

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

ヒト iPS 細胞由来肝細胞の C 型肝炎ウイルス研究への応用

分担研究者 水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科

本研究では、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の新規解析法開発を行うことを目的とする。そのため、遺伝子導入技術を活用して、ヒト iPS 細胞から肝細胞への効率の良い分化誘導法を開発し、大阪大学大学院薬学研究科・八木清仁教授グループとの連携の元、ヒト iPS 細胞由来肝細胞における C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染・複製に関する検討を行った。さらに、より高純度なヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製を目的に、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法の改良を行った。

研究協力者

八木清仁 大阪大学大学院薬学研究科

近藤昌夫 大阪大学大学院薬学研究科

川端健二 (独)医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

櫻井文教 大阪大学大学院薬学研究科

田代克久 (独)医薬基盤研究所

高山和雄 大阪大学大学院薬学研究科
(独)医薬基盤研究所

A. 研究目的

現在世界には 2 億人、本邦には 200 万人の C 型肝炎感染者がおり、世界では年間 200~300 万人ずつ感染者が増加している。依然として難治性 1b 型高ウイルス量患者に対しては既存薬剤の奏効率が 50%に過ぎないこと、インターフェロン投与による副作用発現により投与の中断を余儀なくされる場合があること、各種薬剤耐性ウイルスが出現するこ

とから、C 型肝炎の克服には宿主因子とウイルス感染・複製の関連性を詳細に解析し、肝炎ウイルス治療薬創出に資する新規創薬ターゲットを同定することが必須である。

そこで本研究では、iPS 細胞技術の創薬応用を目的に、まず(1)ヒト iPS 細胞から肝細胞を効率よく分化誘導させる技術を、我々が独自開発した次世代アデノウイルス (Ad) ベクター技術を駆使して開発し、分化誘導した肝細胞の応用として、(2) 大阪大学大学院薬学研究科・八木清仁教授グループとの連携の元、C 型肝炎をはじめとする肝炎克服研究のための *in vitro* 基盤技術 (評価系) 開発を行う。分化誘導状態の異なるヒト肝細胞様細胞を用いて肝炎ウイルス感染能および複製能を解析することで、肝炎ウイルス感染・複製に関する宿主因子の同定や宿主因子とウイルス感染・複製の関連性を詳細に解析でき、肝炎ウイルス治療薬創出に資する新規創薬ターゲットの同定につながることを期待される。

本年度は、昨年度報告した分化誘導法を用いてヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導を行い、大阪大学大学院薬学研究科・八木清仁教授グループにおいて、HCV のレセプター発現や感染・複製に関する検討を行った。さらに、肝成熟化を一層促進するため

に、7種類の肝関連転写因子の遺伝子導入を行うことによって、肝分化を促進する遺伝子のスクリーニングも実施した。

B. 研究方法

B-1. Adベクターの作製

Adベクターの作製は improved in vitro ライゲーション法により行った。シャトルプラスミド pHMEF5 のマルチクローニング部位に β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子、ヒト SOX17 遺伝子、HEX 遺伝子あるいは HNF4 α 遺伝子を挿入し、それぞれのシャトルプラスミドを I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdHM41-K7 に挿入することにより pAd-K7-EF-LacZ、pAd-K7-EF-SOX17、pAd-K7-EF-HEX、pAd-K7-EF-HNF4 α を作製した。作製した Adベクタープラスミドを Pac I で消化し、SuperFect (Qiagen 社) を用いて 293 細胞にトランスフェクションすることにより、Ad-LacZ、Ad-SOX17、Ad-HEX、Ad-HNF4 α を作製した。定法により Adベクターの増殖・精製を行った。

同様に、肝分化を促進する遺伝子のスクリーニングのため、FOXA2、HNF1 α 、HNF1 β 、HNF6 を発現する Adベクターを作製した。

B-2. 内胚葉系細胞、肝幹細胞、肝細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞 (H9) やヒト iPS 細胞 (201B7、Tic、Dotcom) を分化誘導開始の前日に無血清培地 hESF9 (Furue MK et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105, 13409-13414) で培地交換した。次に、細胞剥離液である Accutase (Invitrogen 社) を用いてヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞を回収後、6 因子 (10 μ g/mL human recombinant insulin、5 μ g/mL human apotransferrin、10 μ M 2-mercaptoethanol、10 μ M ethanolamine、10 μ M sodium selenite、0.5 mg/mL fatty acid free bovine

albumin) および 100 ng/mL Activin A (R&D systems 社) を含む hESF-GRO (Cell Science & Technology Institute 社) 培地に懸濁後、マトリゲルでコーティングした細胞培養用 12 プレートに播種した。

Adベクターを用いた遺伝子導入によりヒト iPS 細胞から内胚葉系細胞への分化誘導を行う場合は、各 Adベクター (Ad-LacZ、Ad-SOX17) を 3,000 vector particles (VP)/cell の濃度で中内胚葉系細胞に作用させた。

次にヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞由来の内胚葉系細胞を各 Adベクター (Ad-LacZ、Ad-HEX; 3,000 VP/cell) で作用させた後、10 ng/mL FGF4 (R&D systems 社) と 10 ng/mL BMP4 (R&D systems 社) を含んだ hESF-DIF 培地で 9 日間培養し、肝幹前駆細胞を得た。

ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞由来の肝幹前駆細胞を各 Adベクター (Ad-LacZ、Ad-HNF4 α ; 3,000 VP/cell) で作用させた後、10 ng/mL FGF-4、10 ng/mL HGF (R&D Systems 社)、10 ng/mL Oncostatin M (R&D Systems 社)、 10×10^{-7} M dexamethasone (Sigma 社) を添加した hepatocyte culture medium (Lonza 社) で 9 日間培養し肝細胞への分化効率の測定および機能性の評価を行った。

肝分化を促進する遺伝子のスクリーニング実験においては、上記と同様に、中内胚葉系細胞、内胚葉系細胞、肝幹前駆細胞に SOX17、FOXA2、HEX、HNF1 α 、HNF1 β 、HNF4 α 、HNF6 を発現する Adベクターを感染させ分化能を検討した。

C. 研究結果

本研究では、肝細胞への分化効率を改善するため、中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞において発現している転写因子 SOX17、HEX、HNF4 α 遺伝子を改良型 Adベクター (ファイバー領域にポリリジン配列を付与したファイバー改変 Adベクター) を用いて時期

特異的に一過性に過剰発現させることで、肝細胞への分化効率の飛躍的な向上が可能になった（プロトコールについては Figure 1 参照）。

これら 3 遺伝子を導入することで作製した分化誘導肝細胞は、アルブミン陽性細胞が約 80% となった (Figure 2)。また、CYP3A4、CYP2D6 をはじめとする薬物代謝酵素の活性レベルもヒト初代培養肝細胞と匹敵するレベルであった。さらに最終的に分化誘導した細胞の形態については、細胞間隙が明瞭になり、多核の細胞が現れる等、ヒト初代培養肝細胞の形態と酷似していた。本分化誘導肝細胞を用いて、大阪大学大学院薬学研究科・八木清仁教授グループと共同で、HCV 感染受容体の発現、シールドウイルスを用いた HCV 感染能の評価、HCV ゲノム複製能の評価等を行った。これら HCV 関連研究の結果については、八木らの報告欄に記載した。

さらに、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への各分化過程において、7 種類の肝関連転写因子 (SOX17, FOXA2, HEX, HNF1 α , HNF1 β , HNF4 α , HNF6) を遺伝子導入するスクリーニングを実施した結果 (Figure 3)、FOXA2、HNF1 α 遺伝子を組み合わせることによって、さらなる肝成熟化が確認された。

D. 考察

時期特異的に SOX17、HEX、HNF4 α 遺伝子をヒト ES 細胞や iPS 細胞から分化させた細胞に導入することで、極めて効率よく肝細胞へ分化誘導することに成功した。本研究では、ファイバー領域にポリリジン配列を付与したファイバー改変 Ad ベクターを用いて遺伝子導入しているが、いずれの段階のヒト ES/iPS 細胞由来分化細胞においても、ほぼ 100% の遺伝子導入効率を示すことを確認しており、高い遺伝子導入能が優れた肝分化誘導能の一因であることが考えられた。分化誘導した肝細胞は、HCV の感染受容体を発現し、HCV 感染能、HCV ゲノム複製能を有することが判明し、本細胞系が HCV 研究に利用できることが明らかとなった。

一方、肝細胞分化に重要な遺伝子群を用いて、ヒ

ト ES 細胞や iPS 細胞から肝細胞への分化誘導に用いる転写因子をスクリーニングした結果、さらに高純度な分化誘導肝細胞を作製することに成功した。

来年度以降は新しいプロトコールで分化誘導した肝細胞を用いて HCV 感染能等の評価するとともに、分化状態の異なる細胞群（内胚葉細胞や肝幹前駆細胞等）での HCV 感染能等の検討を行う。また、DNA チップを用いた網羅的な発現解析を行うことで、分化誘導肝細胞の性能確認を行うとともに、宿主因子とウイルス感染・複製の関連性を詳細解析し、肝炎ウイルス治療薬創出に資する新規創薬ターゲットの同定を目指した研究を施行する予定である。

E. 結論

Ad ベクター用いた機能遺伝子の導入によりヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞は、HCV 研究に使用可能なことが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawabata K., Takayama K., Nagamoto Y., Saldon M. S., Higuchi M., Mizuguchi H. Endodermal and hepatic differentiation from human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *J. Stem Cell Res. Ther.*, in press.
- 2) Kawabata K., Inamura M., Mizuguchi H. Efficient hepatic differentiation from human iPS cells by gene transfer. *Methods Mol. Biol.*, 826, 115-124 (2012)
- 3) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue M. K., Mizuguchi H. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic

- stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction. *Mol. Ther.*, 20, 127-137 (2012)
- 4) Yoshida T., Takayama K., Kondoh M., Sakurai F., Tani H., Sakamoto N., Matsuura Y., Mizuguchi H., Yagi K. Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 416, 119-124 (2011)
 - 5) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Tashiro K., Katayama K., Hayakawa T., Furue M.K., Mizuguchi H. Efficient and selective generation of two distinct endoderm lineages from human ES and iPS cells by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One*, 6, e21780 (2011)
 - 6) Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T., Furue M.K., Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther.*, 19, 400-407 (2011)
 - 7) 水口裕之、近藤昌夫、八木清仁；iPS細胞分化誘導によるHCV培養モデル、*肝胆臓*、63、919-924 (2011)
- ## 2. 学会発表
- 1) 高山和雄、稲村 充、川端健二、菅原道子、菊池きよ美、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之：FOXA2・HNF1 α 遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞の分化誘導、日本薬学会第132年会、札幌、2012年3月28-31日
 - 2) 水口裕之：ヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化誘導技術開発と創薬応用、ヒトES/iPS細胞：産業応用最前線セミナー ～細胞治療と創薬スクリーニング～ ダイアログ社セミナー、東京、2011年12月12日
 - 3) 水口裕之：遺伝子導入技術を駆使したヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化誘導技術開発と創薬応用、第26回長崎DDS・再生医療研究会、長崎、2011年12月9日
 - 4) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi：Efficient generation of mature hepatocytes from human pluripotent stem cells by HNF4 α transduction., 第26回日本薬物動態学会年会、広島、2011年11月16-18日
 - 5) 水口裕之：ヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化誘導技術開発と創薬応用、サイエンスエキスポ関西、大阪、2011年10月21日
 - 6) 水口裕之：創薬応用を目指したヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化誘導技術開発、第1回レギュラトリーサイエンス学会学術大会、東京、2011年9月2-3日
 - 7) 水口裕之：ヒトiPS細胞を用いた新規 in vitro

- 毒性評価系の構築、第31回ヒューマンサイエンス基礎研究講習会、大阪、2011年9月1日
- functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction., International Society for Stem Cell Research, Tronto, June, 2011
- 8) 水口裕之: 遺伝子導入技術を駆使したヒト ES/iPS 細胞から肝臓細胞への分化誘導、第28回日本小児肝臓研究会、筑波、2011年7月16日
- 9) 水口裕之: 創薬における iPS 細胞を活用した in vitro 毒性評価、サイエンス&テクノロジーセミナー、東京、2011年7月15日
- 10) 水口裕之: ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発と in vitro 毒性評価系への応用、第38回日本トキシコロジー学会学術年会、東京、2011年7月13日
- 11) 高山和雄、稲村 充、川端健二、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: HNF4 α 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの成熟肝細胞への高効率分化誘導、第18回肝細胞研究会、東京、2011年6月24-25日
- 12) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: HNF4 α promotes hepatic maturation from human embryonic stem cell-derived hepatoblasts., The 6th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, Seoul, Korea, June, 2011
- 13) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: Efficient generation of

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

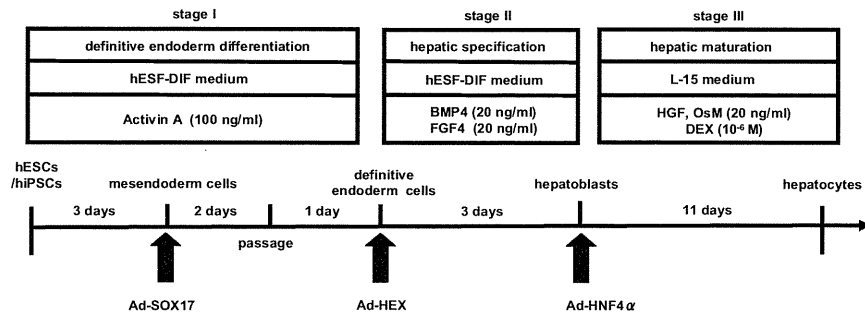


Figure 1. Hepatic differentiation of human human embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) transduced with 3 factors.

The procedure for differentiation of human ESCs and iPSCs into hepatocytes via the definitive endoderm cells and the hepatoblasts is presented schematically. The hESF-DIF medium was supplemented with 10 μ g/ml human recombinant insulin, 5 μ g/ml human apotransferrin, 10 μ M 2-mercaptoethanol, 10 μ M ethanolamine, 10 μ M sodium selenite, and 0.5 mg/ml fatty acid free BSA. The L15 medium was supplemented with 8.3% tryptose phosphate broth, 8.3% FBS, 10 μ M hydrocortisone 21-hemisuccinate, 1 μ M insulin, and 25 mM NaHCO₃.

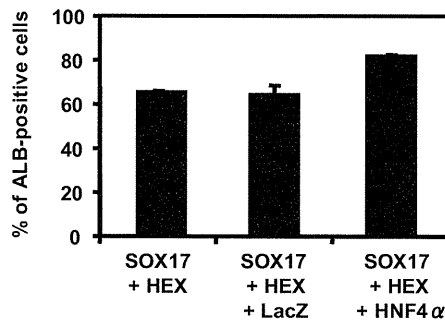


Figure 2. Transduction of 3 factors promotes albumin production from human ESCs (H9)-derived cells.

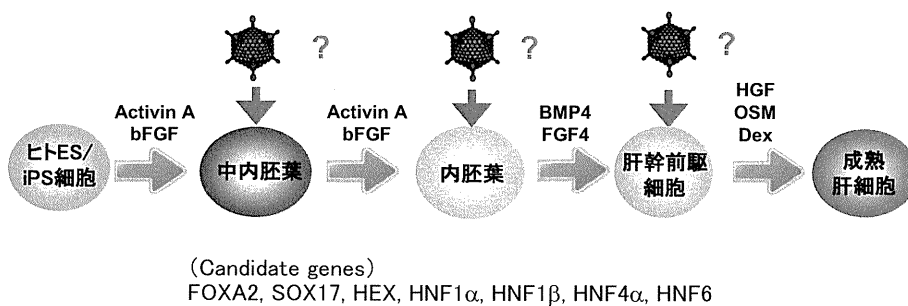


Figure 3. Screening for hepatic differentiation-promoting factors.

HBV増殖系およびHEV培養系による新規抗ウイルス療法の探索に関する研究

研究分担者 清原 知子（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究協力者 石井 孝司、李 天成（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究要旨 本研究はB型肝炎ウイルス（HBV）、E型肝炎ウイルス（HEV）の薬剤スクリーニング系の確立を目的とする。今年度はHBV産生細胞（HepG2. 2. 15細胞）から得た5クローンについてHBs抗原及びHBc抗原産生量の経時適変化を測定した。その結果クローンによってHBs抗原およびHBc抗原が産生されるタイミングが異なることが明らかとなった。一方、HEVについてはVLPやその抗体を組み合わせ、疫学的アプローチに用いることができる抗HEV抗体検出ELISAを作製した。

A. 研究目的

ウイルス性肝炎は社会的な問題となる疾病であり、ワクチンによる予防や効果的な治療薬の開発が望まれる。B型肝炎はB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) の感染によって引き起こされる急性および慢性肝炎である。我が国では母子感染防止対策や献血のHBVスクリーニングによってHBVキャリアは減少しているが、依然新規感染者が報告されている。また、近年は成人でも慢性化する傾向にある Genotype A の感染報告が増加している。B型肝炎の治療にはインターフェロン（IFN）や核酸アナログが使用されているが、副反応や投与時期・期間、薬剤耐性株の誘導などの問題もあり、新たな薬剤の開発が望まれている。

一方、E型肝炎はE型肝炎ウイルス (hepatitis E virus, HEV) による経口急性肝炎である。以前は輸入感染症と考えられていたが調査が進むにつれて国内感染例が確認されるようになった。E型肝炎には人獣共通感染症としての側面もある。動物種を問わない抗HEV抗体検査法はHEVの流行状況を把握する疫学調査に有用である。

本年度の目的はHBVおよびHEVの *in vitro* 実験系を活用して疾病コントロールに寄与できる有用なツ

ルを開発することである。

B. 研究方法

HBV : HepG2. 2. 15細胞のクローンのうち、#1、#3、#4、#21、#G4およびクローニング前のOriginal populationについて、HBs抗原およびHBc抗原の経時変化を測定した。各クローンを96well細胞培養プレートで培養し、Confluentな状態でメディアムを交換した。この日を0日とし、7~9日後まで各抗原を測定した。測定にはそれぞれin-house HBsAg ELISA、QuickTiter HBV Core Antigen ELISA Kit (CELL BIOLOB, INC) を使用した。また、#1、#3、#G4およびOriginal populationのHBe抗原量も測定した（エンザイグノストHBe monoclonal (SIEMENS) 使用）。

HEV : ELISA 用プレートに抗 HEV-VLP 抗体（ウサギ）をコーティングして HEV-VLP を結合させ、HEV プレートを作製した。このプレートに血清検体を入れて検体中の抗 HEV 抗体を結合させる。検体中の抗 HEV 抗体が結合していない HEV-VLP を HRPO 標識抗 HEV-VLP 抗体で検出した。陰性コントロールとして抗 HEV 抗体陰性ヒト血清 (NHS1、NHS2、NHS3)、陽性コントロールとして抗 HEV 抗体陽性ブタ血清 (aHEVsw) 及びウサギ血清 (aHEVRS) を用いて

感度及び特異性を確認した。

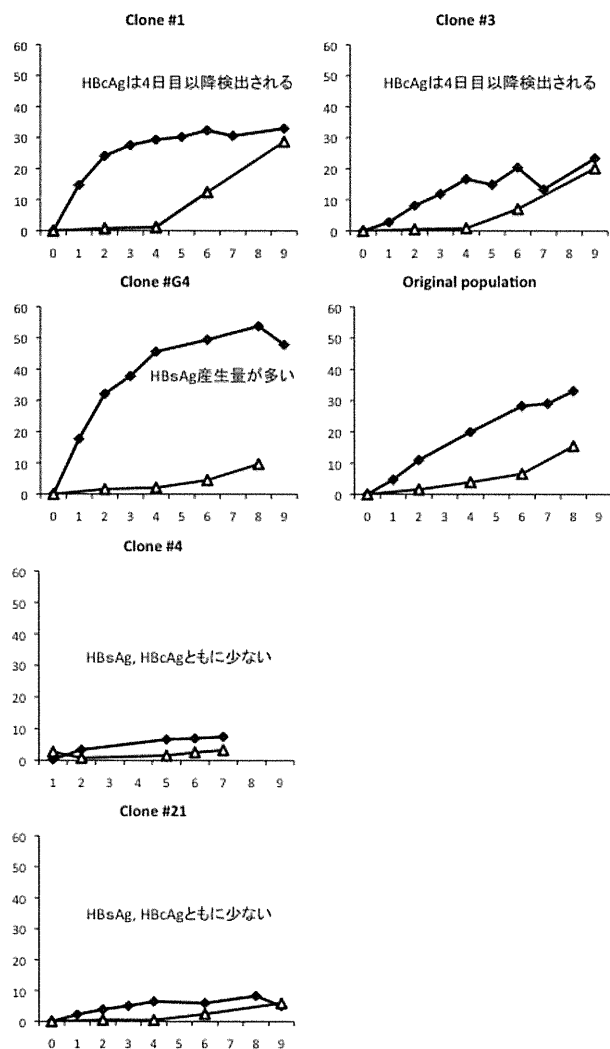
(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

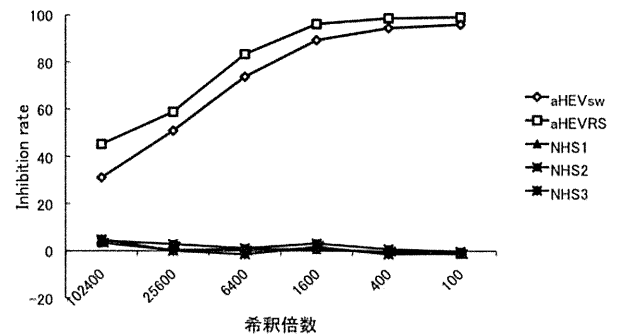
HBV：クローン#1と#3はメディウム交換後1日目からHBs抗原が検出されたがHBc抗原の産生は比較的遅く、4日目まで検出されなかった(図1)。HBs抗原産生量が多い#G4もHBc抗原産生が遅く、且つ、#1、#3に比べて産生量は少なかった。クローン#4、#21どちらも抗原の産生量が少なかった。HBsおよびHBc抗原の産生パターンが似ているクローン#1と#3はHBe抗原産生パターンが異なり、独立したクローンであると推察された。

図1



HEV：陰性コントロールは100倍希釈でも阻害率が0%であった。一方、陽性コントロールは10万倍以上希釈しても標識抗体の結合阻害が認められ、HEV抗体を特異的に検出していることが確認された。陽性コントロールはいずれも100倍から102400倍希釈まで用量依存性に阻害率が変化し最高希釈濃度でも20%以上の阻害率が計算された(図2)。

図2



D. 考察

HBV：HepG2. 2. 15細胞から得たクローンはそれぞれHBVマーカー(HBs抗原、HBc抗原、HBe抗原)の産生パターンが異なる。HBVの増殖はHBs抗原よりもHBc抗原に反映されることが報告されている。HBVに対する薬剤スクリーニングは今回得たクローンのうち4日目以降にHBc抗原が増加する#1と#3が適している。しかしながら、HBVマーカーの産生はHBV増殖の直接的な指標ではなく、また、本実験系の場合、HBV遺伝子のHepG2. 2. 15細胞への組み込み方も考慮しなくてはならない。

HEV：今回作製した抗HEV抗体検出系は感度、特異性ともに良く、実用化が可能であると考えられる。

E. 結論

HBV：今回得たクローンの特性を更に検討するとともに、その特性を生かした薬剤スクリーニング系およびHBs抗原、HBc抗原産生の制御因子の探索につなげていきたいと考えている。

HEV：HEVは人獣共通感染症である。疫学的な背景を探るために多種の動物検体を扱う機会があり今後のHEV対策を考える上で動物種に関係なく抗HEV抗体を検出するシステムは有用である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

該当無し

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当無し

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., and Watanabe, S.	Kaposi's sarcoma-associated Virus governs gene expression profiles toward B cell transformation.	Magel, D. G. ed	Herpesviruses	In-Tech		2012	in press

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
Ueda, K., Ohsaki, E., Nakano, K., and Zheng, X.	Characterization of Kaposi's sarcoma-associated virus-associated lymphomas by DNA array analysis.	In "Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD)		in press	2012
Ohsaki, E. and Ueda, K.	Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency.	Frontiers in Virology		in press	2012
Nakano, K., Katano, H., Tadagaki, K., Sato, Y., Ohsaki, E., Mori, Y., Yamanishi, K., and Ueda, K.	Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman's Disease; Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II.	Virology		in press	2012
Sabine A, Agalarov Y, Hajjami NME, Jaquet M, Hagerling R, Pollmann C, Bebbber D, Pfenniger A, Miura N, Dormond O, Calmes JM, Adams R, Makinen T, Kiefer F, Kwak BR, Petrova TV	PROX1, FOXC2 and mechanotransduction cooperate to control connexin 37 and calcineurin during lymphatic valve formation.	Dev Cell		in press	2012
Uezato T, Sato E, Miura N	Screening of natural medicines that efficiently activate neurite outgrowth in PC12 cells in C2C12-cultured medium.	Biomed Res		in press	2012
Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Kato N.	Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C.	Virus Genes		in press	2012
Iikura M, Furihata T, Mizuguchi M, Nagai M, Ikeda M, Kato N, Tsubota A, Chiba K.	ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system.	Antimicrob Agents Chemother		in press	2012
Raghwani, J., Thomas, X. V., Koekkoek, S. M., Schinkel, J., Molenkamp, R., van de Laar, T., Takebe, Y., Tanaka, Y., Mizokami, M., Rambaut, A. and Pybus, O. G.	The origin and evolution of the unique HCV circulating recombinant form 2k/1b.	J Virol	86(4)	2212-2220	2012

Wang B, Hikosaka K, Sultana N, Sharkar MTK, Noritake H, Kimura W, Wu Y-X, Kobayashi Y, Uezato T, <u>Miura N</u>	Liver tumor formation by a mutant retinoblastoma protein in the transgenic mice is caused by an up-regulation of c-Myc target genes.	Biochem Biophys Res Commun	417(1)	601-608	2012
Tammela T, Zarkada G, NUrmi H, Jakobsson L, Heinolainen K, Tvorogov D, Zheng W, Franco C, Murtomaki A, Aranda E, <u>Miura N</u> , Yla-Herttuala S, Fruttiger M, Makinen T, Eichmann A, Pollard J, Gerhardt H, Alitaro K	VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signaling.	Nature Cell Biol	13(10)	1202-1213	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)	2143-2152	2012
Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue M.K., <u>Mizuguchi H.</u>	Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4a transduction.	Mol Ther	20	127-137	2012
Takeshita S, Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H, Matsuzaki T, Otani M, Muraoka T, Akiyama M, Miuma S, Ozawa E, <u>Ikeda M</u> , Kato N, Isomoto H, Tkashima F, Nakao K.	Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells.	J Gastroenterol		in press	2011
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> , <u>KatoT</u> .	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, Wakita T, 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, Wakita T, 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, Wakita T, Shimotohno K, Seya T.	Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV).	PLoS One	6(6)	e21284.	2011
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	85	6882-6892	2011
Sa-Nguanmoo P, Tanaka Y, Ratanakorn P, Sugiyama M, Murakami S, Payungporn S, Sommanustweechai A, Mizokami M, Poovorawan Y.	Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes.	Virus Res	158(1-2)	209-215	2011
Nakamura I, Tanaka Y, Ochiai K, Moriyasu F, Mizokami M, Imawari M.	Clarification of interspousal hepatitis C virus infection in acute hepatitis C patients by molecular evolutionary analyses: Consideration on sexual and non-sexual transmission between spouses.	Hepatol Res	41(9)	838-845	2011
Wang J, Singh US, Rawal RK, Sugiyama M, Yoo J, Jha AK, Scroggin M, Huang Z, Murray MG, Govindarajan R, Tanaka Y, Korba B, Chu CK.	Antiviral activity of novel 2'-fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine against wild-type and drug-resistant hepatitis B virus mutants.	Bioorg Med Chem Lett	21(21)	6328-6331	2011
Wen, X., Abe, T., Kukihara, H., Taguwa, S., Mori, Y., Tani, H., Kato, N., Suzuki, T., Tatsumi, M., Moriishi, K., and Matsuura, Y.	Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules.	PLoS One	6(1)	e15967	2011
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	85	13185-13194	2011
Kambara, H., Tani, H., Mori, Y., Abe, T., Katoh, H., Fukuhara, T., Taguwa, S., Moriishi, K., and Matsuura, Y.	Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus.	Virology	412	211-219	2011
Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M	Identification of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication.	Antimicrob Agent Chemother	EPub ahead of Print		2011

Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S, <u>Sakamoto N</u> , Izumi N	Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in IL28B with antiviral response.	Hepatology	55(1)	20-29	2011
Ueyama M, Nakagawa M, <u>Sakamoto N</u> , Onozuka I, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Kitazume A, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Sekine-Osajima Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Ochanomizu-Liver Conference Study Group.	Serum interleukin-6 levels correlate with resistance to treatment of chronic hepatitis C infection with pegylated-interferon-alpha2b plus ribavirin.	Antivir Ther	16(7)	1081-1091	2011
Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, <u>Sakamoto N</u> , Enomoto N, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M	Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C.	Human Molecular Genetics	20 (17)	3507-3516	2011
Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, <u>Sakamoto N</u> , 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
Funaoka Y, <u>Sakamoto N</u> , Suda G, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe T, Mishima K, Ueyama M, Onozuka I, Nitta S, Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Watanabe M.	Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91.	J Virol	85(12)	5986-5994	2011
Watanabe T, <u>Sakamoto N</u> , Nakagawa M, Kakinuma S, Itsui Y, Nishimura-Sakurai Y, Ueyama M, Funaoka Y, Kitazume A, Nitta S, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Oooka S, Watanabe M	Inhibitory effect of a triterpenoid compound, with or without alpha interferon, on hepatitis C virus infection.	Antimicrob Agents Chemother	55(6)	2537-2545	2011
Yamamoto M, <u>Sakamoto N</u> , Nakamura T, Itsui Y, Nakagawa M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Azuma S, Tsuchiya K, Kato T, Wakita T, Watanabe M	Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture.	Hepatol Res	41	258-269	2011
<u>Sakamoto N</u> , Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Yuki NS, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M. Ochanomizu-Liver Conference Study Group.	Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b.	J Med Virol	83	871-878	2011
Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, <u>Ikeda M</u> , Dansako H, <u>Wakita T</u> , Kato N.	The ESCRT System Is Required for Hepatitis C Virus Production.	PLoS One	6	e14517	2011

Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, <u>Wakita T</u> , Yamamoto K, Kato N.	Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: potential treatment for hepatitis C.	Liver Int	31	871-880	2011
Mori K, <u>Ikeda M</u> , Ariumi Y, Dansako H, <u>Wakita T</u> , Kato N.	Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system.	Virus Res	157	61-70	2011
Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, <u>Ikeda M</u> , Kato N.	Plural assay systems derived from different cell lines and hepatitis C virus strains are required for the objective evaluation of anti-hepatitis C virus reagents.	Biochem Biophys Res Commun.	409	663-668	2011
Hikosaka K, Noritake H, Kimura W, Sultana N, Skarkar MTK, Tagawa Y, Uezato T, Kobayashi Y, <u>Wakita T</u> , <u>Miura N</u>	Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occludin in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry.	Biomed Res	32(2)	143-150	2011
Kimura W, Machii M, Xue X-D, Sultana N, Hikosaka K, Sharkar MTK, Uezato T, Matsuda M, Koseki H, <u>Miura, N</u>	Irx11 mutant mice show reduced tendon differentiation and no patterning defects in musculoskeletal system development.	Genesis	49(1)	2-9	2011
Yoshida T, Takayama K, Kondoh M, Sakurai F, Tani H, <u>Sakamoto N</u> , Matsuura Y, <u>Mizuguchi H</u> , <u>Yagi K</u> .	Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection.	Biochem Biophys Res Commun	416(1-2)	119-124	2011
Yoshida T, Kondoh M, <u>Yagi K</u> .	Promising targets for anti-hepatitis C virus agents.	Curr Med Chem	18(8)	1239-1244	2011
Yoshida T, Kondoh M, Ojima M, Mizuguchi H, Yamagishi Y, <u>Sakamoto N</u> , <u>Yagi K</u> .	Adenovirus vector-mediated assay system for hepatitis C virus replication.	Nucleic Acids Res	39(10)	e64	2011
Kakutani H, Takahashi A, Kondoh M, Sakihama T, Hamakubo T, <u>Yagi K</u> .	A novel screening system for claudin binder using baculoviral display.	PLoS One	18(8)	1239-1244	2011
Yoshida T., Takayama K., Kondoh M., Sakurai F., Tani H., <u>Sakamoto N.</u> , Matsuura Y., <u>Mizuguchi H.</u> , <u>Yagi K.</u>	Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection.	Biochem Biophys Res Commun	416	119-124	2011
Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Tashiro K., Katayama K., Hayakawa T., Furue M.K., <u>Mizuguchi H.</u>	Efficient and selective generation of two distinct endoderm lineages from human ES and iPS cells by differentiation stage-specific SOX17 transduction.	PLoS One	6	e21780	2011
Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T., Furue M.K., <u>Mizuguchi H.</u>	Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX.	Mol Ther	19	400-407	2011

IV. 研究成果の刊行物・別冊

Chapter Number

Kaposi's Sarcoma-Associated Virus Governs Gene Expression Profiles Toward B Cell Transformation

Keiji Ueda¹, Emi Ito², Masato Karayama³, Eriko Ohsaki¹
Kazushi Nakano and Shinya Watanabe²

¹*Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology
Osaka University Graduate School of Medicine*

²*Department of Clinical Genomics, Translational Research Center
Fukushima Medical University*

³*Department of Infectious Diseases, Hamamatsu University School of Medicine
Japan*

1. Introduction

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), also called human herpesvirus-8 (HHV-8) was found in patients' specimens as a causative agent of Kaposi's sarcoma by representational difference analysis (RDA) (Chang et al., 1994). Initially identified fragments by RDA were KS330Bam and KS631Bam, which showed a sequence similarity to a portion of the open reading frame (ORF) 26 open reading frame encoding the capsid protein VP23 of herpesvirus saimiri (HVS) and the amino acid sequence encoded by the corresponding BDLF1 ORF of Epstein-Barr virus (EBV), and to the tegment protein, ORF75 and also the tegment protein of EBV, BNRF1 (p140), respectively. The following full sequence analysis revealed that KSHV was belonging to the γ -herpesvirus subfamily, the genus rhadinovirus rather than lymphocryptic virus and could be a new oncogenic DNA virus (Moore et al., 1996; Russo et al., 1996).

KSHV is supposed to infect various kinds of tissue *in vitro* at least by using integrin $\alpha V\beta 3$ as a receptor (Garrigues et al., 2008) and establishes latency in B cells (Chen and Lagunoff, 2005). KSHV has been reported to infect a primary endothelial cell and can transform it into a spindle cell which is a characteristic feature of the oncogenic activity of KSHV in endothelial cells (Lagunoff et al., 2002) However, it has not been revealed effective *in vitro* infection to primary peripheral blood mononuclear cells (PBMC), which of course include B cell, as EBV can form lymphoblastoid cell lines (LCL). Extensive studies so far have revealed that KSHV should be an etiologic agent for Kaposi's sarcoma (KS), multicentric Castleman's disease (MCD), and primary effusion lymphoma (PEL) (Hengge et al., 2002a; Hengge et al., 2002b).

It is quite a big question how oncogenic viruses are involved in their related cancers. Especially limited host ranges of viruses only infecting with humans make this question more unanswerable. One approach to get a hint about this question and solve it is to see gene expression profiles of viruses-associated tumors. Recently, we analyzed three types of typical lymphocyte-originated tumor cell lines-primary effusion lymphoma (PEL) cell lines,

1 T cell leukemia cell lines (TCL), Burkitt lymphoma (BL) cell lines-and two sets of PBMCs-in
2 order to know how PEL was generated by searching characteristic gene expression profiles.
3 Our approach, however, might be just to show typical gene expression profiles after
4 establishment of PEL cell lines and it may be very difficult to account for viral pathogenesis
5 only by gene expression profiles. Needless to say, we need an experimental model to
6 observe the whole process from virus infection to cancer formation. In this chapter, we
7 discuss about how KSHV is involved in PEL formation and what to do next to solve
8 questions about viral oncogenesis.

9 2. Characteristic features of KSHV

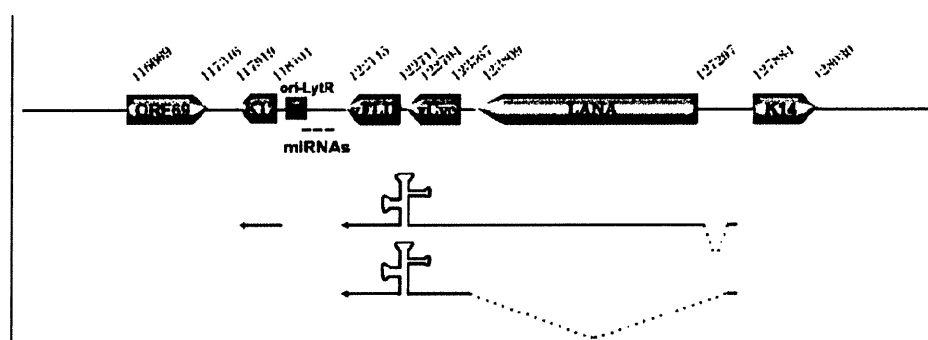
10 KSHV is a γ -herpesvirus mentioned above and the genome is double stranded linearized
11 DNA about 170kb long including GC-rich repetitious repeat called terminal sequences (TR),
12 the unit of which is 801bp and repeated 30~50 times at the end of the genome though the
13 sequence and the repeated unit might be different among clones. The unique region of the
14 genome is about 140kb long and encodes more than 80 genes, most of which are lytic genes
15 (Russo et al., 1996). The linearized genome is circularized at the TR after entry into cells and
16 usually stealthies as an episome not going to full lytic replication.

17 2.1 KSHV life cycles

18 Like the other herpesviruses, KSHV has two typical life cycles called lytic infection (or
19 reactivation from latency) and latent infection. Lytic infection/reactivation is a virus
20 producing cycle and probably all viral genes are expressed from immediate early (IE), early (E)
21 and late (L) genes in a cascade-like fashion. A key factor for lytic replication is Reactivation
22 Transcription Activator (RTA) (Chen et al., 2001; Lukac et al., 1998; Sun et al., 1998). RTA is a
23 very strong transactivator and trans-activates the other viral E genes such as *K-bZIP (K8)*, *orf57*,
24 *pan* including *kaposin (k12)*, a latent gene, not only through specific binding sequences but also
25 through an indirect mechanism (Sakakibara et al., 2001). When L genes are successfully
26 expressed, it leads to explosive daughter virus production, which is a final end of the viral life
27 cycle to disseminate viral infection and survive as its virus itself in nature.

28 On the other hand, latent infection is a viral stealthing state. The viral genome replicates
29 according to the host cell cycle and is partitioned into divided cells at least in KSHV infected
30 PEL cell lines (Ballestas, Chatis, and Kaye, 1999). The viral copy number per cell appears to
31 be maintained at the same (Ueda et al., 2006). In this state, expressing viral genes are
32 extremely limited to a few genes such latency-associated nuclear antigen (*lana*), viral cyclin
33 (*v-cyc*), viral flip (*v-flip*), kaposin (*k12*) and viral interferon regulatory factor 3 (*v-irf-3*)
34 (Paulose-Murphy et al., 2001). The former three genes are actually in one unit of gene (Fig.
35 1). *lana* and *v-cyc-v-flip* expression is regulated by alternative splicing. *v-cyc-v-flip* is in one
36 transcript and v-FLIP is translated through internal ribosome entry site (IRES). Although
37 *k12* is an independent gene, these four genes are present in one region and actively
38 expressed. It remains to be solved how latent genes are regulated, since neighbor genes just
39 upstream or downstream are tightly inactivated in a high density of genes in the genome.
40 Epigenetic marking might be important to establish this state but it is unclear how such an
41 effect itself is controlled (Toth et al., 2010). As for a virus, latency is a kind of poised state
42 waiting for lytic replication, because it could be unfavorable for the virus to disseminate and
43 expand its generation.

1



2

3 Fig. 1. The active gene locus around *lana*.

4 The viral latency might be the places for KSHV-associated malignancies mentioned below,
5 since such malignancies usually show viral latent infection. And therefore, it seems to be
6 quite important to understand what the viral latency is and it will give us hints to
7 investigate functions of the viral latent genes products. Nevertheless, if the viral latent
8 genes products work for cellular immortalization and/or transformation, there may be more
9 patients in KSHV infected people suffering from KSHV-associated malignancies. Thus, it
10 should be kept in our mind to take this idea into consideration when thinking how KSHV is
11 involved in cancer formation.

12 2.2 Latency-associated nuclear antigen (LANA)

13 LANA is one of the most actively produced viral factors and controls the viral latency.
14 Though LANA seems to be a multifunctional protein, important functions of LANA in the
15 latency are to support the viral genome replication, to partition the replicated viral genome
16 and to maintain the same genome copy number per cell, and to regulate the viral genes
17 expression (Han et al., 2010).

18 LANA has two binding sites called LANA binding sequences (LBS) in TR and replication
19 origin of the KSHV genome in latency (ori-P) consists of the LBS and the following 32bp GC-
20 rich segment (32GC) (Garber, Hu, and Renne, 2002; Garber et al., 2001). One of two LBS is
21 required for the viral replication at least but it is not enough, i.e., 32GC is also required (Hu
22 and Renne, 2005). Though it remains to be solved how the viral ori-P is determined among
23 repeated TR sequences and how 32GC is functioning, LANA has been reported to interact
24 with components of cellular replication machinery; origin recognition complex 1 to 6
25 (ORC1~ORC6) (Verma et al., 2006). Probably LANA binds with LBS and recruits ORCs on the
26 ori-P to start replication. It is, however, very questionable whether LANA binds all ORCs at
27 the same time. LANA also interacts with a histone acetyltransferase binding to ORC1 (HBO1)
28 and epigenetic control around ori-P is may be more important (Stedman et al., 2004).

29 LANA is supposed to interact with a chromosome component, since the viral genomes are
30 found in the vicinity of chromosomes and actually reported to bind with a histone such as
31 H2B, and with Bub1, CENP-F and so on (Barbera et al., 2006; Xiao et al., 2010). Such
32 interaction might account for the viral genome partition and maintenance, though the detail
33 is unclear.

34 LANA regulates the viral genes expression and maybe cellular gene expression by interacting
35 with components involved in heterochromatin formation such as heterochromatin protein 1
36 (HP1) and histone methyl transferase, *suv39H1*. LANA binds with LBS and recruits such

1 factors on the viral genome, which forms heterochromatin-like environment of the genome
2 and as a whole inactive gene expression (Sakakibara et al., 2004).

3 Viral genes expressed in the latency might have oncogenic activities because KSHV-associated
4 malignancies are usually in latency setting. Multifunctional LANA interacts with many
5 cellular factors other than those mentioned above. Several mechanisms are thought how
6 LANA works in the viral oncogenesis. LANA interacts with suppressive oncogenes such as
7 p53 (Friborg et al., 1999) as the other oncogenic DNA viral genes products. We have
8 confirmed that LANA interacts with p53 to degradade (Suzuki et al., 2010) but not pRb (our
9 personal observation). It was also reported that LANA interacted with glycogen synthase
10 kinase 3 β (GSK3 β) and blocked β -catenin degradation pathway that was promoted β -catenin
11 phosphorylation by GSK3 β (Liu et al., 2007). On the other hand, stably LANA expressing cells
12 are, however, very difficult to establish, which means that LANA expression might give
13 disadvantage for cell growth rather than cell growth promotion (our personal observation).

14 **2.3 viral Cyclin (v-CYC)**

15 KSHV encodes a cyclin D homologue termed v-cyclin, which is translated from alternatively
16 spliced mRNA covering the *lana-v-cyc-v-flip* region (Li et al., 1997) (Fig. 1). v-CYC interacts
17 with cyclin dependent kinase 6 (CDK6) and promotes G1-S progression (Godden-Kent et al.,
18 1997; Swanton et al., 1997). The Cyclin D-CDK6 complex is to function to exit from G0 to G1
19 phase (Laman et al., 2001) and the v-cyc/CDK6 complex is resistant to inhibition by CDK
20 inhibitors by p16, p21 and p27 (Jarviluoma et al., 2004). Thus, its real function has not been
21 elucidated and it was reported that ectopic or overexpression of c-CYC evokes rather
22 cell/DNA damage (Koopal et al., 2007).

23 **2.4 viral FLICE inhibitory protein (v-FLIP)**

24 KSHV encoded *v-flip*, a homologue of cellular flip (*c-flip*) is expressed as co-transcript with
25 *v-cyc* and translated via internal ribosome entry site (IRES). v-FLIP activates NF- κ B to
26 maintain PEL cell tumor phenotype (Guasparri, Keller, and Cesarman, 2004). Inhibition of
27 NF- κ B activity and knocking down v-FLIP lead to KSHV infected PEL cell death (Keller,
28 Schattner, and Cesarman, 2000). NF- κ B activity is also required for maintenance of KSHV
29 latency (Ye et al., 2008) and v-FLIP, thus, may sustain the viral latency in B cells to stand by
30 for oncogenic transformation and maintain the transformed phenotype (de Oliveira, Ballon,
31 and Cesarman, 2010). Oncogenic activity of v-FLIP was also reported and in transgenic
32 mice models, v-FLIP expression induces B cell transdifferentiation and tumorigenesis
33 (Ballon et al., 2011). Furthermore, v-FLIP represses cell death with autophagy by interacting
34 Atg3 (Lee et al., 2009).

35 **2.5 Kaposin (K12)**

36 *Kaposin* is a uniquely transcribed at the edge of the active transcription region of the KSHV
37 genome (Li et al., 2002). There are three frames around this region and probably a major
38 gene is so-called *kaposin B* whose C-terminal region is corresponding to K12 ORF. Open
39 reading frame (ORF) of KAPO SIN B contains reiterated proline-rich, 23-amino acid direct
40 repeats, since this region includes one of two ori-Lyt sequences (lytic replication origin)
41 (Sadler et al., 1999). KAPO SIN B activates p38 mediated mitogen-activated protein kinase
42 [MAPK]-associated protein kinase 2 (MK2) make AU-rich 3' UTR containing mRNA
43 stabilize (McCormick and Ganem, 2005). Activation of p38, on the other hand, was reported