

201228003A

厚生労働科学研究費補助金

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

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆宇

平成25（2013）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

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

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成25（2013）年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究の総括 ..... 1  
脇田 隆宇

### II. 分担研究報告

1. B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明の総括 ..... 19  
脇田 隆宇
2. HBV 遺伝子発現における転写後調節機構の解析 ..... 23  
鈴木 哲朗
3. HBV タンパク質の発現、酵素活性および結合因子の解析 ..... 25  
梁 明秀
4. ウイルスタンパク質および関与する宿主因子の構造解析 ..... 29  
朴 三用
5. HBV タンパク質に結合する環状ペプチドの探索 ..... 31  
菅 裕明
6. HBV ゲノムを誘導発現可能なマウスモデルの作成と解析 ..... 33  
千葉 勉
7. HBV タンパク質と相互作用する宿主タンパク質の構造と機能の解析 ..... 37  
堀田 博
8. B型肝炎ウイルス増殖と細胞死・細胞極性との関連の解析 ..... 43  
竹原 徹郎
9. HBx の組み込み様式とその機能解析 ..... 47  
加藤 直也
10. HBV 感染と小胞体ストレスに関する解析 ..... 51  
飯島 沙幸

11. B型肝炎ウイルス薬剤耐性株の耐性発現機序の解析	53
加藤 孝宣	
12. HBV の生活環における宿主脂質の役割	55
相崎 英樹	
13. HBx タンパク質と相互作用する細胞側因子の同定	59
岡本 徹	
14. 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HBV preS 領域変異の検討	61
榎本 信幸	
15. カプシド蛋白を標的とした抗 HBV 薬の同定と開発	65
馬場 昌範	
16. Mechanism underlying containment of HBV replication in chronic HBV-infection	71
Akbar Sheikhmohammadfazole	
17. B型肝炎ウイルス肝炎により誘導される宿主因子の網羅的プロテオーム解析	75
森川 賢一	
<b>Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>	<b>79</b>
<b>Ⅳ. 研究成果の刊行物・別冊</b>	<b>89</b>

# I . 総括研究報告

## B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

研究代表者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆字

研究要旨： B型肝炎は逆転写酵素阻害剤が臨床に導入されて抗ウイルス療法が可能となった。しかし、逆転写酵素阻害剤単剤の治療ではウイルス排除に向けた根治は困難で、ウイルス量の制御のために抗ウイルス薬を中止することも難しい。さらに薬剤耐性ウイルス出現のリスクがある。従って、多くのB型肝炎ウイルスキャリアの治療法開発、改善のために新たな抗B型肝炎ウイルス治療薬の開発が望まれている。しかし、B型肝炎の基礎研究は必ずしも進んでいない。

そこで本研究ではB型肝炎の新規治療薬開発に向けて、ウイルスの感染複製増殖機構の解明を目指す。B型肝炎ウイルスは標的細胞の表面に吸着した後、細胞内へ侵入し、そのヌクレオキャプシドが核へ運ばれる。核内でヌクレオキャプシド内の不完全二重鎖 DNA が完全二重鎖となり、いわゆる cccDNA となる。cccDNA からは複数のウイルス RNA が転写され、転写された RNA から翻訳されるコアタンパクが形成するキャプシドに pregenomic RNA が逆転写酵素と共にパッケージングされ、ヌクレオキャプシドを形成する。pregenomic RNA はキャプシド内でマイナス鎖 DNA に逆転写され、さらにプラス鎖 DNA が合成され不完全二重鎖 DNA となる。ヌクレオキャプシドは HBs 抗原を表面に持つエンベロープを被り、ウイルス粒子が完成して細胞外へ分泌される。このウイルスの生活環の各過程を詳細に検討し、関与する宿主因子の同定などを通じてそのメカニズムを解明する。さらに、各過程の解析から新たな抗ウイルス薬標的を同定する。本研究班はB型肝炎研究の基盤を支える若手研究者を育成し、他のB型肝炎創薬研究班との連携を進める。

研究分担者 鈴木 哲朗  
浜松医科大学医学部 教授

研究分担者 梁 明秀  
横浜市立大学医学部 教授

研究分担者 朴 三用  
横浜市立大学 教授

研究分担者 菅 裕明  
東京大学大学院 教授

研究分担者 千葉 勉  
京都大学大学院 教授

研究分担者 堀田 博  
神戸大学大学院 教授

研究分担者 竹原徹郎  
大阪大学大学院 教授

研究分担者 加藤直也  
東京大学大学院 特任准教授

研究分担者 飯島 沙幸  
名古屋市立大学大学院 研究員

研究分担者 加藤孝宣  
国立感染症研究所 室長

研究分担者 相崎英樹  
国立感染症研究所 室長

研究分担者 岡本透  
大阪大学微生物研究所 助教

研究分担者 榎本信幸  
山梨大学大学院 教授

研究分担者 馬場昌範  
鹿児島大学大学院 教授

研究分担者 Akbar Sheikhmohammadfazle  
東芝病院研究部 主任研究員

研究分担者 森川賢一  
昭和大学医学部 助教

## A. 研究目的

HBV に対する新規治療薬開発に向けて、HBV 感染複製増殖機構の解明を目指す。ウイルスの生活環の各過程を網羅的かつ詳細に検討し、関与する宿主因子の同定などを通じてそのメカニズムを解明する。さらに、各過程の解析から新たな抗ウイルス薬標的を同定する。下記の研究項目について研究を進める。

1. ウイルス生活環各ステップを制御する因子の同定とその分子メカニズム解析、
2. 初期感染過程（ウイルス吸着から侵入、核への輸送）の解析、
3. cccDNA 転写機構、ウイルスゲノムインテグレーション機構、ウイルスゲノム複製機構の解析、
4. ウイルス構造蛋白質、逆転写酵素の発現、酵素活性、構造の解析、
5. ウイルス粒子形成および分泌機構の解析、
6. PreS 抗原、HBc 抗原、HBx 抗原の発現、機能、構造の解析、の研究を実施する。また、各分担研究者の研究を支援し、班内および他の班との共同研究を実施する。

## B. 研究方法

1. B 型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明の総括（脇田）

ヒト肝細胞移植キメラマウスへの HBV 感染モデルの樹立：マウスアルブミンプロモーターによりウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーターを発現するトランスジェニックマウス（AL-uPA マウス）は NOD マウス (Ito et al, Blood 2002 100(9): 3175-3182) をもとに作製され、生後肝不全を発症する。AL-uPA マウスを NOG マウスと戻し交配し、ホモ化したものが uPA-NOG マウスである (Suemizu et al, BBRC 2008 377:248-252)。uPA-NOG マウスは実中研で樹立され、実中研より供給される。凍結ヒト肝細胞を uPA-NOG マウスに経脾臓的に移植する。ヒト肝細胞移植 uPA-NOG マウスに B 型肝炎ウイルスを接種し、肝臓内でのウイルス増殖と組織像、さらに接種後部分採血した血液中のウイルスを解析する。

2. HBV 遺伝子発現における転写後調節機構の解析（鈴木）

pgRNA の PRE 領域 (nt 1225-1585) を *in vitro* で合成し BrU 標識した。標識 RNA に Huh7.5.1 細胞の核抽出液を反応させ、抗 BrU 抗体で免疫沈降して、PRE 領域に会合する核タンパク質を回収した。得られた共沈タンパク質を SDS-PAGE で展開し、有意に増加していると考えられ

るバンドを切り出し、プロテアーゼ消化、LC-MS/MS によりタンパク質同定を行った。

3. HBV タンパク質の発現、酵素活性および結合因子の解析（梁）

HBV DNA の逆転写酵素領域をヒト化コドンで最適化した人工 DNA を作製した。次にコムギ無細胞タンパク質合成系により HBV DNA ポリメラーゼ全長タンパク質および逆転写酵素+RNaseH 領域タンパク質を合成した。逆転写酵素の活性は、primer として DIG 標識した DNA を用い、合成される DNA にビオチン標識 dUTP を取り込ませることにより AlphaScreen を用いて検出した。また、鋳型を各阻害剤で対応できるように合成部分がランダム配列になるよう 40mer の RNA 鋳型を設計した。また、PolyA40mer を鋳型としたアッセイを同時に実施した。

4. ウイルスタンパク質および関与する宿主因子の構造解析（朴）

大腸菌発現系では宿主に大腸菌 BL21(DE3)RILP 株を、ベクターに pET28 および pGEX6P を用いることによって、His-Tag 融合蛋白質および GST 融合蛋白質の発現を試みた。バチルス発現系では HBx 蛋白質の遺伝子を含む pNCMO2、pNY326 ベクターを導入することによって HBx 蛋白質を菌体外へ分泌させる方法を試みた。

5. HBV タンパク質に結合する環状ペプチドの探索（菅）

当研究室で独自に開発した RaPID (Random non-standard Peptide Integrated Discovery) システムを駆使し、翻訳系を用いて特殊ペプチドを合成、薬剤探索にあてる。本年度は、その準備として、探索にあてるライブラリーの構築、ならびに細胞表面あるいはバキュロウイルス上に発現されたタンパク質への結合特殊ペプチドの探索法の開発おこなった。

6. HBV ゲノムを誘導発現可能なマウスモデルの作製と解析（千葉）

新規 B 型肝炎モデルマウスの作製：アルブミンプロモーター下に tet-on システムを連結し、薬剤誘導性に肝細胞に特異的に HBV 全タンパク質を発現するコンストラクトを作成した。薬剤による represser 制御能の検証には、HepG2 細胞に同コンストラクトを transfection し、薬剤誘導前後での血清中に分泌される HBs 抗原、HBe 抗原タンパク質の定量を行った。その後、作成したコンストラクトをマウス胚へ injection した。

HBV ゲノムの次世代シーケンサー解析：ヒト肝組織より

DNA を抽出し、超音波発生器を用いて断片化した。断片化した核酸の両側断端を酵素処理により修復した後、その断端に、アダプター配列タグを付加した。サンプルを、ゲノムアナライザー X を用いたペアエンド法により両端76塩基を読み取る大規模並列シーケンス解析を実施した。次世代シーケンサー解析により、各サンプルにおいて、約 1000 万から 3000 万塩基という膨大な量の塩基配列情報を得られる。

#### 7. HBV タンパク質と相互作用する宿主タンパク質の構造と機能の解析 (堀田)

タンデムタグ免疫沈降法・質量分析法: Huh7.5 細胞に Myc-His タグ付きの HBx タンパク質を発現させ、難溶性であるため、沈殿に 8 M 尿素を加えて溶解した。この HBx タンパク質を Ni-NTA アガロースにて精製した。HBx タンパク質を refolding させながら細胞溶解液中の HBx 結合タンパク質と反応させた。その後、イミダゾールで HBx タンパク質及び HBx 結合宿主タンパク質を溶出し、精製した複合体をさらに抗 c-Myc 抗体ビーズにて精製した。精製した HBx タンパク質複合体から質量分析法により HBx 結合宿主タンパク質の候補を同定した。

HBx タンパク質が宿主細胞の MAP キナーゼ経路や TGF- $\beta$ /Smad3 経路に及ぼす影響の解析: Huh7.5 細胞に発現プラスミドをトランスフェクションして HBx タンパク質を発現させ、1-3 日後に細胞を回収し、ウエスタンブロット法により c-Jun、p38 MAPK、ERK1/2 及び Smad3 の発現量及びリン酸化状態を解析した。

#### 8. B 型肝炎ウイルス増殖と細胞死・細胞極性との関連の解析 (竹原)

各種肝細胞株にソラフェニブを投与し、オートファジーの変化を検討した。HBV 感染細胞系として、Huh6 細胞株に genotype C の HBV を発現するベクターを組み込んだ HB611 細胞株、及び HepG2 細胞株に genotype D の HBV を発現するベクターを組み込んだ HepG2.2.15 細胞株を使用した。細胞死の評価として WST 細胞増殖アッセイを行い、アポトーシスの評価として caspase3/7 活性を測定した。また細胞極性・細胞内輸送を制御する Rab11a の検討のために、siRNA を用いたノックダウン実験を行った。

#### 9. HBx の組み込み様式とその機能解析 (加藤直也)

データベースから、ジェノタイプ C の HBV X 遺伝子の全長塩基配列を抽出し、さらに肝癌の有無が明らかになっている患者血清から得られた塩基配列に絞って、

HBV X 遺伝子の肝癌関連変異の解析を行った。CAG プロモーター下に HBx を発現するプラスミドを用いて、SRE、SRF、CRE、NF- $\kappa$ B、NF-AT、AP-1 各シグナル伝達経路の活性化につきレポーターアッセイで検討した。活性化が顕著に認められるシグナル伝達系を選択し、Huh7 細胞を用いて、レポーターベクターの stable transformant の樹立を試みた。次に、複製可能なジェノタイプ C の HBV 1.4 倍長を含むプラスミドを入手し、そこから X 遺伝子をテトラサイクリン存在下で発現するベクターにサブクローニングした。

10. HBV 感染と小胞体ストレスに関する解析 (飯島)  
HBV 感染による ER stress 関連遺伝子の発現プロファイルを経時的に確認: HBV 感染実験に用いたヒト肝臓キメラマウスの肝臓から RNA を抽出し、RTD-PCR にて 8 個の遺伝子について発現解析を行い、非感染コントロールサンプルと比較した。HBV genotype C クローンと S 蛋白のみ産生する変異体クローンを Huh7 細胞にトランスフェクションしウイルス産生をさせた。その細胞内の ER stress 関連因子の発現をリアルタイム PCR 法で定量した。Genotype 間の ER stress レベルの比較: HBV 遺伝子型によってウイルス複製率・ウイルス蛋白発現量は異なった傾向を示すが、それらの差異が ER stress レベルに影響するか検討する。また、HBs 蛋白の各領域(PreS1, PreS2, S)についても検討する。

#### 11. B 型肝炎ウイルス薬剤耐性株の耐性発現機序の解析 (加藤孝宣)

エンテカビル投与により HBV-DNA の陰性化が見られなかった症例および HBV-DNA の再上昇を認めた症例など、耐性ウイルスの存在が疑われる症例の血清から DNA を抽出後、HBV polymerase の RT 領域の塩基配列を決定した。一部の症例では、HBV ゲノム全長を PCR にて増幅した後に全長の塩基配列を決定し、その情報をもとに HBV ゲノムすべての ORF を含むような 1.3 倍長の HBV ゲノム配列を持つ複製モデルコンストラクトを作製した。

12. HBV の生活環における宿主脂質の役割 (相崎)  
HBV 初期感染過程における細胞内脂質の役割: 細胞内脂質が初期感染過程に与える影響を調べるため、DMSO、hydrocortisone 等を加え、1 ヶ月培養した分化 HepaRG 細胞に HMG-CoA reductase 阻害剤 lovastatin を添加した 3 時間後に HBV を感染させ、12 日間培養後、細胞上清中の HBs 量を ELISA 法で測定した。

HBV 後期感染過程における細胞内脂質の役割：細胞内脂質が後期感染過程に与える影響を調べるため、テトラサイクリンを除くことで HBV pgRNA を産生する HepAD38 細胞株を用いて、テトラサイクリンを除くと同時に lovastatin を添加し、6 日後の培養上清中の HBV DNA 量を realtime PCR 法で測定した。

### 1 3. HBx タンパク質と相互作用する細胞側因子の同定 (岡本)

OSF タグを付加した HBx を 293T 細胞に発現させ、ストレプトタグビーズを用いて、HBx に結合活性を示すタンパク質を精製し、質量分析によってタンパク質を同定した。その中で、ヒストン脱メチル化に関与する JMJD5 に注目し、その結合を免疫沈降法と酵母ツーハイブリッド法で確認した。さらに、JMJD5 ノックダウン細胞を作製し、培養上清中に放出される HBV のゲノム量を定量的 PCR によって検討した。

### 1 4. 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HBV preS 領域変異の検討 (榎本)

B 型肝炎のウイルス量が 4 未満で肝炎の活動性が臨床的に認められないキャリア群 12 例、ならびに肝癌を合併した肝硬変症 12 症例における血清から PreS-S 領域をパイロシーケンサーをもちいて deep sequence を行い、HBs 抗原量の値と含めて、臨床的関連性について検討した。

### 1 5. カプシド蛋白を標的とした抗 HBV 薬の同定と開発 (馬場)

*In silico* スクリーニング：169,320 種類の薬剤からなるデータベースから、薬剤として好ましい条件（分子量：350-600、水素結合数：<13、回転可能な結合数：<7、logP：0-6）を有する化合物を選別し、それぞれの薬剤の配座解析を行った。*In silico* スクリーニングの標的分子である HBV カプシド蛋白複合体の結晶構造 [Protein Data Bank (PDB) ID: 1QGT] に水素原子を付加し、構造の最適化を行うことで、カプシド-カプシド蛋白間のインターフェイスにおけるポケットサイトを同定した。このサイトを標的とし、薬剤の *in silico* スクリーニングアッセイを行い、ドッキングスコアを計算した。次に、ドッキングスコアとドッキングポーズが良い化合物 19 種類を選別し、*in vitro* アッセイ系を用いて抗 HBV 活性を評価した。

抗 HBV アッセイ：*In silico* スクリーニングにより選出された薬剤は、HepG2.2.15 細胞のクローン HepG2.2.15.7 を用いて、抗 HBV 効果について検討した。種々の濃度の

薬剤を添加後 3 日目に、同じ濃度の薬剤を含む新鮮な培養液と交換し、さらに 3 日間培養した。培養上清は lysis buffer にてウイルス粒子を融解した後、リアルタイム PCR 方を用いて、ウイルス DNA の定量を行った。

### 16. Mechanism underlying containment of HBV replication in chronic HBV-infection (アクバル)

本研究では動物モデルおよび臨床研究を実施した。HBV DNA、HBsAg、HBeAg を発現するトランスジェニックマウス(HBV TM)を使用した。さらに慢性 B 型肝炎症例のウイルス増殖および肝障害を検討した。

### 1 7. B 型肝炎ウイルス肝炎により誘導される宿主因子の網羅的プロテオーム解析 (森川)

HBV 蛋白発現調整細胞株を樹立する。HBV 蛋白非発現群と発現群を SILAC 法にて標識しプロテオーム解析による比較検討し、HBV により誘導される宿主因子を検討する。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報情報を厳格に管理保存する。

また、ヒト初代培養肝細胞は、京都大学附属病院移植外科においておこなわれた先天性代謝異常症患者への生体肝臓移植において切除された患者肝臓組織を用いて作成されたものである。この研究はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認されたものである。肝臓や血液提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

## C. 研究結果

### 1. B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明の総括 (協田)

ヒト肝細胞移植キメラマウスへの HBV 感染モデルの樹立

初代ヒト肝細胞を経脾臓的に AL-uPA マウスへ移植した。当初はマウス血清中ヒトアルブミン値が 30-150ug/ml 程度と低値だったが、移植手技の改善や肝細胞のロットの変更により移植効率が改善した。1,800ug/ml 以上のアルブミン値を示したマウス 5 匹に遺伝子型 D の HBV を接種した。2 匹に  $10^6$  copy, 3 匹に  $10^7$  copy の HBV DNA を静脈内に接種した。 $10^7$  copy 接種のマウス 3 匹中 2 匹は接種後 1-2 週間で血液中 HBV DNA の上昇を確認し、7-8 週間には  $10^9$  copy/ml に到達した。 $10^6$  copy 接種マウスも 1 匹も 4 週後から血液中の HBV DNA が上昇を開始し、1 2 週間には  $10^9$  copy/ml に到達した。残りの 2 匹は 5-8 週間目から HBV DNA が上昇し始めたが、 $10^6$  から  $10^8$  copy/ml にしか到達しなかった。

## 2. HBV 遺伝子発現における転写後調節機構の解析 (鈴木)

HBV-PRE に特異的に会合していると考えられるバンドを切り出し、質量分析を行ったところ、計 23 個のタンパク質が同定された。それらはすべて RNA への会合が報告されているタンパク質であり、その中で PTB は HBV-PRE との会合が報告されていた。また RNA の二次構造や二重鎖 RNA を認識して会合することが報告されているものが 4 種類含まれた。一方、23 タンパク質をタンパク質間相互作用の観点から相互作用モデルを作成すると、mRNA 核外輸送にかかわる複合体の構成因子 (PRE binding Nuclear export factor: PRE-NEX 1-8) とスプライシングに関わる複合体の構成因子 (PRE binding Splicing factor: PRE-SF 1-7) および同定分子間では相互作用が報告されていない因子 (PRE binding protein: PRE-BP 1-8) に分類された。

## 3. HBV タンパク質の発現、酵素活性および結合因子の解析 (梁)

HBV-polymerase 合成および可溶性の検討: HBV DNA ポリメラーゼ全長および HBV 逆転写酵素+RNA 分解酵素領域の転写鋳型を作製し、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて翻訳を行った。その結果、HBV DNA ポリメラーゼ全長タンパク質の合成量はきわめて少なく、また非常に不溶性であった。種々の界面活性剤を添加して合成を行ったところ界面活性剤の種類と濃度によって可溶性を促進するものが見られた。今後は合成された逆転写酵

素の活性確認を行い、適した Detergent の選択を行う。

AlphaScreen による Reverse Transcriptase 活性検出: 3'側にビオチン化したプライマーおよび、DIG 標識した基質 dNTP を添加し、各種 RT の存在下で合成反応を行った。次にアルファスクリーン試薬を付加し 30 分、室温でインキュベート後、検出した。得られた結果を集計し、逆転写酵素活性を計算した。その結果、PolyA/DIG-oligo(dT)15 を用いた場合において、若干のカウントが検出された。また、検討した海面活性剤の中では、Tween-20(0.25%)が最も S/N 比が高くなっていた。

PAGE による RT 活性検出: 鋳型 RNA に Cy3 標識した primer を混合後、HBV-polymerase または HIV RT を添加し、逆転写酵素阻害剤 (3TC) の存在下において逆転写反応を行った。その後、電気泳動で、RT による生成産物をスミアバンドにて検出した。HBV-full および HBV-RT のレーンにおいてもスミアバンドが見られたが、3TC 添加でもバンドは消失せず、また polymerase(-)のレーンにも同様のバンドが確認できていることから、これらのバンドは非特異的なものと考えられた。今後は HBV-full および HBV-RT の合成量および活性を増加させることが必要であると考えられる。

## 4. ウイルスタンパク質および関与する宿主因子の構造解析 (朴)

大腸菌発現系においては、His-Tag、GST 融合型共に HBx 蛋白質の発現が確認されたが、ほぼすべて不溶性であり、構造解析に用いる蛋白質を得るには至らなかった。天然変性状態を予測するアルゴリズムを用いて HBx 蛋白質のフォールディングを確認したところ、1~50 残基は構造をとっていないことが予測されたため、その部位を除いた箇所( $\Delta 50$ )に関して同様の発現実験を行ったが、やはり可溶性の蛋白質を得ることは出来なかった。

バチルス発現系に関しては、そもそも蛋白質の発現が見られず、HBx 蛋白質の発現には適していない系であった。

今後は全長および  $\Delta 50$  の HBx 蛋白質の発現を目指し、昆虫細胞発現系(Sf-9)およびヒト細胞発現系(HEK293)を用いて発現の確認を行っていく予定である。

## 5. HBV タンパク質に結合する環状ペプチドの探索 (菅)

本年度は、標的蛋白質が共同研究者から手元に届いていないため、探索が瞬時に始められるように特殊ペプチドライブラリーの構築と、標的蛋白質の発現・精製が困

難な場合を想定し、細胞表面あるいはバキュロウイルス上に発現されたタンパク質への結合特殊ペプチドの探索法の開発おこない、その技術の確立を得た。

6. HBV ゲノムを誘導発現可能なマウスモデルの作製と解析 (千葉)

**新規 B 型肝炎モデルマウスの作製:** HBV 肝炎モデルマウス作成のためのコンストラクトの構築を行った。アルブミンプロモーター下に tet-on システムを連結し、doxycycline 投与により repressor が離れる新規システムを応用し、下流に全長の HBV 配列を連結した。作成したコンストラクトの薬剤による repressor 制御能を検証するために、HepG2 細胞に同コンストラクトを transfection し、doxycycline 投与前後で培養上清を回収し、産生・分泌された HBs 抗原、HBe 抗原タンパク質の定量を行うことにより、薬剤投与によりウイルス抗原タンパク質の発現制御が達成できていることを確認した。その後、作成したコンストラクトをマウス胚への injection を実施した。

**HBV ゲノムの次世代シーケンサー解析:** HBV に生じているゲノム変異を包括的に解析する。実際の B 型肝炎症例の肝組織で検出される HBV ゲノム変異の全体像を掌握することを目標として、ウイルスゲノムの deep sequencing 解析を行った。急性/劇症肝炎、慢性肝炎～肝硬変、肝細胞癌、それぞれの病態を形成する HBV ゲノムの全体像を検討する目的で、各臨床病態の肝組織から DNA を抽出し、HBV の amplicon の増幅をおこなった、引き続き、Deep sequencing 解析を行うことにより、HBV 感染により惹起されるそれぞれに病態において、肝組織中には極めて多彩な遺伝子変異を持つクローンが多数共存することが明らかとなった。興味深いことに、HBe 抗原陽性を示す肝硬変 6 例の組織中では既報通り全例において Pre-Core 野生型が major clone として時検出されたが、HBe 抗体が陽性となった seroconversion 後の 8 例の肝組織中でも 4 例(50%)では野生型が major clone であることが確認された。他方、HBe 抗原/抗体の seroconversion の有無に関わらず肝硬変症例の肝組織では core promoter 領域はすべて変異クローンで占められていることもわかった。以上から、HBe 抗原/抗体の seroconversion は、core promoter 領域や pre-Core 領域の変異以外のメカニズムが存在しているものと推測された。

7. HBV タンパク質と相互作用する宿主タンパク質の構造と機能の解析 (堀田)

**HBx 結合宿主タンパク質候補の同定:** HBx タンパク質発現 Huh7.5 細胞から得られた細胞抽出液を用いたタンデムタグ免疫沈降法及び質量分析法により、11 種類の HBx 結合タンパク質の候補が同定された。その中には、HBx タンパク質との結合が既に報告されている X-associated protein 2 (XAP-2) も含まれていた。このことは、今回用いたタンデムタグ免疫沈降法・質量分析法が適切に機能していたことを示唆した。他の 10 種類の候補因子について、HBx タンパク質との相互作用について更に詳細に解析を行う予定である。

**HBx タンパク質が宿主細胞の MAP キナーゼ経路や TGF- $\beta$ /Smad3 経路に及ぼす影響の解析:** HBx タンパク質を Huh7.5 細胞に一過性に強制発現させると、経時的に c-Jun 及び p38 MAPK のリン酸化の程度が顕著に増加した。一方、ERK のリン酸化は HBx タンパク質発現の 2 日目をピークに増加した。以上のように HBx タンパク質の発現により、JNK、p38 MAPK、ERK のシグナル伝達経路がそれぞれ異なるタイミングで活性化することが示された。一方、Smad3 についてはリンカー領域 (Smad3L) 及び C 末端領域 (Smad3C) のリン酸化の程度を解析したが、c-Jun 及び p38 MAPK の場合に比べると、HBx タンパク質発現の影響は明らかには認められなかった。

8. B型肝炎ウイルス増殖と細胞死・細胞極性との関連の解析 (竹原)

肝がん細胞株である Huh7 細胞株及び PLC/PRF/5 細胞株にソラフェニブを投与すると、濃度依存的、時間依存的にオートファジーの進行に必要な LC3-II の発現が亢進し、オートファジーによって特異的に分解される P62 の発現低下を認めた。電子顕微鏡像でもオートライソソームの増加を認め、肝細胞株でソラフェニブ投与はオートファジーを亢進させることが明らかとなった。

そこで、Huh6 細胞株と Huh6 細胞株に HBV ウイルスベクターを組み込んだ HB611 細胞株にソラフェニブを投与した。いずれの細胞株でもソラフェニブの投与で P62 の発現は減少し、オートファジーが促進された。しかし、ソラフェニブの投与で Huh6 細胞株に比し HB611 細胞株で細胞増殖はより顕著に抑制され、HB611 細胞株で細胞死が強く誘導された。そこでアポトーシスの指標である caspase3/7 活性を測定したが、Huh6 細胞株比し HB611 細胞株で有意な差を認めず、ソラフェニブによる HB611 細胞株での細胞死の増強はアポトーシス非依存的である可

能性が示唆された。次に HepG2 細胞株と HepG2.2.15 細胞株を用いて検討を行ったが、同様にソラフェニブは HBV を産生する HepG2.2.15 細胞でより強いアポトーシス非依存的な細胞死を誘導した。なお、ソラフェニブ投与では HB611 細胞、HepG2.2.15 細胞における HBV 産生に大きな差を認めなかった。

細胞極性・細胞内輸送に関わる HB611 細胞株の Rab11a を siRNA でノックダウンしたところ、細胞内 HBV-RNA 量は有意に増加した。一方でメEDIUM中の HBV-DNA 量は減少し、HBV ウイルス増殖・複製過程における Rab11a の関与が示唆された。

#### 9. HBx の組み込み様式とその機能解析 (加藤直也)

公開されているデータベースから X 遺伝子を含む 4223 シークエンスデータを入手し、ジェノタイプ C で全長の X 遺伝子領域を含む 791 シークエンスを抽出した。さらに、オリジナル資料の情報が参照でき、由来と診断が明らかとなっている 762 シークエンスを抽出した。そこからさらに血清由来の 617 シークエンスを抽出。肝癌グループの 96 シークエンス、非肝癌グループの 500 シークエンスを最終的に解析対象とした。

まず、核酸ベースで、 $\chi^2$  検定を行ったところ、肝癌グループと非肝癌グループ間で有意に異なる 22 塩基を見出した。うち 9 塩基はポリメラーゼとオーバーラップする領域内に、10 塩基はエンハンサー2 領域とオーバーラップする領域内に、5 塩基はコアプロモーター領域とオーバーラップする領域内にあった。これら 22 塩基につき、ロジスティック回帰分析を行ったところ、独立して肝癌と関連する 9 塩基 (nt1383, nt1479, nt1485, nt1626, nt1653, nt1719, nt1726, nt1762, nt1800) を抽出し得た。うち 3 塩基はポリメラーゼとオーバーラップする領域内に、4 塩基はエンハンサー2 とオーバーラップする領域内に、2 塩基はコアプロモーター領域とオーバーラップする領域内にあった。肝癌関連 9 塩基のうち、8 塩基はアミノ酸置換を伴うものであった。ポリメラーゼ領域とオーバーラップしている領域内の 3 塩基変異はアミノ酸置換をもたらさなかった。

Huh7 細胞に HBx を CAG プロモーター下に発現するプラスミドと、SRE、SRF、CRE、NF- $\kappa$ B、NF-AT、AP-1 の各シスエンハンサーエレメントをルシフェラーゼ遺伝子のの上流にもつプラスミドを共トランスフェクションし、細胞内シグナル伝達系の活性化をレポーターアッセイに

より検討した。SRE は約 1.8 倍、SRF は約 2.1 倍、CRE は約 1.6 倍、NF- $\kappa$ B は約 3.2 倍、NF-AT は約 2.1 倍、AP-1 は約 1.8 倍に活性化した。HBx は細胞内シグナル伝達経路を肝癌細胞においても活性化することを確認した。そこで最も顕著に活性化が認められた NF- $\kappa$ B レポーターベクターを恒常的に保持する Huh7 細胞の樹立を行っている。

#### 10. HBV 感染と小胞体ストレスに関する解析 (飯島)

HBV 感染群と非感染コントロール群を比較すると ER stress の指標となる因子の発現に差異が認められた。感染群では ARF6、PERK 等の小胞体膜貫通キナーゼの発現が高く、ER stress シグナル経路が活性化していると考えられる。ER ストレスシャペロンである Grp78 は、これまでの知見の通りウイルス産生細胞で発現が高く、細胞内で ER stress が生じていると考えられる。同様に他の因子 (PERK, IRE1, ATF4) でコントロールと差異が確認された。

#### 11. B 型肝炎ウイルス薬剤耐性株の耐性発現機序の解析 (加藤孝宣)

エンテカビル治療を行うも、HBV-DNA 陽性のまま経過した 1 例、エンテカビル投与中に再上昇が見られた 2 例について検討を行った。これら 3 症例の HBV polymerase RT 領域を PCR で増幅し、ダイレクトシーケンスにて解析したところ、これらの症例はすべて Genotype C であり、これまで報告されている RT 領域のエンテカビル耐性変異は検出されなかった。しかしいずれの症例でも既報の薬剤耐性変異以外の部位に変異を認め、これらの変異が薬剤耐性に関与している可能性が考えられた。そこで、HBV-DNA 量の低下が見られず HBV-DNA 陽性のまま経過した症例の HBV 全ゲノム配列を決定しコンセンサス配列を作製した。得られたコンセンサス配列を元に 1.3 倍長のゲノム配列を持つ複製モデルコンストラクトを作製した。この複製モデルコンストラクトは HuH-7 細胞に導入し、その複製をサザンブロットで確認することができた。また、導入細胞をエンテカビルで処理する事により HBV 複製の低下を認め、この系によりエンテカビルの薬剤感受性が評価可能と考えられた。

#### 12. HBV の生活環における宿主脂質の役割 (相崎)

HBV 初期感染過程における細胞内脂質の役割 : lovastatin を添加しても細胞上清中の HBs 量に変化は認められなかった。

HBV 後期感染過程における細胞内脂質の役割 : lovastatin

を添加により細胞上清中の HBV DNA 量は減少傾向を示した。

### 1 3. HBx タンパク質と相互作用する細胞側因子の同定 (岡本)

HBx と相互作用する新規のタンパク質として JMJD5 を同定した。JMJD5 は HBx と酵母内でも相互作用が確認され、HBx の 75-94 アミノ酸領域で結合していた。また、JMJD5 の発現をノックダウンした HepG2.2.15 細胞の培養上清中のウイルスゲノム量が有意に低下していたことから、JMJD5 は HBx と相互作用することで HBV 複製に関与していることが示唆された。

### 1 4. 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HBV preS 領域変異の検討 (榎本)

PreS 欠失・変異は多くの症例にわずかなクローンとして存在するが、高齢化、肝病態の進展に、その割合は増大してくることが明らかになった。また HBs 抗原量は軽度の慢性肝炎症例よりも、むしろ肝硬変・肝癌などの病態の進行したものにおいて少ない傾向を認めた。しかし、これら HBs 抗原量の少ない病態進展症例では PreS の変異・欠失が多い症例が多かった。

### 1 5. カプシド蛋白を標的とした抗 HBV 薬の同定と開発 (馬場)

カプシド蛋白間のインターフェイスを標的とする *in silico* スクリーニング：カプシドーカプシド蛋白間の相互作用を解析したところ、カプシド蛋白のアミノ酸残基、P20, D22, F23, F24, P25, D29, T33, L37, F110, F122, P135, A137, I139, L140 がインターフェイスに含まれ、さらにこれらのアミノ酸残基を含むサイトを解析したところ、薬剤がはまり込むポケットサイトが同定された。このポケットサイトに対して 169,320 薬剤の *in silico* スクリーニングを行った。また、ドッキングスコアの良い 50 種類の化合物のカプシドタンパク質との相互作用解析を行うと、結合する可能性のあるアミノ酸には、インターフェイスに存在するアミノ酸残基 D22, F23, P135, A137, I139, L140 が含まれており、標的として用いたポケットサイトが適切であることが示された。また、選出された薬剤はこれらのアミノ酸の相互作用を阻害し、カプシド形成を出来なくすることで、抗 HBV 活性を示す可能性がある。抗 HBV 効果：*In silico* スクリーニングで選別された 50 種類の薬剤のうちから、19 種類の薬剤を入手し、それらの HepG2.2.15.7 細胞における抗 HBV 効果を調べた。その際

に、抗 HBV 薬として臨床で使用されている lamivudine (3TC) を比較薬剤として用いた。19 種類の薬剤の大部分は、細胞からのウイルス産生を全く抑制しないか、あるいは逆に増強させた。しかし、一部の薬剤に関しては、10  $\mu$ M の濃度において、明らかに培養上清中の HBV DNA の量を減少させた。これらの薬剤の中で、ドッキングスコアおよび抗 HBV 効果が最も優れていた薬剤 No. 289 を選んで、さらに詳しくその抗 HBV 効果について検討した。まず、3TC の抗 HBV 効果について検討したところ、3TC は 1  $\mu$ M の濃度ではほぼ完全ウイルスの産生を抑制した。この濃度において、上清中には薬剤を添加しない時と比較して、約 10% の HBV DNA が検出されるが、それ以上濃度を上げて、この DNA 量は減少しない。このことはウイルス遺伝子の新たな産生を完全に抑制しても、HBV が DNA ウイルスであるため、それまでに産生されたウイルスが引き続き培養上清中へ放出されるためであると思われる。また、3TC は 0.1  $\mu$ M の濃度でも約 75% のウイルス量を減少させることから、*in vitro* においては非常に強力な抗 HBV 薬であることが分かった。薬剤 289 も濃度依存性に上清中の HBV DNA 量を減少させた。本薬剤は 10 および 50  $\mu$ M の濃度で、上清中のウイルス量をそれぞれ約 45% および 75% 減少させた。一方、この薬剤は 50  $\mu$ M の濃度においても、生細胞数に対してほとんど影響を与えなかった。以上のことから、薬剤 289 は弱いながらも選択的な抗 HBV 効果を有することが明らかとなった。

### 16. Mechanism underlying containment of HBV replication in chronic HBV-infection (アケバル)

HBV トランスジェニックマウスに免疫修飾薬を投与することにより、免疫反応が修飾された。非特異的な免疫修飾薬では肝障害の増強が観察された。しかし、HBV DNA や HBsAg、HBeAg の血中レベルに変化はなかった。一方で、HBsAg および HBsAg/HBcAg-based vaccine の投与により、HBV DNA や HBsAg、HBeAg の低下が観察された。肝障害は誘導されなかった。臨床研究で、HBsAg および HBsAg/HBcAg-based vaccine を投与された慢性 B 型肝炎症例では約半数に HBV DNA の低下や ALT 値の正常化を観察した。

### 1 7. B 型肝炎ウイルス肝炎により誘導される宿主因子の網羅的プロテオーム解析 (森川)

今年度はプラスミドの構築を行い、細胞株を樹立に向け進行中である。細胞株樹立の後、SILAC 法にて比較プ

ロテオーム解析を施行する予定である。

#### D. 考察

これまでの肝炎対策研究によりHCVの基礎研究は飛躍的に進み、HCVキャリアに対する抗ウイルス療法は改善されてきた。しかし、HBVキャリアに対する治療法は未だに不十分であり、より良い治療法を提供することが必要である。HCV研究の経験からもウイルスの基礎研究の進展が効果的な新規抗ウイルス薬の開発に最も重要と考えられる。従って、B型肝炎に対する創薬研究を進めるためにHBVの感染複製増殖機構の解析はすべての研究の要となる。我が国におけるHBV研究のレベルを世界最高水準に引き上げることを目指す。また、B型肝炎創薬研究では研究班の間の連携が重要である。本研究の研究成果はウイルス培養系・動物モデル開発・創薬スクリーニングなどの研究班に提供する。また、肝炎ウイルス研究にかかわる若手研究者の育成をおこなう。今年度は、研究班会議を2回実施した。また、肝炎研究基盤整備事業により感染研ウイルス第二部で実施している肝炎ウイルスセミナーやシンポジウムにも研究班の分担研究者の研究室に所属する若手研究者に参加を呼びかけた。

各分担研究者による研究は順調に開始され、初年度であり程度には差があるもののすでに研究成果が得られている。来年度はさらに多くの成果が期待できる。

#### E. 結論

- ・uPA-NOG マウスにヒト肝細胞を移植して、HBV 感染感受性を確認した。

- ・ HBV-PRE に結合する 23 種類の宿主因子を同定した。今後、これらの機能解析を通じて HBV 転写後調節の分子機構を明らかにし、新規創薬標的を見出す。

- ・ コムギ無細胞タンパク質合成系と AlphaScreen を用いた酵素活性アッセイ系を組み合わせることにより、HBV 逆転写酵素を標的とする新たな in vitro 薬剤スクリーニング系の構築を試みた。AlphaScreen を用いたアッセイ系では特異的な酵素活性が確認されており、今後、RT タンパク質の合成および可溶化の効率を上昇させることでアッセイ系の構築が期待できる。

- ・ 細菌を用いた発現系を用いて HBx 蛋白質の発現を試みたが、全長、および構造を保っていると予想された部位に関して、どちらも可溶性の蛋白質を得ることは出来

なかった。今後は細胞を用いた発現系を試みることによって、蛋白質の大量発現を目指す予定である。

- ・ 細胞表面に発現された標的に関しては、そのバックグラウンドを除去する為には、ネガティブセレクション用の細胞を用意することはもちろんのこと、非常に厳密な条件検討を必要とすることが分かった。一方、バキュロウイルス上に発現されたタンパク質では、細胞上よりもバックグラウンドを下げて探索ができることがわかり、実質的にはこの両者の組み合わせによる探索が好ましいと考えている。

- ・ HBV の病態解明と創薬ターゲットの絞り込みを達成することを目標とし、ヒト B 型肝炎を模倣する肝細胞に全長 HBV を発現する新しいモデルマウスの作製と、実際の臨床病態に 관련된 肝組織中の HBV ゲノムの特性の解析を行った。

- ・ HBx タンパク質発現 Huh7.5 細胞の抽出液を用いたタンデムタグ免疫沈降法及び質量分析法により、11 種類の HBx 結合宿主タンパク質の候補を同定した。また、HBx タンパク質の一過性発現により、JNK、p38 MAPK、ERK がそれぞれ異なるタイミングで活性化された。一方、HBx タンパク質の Smad3 シグナル伝達経路への影響は今回の実験系では明らかには認められなかった。

- ・ ソラフェニブは肝細胞のオートファジーを促進した。このソラフェニブによる細胞死機構の解明を行うことで、HBV 感染細胞の排除に向けた創薬開発がすすむことが期待される。また、Rab11a は細胞内輸送を司る蛋白としても知られており、今後、HBV 増殖過程における細胞内輸送を検討する。

- ・ 肝癌関連 HBx 変異を同定した。HBx のトランス転写活性化を阻害する薬剤のハイスループットスクリーニング系を樹立中である。

- ・ 肝線維化が認められた HBV 感染キメラマウス肝臓において ER stress 因子の発現上昇が確認された。マイクロアレイ解析で抽出された遺伝子を詳細に検討し、宿主側のメカニズム解明に繋げるとともに Genotype ごとの S 蛋白の影響を比較検討する。

- ・ エンテカビル治療に抵抗性の患者から同定された変異がエンテカビル耐性に関与しているかの検討が必要である。今後、得られた HBV の配列を持つ複製モデルコンストラクトを用い、同定された変異がエンテカビル耐性に与える影響を解析する。

・細胞内脂質が HBV の生活環に影響を与えている可能性が考えられた。

- ・ HBx と結合する新規分子として JMJD5 を同定した。JMJD5 は HBV の複製に関与していることが示唆された。
- ・ deep sequence による HBV の quasispecies 解析を行うことにより、日本における B 型肝炎の臨床的特徴を明らかにしうる可能性が考えられ、B 型慢性肝疾患の病態理解が進むことが考えられた
- ・ HBV のカプシド蛋白を標的とする薬剤の *in silico* アッセイ系を確立し、それを用いて薬剤ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、ドッキングスコアの高い 50 種類の薬剤を選び出した。その中の 19 種類について、抗 HBV アッセイを行ったところ、濃度依存的にウイルスの産生を抑制する薬剤を同定することに成功した。
- ・ 病原性免疫と予防的免疫について解析を進めることにより、B 型肝炎の病体について新しい理解が進むことが期待できる。
- ・ HBV 細胞モデルを構築し、HBV 蛋白発現下において誘導される宿主因子を網羅的にプロテオーム解析することにより、宿主因子をターゲットとした創薬へと繋がる事が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Narita Y, Murata T, Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T, Kimura H, Tsurumi T. Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication. *J Virol.* 87(4):2120-27, 2012.
- 2) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A. Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu. *Sci Signal.* 245(5): ra73, 2012.
- 3) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J Proteomics.* 75(15): 4863-73, 2012.
- 4) C. J. Hipolito, H. Suga “Ribosomal production and in vitro selection of natural product-like peptidomimetics: The FIT and

RaPID systems” *Current Opinion in Chemical Biology* 16 196-203 (2012)

- 5) Y. Hayashi, J. Morimoto, H. Suga “In vitro selection of anti-Akt2 thioether-macrocyclic peptides leading to isoform-selective inhibitors” *ACS Chemical Biology* 7, 607-613 (2012)
- 6) K. Iwasaki, Y. Goto, T. Katoh, H. Suga “Selective thioether macrocyclization of peptides having the N-terminal 2-chloroacetyl group and competing two or three cysteine residues in translation” *Organic & Biomolecular Chemistry* 10, 5783-5786 (2012)
- 7) Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, Kou T, Yazumi S, Fujiwara T, Tsuchiya S, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing. *PLoS ONE.* 2012; 7: e35052.
- 8) Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Nishijima N, Chiba T, Uemoto S. Efficacy and safety of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living donor liver transplantation. *Hepatol Res.* 2012; 43: 67-71.
- 9) Chiba T, Marusawa H, Ushijima T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs: Mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. *Gastroenterology.* 2012; 143: 550-563.
- 10) Okuyama S, Marusawa H, Matsumoto T, Ueda Y, Matsumoto Y, Endo Y, Takai A, Chiba T. Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. *Int J Cancer.* 2012; 130: 1294-1301.
- 11) Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Mori A, Ogawa K, Yoshizawa A, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Chiba T. Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Viral Hepat.* 2012; 19: 32-38.
- 12) Osaki Y, Ueda Y, Marusawa H, Nakajima J, Kimura T, Kita R, Nishikawa H, Saito S, Henmi S, Sakamoto A, Eso Y, Chiba T. Decrease in alpha-fetoprotein levels predicts reduced incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection receiving interferon therapy. *J Gastroenterol.* 2012; 47: 444-451.
- 13) Takahashi K, Marusawa H, Chiba T. Large-scale

- identification of effector genes that mediate the type I interferon antiviral response. *Gastroenterology* 2012; 142: 178-180.
- Shimizu T, Marusawa H, Endo Y, Chiba T. Inflammation-mediated genomic instability: roles of AID in carcinogenesis. *Cancer sci* 2012; 103:120-126.
- 14) Utsumi T, Yano Y, Lusida MI, Nasronudin, Amin M, Juniastuti, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Detection of highly prevalent hepatitis B virus co-infection with HIV in Indonesia. *Hepatol Res*, (in press)
- 15) El-Shamy A, Shindo M, Shoji I, Deng L, Okuno T, Hotta H. Polymorphisms of the core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, (in press)
- 16) Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Sianipar IR, Deng L, Hotta H. Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via down-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ . *J Virol*, 86(23): 12903-12911, 2012.
- 17) El-Shamy A, Shoji I, El-Akel W, Bilasy SE, Deng L, El-Raziky M, Jiang DP, Esmat G, Hotta H. NS5A sequence heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4a predicts clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy in Egyptian patients. *J Clin Microbiol*, 50(12): 3886-3892, 2012.
- 18) Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Horiguchi T, Sun X, Deng L, Shoji I, Hotta H, Sada K. HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinase Fyn in B cells. *PLoS ONE*, 7(10): e46634, 2012.
- 19) Yano Y, Seo Y, Miki A, Saito M, Kato H, Hamano K, Oya M, Ouchi S, Fujisawa T, Yamada H, Yamashita Y, Tani S, Hirohata S, Yoon S, Kitajima N, Kitagaki K, Kawara A, Nakashima T, Yu H, Maeda T, Azuma T, El-Shamy A, Hotta H, Hayashi Y. Mutations in non-structural 5A and rapid viral response to pegylated interferon- $\alpha$ -2b plus ribavirin therapy are associated with therapeutic efficacy in patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *Int J Mol Med*, 30(5): 1048-1052, 2012.
- 20) Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Kim KI, Ide YH, Deng L, Shoji I, Tanaka Y, Hasegawa Y, Ota M, Hotta H. Prediction of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C genotype 1b and high viral load. *J Gastroenterol*, 47(10): 1143-51, 2012.
- 21) Shoji I, Deng L, Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Front Microbiol*, 2: A278, 1-5, 2012.
- 22) El-Shamy A, Shoji I, Kim SR, Ide Y, Imoto S, Deng L, Yoon S, Fujisawa T, Tani S, Yano Y, Seo Y, Azuma T, Hotta H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy. *PLoS ONE*, 7(2): e30513, 2012.
- 23) Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, Hotta H. A point mutation at ASN-534 that disrupts a conserved N-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis c virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization. *J Med Virol*, 84(2): 229-234, 2012.
- 24) Nawa T, Ishida H, Tatsumi T, Li W, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Hosui A, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N, Takehara T. Interferon- $\alpha$  suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via the protein kinase C pathway. *Virology*. 432: 452-459, 2012.
- 25) Sakamoto T, Tanaka Y, Kani S, Sugiyama M, Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the Dependence of Hepatitis B Virus Genotype G on Co-infection with Other Genotypes for Viral Replication. *J Viral. Hepat.*, in press.
- 26) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsuhashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon-I in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut.*, 2012 Nov 7. [Epub ahead of print]
- 27) Liu HM, Aizaki H, Machida K, Ou JH, Lai MM. Hepatitis C virus translation preferentially depends on active RNA replication. *PLoS One*. 2012;7:e43600.
- 28) Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology*. 2012;10:29-38.
- 29) Murayama A, Sugiyama N, Watashi K, Masaki T, Suzuki R, Aizaki H, Mizuochi T, Wakita T, Kato T. Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus

- RNA and core antigen quantitative assays. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1943-9.
- 30) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and Measurement of ATP Levels in Living Cells Replicating Hepatitis C Virus Genome RNA. *PLOS Pathogen* 2012;8:e1002561.
- 31) Moujalled DM, Cook WD, Okamoto T, Murphy J, Lawlor KE, Vince JE, Vaux DL. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Dis*, 2013, Jan 17;4:e465
- 32) Okamoto T, Zobel K, Fedorova A, Quan C, Yang H, Fairbrother WJ, Huang DC, Smith BJ, Deshayes K, Czabotar PE. Stabilizing the Pro-Apoptotic BimBH3 Helix (BimSAHB) Does Not Necessarily Enhance Affinity or Biological Activity. *ACS Chem Biol*, 2012, Dec 10. [Epub ahead of print]
- 33) Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J Virol*, 2012, 87, 489-502.
- 34) Giam M, Okamoto T, Mintern JD, Strasser A, Bouillet P. Bcl-2 family member Bcl-G is not a proapoptotic protein. *Cell Death Dis*, 2012, Oct 11;3:e404.
- 35) Okamoto T, Campbell S, Mehta N, Thibault J, Colman PM, Barry M, Huang DC, Kvensakul M. Sheeppox Virus SPPV14 Encodes a Bcl-2-Like Cell Death Inhibitor That Counters a Distinct Set of Mammalian Proapoptotic Proteins. *J Virol*, 2012, 86, 11501-11511.
- 36) Yamamoto M, Okuyama M, Ma JS, Kimura T, Kamiyama N, Saiga H, Ohshima J, Sasai M, Kayama H, Okamoto T, Huang DC, Soldati-Favre D, Horie K, Takeda J, Takeda K. A cluster of interferon- $\gamma$ -inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 2012, 37, 302-12.
- 37) Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. The serum RANTES level influences the response to pegylated-interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *Hepatol Res*. 2012, in press.
- 38) Sueki R, Maekawa S, Miura M, Kadokura M, Komase K, Shindo H, Kanayama A, Ohmori T, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Correlation between pretreatment viral sequences and the emergence of lamivudine resistance in hepatitis B virus infection. *J Med Virol*. 2012 Sep;84(9):1360-8.
- 39) Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of Both Protease and Helicase Activities of Hepatitis C Virus NS3 by an Ethyl Acetate Extract of Marine Sponge *Amphimedon* sp. *PLoS One*. 2012;7(11):e48685.
- 40) Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. IL-28B (IFN- $\lambda$ 3) and IFN- $\alpha$  synergistically inhibit HCV replication. *J Viral Hepatitis*. 2012, in press.
- 41) Maekawa S, Sakamoto M, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Komatsu N, Shindo K, Kanayama A, Ohmori T, Amemiya F, Takano S, Yamaguchi T, Nakayama Y, Kitamura T, Inoue T, Okada S, Enomoto N. Comprehensive analysis for viral elements and IL28B polymorphisms in response to peginterferon plus ribavirin therapy in hcv-1b infection. *Hepatology*. 2012 May 10.
- 42) Yamashita A, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Mar Drugs*. 2012 Apr;10(4):744-61.
- 43) Ordonez P, Hamasaki T, Isono Y, Sakakibara N, Ikejiri M, Maruyama T, Baba M. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of novel 6-substituted 1-benzyl-3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*. 56: 2582-2589 (2012).
- 44) Toyama M, Hamasaki T, Uto T, Aoyama H, Okamoto M, Hashimoto Y, Baba M. Synergistic inhibition of HTLV-1-infected cell proliferation by combination of

- cepharanthine and a tetramethylnaphthalene derivative. *Anticancer Res.* 32: 2639-2646 (2012).
- 45) Sohl CD, Kasiviswanathan R, Kim J, Pradere U, Schinazi RF, Copeland WC, Mitsuya H, Baba M, Anderson KS. Balancing antiviral potency and host toxicity: identifying a nucleotide inhibitor with an optimal kinetic phenotype for HIV-1 reverse transcriptase. *Mol. Pharmacol.* 82: 125-133 (2012).
- 46) Chande AG, Baba M, Mukhopadhyaya R. A single step assay for rapid evaluation of inhibitors targeting HIV type 1 Tat mediated long terminal repeat transactivation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28: 902-906 (2012).
- 47) Sakuma S, Suita M, Inoue S, Marui Y, Nishida K, Masaoka Y, Kataoka M, Yamashita S, Nakajima N, Shinkai N, Yamauchi H, Hiwatari K, Tachikawa R, Uto T, Baba M. Cell-penetrating peptide-linked polymers as carriers for mucosal vaccine delivery. *Mol. Pharm.* 9: 2933-2941 (2012).
- 48) Kumamoto H, Kawahigashi S, Wakabayashi H, Nakano T, Miyaie T, Kitagawa Y, Abe H, Ito M, Haraguchi K, Balzarini J, Baba M, Tanaka H. Tuning efficiency of the 4-exo-trig cyclization by the electronic effect: ring closure of 3,3-difluoro-4-pentenyl carbon radicals and synthesis of a gem-difluorocyclobutane nucleoside. *Chem. Comm.* 48: 10993-10995 (2012).
- 49) Thiyagarajan A, Salim MTA, Balaraju T, Bal C, Baba M, Sharon A. Structure based medicinal chemistry approach to develop 4-methyl-7-deazaadenine carbocyclic nucleosides as anti-HCV agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22: 7742-7747 (2012).
- 50) Uto T, Toyama M, Nishi Y, Akagi T, Shima F, Akashi M, Baba M. Uptake of biodegradable poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles and antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Results Immunol.* 3: 1-9 (2013).
- 51) Nakamura M, Matsumoto Y, Toyama M, Baba M, Hashimoto Y. Organosilicon compounds as adult T-cell leukemia cell proliferation inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* 61: 237-241 (2013).
- 52) Hamasaki T, Okamoto M, Baba M. Identification of novel inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 replication by *in silico* screening targeting cyclin T1/Tat interaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* in press.
- 53) Haraguchi K, Takeda S, Kubota Y, Kumamoto H, Tanaka H, Hamasaki T, Baba M, Painsil E, Cheng Y-C. From the chemistry of epoxy-sugar nucleosides to the discovery of anti-HIV agent 4'-ethynylstavudine – Festinavir. *Curr. Pharm. Des.* in press.
- 54) Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Abe M, Hiasa Y, Onji M.. Strong and multi-antigen specific immunity by hepatitis B core antigen (HBcAg)-based vaccines in a murine model of chronic hepatitis B: HBcAg is a candidate for a therapeutic vaccine against hepatitis B virus. *Antiviral Res.* 2012;96(1):59-64
- 55) Akbar SM, Hiasa Y, Al-Mahtab M, Onji M. Dendritic cell-based immune therapy in liver diseases. *Current Immunology Review* 2012; 8(1): 28-36
- 56) Al-Mahtab M, Akbar SM, Rahman S, Kamal M, Khan MSI. Biochemical, virological, immunological and histopathological features of 702 incidentally detected chronic hepatitis B virus carriers in Bangladesh. *Digestion* 2012; 86 (1): 1-5
- 57) Hoshino H, Hino K, Miyakawa H, Takahashi K, Akbar SM, Mishiro S. Inter-genotypic recombinant hepatitis C virus strains in Japan noticed by discrepancies between immunoassay and sequencing. *J Med Virol* 2012; 84: 1018-1024
- 58) Miyashita K, Kang J-H, Saga A, Takahashi K, Shimamura T, Yasumoto A, Fukushima H, Sogabe S, Konishi K, Uchida K, Fujinaga A, Matsui T, Sakura Y, Tsuji T, Maguchi H, Taniguchi M, Abe N, Akbar SM, Arai M, Mishiro S. Three Cases of Acute or Fulminant Hepatitis E Caused by Ingestion of Pork Meat and Entrails in Hokkaido, Japan; Zoonotic Food-Borne Transmission of Hepatitis E Virus and Public Health Concerns. *Hepato Res.* 2012; 42(9):870-878.
- 59) Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol.* 2012 86(19):10805-20.
- 60) Inokuchi M, Ito T, Nozawa H, Miyashita M, Morikawa K, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Arai J, Shimazaki T, Hiroishi K, Imawari M. Lymphotropic hepatitis C virus has an interferon-resistant phenotype. *J Viral Hepat.* 2012 19(4):254-62.
- 61) Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T,

Mizokami M, Wakita T. Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone. *Microbiol Immunol.* 2012 May;56(5):308-17.

62) Lange CM, Kutalik Z, Morikawa K, Bibert S, Cerny A, Dollenmaier G, Dufour JF, Gerlach TJ, Heim MH, Malinverni R, Müllhaupt B, Negro F, Moradpour D, Bochud PY; Swiss Hepatitis C Cohort Study Group. Serum ferritin levels are associated with a distinct phenotype of chronic hepatitis C poorly responding to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy. *Hepatology.* 2012 Apr; 55(4):1038-47.

6 3) 進藤 道子, El-Shamy Ahmed, 奥野 忠雄, 堀田 博. C型慢性肝炎時から肝癌発生まで経過を追えたC型肝炎ウイルスジェノタイプ1bのコア蛋白アミノ酸多様性と肝癌発生との関連性. *肝臓*, 53(9): 541-548, 2012.

6 4) 田中純子, 小山富子, 相崎英樹. C型肝炎ウイルス(HCV)による感染. *日本臨床ウイルス学会、臨床とウイルス*, 2012;40:28-35.

6 5) 相崎英樹, HCV感染と代謝異常(脂質・エネルギー)、*医学の歩み*, 2012; in press.

6 6) 相崎英樹, HCV粒子形成に関与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析, *Liver Forum in Kyoto 第14回学術集会記録集、メディカルトリビューン*, 2012;30-33.

6 7) 相崎英樹, C型肝炎ウイルスの生活環、細胞、ニューサイエンス社、東京、2012; in press.

6 8) 馬場昌範. 抗ウイルス薬研究の歴史と進歩, 特集「抗ウイルス薬—最近の動向—」. *日本臨床*. 70: 553-557 (2012).

6 9) 馬場昌範. 抗ウイルス薬の開発. 柳 雄介, 堤 裕幸(編集)「新編 ウイルスの今日的意味」pp117-126, 医薬ジャーナル社 (2012).

7 0) 馬場昌範. 抗ウイルス薬の歴史と分類、特集「抗ウイルス療法の現状と今後の展望」. *臨床と微生物*40: 3-7 (2013).

7 1) 濱崎隆之, 馬場昌範. 抗ウイルス薬. *医薬ジャーナル増刊号「新薬展望2013」* 49: 102-108 (2013).

## 2. 学会発表および講演など

1) Hiroaki Suga 「The nontraditional peptide therapeutics」 AACR Annual Meeting, Chicago, IL USA; 3.31.2011-4.4. 2012

2) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Natural Product-Like Peptides against Therapeutic Targets」 Asia TIDES

Oligonucleotide and Peptide Research, Technology and Product Development, Las Vegas, NV USA; 5.20-5.23. 2012

3) Hiroaki Suga 「Non-Traditional Peptide Therapeutic Leads」 Colby-Sawyer College New London, NH USA; 8.5-8.10. 2012

4) Hiroaki Suga 「RaPID system: A new discovery tool of natural product-like peptides from de novo libraries」 3rd International Symposium on DNA-encoded chemical libraries, Zurich, Switzerland; 8.20. 2012

5) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 EFMC-ISMC 2012 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry, Berlin, Germany; 9.2-9.6. 2012

6) Hiroaki Suga 「 RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 ICCP2012-International Conference on Circular Proteins, Heron island, Australia; 10.14-10.17. 2012

7) Hiroaki Suga 「 RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 13th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Bangkok, Thailand; 11.25-11.27. 2012

8) Hiroaki Suga 「 RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 13th Tetrahedron Symposium, Taipei, Taiwan; 11.27-11.30. 2012

9) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 Flexizyme, FIT and RaPID: The enabling technologies for probes discovery, Olmué, Chile; 12.2-12.6. 2012

10) Deng L, Chen M, Jiang DP, Shoji I, Hotta H. Up-regulation of MAPK phosphatase 3 is involved in HCV-induced suppression of FoxO1 phosphorylation. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

11) Jiang DP, Ratnoglik S L, Aoki C, Deng L, Shoji I, Hotta H. Development of therapeutic and preventive vaccines against Hepatitis C virus. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

12) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. Identification and characterization of a novel NS5A-interacting protein, SMYD3. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

13) Matsui C, Shoji I, Deng L, Hotta H. HCV infection

- induces lysosomal degradation of hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  via interaction with HCV NS5A protein. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
- 14) H Hikita, T Kodama, S Tanaka, Y Saito, S Shimizu, M Shigekawa, W Li, T Miyagi, T Kanto, N Hiramatsu, T Tatsumi, T Takehara. (2012) Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Boston, USA, November 8 - 12.
- 15) Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Hinako Tsunematsu, Kumiko Nishio, Takatoshi Nawa, Minoru Shigekawa, Satoshi Shimizu, Wei Li, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, T Takehara. (2012) Bid and Bim are essential regulators involving the intrinsic pathway of apoptosis in hepatocytes in the absence of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Boston, USA, November 8 - 12.
- 16) Kowaki T, Ngoc PH, Fukuhara T, Okamoto T, Matsuura Y, Identification of host factors interact with hepatitis B virus X protein. 第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
- 17) Baba M, Uto T, Akagi T, Akashi M. Induction of potent cellular immunity by antigen-carrying biodegradable poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles: A potential candidate for an anticancer vaccine adjuvant. 17th World Congress on Advances in Oncology and 15th International Symposium on Molecular Medicine, October 12, 2012, Crete, Greece.
- 18) Akbar SM, Chen S, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Myeloid-derived suppressor cells; a critical regulator of intrahepatic immunity in chronic HBV infection. 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 16-19<sup>th</sup> February 2012, Taipei, Taiwan
- 19) Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Hiasa Y, Onji M. Mechanism underlying insignificant therapeutic effects of combination of antiviral and vaccine therapy in patients with chronic hepatitis B: need of maintenance of hepatitis B core antigen-specific immune responses. 6<sup>th</sup> Annual World Vaccine Congress Asia 2012, 11-14<sup>th</sup> June 2012, Singapore
- 20) Akbar SM and Al-Mahtab. Bridging clinical outcome with immunological events for preclinical and clinical trial. 14<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis and liver Disease (ISVHLD), Shanghai, China, June 22-25<sup>th</sup> 2012
- 21) Akbar SM, Al-Mahtab M, Aguilar J, Onji M, Mishiro S. Activation of Dendritic Cells and Induction of Antigen-Specific Immunity by a Therapeutic Vaccine Containing Both HBsAg and HBcAg Administered Through Nasal Route in Chronic Hepatitis B; A Patient-Friendly and Evidence-Based Therapeutic Approach
- 22) Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Hiasa Y, Onji M. HBsAg-specific immune responses by HBcAg-pulsed dendritic cells: Role of antigen and adjuvant in therapeutic vaccine against chronic hepatitis B. 9<sup>th</sup> Turkish Hepato Gastroenterology Congress. September 26-30, 2012, Cyprus, Turkey
- 23) Akbar SM. Designing and Engineering Immune Therapy Against Chronic HBV infection. APASL 3<sup>rd</sup> Single Topic Conference on HBV. Dhaka, Bangladesh, October 6<sup>th</sup> -7<sup>th</sup>
- 24) Akbar SM. Immune pathogenesis of HBV-related liver damages. 6<sup>th</sup> Annual Meeting of Pakistan Society for the Study of Liver Diseases. Karachi, Pakistan, December 14-16 2012.
- 25) Kenichi Morikawa, Jérôme Gouttenoire, Huong T. L. Tran, François Penin, Markus H. Heim, Manfredo Quadroni and Darius Moradpour. Identification of GPx8 as a Novel Cellular Substrate of the Hepatitis C Virus NS3-4A Protease. Annual meeting of AASLD. Boston, USA, 9-13 November 2012. Poster.
- 26) Kenichi Morikawa, Jérôme Gouttenoire, Huong T. L. Tran, François Penin, Markus H. Heim, Manfredo Quadroni and Darius Moradpour. Identification of GPx8 as a Novel Cellular Substrate of the Hepatitis C Virus NS3-4A Protease. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italia, 5-9 October 2012. Oral.
- 27) Kenichi Morikawa, Jérôme Gouttenoire, Huong T. L. Tran, Markus H. Heim, Manfredo Quadroni and Darius Moradpour. IDENTIFICATION OF GPX8 AS A NOVEL CELLULAR TARGET OF THE HEPATITIS C VIRUS NS3-4A PROTEASE. Annual Meeting of SGG Interlaken, Switzerland, 20-21 September 2012. Oral.
- 28) 渡士幸一、内田奈々、大東卓史、史与原知子、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆宇、IL1およびTNF-alphaのB型肝炎ウイルス感染阻害活性、第60回日本ウイルス学会学術