

receptor required for HBV entry.

However, sodium taurocholate transporter (NTCP) was found last year to be the receptor required for HBV entry.

We then changed our aim from identifying the HBV entry receptor, to analyse if human NTCP can induce HBV infection of mouse hepatocytes.

To reach this target we used the following:

- 1- Establishment of mouse hepatocyte cell line permissive to HBV replication.

In-vivo primary mouse hepatocytes were previously reported to support HBV replication, however primary hepatocytes undergo senescence and death when cultured in-vitro. Hence we used primary like immortalized mouse hepatocytes by SV40-LT Oncogene. We then assayed HBV replication in these cells using the following:

HBV genome expressing plasmid is transfected into the obtained cell clones and HBV replication was assayed by the amplification of nuclease resistant HBV-DNA packaged in HBV-core particles by real-time PCR.

- 2- HBV-infection into immortalized mouse hepatocytes.

-HBV virus inoculum was derived from the medium supernatant of HepG2-4A5 cells. The supernatant was concentrated with PEG, and was used for infection.

Myc tagged Human NTCP was cloned from primary human hepatocytes, Myc tag

is added at carboxy terminus and cloned into lenti virus vector and introduced into mouse hepatocytes. The expression of human NTCP was confirmed by western blot. HBV infection was then performed, and infected cells were assayed for HBV infectivity by the amplification of nuclease resistant HBV-DNA packaged in HBV-core particles by real-time PCR.

(倫理面への配慮) Ethical

All mice that will be used in this study will receive human care and permissions from institutional review board to conduct the study.

C. 研究結果 result

HBV replication by the transfection of HBV-DNA was successfully established in immortalized mouse hepatocytes confirming that no block is present at the replication level of HBV in these cells. Human NTCP expression was confirmed by western blot analysis and its distribution to the cell membrane was also confirmed by immunofluorescence. However, infection of HBV particles into these cells was not successfully established, suggesting the presence of other host restriction factor required for HBV entry into mouse cells.

We then moved into the identification of host factors required for HBV life cycle in human HepG2 cells. Stable HepG2 cells expressing human NTCP and efficiently infected with HBV were established. We treated these cells

with siRNA libraries targeting several membrane proteins followed by HBV infection after 2 days. We then screened for the membrane proteins required for HBV entry which might act as another HBV receptor, this work is still undergoing.

We also screened for host factors required for HBV replication using AD38.7 cells. Since kinases are involved in many signaling pathways, and protein functions. We screened 500 human kinases for its function on HBV replication. We identified 4 kinases that are required for HBV replication, and 5 kinases that significantly suppress HBV. One of these kinases, TSSK2, it showed an efficient suppression of HBV infection and replication. Using interferon non-responsive cells we proved that the suppressive function of this kinase on HBV is interferon independent. We are now working on the identification of the mechanism by which TSSK2 suppress HBV.

D. 考察 discussion

The permissiveness of mouse hepatocyte to HBV replication confirmed that there is no block at the replication level to HBV in mouse cells. However the lack of infection by HBV particles into human NTCP expressing cells suggested the presence of a still unknown host factor required for the establishment of HBV infection into mouse hepatocytes. This host factor may be another entry receptor, or another internal factor suppressing the early steps of HBV infection. Using siRNA library

screening, we are currently trying to identify human host factors required for HBV life cycle, and its effect on HBV infectivity when overexpressed in human NTCP expressing mouse hepatocytes.

E. 結論 conclusion

Mouse hepatocytes were susceptible to HBV replication, however HBV entry was not observed even after the expression of human NTCP receptor, suggesting the lack of another factor required for HBV entry. We are aiming to identify host factors affecting HBV entry and/or replication that might be required for HBV infectivity in mouse hepatocytes.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1- Masashi Iwamoto, Koichi Watashi, Senko Tsukuda, **Hussein Hassan Aly**, Masayoshi Fukasawa, Akira Fujimoto, Ryosuke Suzuki, Hideki Aizaki, Takayoshi Ito, Osamu Koiwai, Hiroyuki Kusuhara, Takaji Wakita. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. , 2013 Dec 14. pii: S0006-291X(13)02111-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.052. [Epub ahead of print].

2- Takayuki Suzuki, Hiroyuki Oshiumi, Moeko Miyashita, Hussein Hassan Aly, Misako Matsumoto, and Tsukasa Seya., Cell Type-Specific Subcellular Localization of Phospho-TBK1 in Response to Cytoplasmic Viral DNA. PLoS One. 2013 Dec 9;8(12):e83639

3- Yuichi Abe, Hussein H. Aly, Michio Imamura, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Kazuaki Chayama, Makoto Hijikata, Thromboxane A2 synthase inhibitor and prostaglandin I2 receptor agonist are potent anti-Hepatitis C virus (HCV) drugs, Gastroenterology (2013), 145(3): 658-667.e11

2. 学会発表

1. Aly HH, Watashi K, Chayama K, Wakita T. The discovery of a new virus/host interaction regulating HBV life cycle. *2013 international meeting on molecular biology of hepatitis B viruses, Poster Presentation, October, Shanghai, China.*

2. Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Suzuki R, Aizaki H, Kusuhara H, Wakita T. Mechanistic analysis of hepatitis B virus entry in an NTCP-overexpressing cell line. *2013 international meeting on molecular biology of hepatitis B viruses, Poster*

Presentation, October, Shanghai, China.

3. Yuichi Abe, Aly H. Hussein, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Kazuaki Chayama, Makoto Hijikata. Thromboxane A2 synthase inhibitors prevent production of infectious hepatitis C virus. *International Symposium on hepatitis C virus and related viruses, October 2013, Melbourne, Australia*

4. Aly HH, Watashi K, Chayama K, Wakita T. Study of new virus/host interactions regulating HBV life cycle. *The 61th meeting of the Japanese society of virology. Oral presentation, 2013, Kobe, Japan.*

5. Aly HH, Watashi K, Chayama K, Wakita T. Functional screening of human kinases interacting with Hepatitis B virus life cycle. *The 36th annual meeting of the molecular biology society of Japan. Poster presentation, 2013, Kobe, Japan*

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）
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究
分担研究報告書（平成25年度）

B型肝炎ウイルス蛋白質の抗インターフェロン活性および
ウイルス粒子形成における役割

研究分担者 坂口 剛正 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス（広島YE株）の各蛋白質を培養細胞で発現させた。各蛋白質のインターフェロン・シグナル伝達に対する影響を検討したが、明瞭な特徴を明らかにできなかった。一方、P蛋白質（特に逆転写ドメイン）が全般的に蛋白質合成を抑制することを見いだした。また、いくつかのHBV蛋白質が単独発現で細胞から放出されることを見だし、ウイルス粒子形成機構の解明に通じる成果を得た。

A. 研究目的

B型肝炎の治療戦略を検討するために、ウイルス蛋白質をプラスミドから発現する系を構築し、各蛋白質の性状を解析した。

インターフェロン（IFN）はウイルスに特異的に作用するサイトカインであり、ウイルスに対する自然免疫に重要な働きをしている。医薬品としてウイルス治療にも用いられているが、B型肝炎ウイルス（HBV）に対しては、C型肝炎ウイルスのようにウイルスの排除に通じるような効果は得られていない。この理由を明らかにするために、HBV蛋白質が、IFNシグナル伝達を阻害するかどうか検討することを第一の目的とする。

HBVでは、core蛋白質からなるヌクレオカプシドが、主としてHBs（S）およびpre-S1-S2-Sを含むエンベロープを獲得して成熟粒子が産生される。一方で、ヌクレオカプシドをもたない中空粒子が多数産生される。これらのウイルス粒子形成の機構を詳細に解明し、成熟粒子の合成を抑制する手段を見つけるべく、ウイルス様粒子の産生系を構築し、ウイルス粒子形成におけるウイルス蛋白質間相互作用と出芽機構について研究を行うことを第二の目的とした。

B. 研究方法

HBV広島YE株（Accession# AB206816）のゲノムcDNAから各蛋白質を発現するプラスミドを構築した。これを培養細胞に導入し、各蛋白質の発現をウェスタンブロット、蛍光抗体法で確認した。

レポーターアッセイは、プラスミドを293T細胞（T抗原発現ヒト腎臓上皮由来細胞）に導入して行った。HBV蛋白質発現プラスミドの他に、IFN- β プロモーターあるいはIRF3プロモーター下に蛍ルシフェラーゼ遺伝子をもつレポータープラスミドを細胞に導入し、誘導剤としてセンダイウイルスCantell株を感染させた。あるいはレポータープラスミドとして、IFN stimulation responsive element（ISRE）の下流に蛍ルシフェラーゼ遺伝子をもつプラスミドを用い、精製ヒトIFN- β あるいはCantell株で刺激した。海椎茸ルシフェラーゼ発現プラスミドを内部対照として用いた。

ウイルス蛋白質出芽の検討は、肝炎ウイル

ス蛋白質発現プラスミドを293T細胞に導入し、24時間後に上清と細胞をそれぞれ分取して行った。上清は超遠心後の沈殿を回収し、細胞は溶解し、それぞれウェスタンブロット法でウイルス蛋白質を解析した。

C. 研究結果

HBV広島YE株の蛋白質を発現させた。蛋白質は、HBs (S), Pre-S2-S, Pre-S1-S2-S, core, pre-core-core, HBe, X-HA (HAタグ付加), P-FLAG (FLAGタグ付加) であり、これらの発現をそれぞれの特異抗体あるいは分子タグに対する抗体で確認した。蛍光抗体法でも蛋白質発現と細胞内局在を確認した。

センダイウイルスCantell株を感染させると細胞内センサー分子RIG-Iが活性化され、IFN- β が誘導される。HBV蛋白質の中に、この経路を部分的に抑制するものが見つかった。特にP蛋白質は強い抑制能があった。分泌されたIFN- β は自己ならびに周辺の細胞のIFN- α / β 受容体に結合して、Jak/STAT系のシグナル伝達を介して、ISRE下流の抗ウイルス蛋白質、IRF7等の合成を誘導する。HBV蛋白質はこれも部分的に抑制したが、P蛋白質の強い抑制作用が際立っていた。

試験中に、対照の海椎茸ルシフェラーゼの活性もP蛋白質で強く抑制され、P蛋白質はIFNシグナル伝達を特異的に阻害するのではなく、蛋白質合成を全般的に抑制することが示唆された。この抑制について、転写プロモーターを変えても起こること、mRNAは大きく減少していないことから、転写ではなく、翻訳が全般的に抑えられていると考えられた。P蛋白質をさらにドメイ

ン毎に分けて発現するプラスミドを構築して検討したところ、逆転写酵素 (RT) ドメインに強力な蛋白質合成抑制作用があることを見いだした。

HBV蛋白質を293T細胞で単独で発現すると、HBs (S), Pre-S2-S, Pre-S1-S2-S, core, pre-core-core, HBeは培養上清に放出された。core蛋白質はC端側に特徴的な塩基性アミノ酸、特にアルギニンのクラスターをもっている。これを欠損した“short core”蛋白質は培養上清には検出できず、core蛋白質の放出には、C端側の塩基性アミノ酸が必要であると考えられた。塩基性アミノ酸クラスターは複数あり、これをC端側から順次削っていったところ、端から少なくとも2つのクラスターが細胞からの放出に重要であると考えられた。

D. 考察

HBV蛋白質によるIFNシグナル伝達阻害実験では、P蛋白質以外には明瞭な結果を得ることが出来なかった。P蛋白質は予想外に蛋白質合成全般を抑制し、特に翻訳を阻害すると推定された。P蛋白質によるアポトーシス誘導などの細胞傷害性について検討が必要である。

HBV蛋白質はそれぞれを発現させたところ、多種類の蛋白質が培養上清に放出された。超遠心による沈殿に回収されているので、いずれも何らかの構造物として培養上清に存在していると考えられる。HBsはシグナル配列をもっているため、分泌経路で細胞表面まで運ばれ、そこからウイルス粒子様の構造をとって出芽して放出されていると推測される。pre-core-coreにもN端に疎

水性アミノ酸のシグナル配列として働く部分があり、分泌経路を介して放出されていると考えられる。この場合には、細胞内と放出された蛋白質ではサイズが大きく異なり、放出にあたってプロセッシングを受け、HBe様の蛋白質に変化したものと考えられる。

HBeについては、前半の疎水性配列によって分泌経路を介した放出が考えられる一方で、coreは疎水性配列を欠き、分布経路に依存しないで細胞から放出されると考えられる。この場合には、coreのC末端側の塩基性アミノ酸クラスターが必須であった。この機構は不明である。

今後は、それぞれの放出経路、関与する宿主機能などの性質を解明し、複数のHBV蛋白質を組み合わせることで実際のHBV粒子に近いウイルス様粒子を作製することで、HBV粒子形成の詳細を解明する予定である。

E. 結論

HBV 広島 YE 株の蛋白質発現系を作製した。HBV 蛋白質の IFN シグナル伝達に対する影響は不明であったが、P 蛋白質（特に逆転写ドメイン）が全般的に蛋白質合成を抑制することを見いだした。また、いくつかの HBV 蛋白質が単独発現で細胞から放出されることを見いだした。各蛋白質の放出について、その性状と分子機構について検討する必要がある。

F. 健康危険情報

（総括研究報告書にまとめて記入）

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Irie T, Okamoto I, Yoshida A, Nagai Y,

Sakaguchi T Trans-regulatory polarity shift during the viral RNA synthesis dictates the negative genome polarity of the Mononegavirales. J Virol. 2014. 88:690-8.

2) Irie T, Yoshida A, Sakaguchi T Clustered basic amino acids of the small Sendai virus C protein Y1 are critical to its Ran GTPase-mediated nuclear localization. PLoS One 2013. 8:e73740

3) Ueda K, Kawabata R, Irie T, Nakai Y, Tohya Y, Sakaguchi T Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins: strong effects of extracts from persimmon (*Diospyros kaki*) on a board range of viruses. PLoS One 2013, 8: e55343

2. 学会発表

(1) 坂口剛正、柿タンニンによる多様なウイルスの不活化とその応用、第56回近畿アグリハイテクシンポジウム～柿タンニンの底力～、奈良、2013

(2) 坂口剛正、川端涼子、福士雅也、B型肝炎ウイルス蛋白質の性状解析、厚生労働省B型肝炎創薬実用化等研究事業、革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究、平成25年度3班合同班会議、広島、2013

(3) 小田康祐、的場康幸、川端涼子、入江崇、福士雅也、坂口剛正、自然免疫の抑制に関わるセンダイウイルスCタンパク質と宿主転写因子STAT1の構造生物学的解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

(4) 星野羊一、入江崇、小田康祐、福士雅也、坂口剛正、センダイウイルスCタンパク質の増殖動態とIFN β 誘導の定量的解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

(5) 坂口剛正、吉田明日香、入江崇、センダイウイルス感染によるストレス顆粒様構造の形成とIFN誘導におけるC蛋白質の関与、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

(6) 入江崇、吉田明日香、川端涼子、坂口剛正、センダイウイルス株間の著しいインターフェロン誘導性の違いを生む因子、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

(7) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T, Paramyxovirus Sendai virus N protein plays a critical role on restricted production of copyback-type DI genomes to escape from detection by host innate immunity, The 12th Awaji international forum on Infection and Immunity, Awaji, 2013

(8) 坂口剛正、HBV蛋白質の性状解析、B型肝炎ウイルス蛋白質の性状解析、厚生労働省B型肝炎創薬実用化等研究事業、革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究、平成25年度茶山班会議、広島、2013

(9) 小田康祐、川端涼子、福土雅也、入江崇、坂口剛正、センダイウイルスCタンパク質と転写因子STAT1の相互作用の構造学的解析、第28回中国四国ウイルス研究会、広島、2013

(10) Irie T, Okamoto I, Yoshida A, Nagai Y, Sakaguchi T, A novel regulatory mechanism determining the genome polarity of the Mononegavirales, NSV2013, Granada, Spain, 2013

(11) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T, Different production of viral RNA species between Sendai virus strains causes their

remarkable difference in IFN inducibility, NSV2013, Granada, Spain, 2013

(12) 坂口剛正、HBV蛋白質の性状解析、B型肝炎ウイルス蛋白質の性状解析、厚生労働省B型肝炎創薬実用化等研究事業、革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究、平成25年度茶山班班員ミーティング、広島、2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(1) 国内特許

特許第5421901号

発明の名称：エンテロウイルス属の非エンベロープに対する抗ウイルス剤および抗ウイルス用組成物

特許権者：国立大学法人広島大学、アルタン株式会社

発明人：島本整、沖中泰、坂口剛正、辻徹、中井義昭

出願番号：特願2010-505931

出願日：平成21年3月31日

登録日：平成25年11月29日

(2) ロシア特許 平成25年10月

国際出願番号：PCT/JP2010/056879

発明の名称：抗ウイルス剤及び洗浄剤

出願人：シャボン玉石けん株式会社、国立大学法人広島大学

発明人：川原貴佳、草場麻衣子、坂口剛正

ロシア出願番号: 20111146534

特許番号：2491929

特許期間満了日：2030年4月16日

(3) 中国特許 平成25年9月

同上

中国出願番号: 201080016783.2

厚生労働科学研究補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じた HBV 排除への創薬研究
分担研究報告書（平成 25 年度）

肝炎モデルの改良と新規 HBV 感染モデルマウスの作製

研究分担者 阿部 弘美 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 准教授

研究要旨：ヒト iPS 細胞より成熟肝細胞を誘導し、HBV 産生細胞の培養上清を濃縮して感染源として調製した HBV 溶液を接種し HBV 感染が引き起こされるかどうか検討を行った。iPS 細胞由来の成熟肝細胞は肝特異的遺伝子である AFP の発現やアルブミンの産生が認められた。今回誘導させた肝細胞は成熟肝細胞に誘導後 7 日間までしか培養できないため培養上清中の HBV DNA を十分検討できなかったが複製中間体が検出された。このことより iPS 細胞由来の成熟肝細胞は HBV 感染が引き起こされたと考えられる。今後、この細胞を SCID マウスに移植してヒト肝細胞マウスを作製し既存の HBV 感染モデルとの比較を行う予定である。

A. 研究目的

肝炎モデルを改良し慢性 B 型肝炎モデルを作製、また HBV 産生モデルとして HBV Tg マウスを作製し HBV 感染細胞の排除機構、cccDNA の排除、HBV 粒子分泌抑制、HBV 蛋白に対する抗体産生促進する因子の探索を目的とする。また、iPS 細胞由来の肝細胞を用いたヒト肝細胞マウスを作製し、既存のヒト肝細胞キメラマウス、HBV Tg マウスモデル間での感染効率等の比較を行う。

B. 研究方法

下記の 3 種類のヒト肝細胞マウスモデルを作製し、HB を感染させマウスモデル間の比較を行う。

①ヒト肝炎モデルを NOG-scld, NOD-scld を背景としたマウスを用いてヒト肝細胞、ヒト免疫細胞を移植し慢性 B 型肝炎モデルを作製する。

②3.5kb pregenome RNA を生成するような 1.4 倍長の HBV ゲノムを C57BL/6J-Jcl マウス受精卵へ導入し HBV 産生マウスを作製する。得られた個体の血清中 HBV DNA、HBs 抗原、HBe 抗原、HBV ゲノム複製の状態など特徴をつかみ安定して実験に使用できるような系統を樹立する。

③iPS 細胞から Basma et al., の 3 ステップからなる方法により成熟肝細胞を作製し、SCID マウスへ移植を行う。

①～③のマウスモデルを用いて HBV 感染効率、血清中 HBV DNA、HBs 抗原量、HBe 抗原量を測定、肝細胞中の HBV 複製中間体の解析を行った。また、①、③のモデルについては in vitro での HBV 感染実験も行った。

C. 研究成果

①NOG-scld, NOD-scld を背景としたマウスを用いてヒト肝細胞、ヒト免疫細胞を移植し

慢性 B 型肝炎モデルを作製し論文として発表した(Kosaka et al., BBRC, 2013)。従来の uPA/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスに比べるとヒトアルブミンの産生量は uPA/SCID の方が高いが、NOG/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスの方がヒト肝細胞への置換率が低くても HBV 感染効率が良好で、死亡率も低かった。また、HBV 感染マウスに対して抗ウイルス薬であるエンテカビルを投与すると 3 週間で血清中 HBV DNA は 3log copy/ml 減少した。従って改良型の NOG/SCID マウスを背景としたヒト肝細胞キメラマウスは従来の uPA/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスと同等以上の HBV 感染モデル、B 型肝炎モデルとして使用可能であると考えられる。

②HBV 産生マウスから得られた血清中 HBV DNA、HBs 抗原、HBe 抗原、HBV ゲノム複製の状態など特徴をつかみ安定して実験に使用できるような系統を 3 系統 (#31, #84, #K)を樹立した。#31, #84 の系統では血清中の HBV DNA はいずれも 5 log copy/ml 以上であったが HBs 抗原量はいずれも 0.3-0.5IU/ml、HBe 抗原量は 10-20IU/ml と低値であった。反対に、#K では血清中 HBV DNA は 4-5 log copy/ml と低値であったが HBs 抗原量は 12 IU/ml、HBe 抗原量は 110 IU/ml と高値であった。HBV の core 蛋白の発現を調べたところ #31 では肝臓でのみ core 蛋白は発現し、#K では肝臓、腎臓で core 蛋白が発現していた。これら 3 系統について受精卵を保存した。

③iPS 細胞由来の肝細胞において肝細胞に特異的に発現している AFP, アルブミンの発現を免疫染色で調べた結果、20-50%の細胞が AFP, アルブミンを発現する成熟肝細胞であった。この細胞に HBV 産生細胞由来の HBV を感染させ、翌日 PBS を用いて感染源を除去

し、HBV 感染 3 日後、6 日後の培養上清中 HBV DNA を測定したところ感染 3 日後に比べて 6 日後の HBV DNA は減少していた。今回行った方法では成熟肝細胞に分化した後は 7 日間しか培養できなかったため、HBV 添加後の培養上清中 HBV DNA では HBV 感染の有無は判定できなかった。そこで、細胞外へ放出される前の HBV 複製中間体が形成されているかどうか調べるために肝細胞内の HBV core capsid を抗 HBV core 抗体に結合させ、SDS, proteinase K を用いて蛋白を分解させた後、核酸を精製し HBV core capsid 内に内包された HBV ゲノムの検出を試みた。その結果、iPS 細胞由来の成熟肝細胞内には core capsid に包まれた HBV ゲノムが検出され、HBV 感染が引き起こされていたことが示唆された。

D. 考察

NOG-scid マウスを用いることで長期ヒト血球細胞の生着が期待できる。HBV Tg マウスは高 HBV 量、低 HBV 量の両系統のマウスが得られた。iPS 由来の肝細胞への HBV 感染は複製中間体を検出することによって確認したが感染性の HBV 粒子が放出されているかどうかは未だ不明である。今後分化誘導方法を検討し長期間培養できるようなシステムの構築を目指す。さらに iPS 細胞由来の肝細胞を SCID マウスに移植しヒト肝細胞マウスを作製し①、②のマウスとの比較を行う。

E. 結論

改良型肝炎モデル、HBV Tg マウス、iPS 細胞由来肝細胞移植マウスを用いることで炎症反応の制御、HBV のライフサイクルに関する研究が促進され、宿主免疫を制御しながら HBV のライフサイクルを標的とした創薬研究が可能となる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1). Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;441:230-235

2). Arataki K, Hayes CN, Akamatsu S, Akiyama R, Abe H, Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W, Chayama K. Circulating

microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic shepatitis B. *J Med Virol.*2013;85:789-798.

3). Tsuge M, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Hiraga N, Takahashi S, Ochi H, Nelson Hayes C, Ginba H, Matsuyama K, Kawakami H, Chayama K. Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol.* 2013 ;48:1188-1204.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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
Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T and <u>Chayama K.</u>	A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	441	230-235	2013
Arataki K, Hayes CN, Akamatsu S, Akiyama R, <u>Abe H</u> , Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W, <u>Chayama K.</u>	Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic shepatitis B.	<i>J Med Virol</i>	85	789-798	2013
Tsuge M, Murakami E, Imamura M, <u>Abe H</u> , Miki D, Hiraga N, Takahashi S, Ochi H, Nelson Hayes C, Ginba H, Matsuyama K, Kawakami H, <u>Chayama K.</u>	Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients	<i>J Gastroenterol.</i>	48	1188-1204	2013
Tsuge M and <u>Chayama K.</u>	Availability of monitoring serum HBV DNA plus RNA during nucleot(s)ide analogue therapy.	<i>J Gastroenterol.</i>	48	779-780	2013
Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, <u>Seya T.</u>	IPS-1 Is Essential for Type III IFN Production by Hepatocytes and Dendritic Cells in Response to Hepatitis C Virus Infection.	<i>J Immunol.</i>	in press		2014

Tatematsu M, <u>Seya T</u> , Matsumoto M.	Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses.	Biochem J.	458(2)	195-201	2014
Takaki H, Honda K, Atarashi K, Kobayashi F, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Shingai M, <u>Seya T</u> .	MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon β -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells.	Mol Immunol.	57(2)	100-110	2014
Enokizono Y, Kumeta H, Funami K, Horiuchi M, Sarmiento J, Yamashita K, Standley DM, Matsumoto M, <u>Seya T</u> , Inagaki F.	Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling.	Proc Natl Acad Sci U S A.	110(49)	19908-19913	2013
Takaki H, Takeda M, Tahara M, Shingai M, Oshiumi H, Matsumoto M, <u>Seya T</u> .	The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I IFN production against measles virus in a mouse infection model.	J Immunol.	191(9)	4740-4747	2013
Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, <u>Seya T</u> .	A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses.	PLoS Pathog.	9(8)	e1003533	2013
Tanaka Y, Suenaga T, Matsumoto M, <u>Seya T</u> , Arase H.	Herpesvirus 6 glycoproteins B (gB), gH, gL, and gQ are necessary and sufficient for cell-to-cell fusion.	J Virol.	87(19)	10900-10903	2013
Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, <u>Seya T</u> , Takaku H, Shimotohno K.	Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells.	J Virol.	87(14)	8169-8178	2013
Tatematsu M, Nishikawa F, <u>Seya T</u> , Matsumoto M.	Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA.	Nat Commun.	4	1833	2013
<u>Seya T</u> , Azuma M, Matsumoto M.	Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer.	Expert Opin Ther Targets.	17(5)	533-544	2013

Oshiumi H, Funami K, Aly HH, Matsumoto M, <u>Seya T.</u>	Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus.	Arch Immunol Ther Exp (Warsz)	61(2)	127-138	2013
Toscano F, Estornes Y, Virard F, Garcia-Cattaneo A, Pierrot A, Vanbervliet B, Bonnin M, Ciancanelli MJ, Zhang SY, Funami K, <u>Seya T.</u> , Matsumoto M, Pin JJ, Casanova JL, Renno T, Lebecque S.	Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor.	J Immunol.	190(2)	764-773	2013
Funabiki M, <u>Kato H</u> , Miyachi Y, Toki H, Motegi H, Inoue M, Minowa O, Yoshida A, Deguchi K, Sato H, Ito S, Shiroishi T, Takeyasu K, Noda T, and Fujita T	Autoimmune Disorders Associated with Gain of Function of the Intracellular Sensor MDA5	Immunity	40	1-14	2014
Ng CS, Jogi M, Yoo JS, Onomoto K, Koike S, Iwasaki T, Yoneyama M, <u>Kato H</u> , Fujita T	Encephalomyocarditis virus disrupts stress granules, the critical platform for triggering antiviral innate immune responses	J Virol	87(17)	9511-22	2013
Kakuni M, Yamasaki C, Tachibana A, Yoshizane Y, Ishida Y, <u>Tateno C.</u>	Chimeric mice with humanized livers: a unique tool for in vivo and in vitro enzyme induction studies.	Int J Mol Sci.	15(1)	58-74	2013
Arai M, Tokunaga Y, Takagi A, Tobita Y, Hirata Y, Ishida Y, Tateno C, Kohara M.	Isolation and Characterization of Highly Replicable Hepatitis C Virus Genotype 1a Strain HCV-RMT.	PLoS One.	8(12)	e82527	2013

Tokumasu D, Sakuma T, Hayashi Y, Hosoi S, Hiyama E, <u>Yamamoto T</u>	FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions	<i>Genes Cells</i>	in press			2014
Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii T, <u>Yamamoto T</u> , Matsuura S.	TALEN-mediated single-base pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome.	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	111	1461-1466		2014
Nakagawa Y, <u>Yamamoto T</u> , Suzuki KI, Araki K, Takeda N, Ohmuraya M Sakuma T.	Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice.	<i>Exp Anim</i>	63	79-84		2014
Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S and Yamamoto T.	Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity.	<i>Scientific Reports</i>	3	3379		2013
Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki KI, Kathod shiwagi K, Wadda H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S, <u>Yamamoto T</u>	Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications	<i>Genes Cells</i>	109(27)	10915-10929		2013

Mikihisa Takan o, Chieko Yama moto, Keisuke Sambuichi, Keis uke Oda,Junya Nagai, Akira S himamoto, <u>Hide toshi Tahara</u> , a nd Ryoko Yumo to	Introduction of a Single Transporter Gene ABCA 3 Directs RLE-6TN to More Type II-like Alveo lar Epithelial Cells	MEMBRAN	Vol.38 (5)	246-253	2013
Shiotani B, Nguyen HD, Håkansson P, Maréchal A, Tse A, <u>Tahara H</u> , Zou L.	Two distinct modes of ATR activation orchestrated by Rad17 and Nbs1.	Cell Rep.	30:3(5)	1651-62	2013
Ikeda A, Shimiz u T,Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Mizuguchi A, Shimizu K, Hat ano E, Uemoto S, ChibaT, <u>Mar usawa H</u>	Leptin Receptor Somatic Mutations are frequent in HCV-infected Cirrhotic Liver and associated with Hepatocellular Carcinoma.	Gastroenter ology	146(1)	222-232	2014
Ueda Y, Kaido T, Ito T, Ogaw a K, Yoshizaw a A, Fujim oto Y, Mori A, Miyagawa-Haya shino A, Hga H, <u>Marusawa H</u> , ChibaT, Ue moto S	Chronic rejection associa ted with antiviral therat ion py for recurrent hepatitis C after living donor li ver transplantation.	Transplantat ion in press			2014
Kim SK, Nasu A, Komori J,Sh imizumi T, Matsu moto Y, Minaki i Y,Kohno K,Sh imizumi K,Uemoto S, Chiba T, <u>Marusawa H</u>	A model of liver carcino genesis originating from hepatic progenitor cell s with accumulation of genetic alterations.	Int J Cance	134(5)	1067-76	2014
Watashi K, Lia ng G, Iwamoto M, <u>Marusawa H</u> ,UchidaN,Dai to T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, KiyoharaT, Suz uki R, Li J, To ng S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Waki ta T	Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a c ytidine deaminase AI D.	J Biol Che	288(44)	31715-27	2013

Ueda Y, <u>Marusawa H</u> , 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
Ohtsuru S, Ueda Y, <u>Marusawa H</u> , Inuzuka T, Nishijima N, Nasu A, Shimizu K, Koike K, Uemoto S, Chiba T	Dynamics of defective hepatitis C virus clones in reinfected liver graft recipients; ultra-deep sequencing analysis.	Journal of Clinical Microbiology	51	3645-3652	2013
Ueda Y, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Miyagawa Hyashino A, Haga H, <u>Marusawa H</u> , Teramukai 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
Masashi Iwamoto, Koichi Watashi, Senko Tsukuda, <u>Hussein Hassan Aly</u> , Masayoshi Fukasawa, Akira Fujimoto, Ryosuke Suzuki, Hideki Aizaki, Takayoshi Ito, Osamu Koiwai, Hiroyuki Kusuhara, Takaji Wakita.	Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP.	BBRC	Dec 14.	pii: S0006-291X(13)02111-6. doi	2013
Abe Y, <u>Aly HH</u> , Hiraga N, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M.	Thromboxane A2 synthase inhibitors prevent production of infectious hepatitis C virus in mice with humanized livers.	Gastroenterology	145(3):	658-67	2013
Takayuki Suzuki, Hiroyuki Oshiumi, Moeko Miyashita, <u>Hussein Hassan Aly</u> , MA. Misako Matsumoto, and Tsukasa Seya	Cell Type-Specific Subcellular Localization of Phospho-TBK1 in Response to Cytoplasmic Viral DNA.	PloS One	8(12)	e83639	2013

Irie T, Okamoto I, Yoshida A, Nagai Y, <u>Sakaguchi T</u>	Sendai virus C proteins regulate viral genome and antigenome synthesis to dictate the negative genome polarity.	J Virol	88	690-8	2014
Irie T, Yoshida A, <u>Sakaguchi T</u>	Clustered basic amino acids of the small Sendai virus C protein Y1 are critical to its Ran GTPase-mediated nuclear localization.	PLoS One	8	e73740	2013
Ueda K, Kawabata R, Irie T, Nakai Y, Tohya Y, <u>Sakaguchi T</u>	Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins: strong effects of extracts from persimmon (<i>Diospyros kaki</i>) on a board range of viruses.	PLoS One	8	e55343	2013
Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K.	.A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections.	Biochem Biophys Res Commun	441	230-235	2013
Arataki K, Hayes CN, Akamatsu S, Akiyama R, <u>Abe H</u> , Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W, Chayama K.	Circulating microRNA-212 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis B.	J Med Virol	85	789-798	2013

<p>Tsuge M, Murakami E, Imamura M, <u>Abe H</u>, Miki D, Hiraga N, Takahashi S, Ochi H, Nelson Hayes C, Gibson H, Matsuyama K, Kawakami H, Chayama K.</p>	<p>Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients.</p>	<p>J Gastroenterol.</p>	<p>48</p>	<p>1188-1204</p>	<p>2013</p>
---	---	-------------------------	-----------	------------------	-------------

IV. 研究成果の刊行物・別刷

(平成25年度)