の IncD タンパク質の相互作用が重要な役割を担っていることが知られている。本年度は CERT および IncD に様々な変異を導入したコンストラクトを作製し、これらを用いて免疫沈降実験を行った。CERT と IncD の相互作用に関する、より詳細な情報が得られた。

[熊谷圭悟、花田賢太郎；安藤秀二（ウイルス 1 部）]

(3) スフィンゴミエリンと CERT との共進化

スフィンゴミエリンの構造や代謝酵素および CERT が生物進化上に出現した時期を文献調査や遺伝子系統樹解析によって考察してスフィンゴミエリンと CERT との共進化を提唱した。また、コリン含有脂質の生物進化上の意義を compatible solutes/osmo-protectants との化学的類似性から考察した。[花田賢太郎]

V. オートファジーに関わる研究

(1) 類鼻疽菌の好中球感染におけるオートファジーの関与

類鼻疽(Melioidosis)は類鼻疽菌(*Burkholderia pseudomallei*)の感染によって引き起こされる人獣共通感染症で、ヒト用のワクチンは無い。我々は類鼻疽菌の好中球感染におけるオートファジーの関与について解析を行なった。類鼻疽菌感染好中球においてオートファジーが細菌排除機構の一翼を担っていることをみいだした。この時、類鼻疽菌を取り囲むファゴソーム周辺に隔離膜やオートファゴソームが多く誘導され、その一部が融合した極めてユニークな形態をとっていることがわかった。この形態は類鼻疽菌の III 型分泌装置依存的におこっていた。[谷田以誠；小川道永（細菌第 1 部）；阿戸 学（免疫部）；Darawan Rinchai、Ganjana Lertmemongkolchai（タイ、コーンケン大）]

(2) 神経細胞の軸索起始部における GABARAP の局在

GABARAP は LC3 のホモログとしてオートファジーに関与すると考えられているが、GABARAP 特有の機能についてはあまりわかっていない。GABARAP は、ユビキチン様反応を介した脂質化によって、膜画分に局在す

ると考えられていたが、マウス脳より単離したシナプトソームを多く含む画分においては、GABARAP が脂質化を受けない形で膜に局在していた。GFP-GABARAP トランスジェニックマウスをもちいて GABARAP の神経細胞内局在を調べると、軸索起始部において GABARAP が特異的に局在していた。[谷田以誠；小池正人、七尾友久、多田昇弘、上野隆、木南英紀、内山安男（順天堂大）]

VI. 細胞外環境変化を感知し応答する細胞内情報伝達システムの研究

(1) がん制御因子 PICT1 による核小体ストレス感知機構の解明

PICT1 の C 末端領域付近に存在する約 20 アミノ酸残基からなる天然変性領域を除去することで PICT1 タンパク質が安定化することを見いだした。この天然変性領域を除去したリコンビナント PICT1 タンパク質を用いた性状解析により PICT1 の酵素活性を新たに見いだした。[前濱朝彦、花田賢太郎；鈴木聡（九州大）]

VII. ゲノミクスを基盤にした Vero 細胞の研究

(1) 全ゲノム配列決定に用いる Vero 細胞シード

培養細胞のゲノム配列情報は、細胞株改良や新しい細胞品質管理手法を開発する場合などに不可欠の基盤情報となりつつある。Vero 細胞は、1962 年にアフリカミドリザル (AGM) 腎臓から我国で樹立された継代培養可能な細胞株であり、多くの種類のウイルスや細胞毒素に高い感受性を持つことから、病原体検出やワクチン生産に汎用されてきた。Vero 細胞の全ゲノム配列を決定するに当たり、現在入手可能な Vero 細胞の中で最も継代数の少ないと思われる医薬基盤研の凍結保存ロット JCRB0111 (継代数：115) をシードに選択した。[花田賢太郎；小原有弘（医薬基盤研）]

(2) Vero 細胞の核型解析

Vero JCRB0111 細胞の核型解析をギムザ染色法および多重色蛍光標識法である multi-color fluorescence in situ hybridization で行った。正常 AGM 細胞の核型が $30 \times 2 = 60$ 本であるのに対して Vero 細胞の核型は個々の細胞で見ると 59 本が主体であった。しかし、1 本に見える 24 番染色体の残りの一本は他の染色体に転座しており、ゲノム全体としては二倍体もしくは疑似二倍体であった。[花田賢太郎；小原有弘、平山知子、笠井文生（医薬基盤研）]

(3) Vero 細胞ゲノム配列の解析

本プロジェクト開始時点では正常 AGM の配列も未決定であったので、Vero 細胞全ゲノム配列を新規アセンブ

リ de novo assembly で決定することにした。エンドペアおよびメイトペアライブラリー由来のショートリードをイルミナ HiSeq2000 によってシーケンシングし、SGAやSSPACEプログラムを活用してアセンブリを行った。この際、RNA-seq も並行して行い、その結果をタンパク質コード領域の推測に役立てた。現在、Vero 細胞全ゲノムドラフト配列を得るための最終調整中である。[山地俊之、花田賢太郎；関塚剛史、黒田誠（病原体ゲノム解析センター）；長田直樹（遺伝研）；小原有弘（医薬基盤研）]

（４）I 型インターフェロン遺伝子クラスターを含むホモ接合型染色体欠失

Vero 細胞の 12 番染色体には 9 Mb に及ぶ染色体欠失とその領域をまたがる約 59 Mb のヘテロ接合体消失 (loss of heterogeneity; LOH) が認められた。本欠失領域の存在はゲノミック PCR と当該 PCR 産物のサンガー法シーケンスで確認した。これらの結果は、12 番染色体の相同染色体の一方で 9 Mb の欠失が起こったのちに相同染色体間での大規模な変換 conversion が起こり、ホモ接合型の欠失が確立されたことを示唆している。この欠失により、Vero 細胞では I 型インターフェロン遺伝子クラスターが安定に失われており、これがウイルス高感受性という Vero 細胞の特性の重要な原因となっていると考えられる。[山地俊之、花田賢太郎；長田直樹（遺伝研）]

（５）内在性サル・レトロウイルスの解析

Vero 細胞ゲノムには、サル D 型レトロウイルス simian type D retrovirus (SRV) 配列が内在的に存在することが知られている。Vero JCRB0111 細胞のゲノム上にも SRV に由来した多くの配列が存在し、その配列に多様性があることが分かった。[花田賢太郎；関塚剛史、黒田誠（病原体ゲノム解析センター）；長田直樹（遺伝研）]

レファレンス業務

I. 伝達性海綿状脳症 (TSE) 検査

（１）TSE スクリーニング検査に関する外部精度管理試験の実施

TSE スクリーニング検査を実施している国内の検査機関に対して、厚生労働省・医薬食品局食品安全部監視安全課からの依頼により、健常マウスおよびスクレーパー感染マウスの脳乳剤を標準検体とした精度管理試験を実施した (H25 年 11 月～H26 年 3 月。24 機関について実施)。統計解析した試験結果を監視安全課へ報告した。なお、本事業は H24 年度から開始したが、本年度の試験は

H24 年度とは異なる検査キットを対象としたため、試験条件の検討を行い、キットに合致した新たな試験プロトコールを作成した [萩原健一、中村優子、花田賢太郎；飛梅実、長谷川秀樹（感染病理部）]

（２）TSE 行政検査 (ウエスタンブロット法による確認検査) 業務の担当

検査プロトコールの確認、感度評価用の内部標準品および抗体等の試薬の品質の適正管理、検査手技の維持を目的として、BSE 陽性ウシの標準試料を用いて検査要項の方法に即して分析を行った (H25 年 7 月に 4 回、H26 年 3 月に 2 回実施)。検査手技レベルと検査試薬等が適正に管理されていることを確認し、データを厚生労働省・医薬食品局食品安全部監視安全課へ報告した。[萩原健一、中村優子]

品質管理に関する業務

I. 生物学的製剤の承認前検査

ハイゼンドラ 20%皮下注の承認前検査では、ポリソルベート 80 含量試験と L-プロリン含量試験を担当して成績書を提出した。Hib ワクチン Vaxem の承認前検査では、分子サイズ分布試験の書類調査を実施しつつある。乾燥濃縮人血液凝固第 X 因子加活性化第 VII 因子の承認前検査では、ポリソルベート 80 含量試験、サイズ排除クロマトグラフィー試験および FVIIa/FX 含量試験を担当し、平成 26 年 4 月の締め切りに向けて進捗中である。[前濱朝彦、熊谷圭悟、谷田以誠、齊藤恭子、深澤征義、山地俊之、花田賢太郎]

I I. 検定検査業務における内部監査の強化と効率化

検定検査業務に対する内部監査の強化と効率化のため、検定検査業務評価委員会は、「室長や主任研究官も監査員となる内部監査員制度」を平成 24 年度から設置した。平成 25 年度は、当委員会の活動をさらに改善するため、「検定検査業務内部監査に携わる者の教育訓練手順書」を新たに作成し、また「検定検査業務自己点検表」や「内部監査に関する各種規定書・手順書」の改訂も適宜行いながら本年度の内部監査を実施した。細胞化学部長は本委員会の委員長としてこれら業務の中心的な役割を担った。[花田賢太郎：検定検査業務評価委員会、検定検査内部監査員、検定検査品質保証室、総務部業務管理課]

国際協力関係業務

I. WHO 関連業務

生物学的製剤用細胞バンクの特性解析に関する国際情報

共有および市販ワクチンに微生物混在が疑われた際に規制当局が行うリスク評価に関する非公式な諮問 WHO implementation workshop: characterization of cell banks for the production of biologicals, and WHO informal consultation on regulatory risk assessment in the case of adventitious agent finding in a marketed vaccine (平成25年5月27～5月31日、北京市、中国) に招待参加して討議を行った。[花田賢太郎]

I I. 国際的ガイドラインの策定

WHO 文書” Regulatory Risk Evaluation on Finding an Adventitious Agent in a Marketed Vaccine, WHO/RA_DRAFT/19 September 2013”を作成した。[花田賢太郎]

研修業務

(1) 国立感染症研究所・医師卒後臨床研修プログラムの講師

‘プリオン病について’ 2013.10.21 [萩原健一]

‘試験研究機関の QMS について’ 2013.10.21 [花田賢太郎]

(2) 新規者向け検定・検査教育講習会の講師

‘公的試験機関の品質マネジメントシステムについて’ 2013.5.23 [花田賢太郎]

(3) 感染研・部長等を対象とした検定教育の講師

‘検定検査業務評価委員会の役割：試験機関の品質マネジメントシステムと内部監査’ 2013.12.13 [花田賢太郎]

その他

(1) (独) 医薬品医療機器総合機構 平成25年度 GLP 評価委員会委員および医療機器 GLP 評価委員会委員 [花田賢太郎]

(2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部 牛海綿状脳症の検査に係る専門家会議委員 [萩原健一]

(3) 機器管理運営委員会機器の管理と運用

戸山庁舎の MALDI-飛行時間型質量分析機 (AXIMA-QIT) の保守、運用を行った。今夏の節電対策要請時には、機器の稼働停止および再稼働による不測の故障を避けるために、必要とされる予防措置・点検を行った。また、消耗品の交換、機器のトラブルへの対処とともに、プロテオーム研究に必須なデータベース検索ソフトを管理した。機器およびソフトウェアは、所内研究者 (戸山・村山) が利用した。[萩原健一、桶本和男、花

田賢太郎]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Yamaji, T., Hanada, K.: Establishment of HeLa cell mutants deficient in sphingolipid-related genes using TALENs. PLoS One, 9, e88124, 2014
- 2) Kajiwar, K., Ikeda, A., Aguilera-Romero, A., Castillon, G.A., Kagiwada, S. Hanada, K., Riezman, H., Muñiz, M., Funato, K.: Osh proteins regulate COPII-mediated vesicular transport of ceramide from the endoplasmic reticulum in budding yeast. J. Cell Sci., 127, 376-387, 2014
- 3) Hanada, K.: Co-evolution of sphingomyelin and the ceramide transport protein CERT. Biochim. Biophys. Acta, in press
- 4) Nishio, M., Otsubo, K., Maehama, T., Mimori, K., Suzuki, A.: Capturing the mammalian Hippo: elucidating its role in cancer. Cancer Sci. 104, 1271-1277, 2013
- 5) Uchi, R., Kogo, R., Kawahara, K., Sudo, T., Yokobori, T., Eguchi, H., Sugimachi, K., Maehama, T., Mori, M., Suzuki, A., Komune S, Mimori K.: PICT1 regulates TP53 via RPL11 and is involved in gastric cancer progression. Br. J. Cancer 109, 2199-2206, 2013
- 6) 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. 440, 150-156, 2013
- 7) Kukimoto, I., Maehama, T., Sekizuka, T., Ogasawara, Y., Kondo, K., Kusumoto-Matsuo, R., Mori, S., Ishii, Y., Takeuchi, T., Yamaji, T., Takeuchi, F., Hanada, K., Kuroda, M.: Genetic variation of human papillomavirus type 16 in individual clinical specimens revealed by deep sequencing. PLoS One 8, e80583, 2013
- 8) Murakami, Y., Fukasawa, M., Kaneko, Y., Suzuki, T., Wakita, T., Fukazawa, H.: Retinoids and rexinoids inhibit hepatitis C virus independently of retinoid receptor signaling, Microbes and Infection. 16, 114-122, 2014
- 9) Iwamoto, M., Watashi, K., Tsukuda, S., Aly, H. H., Fukasawa, M., Fujimoto, A., Suzuki, R., Aizaki, H., Ito, T., Koiwai, O., Kusuhara, H., Wakita, T.: Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. Biochem. Biophys. Res. Commun., 443, 808-813,

2014

- 10) Sugiyama, K., Ebinuma, H., Nakamoto, N., Sakasegawa, N., Murakami, Y., Chu, P.-S., Usui, S., Ishibashi, Y., Wakayama, Y., Taniki, N., Murata, H., Saito, Y., Fukasawa, M., Saito, K., Yamagishi, Y., Wakita, T., Takaku, H., Hibi, T., Saito, H., Kanai, T.: Prominent Steatosis with Hypermetabolism of the Cell Line Permissive for Years of Infection with Hepatitis C Virus. PLoS One, in press
- 11) Tanida, I., Koike, M., Nanao, T., Tada, N., Iwata, J.I., Ueno, T., Kominami, E., Uchiyama, Y.: Enrichment of GABARAP relative to LC3 in the axonal initial segments of neurons. PLoS One, 8, e63568, 2013
- 12) Sabit, I., Hashimoto, N., Matsumoto, Y., Yamaji, T., Furukawa, K., Furukawa, K.: Binding of a Sialic Acid-recognizing Lectin Siglec-9 Modulates Adhesion Dynamics of Cancer Cells via Calpain-mediated Protein Degradation. J. Biol. Chem., 288, 35417-35427, 2013
- 13) Fukasawa, M., Cornea, A., Varlamov, O.: Selective control of SNARE recycling by Golgi retention. FEBS Lett., 587, 2377-2384, 2013
- 14) Kumagai, K., Kawano-Kawada, M., Hanada, K.: Phosphoregulation of the ceramide transport protein CERT at serine 315 in the interaction with VAMP-associated protein (VAP) for inter-organelle trafficking of ceramide in mammalian cells. J. Biol. Chem., in press
2. 和文発表
- 1) 熊谷圭悟、花田賢太郎: 効率的な細胞内セラミド輸送の仕組みとその制御、医学のあゆみ、248、1125-1131、2014
- II. 学 会 発 表
1. 国際学会
- 1) Hanada, K.: Structural biology revealed the serendipity of development of HPA-12, a potent inhibitor of intracellular trafficking of ceramide, FASEB Science Research Conference: Lysophospholipid and other Related Mediators – From Bench to Clinic, 2013.8.4-9, Niseko, Japan
- 2) Yamaji, T., Hanada, K.: TALEN-Mediated Disruption of Sphingolipid-Related Genes in a HeLa Cell Line, 54th International Conference on the Bioscience of Lipids: Linking Transcription to Physiology in Lipidomics, 2013.9.17-21, Bari, Italy
- 3) Hanada, K.: Introductory remarks for the session of Membrane Dynamics and Trafficking, Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology, 2014.1.12-17, Ventura, CA, USA
- 4) Yamaji, T., Hanada, K.: TALEN-Mediated Disruption of Several Sphingolipid-Related Genes in a HeLa cell line, Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology, 2014.1.12-17, Ventura, CA, USA
- 5) Nagase, S., Yamashita, M., Iida, M., Watari, A., Kondoh, M., Fukasawa, M., Yagi, K.: Development of claudin-1-specific ligand, Experimental Biology 2013, 2013.4.20-24, Boston, USA
- 6) Shimizu, Y., Kondoh, M., Watari, A., Fukasawa, M., Yagi, K.: A toxicological evaluation of the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin as a claudin-3/-4 binder—Effect of claudin on cytochrome P450 activity, Experimental Biology 2013, 2013.4.20-24, Boston, USA
- 7) Nagase, S., Yamashita, M., Iida, M., Watari, A., Yagi, K., Fukasawa, M., Kondoh, M.: Claudin-1-specific monoclonal antibodies and their inhibition of hepatitis C virus infection, 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2013.7.21-24, Honolulu, USA
- 8) Nagase, S., Yamashita, M., Iida, M., Shirasago, Y., Fukasawa, M., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M.: Claudin-1-Specific Monoclonal Antibodies And Their Inhibition Of Hepatitis C Virus Infection, International Liver Cancer Association Seventh Annual Conference (ILCA 2013), 2013.9.13-15, Washington, USA
- 9) Fukasawa, M., Nagase, S., Yamashita, M., Iida, M., Shirasago, Y., Watari, A., Suzuki, T., Wakita, T., Yagi, K., Kondoh, M.: Inhibition of hepatitis C virus infection by mouse anti-claudin 1 monoclonal antibodies, The 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2013.10.6-10, Melbourne, Australia
- 10) Nagase, S., Yamashita, M., Iida, M., Watari, A., Yagi, K., Fukasawa, M., Kondoh, M.: Creation of monoclonal antibodies to the extracellular loop regions of claudin-1 and their application to HCV therapy, 2013 American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition, 2013.11.10-14, San Antonio, USA
- 11) Iida, M., Li, X., Kuniyasu, H., Fukasawa, M., Tada, M.,

- Ishii, A., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M.: Development of claudin-4-specific monoclonal antibodies and their anti-tumor activities, IBC's 24th Annual Antibody Engineering & Therapeutics, 2013.12.8-12, Huntington Beach, CA, USA
- 12) Nagase, S., Yamashita, M., Iida, M., Shirasago, Y., Fukasawa, M., Tada, M., Ishii, A., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M.: Claudin-1-specific monoclonal antibodies and their inhibition of hepatitis C virus infection, IBC's 24th Annual Antibody Engineering & Therapeutics, 2013.12.8-12, Huntington Beach, USA
- 13) Tanida, I.: Autophagy and Infection, 2013 Infection & Immunity Conference: From Basic to Translational Research, 2013.9.21-23, Hua Hin, Thailand
2. 国内学会
- 1) 山地俊之、花田賢太郎：人工ヌクレアーゼを用いた種々のスフィンゴ脂質関連遺伝子の変異株作製、第55回日本脂質生化学会大会、2013.6.6-7、松島
- 2) 山地俊之、花田賢太郎：人工ヌクレアーゼを利用したゲノム編集技術によるスフィンゴ脂質関連遺伝子破壊 HeLa 細胞変異株パネル作成の試み、第8回スフィンゴテラピー研究会、2013.7.12-13、加賀
- 3) 山地俊之、花田賢太郎：人工ヌクレアーゼ TALENを用いた種々のスフィンゴ脂質関連遺伝子の変異株作製、第32回日本糖質学会大会、2013.8.5-7、大阪
- 4) 花田賢太郎：膜接触部位を介した宿主細胞セラミドのクラミジア菌寄生胞・封入体への輸送、第86回日本生化学会大会、2013.9.11-13、横浜
- 5) 山地俊之、花田賢太郎：遺伝生化学的手法を用いたスフィンゴ糖脂質研究、第86回日本生化学会大会、2013.9.11-13、横浜
- 6) Yilihamujiang, S., Hashimoto, N., Matsumoto, Y., Hashimoto, Y., Yamaji, T., Furukawa, K., Furukawa, K.: Biding of Siglec-9 to the counter-receptors on cancer cells regulates adhesion dynamics via protease-mediated degradation of focal adhesion kinase (FAK), 第86回日本生化学会大会、2013.9.11-13、横浜
- 7) 前濱朝彦、河原康一、西尾美希、鈴木聡、花田賢太郎：核小体ストレスに应答した癌制御因子 PICT1 のプロテアソーム依存性・ユビキチン非依存性分解、第86回日本生化学会大会、2013.9.11-13、横浜
- 8) 花田賢太郎：細胞内セラミド輸送をつかさどる CERT の発見、第6回セラミド研究会学術集会、2013.11.7-8、札幌
- 9) 花田賢太郎：細胞バンク管理の新技术と市販後ワクチンに微生物混在が疑われた際の対応：WHO 会議からみた世界的潮流、バイオロジクスフォーラム第11回学術集会、2014.1.24、東京
- 10) 松尾理加、森清一郎、前濱朝彦、柊元巖：ヒトパピローマウイルス 16 型 E1 タンパク質に結合する細胞チロシンキナーゼの同定、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013.11.10-12、神戸
- 11) 前濱朝彦、西尾美希、鈴木聡：核小体ストレスに应答した癌制御因子 PICT1 のプロテアソーム依存性・ユビキチン非依存性分解、第6回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2014.2.10-21、津
- 12) 長瀬翔太郎、山下真代、飯田愛未、渡利彰浩、近藤昌夫、深澤征義、多田稔、石井明子、八木清仁：上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第1報～claudin-1 特異性抗体の創製～、第29回日本 DDS 学会学術集会、2013.7.4-5、京都
- 13) 飯田愛未、長瀬翔太郎、山下真代、近藤昌夫、八木清仁、國安弘基、深澤征義：上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第2報～claudin-1 抗体の C 型肝炎治療への応用～、第29回日本 DDS 学会学術集会、2013.7.4-5、京都
- 14) 深澤征義、白砂圭崇、長瀬翔太郎、近藤昌夫、八木清仁、安部 良、花田賢太郎：Claudin 1 抗体の樹立と本抗体による C 型肝炎ウイルス感染阻害、第86回日本生化学会大会、2013.9.11-13、横浜
- 15) 白砂圭崇、鈴木哲朗、脇田隆宇、花田賢太郎、安部 良、深澤征義：C 型肝炎ウイルスへの感染感受性を欠損した宿主肝細胞変異株の分離と性状解析、第86回日本生化学会大会、2013.9.11-13、横浜
- 16) 山下真代、長瀬翔太郎、飯田愛未、深澤征義、近藤昌夫、多田稔、石井明子、渡利彰浩、八木清仁：Development of claudin-1 monoclonal antibodies and their pharmaceutical activities, 日本薬物動態学会第28回年会、2013.10.9-11、東京
- 17) 深澤征義、近藤昌夫、長瀬翔太郎、白砂圭崇、飯田愛未、山下真代、鈴木哲朗、脇田隆宇、八木清仁、安部 良、花田賢太郎：宿主 Claudin 1—ウイルス相互作用を標的とした C 型肝炎ウイルス感染阻害、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013.11.10-12、神戸
- 18) 白砂圭崇、鈴木哲朗、脇田隆宇、花田賢太郎、安部

- 良、深澤征義：Huh7.5.1 細胞由来 C 型肝炎ウイルス非感染感受性変異株の分離と性状解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013.11.10-12、神戸
- 19) 谷田以誠、深澤征義、脇田隆宇、花田賢太郎：HCV 感染における Vimentin の細胞内分布変化、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013.11.10-12、神戸
- 20) 川東祐美、李相儒、國安弘基、多田稔、石井明子、深澤征義、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁：上皮を標的とした創薬基盤研究～Claudin-4 抗体の作製および抗腫瘍活性解析～、日本薬学会第 134 年会、2014.3.27-30、熊本
- 21) 木村友香、李相儒、飯田愛未、多田稔、石井明子、國安弘基、深澤征義、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁：上皮を標的とした創薬基盤研究～Dual specific claudin-3/4 抗体の動態特性および抗癌活性解析～、日本薬学会第 134 年会、2014.3.27-30、熊本
- 22) 中嶋美咲、山下真代、渡利彰浩、深澤征義、近藤昌夫、八木清仁：上皮を標的とした創薬基盤研究～Claudin-1 を標的とした表皮バリア制御の可能性～、日本薬学会第 134 年会、2014.3.27-30、熊本
- 23) 畑智幸、長瀬翔太郎、白砂圭崇、深澤征義、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁：上皮を標的とした創薬基盤研究～抗 claudin-1 抗体のエピトープ・交叉性解析～、日本薬学会第 134 年会、2014.3.27-30、熊本
- 24) 白砂圭崇、葛西正孝、花田賢太郎、安部良、深澤征義：TRAX はユビキチン非依存的なプロテアソーム分解を受ける、日本薬学会第 134 年会、2014.3.27-30、熊本
- 25) 谷田以誠、小池正人、七尾友久、多田昇弘、上野隆、内山安男：Enrichment of GABARAP relative to LC3 in the axonal initial segments of neurons、第 86 回日本生化学会大会、2013.9.11-13、横浜
- 26) 谷田以誠、小池正人、七尾友久、多田昇弘、上野隆、内山安男：GABARAP は LC3 に比べて神経細胞の軸索起始部に多く局在する、細胞内ロジスティクス シンポジウム、2013.9.17-18、兵庫