

平成 25 年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

課題番号：H24-B創-肝炎-一般-004

予定期間：H24年度からH28年度まで

研究代表者：脇田隆宇

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：ウイルス第二部

職名：部長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 200,000,000円 2年目 200,000,000円

I. 研究の意義

(1) 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。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。本研究により我が国における 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。

(2) 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。

(3) 肝炎ウイルスに対する新たな治療法の開発は患者の予後を改善するのみならず、肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らすことにより、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与することが可能である。また、HBV の新規創薬ターゲットの発見および新規治療法の開発に繋がることを期待でき、世界の保健・医療福祉向上に多大な貢献が期待される。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) B型肝炎の治療には逆転写酵素阻害剤が導入されたが、単剤の治療ではウイルス排除は困難で、薬剤耐性ウイルス出現のリスクがある。従って、多くのHBVキャリアの治療法開発、改善のために新たな抗HBV治療薬の開発が必要である。

(2) B型肝炎の新規治療薬開発に向けて、HBVの感染複製増殖機構の解明を目指す。HBVは細胞表面から細胞内へ侵入し、核へ運ばれる。核内で不完全二重鎖DNAが完全二重鎖となり、cccDNAとなる。複数のウイルスRNAが転写され、翻訳された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ップを被り、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して新たな抗ウイルス薬標的を同定する。

(3) HBV のウイルス感染、複製増殖系を抑制する化合物の探索、siRNA による関与する宿主因子の探索から実施し、ウイルスライフサイクルの機構解析を進めて新たな抗ウイルス薬標的探索につなげる。「B型肝炎創薬実用化等研究事業」におけるウイルス培養細胞実験系や感染実験動物モデルの樹立を目指す研究班と連携することにより、新規化合物スクリーニングに資するアッセイ系を確立して、スクリーニングを実施する研究班に速やかに提供して、抗ウイルス薬候補の探索に供する。

Ⅲ. 2年間の研究成果

1. ウイルス生活環の制御因子同定：HBV複製誘導細胞を用いてHBV蛋白および複製複合体誘導化における約4000種類の蛋白の動態を比較定量的に評価した。さらにcccDNA検出系を確立し、cccDNAを阻害する化合物をスクリーニングした。
2. 初期感染過程の解析：NTCPがHBV感染に必須な因子であることを確認した。サイクロスポリン(CsA)が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スポーター活性を抑制してHBV感染を阻害する。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た。複数の化合物の抗HBV作用について検証を行った。
3. 遺伝子発現および転写機構、インテグレーション機構の解析：1)HBV mRNAの核外輸送機構解明ため、HBVゲノムの転写後調節エレメント(PRE)結合因子をスクリーニングした。PREに結合しHBVプレゲノムRNAの分解促進に働きHBV産生を抑制する宿主因子としてhnRNP Uを同定した。2)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(22517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、PARP1等のDNA損傷センサー、そして種々のRNAヘリケース等のノックダウン細胞を構築した。
4. ウイルス蛋白質発現、機能および構造の解析：1)カプシド蛋白を標的とした抗HBV薬の同定と開発を目的として、in silicoスクリーニングアッセイを実施し、選択的な抗HBV効果を示すいくつかのリード化合物の同定に成功した。既存の抗HBV核酸誘導体とは化学構造の全く異なる、2種類の新規核酸誘導体に強い抗HBV活性を同定した。2)コムギ無細胞系を用いて逆転写酵素タンパク質の合成および精製を試みたところ、Detergent添加により可溶化に成功した。3)HBx、HBcおよびRTタンパク質をコムギ無細胞系により大量合成し、それらをマウスへ免疫、脾細胞とミエローマ細胞のハイブーマを作製することで、各タンパク質に対するモノクローナル抗体を作製した。4)RNase H阻害剤スクリーニング系の初期バージョンを開発した。同じタンパク質を用いて、蛍光ラベルオリゴdTプライマー、ポリA RNA鋳型による試験管内逆転写系を開発した。
5. ウイルス粒子形成および分泌機構の解析：任意の時期に肝細胞にHBV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作成を進めている。F0～F1マウスとして計3ライン確保し、F1マウスへの薬剤投与にてマウス肝組織にHBV RNAが発現誘導されることを確認した。
6. HBx抗原の発現、機能、構造の解析：1)可溶性が高いHBxアミノ末端領域(1-90aa)を用いてHBxタンパク質と特異的に結合する宿主因子としてperoxiredoxin1(Prdx1)を同定した。2)発癌と関連するHBxタンパク質の変異につきグローバルデータベースを用いて検討した。HBV感染および持続感染に必須と考えられているHBxタンパク質の転写活性化能につき検討した。HBxタンパク質はNF- κ Bシグナル伝達系を始めとしてSRE、SRF、AP-1の各シグナル伝達系を活性化した。HBxタンパク質のNF- κ B転写活性化能を抑制する薬剤スクリーニングを行うため、レポータープラスミドを恒常的に保持するHuh7細胞を樹立した。3)HBxタンパク質と相互作用する宿主因子を質量分析法で解析し、脱メチル化酵素であるJumonji domain containing 5(JMJD5)を同定した。JMJD5はHBxと直接結合し、HBVの粒子産生を抑制した。JMJD5はp53との相互作用が示唆されており、HBVの粒子産生にp53の関与を示す成績が得られた。HBx蛋白質は主に細胞質に局在するが、JMJD5は核に局在している。HBx発現細胞ではJMJD5は核から細胞質へ局在を変化した。
7. 病原性解析、線維化、オートファジーの影響：1)HBV感染キメラマウスの線維化肝臓サンプルを用いてマイクロアレイ解析を行いHBV感染による遺伝子発現の変動を検証した。さらにデータからpathway解析を行い線維化に関わる推測されるsignal pathwayの抽出を行った。2)In vitroにおいて、オートファジーの抑制はHBV増殖を抑制し、オートファジーの促進はHBV増殖を促進した。

Ⅳ. 平成26～28年度の課題

- (1)cccDNA 検出系を用いて、化合物ライブラリーおよび宿主遺伝子を標的とした siRNA ライブラリーにより、cccDNA 合成に関与する宿主因子の同定を目指す。
- (2)サイクロスポリンの誘導体による感染阻害剤の開発を目指す。レセプター候補の NTCP の組換え蛋白の作製に成功した。結合化合物や環状ペプチドの探索、構造解析を進める。
- (3) 転写後制御に重要な宿主因子の探索を進め、宿主因子-HBV RNA 結合を標的とした阻害剤スクリーニング系を構築する。種々の RNA ヘリケースや p53、p21、PML など核内に局在する癌抑制因子等と HBV 分子クローンを HepG2-NTCP 細胞に共発現させ、HBV 複製に関与する宿主因子の同定を進める。APOBEC3G のシチジンデアミナーゼ活性に非依存的な抗 HBV 作用機序についても検討する。
- (4)カプシド阻害剤のリード化合物の誘導体について、抗 HBV 活性を検討することで、リード化合物の最適化を行う。
- (5) RT-RNase H ドメインの発現精製法を改良する。試験管内 HBV 逆転写系から、阻害剤スクリーニング系を開発する。
- (6) HBx タンパク質の NF- κ B 転写活性化を阻害する薬剤のスクリーニングを行う。HBx タンパク質の転写活性化能を阻害する薬剤の HBV 複製に対する影響を検討する。
- (7)コムギ無細胞系およびアルファスクリーンを用いた *in vitro* ハイスクリーン薬剤アッセイ系を構築する。また、肝細胞において、I 型インターフェロンより誘導される Tetherin/BST2 の抗 HBV 作用および HBV タンパク質による Tetherin 抑制の分子メカニズムについて検討を行う。

V. 行政施策への貢献の可能性

1. 本研究により、HBV 感染による肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らすことができれば、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与することが可能となる。
2. ウイルス性肝炎患者を広く検診で拾い上げ、治療が必要な患者に対して適切な治療を行うことが社会的な要請である。このため、より効果の高い治療法を低コストで実施できるよう開発していく必要がある。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, 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. BBRC 2013 in press

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 in press.

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- α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. J Biol Chem. 2013 Nov 1;288(44):31715-27.

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 2013;43:67-71.

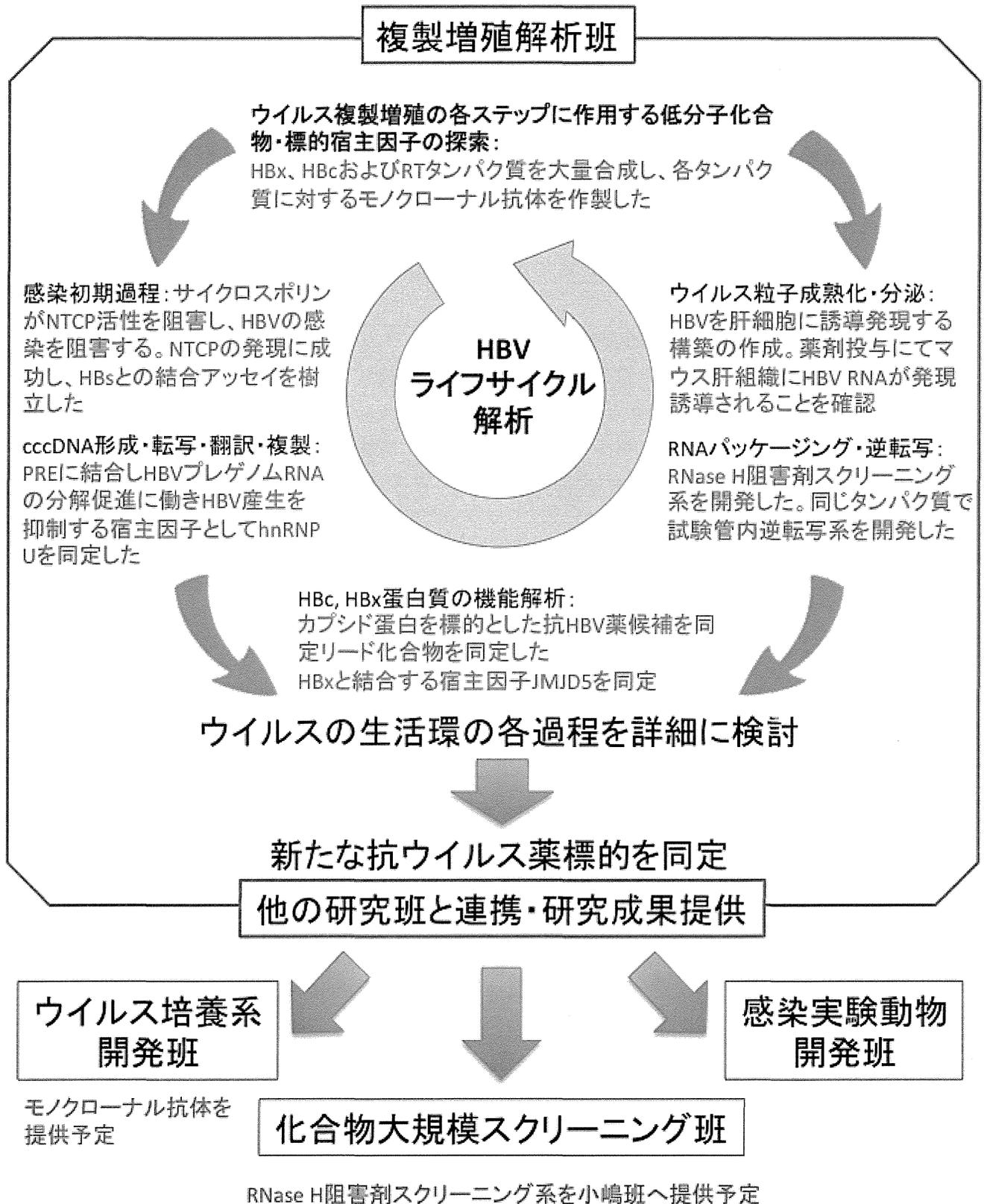
Li Q, Yu C-H, Yu J-H, Liu L, Xie S-S, Li W-W, Yang X, Fan W-B, Gai Z-T, Chen S-J, Kato N. ABO blood group and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in patients with chronic hepatitis B. PLoS One 7: e29928, 2012

Li Q, Li W-W, Yang X, Fan W-B, Yu J-H, Xie S-S, Liu L, Ma L-X, Chen S-J, Kato N. Type 2 diabetes and hepatocellular carcinoma: a case-control study in patients with chronic hepatitis B. Int J Cancer 131: 1197-202, 2012

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. 19:6214-20, 2013

VII. III (2年間の研究成果)の概要図等

今年度の研究成果を赤字で記載



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和63年～平成4年	名古屋大学大学院医学研究科
平成4年～7年	米国ハーバード大学医学部・客員研究員
平成7年～10年	東京都臨床医学総合研究所・主任研究員
平成10年～18年	東京都神経科学総合研究所・副参事研究員
平成18年～現在	国立感染症研究所・ウイルス第二部・部長

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

名古屋大学大学院医学研究科 坂本信夫教授および各務伸一講師
 米国ハーバード大学医学部 Jack Wands 準教授
 東京都臨床医学総合研究所 小原道法室長
 東京都神経科学総合研究所 保井孝太郎副所長
 国際医療研究センター、肝炎・免疫研究センター 溝上雅史センター長

・主な研究課題

C型肝炎ウイルス感染複製機構の解析
 肝炎ウイルスの病原性発現機構の解析
 肝炎ウイルス感染症の新たな治療法の開発
 下痢症ウイルス、腸管感染ウイルスの研究

・これまでの研究実績

論文業績：英文原著 251 報、英文レビュー5 報、英文著書 4 報、邦文 60 報

代表論文 20 報

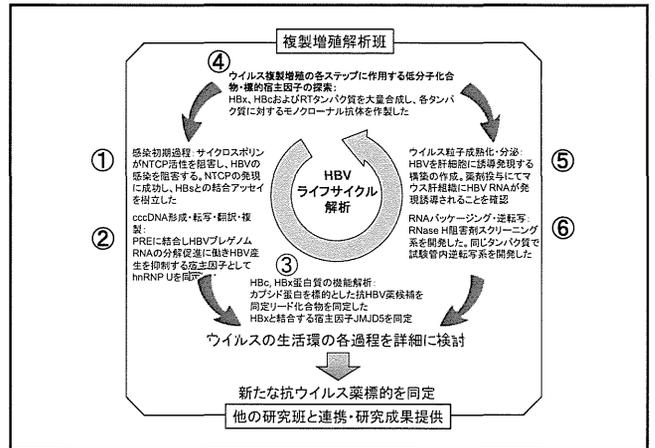
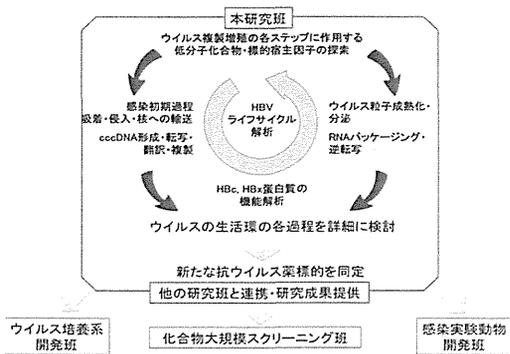
- 1) Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of Hepatitis C Virus Genotype 3a in Cultured Cells. *Gastroenterology*. 2012 S0016-5085(12)01373-X.
- 2) Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol*. 2012 86(19):10805-20.
- 3) Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, Wakita T. Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone. *Microbiol Immunol*. 2012 May;56(5):308-17.
- 4) Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, Wakita T. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine*. 2011 29(29-30):4821-8.
- 5) Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog*. 2011 7(10):e1002289.
- 6) Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H. Tyrosine Sulfation of the Amino Terminus of PSGL-1 Is Critical for Enterovirus 71 Infection. *PLoS Pathog*. 2010 6(11):e1001174.
- 7) Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med*. 2009 15(7):794-7.
- 8) Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatol*. 2008 48(3):732-40.

- 9) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. **Nat Cell Biol.** 2007 9(9):1089-97.
- 10) Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. **Nat Protoc.** 2006;1(5):2334-9.
- 11) Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Miyamoto M, Kaga M, Barth H, Baumert TF, Dubuisson J, Wakita T. CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. **J Virol.** 2007 81(10):5036-45.
- 12) Wakita T, T Pietschmann, T Kato, T Date, M Miyamoto, Z Zhao, K Murthy, A Habermann, H-G Kräusslich, M Mizokami, R Bartenschlager, T J Liang. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome. **Nat Med.** 2005 11:791-6.
- 13) Zhong J, P Gastaminza, G Cheng, S Kapadia, T Kato, DR Burton, SF Wieland, S Uprichard, T Wakita, FV Chisari. Robust Hepatitis C Virus Infection in Vitro. **PNAS** 2005, 102:9294-9.
- 14) Date T, Kato T, Miyamoto M, Zhao Z, Yasui K, Mizokami M, Wakita T. Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon Can Replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. **J Biol Chem.** 2004, 279:22371-6.
- 15) Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, Wakita T. Efficient Replication of the Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon. **Gastroenterol.** 2003, 125:1808-17.
- 16) Wakita T, Taya C, Katsume A, Kato J, Yonekawa H, Kanegae Y, Saito I, Hayashi Y, Koike M, and Kohara M. Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. **J Biol Chem.** 1998 273: 9001-6.
- 17) Wakita T and Wands JR. Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligodeoxy-nucleotides: In vitro model for selection of target sequence. **J Biol Chem.** 1994 269:14205-10.
- 18) Wakita T, Kakumu S, Shibayama M, Yoshioka K, Ito Y, Shinagawa T, Ishikawa T, Takayanagi M, Morishima T. Detection of pre-C and core region mutants of hepatitis B virus in chronic hepatitis B virus carriers. **J Clin Invest.** 1991 88: 1793-801
- 19) Wakita T, Kakumu S, Yoshioka K, Ishikawa T, Ito Y, Shinagawa T. Cellular immune responses of peripheral blood mononuclear cells to HBV antigens during chronic and acute HBV infection. **Digestion** 1992 52 : 26-33
- 20) Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Ito Y, Takayanagi M, Higashi Y, Shibata M, Morishima T. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon - alpha therapy : relationship to genotypes of hepatitis C virus. **Hepatology** 1992 16: 293-9

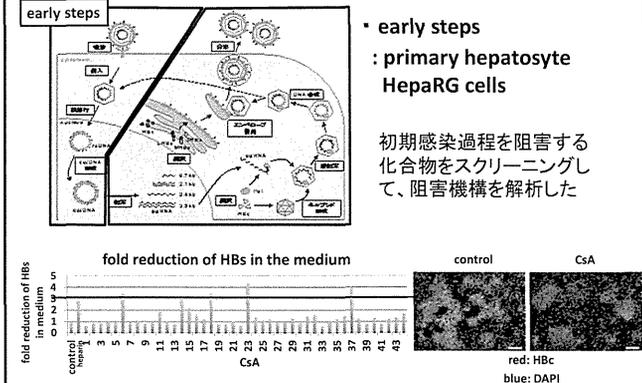
特許

- 1)US 08/474, 700 Antisense inhibition of hepatitis C virus
- 2)US 08/467, 859 Chimeric hepatitis B/hepatitis C virus vaccine
- 3)PCT/US95/13552 Hepatitis virus vaccine
- 4)平 8-195076 C型肝炎モデル動物
- 5)特願 2000-367365 劇症C型肝炎ウイルス株の遺伝子
- 6)特願 2002-096383 C型慢性肝炎、肝硬変、肝癌病態を呈するモデル動物およびその作製方法
特許番号： EP 1627917, JP 4694208, US 7935676, CN 200380110406.5
- 7)発明の名称： 遺伝子型 2a のC型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム由来の核酸を含む核酸構築物、及び該核酸構築物を導入した細胞 登録国： EP, JP, US, CN
- 8)発明の名称： 新規 HCV ウィルス株の遺伝子、核遺伝子を含む核酸構築物、及び該核酸構築物を導入した細胞 登録国： US, JP 特許番号： US 7659103, EP 1721985 1942191, CN 200580011515
- 9)発明の名称： ヒトC型肝炎ウイルスの全長ゲノムを含む核酸構築物及び該核酸構築物を導入した組換え全長ウイルスゲノム複製細胞、並びにヒトC型肝炎ウイルス粒子の作成方法 登録国： US, EP, CN 特許番号： AU 200527513, EP 1801209
- 10)発明の名称： 自律複製能を有する改変されたヒトC型肝炎ウイルスゲノム RNA 登録国： AU, EP 特許番号： EP 1930416
- 11)発明の名称： 新規組換え型ヒトC型肝炎ウイルス様粒子とその産生方法 登録国： E P 特許登録日：2011年12月14日 特許番号： EP 1956087
- 12)発明の名称： 感染性C型肝炎ウイルス粒子高生産系 登録国： E P 特許登録日：2010年5月26日
- 13)特願 2006-351809 C型肝炎ウイルス阻害剤を検出するためのアッセイ方法
- 14)特願 2007-167916 UV によるC型肝炎ウイルスの不活化方法
- 15)特願 2007-184587 感染性エピトープタグ化 HCV 粒子とその利用
- 16)特願 2007-193413 C型肝炎ウイルス (HCV) に対して感染阻害活性を有する抗体およびその用途
- 17)特願 2008 遺伝子型 1b の C型肝炎ウイルス粒子の高効率産生法
- 18)特願 2009- C型肝炎ウイルスワクチン組成物

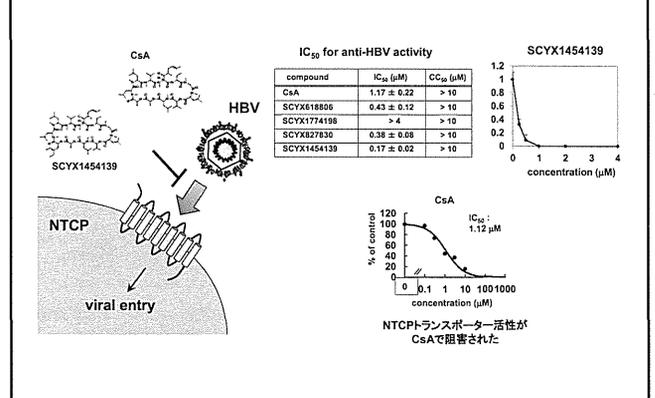
B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究



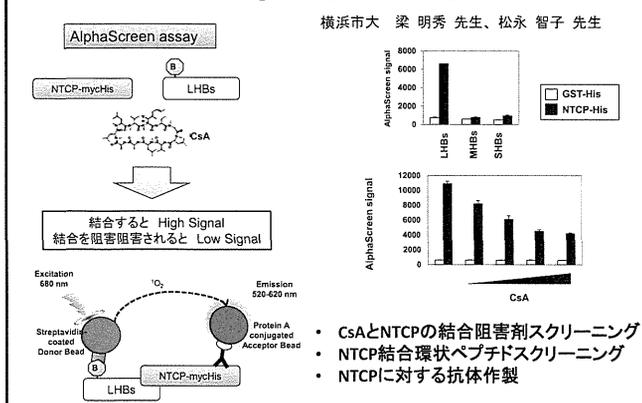
① 低分子化合物を利用したB型肝炎の生活環の解明 感染研ウイルス第二部 渡士幸一・相崎英樹・脇田隆字



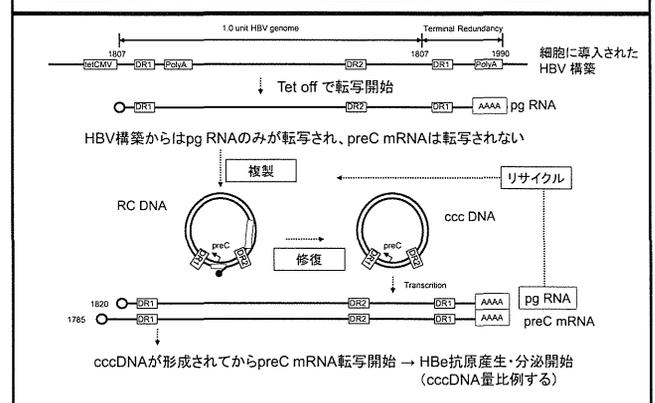
CsAとその誘導体はNTCP活性とHBV感染を阻害する



CsAはNTCPとLarge HBs 抗原の結合を阻害する



② HepAD38.7 細胞を用いたcccDNAアッセイ 感染研ウイルス第二部



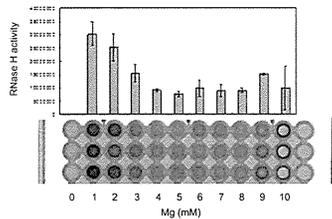
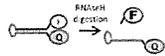
RNase H 活性の確認

Takara 1h 16h
Probe: 30'



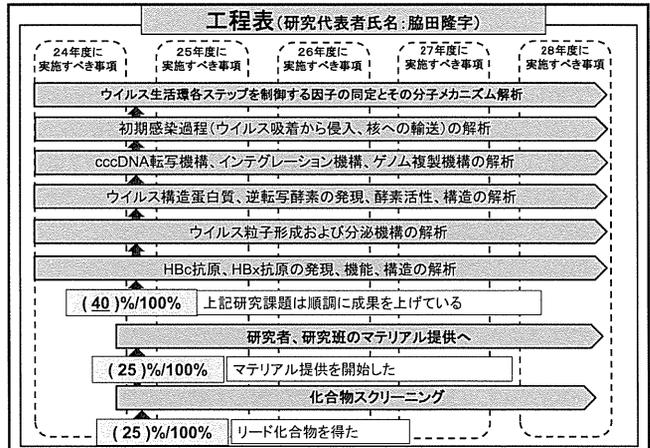
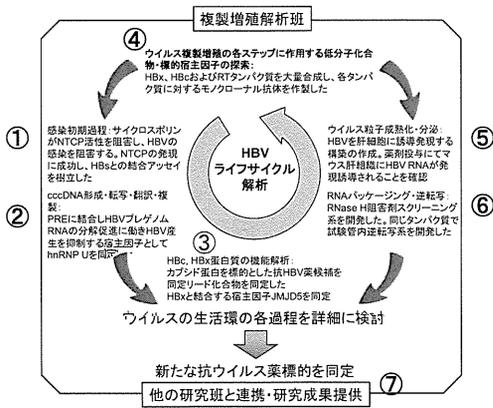
High throughput screening system of RNase H inhibitors

Probe (substrate): RC961-1



その他の分担研究課題

- 京大 千葉 勉: 免疫系を保持した新規マウスモデル
- 東大 菅 裕明: NTCP結合環状ペプチド探索
- 横浜市大 朴 三用: HBV蛋白質構造解析
- 神戸大 堀田 博: HBx結合蛋白質
- 名市大 飯島沙幸: HBsによるERストレス
- 山梨大 榎本信幸: PreS変異解析
- 感染研 加藤孝宣: 薬剤耐性機構解析
- 東芝病院 Akbar: 病原免疫と防御免疫
- 昭和大学 森川賢一: 感染細胞の網羅的プロテオーム
- 熊本大 有海康雄: HBVゲノム核内維持機構



利益相反について

利益相反の有無等 (平成25年度)

- ア 利益相反の有無 有・無 (いずれかを記載)
- イ 利益相反がある場合には具体的内容 (以下に記載)

なし

他の研究班への参加状況

研究代表者が、「肝炎等克服緊急対策研究事業」または「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業 (肝炎関係研究分野)」研究班の研究代表者として参加しているか (ア又はイに記載)

「肝炎ウイルスの複製増殖および病原性発現機構と薬剤感受性の解析研究班」(研究代表者: 脇田隆宇)
本研究班ではC型肝炎ウイルスの研究をおこなっており、代表者の研究に重複はない

合同研究会議開催状況

他の研究会と合同での研究会議開催状況（平成25年度）

平成25年9月9日 合同研究会議、脇田班、下遠野班、成松班、小嶋班

平成25年12月25日 合同研究会議、B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究（脇田隆宇）、
B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と感染系の樹立及び感染系による病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発（上田啓次）

平成 25 年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と感染系の樹立及び感染系による病態機構の解析と新規抗 HBV 剤の開発

課題番号：H24-B創-肝炎-一般-005

予定期間：H24 年度から H28 年度まで

研究代表者：上田啓次

所属研究機関：国立大学法人大阪大学

所属部局：大学院医学系研究科

職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：1 年目 195,000,000 円 2 年目 200,000,000 円

I. 研究の意義

- (1) HBV 感染制御のための新規薬剤の探索、治療法の開発には HBV 感染動態を追跡できる簡便かつ効率の良い感染系が必要であるが、未だに有効な感染系がない。
- (2) HBV 感染機構を含めた生活環や病態発症機構の解明のためにも感染系は不可欠である。
- (3) HBV の特性や病態に基づいた治療法は開発されていない。
- (4) HBV 受容体 (HBV-R) 全容解明は科学的にもひじょうにインパクトが高い。
- (4) 糖鎖修飾はウイルス感染動態や病態発症と深く関わるが、HBV 感染機構や関連病態との関わりは不明である。
- (5) HBV 持続感染には免疫抑制機構が関わっていると考えられるが、その機構の詳細は不明である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HBV 感染受容体全容の解明は、有用な HBV 感染系の構築、立体構造に基づいた新規治療薬の開発に発展する。
- (2) HBV 感染系の構築は、HBV の感染機構/生活環、HBV 関連病態機構の解明、新規治療薬・治療法の探索・開発に発展する。
- (3) HBV の感染機構/生活環、HBV 関連病態機構の解明は治療標的を具体化する。
- (4) HBV ポリメラーゼの全長或は領域別発現・精製は活性測定系を可能にし、high-throughput 薬剤探索系構築や立体構造に基づいた新規治療薬の開発に発展する。
- (5) 糖鎖修飾と HBV 感染・病態発症機構との関連性の解明は、HBV 感染機構や病態発症に関わるバイオマーカーの同定に繋がり、検査法の開発に繋がる。
- (6) HBV 持続感染をもたらす免疫抑制機構の解明は、病態発症機構の解明、新たな治療戦略の標的を具体化する。

III. 2 年間の研究成果

・研究代表者

- (1) HBV の preS1~HBsN 末 (PS1-SSN) と相互作用する新規 2 因子を分離し、発現系を構築した (現在、HBV-R としての活性を検討している)。

- (2) HepG2 での NTCP の発現は単純に HBV 感染を許容しないことを示した。

・研究分担者(森石恆司)

- (1) NTCP を発現させた HepG2 細胞から preS1 ペプチド結合性の高いクローンを選抜し、HBV 感染性を証明した。

- (2) NTCP 発現 HepG2 細胞をある薬剤処理することにより HBV 感染効率を著しく上昇させることを示した。このことは NTCP 発現局在によるものと思われ、HBV の細胞への感染経路を考える上で興味深い。

・研究分担者(黒木和之)

- (1) 蛍光蛋白遺伝子 (YFP、tdTomato)、分泌型ルシフェラーゼ (GLuc、NonoLuc) 遺伝子を組込んだ組換え HBV の作製が可能であること、その感染性を示した。本ウイルスは迅速な HBV 感染モニタリングを可能にする。

- (2) 上記の組換え HBV を用いて、NTCP の HuH7 強制発現は単純に HBV 感染を許容しないことを示した。

・研究分担者(黒田俊一)

- (1) BNC (HBV large S 蛋白粒子; 疑似 HBV 粒子) がヘパラン硫酸依存的に HuH7 細胞に結合すること、BNC の HuH7 細胞と HuS-E/2 細胞への結合量と侵入量に大差がないことを示した。

- (2) NTCP を過剰発現する非ヒト肝臓由来細胞は BNC と結合できないこと、HuH7 細胞において NTCP を過剰発現しても BNC の結合量と侵入量に無関係なことから、NTCP が HBV-R の本体ではないことを示した。

・研究分担者(岡本 徹)

- (1) 肝臓特異的にヒト NTCP を発現するトランスジェニックマウスの作製に着手した。
- (2) HBx 蛋白質は CUL1/SKP1 と FBXL5 (F-box 蛋白質) から成る SCF 複合体により分解を受けること、FBXL5 欠損細胞株で HBV 複製は減少することを示した。
 - ・研究分担者(三善英知)
 - (1) HBV を産生する HB611 細胞では、親株(HuH6)に比べコアフコースの増加とシアル酸の増加、および E4-PHA との結合性が低下していること、BNC の取込みが増加していることを示した。
 - (2) BNC の取込み効率の良い細胞では NTCP の発現が増加しており、コアフコースやシアル酸の増加と関連があるものと推測された。
 - ・研究分担者(三崎 亮)
 - (1) HBV pseudotype particle: (HBVpp) を発現する HuH7 細胞では *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、マンノース (Man)、フコース (Fuc) からなる分岐型糖鎖の合成が増加していることが解った。
 - (2) HBV を産生する HB611 細胞でも Fuc を持つ分岐型糖鎖の産生が上昇しており、HBV の感染が α 1,6-フコース転移酵素をはじめ分岐型糖鎖を生合成する糖転移酵素の発現量増加の起因となることが示唆された。
 - ・研究分担者(竹原徹郎)
 - (1) 健常人と B 型肝炎患者抹消血中の MDSC 数に有意な差はないことが解った。
 - (2) 血中 HBV 量の多い患者では MDSC 数が有意に低下していた。このことは HBV の存在が MDSC の誘導を抑制していることを示唆している。
 - ・研究分担者(考藤達哉)
 - (1) NK 細胞は HBV により IFN- γ を産生し、HBV 複製を抑制すること、NK 活性は DC が共存することで、IFN- α 、IFN- λ 依存性に増強することを示した。
 - (2) HBV により ISG の発現は抑制されること、NK、DC の共存下において IDO が誘導されることから、NK 細胞、DC は HBV 感染細胞を認識し、ISG、IDO などの誘導を介して HBV 複製を抑制することが示唆された。
 - ・研究分担者(大崎恵理子)
 - (1) HBVpol の逆転写ドメイン (RT) を GST-RT として大腸菌にて発現させ、部分精製に成功した。
 - (2) 本 RT の逆転写酵素活性を検出した。

IV. 平成 26~28 年度の課題

- (1) HBV 感染受容体全容を明らかにし、培養細胞系及び個体レベルでの感染系を構築する。
- (2) 樹立した感染系を用いて HBV 感染機構を明らかにする。
- (3) NTCP の大量発現・精製系を確立し、その立体構造に基づく創薬を実行する。
- (4) 感染系樹立により、HBV 関連病態発症モデルを構築し、病態発症機構を解明する。
- (5) 感染系樹立により、新規抗 HBV 剤のアッセイ系を確立する。
- (6) HBV ポリメラーゼ全長或は領域別発現により、活性測定系の樹立、立体構造解析による high-throughput 薬剤探索/*in-silico* 創薬デザインを実現する。
- (7) 糖鎖修飾と HBV 感染、関連病態発症機構を解明し、新たなバイオマーカーを創出する。
- (8) HBV 持続感染をもたらず免疫抑制機構を解明し、新規治療戦略を開発する。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) HBV 感染症を制御する新たな治療標的を定めることが可能になる。
- (2) 新規抗 HBV 剤の発掘により、HBV 感染症を制御する新たな治療法、治療指針を確立できる。
- (3) 新規抗 HBV 剤の開発で、日本に約 120~150 万人、世界に 4 億人存在していると言われる HBV 感染患者を縮小させることが出来る。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者

- (1) Ueda, K. “One year passed since a bile acid transporter (sodium taurocholate cotransporting peptide [NTCP] was nominated as a hepatitis B virus (HBV) entry receptor; has the NTCP has been as a real HBV receptor? Medical Microbiology and Diagnosis (submitted)
- (2) Ueda, K., Ohsaki, E., and Omori, H. “Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype; a versatile tool for Identification of the HBV Receptor and Investigation of HBV infectivity.” Biochem. Biophys. Res. Comm. (under revision)
- (3) Ueda, K. “Change in Cellular Gene Expression by hepatitis B virus (HBV)” Conditionally accepted for iConcept (revised version submitted)
- (4) Ueda, K. “Start or End?; one of the biggest mysteries is finally solved?” Medical Microbiology and

Diagnosis dx.doi.org/10.4172/2165-7866.1000e101.

研究分担者 (黒田俊一)

(1) Iijima, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., and Kuroda, S. “Nanocapsule-based probe for evaluating the orientation of antibodies immobilized on a solid phase.” *Analyst* 138: 3470-3477, 2013.

(2) Yoshimoto, N., Kida, A., Jie, X., Kurokawa, M., Iijima, M., Niimi, T., Maturana, A.D., Nikaido, I., Ueda, H.R., Tatematsu, K., Tanizawa, K., Kondo, A., Fujii, I., and Kuroda, S. “An automated system for high-throughput single cell-based breeding.” *Scientific Reports* 3: 1191-1199, 2013.

(3) Iijima, M., Yamamoto, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., and Kuroda, S. “Bio-nanocapsules for signal enhancement of alkaline phosphatase-linked immunosorbent assays.” *Biosci. Biotech. Biochem.* 77: 843-846, 2013.

研究分担者 (三善英知)

(1) Kamada Y, Fujii H, Fujii H, Sawai Y, Doi Y, Uozumi N, Mizutani K, Akita M, Sato M, Kida S, Kinoshita N, Maruyama N, Yakushijin T, Miyazaki M, Ezaki H, Hiramatsu N, Yoshida Y, Kiso S, Imai Y, Kawada N, Takehara T, Miyoshi E. “Serum Mac-2 binding protein levels as a novel diagnostic biomarker for prediction of disease severity and nonalcoholic steatohepatitis.” *Proteomics CA*, in press.

(2) Kamada Y, Kinoshita N, Tsuchiya Y, Kobayashi K, Fujii H, Terao N, Kamihagi K, Koyama K, Yamada S, Daigo Y, Nakamura N, Taniguchi N, Miyoshi E. “Reevaluation of a lectin antibody ELISA kit for measuring fucosylated haptoglobin in various conditions.” *Clin. Chim. Acta* 417, 48-53, 2013.

(3) Kamada Y, Akita M, Takeda Y, Yamada S, Fujii H, Sawai Y, Doi Y, Asazawa H, Nakayama K, Mizutani K, Fujii H, Yakushijin T, Miyazaki M, Ezaki H, Hiramatsu N, Yoshida Y, Kiso S, Imai Y, Kawada N, Takehara T, Miyoshi E. “Serum fucosylated haptoglobin as a novel diagnostic biomarker for predicting hepatocyte ballooning and nonalcoholic steatohepatitis.” *PLOS ONE* 8(6), e66328, 2013.

研究分担者 (竹原徹郎)

(1) Higashitani K, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Matsubara T, Kakita N, Oze T, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Mita E, Imai Y, Kasahara A, Okuno A, Takikawa O, Hayashi N, Takehara T. “Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection.” *J Gastroenterol.* 48(5):660-7, 2013.

研究分担者 (考藤達哉)

(1) Matsubara, T., Kanto, T., Kuroda, S., Yoshio, S., Higashitani, K., Kakita, N., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Kasahara, A., Tomimaru, Y., Tomokuni, A., Nagano, H., Hayashi, N. and Takehara, T., “TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlated with angiogenesis.” *Hepatology.* 2013. 57: 1416-1425, 2013.

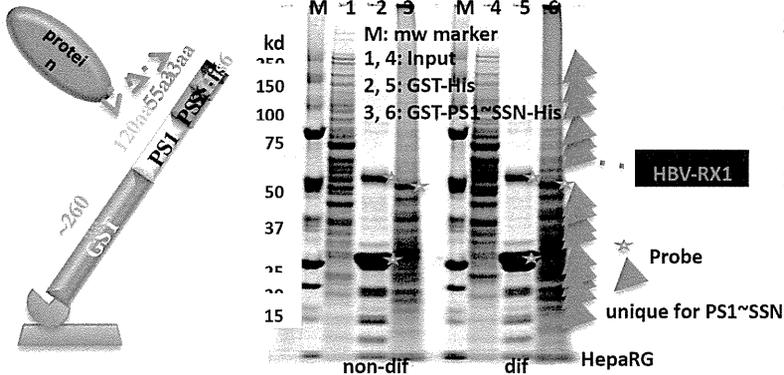
(2) Higashitani, K., Kanto, T., Kuroda, S., Yoshio, S., Matsubara, T., Kakita, N., Oze, T., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Mita, E., Imai, Y., Kasahara, A., Okuno, A., Takikawa, O., Hayashi, N. and Takehara, T. “Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection.” *J Gastroenterol.* 48: 660-670, 2013.

(3) Aketa, H., Tatsumi, T., Kohga, K., Tsunematsu, H., Aono, S., Shimizu, S., Kodama, T., Nawa, T., Shigekawa, M., Hikita, H., Sakamori, R., Hosui, A., Miyagi, T., Hiramatsu, N., Kanto, T., Hayashi, N. and Takehara, T. “The combination therapy of alpha-galactosylceramide and 5-fluorouracil showed antitumor effect synergistically against liver tumor in mice.” *Int J Cancer* 133: 1126-1134, 2013.

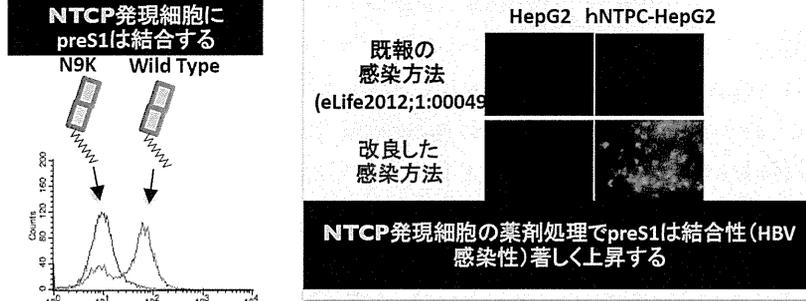
Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

● PSI~SSN結合蛋白及びNTCPIによるHBV感染性(研究代表者)

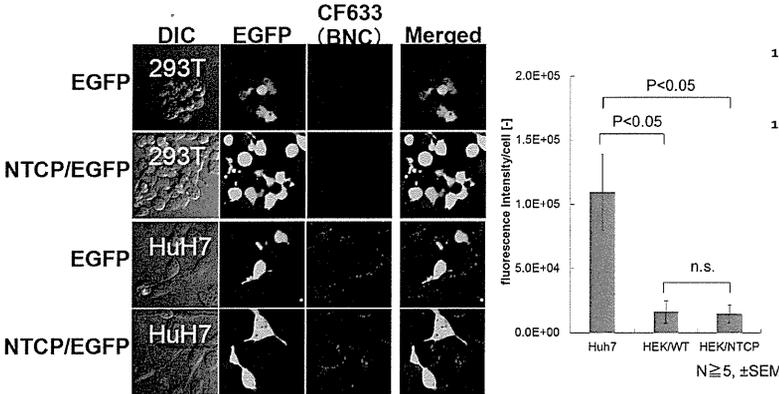
HBV-R候補因子としてHBV-RX1を分離・同定



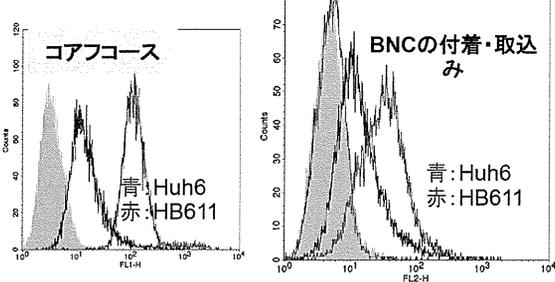
● NTCP発現細胞はある薬剤処理で著しくHBV感染性が上昇する(研究分担者: 森石)



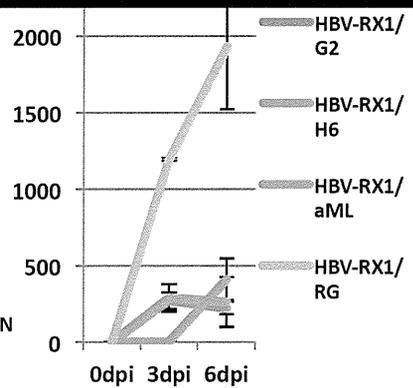
● NTCP発現293細胞はBNCを取込まない、NTCP発現HuH7細胞はBNC取込みを促進しない(研究分担者: 黒田)



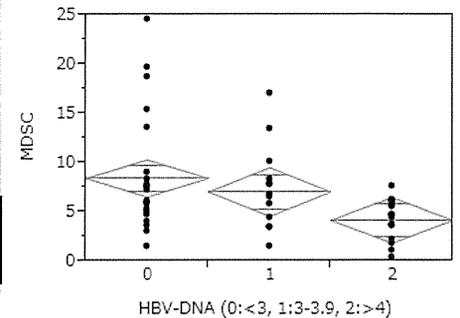
● HBV産生によりシアル酸、コアフコース修飾が亢進し、BNC取込みが上昇する(研究分担者: 三善、三崎)



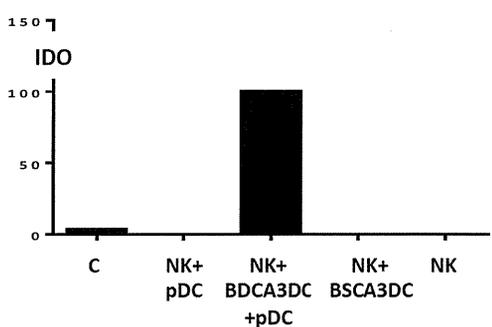
HBV-RX1発現によるrcHBV/NL1.3Neo(研究分担者: 黒木)の感染性の評価



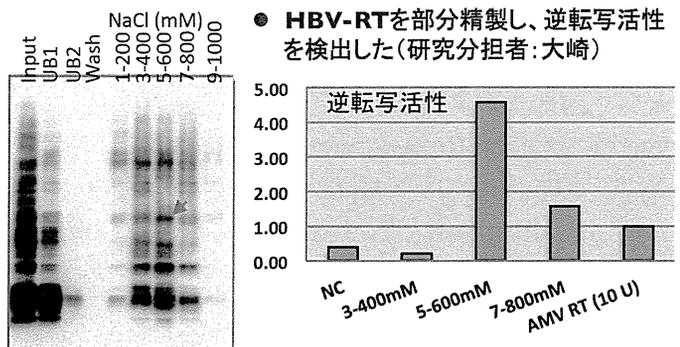
● 血中HBV DNA量の増加はMDSC誘導を抑制する(研究分担者: 竹原)



● HBV複製はNK+BDC43DC+pDC依存性にIDO産生を誘導する(研究分担者: 考藤)



● HBV-RTを部分精製し、逆転写活性を検出した(研究分担者: 大崎)



●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

1986～1992：大阪大学細胞工学センター（松原謙一研究室）

1992～1995：カリフォルニア大学サンフランシスコ校（Don Ganem 研究室）

1996～1999：大阪大学医学部第一内科消化器研究室（鎌田武信研究室）

1999～2006：大阪大学医学部微生物学教室（山西弘一研究室）

2006～2009：浜松医科大学感染症学感染機構解析分野

2009～現在：大阪大学大学院医学系研究科感染免疫医学講座ウイルス学

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

1986～1992：大阪大学細胞工学センター（松原謙一研究室）/松原謙一、釣本俊樹、千坂修

1992～1995：カリフォルニア大学サンフランシスコ校（Don Ganem 研究室）/Don Ganem

1996～1999：大阪大学医学部第一内科消化器研究室（鎌田武男研究室）/鎌田武信、林紀夫

1999～2006：大阪大学医学部微生物学教室（山西弘一研究室）/山西弘一

・主な研究課題

- 1) 抗HBV剤スクリーニングシステムの開発
- 2) 感染性粒子形成に関わるHBV膜蛋白機能の解析
- 3) HBVプレゲノムRNA転写制御機構の解明
- 4) ウッドチャック肝炎ウイルスによる発癌機構解明
- 5) カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの前初期遺伝子活性化機構の解明
- 6) カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス溶解複製機構の解明
- 7) カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス潜伏感染複製と遺伝子発現制御機構の解明
- 8) カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスによる発癌機構の解明
- 9) HBV HBs 粒子形成能を利用した万能型ワクチン創製技術の開発
- 10) HBV pseudotype の作製によるHBVレセプター同定戦略
- 11) 感染誘導した細胞を用いた差分解析によるHBVレセプター同定戦略

・これまでの研究実績

※研究代表者の本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、太字・斜体文字で記載してください)

※ 発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

1. *Ueda, K. "One year passed since a bile acid transporter (sodium taurocholate cotransporting peptide [NTCP] was nominated as a hepatitis B virus (HBV) entry receptor; has the NTCP has been as a real HBV receptor? Medical Microbiology and Diagnosis (submitted)*
2. *Ueda, K., Ohsaki, E., and Omori, H. "Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype; a versatile tool for Identification of the HBV Receptor and Investigation of*

- HBV infectivity.* *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (under revision)
3. Ueda, K. “Change in Cellular Gene Expression by hepatitis B virus (HBV)” *Conditionally accepted for iConcept (revised version submitted)*
 4. Ueda, K. “Start or End? ; one of the biggest mysteries is finally solved?” *Medical Microbiology and Diagnosis dx.doi.org/10.4172/2165-7866.1000e101.*
 5. Ueda, K. “Kaposi’s Sarcoma-associated Herpesvirus Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic Insults are evaded.” *J. Blood and Lymph* 2:3, 2012. doi.org/10.4172/2165-7831.1000e109.
 6. Ueda, K. “For the future studies of Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus”. An Editorial. *Frontiers in Virology* 3: 1-2, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00237.
 7. Ohsaki, E. and Ueda, K. “Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency.” *Frontiers in Virology.* 3:7-19, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00007.
 8. Ueda, K., Ohsaki, E., Nakano, K., and Zheng, X. “Characterization of Kaposi’s sarcoma-associated virus-associated lymphomas by DNA array analysis.” In “Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD). *Leukemia Research and Treatment.* doi:10.4061/2011/726964.
 9. Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., and Watanabe, S. “Kaposi’s sarcoma-associated Virus governs gene expression profiles toward B cell transformation.” In “*Herpesviruses*” Magel, D. G. and Tyring, S., ed., In-Tech ISBN 978-953-51-0186-4. pp93-104, 2012.
 10. Suzuki, T., Isobe, T., Kitagawa, M., and Ueda, K. “Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA positively affects on ubiquitylation of p53.” *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 403: 194-197, 2010.
 11. Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., Watanabe, S. “KSHV-infected PEL cell lines exhibit a distinct gene expression profile.” *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 394: 482-487, 2010.
 12. Ohsaki, E., Suzuki, T., Karayama, M., Ueda, K. “Accumulation of LANA at Nuclear Matrix fraction is important for Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Replication in Latency.” *Virus Research* 134: 74-84, 2009.
 13. Ueda, K., Sakakibara, S., Ohsaki, E., Yada, K. “Lack of a Mechanism of Faithful Partition and Maintenance for the KSHV Genome.” (2006) *Virus Research* 122: 85-94.
 14. Ohsaki, E., Ueda, K., Sakakibara, S., Do, E., Yada, K., Yamanishi, K. (2004) “PARP1 (poly [ADP-ribose] polymerase 1) binds with Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) terminal repeat sequence and modulated KSHV replication in latency.” *J. Virol.* 78 (18): 9936-9946.
 15. Nishimura, K., Ueda, K., Guwanan, E., Sakakibara, S., Do, E., Ohsaki, E., Yada, K., Okuno, T., Yamanishi, K. (2004) “Posttranscriptional regulator of Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus interacts with RNA-binding protein PCBP1 and controls gene expression through the IRES.” *Virology* 325: 364-378.
 16. Sakakibara, S., Ueda, K., Nishimura, K., Ohsaki, E., Do, E., Yamanishi, K. (2004) “Accumulation of

- heterochromatin components on the terminal repeat sequence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus mediated by the latency-associated nuclear antigen." *J. Virol.* 78 (14): 7299-7310.
17. Nishimura, K., Ueda, K., Sakakibara, S., Okuno, T., Yamanishi, K. (2003) "A viral transcriptional activator of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) induces apoptosis, which is blocked in KSHV-infected cells." *Virology* 316: 64-74.
 18. Ueda, K., Ishikawa, K., Nishimura, K., Sakakibara, S., Do, E., Yamanishi, K. (2002) "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) replication and transcription factor activates the K9 (vIRF) through two distinct cis elements by a non-DNA binding mechanism." *J. Virol.* 76 (23): 12044-12054.
 19. Sakakibara, S., Ueda, K., Chen, J., Okuno, T., Yamanishi, K. (2001) "The octamer-binding sequence is a key element for the autoregulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF50/Lyta gene expression." *J. Virol.* 75 (15): 6894-6900.
 20. Chen, J., Ueda, K., Sakakibara, S., Okuno, T., Parravicinim, C., Corbellino, M., Yamanishi, K. (2001) "Activation of latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by demethylation of the promoter of lytic transactivator." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4119-4124.
 21. Chen, J., Ueda, K., Sakakibara, S., Okuno, T., Yamanishi, K. (2000) "Transcriptional regulation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor gene." *J. Virol.* 74 (18): 8623-8634.
 22. Haque, M., Chen, J., Ueda, K., Mori, Y., Nakano, K., Hirata, Y., Kanamori, S., Uchiyama, Y., Inagi, R., Okuno, T., Yamanishi, K. (2000) "Identification and analysis of the K5 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." *J. Virol.* 74 (6): 2867-2875.
 23. Ishida, H., Ueda, K., Ohkawa, K., Kanazawa, Y., Hosui, A., Nakanishi, F., Mita, E., Kasahara, A., Sasaki, Y., Hori, M., Hayashi, N. (2000) "Identification of multiple transcription factors, HLF, FTF, and E4BP4, controlling hepatitis B virus enhancer II." *J. Virol.* 74 (3): 1241-1251.
 24. Yamamoto, M., Hayashi, N., Takehara, T., Ueda, K., Mita, E., Tatsumi, T., Sasaki, Y., Kasahara, A., Kamada, T. (1999) "Intracellular single-chain antibody against hepatitis B virus core protein inhibits the replication of hepatitis B virus in cultured cells." *Hepatology* 30 (1): 300-307.
 25. Ueda, K., Wei, Y., and D. Ganem. (1996) "Cellular factors controlling the activity of woodchuck hepatitis virus enhancer II." *J. Virol.* 70 (6): 4714-4723.
 26. Ueda, K., Wei, Y., and D. Ganem. (1996) "Activation of N-myc2 gene expression by cis-acting elements of oncogenic hepadnaviral genomes: a key role of enhancer II." *Virology* 217: 413-417.
 27. Ueda, K., and D. Ganem. (1996) "Apoptosis is induced by N-myc expression in hepatocytes, a frequent event in hepadnaviral oncogenesis, and is blocked by IGF II." *J. Virol.* 70 (3): 1375-1383.
 28. Kawamoto, S., Ueda, K., Mita, E., Matsubara, K. (1994) "The packaging signal in hepatitis B virus pregenome functions only at the 5' end." *J. Virol. Meth.* 49 (2): 113-127.
 29. Takehara, T., Hayashi, N., Mita, E., Hagiwara, H., Ueda, K., Katayama, K., Kasahara, A., Fusamoto, H., Kamada. (1992) "Detection of the minus strand of hepatitis C virus RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction." *Hepatology* 15 (3): 387-390.

30. Hagiwara, H., Hayashi, N., Mita, E., Ueda, K., Takehara, T., Kasahara, A., Kamada, T. (1992) "Detection of hepatitis C virus RNA in serum of patients with chronic hepatitis C treated with interferon- α ." *Hepatology* 15 (1): 37-41.
31. Ueda, K., Tsurimoto, T., Matsubara, K. (1991) "Three envelope proteins of hepatitis B virus: large S, middle S and major S proteins needed for the formation of Dane particles." *J. Virol.* 65 (7): 3521-3629.
32. Yuki, N., Hayashi, N., Kasahara, A., Katayama, K., Ueda, K., Fusamoto, H., Kamada, T. (1990) "Detection of antibodies against the polymerase gene product in hepatitis B virus infection." *Hepatology* 12 (2): 193-198.
33. Kawamoto, S., Yamamoto, S., Ueda, K., Nagahata, T., Chisaka, O., Matsubara, K. (1990) "Translation of hepatitis B virus DNA polymerase from the internal AUG codon, not from the upstream AUG codon for the core protein." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 171 (3): 1130-1136.
34. Ueda, K., Tsurimoto, T., Nagahata, T., Chisaka, O., Matsubara, K. (1989) "An in vitro system for screening anti-hepatitis B virus drugs." *Virology* 169 (1): 213-216.
35. Ochiya, T., Tsurimoto, T., Ueda, K., Okubo, K., Shiozawa, M., Matsubara, K. (1989) "An in vitro system for infection with hepatitis B virus that uses primary human fetal hepatocytes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 1875-1879.
36. Katayama, K., Hayashi, N., Sasaki, Y., Kasahara, A., Ueda, K., Fusamoto, H., Sato, N., Chisaka, O., Matsubara, K., Kamada, T. (1989) "Detection of hepatitis B virus X gene protein and antibody in type B chronic liver disease." *Gastroenterology* 97(4): 990-998.
37. Nagahata, T., Ueda, K., Tsurimoto, T., Chisaka, O., Matsubara, K. (1989) "Anti-hepatitis B virus activities of purine derivatives of oxetanocin A." *J. Antibiotics* 42(4): 644-646.
38. Ochiya, T., Tsurimoto, T., Ueda, K., Okubo, K., Shiozawa, M., Matsubara, K. (1989) "An in vitro system for infection with hepatitis B virus that uses primary human fetal hepatocytes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 1875-1879.

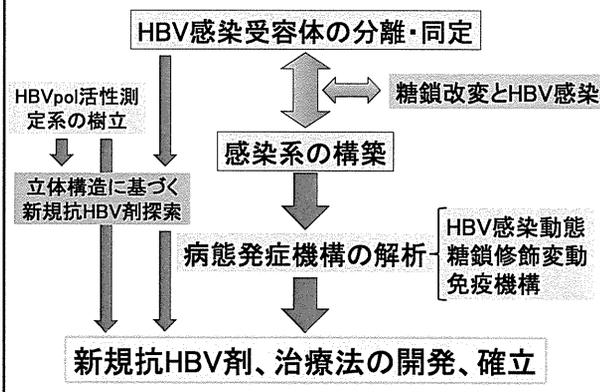
B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と 感染系の樹立、及び感染系による 病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発

上田 啓次
大阪大学大学院
医学系研究科

班組織

- ◆ HBV受容体・感染系
上田 啓次 大阪大学大学院医学系研究科
- 森石 恒司 山梨大学大学院医学工学総合研究院
黒田 俊一 名古屋大学大学院生命農学研究科
黒木 和之 金沢大学がん進展制御研究所
岡本 徹 大阪大学微生物病研究所
- ◆ 糖鎖とHBV感染、病態
三善 英知 大阪大学大学院医学系研究科
三崎 亮 大阪大学生工学国際交流センター
- ◆ HBV感染と免疫抑制
竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科
考藤 達哉 国立国際医療センター
- ◆ HBVポリメラーゼアッセイ系・立体構造
大崎恵理子 大阪大学大学院医学系研究科

目的・目標



B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と 感染系の樹立、及び感染系による 病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発

- 受容体の分離・同定と感染系の樹立
- 糖鎖修飾とHBV感染機構、病態
- HBVによる免疫抑制機構の解明
- HBVpol活性測定系の確立と抗HBV剤探索

