

Ⅱ. 分担研究報告

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）
分担研究報告書（平成25年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

主任研究者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

分担研究課題：B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明の総括

研究要旨：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解析可能なアッセイ系を構築し、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。

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解析可能なアッセイ系を構築し、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。

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。

B. 研究方法

低分子化合物を利用した HBV 生活環の解明

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。

HBV cccDNA アッセイの構築

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。

（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あるいは市販されている肝細胞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。

C. 研究結果

低分子化合物を利用した HBV 生活環の解明

HepaRG 細胞を用いて HBV 感染を評価できる実験系を樹立した。この系において、これまでに HBV 吸着を阻害することが報告されているヘパリンやポリリジンが HBV 感染を阻害することが確認された。この 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。

HBV cccDNA アッセイの構築

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。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。HepAD37 細胞のサブクローン細胞では cccDNA の産生がさらに高く、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。

D. 考察

今年度は 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。他のトランスポーター活性を阻害する化合物も同様に HBV 感染を阻害する事から、NTCP のトランスポーター活性が HBV の初期感染過程に重要であると考えられた。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。

E. 結論

今年度は 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。

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, Kusuhara 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, Kusuhara H, Wakita T. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors

using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun*. 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.

2. 学会発表

- 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) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 古賀れいな、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)
- G. 知的所得権の出願・登録状況
なし

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）
分担研究報告書（平成 25 年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

分担研究者：鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授
研究協力者：中島 謙治 浜松医科大学感染症学講座 特任研究員

分担研究課題：HBV 遺伝子発現における転写後調節機構の解析

研究要旨：

既存の治療薬とは作用機序の異なる新たな創薬標的を見出すため、HBV 遺伝子発現の転写後調節に働く宿主因子を探索した。プロテオーム解析で見出した HBV 転写後調節エレメント結合因子群のうち、ノックダウンまた強制発現解析から hnRNP の一種、hnRNP U が HBV 複製を負に制御することを見出した。hnRNP U は HBV 複製細胞内でプレゲノム RNA と会合し、同 RNA を不安定化することを明らかにした。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス (HBV) キャリアの数は、世界的には3億5000万人にのぼると推定される。HBV 感染症の対する治療薬として核酸アナログ製剤、インターフェロンなどが使われているが、ウイルス DNA の完全排除は困難なこと、薬剤耐性ウイルスの出現などの問題があり、根治療法は確立されていない。現行の治療薬とは機序の異なる新規治療薬の開発が待望されており、そのために HBV の感染複製増殖機構の解明が重要である。

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。本研究では、HBV 遺伝発現における転写後調節機構、特に、pgRNA の核外輸送、安定性制御またスプライシングの分子機構の解明を目指す。

B. 研究方法

PRE 結合因子のノックダウン解析では、各 20nM siRNA (Invitrogen 社 Silencer siRNA) を Lipofectamine RNAiMAX で 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（上記）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。

（倫理面への配慮）株化細胞のみを用いた研究であり該当しない。

C. 研究結果

昨年度、ヒト肝がん細胞 HuH-7 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 HBV-PRE 結合因子をスクリーニングし、23 種類の宿主細胞タンパク質を同定した。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。

そこで本年度は、同定した宿主因子について、順次、遺伝子ノックダウンまた強制発現を行い、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。

D. 考察

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。mRNA の不安定化に働く CRD (coding region instability determinant) 領域への結合が、c-Myc 遺伝子について報告されている。これにより hnRNP U は c-Myc mRNA の安定化に寄与することが知られている。今回の解析で、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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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].

2. 学会発表

1. 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.

G. 知的所得権の出願・登録状況
なし

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

分担研究者：梁 明秀（横浜市立大学医学部微生物学）

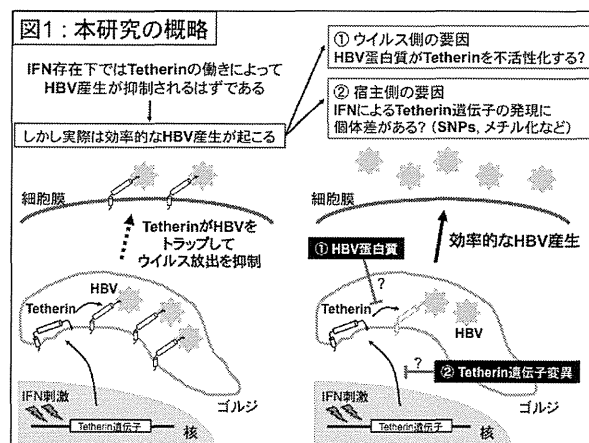
分担研究課題：HBV タンパク質の発現、酵素活性および結合因子の解析

研究要旨：I型インターフェロン（IFN）は広範なウイルス感染に対して抑制的に働くタンパク質として知られるが、B型肝炎ウイルス（HBV）に対するIFN療法の奏功率はわずか2～3割である。その要因は不明だが、HBVがIFN誘導性の抗ウイルス因子を不活性化することや、IFN誘導性の遺伝子発現に個体差があることなどが考えられる。本研究では、I型IFN誘導性の抗ウイルス宿主因子であるTetherin/BST-2がHBV産生を顕著に抑制すること、また、一方でHBs蛋白質がTetherin/BST-2と結合し、その抗ウイルス活性を負に制御することを発見した。また、HBsはTetherin/BST-2を抑制することでHIVの粒子形成を促進した。これらの結果はHBVが抗ウイルス因子に対して抑制的な機構を持つことで、I型インターフェロンによる抗ウイルス作用を回避できることを示唆している。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）は、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を引き起こす不完全二重鎖DNAウイルスである。一方で、我々の細胞には、I型IFNで発現が誘導され且つ強い抗ウイルス活性をもつ内因性防御因子が存在する。そのうち、とくにエンベロープをもつウイルス全般に対して阻害活性を示すものがTetherinまたはBST-2と呼ばれる1回膜貫通型の膜蛋白質である。Tetherinは感染細胞から新たに産生されたウイルスを細胞膜上に繫留することでウイルス産生を阻害する活性をもつ（Neil SJ et al., Nature 425, 2008）。現在までのところ、我々はTetherinがHBVに対しても強い抗ウイルス活性を示すことを発見した。しかしながら臨床的にはHBVはIFNに対して抵抗性を示すため、生体内ではTetherinによる阻害効果は少ないと推測される。そこで本研究では、HBV蛋白質がTetherinを不活性化する可能性（ウイルス側の要因）、またはTetherin遺伝子の発現制御機構に個体差がある可能性（宿主側の要因）について検討し、HBVがIFN誘導性の宿主防御システムから回避する機構や、Peg-IFN治療効果と

Tetherin 遺伝子の関連の有無について解明する。最終的には、Tetherinの強い抗HBV活性を利用した新規治療法の提案と確立を目指す(図1)。



B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験については、組換え DNA 実験安全管理規則に基づき、横浜市立大学組換え DNA 実験安全委員会による審査・承諾を得て実験を行っている。また、感染性ウイルスの取り扱いについては、十分に注意喚起を行い、安全に実験を遂行する。

C. 研究結果

I 型 IFN は HepG2 細胞において Tetherin の発現を誘導する

HepG2 細胞に IFN α 処理を行った後、Tetherin の発現をウェスタンブロット法および免疫染色法にて解析した。その結果、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。

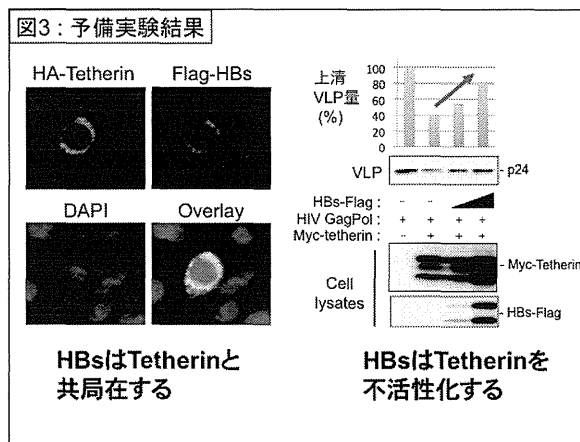
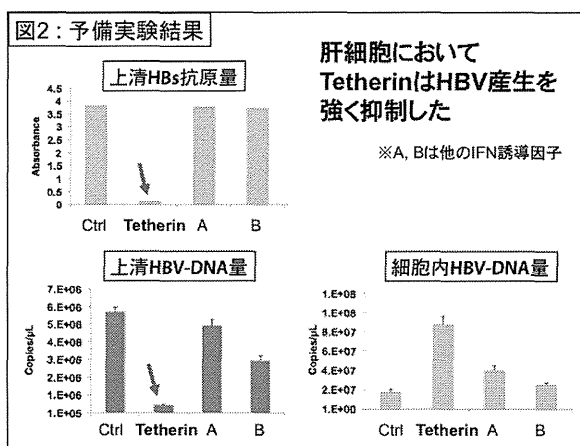
Tetherin は HBV 粒子産生を阻害する

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、細胞内および細胞上清中の HBV-DNA 量および細胞上清中の HBs 抗原の量を、それぞれ PCR 法および ELISA 法で定量した。その結果、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(図 2)。

HBs は Tetherin と結合し抗ウイルス活性を阻害する

続いて、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 と強く結合することが判明した。さらには、蛍光免疫染色法および免疫沈降法により HBs と Tetherin は細胞質で共局在および相互作用することが明らかとなった(図 3 左)。そこで HBs が Tetherin の抗ウイルス活性を阻害するかどうかについて HIV 粒子形成細胞を用いて検証した。その結果、

HBs を強制発現させると Tetherin 陽性細胞からの HIV ウイルス様粒子の産生が増強されることが分かった(図 3 右)。現在、HBs 蛋白質が Tetherin の抗 HBV 活性を拮抗する可能性をさらに詳しく検討中である。



D. 考察

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、多くのウイルスが Tetherin に対する拮抗能をもっている。今年度の本研究において、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 は単独発現で粒子様の微細な超構造体をとることが分かっており、Tetherin

をその構造体に取り込み不活性化することで、HBV デーン粒子の効率のよい放出を実現している可能性が考えられる。また、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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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, Kusuhara 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*. (in press)

2. 学会発表

(1) 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 2013 年 11 月. 神戸

(2) Asano S, Matsunaga S, Ryo A; Production and characterization of monoclonal antibodies to Hepatitis B virus X (HBx) protein, HUPO 2013 2013.9. Yokohama.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

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）
分担研究報告書（平成 25 年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

分担研究者：朴 三用

研究協力者：河合 文博、杉山 佳奈子

分担研究課題：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

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)は、DNAウイルスであるにも関わらず、RNAを経由して自身のゲノムを複製する点において、他のウイルスでは見られない独特な複製機構を持ち合わせている。この複製を可能にしているのは、HBV DNAポリメラーゼである。しかしながら、HBV DNAポリメラーゼの構造情報は明らかとなっていない。複製機構の中心であるHBV DNAポリメラーゼの構造生物学的理解は、詳細な複製機構の解明にとどまらず、創薬の基盤情報構築を行うことを可能にする。

Xタンパク質は、宿主細胞内において様々なシグナルカスケードの蛋白質の活性化やアポトーシスを阻害することで、細胞のガン化を促進する蛋白質である。しかしながら、このように重要ではあるものの、両蛋白質とも構造的見知を得ることが出来ていない。そこで、両蛋白質の結晶構造解析による創薬基盤情報構築を最終目的とし、HBV DNAポリメラーゼ及びXタンパク質の発現系構築、精製実験を行った。

A. 研究目的

HBV の独特な複製機構の中心的な役割を果たしているのは、HBV DNA ポリメラーゼである。しかし、構造情報はこれまでに得られていない。HBV DNA ポリメラーゼ同様、肝がんへの進行に関与するとされる蛋白質、X タンパク質の構造情報も得られていない。本研究では、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す。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。これまでに、両蛋白質の大量発現系、精製方法は確立されていない。従って、DNA ポリメラーゼ及び X タンパク質の大量発現系構築、高純度精製を第一の研究目的とした。

B. 研究方法

〈HBV DNA ポリメラーゼ〉

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、また転写翻訳がきちんに行われたかを確認する為に、C 末端には TEV プロテアーゼサイト GFPeHis₆ を付加したコンストラクト構築も行った。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)〉

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 つのコンストラクト構築を行った。HBV DNA ポリメラーゼ同様、可溶性タグの FATT タグを付加したものも作成。培養条件は、O.D.₆₀₀=1 付近で、1 mM IPTG 添加

後、37℃、4時間及び20℃(AE(DE3)とpColdIIの組み合わせは13℃)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。

C. 研究結果

〈HBV DNA ポリメラーゼ〉

各種大腸菌、ベクター、発現培養条件の組み合わせを検討した結果、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。しかしながら、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。TEVプロテアーゼサイトの前後に数残基のリンカーを挿入することで、TPドメイン、RHドメインともにGFPeHis₆を切断することが出来た。

〈Xタンパク質〉

HBV DNAポリメラーゼ同様、様々な組み合わせで発現チェックを行った。その結果、BL21(DE3)RILP, pET28-FATT-CHB_x, 37℃、4時間培養の条件で少量であるがX蛋白質の発現を確認した。粗精製サンプルにTEVプロテアーゼを添加し、終夜4℃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。20 mL LB培養で発現が確認出来た組み合わせを、1 L LB大量培養に移行したところ、発現が確認出来なくなった。

D. 考察

〈HBV DNA ポリメラーゼ〉

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。ヒト細胞等の発現系、無細胞系での発現も試していく。TPドメインの機能は、その他のRT、RHドメインよりも大腸菌の生育、蛋白質発現系に影響を与えにくいと考えられる為、少量ではあるが発現、粗精製が出来たと考えられる。

〈Xタンパク質〉

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タンパク質の可溶かは、FATTタグの可溶化能による効果が大きいと考えられる。大量発現系でのタンパク質発現レベルの変化は今の所不明である。

E. 結論

可溶性タグを付加することで、TPドメイン及びXタンパク質共に可溶性画分に得られるサンプル量が増えた。TPドメインに関しては、これから数Lの大量培養、精製条件検討等を行う。その他のドメインについても現段階ではどの程度の精製ができ、収量が見込めるかは不明である為、順次、大量培養をしていく。Xタンパク質の発現は、20 mL LB培養と1 L LB培養では、発現レベルの挙動が異なるため原因究明をし、発現出来る条件で大量培養を行う。

また、可溶性であることと、機能を持った構造(正しい構造)であることは直結しないため、精製後にCD測定や活性測定をする必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nishiyama T, Noguchi H, Yoshida H, Park SY, Tame JR. The structure of the deacetylase domain of *Escherichia coli* PgaB, an enzyme required for biofilm formation: a circularly permuted member of the carbohydrate esterase 4 family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 69, 44-51. 2013.
- (2) Kikuchi J, Shibayama N, Yamada S, Wada T, Nobuyoshi M, Izumi T, Akutsu

M, Kano Y, Sugiyama K, Ohki M, Park SY, Furukawa Y. Homopiperazine derivatives as a novel class of proteasome inhibitors with a unique mode of proteasome binding. PLoS One. 2013 Apr 11;8(4):e60649. doi: 10.1371/journal.pone.0060649. Print 2013.

- (3) Cho KJ, Lee JH, Hong KW, Kim SH, Park Y, Lee JY, Kang S, Kim S, Yang JH, Kim EK, Seok JH, Unzai S, Park SY, Saelens X, Kim CJ, Lee JY, Kang C, Oh HB, Chung MS, Kim KH. Insight into structural diversity of influenza virus hemagglutinin. J Gen Virol.94(Pt 8):1712-22.2013.

2. 学会発表

- (1) Sam-Yong Park, “*Structural Studies of the Influenza RNA-polymerase for Novel Drug Design*” Meeting of the Italian,

Spanish and Swiss crystallographic associations, September 9-12 2013, Como Italy. (招待講演)

- (2) 朴 三用: 「新規抗ウイルス薬の開発基盤となる RNA ポリメラーゼの構造解析」CBI学会 2013年大会 -生命医薬情報学連合大会-、タワーホール船堀、2013年10月28-31日、(招待講演)

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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）
分担研究報告書（平成 25 年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

分担研究者：菅 裕明

研究協力者：加藤敬行

分担研究課題：HBV タンパク質に結合する環状ペプチドの探索

研究要旨：本研究分担班は、独自に開発したRaPIDシステムを駆使し、B型肝炎ウイルス感染における新規標的や疾患関連因子に対し、環状特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指す。本研究期間に、NTCP蛋白質等、疾患に関連した標的蛋白質に結合する特殊ペプチドを発見し、その生物活性について検討、薬剤開発への糧となるシーズを提供する。

A. 研究目的

本研究分担班は、独自に開発した RaPID システムを駆使し、B 型肝炎ウイルス感染における新規標的や疾患関連因子に対し、環状特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指す。本研究期間に、X タンパク質および HBV 逆転写酵素等に結合する特殊ペプチドを発見し、その生物活性について検討、薬剤開発への糧となるシーズを提供する。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

本研究はウイルスを中心としており、倫理面への配慮を特に必要ないが、全て P2 レベルで実験は行っている。また、共同研究者が行う動物個体を用いた実験については、所属機関のルールに則って行った。

C. 研究結果

本年度は、外注による NTCP 蛋白質の発現を依頼しており、それが納品され次第、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。

D. 考察

現状、結果がまだ出ていないため、考察は控える。

E. 結論

現状、結果がまだ出ていないため、結論は控える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Y. Goto, M. Iseki, A. Hitomi, H. Murakami, and H. Suga “Non-standard peptide expression under the genetic code consisting of reprogrammed dual sense codons” *ACS Chemical Biology* 8, 2630-4 (2013).

C.J. Hipolito, Y. Tanaka, T. Katoh, O. Nureki, H. Suga “A macrocyclic peptide that serves as a cocrystallization ligand and inhibits the function of a MATE family transporter” *Molecules* 18, 10514-30 (2013).

Y. Tanaka, C.J. Hipolito, A.D. Maturana, K. Ito, T. Kuroda, T. Higuchi, T. Katoh, H.E. Kato, M. Hattori, M. K. Kumazaki, T. Tsukazaki, R. Ishitani, H. Suga, O. Nureki “Structural basis for the drug extrusion

mechanism by a MATE multidrug transporter.” **Nature** 496, 247-51 (2013).

T. Passioura, H. Suga “Flexizyme-mediated genetic reprogramming as a tool for noncanonical Peptide synthesis and drug discovery.” **Chemistry** 19, 6530-6 (2013).

T. Kawakami, T. Ishizawa, T. Fujino, P.C. Reid, H. Suga H, H. Murakami “In Vitro Selection of Multiple Libraries Created by Genetic Code Reprogramming To Discover Macrocyclic Peptides That Antagonize VEGFR2 Activity in Living Cells.” **ACS Chemical Biology** 8,1205–1214 (2013)

K. Ito, T. Passioura, H. Suga “Technologies for the synthesis of mRNA-encoding libraries and discovery of bioactive natural product-inspired non-traditional macrocyclic peptides.” **Molecules** 18, 3502-28 (2013).

T. Passioura, H. Suga “Flexizymes, Their Evolutionary History and Diverse Utilities.” **Topics of Current Chemistry** Mar 12 (2013).

T. Fujino, Y. Goto, H. Suga, H. Murakami “Reevaluation of the D-amino acid compatibility with the elongation event in translation.” **Journal of American Chemical Society** 135, 1830-7 (2013).

2. 学会発表

Plenary Lecture, Discovery Chemistry Congress, Munich, Germany, 3/19-3/20, 2013

Award Presentation in Spring Annual Meeting of Chemical Society of Japan, Kusatsu, Japan, 3/23, 2013

Symposium on Foldamers, Paris, France, 4/9-4/12, 2013

RIKEN-Max Planc Joint Symposium, Wako, Saitama, 4/16, 2013

5th Gratama Workshop, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, 5/30, 2013

Gordon Research Conference, Bioorganic Chemistry, New Hampshire, USA, 6/13,

2013

American Peptide Symposium 2013, Hawaii, USA, 6/23, 2013

Keynote Lecture, Symposium on Chemoselective Reactions for the Synthesis and Application, Dortmund, Germany, 6/2-6/5, 2013

International Conference on Structural Genomics 2013, Structural Life Science, Sapporo, Japan, 7/29-8/1, 2013

Current Strategy for Development of Biopharmaceuticals and Small Molecule Drugs, Sapporo, Japan, 8/1-8/2, 2013

“Jokichi Takamine” 130 years of Glasgow-Japan Collaboration, Glasgow, UK, 9/5-9/6, 2013

ACS National Meeting, Indianapolis, USA, 9/9, 2013

Lilly Distinguished Lecturer at Colorado State University, Fort Collins, USA, 9/10, 2013

Biochemistry Seminar of University of Colorado, BioFrontier Institute, Boulder, USA, 9/11, 2013

RiboClub, Quebec, Canada, 9/22, 2013

Solvay Conference of “New Chemistry and New Opportunities from the Expanding Protein Universe”, Brussels, Belgium, 10/15-19, 2013

Basel Chemical Society Lectureship, Basel, Switzerland, 10/24, 2013

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）
分担研究報告書（平成25年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

分担研究者： 千葉 勉（京都大学医学研究科消化器内科）

分担研究課題： HBV ゲノムを誘導発現可能なマウスモデルの作成と解析

研究要旨：

B型肝炎ウイルス(HBV)に対する新しい創薬をめざすためには、HBVにより惹起される急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎、といった多様な免疫応答を模倣した *in vivo* モデルの樹立が急務である。本研究課題では、HBV感染が肝細胞に成立した病態を模倣し、肝炎ウイルスに対する特異的な免疫応答を誘導することができる新しいモデルマウスの樹立を目的とする。具体的には、任意の時期に肝細胞に特異的に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しい誘導型トランスジェニックマウスの作成を進め、その表現型の解析を進めている。同時に、さまざまなHBVウイルスタンパク質を肝細胞に特異的に一過性発現する新しいモデルの構築を目指している。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)感染により形成されるさまざまな病態は、ウイルス側の要因と宿主側の免疫応答の両者の相互作用により形成されるものと推定されている。特にHBV感染に際しては、急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌、無症候性キャリア、といった多様な病態が生じることが特徴である。これらの病態形成には、宿主側の免疫応答が中心的な役割を果たしており、肝細胞からのウイルス排除には自然免疫・獲得免疫の両者の関与が必要となる。このため、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の絞り込みを本研究課題の目的とする。

B. 研究方法

1. 新規B型肝炎モデルマウスの作製；
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。具体的には、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 repressor 制御能の検証には、in vitro で肝培養細胞(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の injection を実施し、計 3 ラインの F0 マウスを確保した。

2. 肝細胞への HBV ウィルスタンパクの一過性発現による肝炎免疫応答モデルの樹立；

免疫応答の成熟した成体マウスの肝組織に HBV ウィルス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。通常のプラスミドを用いた hydrodynamic injection 投与では、肝組織へのプラスミド由来タンパク質の発現誘導が可能ではあるが、その発現期間はごく短期間のみ限定することが問題点としてあげられる。そこで、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親ベクターに HBV ウィルスタンパク質をコードする遺伝子配列を挿入した新しい発現誘導ベクターを構築し、野生型マウスへの hydrodynamic injection 投与を実施した。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験を含む遺伝子組換え生物等の第二種使用等については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)、「同施行規則」(平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号)、「研究開発等に関する遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき核酸防止措置などを定める省令」(平成 16 年文部科学省・環境省令第一号)、その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じた。

動物実験に関しては、「動物の保護および管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年 6 月 1 日一部改正)に従った。また、当該所属機関の動物実験委員会に申請し承認を受けた後、実施した。

C. 研究結果

1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；
まずはじめに、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。ウィルス抗原タンパク質のアミノ酸配列には変化を与えないが、ウィルスの 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、作成したコンストラクトから産生された HBV 粒子のヒトへの感染性を消失させる工夫を行った。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、*in vitro* で肝培養細胞(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、最終的に計 3 ライン(#1~#3 ライン)の F0 マウスを確保することができた。マウス誕生が先行したライン#1 の F0 マウスから F1 マウスを確保し、doxycycline 投与前後でマウス肝組織中の HBV RNA の発現量を real time RT-PCR で検討したところ、薬剤誘導により HBV RNA 発現が顕著に誘導されることがわかった。

2. 肝細胞への HBV ウィルスタンパク質の一過性発現による肝炎免疫応答モデルの樹立；

はじめに、人為的に CpG サイトを失活させた親ベクターに GFP をクローニングしたレポータープラスミドを作成し、野生型マウスへの hydrodynamic injection 投与を行った。比較対象として、従来型の GFP 発現プラスミドを用いた hydrodynamic injection 投与を実施し、肝細胞への発現誘導効率の比較検討を行った。従来型の GFP 発現プラスミドを用いた hydrodynamic injection 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

の発現が消失していることがわかった。これに対して、CpG サイトを人為的に失活させた親ベクターに GFP をクローニングしたレポータープラスミドを hydrodynamic injection したマウス肝組織では、1 ヶ月間以上安定して肝細胞での GFP 発現が維持されていることが確認された。そこで、CpG サイトを失活させた親ベクターに HBV の Surface 領域の遺伝子配列をクローニングし、HBs 抗原タンパク質発現ベクターを複製した。この HBs 発現ベクターを野生型マウスに hydrodynamic injection 投与し、経時的に血中 HBs 抗原の分泌量を ELISA 法により定量評価を行ったところ、HBs 抗原タンパク質発現ベクター投与を受けたマウスの 1 週間後の血中にも高い HBs 抗原価が検出されていることがわかった。

D. 考察

本研究課題では、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 ウィ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、ウィ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 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、ウィルス型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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueda Y, Kaido T, Ito T, Ogawa K, Yoshizawa A, Yasuhiro F, Mori A, Miyagawa-Hashino A, Haga H, Marusawa H, Chiba T, Uemoto S: Chronic rejection associated with recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. **Transplantation** (in press) 2014.
- 2) Ueda Y, Yoshizawa A, Ogura Y, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Chiba T, Uemoto S: Plasma cell hepatitis induced by the termination of antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. **Hepatol Res** (in press) 2014.
- 3) Ikeda A, Shimizu T, Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Mizuguchi A, Shimizu K, Hatano E, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H. Leptin receptor somatic mutations are frequent in HCV-infected cirrhotic liver and associated with hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology** 146; 222-232, 2014.
- 4) 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.
- 5) Iwamoto S, Kido M, Aoki N, Nishimura H, Maruoka R, Ikeda A, Okazaki T, Chiba T, Watanabe N. TNF- α is essential in the induction of fatal autoimmune hepatitis in mice through upregulation of hepatic CCL20 expression. **Clin Immunol** 146; 15-25, 2013.
- 6) Maruoka R, Aoki N, Kido M, Iwamoto S, Nishiura H, Ikeda A, Chiba T, Watanabe N: Splenectomy prolongs the effects of corticosteroids in mouse models of autoimmune hepatitis. **Gastroenterology** 145; 209-220, 2013.
- 7) Ohtsuru S, Ueda Y, Marusawa H, Inuzuka T, Nishijima N, Nasu A, Shimizu K, Koike K, Uemoto S, Chiba T: Dynamics of defective hepatitis C virus clones in reinfected liver grafts in liver transplant recipients; ultra-deep sequencing analysis. **Journal of Clinical Microbiology** 51; 3645-3652, 2013.
- 8) Ueda Y, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Marusawa H, Teramukai S, Uemoto S, Chiba T: Pretransplant serum hepatitis C virus RNA levels predict response to antiviral treatment after living donor liver transplantation. **Plos One** 8; e58380, 2013.
- 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.

2. 学会発表

- 1) 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.