

タグをつけた pol (pol-His)を大腸菌から精製したが、いずれも、HSP90 α 、GroEL 其他の大腸菌のタンパクが混在している(図1)。

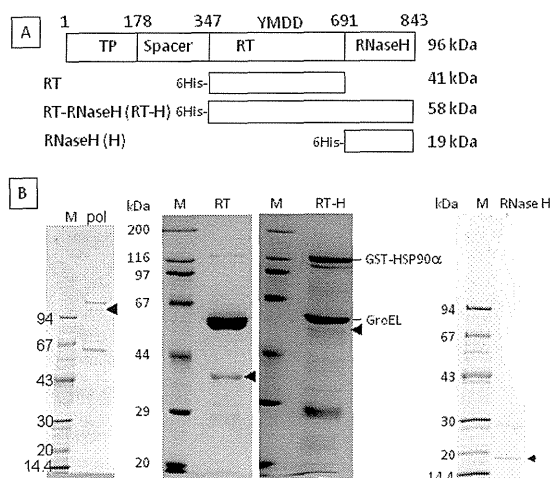


図1. HBV polymerase、RT-RNase H、RT、RNase H
HBV polymerase (pol)、RT-Rnase H (RT-H)、RT、RNase H (H)
の構造(A)と精製したタンパク(B矢頭)

2. RNase H 活性

25 μ L: 1 pmol RC970-01 と 2 pmol オリゴ DNA を 42 $^{\circ}$ C でアニールした後に 50 mM TrisHCl pH7.5, 1 mM DTT, 0.01 % BSA, 0.02 % Triton X-100, 1 mM MgCl₂, RNaseIn 0.5 μ L, His-RT-H (pol-His) 2.5 μ L で 37 $^{\circ}$ C、16 時間反応後 15% PAGE で解析した。

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。

3. RNase H 活性阻害剤の 50 μ L ハイスルー プットスクリーニング系の開発

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 μ L, His-RT-RNaseH (pol-His) 2.5 μ L で 37 $^{\circ}$ C、16 時間反応後、Emission at 520 nm, excitation at 488 nm で検出した(図2)。

4. 逆転写酵素活性

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。

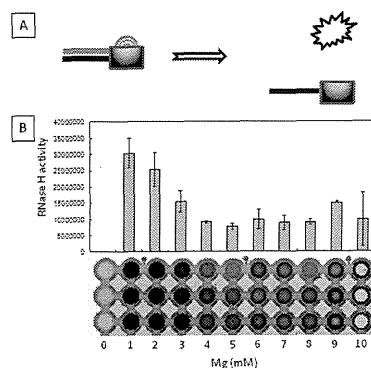


図2. ハイスループットRNase H活性測定法
RNase H測定の原理(A)と96穴プレートによる活性
測定(B)

D. 考察

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の開発と短期間のマンパワーが必要である。また、逆転写酵素活性の阻害剤のスクリーニングのための Fluorescent based polymerase elongation template element (PETE) assay system を行うための装置が必要である。

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 (HSP90 α 、HSP70、Hop)の影響を調べる必要がある。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Wang Q, Weng L, Jiang H, Zhang S, Toyoda T, Fluorescent primer-based *in vitro* transcription system of viral RNA polymerases. Anal Biochem 433, 92-94, 2013.

2. 学会発表

なし

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：熊本大学エイズ学研究センター 有海 康雄 准教授
研究協力者：熊本大学エイズ学研究センター 黒木 美沙緒 厚労科研究員

分担研究課題：HBVゲノムの核内維持機構の解析

研究要旨： 現行の逆転写酵素阻害剤を用いたB型肝炎ウイルス (HBV) の治療法では、完全にHBVを排除することが困難であるため、宿主因子を分子標的とした新たな抗HBV剤の開発が急務である。また、HBVゲノムの宿主細胞の核内に持続的に維持される分子機構を明らかにすれば、HBVの排除法の確立につながる。そこで、HBV生活環に必要な宿主因子、特に宿主核内因子によるHBV増殖制御について研究を進めた。同時にAPOBEC3Gのシチジンデアミナーゼ非依存的な抗HBV作用機序についても検討を行った。その結果、DNA損傷センサーであるDNA-PK及びPARP-1、そして相同組換因子Rad51がHBV増殖を抑制的に制御していることを見出した。一方、低分子RNA 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、そしてAPOBEC3Gが7SL RNAのHBV pre-genomic RNAへの結合を競合的に阻害することが、シチジンデアミナーゼ非依存的なAPOBEC3Gの抗HBV作用機序として示唆された。

A. 研究目的

現在、B型肝炎ウイルス (HBV) の逆転写酵素阻害剤は、主要な抗HBV剤として、臨床の場で治療に用いられているが、完全にHBVを排除することが出来ない。そこで、HBVキャリアや慢性B型肝炎患者より、HBVを効率良く排除するために新たな宿主因子を標的とした抗HBV剤の開発が急務とされている。しかしながら、HBVの生活環やHBV増殖制御に関与している宿主因子の解明はほとんど進展していない。

そこで、本研究において、HBV生活環に関与する宿主因子を同定し、そのHBV生活環における役割を解明し、新規抗HBV剤開発につなげたい。特にHBVゲノムの宿主細胞核内における持続的な維持機構を解明し、これを破綻すれば慢性B型肝炎やキャリアからHBVを排除する有効な治療法の開発が期待される。さらにAPOBEC3Gの抗HBV効果の分子機構についても解析を行い、HBVを宿主細胞から排除する方法の確立を目指した。

B. 研究方法

(1) 宿主核内因子のHBV生活環における役割の解析

核内宿主因子等を標的とする shRNA を恒常的に発現するレンチウイルスベクター導入により、種々の宿主核内因子、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 発現レベルをウエスタンブロット法により、また細胞内 HBV キャプシド DNA 量をリアルタイム PCR 法により定量解析を行った。さらに、培養上清中に放出される HBs 抗原量を ELISA 法、そして上清中の HBV DNA 量をリアルタイム PCR 法により解析し、HBV 産生能についても検討を行った。尚、本研究に用いた HepG2. 2. 5. 1. 7 細胞及び NTCP-HepG2 細胞は国立感染症研究所ウイルス第二部の脇田隆宇先生、渡士幸一先生により分与された細胞を使用した。

(2) シチジンデアミナーゼ非依存的な APOBEC3G の抗 HBV 作用機序の解析

HuH-7 細胞に APOBEC3G-HA 及び HBV ayw 分子クローン株を共発現させ、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。本研究はスイス連邦工科大学ローザンヌ校 (EPFL) ライフサイエンス部の Didier Trono 教授、Priscilla Turelli 博士との共同研究として進めている。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究には、ヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞、HBV 株、及び核酸については高圧蒸気滅菌を施した後に廃棄した。また、HBV 感染実験はバイオハザード P2 レベル実験室にて行い、感染防止対策を行った。

C. 研究結果

(1) 宿主核内因子の HBV 生活環における役割の解析

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、HBV 恒常的複製細胞

(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。これらノックダウン細胞を用いて、HBV 増殖能を解析した結果、DNA-PKcs、PARP-1、そして Rad51 ノックダウン HepG2. 2. 5. 1. 7 細胞に

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。同様に 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。また、各々の培養上清中の HBs 抗原量を ELISA 法により定量した結果、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。一方、MOV10 ノックダウン細胞では HBV 増殖に対して顕著な影響はみられなかった。

(2) シチジンデアミナーゼ非依存的な APOBEC3G の抗 HBV 作用機序の解析

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ングされること、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。

D. 考察

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。この核内における HBV DNA ゲノムは核内宿主 DNA 損傷センサーにより、認識され、これらセンサーを活性化する可能性が示唆される。実際、今年度の本研究により、DNA 損傷センサーである DNA-PKcs や PARP-1 そして相同組換因子 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。現在、(1) 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、(2) 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、(3) 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 (4) 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。

E. 結論

(1) 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。

(2) 相同組換え因子 Rad51 が HBV 増殖を抑制していることが示唆された。

(3) 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yasuda-Inoue M, Kuroki M, Ariumi Y. DDX3 RNA helicase is required for HIV-1 Tat function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441:607-611, 2013
2. Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Adenosine kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin. *Hepatology* 58:1236-1244, 2013
3. Yasuda-Inoue M, Kuroki M, Ariumi Y. Distinct DDX DEAD-box RNA helicases

cooperate to modulate the HIV-1 Rev function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434:803-808, 2013

4. Yagita Y, Kuse N, Kuroki K, Gatanaga H, Carlson J, Chikata T, Brumme Z, Murakoshi H, Akahoshi T, Pfeifer N, Mallal S, John M, Ose T, Matsubara H, Kanda R, Fukunaga Y, Honda K, Kawashima Y, Ariumi Y, Oka S, Maenaka K, Takiguchi M. Distinct HIV-1 escape patterns selected by CTLs with identical epitope specificity. *J. Virol.* 87:2253-2263, 2013
5. Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumore suppressor protein is required for HCV production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430:592-597, 2013

2. 学会発表

(1) 武田 緑、池田 正徳、森 京子、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. 骨粗鬆症治療剤であるラロキシフェンの抗HCV活性機構について. 第49回日本肝臓学会総会、東京、2013年6月6-7日

(2) 武田 緑、池田 正徳、森 京子、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. 骨粗鬆症治療剤であるラロキシフェンは抗HCV活性を示す. 第28回中国四国ウイルス研究会、広島、2013年6月22-23日

(3) 武田 緑、池田 正徳、森 京子、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. 遺伝子型の異なるHCV培養細胞システムを用いたラロキシフェンの抗HCV活性の検討. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10-12日、神戸国際会議場、神戸

(4) 黒木美沙緒、井上万里子、中島詩織、有海康雄. がん抑制因子はLINE-1のレトロトランスポジションを抑制する. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10日~12日, 神戸国際会議場、神戸

(5) 川野広大、黒木美沙緒、有海康雄. HIV-1によるLINE-1レトロトランスポジションの抑制. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10日~12日, 神戸国際会議場、神戸

(6) Takeda M, Ikeda M, Mori K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication. 20th international symposium on hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013

(7) Misao Kuroki, Mariko Yasuda-Inoue, Shiori Nakashima, Yasuo Ariumi. Identification and characterization of novel restriction factors of LINE-1. Cold Spring Harbor Retroviruses Meeting. Cold Spring Harbor, New York, USA, May 20-25, 2013

(8) Yasuo Ariumi, Mariko Yasuda-Inoue, Misao Kuroki. Distinct DDX DEAD-box RNA helicases cooperate to modulate the HIV-1 Rev and Tat function. Cold Spring Harbor Retroviruses Meeting. Cold Spring Harbor, New York, USA, May 20-25, 2013

(9) Yasuo Ariumi and Misao Kuroki. Tumor suppressor proteins negatively regulates the life cycle of LINE-1. FASEB meeting Mobile DNA in mammalian genomes, June 9-14, 2013, Big Sky, Montana, USA

(10) Yasuo Ariumi, Mariko Yasuda-Inoue, Misao Kuroki. Distinct DDX DEAD-box RNA helicases cooperate to modulate the HIV-1 Rev and Tat function. Frontiers of retrovirology 16-18 September, 2013, Churchill College, Cambridge University, UK

(11) Misao Kuroki, Mariko Yasuda-Inoue, Shiori Nakashima, Yasuo Ariumi. Tumor suppressor proteins restricts LINE-1 retrotransposition. Frontiers of retrovirology September 16-18, 2013, Churchill College, Cambridge University, UK

(12) Kodai Kawano, Misao Kuroki, Yasuo Ariumi. HIV-1 interacts with LINE-1. Keystone symposia Mobile Genetic Elements and Genome Evolution (C2), March 9 - 14, 2014, Santa Fe, New Mexico, USA

(13) Kodai Kawano, Misao Kuroki, Yasuo Ariumi. HIV-1 suppresses LINE-1 retrotransposition. 14th Kumamoto AIDS Seminar. October 29-31, 2013, Kumamoto, Japan

(14) Yasuo Ariumi. P-body, RNA helicase, and HIV-1 life cycle. 14th Kumamoto AIDS Seminar. October 29-31, 2013, Kumamoto, Japan

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

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：朝比奈靖浩

分担研究課題：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

研究要旨：【目的】HBV のウイルス蛋白発現、細胞増殖、細胞内シグナルなどに作用する機能ドメインを探索するため、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ことをめざす。【方法】エピトープ欠失 X 蛋白、全長にわたりアミノ酸を網羅的に置換した X 蛋白発現系を用いて、共発現系にて複製に関与するドメインを探索する。【結果】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。【結論】本系の構築により、HBx および宿主因子を標的とした新規クラスの抗ウイルス療法の創出が期待される。

A. 研究目的

HBV のウイルス蛋白発現、細胞増殖、細胞内シグナルなどに作用する機能ドメインを探索するため、エピトープ欠失 X 蛋白、全長にわたりアミノ酸を網羅的に置換した X 蛋白発現系を用いて、薬物の標的となる部位を探索・特定し、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ことをめざす

B. 研究方法

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）

本研究における遺伝子組換え実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく「研究開発二種省令・研究開発等に係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拡散防止措置等を定める省令」に準拠し遂行する。研究の施行に当たっては、東京医科歯科大学組み換え DNA 実験安全管理委員会の承認、および文部科学大臣の確認を取得している。

C. 研究結果

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、細胞分化度を調節する培養系の基盤を確立した。

D. 考察

本システムにより、HBx 蛋白のウイルス蛋白発現、細胞増殖、細胞内シグナルなどに作用する機能ドメインを同定し、現在の B 型肝炎治療を補完する新規クラスの抗ウイルス治療法の創出が期待できる。また、薬剤スクリーニング・ケミカルバイオロジー技術の応用範囲の拡大が期待でき、多分野での新たな研究の創造が期待できる。

E. 結論

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. Yutaka Yasui, Atsushi Kudo, Masayuki Kurosaki, Shuya Matsuda, Masaru Muraoka, Nobuharu Tamaki, Shoko Suzuki, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Kotaro Matsunaga, Hiroyuki Nakanishi, Kaoru Tsuchiya, Jun Itakura, Yuka Takahashi, Shinji Tanaka, Yasuhiro Asahina, Nobuyuki Enomoto, Shigeki Arai, Namiki Izumi. Reduced organic anion transporter expression is a risk factor for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients: A propensity score matching study. *Oncology* 86:53-62, 2014
2. Kaoru Tsuchiya, Yasuhiro Asahina, Nobuharu Tamaki, Yutaka Yasui, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Hiroyuki

Nakanishi, Jun Itakura, Masayuki Kurosaki, Nobuyuki Enomoto, Namiki Izumi. Risk factors for exceeding the Milan criteria after successful radiofrequency ablation in patients with early stage hepatocellular carcinoma. *Liver Transplant* 2013 in press.

3. Nobuharu Tamaki, Masayuki Kurosaki, Shuya Matsuda, Masaru Muraoka, Yutaka Yasui, Shoko Suzuki, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Kaoru Tsuchiya, Hiroyuki Nakanishi, Jun Itakura, Yuka Takahashi, Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi. Non-invasive prediction of hepatocellular carcinoma development using serum fibrosis marker in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 2013 in press.
4. Sato A, Sata M, Ikeda K, Kumada T, Izumi N, Asahina Y, Osaki Y, Chayama K, Kaneko S, Sakai A, Onji M, Hiasa Y, Omura T, Ozeki I, Yokosuka O, Shiina S, Itsubo M, Nishiguchi S, Hirano K, Ide T, Sakisaka S, Yamasaki T, Hidaka I, Tanaka M, Kim SR, Ichida T. Clinical characteristics of patients who developed hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication with interferon therapy: current status in Japan. *Internal Medicine* 52: 2701-2706, 2013.
5. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. α -fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 58:1253-1262, 2013. doi: 10.1002/hep.26442.
6. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. Genetic variation near interleukin 28B and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2013 Jul 17.
7. Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology* 2013; 43: 1-34.
8. Tsuchiya K*, Asahina Y*, Matsuda S, Muraoka M, Nakata T, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N.* These authors contributed equally to this study. Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 120:229-237, 2014
9. Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Yamada G, Kawai T, Kajiwaru E, Okamura Y, Takeuchi T, Yokosuka O, Kariyama K, Toyoda J, Inao M, Tanaka E, Moriawaki H, Adachi H, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsushashi H, Oketani M, Kumada H. Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFN α -2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multicenter cooperative study. *J Gastroenterol* 48:

- 382-390, 2013.
10. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M. Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 57: 46-58, 2013.
 11. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fijuki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M. Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells in mice. *Hepatology* 57: 2502-2513, 2013.
 12. Toyota J, Ozeki I, Karino Y, Asahina Y, Izumi N, Takahashi S, Kawakami Y, Chayama K, Kamiya N, Aoki K, Yamada I, Suzuki Y, Suzuki F, Kumada H. Virologic response and safety of 24-week telaprevir alone in Japanese patients infected with hepatitis C virus subtype 1b. *J Viral Hepat* 20: 167-173, 2013.
 13. Tamaki N, Kurosaki M, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Izumi N. Noninvasive estimation of fibrosis progression overtime using the FIB-4 index in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 20: 72-76, 2013.
 14. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N. Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 85: 449-458, 2013.
 15. Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Itakura J, Anami K, Asahina Y, Enomoto N, Higuchi T, Izumi N. Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: Evaluation by near-infrared spectroscopy. *Hepatology* 2013 Apr 5. doi: 10.1111/hepr.12127.
 16. Tamaki N, Kurosaki M, Matsuda S, Nakata T, Muraoka M, Suzuki Y, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Matsunaga K, Taki K, Asahina Y, Izumi N. Prospective comparison of real-time tissue elastography and serum fibrosis markers for the estimation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 2013 Jun 6. doi: 10.1111/hepr.12179.
 17. Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. JSH Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection: A 2014 Update for Genotype 1. *Hepatology* 2014; 44: S59-S70.
 18. Asahina Y, et al.: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. Guidelines for the Management of Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology* 2014; 44: S1-S58.
- ## 2. 学会発表
1. Tsuchiya K, Yasui Y, Matsuda S, Muraoka M, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N. Monitoring of plasma vascular endothelial growth factor after sorafenib administration as predictor of survival in advanced hepatocellular carcinoma. 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.
 2. Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Murayama A, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Substitution of amino acid 70/91 in the hepatitis C virus core region affects infectious virus production and cell surface expression of MHC class I. 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.
 3. 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.
 4. Asahina Y, Nakagawa M, Taniguchi M, Kawai F, Fujiki J, Otani T, Yamanaka H, Murakawa M, Nitta S, Kitazume A, Watanabe T, Sakurai Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Serum interleukin-6 levels during treatment correlate with resistance to telaprevir-based triple therapy in chronic hepatitis C. The 48th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2013), Amsterdam, Netherlands, April 24-28, 2013.
 5. Azuma S, Asahina Y, Sakurai Y, Ootani H, Yamanaka H, Kawai F, Fujiki J, Nitta S, Kitazume A, Murakawa M, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M. Comparison between Gd-EOB-DTPA MRI and CTHA/CTAP for detection of hypervascular hepatocellular carcinoma: efficacy of diffusion weighing image and hepatobiliary phase. APASL Liver Week 2013 (Annual Meeting of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver),

Singapore, June 2013.

6. Asahina Y, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired IL28B gene induction and expression of IFN λ 4 are closely associated with a non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C patients. 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.

G. 知的所有権の出願・取得状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Watashi K, Urban S, Li W, <u>Wakita T.</u>	NTCP and Beyond: Opening the Door to Unveil Hepatitis B Virus Entry.	Int J Mol Sci.	15(2)	2892-905.	2014
Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, <u>Ryo A</u> , Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, <u>Wakita T.</u>	Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP.	Hepatology.		Epub ahead of print	2013
Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, <u>Wakita T.</u>	Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP.	Biochem Biophys Res Commun.	443(3)	808-13.	2014
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, <u>Wakita T</u> , Zhu J, Issa JP, Kondo Y.	Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers.	Gastroenterology.	146(2)	562-72.	2014

Chen DS, Locarnini S, Wait S, Bae SH, Chen PJ, Fung JY, Kim HS, Lu SN, Sung J, Tanaka J, <u>Wakita T</u> , 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.	59(5)	1073-80	2013
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, <u>Wakita T</u> .	Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID.	J Biol Chem.	288(44)	31715-27.	2013
Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, <u>Suzuki T</u> , 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.		Epub ahead of print	2014
Kim SK, Nasu A, Komori J, Shimizu T, Matsumoto Y, Minaki Y, Kohno K, Shimizu K, Uemoto S, <u>Chiba T</u> , Marusawa H.	A model of liver carcinogenesis originating from hepatic progenitor cells with accumulation of genetic alterations.	Int J Cancer	134	1067-1076,	2014
Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Nishijima N, <u>Chiba T</u> , 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
Utsumi T, Yano Y, <u>Hotta H</u> .	Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Asia.	World J Med Genet		in press	2014
Rinonce HT, Yano Y, Utsumi T, Heriyanto DS, Anggorowati N, Widasari DI, Lusida MI, Soetjipto, Prasanto H, <u>Hotta H</u> , 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

Utsumi T, Yano Y, Lusida MI, Nasronudin, Amin M, Juniasuti, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y.	Detection of highly prevalent hepatitis B virus co-infection with HIV in Indonesia.	Hepato Res,	43	1032-1039	2013
Elkady A, Aboulfotuh 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.	19 (37)	6214-20.	2013
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.	9 (1)	e86007	2014
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.	2014
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
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
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.	Hepato Int	7	981-989	2013

Asahina Y, et al.: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines.	Guidelines for the Management of Hepatitis B Virus Infection.	Hepatol Res	44	S1-S58.	2014
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
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

