

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研究に進展があった。また、霊長類におけるプリオン病モデルの作出とその病態解析のために、C-BSE および非定型 BSE (L-BSE) プリオンのカニクイザルへの伝播実験を医薬基盤研および感染病理部との共同研究で進め、当部は病原体の生化学・蛋白質化学の視点からの解析を主に担当している。さらに、L-BSE プリオンについての経口摂取でのリスク評価に資するデータを得るべく、ウシ脳乳剤をサルへ経口投与して経過を追跡中である。

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が、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた動物個体レベルでの HCV 感染を抑制することを明らかにした。また、HCV 研究に汎用されているヒト肝由来 Huh7.5.1 細胞に比べて HCV 感染増殖能の高い亜株 Huh7.5.1-8 細胞を分離し、その性状解析を行った。その他にも、HCV や B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染増殖に果たす宿主細胞の脂質機能に関するいくつかの研究成果を挙げた。

セラミド輸送タンパク質 CERT は、小胞体で生合成されたセラミドをスフィンゴミエリン合成の場であるゴルジ体へと運ぶ。リン酸化による CERT 機能制御の一端を明らかにするとともに、偏性細胞内寄生細菌クラミジア

が CERT をハイジャックするメカニズムの研究でも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。進展著しいゲノム編集技術を感染症研究においても使用できるように、レンチウイルスベクター上に構築した shRNA ライブラリに加えて、CRISPR/Cas9 ライブラリの導入も行った。これらの実験系が適切に働くことを、志賀毒素感受性に関わる多数の既知の宿主細胞遺伝子群を効率的にヒットできるか否か調べることで確認しつつある。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。

アフリカミドリザルの摘出腎臓から樹立された連続継代培養可能な細胞株である Vero 細胞は、多くの種類のウイルスや細菌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。細胞化学部では、多施設共同研究として Vero 細胞のゲノム配列を決定し、世界に先駆けて発表した。

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。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、Hib ワクチンの承認前検査では、分子サイズ分布試験の書類調査を担当した。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。

人事面では、谷田以誠第二室長が平成 27 年 3 月 31 日付けで辞職し、順天堂大学医学部に転出した。

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

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が必要とされているが、より簡便な代替検出系の開発が望まれる。当部では、ヒト由来の株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

を目指している。前年度までに、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に晒したヒト培養細胞（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、レシピエント細胞において PrP^{Sc} が検出されることを示した。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、一ヶ月程度で感染性の評価が可能な検出系を確立した。本年度は、これまでに得られたプリオン感受性やプリオン蛋白質の産生量に関する知見をもとに、さらなる細胞株の選択や改良を行い、プリオン感染性評価に要する期間短縮を目指した検討を行った。[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 BSE プリオンに関する研究

医薬基盤研究所と共同で進めてきた C-BSE プリオンおよび L-BSE プリオンのカニクイザルへの2代目伝播実験（脳内接種）が完了した。得られた組織材料についてウエスタンブロット法による PrP^{Sc} の蓄積・分布の分析を行い、C-/L-BSE プリオンの間での PrP^{Sc} の蓄積・分布の特徴の違い、等を比較・検討した。[萩原健一；佐藤由子、飛梅実（感染病理部）；小野文子（千葉科学大学）；柴田宏昭（医薬基盤研）]

(3) BSE 迅速 ELISA キットの有効性の評価試験

欧州およびカナダ（加）での試験研究により、欧・加で使用されている BSE 迅速 ELISA キットが C-BSE プリオンのみならず非定型 BSE プリオンに罹患したウシの摘発にも有効であることが報告された。そこで本邦で使用されている迅速 ELISA キットについて、同様の試験研究を行った。得られたデータを欧州連合（EU）が定めた有効性の評価基準と照合し、本邦の ELISA キットが C-BSE プリオンとともに L-BSE プリオン罹患ウシの摘発にも有効であると結論した。[萩原健一、花田賢太郎；飛梅実（感染病理部）]

(4) 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

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42ヶ月経過し、神経症状等は未だ呈していない（平成27年3月時点）。[萩原健一；柴田宏昭（医薬基盤研）；大藤

圭子、岡林佐知（予防衛生協会）；小野文子（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 in vivo C 型肝炎ウイルス感染阻止

樹立したマウス抗ヒト Claudin-1 モノクローナル抗体の中で、性状の異なる2つの抗体を用い、ヒト肝キメラマウスの HCV 感染系における抗体の影響を検討した。その結果、両抗体が有意に HCV の感染を阻止できることが明らかとなった。抗体処理がマウスに対して特に毒性を示すことはなく、血中 ALT・AST 値、血中ヒトアルブミン値にも有意な変化が見られなかったことから、ヒト肝臓への悪影響もないと考えられた。これらの結果から、Claudin-1 を標的とした抗 HCV 戦略の有効性が示された。[深澤征義、花田賢太郎；近藤昌夫、八木清仁（阪大薬）]

(2) C 型肝炎ウイルスに対する高感受性宿主細胞株の分離と性状解析

C 型肝炎ウイルス（HCV）の感染実験に汎用されるヒト肝由来 Huh7.5.1 細胞について、我々の用いていた株は、ヘテロな細胞集団であることが分かり、クローニングにより亜株を分離したところ、Huh7.5.1-8 細胞株は、親株の10倍以上 HCV 感染感受性が高まっていることが分かった。その理由は、1) 複製能が10倍以上上昇していること、2) ウイルス受容体の発現が安定していること等が考えられた。遺伝子発現解析を行った結果、Huh7.5.1-8 細胞株では肝細胞特異的因子の発現が上昇しており、このことが、HCV 感染感受性上昇に関わっている可能性が考えられた。[深澤征義、白砂圭崇、齊藤恭子、花田賢太郎；関塚剛史、黒田誠（病原体ゲノム解析研究センター）；脇田隆字（ウイルス第2部）]

(3) B 型肝炎ウイルスの効率的な産生培養系に関する研究

B 型肝炎ウイルス（HBV）の侵入に関わるヒト NTCP 分子を発現した HepG2 細胞を宿主細胞として、Hep2.2.15.7 細胞の濃縮上清を感染源として用いることで、従来より10倍以上ウイルス量が少ない感染条件での HBV 感染培養系を確立できることがわかった。さらに、本感染系においてウイルスの再感染が見られることも観察し、ウイルスライフサイクルのすべてが再現されることを確認した。[深澤征義、花田賢太郎；渡士幸一、脇田隆字（ウイルス第2部）；田中靖人（名市大）]

(4) B 型肝炎ウイルス産生における脂質代謝変動の解

析

上述した HBV 感染細胞系を用いて脂質代謝変動の検討を行った結果、1) コレステリルエステルの上昇、2) トリグリセリドの上昇、3) セラミド生合成の上昇、4) スフィンゴミエリン・グルコシルセラミド生合成の低下、5) ホスファチジルエタノールアミンからホスファチジルコリンへの変換低下、等が見出された。[深澤征義、花田賢太郎；渡士幸一、脇田隆宇（ウイルス第2部）；田中靖人（名市大）]

（5）HCV 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 NS4B 蛋白質の細胞内分布を免疫蛍光染色法で解析した。NS4B 蛋白質を恒常的に発現するヒト培養肝細胞を用いて解析した結果、同蛋白質の一部は、ミトコンドリアに存在する可能性が考えられた。HCV 感染細胞においても同様の細胞内分布を示すかどうか、検討を行っている。[齊藤恭子、深澤征義、花田賢太郎]

（6）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 JFH1 株（遺伝子型 2a）のウイルス産生を阻害することを見出している。スクアレン合成酵素阻害剤で処理した細胞に、HCV JFH1 株のシュードウイルスを感染させたところ、同ウイルスの侵入が阻害されたことから、同薬剤の抗 HCV 機序の一つとして、HCV 侵入過程の阻害が考えられた。一方、スクアレン合成酵素阻害剤は遺伝子型 1b の HCV シュードウイルスの侵入は阻害しなかったことから、同薬剤の抗 HCV 効果は HCV の遺伝子型によって異なることが示唆された。[齊藤恭子、白砂圭崇、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。以前より、レンチウイルス shRNA ライブラリを用いて、発現抑制で志賀毒素に耐性を示す遺伝子を探索してきた。本年度は耐性候補となっている遺伝子のうち、UDP-galactose 4-epimerase (GALE) とセラミド合成酵素の一種 CERS2 について、詳細な検討をした。その結果 GALE は UDP-galactose の低下により Gb3 を低下させることで耐性を示すことが確認された。一方 CERS2 に関しては Gb3 の生合成は低下するものの、cDNA を発現させることに

よる発現量及び毒素感受性の回復が見られなかったことより、オフターゲット効果であることが示唆された [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（病原体ゲノム解析研究センター）]

（2）CERS2 遺伝子ノックアウト細胞株の構築と解析

ゲノム編集法の 1 つ TALEN 法を用いて、CERS2 遺伝子のノックアウト細胞を樹立した。上記の shRNA ライブラリによるスクリーニングの結果を踏まえ、CERS2 ノックアウト細胞の志賀毒素に対する感受性を検討したが、耐性は見られず、shRNA の結果がオフターゲットであることが確認出来た。また作製した種々の CERS2 変異株を用いた脂質解析により、スフィンゴミエリンと比較し糖脂質のほうに極長鎖脂肪酸をより選択的に使用することが示唆された。[山地俊之、堀江亜矢、花田賢太郎]

（3）CRISPR ライブラリを用いたスクリーニング系の構築

レンチウイルス CRISPR ライブラリを用いた遺伝子ノックアウトスクリーニングを行うため、HeLa 細胞及びヒト半数体細胞株 HAP1 において、DNA 切断に必須な CAS9 を安定発現させたクローンを単離した。これらの株を用いて、予備実験としてレンチウイルスの CRISPR を用いた遺伝子破壊に成功した。今後これらを用いて、志賀毒素をはじめとする宿主因子の探索を行う予定である。[山地俊之、花田賢太郎]

（4）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 プロモータの制御に関わる宿主因子を探索するため、HPV16 ゲノムの L1、L2 遺伝子を薬剤耐性遺伝子に置換したレプリコンコンストラクトを作製した。また、このレプリコンコンストラクトを導入した U2OS 細胞株を樹立した。[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）]

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、この相互作用を介してセラミドの輸送効率を上げている。CERT と VAP の相互作用は CERT の 315 番目のセリン残基 (CERT S315) のリン酸化によって増強され、結果として、スフィンゴミエリン生合成が促進する。本年度は CERT S315 のリン酸化に関与するキナーゼを予備的に探索した。文献調査により関与の可能性が高いと判断された約 10 種

類のキナーゼについて siRNA を用いて発現量を抑制させた。その中に CERT S315 のリン酸化状態に変化をきたすものを確認した。[熊谷圭悟、花田賢太郎]

(2) CERT と IncD の相互作用に関する研究

Chlamydia trachomatis は宿主細胞内に寄生することによって増殖する偏性細胞内寄生細菌である。*C. trachomatis* が増殖する際には、*C. trachomatis* 由来の IncD と宿主細胞由来の CERT と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。昨年度に引き続き、CERT および IncD に様々な変異を導入したコンストラクトを用いて、CERT と IncD の相互作用に関する解析をさらに進めた。[熊谷圭悟、花田賢太郎；安藤秀二（ウイルス1部）]

(3) HCV 増殖における宿主細胞 FAPP2 の重要性

RNA 干渉法によるグルコシルセラミド輸送タンパク質 FAPP2 のノックダウンや、薬剤によるグルコシルセラミド合成酵素の阻害を行った場合、細胞増殖には影響せずに HCV 複製が顕著に抑制された。この抑制は培地にスフィンゴ糖脂質を添加することで部分的に回復した。免疫染色解析から、FAPP2 は HCV 複製複合体に移行すると示唆された。これらの結果は、宿主細胞のスフィンゴ糖脂質が FAPP2 を介して HCV 複製複合体に輸送されており、そのようにして宿主由来スフィンゴ糖脂質を活用することが HCV ゲノム複製に重要であることを示唆している。[花田賢太郎；Irfan Khan, Divya S. Katikaneni, Qingxia Han, Lorena Sanchez-Felipe, Kouacou V. Konan（米国・アルバニー医科大）；Rebecca L. Ambrose, Jason M. Mackenzie（オーストラリア国・メルボルン大）]

V. オートファジーに関わる研究

(1) 高感度 pH 感受性蛍光蛋白質を用いたオートファジー評価系の開発

オートファジーを高感度に検出する系として EGFP-mCherry を用いた評価系が採用されていたが、EGFP が酸性 pH 条件においては蛍光の減衰は認められるものの、pH5.0 でも蛍光を発することが問題であった。そこで pH に高感受性を示す蛍光蛋白質 pHluorin と pH 安定性が高い mKate2 を用いて、オートファジーを高感度に評価する系を作成した。EGFP に代わって用いた、pHluorin は pH6.0 ではほぼ蛍光が消失し、オートファジーの評価系として、シグナル/ノイズ比がよりよい評価プローブを作成した。[谷田以誠；上野隆、内山安男（順天堂大）]

(2) 試験管内 Atg8 ホモログのリン脂質化修飾反応に関

わるメソドロジー

オートファジーの際のオートファゴソーム形成には Atg8 ホモログのユビキチン様修飾によるリン脂質結合反応が必須である。我々はこれまで、哺乳類 Atg8 ホモログ (LC3、GABARAP、GATE-16)、ユビキチン様修飾反応に必須な E1 様酵素、Atg7、E2 酵素、Atg3、をリコンビナント蛋白質として精製し、試験管内リン脂質化修飾反応を行ってきた。そこで、これら Atg 蛋白質の精製法、試験管内 Atg8 ホモログの試験管内反応の反応条件、検出法について、詳細を報告した。[谷田以誠；上野隆、木南英紀（順天堂大）]

(3) オートファジーを介した PRIP の黄色ブドウ球菌に対する細胞内免疫システムの解析

PRIP (Phospholipase C-related catalytically inactive protein) は、オートファゴソーム形成因子である LC3 と相互作用をし、オートファジーの効率に影響を与える。PRIP ノックアウトマウス繊維芽細胞に黄色ブドウ球菌を感染させたところ、ゼノファジー（細菌感染特異的オートファジー）が抑制されていた。この時、菌を取り囲むオートファゴソームがリソソームと融合する時間が遅延しており、PRIP はオートファゴソーム・リソソーム融合に重要な役割を果たしていることがわかった。[谷田以誠；兼松隆（広島大）]

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 の変異による核小体ストレス感知の変化を解析するため、不死化した PICT1^{-flox} マウス由来の胚性繊維芽細胞を作製し、その中からタモキシフェンに応答して PICT1^{-/-}となる細胞株を樹立した。またタモキシフェン処理で PICT1-null にした細胞では p53 依存性の細胞死が起こること、そして野生型 PICT1 の発現がその作用を打ち消すことを検証し、この細胞がストレス応答における PICT1 変異の効果の解析に有用であることを確認した。[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) Vero 細胞 JCRB0111 株の造腫瘍性試験

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）をゲノム配列決定に使用する細胞シードとした。そこで、その造腫瘍性試験を医薬基盤研にて特性解

析の一環として実施し、この継代数の Vero 細胞には造腫瘍性のないことを確認した。[花田賢太郎；小原有弘（医薬基盤研）]

（2）Vero 細胞ゲノム配列の決定

エンドペアおよびメイトペアライブラリ由来のショートリードを次世代シーケンサで読み、配列のアセンブリを行った。この際、網羅的な mRNA-sequencing も並行して行い、タンパク質コード領域の推測に役立てた。これら解析に基づいて、Vero 細胞の全ゲノムドラフト配列を作成した。当該ゲノムのサイズはヒトとほぼ同じ約 3 Gb であり、約 26,000 のタンパク質コード遺伝子を持っていることが明らかとなった。[山地俊之、花田賢太郎；関塚剛史、黒田誠（病原体ゲノム解析研究センター）；長田直樹（遺伝研）；小原有弘、平山知子、笠井文生（医薬基盤研）]

（3）Vero 細胞はメスの個体に由来する

Vero 細胞が由来するサル個体の性別は知られていなかった。我々の行った核型解析において、Vero 細胞の性染色体は XX 型、すなわちメス型であった。もともとは XY 型だったものから Y 染色体が脱落して XO 型となり、この X が重複して XX 型となったという可能性は、一塩基多様性（single nucleotide variations; SNVs）の解析から否定された。よって、Vero 細胞は雌サルに由来すると結論した。[花田賢太郎；長田直樹（遺伝研）；小原有弘、平山知子、笠井文生（医薬基盤研）]

（4）Vero 細胞は *Chlorocebus sabaues* に由来する

Vero 細胞が樹立された 1960 年代の時点では、アフリカミドリザルは一種類の生物種 *Cercopithecus aethiops* とされていたが、その後、アフリカミドリザルの分類上の属は *Cercopithecus* から *Chlorocebus* に移され、さらに、複数の種からなっていると考えられるようになった。ミトコンドリアゲノム配列が参照できる 4 種のアフリカミドリザルとの比較解析により、Vero 細胞は西アフリカのサバンナ地方を中心に棲息する *Chlorocebus sabaues* に由来していると結論した。[花田賢太郎；長田直樹（遺伝研）]

（5）12 番染色体の 9 Mb ホモ接合型欠失

細胞周期のブレーキ役として機能する二つのサイクリン依存性キナーゼ阻害因子をコードする遺伝子 *CDKN2A*、*CDKN2B* はヒトゲノムにおいて I 型インターフェロン遺伝子クラスターの近傍に存在しており、*CDKN2A*、*CDKN2B* 上の変異がいろいろなヒト癌細胞のゲノムで起こっていることが知られている。Vero 細胞の 12 番染色体は両方の相同染色体で 9 Mb に及ぶ染色体欠失があり、I 型インターフェロン遺伝子クラスターや *CDKN2A*、*CDKN2B* が失

われていることが明らかとなった。このゲノム上の特性は、ウイルス高感受性の不死化細胞という Vero 細胞の特徴と密接に関わると考えられる。[山地俊之、花田賢太郎；長田直樹（遺伝研）]

（4）内在性サル・レトロウイルス配列の多様性

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し、RNA に転写されることが知られている。興味深いことに、JCRB0111 株のゲノム上の SRV 配列には別の Vero 細胞亜株由来 SRV 配列では報告されていない変異があり、さらに、後者の SRV 配列で存在する変異が JCRB0111 株由来 SRV 配列には見つからなかった。この Vero 細胞亜株間の SRV 配列多様性は、亜株間を区別するゲノム情報になりえる可能性もあり、今後も注目してゆきたい。[花田賢太郎；関塚剛史、黒田誠（病原体ゲノム解析研究センター）；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（平成 26 年 1 月～平成 27 年 3 月。22 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。本事業は平成 24 年度から開始し、本年度は 3 年目である。[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

平成 26 年 7 月に TSE 行政検査の依頼 1 件（検体 8 個）があった。検体受取り後、ウエスタンブロット法の検査プロトコールに従って速やかに検査を実施し、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提出した。また、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（平成 27 年 2 月実施）。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

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 月に成績書を提出した。Hib ワクチンの承認前検査では、分子サイズ分布試験の書類調査を実施し、平成 26 年 9 月に調査結果を提出した。[谷田以誠、齊藤恭子、深澤征義、山地俊之、花田賢太郎]

II. 検定検査業務における内部監査

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 26 年度も検定検査業務内部監査計画書を策定し、それに沿った内部監査を実施した。そして、その結果を所長に報告するとともに、内部監査で指摘された事項への対処状況を適時確認した。所の検定検査業務品質管理システムは PDCA サイクルを回しながら随時改善を行い適切な状況にあることが伺えた。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

“WHO - Request for progress report of your collaborating centre, JPN-28”の作成に協力した。[花田賢太郎]

II. 国際的ガイドラインの策定

WHO 文書“BS 2232 - Regulatory Risk Evaluation on Finding an Adventitious Agent in a Marketed Vaccine draft (version 18 June 2014)”の作成に協力した。[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’ 2014.10.20 [萩原健一]

(2) 新規者向け検定・検査教育講習会の講師

‘試験機関の品質マネジメントシステムと内部監査’ 2014.5.20 [花田賢太郎]

その他

(1) (独) 医薬品医療機器総合機構 平成 26 年度 GLP 専門協議の専門委員 [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、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更新・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、花田賢太郎]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E.: In vitro assays of lipidation of Mammalian atg8 homologs. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 64, 11.20.1-11.20.13, 2014
- 2) Tanida, I., Ueno, T., Uchiyama, Y.: A super-ecliptic, pHfluorin-mKate2, tandem fluorescent protein-tagged human LC3 for the monitoring of mammalian autophagy. *PLoS One*, 9, e110600, 2014
- 3) Tanida, I., Shirasago, Y., Suzuki, R., Abe, R., Wakita, T., Hanada, K., Fukasawa, M.: Caffeic acid, a coffee-related organic acid, inhibits the propagation of hepatitis C virus. *Jpn. J. Infect. Dis.*, in press
- 4) Rinchai, D., Riyapa, D., Buddhisa, S., Utispan, K., Titball, R.W., Stevens, M.P., Stevens, J.M., Ogawa, M., Tanida, I., Koike, M., Uchiyama, Y., Ato, M., Lertmemongkolchai, G.: Macroautophagy is essential for killing of intracellular *Burkholderia pseudomallei* in human neutrophils. *Autophagy*, 11, 748-755, 2015
- 5) Harada-Hada, K., Harada, K., Kato, F., Hisatsune, J., Tanida, I., Ogawa, M., Asano, S., Sugai, M., Hirata, M., Kanematsu, T.: Phospholipase C-related catalytically inactive protein participates in the autophagic elimination of *Staphylococcus aureus* infecting mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One*, 9, e98285, 2014
- 6) Asano, S., Nemoto, T., Kitayama, T., Harada, K., Zhang, J., Harada, K., Tanida, I., Hirata, M., Kanematsu, T.: Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) controls KIF5B-mediated insulin secretion. *Biol. Open*, 3, 463-474, 2014
- 7) Hanada, K.: Co-evolution of sphingomyelin and the ceramide transport protein CERT. *Biochim. Biophys.*

- Acta, 1841, 704-719, 2014 [*Corrigendum*;1841, 1561-1562, 2014]
- 8) 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.*, 289, 10748-10760, 2014
- 9) Hanada, K., Voelker, D.: Interorganelle trafficking of lipids: preface for the thematic review series. *Traffic*, 15, 889-894, 2014
- 10) Hasegawa, Y., Hayashi H., Naoi, S., Kondou, H., Bessho, K., Igarashi, K., Hanada, K., Nakao, K., Kimura, T., Konishi, A., Nagasaka, H., Miyoshi, Y., Ozono, K., Kusuhara, H.: Intractable itch relieved by 4-phenylbutyrate therapy in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis type 1. *Orphanet J. Rare Dis.*, 9, 89, 2014
- 11) Khan, I., Katikaneni, D.S., Han, Q., Sanchez-Felipe, L., Hanada, K., Ambrose, R.L., Mackenzie, J.M., Konan, K.V.: Modulation of hepatitis C virus genome replication by glycosphingolipids and four-phosphate adaptor protein 2. *J. Virol.*, 88, 12276-12295, 2014
- 12) Osada, N., Kohara, A., Yamaji, T., Hirayama, N., Kasai, F., Sekizuka, T., Kuroda, M., Hanada, K.: The genome landscape of the African green monkey kidney-derived Vero cell line. *DNA Res.*, 21, 673-683, 2014
- 13) Sano, O., Ito, S., Kato, R., Shimizu, Y., Kobayashi, A., Kimura, Y., Kioka, N., Hanada, K., Ueda, K., Matsuo, M.: ABCA1, ABCG1, and ABCG4 are distributed to distinct membrane meso-domains and disturb detergent-resistant domains on the plasma membrane. *PLoS One*, 9, e109886, 2014
- 14) Zhao, Y., Ishigami, M., Nagao, K., Hanada, K., Kono, N., Arai, H., Matsuo, M., Kioka, N., Ueda, K.: ABCB4 exports phosphatidylcholine in a sphingomyelin-dependent manner. *J. Lipid Res.*, in press
- 15) Kang, H.-N., Xu, M., Rodríguez, V.P., Mefed, K., Hanada, K., Ahn, K.-S., Gangakhedkar, S.J., Pakzad, S.R., Prawahju, E.I., Lee, N., Phumiamorn, S., Nemeč, M., Meng, S., Knezević, I.: Review of the current use and evaluation of cell substrates for producing biologicals in selected countries. *Biologicals*, in press
- 16) Yamaji, T., Hanada, K.: Sphingolipid metabolism and interorganelle transport: localization of sphingolipid enzymes and lipid transfer proteins. *Traffic*, 16, 101-122, 2015
- 17) 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*, 9, e94460, 2014
- 18) Sung, P.S., Murayama, A., Kang, W., Kim, M.-S. Yoon, S.K., Fukasawa, M., Kondoh, M., Kim, J.S., Kim, H., Kato, T., and Shin, E.-C.: Hepatitis C virus entry is impaired by claudin-1 downregulation in diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT1)-deficient Cells. *J. Virol.*, 88, 9233-9244, 2014
- 19) 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
- 20) Li, X., Iida, M., Tada, M., Watari, A., Kawahigashi, Y., Kimura, Y., Yamashita, T., Ishii-Watabe, A., Uno, T., Fukasawa, M., Kuniyasu, H., Yagi, K., Kondoh, M.: Development of an anti-claudin-3 and -4 bispecific monoclonal antibody for cancer diagnosis and therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 351, 206-213, 2014
- 21) Ogawa, M., Fukasawa, M., Satoh, M., Hanada, K., Saijo, M., Uchiyama, T., and Ando, S.: The intracellular pathogen *Orientia tsutsugamushi* responsible for scrub typhus induces lipid droplet formation in mouse fibroblasts. *Microbe Infect.*, 16, 962-966, 2014
- 22) 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
- 23) 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.*, in press
- 24) Yamashita, M., Iida, M., Tada, M., Shirasago, Y.,

Fukasawa, M., Nagase, S., Watari, A., Ishii-Watabe, A., Yagi, K., Kondoh, M.: Discovery of anti-claudin-1 antibodies as candidate therapeutics against hepatitis C virus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press

- 25) Maehama, T., Kawahara, K., Nishio, M., Suzuki, A., Hanada, K.: Nucleolar stress induces ubiquitination-independent proteasomal degradation of PICT1 protein. *J. Biol. Chem.*, 289, 20802-20812, 2014

2. 和文発表

- 1) 前濱朝彦、鈴木聡 : PTEN/PI3K シグナルと発がん、*The LIPID*、25、63-69、2014

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Hanada K: Phosphoregulation of inter-organelle traffic of ceramide in mammalian cells, *The International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (KSMCB)* 2014.10.21-23, Seoul, Korea.
- 2) Yamaji, T., Hanada, K.: Genetic approaches for studying sphingolipid metabolism: Construction of sphingolipid gene disruptants in HeLa cells by genome editing, *6th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology*, 2014.12.9-12, Hyderabad, India
- 3) Nakajima, M., Yamashita, M., Watari, A., Yagi, K., Fukasawa, M., Kondoh, M.: Claudin-1 as a target for modulation of epidermal barriers, *Experimental Biology 2014 (EB2014)*, 2014.4.26-30, San Diego, USA
- 4) Kawahigashi, Y., Li, X., Iida, M., Tada, M., Ishii, A., Watari, A., Fukasawa, M., Yagi, K., Kondoh, M.: Tumor-targeting and anti-tumor activity of anti-claudin-3/-4 antibody, *Experimental Biology 2014 (EB2014)*, 2014.4.26-30, San Diego, USA
- 5) Kimura, Y., Li, X., Kuniyasu, H., Fukasawa, M., Tada, M., Ishii, A., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M.: Development and anti-tumor activities of claudin-4-specific monoclonal antibodies, *Experimental Biology 2014 (EB2014)*, 2014.4.26-30, San Diego, USA
- 6) Iida, M., Nagase, S., Yamashita, M., Shirasago, Y., Fukasawa, M., Tada, M., Ishii, A., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M.: In vivo inhibition of hepatitis C virus infection by anti-Claudin-1 monoclonal antibodies, *Experimental Biology 2014 (EB2014)*, 2014.4.26-30, San Diego, USA

- 7) Li, X., Iida, M., Kuniyasu, H., Fukasawa, M., Tada, M., Ishii, A., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M.: Anti-tumor activity of a novel monoclonal antibody recognizing claudin-3 and -4, *23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR-239)*, 2014.7.5-8, München, Germany
- 8) Iida, M., Nagase, S., Yamashita, M., Shirasago, Y., Fukasawa, M., Tada, M., Ishii, A., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M.: In vivo inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin 1 monoclonal antibodies, *41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2014 CRS Annual Meeting)*, 2014.7.13-16, Chicago, USA
- 9) Kimura, Y., Li, X., Iida, M., Tada, M., Ishii, A., Fukasawa, M., Kawahigashi, Y., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M.: Development and anti-tumor activity of a novel anti-claudin-3/-4 dual-specific antibody, *41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2014 CRS Annual Meeting)*, 2014.7.13-16, Chicago, USA
- 10) Fukasawa, M., Shimizu, Y., Shirasago, Y., Iwamoto, M., Watashi, K., Tanaka, Y., Wakita, T., Kondoh, M., Yagi, K., Hanada, K.: Efficient HBV infection system in cultured cells, *2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses*, 2014.9.3-6, Los Angeles, USA
- 11) 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, *The 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses*, 2014.9.7-11, Banff, Canada
- 12) Iida, M., Yamashita, M., Nagase, S., Tada, M., Shirasago, Y., Fukasawa, M., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M.: Anti-human Claudin-1 Monoclonal Antibodies Inhibit a Hepatitis C virus Infection in vivo, *The 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses*, 2014.9.7-11, Banff, Canada
- 13) Fukasawa, M., Nagase, S., Yamashita, M., Iida, M., Shirasago, Y., Hanada, K., Yagi, K., Kondoh, M.: An efficient screening strategy for functional monoclonal antibodies against intact cell surface multi-spanning membrane proteins using cell mutants defective in the target proteins: Establishment of anti-claudin 1 monoclonal antibodies that inhibit hepatitis C virus

- infection in vitro and in vivo, Protein Island Matsuyama (PIM) International Symposium 2014, 2014.9.17, Ehime, Japan
- 14) Kimura, Y., Li, X., Iida, M., Tada, M., Ishii, A., Fukasawa, M., Kawahigashi, Y., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M.: Tumor-targeting and anti-tumor activity of a novel dual-specificity anti-claudin antibody, Protein Island Matsuyama (PIM) International Symposium 2014.9.17, Ehime, Japan
- 15) Iida, M., Yamashita, M., Nagase, S., Tada, M., Shirasago, Y., Fukasawa, M., Watari, A., Ishii-Watabe, A., Yagi, K., Kondoh, M.: Anti-human claudin-1 monoclonal antibodies as anti-Hepatitis C Virus agents, IBC's 25th Annual Antibody Engineering & Therapeutics, 2014.12.7-11, Huntington Beach, USA
- 16) Kimura, Y., Li, X., Iida, M., Tada, M., Ishii, A., Fukasawa, M., Kawahigashi, Y., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M.: Development of a novel bispecific anti-claudin antibody and its anti-tumor activity, IBC's 25th Annual Antibody Engineering & Therapeutics, 2014.12.7-11, Huntington Beach, CA, USA
- 17) Hata, T., Nagase, S., Shirasago, Y., Fukasawa, M., Takeda, S., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M.: Epitope mapping of an anti-claudin-1 monoclonal antibody and its application to preclinical drug discovery, IBC's 25th Annual Antibody Engineering & Therapeutics, 2014.12.7-11, Huntington Beach, CA, USA
- 18) Shirasago, Y., Tanida, I., Shimizu, Y., Suzuki, T., Wakita, T., Hanada, K., Kondo, M., Fukasawa, M.: Establishment of an occludin knock-out human hepatic cell and its application for hepatitis C virus study, Keystone Symposia Precision Genome Engineering and Synthetic Biology, 2015.1.12-15, Montana, USA
- 19) Kusumoto-Matsuo, R., Mori, S., Maehama, T., Kukimoto, I.: Wee1 binds to and stabilizes the E1 helicase of human papillomavirus type 16, 29th Annual International Papillomavirus Conference and Public Health & Clinical Workshops, 2014.8.21-25, Seattle, USA
- 20) Maehama, T., Kawahara, K., Nishio, M., Suzuki, A.: Nucleolar stress induces ubiquitination-independent proteasomal degradation of PICT1 protein, 11th International Conference on Protein Phosphatase, 2014.11.12-14, Sendai, Japan
2. 国内学会
- 1) 谷田以誠、Darawan Rinchai、小川道永、Ganjana Lertmemongkolchai、阿戸 学：類鼻疽菌の好中球感染におけるオートファジー関連構造体、第87回日本生化学会大会、2014.10.15-18、京都
- 2) 谷田以誠：類鼻疽菌の好中球感染における新奇オートファジー関連構造体、第88回日本細菌学会総会、2015.3.26-28、岐阜
- 3) 花田賢太郎：セラミドの構造多様性について、スフィンゴ脂質データベースワークショップ、2014.5.22-23、三島
- 4) 熊谷圭悟、花田賢太郎：セラミド輸送タンパク質 CERTのリン酸化による機能制御、第56回日本脂質生化学会大会、2014.6.6-7、大阪
- 5) Naoki Osada, Arihiro Kohara, Toshiyuki Yamaji, Noriko Hirayama, Fumio Kasai, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, and Kentaro Hanada: The genome landscape of the African green monkey kidney-derived Vero cell line, 感染研 GSC x 新学術領域感染コンピ 研究交流会、2014.7.12、東京
- 6) 花田賢太郎、熊谷圭悟：CERT-VAP 間の相互作用調節を介したセラミド輸送の制御、第9回スフィンゴセラピー研究会、2014.7.18-19、加賀
- 7) 島崎健太郎、高橋美帆、梅田真郷、熊谷圭悟、花田賢太郎、柴田識人、内藤幹彦、西川喜代孝：クラスター化した BCR-ABL PH-ドメインに対するリガンド結合特性の解析、第87回日本生化学会大会、2014.10.15-18、京都
- 8) 大槻紀之、坂田真史、花田賢太郎、岡本貴世子、安楽正輝、竹田誠、森嘉生：スフィンゴミエリンは風疹ウイルスによる赤血球凝集において重要な役割を果たす、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜
- 9) 花田賢太郎、山地俊之、黒田誠、関塚剛史、小原有弘、笠井文生、平山知子、長田直樹：アフリカミドリザル腎由来 Vero 細胞のゲノム構造決定、第87回日本生化学会大会、2014.10.15-18、京都
- 10) 花田賢太郎：日本のワクチンの国際展開の為に何が重要か？ ワクチン分科会趣旨説明、バイオロジクスフォーラム第12回学術集会、2014.12.12、東京
- 11) 堀江亜矢、関塚剛史、竹内史比古、黒田誠、花田賢太郎、山地俊之：志賀毒素の細胞障害作用に対するゲノムワイド shRNA スクリーニング、第87回日本生化学会大会、2014.10.15-18、京都

- 12) 岩本 将士、渡士 幸一、九十田 千子、Hussein Hassan Aly、深澤 征義、藤本 陽、鈴木 亮介、相崎 英樹、小祝 修、楠原 洋之、脇田 隆字：ヒト NTCP 安定発現による B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染許容性の獲得とそれを用いた HBV 侵入機構の解析、第 22 回肝病態生理研究会、2014.5.31、東京
- 13) 深澤征義：タイトジャンクションタンパク質 Claudin-1 と C 型肝炎ウイルス感染、第 87 回日本生化学会大会、2014.10.15-18、京都
- 14) 深澤征義、清水芳実、白砂圭崇、岩本将士、渡士幸一、田中靖人、脇田隆字、近藤昌夫、八木清仁、花田賢太郎：効率的な HBV 感染培養細胞系の構築に関する研究、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜
- 15) 白砂圭崇、関塚剛史、齊藤恭子、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、黒田誠、安部良、深澤征義：HCV に対して高感染感受性を有する Huh7.5.1 細胞亜株の樹立と性状解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜
- 16) 深澤征義：C 型肝炎ウイルス感染とタイトジャンクションタンパク質、日本薬学会第 135 年会、2015.3.25-28、神戸
- 17) 白砂圭崇、谷田以誠、清水芳実、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、近藤昌夫、安部良、深澤征義：Occludin ノックアウト肝細胞の樹立と本細胞を用いた HCV 感染の解析、第 135 回日本薬学会、2015.3.25-28、神戸
- 18) 河原康一、堀口史人、上條陽平、山本雅達、新里能成、南謙太郎、エフ・エム・モイスディン、有馬一成、西尾美希、佐々木雅人、前濱朝彦、鈴木聡、古川龍彦：生体イメージング技術による核小体ストレス応答の制御基盤の解明、第 87 回日本生化学会大会、2014.10.15-18、京都