

201321003A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成26（2014）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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成26（2014）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 3
脇田 隆字

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 2 1
脇田 隆字
2. HBV 遺伝子発現における転写後調節機構の解析 2 5
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 2 8
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 3 1
朴 三用
5. HBV タンパク質に結合する環状ペプチドの探索 3 4
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 3 6
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 . . . 4 1
堀田 博
8. HBV の増殖機構におけるオートファジーの影響 4 7
宮城 琢也
9. HBx の組込み様式とその機能解析 5 0
加藤 直也
10. 創薬を目指した HBV 感染による肝線維化メカニズムの解明 5 3
飯島 沙幸

11. 患者血清由来株を用いた HBV 複製系による薬剤感受性の評価	5 6
加藤 孝宣	
12. HBx タンパク質と相互作用する細胞側因子の同定	5 9
岡本 徹	
13. Deep sequence を用いた PreS 変異と HBV 肝病態進展の検討	6 2
榎本 信幸	
14. カプシド蛋白を標的とした抗 HBV 薬の同定と開発	6 5
馬場 昌範	
15. Mechanism underlying containment of HBV replication in chronic HBV-infection	7 3
Akbar Sheikhmohammadfazole	
16. HBV 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	7 6
森川 賢一	
17. HBV 逆転写酵素の生化学的研究と阻害剤開発のためのハイスループットスク リーニング系の開発	7 9
豊田 哲哉	
18. HBV ゲノムの核内維持機構の解析	8 2
有海 康雄	
19. HBx 蛋白の機能解析と HBx 蛋白および関連する宿主因子を標的とした新規ク ラス治療薬創出に関する研究	8 6
朝比奈 靖浩	
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	9 3

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 隆宇

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 加藤孝宣 国立感染症研究所 室長
研究分担者 梁 明秀 横浜市立大学医学部 教授	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 朴 三用 横浜市立大学 教授	研究分担者 榎本信幸 山梨大学大学院 教授
研究分担者 菅 裕明 東京大学大学院 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 千葉 勉 京都大学大学院 教授	研究分担者 Akbar Sheikhmohammadfazole 東芝病院研究部 主任研究員
研究分担者 堀田 博 神戸大学大学院 教授	研究分担者 森川賢一 昭和大学医学部 助教
研究分担者 宮城琢也 大阪大学大学院 助教	研究分担者 豊田 哲也 長寿医学研究所 副所長
研究分担者 加藤直也 東京大学大学院 准教授	研究分担者 有海 康雄 熊本大学エイズ学研究センター 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 朝比奈靖浩 東京医科歯科大学 教授

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（脇田）

HBV の感染感受性が確認されている HepaRG 細胞および初代培養肝細胞を用いて初期感染過程を阻害する化合物のスクリーニングを実施した。感染源として用いる HBV は HepAD38 細胞あるいは HBV プラスミドを導入した HepG2 細胞の培養上清を用いた。HepG2. 2. 15 細胞および HepAD37 細胞を用いて HBV の cccDNA 検出系を構築した。細胞内の cccDNA を Hirt の変法により抽出した。

2. HBV 遺伝子発現における転写後調節機構の解析（鈴木）

PRE 結合因子のノックダウン解析では、各 20nM siRNA を HuH-7 細胞へ導入し、36 時間後に 1.24 倍長の HBV ゲノム（遺伝子型 Ce）を導入した。さらに 24 時間培養後、細胞からトータル RNA を抽出し pgRNA 量を RT-qPCR で評価、細胞及び上清中の HBs 抗原をウェスタンブロットにより検出した。強制発現実験では、各 PRE 結合因子を N 末端に FLAG タグを付加した形で発現するよう pcDNA3.1 (Invitrogen 社) にサブクローン化した。作製した発現ベクターと HBV ゲノムを同時に HuH-7 細胞へトランスフェクションし 72 時間後に細胞トータル RNA 及び細胞、上清タンパク質を回収し pgRNA、HBs 抗原を解析した。

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）

HepG2 細胞に HBV 全長をコードする pUC19-C-AT と Tetherin を共発現させ、細胞上清中に放出さ

れるウイルス DNA 量及び HBs 抗原量を測定することでウイルス複製効率を計算した。in vitro アッセイでは、コムギ無細胞蛋白質合成系を用いて HBV 各蛋白質を合成し、AlphaScreen 法を用いて、Tetherin との結合を検出した。また、HIV-1 Gag-Pol 発現 HEK293 細胞に HBs を共発現させ、HBs の Tetherin 抑制能および HIV 粒子産生への影響について考察した。

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）

HBV DNA ポリメラーゼの大量発現系として大腸菌、BL21 (DE3) RILP、BL21Star (DE3) pLysS、ArcticExpress (DE3) の 3 種類を用い、プラスミドは、pET23a と pColdII ベクターの 2 種類を使用した。各々のプラスミドには、HBV DNA ポリメラーゼの全長及びドメイン (TP、RT、RH、RTRH) を挿入した。可溶性を上げるため、アミロイド前駆体蛋白質の超酸性領域を用いたタグ (FATT タグ) を N 末端に付加し 3C プロテアーゼサイトを、また転写翻訳を確認する為に、C 末端に TEV プロテアーゼサイト GFPeHis₆ を付加した。培養条件は、O. D.₆₀₀=1 付近で、1 mM IPTG 添加後、37°C、4 時間及び 20°C (AE (DE3) と pColdII の組み合わせは 13°C) 終夜培養で行った。

X タンパク質 (cHBx) の大量発現大腸菌として、BL21 (DE3) RILP、BL21star (DE3) pLysS を用いた。プラスミドには、pET28 及び pColdII ベクターの 2 種類を使用した。共に N 末端に His タグが付加される。X タンパク質の全長及び、90 残基までの 2 つを構築した。HBV DNA ポリメラーゼ同様、可溶性タグの FATT タグを付加したのもも作成。培養条件は、O. D.₆₀₀=1 付近で、1 mM IPTG 添加後、37°C、4 時間及び 20°C (AE (DE3) と pColdII の組み合わせは 13°C) 終夜培養で行った。両蛋白質の発現確認は、20 mL LB 培養で行い、蛋白質発現を SDS-PAGE 上で確認した。

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。

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）

任意の時期に肝細胞に B 型肝炎ウイルス全タンパク質を発現し、肝炎としての免疫応答を惹起する新規モデルマウスの作成を進める。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、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

ストラクトを作成する。作成したコンストラクトの薬剤による represser 制御能の検証には、HepG2 細胞に transfection し、薬剤誘導前後での血清中に分泌される HBs 抗原、HBe 抗原タンパク質を定量した。その後、コンストラクトをマウス胚への injection を実施し、計 3 ラインの F0 マウスを確保した。免疫応答の成熟した成体マウスの肝組織に HBV タンパク質を特異的に発現するモデルとして、マウス尾静脈からの hydrodynamic injection 法を利用した新しいモデルの構築を行った。マウス肝細胞内でのプラスミドからの転写発現を効率的かつ長期間維持する目的で、人為的に CpG サイトを失活させたベクターに HBV タンパク質をコードする遺伝子配列を挿入した発現誘導ベクターを構築し、マウスへ hydrodynamic injection 投与した。

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)

タンデムタグ・アフィニティークロマトグラフィー/質量分析法: 全長 HBx は難溶性であるため、本実験では種々の欠失変異体を作製し、可溶性の高い HBx 欠失変異体を発現させて検討した。常法により、Huh7.5 細胞に Myc-His タグ付き HBx を発現させ、その細胞溶解液を Ni-NTA アガロースにて精製した。イミダゾールで HBx/宿主タンパク質複合体を溶出し、さらに抗 c-Myc 抗体ビーズを用いて精製した。精製した HBx 複合体を SDS-PAGE で分画し、銀染色により候補と考えられるバンドを切り出し、質量分析法により HBx 結合宿主タンパク質候補を同定した。

宿主細胞の酸化ストレス及び JNK 活性化に及ぼす HBx の影響の解析: Huh7.5 細胞に、酸化ストレス検出用の ARE ルシフェラーゼレポーター遺伝子 (pGL4.37) あるいは JNK 活性化検出用の AP1 RE ルシフェラーゼレポーター遺伝子 (pGL4.44) を、全長 HBx あるいは欠失変異 HBx 発現プラスミドとともにトランスフェクションして培養後、ルシフェラーゼ活性を指標にして、宿主細胞の酸化ストレス及び JNK 活性化に及ぼす HBx の影響について解析した。

8. B 型肝炎ウイルスの増殖機構におけるオートファジーの影響 (宮城)

ゲノタイプ A の HBV 遺伝子を 1.5-mer タンデムに繋いだ発現プラスミドを Huh7 細胞にトランスフェクションさせ、HBV を強制発現させた。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。

9. HBx の組み込み様式とその機能解析 (加藤直也)

Genbank と Japan HBV Database から、ジェノタイプ C の B 型肝炎ウイルス 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、B 型肝炎ウイルス X 遺伝子の肝癌関連変異の解析を行った。統計学手法としては χ^2 検定、ロジスティック回帰を用いた。得られた肝癌関連変異につき、病期別の変異頻度を検討し、肝癌特異的変異であるかどうかの検討した。CAG プロモーター下に HBx (ジェノタイプ D) を発現するプラスミドを Huh7 細胞内に導入、HBx を発現させ、SRE、SRF、CRE、NF- κ B、NF-AT、AP-1、Wnt/ β -catenin 各シグナル伝達経路の活性化につき検討した。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、リポーターベクターの stable transformant の樹立を試みた。Stable transformant は TNF- α に対する反応性を指標として選択した。次に、複製可能なジェノタイプ C の HBV の 1.4 倍長ゲノムを含むプラスミドから 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. 創薬を目指した HBV 感染による肝線維化メカニズムの解明 (飯島)

キメラマウスに HBV を接種後 6 ヶ月で肝線維化が進行し、強い肝傷害が見られた。また同時に TLR4、炎症性サイトカインである IL-6 の発現増加を検出した。さらに HBV 感染キメラマウスにおいて抗マウス TLR4 抗体を投与した場合にのみ線維化進行が抑制された。この感染実験サンプルを用いて TLR4 pathway の詳細な解析を試みた。抗 TLR4 抗体による感染実験に用いたキメラマウス肝臓組織から RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った。

11. 患者血清由来株を用いた HBV 複製系による薬剤感受性の評価 (加藤孝宣)

これまで核酸アナログの投与歴がなくエンテカビル投与を行った症例で、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 3 例を検討した。これらの症例の血清中の HBV 株全長を PCR で増幅し、その情報をもとにすべての ORF を含むような HBV ゲノム 1.4 倍長の配列を持つ複製モデルコンストラクトを作製した。

12. 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 タンパク質を 293T 細胞に発現させ、ストレプトタグビーズを用いて、HBx 結合タンパク質を精製し、質量分析によって、網羅的に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及び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 によって検討を行った。また、HBx 発現細胞での JMJD5 の細胞内局在を調べた。

13. Deep sequence を用いた PreS 変異と HBV 肝病態進展の検討 (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 (AsC) 18 例、慢性肝炎群 (CH) 25 例、肝硬変群 (LC) 29 例における血清から PreS⁺S 領域をパイロシークエンサーをもちいて 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。

14. カプシド蛋白を標的とした抗 HBV 薬の同定と開発 (馬場)

薬剤の *in silico* スクリーニング系の構築には、統合計算化学システム Molecular Operating Environment (MOE, Chemical Computing Group Inc.) を用いた。In *silico* スクリーニングにより選び出された薬剤は、HepG2.2.15 細胞のクローン株 HepG2.2.15.7 を用いて、抗 HBV 効果について検討した。培養 3 日後に、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。その後、生細胞数を定量した。一方、培養上清は lysis buffer にてウイルス粒子を融解した後、real-time PCR 法でウイルス DNA を定量した。

15. 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。

16. 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り比較検討し、HBV により誘導される宿主因子を検討する。

17. HBV 逆転写酵素の生化学的研究と阻害剤開発のためのハイスループットスクリーニング系の開発 (豊田)

T7 プロモーターの下流に His タグをつけた HBV ポリメラーゼ (pol)、逆転写酵素と RNase H 部位 (RT-H)、RNase H 部位 (H) をクローニングし、大腸菌にて HSP90a と共発現し、変性剤を使わずに可溶化し、N-NTA、Mono Q、Superdex200 の組み合わせで部分精製した。蛍光色素 FAM を結合した HBV の遺伝子 RNA、とオリゴ DNA を用いて PAGE

にて RNase H 活性を測定した。また、DNA-RNA キメラヌクレオチドを用いて RNase H 活性阻害剤の探索系を開発した。ポリ A 鋳型に FITC-oligo dT15 をプライマーとする系と HBV DR と eRNA 鋳型と DR に対する相補 DNA をプライマーとする系で逆転写酵素活性を測定した。

18. HBV ゲノムの核内維持機構の解析 (有海)

核内宿主因子等を標的とする shRNA を発現するレンチウイルスベクター導入により、核内因子、ATM、Chk2、DNA-PKcs、p53、PARP-1、PCNA、PML、Rad18、Rad51 や RNA ヘリケース DDX1、DDX3、MOV10 をノックダウンした HBV 恒常的複製細胞 HepG2.2.5.1.7 細胞や HBV 感染レセプター-NTCP を発現させた HepG2-NTCP 細胞を用いて、細胞内 HBc 発現レベルを定量解析した。培養上清中の HBs 抗原量と HBV DNA 量を解析し、HBV 産生能を検討した。

HuH-7 細胞に APOBEC3G-HA 及び HBV を共発現させ、APOBEC3G と HBV pre-genomic RNA 及び 7SL RNA との結合について、APOBEC3G の免疫沈降物を用いた RT-PCR 法により解析した。また、HBV 粒子内の 7SL RNA のパッケージング能についても、APOBEC3G の発現有無で比較検討を行った。

19. HBx 蛋白の機能解析と HBx 蛋白および関連する宿主因子を標的とした新規クラス治療薬創出に関する研究 (朝比奈)

複製可能な 1.24 倍長のゲノタイプ A、B、C の HBV プラスミドを用いてもいい、HBx 遺伝子を網羅的にアラニン置換した発現プラスミド・シリーズと HBx を欠失したプラスミドを作成する。これを肝癌細胞株、ヒト iPS 細胞由来の肝幹・前駆細胞株等を用いて、遺伝子導入による発現解析を行う。

(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 (脇田)

HepaRG細胞を用いたHBV感染評価系を用いて、HBV侵入を阻害する化合物をスクリーニングした。その結果、7種類の化合物をHepaRG細胞に前処理した場合、HBV感染が有意に低下することが認められた。この化合物の中で、サイクロスポリンA(CsA)に注目して解析を進めた。CsAはNTCPのトランスポーター活性を阻害することにより、HBV感染も阻害する事が明らかとなった。また、他のNTCPのトランスポーター活性を有する化合物でもHBV感染を阻害した。CsAは初代培養肝細胞におけるHBV感染も阻害した。

HepG2.2.15細胞よりもHepAD37細胞の方がcccDNA発現が高い事が明らかとなった。Hirtの変法により抽出したcccDNAをサザンブロット法により検出した。また、培養上清中のHBe抗原量はcccDNA産生量と比例した。そこで、培養上清中のHBe抗原量を指標としてcccDNA産生を抑制する化合物のスクリーニングを実施した。核酸アナログなどの逆転写酵素阻害薬はcccDNA産生を抑制した。以上の結果からAD37細胞およびそのサブクローン細胞はcccDNAアッセイ系として有用であることが明らかとなった。

2. HBV遺伝子発現における転写後調節機構の解析 (鈴木)

HuH-7細胞の核抽出物を用いた網羅的なプロテオーム解析によって23種類の宿主細胞タンパク質をHBV-PRE結合因子として同定した。これらにはRNAの二次構造、二重鎖RNAを認識するもの、mRNAの輸送、スプライシングに関与するものなどが含まれていた。同定した宿主因子について、HBV産生に関与する因子の選抜を行った。その結果、hnRNP (heterogenous ribonucleoprotein) Uが、HBVゲノム複製細胞でノックダウンすることによってHBV pgRNAレベルが有意に亢進する一方、同細胞で強制発現させることによってpgRNAレベルが有意に低下することを見出した。さらに、HBV複製細胞での免疫沈降/RT-PCRによってhnRNP Uが細胞内でpgRNAと相互作用することが明らかとなり、HBV複製細胞へアクチノマイシン

Dを添加、経時的にpgRNA量を測定することにより、hnRNP U発現によってpgRNAの分解が促進されることを見出した。

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)

I型IFN処理によりHepG2細胞におけるTetherinの発現が顕著に誘導された。誘導されたTetherinは主に小胞体やゴルジ体に局在した。次に、HepG2細胞にHBVの分子クローンpUC19-C-ATとTetherinを共発現させるとTetherinの強制発現により細胞上清中のウイルスDNA量とHBs抗原量の有意な減少、および細胞内のDNA量の増加が認められた。Tetherinと結合するHBV蛋白質のスクリーニングを行ったところ、HBsがTetherinと強く結合した。HBsとTetherinは細胞質で共局在および相互作用した。HBsを強制発現させるとTetherin陽性細胞からのウイルス様粒子の産生が増強されることが分かった。

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)

HBV DNAポリメラーゼは、N末端にFATTタグと3Cプロテアーゼサイト、C末端TEVプロテアーゼサイトとGFPeHisを付加したコンストラクトで発現させることで、可溶性画分にTP及びRHドメインの発現を確認した。しかし、全長HBV DNAポリメラーゼに関しては、どの組み合わせにおいても確認出来ない程であった。Xタンパク質は、BL21(DE3)RILP, pET28-FATT-CHBx, 37°C、4時間培養の条件で少量であるが発現を確認した。粗精製サンプルにTEVプロテアーゼを添加し、終夜4°C反応させ、His-FATTタグの切断反応を行った。TEVプロテアーゼ添加前後でのバンドの変化をSDS-PAGE上で確認出来たことから、発現蛋白質はXタンパク質であると確認した。

5. HBVタンパク質に結合する環状ペプチドの探索 (菅)

NTCP蛋白質が納品され次第、標的とした特殊ペプチドの探索を行う予定であった。しかし、納品が著しく遅れており、探索の開始が出遅れしまった。したがって、探索の結果はまだ出ていない。

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)

アルブミンプロモーター下にtet-onシステムを連結し、下流に全長のHBV配列を連結した。DNAポリメラーゼのみ産生できないように人為的に遺伝子変異を導入することにより、産生されたHBV粒子のヒトへの感染性を消失させる工夫を行った。HepG2細胞にコンストラクトを導

入し、doxycycline 投与前後で産生・分泌された HBs 抗原、HBe 抗原タンパク質の発現制御を確認した。その後、コンストラクトをマウス胚へ injection し、最終的に計3ライン(#1~#3ライン)の F0 マウスを確保した。ライン#1 の F1 マウスで doxycycline 投与後で HBV RNA 発現が顕著に誘導された。

CpG サイトを失活させたベクターに GFP をクローニングしたプラスミドを作成し、野生型マウスへの hydrodynamic injection した。従来型の GFP 発現プラスミド投与では、投与数日間は肝細胞への GFP 発現が確認できるものの、1週間以内にその大部分の発現が消失した。これに対して、CpG 失活 GFP ベクター投与では、1ヶ月間以上安定して肝細胞での GFP 発現が維持された。そこで、CpG 失活ベクターを用いて、HBs 抗原タンパク質発現ベクターを作製した。この HBs 発現ベクターを野生型マウスに hydrodynamic injection 投与したところ、投与1週間後の血中にも高い HBs 抗原価が検出された。

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)

種々の HBx 欠変異体を Huh7.5 細胞に一過性に発現させると N 末端 90 アミノ酸領域 (HBx[1-90]) の可溶性が高いことを確認した。この HBx(1-90) 発現プラスミドを用いてタンデムタグ・アフィニティークロマトグラフィー/質量分析法を行い、新規の HBx 結合宿主タンパク質として peroxiredoxin 1 (Prdx1) を同定した。HBx(1-90) 発現 Huh7.5 細胞において、内在性 Prdx1 と HBx(1-90) が結合することを免疫共沈法で確認した。全長 HBx と Prdx1 の結合も軽度であるが確認した。HBx(1-90) は細胞質と核にほぼ均等に分布した。一方、内在性 Prdx1 は細胞質に強く発現し、核には弱く発現していた。HBx(1-90) と Prdx1 が細胞質で共局在した。全長 HBx は酸化ストレス及び JNK 活性化を強く誘導するが、HBx(1-90) 及び HBx(1-70) はその誘導活性が有意に減弱した。全長 HBx と SMYD3 を Huh7.5 細胞に一過性に共発現させると両者が結合した。また、HBV 複製細胞における HBx と一過性発現 SMYD3 の結合、及び、一過性発現全長 HBx と内在性 SMYD3 の結合を免疫共沈法で確認した。HBx の C 末端領域 (131-154)、及び、SMYD3 の C 末端領域 (248-428) が、両者の結合に重要であることがわかった。

8. B 型肝炎ウイルスの増殖機構におけるオートファジーの影響 (宮城)

HBV がオートファジーに与える影響を検討するために、Huh7 細胞に HBV 発現プラスミドを導入した。細胞内で HBV の発現が認められると同時に、オートファジー依存的に分解される P62 蛋白

質の発現は抑制され、オートファジーの促進が示唆された。HBV 感染細胞系である HB611 細胞株及び HepG2.2.15 細胞株にソラフェニブを投与した。ソラフェニブ投与により HB611 細胞でも P62 蛋白質の発現は減少し、オートファジーの促進を認めた。ソラフェニブの投与により HB611 細胞及び HepG2.2.15 細胞の培養上清中の HBV-DNA 量はいずれも増加し、オートファジーの亢進によりウイルス増殖が増加していることが示唆された。オートファゴソームとライソソームの融合を負に制御する蛋白質である Rubicon に着目し、HepG2 細胞で siRNA を用いてノックダウンさせると、LC3-II 蛋白質及び P62 蛋白質が減少し、オートファジーが促進した。B611 細胞や HepG2.2.15 細胞で Rubicon をノックダウンさせると、同様に LC3-II 蛋白質及び P62 蛋白質が減少し、オートファジーが促進した。この時細胞内の Pre-genome RNA はいずれの細胞株でも有意に上昇し、HBV 増殖は促進した。オートファゴソームとライソソームの融合を阻害するクロロキンを HB611 細胞に投与すると、LC3-II 蛋白及び P62 蛋白質は発現増強し、オートファジーの後期課程が抑制された。一方、細胞内の Pre-genome RNA は有意に低下し、HBV 増殖は抑制された。

9. HBx の組込み様式とその機能解析 (加藤直也)

Genbank から 1,369 の HBV シークエンス、Japan HBV database から 4,011 の HBV シークエンスを収集した。ジェノタイプ C で全長の X 遺伝子領域を含む 495 シークエンスを抽出した。肝癌のシークエンスは日本を中心として、韓国、中国を含む 6 か国から集められたものであり、非肝癌のシークエンスは中国と日本を中心とした 15 か国から集められたものである。肝癌グループの 153 シークエンス、非肝癌グループの 342 シークエンスを最終的に解析対象とした。核酸ベースで、 χ^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 20 塩基を見出した。これら 20 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 5 塩基 (nt1383、nt1479、nt1485、nt1652、nt1762) を抽出し得た。うち nt1653 と nt1762 はコアプロモーター領域とオーバーラップする領域内であった。肝癌関連 5 塩基 7 変異のうち、5 変異はアミノ酸置換を伴うものであった (aa36 Thr→Pro、aa36 Thr→Ala、aa38 Pro→Ser、aa94 His→Tyr)。それぞれの変異につき、病期別の頻度を検討した。すべての変異は、慢性肝炎や肝硬変の段階で生じており、肝癌特異的な変異ではなかった。変異が肝

癌に本当に寄与しているのかどうかは、更なる検討が必要である。

Huh7 細胞にジェノタイプ D の 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- κ B、NF-AT、AP-1、Wnt/ β -catenin 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リポーターアッセイにより検討した。HBx は NF- κ B を約 3.2 倍と最も活性化した。そこで NF- κ B レポーターベクターを恒常的に保持する Huh7 細胞を樹立した。バックグラウンドノイズが少なく、TNF- α による誘導が良好なクローンを選択し、Huh7#2NF κ B luc と名付けた。また、FLAG タグを持つジェノタイプ C の HBx を CMV プロモーターの下流にクローニングし、作成したベクターを Huh7#2NF κ B luc にトランスフェクションし、NF- κ B を約 3.9 倍まで活性化することを確認した。テトラサイクリンの存在下で発現するベクターを構築し、Huh7#2NF κ B luc にトランスフェクションし、double stable transfectant 細胞を得ている。

10. HBV 感染と小胞体ストレスに関する解析 (飯島)

マイクロアレイ解析のデータを元にパスウェイ解析を行ったところ、発現上昇遺伝子群から MAPK signaling pathway, など既に報告のあるシグナル経路の活性化が確認された。一方で TLR4 pathway 関連因子は一部が発現減少遺伝子群からの解析で抽出された。

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)

エンテカビル耐性が疑われる 3 症例の RT 領域の direct sequence の結果、既報のエンテカビル薬剤耐性変異以外の部位に変異を認めた。エンテカビル投与により HBV-DNA が検出感度未満になったが投与中に再上昇しその後も高値が持続し耐性が疑われた症例 1 では、rtV173L, rtL180M, rtM204V のラミブジン耐性変異のみ認めた。エンテカビル投与により HBV-DNA が検出感度未満になったが投与中に一過性に再上昇しその後自然の経過で陰性化した症例 2 では、rtV191I のアミノ酸変異を認めた。エンテカビル投与開始後 1 年以上経過後も十分な HBV-DNA 量の低下が見られず、HBV-DNA 陽性のまま経過した症例 3 では、rtI122L, rtN123H の変異を認めた。これらの 3 症例から得られた HBV 株の配列を有する HBV ゲノム 1.4 倍長の複製モデルコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトを HepG2 細胞に導入し、エンテカビルで処理した後、HBV の複製をサザンブロット法および RTD-PCR 法で評価した。

症例 1 から得られた HBV 株の検討において、同定されたラミブジン耐性変異 (rtV173L, rtL180M, rtM204V) 導入株は、これらの変異を持たない株に比べエンテカビルに対する反応性が不良であり、これらの変異はエンテカビル耐性にも関わっていると考えられた。症例 2 で得られた rtV191I のアミノ酸変異を有するコンストラクトは、明らかなエンテカビルに対する耐性は検出されなかった。症例 3 から得られた HBV 株の検討においては、rtI122L, rtN123H の変異を持つコンストラクトは症例 1 から得られた HBV 株の変異を持つコンストラクトと同様に培養細胞内での強い複製が観察された

12. 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 JMJD5 は HBx と酵母内でも相互作用が確認され、HBx タンパク質の 75-94 アミノ酸で結合していることが明らかとなった。また、HBV の感染性粒子を発現している HepG2. 2. 15 細胞の JMJD5 の発現を shRNA でノックダウンさせると、培養上清中のウイルスゲノム量が有意に低下することから、JMJD5 は HBx タンパク質と相互作用して HBV 複製に関与することが示唆された。また、HBx は主に細胞質に局在しているが、JMJD5 は核に局在する。HBx 発現細胞では、JMJD5 は核から細胞質に局在を変換することが示された。

13. Deep sequence を用いた PreS 変異と HBV 肝病態進展の検討 (榎本)

Deep sequence を用いた検討にて PreS2 欠失が混在する症例は、Asc16.7%、CH56%、LC62% ($p < 0.01$) と肝病態の進展につれてその割合は増大してくることが明らかになった。また HBs 抗原量と PreS 経度の関連を検討すると、PreS2 欠失 ($p < 0.01$) あるいは変異 ($p = 0.03$) HBV の混在率が高まるほど、HBs 抗原量が低下することが明らかとなった。

14. 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* スクリーニングで薬剤がはまり込むポケットサイトを同定することに成功した。このポケットサイトに対し、引き続き *in silico* スクリーニングを実施した。その結果、新たに 24 種類の化合物を選び出し、HepG2. 2. 15. 7 細胞における抗 HBV 効果について調べた。24 薬剤のうち、7 薬剤に抗 HBV 効果を認めた。そのうち、4 薬剤は化学構造が類似していたが、細胞毒性も比較的強く、HBV に対する選択性が得られなかった。薬剤 10, 15, 17 については、細胞毒性がほとんど認められな

ったが、10を除いて、わずかな抗HBV効果しか示さなかった。以上から、薬剤10がリード化合物の第一候補であると考えられた。

我々は新規核酸誘導体に強い抗HBV効果をもたせることに成功した。何れも adenosine 誘導体である。また、糖に相当する部分是不飽和炭素環構造であり、2' および 3' の位置に水酸基を有する、リボース型であった。

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

HBsAg/HBcAg-based vaccine の投与による治療を end of treatment (EOT) および EOT 後 24 週で評価した。HBsAg/HBcAg-based vaccine を投与された慢性 B 型肝炎症例では 56% の症例で HBV DNA が陰性化し、ALT 値が正常化した。EOT 後 24 週では 45% の症例で HBV DNA が陰性化し、ALT 値が正常化した。

16. 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)

各遺伝子型 HBV プラスミドの構築を行い、細胞株樹立に向け進行中である。パイロット試験として樹立した遺伝子型 D の細胞株を用いて SILAC 法によるプロテオーム解析を行った。3828 蛋白を比較定量的に同定し、約 111 蛋白が HBV 蛋白発現時に有意に増減していた。ミトコンドリア関連蛋白の増加と小胞体関連蛋白の減少が、明らかな傾向として示された。

17. HBV 逆転写酵素の生化学的研究と阻害剤開発のためのハイスループットスクリーニング系の開発 (豊田)

HBV ポリメラーゼの精製では N 末端に His タグをつけた pol (His-pol)、RT-H (His-RT-H)、H (H-His) と C 末端に His タグをつけた pol (pol-His) を大腸菌から精製したが、いずれも、HSP90a、GroEL その他の大腸菌のタンパクが混在している。H-His は RNase H 活性を示さなかったが、His-RT-H と pol-His は RNase H 活性を示した。そこで 96 穴プレートを用いて 50 mM TrisHCl pH7.5, 1 mM DTT, 0.01 % BSA, 0.02 % Triton X-100, 1 mM MgCl₂, 0.2 pmol RC961-1, RNaseIn 0.5 mL, His-RT-RNaseH (pol-His) 2.5 mL で 37°C、16 時間反応後、Emission at 520 nm, excitation at 488 nm で検出した。さらに His-RT-H、His-RT の逆転写酵素活性はポリ A 鋳型に FITC-oligo dT15 をプライマーとする系を用いた場合、プライマーに 1 ヌクレオチドを付加する反応までしか進まなかった。

18. HBV ゲノムの核内維持機構の解析 (有海)

HBV ゲノムの核内維持機構及びヒトゲノムへのインテグレーション機構を解明するために、

shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて、HepG2. 2. 5. 1. 7 細胞や HepG2-NTCP 細胞において、p53 や PML 等の核内がん抑制因子、ATM、Chk2、DNA-PK、PARP-1 等の DNA 損傷センサー、Rad18 や PCNA 等の DNA 複製関連因子、Rad51 などの相同組換因子、そして DDX1、DDX3 や MOV10 RNA ヘリケース等のノックダウン細胞を構築した。HBV 増殖能を解析した結果、DNA-PKcs、PARP-1、Rad51 ノックダウン HepG2. 2. 5. 1. 7 細胞において、細胞内 HBV キャプシド DNA 量がコントロール細胞に比べて、3~5 倍 HBV DNA 量の増加が見出された。DNA-PKcs、PARP-1、Rad51 ノックダウン細胞の培養上清中の HBV DNA 量が 2~3 倍増加した。培養上清中の HBs 抗原量は PARP-1 及び Rad51 ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比べて 2~2.5 倍増加した。

シチジンデアミナーゼ活性の変異した APOBEC3G 変異体を用いても、野生型同程度に HBV 複製能を顕著に抑制することが確認された。一方、APOBEC3G の免疫沈降物を用いて、RT-PCR 法を行った結果、APOBEC3G が pre-genomic HBV RNA 及び 7SL RNA と結合することが判明した。さらに 7SL RNA は HBV 粒子内にパッケージされること、そしてこの取り込みは APOBEC3G の共発現により抑制されることも見出された。

19. HBx 蛋白の機能解析と HBx 蛋白および関連する宿主因子を標的とした新規クラス治療薬創出に関する研究 (朝比奈)

導入 HBV ベクターとして、in vitro で複製可能な 1.24 倍長の HBV ベクターを構築し、HBx 遺伝子機能解析のために HBx 遺伝子を網羅的にアラニン置換した発現プラスミド・シリーズを構築した。野生型 HBx 発現プラスミドと HBx を欠失したプラスミドとの共発現により、培養上清中への HBe 抗原の産生を確認した。しかし、HBs 抗原の産生効率は十分ではなかったため、種々の条件検討を加えている。ヒト iPS 細胞をマトリゲル上で培養し、activin-A、bFGF・hBMP-4 および hHGF を添加し、それぞれ未分化内胚葉細胞、肝幹前駆細胞および成熟肝細胞各段階への分化誘導を試み、細胞分化度を調節しうる培養系の基盤を確立した

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、研究会会議を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進んでいる。また二年度目から参加された分担研究者も、すでに研究成果が得られている。各分担研究者の研究成果については各分担研究報告書を参照されたい。

HBVの場合はHIVと比較して、薬剤の標的となるウイルス由来の蛋白分子も少なく、ウイルスの感染複製機構の解明も遅れているが、カプシド蛋白を標的とする薬剤の *in silico* アッセイ系 (docking study) を確立できたことから、これを用いて薬剤の *in silico* スクリーニングを行うことで、効率的な薬剤の同定を試みている。選択的な抗 HBV 効果を有するリード化合物が得られたら、その周辺化合物や誘導体について、抗 HBV 効果を検討することで薬剤の最適化を行うとともに、作用機序 (分子標的) を明らかにする。最終的には、動物を用いた毒性試験や薬物動態試験を行い、これらの結果を総合することで、当該薬剤の臨床開発の可能性を決定する。

HBVのコアは感染細胞の細胞質において、カプシド蛋白、ウイルスプレゲノム RNA、ウイルス DNA ポリメラーゼ、そしていくつかの宿主細胞由来の蛋白によってアセンブリされる。コアはプレゲノム RNA からウイルス DNA の合成や細胞内輸送に必須であることから、コアを形成する際のカプシド-カプシド蛋白間の相互作用 (インターフェイス) は、抗ウイルス薬の標的になる可能性がある。今回、同定された薬剤は新しいリード化合物になる可能性を有している。特に薬剤 10 は細胞毒性もほとんどないことから、今後はこの誘導体について、抗 HBV 効果を検討することで、化合物の最適化を図る予定である。また、昨年度に同定したリード化合物も、その誘導体について抗 HBV 効果を検討中であり、活性が高い薬剤が同定できた時には、これらの薬剤がコアの形成を阻害することで、抗 HBV 効果を発揮しているかどうかを明らかにする予定である。これとは別に2種類の新規核

酸誘導体に強い抗 HBV 効果を同定することに成功した。現在、これらの薬剤については、特許を出願するとともに、誘導体を合成展開中であり、さらに高い活性を有するものが得られた場合には、3TC や ETV に耐性を示す HBV に対する抗ウイルス効果を検証することで、開発の可能性を探る予定である。

HBV の初期感染過程を阻害する化合物として CsA を同定するとともに、cccDNA の検出系を構築した。CsA は HBV の感染過程を阻害する事を明らかにした。CsA は NTCP に結合してそのトランスポーター活性を抑制して HBV 感染を阻害した。さらに、NTCP と LHBs の相互作用を *in vitro* でハイスループットに検出するアッセイ系を構築している。このアッセイ系により NTCP と LHBs の相互作用を直接阻害する化合物のスクリーニングが可能となる。HBV の初期感染過程の分子機構をさらに詳細に解析することにより創薬標的を同定することが可能と考えられた。

cccDNAはHBVの持続感染に最も重要なウイルスゲノムの存在様式と考えられている。しかし、cccDNAが作られて、細胞核内で維持される機構についてはほとんど解明されていない。そこで、本研究ではcccDNAを効率よく検出するアッセイ系を構築した。このアッセイ系を用いてcccDNA産生や維持に関与する宿主因子を同定したり、cccDNAを阻害する化合物を同定することが可能となる。HepAD37細胞の培養上清中のHBe抗原量はcccDNA産生量と比例することが明らかとなり、HBe抗原を指標としたスクリーニング系の構築に成功した。

HBV の生活環において、転写後、プレゲノム RNA (pgRNA) は細胞質へ輸送されカプシドへパッケージングされる。pgRNA の核外輸送は HBV の複製増殖に必須と考えられ、HBV RNA 内に post-transcriptional regulatory element (PRE) が存在することは知られているが、関与する宿主因子とその役割など調節機構は十分に解明されていない。また、pgRNA の一部はスプライシングされるが、その意義、調節機構は必ずしも明らかでない。同定した hnRNP U は、RNA 結合能を持ち hnRNA と複合体を形成する hnRNP ファミリーの一員で、RNA の代謝や安定性の制御に関連すること、また転写の開始や mRNA 伸長に関わることが知られている。HBV pgRNA は hnRNP U との結合により不安定化が促進されることが見出された。hnRNP U を介した RNA 安定性調節には正負両方向のメカニズムが存在することが示された。hnRNP U 依存的な pgRNA 分解のメカニズム解析を進めることによって、新たな創薬標的を見出すことが期待され

る。

HBV複製後期過程において、Tetherinはウイルス複製を負に制御することが示唆された。しかしながらHBVはIFN抵抗性であることから、HBVは何らかのTetherin回避機構をもつ可能性が高い。実際にHBs蛋白質が細胞内でTetherinと結合し、共局在することが判明した。また、HBsを発現させると、Tetherin存在下でもウイルス粒子の産生が増強されることから、HBs蛋白質がTetherinを不活性化する可能性が示唆された。HBsとTetherinとの結合を特異的に阻害するような化合物を開発することで、IFN療法の奏効率向上に寄与できるかもしれない。

DNAポリメラーゼ及びXタンパク質の構造解析に向けた蛋白質発現系構築を目指している。結晶構造解析には、少なくとも数mgの高純度に精製されたタンパク質が必要になる。全長HBV DNAポリメラーゼは、全ての組み合わせ培養条件に置いて発現を確認することは出来なかった。これは内在性プロモーターやmRNAの二次構造が発現レベルを制御していると考えられる。さらに、大腸菌を用いた発現系である為、大腸菌のコドン利用頻度を考慮する事で発現レベルが変化すると考えられる。テノフォビル、エンテカビルより効率の良いHBV逆転写酵素の阻害剤の開発と新たにRNase Hに対する阻害剤の開発のために、ハイスループットスクリーニング系の開発をおこなった。理研小嶋グループのドラッグライブラリーを用いてRNase H阻害剤をスクリーニングに足りるHis-RT-Hの効率の良い精製法を開発する。また、逆転写酵素活性の活性を上げるために、TPとRT-Hの再構成とシャペロン(HSP90a、HSP70、Hop)の影響を調べる必要がある。HBxタンパク質では単独の発現やGST、Hisタグ融合Xタンパク質発現では、ほぼ全てが不溶性になる事から、本件で確認出来たXタンパク質の可溶化は、FATTタグの可溶化能による効果が大きいと考えられる。

HBxは細胞質と核の双方に存在し、HBxはウイルス遺伝子の転写活性化作用を有し、また、多くの宿主因子と相互作用する多機能タンパク質であり、宿主細胞の増殖、炎症、シグナル伝達関連遺伝子の転写阻害作用やシグナル伝達攪乱作用、及び細胞癌化にも関与していると考えられている。タンデムタグ・アフィニティークロマトグラフィー/質量分析法を用いて、新規HBx結合宿主因子としてPrdx1を単離・同定した。Prdx1はペルオキシダーゼであるPrdxファミリーに属し、細胞の生理機能を維持する重要な抗酸化タンパク質である。Prdx1は細胞質と核に存在し、癌抑制因子としてJNK、c-Myc、PTENなどシグナル伝

達タンパク質と結合することにより、細胞増殖やアポトーシスなどに関与することが知られている。今後、酸化ストレス、JNK活性化及びその他のシグナル伝達系への影響について詳細に解析する予定である。また、両者の結合に関与する領域のより詳細なマッピングも併せて行う。また、全長HBxがヒストンメチルトランスフェラーゼSMYD3と結合することを見出した。SMYD3は細胞質と核に存在しているが、核内のヒストンH3やH4の特定のアミノ酸残基をメチル化し、クロマチン構造変換を引き起こすことによって、種々の原癌遺伝子や細胞周期調節遺伝子の発現制御に関与している。また、SMYD3は乳癌をはじめ肝細胞癌、大腸癌、前立腺癌などで過剰発現していることが報告されている。

また、HBxと結合するJMJD5はヒストン脱メチル化に関与するタンパク質であり、JMJD5が標的とする分子がHBV複製に関与していることが考えられる。HBxはそれ自身にDNA結合能はないが、様々な遺伝子発現を制御していることが報告されていることから、JMJD5がHBxによる遺伝子発現制御に関与していることが示唆できる。

HBV X遺伝子変異は肝発癌に関係すると考えられているが詳細な機構は不明である。われわれはB型肝炎における肝発癌と関連するHBxのアミノ酸変異を5か所同定した。これら5アミノ酸置換は、肝癌に関連しているが、慢性肝炎、肝硬変の状態から存在しており、肝癌に特異的な変異ではないことから、この変異とHBxの肝発癌における機能との関連については更なる検討が必要である。今後、HBxの様々な機能に及ぼす本アミノ酸置換の影響につき、検討を進める必要がある。

HBV X遺伝子はHBVの感染成立、維持に重要であることがわかっている。HBxの転写活性化能を指標として、HBxの転写活性化能を阻害する薬剤をのハイスループットスクリーニング系の確立を目的として研究を行った。HBxのトランス転写活性化能は、持続感染の維持、すなわちcovalently closed circular (CCC) HBV DNAの維持にも関わっている可能性があり、HBxの転写活性化能を阻害する薬剤は、HBVの持続感染を阻止し得る可能性がある。

オートファジーとHBVとの関係については不明な点が多い。そこで今回HBVがオートファジーに与える影響、またオートファジーがHBV増殖に与える影響を検討し、オートファジーが新規治療標的となるか検討した。HBVが発現した細胞ではオートファジーが亢進するが、このオ

オートファジーの亢進はHBVの増殖を促進すると考えられた。一方、オートファジーの抑制はHBV増殖を抑制することから、オートファジー阻害剤などによるHBV増殖抑制治療の可能性が示唆された。オートファジー特異的な阻害剤を用いて、HBV増殖抑制効果及びそのメカニズムを明らかにすることで、オートファジーの調節によるHBV感染症の制御が可能となると期待される。

HBV DNA ゲノムは宿主細胞核内で持続的に保持され、そのゲノムの一部は宿主ヒトゲノム内にインテグレーションされることが知られている。DNA 損傷センサーである DNA-PKcs や PARP-1 そして相同組換え因子 Rad51 が HBV 増殖に対して抑制的に制御していることが示唆された。HepG2-NTCP 細胞を用いた *in vitro* の感染系において、DNA-PK、PARP-1、そして Rad51 が HBV 感染も抑制するのか、HBV 複製や感染が DNA-PK の DNA 依存的なキナーゼ活性や PARP-1 のポリ ADP リボシル化能を活性化するか、逆に DNA-PK により HBV 因子がリン酸化されるのか、PARP-1 により HBV 因子がポリ ADP リボシル化されるのか、DNA-PK や PARP 阻害剤を用いて HBV 増殖能における影響について検討中である。

一方、APOBEC3Gはシチジンデアミナーゼ依存的、あるいは非依存的にHBV増殖を抑制することが知られている。しかしながら、シチジンデアミナーゼ非依存的な抗HBV作用機序については解明されていない。本年度の研究成果により、7SL RNAがHBV pre-genomic RNAと結合し、HBV粒子内にパッケージングされること、この7SL RNAのHBV pre-genomic RNAへの結合がAPOBEC3Gにより競合阻害されることが示唆され、シチジンデアミナーゼ非依存的なAPOBEC3Gの抗HBV作用機序の一つとして提唱された。

近年、NASHに関連した肝硬変や肝がんが増加しているものの、依然として肝癌死亡の14%がHBVに起因する。今後HBV慢性感染患者の高齢化が進むためHBV感染による肝癌発症の抑止は重要度が高い。ヒト肝キメラマウス感染実験サンプルを用いて行ったパスウェイ解析で、有意な発現変動が確認されたパスウェイの上位にTLR4 pathwayが認められた(HBV感染によって活性化されるMAPKパスウェイ等も同時に抽出されたので信頼性は高いと思われる)。各々の分子は線維化・HBV感染との関連知見も存在するため現在検索中である。

HBVに対する新しい創薬をめざすためには、これら多様な免疫応答により惹起される病態を模倣した*in vivo*モデルの樹立が急務である。しかしながら、ヒトと同様に、マウスでも胎児期からわずかでもHBV抗原の提示が潜在するとウイルス

に対して免疫寛容状態となり、肝炎を模倣する免疫応答が生じないことが知られておる。このため、HBV感染が肝細胞に成立することにより免疫応答を惹起するB型肝炎の病態を模倣するモデルマウスはほとんどない。そこで、胎児期には厳密にウイルスタンパク質の発現を制御し、生後、任意の時期に薬剤誘導性にウイルスタンパク質を肝細胞に発現する新規B型肝炎モデルマウスを樹立し、HBV感染に起因した肝炎の病態解明と創薬ターゲット候補を絞り込みむ。薬剤誘導性にrepressorタンパク質を制御するシステムを用いることにより、肝細胞に任意の時期に免疫応答を惹起するB型肝炎モデルマウスの作製を目指すとともに、個々のHBVウイルス抗原タンパク質特異的な免疫応答反応を検証するための一過性に肝細胞特異的にHBVタンパク質が発現可能なモデルの構築を行っている。いずれのモデルもマウスの樹立目標は本年度で達成することができた。今後の課題としては、肝細胞へのHBVタンパク質の発現誘導のみでは十分な免疫応答が誘導できないことがあげられ、ウイルスに対する免疫能の活性化の方策についてのさらなる検討が必要となる。抗HBV創薬の解析基盤となる新規マウスの樹立と表現型の解析を引き続き進める予定である。

E. 結論

- ・HBVの初期感染過程を阻害する化合物としてCsAを同定するとともに、cccDNAの検出系を構築した。
- ・HBVプレゲノムRNAに結合し同RNAの分解促進に働きHBV産生を抑制する因子としてhnRNP Uを見出した。
- ・I型IFN誘導性の宿主蛋白質TetherinはHBV粒子産生を負に制御するが、ウイルス側はそれに対抗する手段としてHBsがTetherinに拮抗することが示唆された。
- ・ヒトB型肝炎を模倣する肝細胞にHBVタンパク質を発現する2種類の新しいモデルマウス系を樹立した。今後、構築したマウスシステムにおいて、ラインの選別や表現型の解析、ウイルス性肝炎を模倣した免疫応答の活性化法の探求を進めていく予定である。
- ・新規HBx結合宿主因子としてPrdx1及びSMYD3を単離・同定した。Prdx1との結合にはHBxのN末端領域が、また、SMYD3との結合にはHBxのC末端領域が、それぞれ重要であることがわかった。
- ・HBV感染は感染細胞のオートファジーを促進させ、オートファジーの促進はHBV増殖を亢進させた。オートファジー調節機構を標的とし

た HBV 新規治療の可能性が期待された。

- ・ 肝癌関連 HBx 変異を同定したが、肝癌特異的変異ではないことが明らかになった。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

- ・ 抗 TLR4 抗体による線維化の阻害効果と肝組織内の TLR4 pathway 関連因子の発現変動が関連している可能性が示された。今後は TLR4 pathway 関連因子を中心に遺伝子ノックダウン等の方法も含めて宿主側因子の解析を進める予定である。
- ・ HBx と相互作用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。

- ・ 次世代シーケンサーを用いた deep sequence による HBV の quasispecies 解析を行うことにより、肝病態の進展に PreS2 の変異・欠失が関連することが明らかとなった。

- ・ HBV のカプシド蛋白を標的とする薬剤の *in silico* アッセイ系を用いて、薬剤ライブラリーのスクリーニングを行い、選び出した 25 種類について、*in vitro* 抗 HBV アッセイを行ったところ、リード化合物となるような新規薬剤を同定することに成功した。また、これとは別に、強い抗 HBV 効果を有する新規核酸誘導体を同定することに成功した。

- ・ The dose of vaccines, duration of therapy, nature of therapy, repeated vaccinations and other unknown factors may be related to waning of antigen-specific immunity in vaccinated subjects along with time. Defining proper therapeutic regimen on the basis of retrieved data and further study would be required.

- ・ 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、HBV により修飾を受ける細胞性因子の同定、異なる遺伝子型 HBV における複製増殖機構、病原性発現機構を分子レベルで解明し、新たな抗ウイルス薬開発の基盤形成を目指す

- ・ 96 穴プレートを用いる RNase H 活性のハイスループットスクリーニング系を開発した。この系は 384 穴プレートの系に用いることが可能である

- ・ DNA 損傷センサー DNA-PK 及び PARP-1 が HBV 増殖を抑制していることが示唆された。相同組換因子 Rad51 が HBV 増殖を抑制していることが示唆された。APOBEC3G のシチジンデアミナーゼ非依存的な抗 HBV 効果の分子機序として、APOBEC3G が HBV pre-genomic RNA 及び 7SL-RNA と結合すること、7SL-RNA が HBV 粒子内にパッケージングされるが、APOBEC3G によりそのパッケージングが

阻害されることが示唆された

- ・ HBx 蛋白を中心とした機能解析と細胞分化度を調整し得るヒト肝細胞培養系を構築することにより、従来の薬剤開発とは視点を異にする新規治療の創出に新たな知的・技術的基盤を確立するために、本系は有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watashi K, Urban S, Li W, Wakita T. NTCP and Beyond: Opening the Door to Unveil Hepatitis B Virus Entry. *Int J Mol Sci*. 2014 Feb 19;15(2):2892-905.
- 2) Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuvara H, Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP. *Hepatology*. 2013 Dec 21. doi: 10.1002/hep.26982. [Epub ahead of print]
- 3) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuvara H, Wakita T. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jan 17;443(3):808-13.
- 4) Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y, Joh T, Sato S, Takahashi S, Wakita T, Zhu J, Issa JP, Kondo Y. Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers. *Gastroenterology*. 2014 Feb;146(2):562-72.
- 5) Chen DS, Locarnini S, Wait S, Bae SH, Chen PJ, Fung JY, Kim HS, Lu SN, Sung J, Tanaka J, Wakita T, Ward J, Wallace J; CEVHAP North Asia Workshop on Viral Hepatitis. Report from a Viral Hepatitis Policy Forum on implementing the WHO Framework for Global Action on viral hepatitis in North Asia. *J Hepatol*. 2013 Nov;59(5):1073-80.
- 6) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. *J Biol Chem*. 2013 Nov 1;288(44):31715-27.
- 7) Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, Suzuki T, Tagawa Y. An *in vitro* liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved

- hepatitis B virus replication. *J Biosci Bioeng*. 2014 Feb 1. pii: S1389-1723(13)00474-X. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.016. [Epub ahead of print].
- 8) Kim SK, Nasu A, Komori J, Shimizu T, Matsumoto Y, Minaki Y, Kohno K, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H. A model of liver carcinogenesis originating from hepatic progenitor cells with accumulation of genetic alterations. *Int J Cancer* 134; 1067-1076, 2014.
 - 9) 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* 43; 67-71, 2013.
 - 10) Utsumi T, Yano Y, Hotta H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Asia. *World J Med Genet*, (in press)
 - 11) Rinonce HT, Yano Y, Utsumi T, Heriyanto DS, Anggorowati N, Widasari DI, Lusida MI, Soetjipto, Prasanto H, Hotta H, Hayashi Y. Hepatitis B and C virus infection among hemodialysis patients in Yogyakarta, Indonesia: Prevalence and molecular evidence for nosocomial transmission. *J Med Virol*. 5(8): 1348-1361, 2013.
 - 12) 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*, 43: 1032-1039, 2013.
 - 13) Elkady A, Aboufotuh S, Ali EM, Sayed D, Abdel-Aziz NM, Ali AM, Murakami S, Iijima S, Tanaka Y. Incidence and characteristics of HBV reactivation in hematological malignant patients in south Egypt. *World J. Gastroenterol*. 2013; 19 (37): 6214-20.
 - 14) Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Iijima S, Matsuura K, Shinkai N, Watanabe T, Poovorawan Y, Tanaka Y. Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in Thai population. *PLoS One*. 2014; 9 (1): e86007
 - 15) Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Acute Hepatitis B of Genotype H Resulting in Persistent Infection. *World J Gastroenterol*, in press.
 - 16) Akbar SM, Al-Mahtab M, Uddin MH, Khan MSI. Scope and limitation of HBsAg-, HBcAg-, and HBsAg/HBcAg-based combined therapeutic vaccines in chronic HBV infection: Evidences from laboratory benches and patient's bedsides. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 12:363-9, 2013
 - 17) Akbar SM, Al-Mahtab M, Khan SI. Non-antigen-specific and antigen-specific immune therapies for chronic hepatitis B: Evidences from laboratory benches and patient's bedsides. *Expert Opin Biol Ther* 13: 1063-74, 2013
 - 18) Al-Mahtab M, Akbar SM, Aguilar JC, Uddin H, Khan MS, Rahman S. Therapeutic potential of a combined hepatitis B surface antigen and core antigen vaccine in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 2013; 7:981-989
 - 19) Asahina Y, et al.: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. Guidelines for the Management of Hepatitis B Virus Infection. *Hepatol Res* 2014; 44: S1-S58.
 - 20) 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).
 - 21) 瀧崎隆之, 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) K Watashi, T Daito, A Sluder, K Borroto-Esoda, T Wakita. CYCLOPHILIN INHIBITORS POTENTIATE INTERFERON SIGNALING THROUGH DIMINISHED PKR PHOSPHORYLATION IN HCV-INFECTED CELLS. The International Liver Congress™ 2013, 48th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver, Amsterdam, The Netherlands (2013, 4.24-28)
 - 2) N Ogura, K Watashi, T Wakita. FORMATION OF COVALENTLY CLOSED CIRCULAR (ccc) DNA IN HepAD38.7 CELLS, A TETRACYCLINE INDUCIBLE HBV EXPRESSION CELL LINE. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
 - 3) HH Aly, K Watashi, K Chayama, T Wakita. The discovery of a new virus/host interaction regulating HBV life cycle. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
 - 4) M Iwamoto, K Watashi, S Tsukuda, HH Aly, R Suzuki, H Aizaki, O Koiwai, H Kusuhara, T Wakita. Mechanistic analysis on hepatitis B virus entry in an NTCP-overexpressing cell line. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
 - 5) K Watashi, G Liang, M Iwamoto, H Marusawa, K Kitamura, M Muramatsu, R Suzuki, J Li, S Tong, Y Tanaka, K Murata, H Aizaki, T Wakita.

- Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
- 6) K Watashi, A Sluder, S Matsunaga, A Ryo, S Nakajima, M Iwamoto, S Tsukuda, K Borroto-Esoda, M Sugiyama, Y Tanaka, M Mizokami, T Wakita. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
 - 7) S Tsukuda, K Watashi, M Iwamoto, R Suzuki, H Aizaki, S Kojima, T Wakita. A Retinoid Derivative Inhibits Hepatitis B Virus Entry Mediated by NTCP. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
 - 8) Asano S, Matsunaga S, Ryo A; Production and characterization of monoclonal antibodies to Hepatitis B virus X (HBx) protein, HUPO 2013 2013.9. Yokohama.
 - 9) Triani E, Juniastuti, Utsumi T, Amin M, Soetjipto, Yano Y, Hotta H, Hayashi Y, Lusida MI. High prevalence of hepatitis B infection among Indonesian migrant workers from Lombok Island, Indonesia and its HBV molecular characteristics. Asian-Africa Research Forum on Emerging and Reemerging Infections, Sendai, January 20-22, 2014.
 - 10) Satoshi Tanaka, Hayato Hikita, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Wei Li, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2013) The crosstalk between apoptosis and autophagy in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. The 64th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Washington, USA, November 1 - 5.
 - 11) Murakami S, Watanabe T, Omagari K, Inoue T, Iijima S, Hamada-Tsutsumi S, Hayashi S, Tajiri K, Kishi H, Tanaka Y. A novel three-dimensional long-term culture system of primary human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized liver for hepatitis B virus infection. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Oct. 20-23, 2013. Shanghai, China.
 - 12) Hayashi S, Khan A, Simmons B, Jones CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami S, Iijima S, Watanabe T, Tanaka Y. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus genotype F in Alaska: A retrospective case-control study. Asian Pacific Association for The Study of the Liver. Mar. 12-15, 2014. Brisbane, Australia.
 - 13) Yamada N, Sugiyama R, Yotsuyanagi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Amino acid polymorphisms of S region of hepatitis B virus in acute hepatitis B patients in Japan. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 1-5, 2013. Washington DC, USA
 - 14) Baba M. My antiviral research in Fukushima, Leuven and Kagoshima. "Gertrude Elion Award Lecture" *26th International Conference on Antiviral Research*, May 12, 2013, San Francisco, USA.
 - 15) Akbar SM. Therapeutic vaccine for HBV. 3rd Meeting of the USJCMSP Hepatitis Panel. A Symposium on Curative Therapies for Chronic HBV Infection. Singapore, March 12th-13th 2013.
 - 16) Akbar SM. Therapeutic potential of inducible immunity in HBV infection: antigen non-specific versus antigen-specific immune therapy. 2013 Taiwan Association for the Study of the Liver (TASL)-Japan Hepatitis B Workshop, Tokyo, Japan April 13-14 2013
 - 17) Akbar et al. Wide-spread immunogenicity and adjuvant properties of hepatitis B core antigen (HBcAg) and their utility during immune therapy against chronic hepatitis B. Asia-Pacific Asociación for the Study of the Liver. Singapore June 6-10, 2013.
 - 18) Akbar et al. Mechanisms underlying limited therapeutic efficacy of combination therapy containing antiviral drug and hepatitis B virus vaccine in chronic hepatitis B. Asia-Pacific Asociación for the Study of the Liver. Singapore June 6-10, 2013.
 - 19) Akbar et al. Safety and efficacy of HBsAg/HBcAg-based therapeutic vaccine vs pegylated interferon in a phase III clinical trial with 151 chronic hepatitis B patients in Bangladesh. 第24回 The Meeting of Liver and Immunology 平成25年9月7日 京都
 - 20) Akbar et al. A phase III clinical trial with a therapeutic vaccine containing both HBsAg and HBcAg administered via both mucosal and parenteral routes in patients with chronic hepatitis B. 64th Annual Meeting of American Association for the Study of the Liver, Washington DC, November 1-5, 2013
 - 21) Akbar et al. Nature of a pathogenic and protective immunity in chronic hepatitis B virus infection. 64th Annual Meeting of American Association for the Study of the Liver, Washington DC, November 1-5, 2013

- 22) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto Wk, Yuen MF, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Korenaga M, Mawatari Y, Kawashina M, Tokunaga K, Mizokami M. Trans-ethnic analysis of HLA-DPA1, DOB1 haplotypes to be associated with hepatitis B virus infection. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.
- 23) 清原知子、石井孝司、多屋馨子、荒木和子、脇田隆宇、小児におけるHBs抗原保有率調査、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- 24) 岩本将士、渡士幸一、九十田千子、HH Aly、鈴木亮介、相崎英樹、小祝修、楠原洋之、脇田隆宇、NTCP安定発現細胞株におけるB型肝炎ウイルス侵入機構の解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- 25) HH Aly, K Watashi, K Chayama, T Wakita. Study of new virus/host interactions regulating HBV life cycle. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- 26) 古賀れい奈、宮川敬、松永智子、渡士幸一、脇田隆宇、梁明秀、Tetherin/BST-2はHBV複製を負に制御する、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- 27) 中島謙治、伊藤昌彦、李媛、孫鎖鋒、鈴木哲朗。B型肝炎ウイルス(HBV)プレゲノムRNA核外移行機序の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸。2013年11月。
- 28) 千葉 勉、丸澤宏之。炎症と遺伝子不安定性。第72回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜 2013。
- 29) 田中聡司、疋田隼人、齋藤義修、中堀輔、清水聡、阪森亮太郎、宮城琢也、巽智秀、竹原徹郎。非アルコール性脂肪性肝障害の病態形成における、飽和・不飽和脂肪酸負荷による肝細胞オートファジーの抑制とアポトーシスの誘導。第49回肝臓学会総会。東京 2013年6月6日-7日
- 30) 飯島沙幸、渡邊綱正、林佐奈衣、松浦健太郎、田中靖人: C型慢性肝炎に対する3剤併用療法における薬剤投与直後のPBMC内ISG発現動態。日本ウイルス学会, 2013, 神戸。
- 31) 林佐奈衣, 村上周子, 飯島沙幸, 渡邊綱正, 田中靖人: HBV genotypeFにおける肝細胞癌特異的ウイルス変異の同定。日本ウイルス学会, 2013, 神戸
- 32) 山田典栄, 四柳宏, 池田裕喜, 小林稔, 奥瀬千晃, 森屋恭爾, 安田清美, 鈴木通博, 伊東文生, 加藤孝宣, 脇田隆宇, 小池和彦。国内感染と考えられるB型急性肝炎genotype Hの一例。第17回日本肝臓学会大会。2013年10月9-10日、東京
- 33) 山田典栄, 加藤孝宣, 四柳宏。B型急性肝炎症例におけるHBV S領域のアミノ酸変異の検討。第40回日本肝臓学会西部会。ワークショップ4; 急性B型肝炎。2013年12月6-7日、岐阜
- 34) 山本聡美、福原崇介、塩川 舞、小野慎子、岡本 徹、松浦善治、B型肝炎ウイルスの増殖に關与する宿主因子の解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11月10日-12日, 2013

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許出願・取得

抗B型肝炎ウイルス薬。発明者：馬場昌範，濱崎隆之，Ashoke Sharon, Chandralata Bal, Anandarajan Thiyagarajan, Mohan Kasula。出願人：鹿児島大学。出願番号：特願2013-254236，特願2013-254238。出願日：2013年12月9日