

平成 26 年度 肝炎等克服実用化研究事業 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、部局：国立感染症研究所、ウイルス第二部

職名：部長

委託費(決定額)：1年目 200,000,000 円 2年目 200,000,000 円 3年目 200,000,000 円
計 600,000,000 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。キャプシド内の逆転写反応によりマイナス鎖DNA、さらにプラス鎖DNAが合成され不完全二重鎖DNAとなる。ヌクレオキャプシドはHBs抗原を表面に持つエンベロープを被り、ウイルス粒子が完成して細胞外へ分泌される。このウイルスの生活環の各過程を詳細に検討し、関与する宿主因子の同定などを通じてそのメカニズムを解明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を実施し、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. 3年間の研究成果

1. ウイルス生活環の制御因子同定：DNA損傷センサー因子DNA-PK及びPARP-1と、相同組換因子Rad51およびRNAヘリケースMOV10がHBV増殖を抑制していることが示唆された。HBV発現調整細胞株を用いてSILAC法による網羅的プロテオーム解析を行った。HBV蛋白発現時には、細胞周期や細胞分化が制御されている事が示唆された。

2. 初期感染過程の解析：シクロスポリンがHBVの感染過程を阻害する事を明らかにし、より抗HBV効果の高い誘導体を同定した。さらに、HBV感染許容性細胞を用いたNTCP transporter assay系および transporter阻害剤スクリーニング系を確立した。NTCPとLHBsの相互作用アッセイ系によるスクリーニングで感染阻害活性を有する化合物を同定した。NTCPタンパク質を標的として、RaPIDシステムを駆使し11種の特種ペプチドを獲得した。

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のPRE RNA領域に結合する宿主因子23種類を同定した。PRE結合因子hnRNPUがHBV RNA分解促進とスプライシング促進に働くことと、PRE結合因子AUF1がHBV RNA分解促進とスプライシング抑制に働くことを見出した。2) 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。

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in silicoスクリーニングアッセイを実施し、約3,000,000薬剤のスクリーニングを行い、2種類のリード化合物を同定した。それぞれのリード化合物について、より抗HBV活性の強い誘導体を同定した。2) コムギ無細胞系を用いてすべてのHBV蛋白を合成した。さらにその抗体を作製して外部研究者へも提供した。NTCP蛋白質も合成した。3) RNase H阻害剤スクリーニング系を開発し、小嶋班に技術移転した。さらに、蛍光ラベルオリゴdTプライマー、ポリA RNA鋳型によるポリメラーゼの試験管内逆転写系を開発した。4) 新規核酸誘導体の7-deazaneplanocin Aおよび7-deaza-8-azaneplanocin A誘導体に選択的な抗HBV効果を同定した。

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。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) 新規HBx結合宿主タンパク質として、Prdx1及びSMYD3を同定した。Prdx1とHBxの相互作用により、HBVの複製が有意に増加した。2) 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。3種のNF- κ B経路活性化を抑制する化合物を見出した。3) HBxと結合する宿主因子としてJMJD5を同定した。JMJD5はHBxとの結合を介してHBVの複製に関与している。JMJD5とHBxとの結合を阻害する化合物は、新規B型肝炎治療の創薬標的となる可能性を見出した。

7. 病原性解析、線維化、オートファジーの影響：1) HBV感染ヒト肝細胞キメラマウスにおいて酸化ストレスに伴う線維化を認めた。この線維化は抗マウスTLR4抗体投与により抑制された。2) NTCP発現細胞はHBV感染によりオートファジーが亢進した。ヒト初代培養肝細胞のオートファジーを抑制するとHBV感染時の細胞内cccDNA量は増加した

8. HBs 抗原と HBc 抗原による免疫療法を開発した。トランスジェニックマウスによる前臨床試験を経て、慢性B型肝炎症例に対する第三相試験をバングラデシュにおいてペグIFN療法との比較で実施した。

9. エンテカビル耐性症例からHBV株を分離し複製モデルを作成し、薬剤感受性評価システムを構築した。LAM耐性変異として知られている変異がETV感受性の低下にも関わっていることが明らかとなった。

10. ヒトiPS細胞から分化誘導した前腸内胚葉細胞・血管内皮細胞・間葉系幹細胞の共培養により、世界で初めてiPS細胞由来のヒト肝臓原基（肝芽）の作成に成功した。肝芽を免疫不全マウスに移植することにより、血管網を有した機能的なヒト肝臓が構築されることを明らかにした。

IV. 今後考えられる新たな課題

(1) cccDNA合成に関与する宿主因子の機能解析を実施する。

(2) 免疫抑制効果とシクロフィリン阻害活性を欠失するが、高い抗HBV効果を有するシクロスポリン誘導体を探索する。創薬標的化のために、NTCP transporter活性を阻害することなくHBV感染を阻害する化合物が取得可能かを検証する。NTCP結合特種ペプチドの機能解析を進める。

(3) PRE結合宿主因子の機能解析を進め、抗HBV薬探索系を構築する。

(4) 同定したカプシド阻害剤の抗HBV活性は不十分であり、化学構造の最適化を行う。また、得られた化合物について、既存薬に耐性のHBVに対する効果を解析する。

(5) RT-RNase Hの発現精製法を改良する。蛍光偏光の測定によるHBV逆転写酵素活性の阻害薬のスクリーニング系を開発する。また、HBV PolとプレゲノムRNAの相互作用検出アッセイ系を構築する。

(6) HBV複製及び病原性発現におけるPrdx1の役割を詳細に解明する。JMJD5とHBxの結合が肝癌の発症に及ぼす影響を検討する。また、JMJD5の活性を抑制するとHBVの複製が顕著に抑制されることから、JMJD5を標的とした化合物のスクリーニング系を構築する。

(7) HBV感染による肝線維化においてTLR-4シグナル経路が活性化する機序を解明する。オートファジーを特異的に阻害もしくは亢進させる小分子化合物による治療の可能性を探る。

(8) HBs抗原とHBc抗原による免疫療法の評価を進める。

(9) 薬剤感受性評価システムを用いることで多剤耐性を示すHBV株に対して有効な薬剤のスクリーニングが可能となる。

(10) ヒトiPS細胞由来肝芽や誘導した肝臓組織を活用して、HBV感染系の確立を目指す。HBVの感染・増殖・放出等の抑制を可能とするゲノム編集を行ったヒトiPS細胞を用いて肝芽作製および肝芽移植を行い、HBV再感染耐性の遺伝子改変肝臓組織を再構成する新たな治療コンセプトの確立を試みる。

V. 実用化(ワクチン、診断薬、治療薬の開発等)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。3. HBV感染阻害リード化合物を多数同定しているため、今後抗HBV作用の至適化によりHBV感染阻害剤を創出する。4. 逆転写酵素阻害薬とRNase H活性阻害薬のスクリーニングが可能となる。5. HBs抗原とHBc抗原による免疫療法は新規HBV治療法として期待される。6. 作製したHBc、HBs、HBx抗体は、複数の遺伝子型を広く認識できることを確認しており、現在、試薬メーカーと研究試薬および迅速診断キットの作製について協議中。

VI. 行政施策への貢献の可能性

(1) 我が国に110-140万人と推定されるHBV持続感染者に対し、既存の抗HBV薬とは異なる作用機序を有する新規薬剤を提供することにより、HARRTに相当する新しいB型肝炎治療への展望を開くことが可能となる。(2) HBs抗原とHBc抗原による免疫療法は安価で安全な新規HBV治療法となる可能性がある。

VII. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

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

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

Ogura N, Watashi K, Noguchi T, Wakita T. Formation of covalently closed circular DNA in Hep38.7-Tet cells, a tetracycline inducible hepatitis B virus expression cell line. **BBRC**. 2014 452(3):315-21

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, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). **Hepatology**. 2014 59(5):1726-37 Inuzuka T, Ueda Y, Morimura H, Fujii Y, Umeda M, Kou T, Osaki Y, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Reactivation from occult HBV carrier status is characterized by low genetic heterogeneity with the wild-type or G1896A variant prevalence. **J Hepatology**. 61: 492-501: 2014.

Inuzuka T, Takahashi K, Chiba T, Marusawa H: Mouse models of hepatitis B virus infection comprising host-virus immunologic interactions. **Pathogens**. 3: 377-389: 2014.

Akbar SM, Mahtab MA, Hiasa Y. Designing Immune therapy for chronic hepatitis B. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology** 2014. 4(3); 241-246.

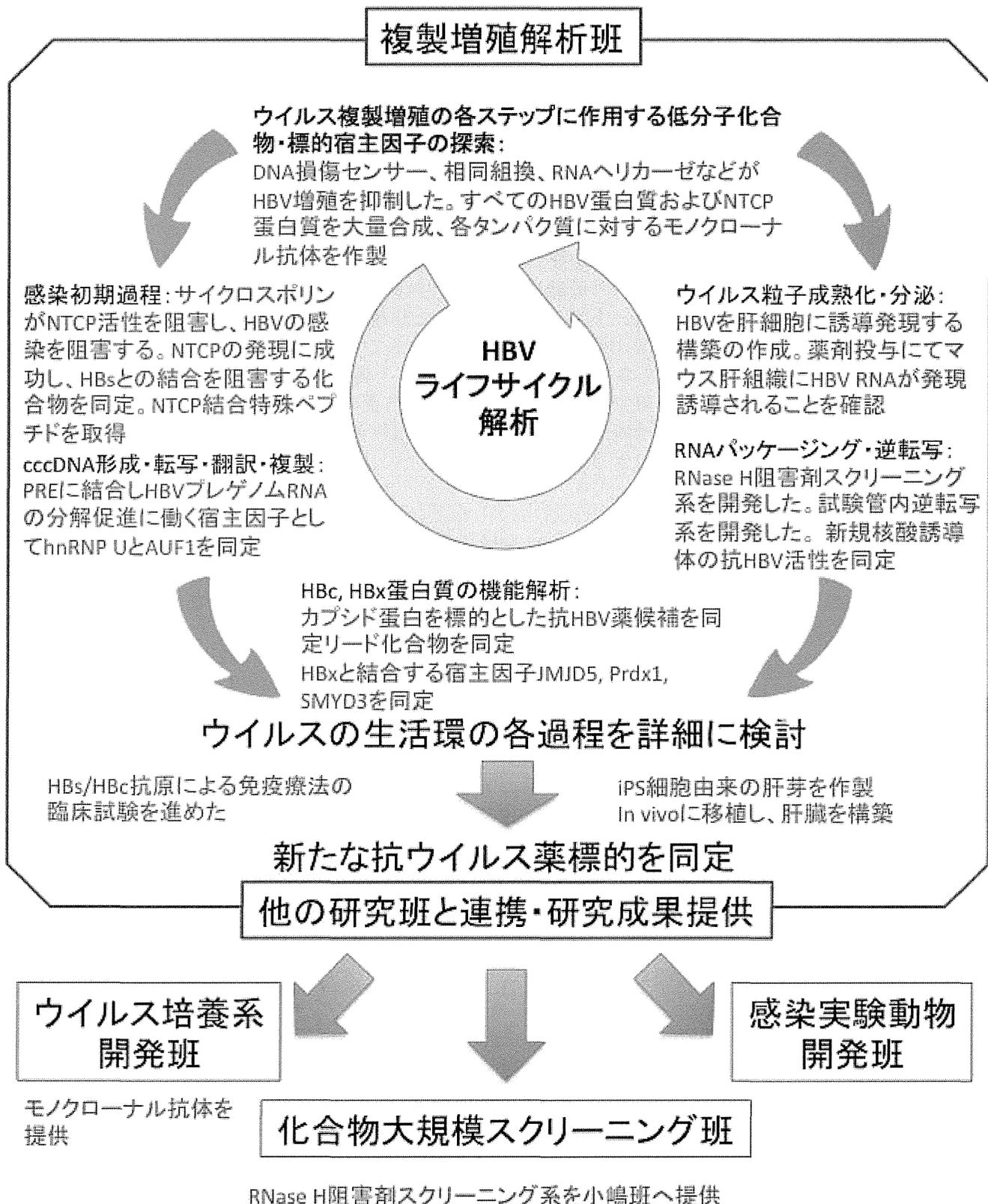
Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, Suzuki T, Tagawa YI. An in vitro liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication. **J Biosci Bioeng**. 118: 107-111 (2014).

Isogawa M, Tanaka Y. The Immunobiology of Hepatitis B Virus Infection. **Hepato Res**. In press. 2014 Oct 20. doi: 10.1111/hepr.12439. [Epub ahead of print]

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** 20(3044-9) 2014.

Ⅷ. (3年間の研究成果の)概要図等

今年度まで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 准教授
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

B型および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 274 報、英文レビュー5 報、英文著書 4 報、邦文 99 報

代表論文 22 報

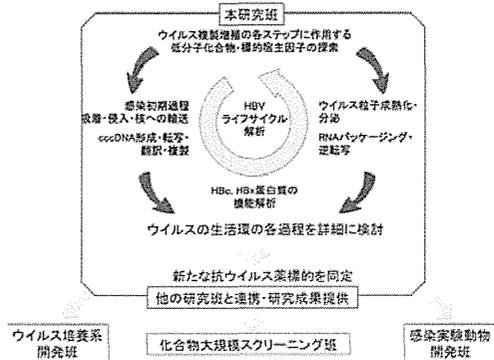
1. Ogura N, Watashi K, Noguchi T, Wakita T. Formation of covalently closed circular DNA in Hep38.7-Tet cells, a tetracycline inducible hepatitis B virus expression cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Sep 26;452(3):315-21
2. Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto 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*. 2014 59(5):1726-37.
3. Kim S, Date T, Yokokawa H, Kono T, Aizaki H, Maurel P, Gondeau C, Wakita T. Development of Hepatitis C Virus Genotype 3a Cell Culture System. *Hepatology*. 2014 60(6):1838-50
4. Daito T, Watashi K, Sluder A, Ohashi H, Nakajima S, Borroto-Esoda K, Fujita T, Wakita T. Cyclophilin Inhibitors Reduce Phosphorylation of RNA-dependent Protein Kinase to Restore Expression of IFN-stimulated Genes in HCV-infected Cells. *Gastroenterology*. 2014 147(2):463-72
5. 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. *BBRC*. 2014 Jan 17;443(3):808-13.
6. Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing Antibodies Induced by Cell Culture-Derived Hepatitis C Virus Protect Against Infection in Mice. *Gastroenterology*. 2013 145(2):447-455.e4.
7. 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*. 2013 144(1):56-58.e7.
8. 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.
9. 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.
10. 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.

11. 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.
12. 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. *Hepatology*. 2008 48(3):732-40.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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

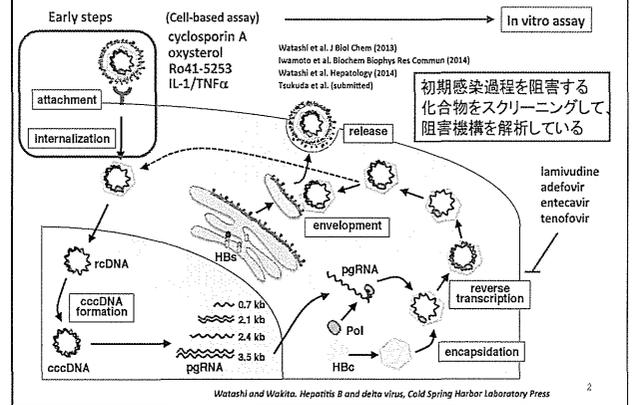
特許

- 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 感染性エプイプタグ化 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

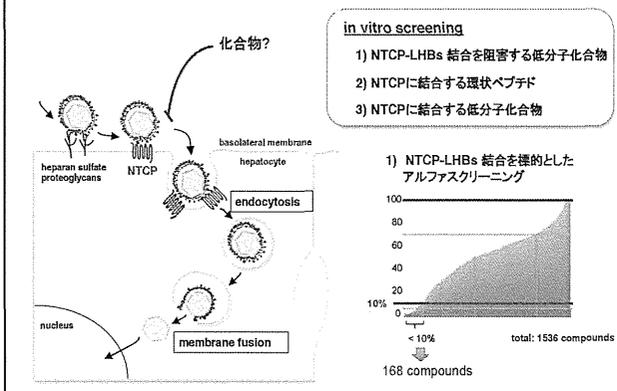
B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究



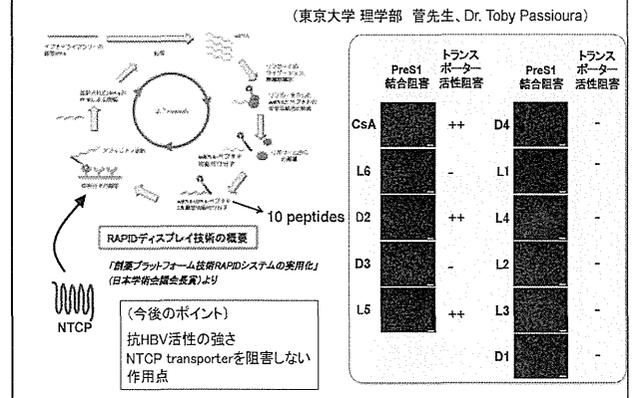
HBVエンタリー阻害剤の探索



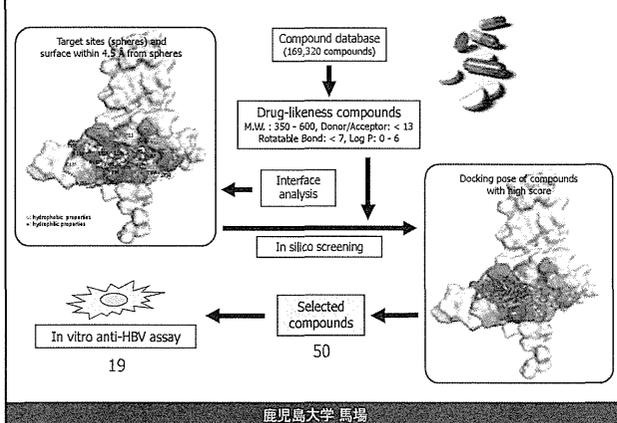
LHBsとNTCPの結合を標的としたスクリーニング



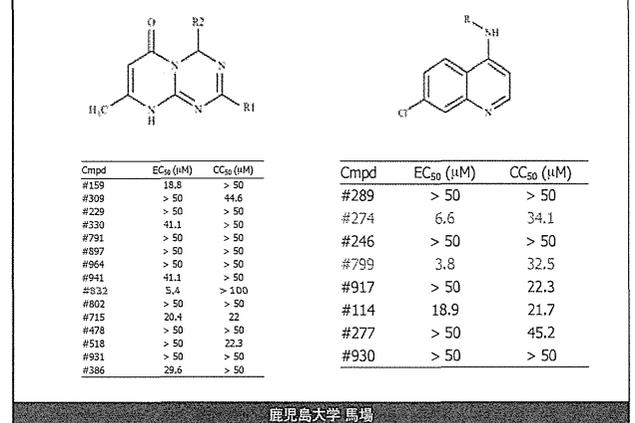
2) NTCP に結合する環状ペプチド

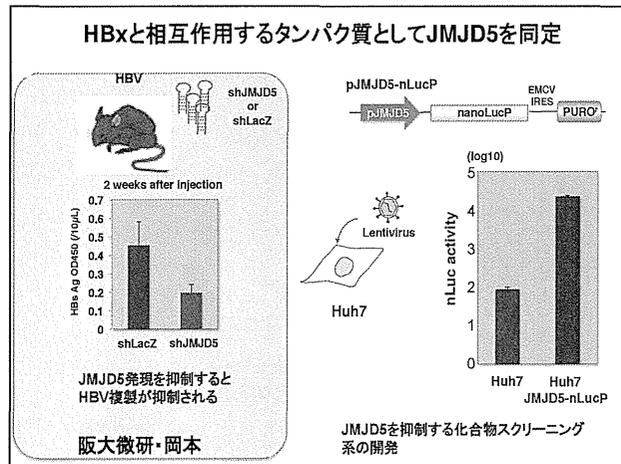
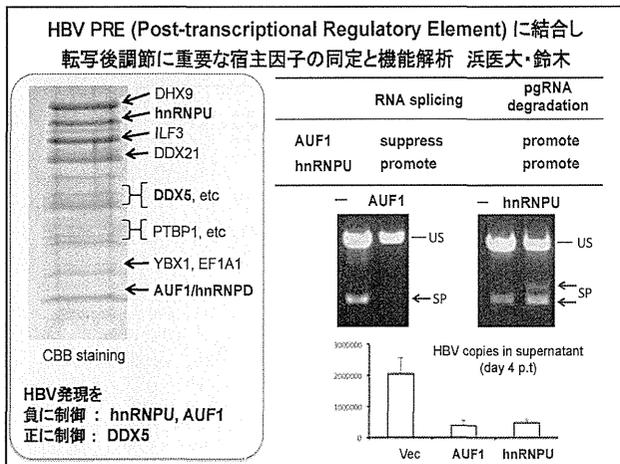


キャブド合成阻害剤の in silico スクリーニングの実施結果



キャブド合成阻害剤の in silico スクリーニングの実施結果





HBVモノクローナル抗体 横浜市大 梁明秀先生

anti-HBx mAb

mAb No.	subclass	WB	ELISA	IF	IP	epitope
# 5	IgG ₁ , K	A and C	o	o	o	-
# 19	IgG ₁ , K	C	o	-	-	-
# 29	IgG ₁ , K	C	o	-	-	-
# 32	IgG ₁ , K	C	o	o	o	-
# 39	IgG ₁ , K	A and C	o	o	o	-
# 45	IgG ₁ , K	C	o	-	-	-

WB, recombinant protein overexpression lysate
IF, overexpression

anti-HBc mAb

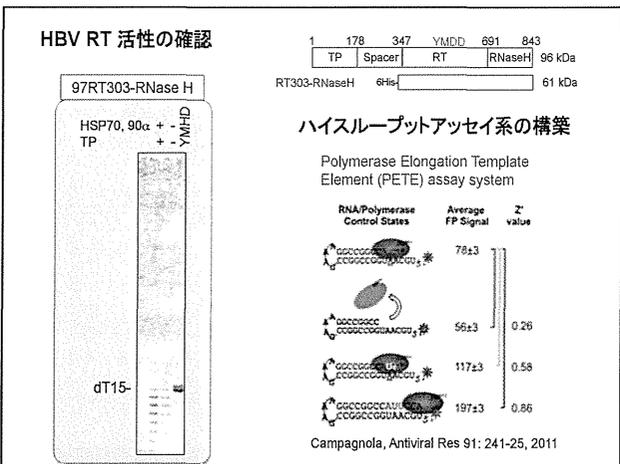
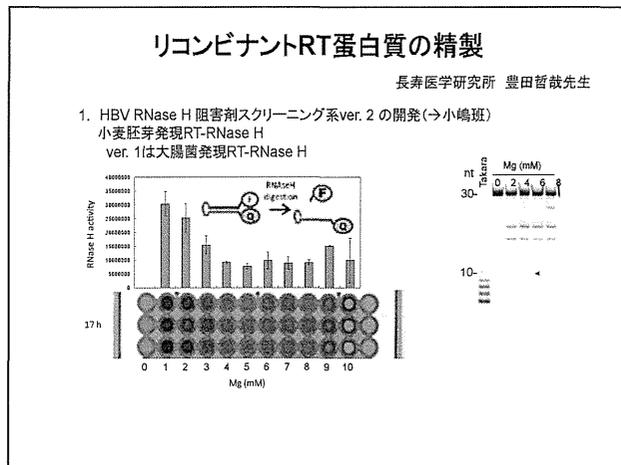
mAb No.	subclass	WB	ELISA	IF	IP	epitope
# 7	-	o	-	o	-	75-183
# 28	-	o	-	o	-	1-74
# 32	-	o	-	o	-	75-183
# 38	-	o	-	-	-	75-183
# 47	-	o	-	-	-	75-183
# 48	-	o	-	o	-	75-183

WB, recombinant and infection cell lysate
IF, overexpression

anti-HBV_pol mAb

mAb No.	Subclass	WB	ELISA	IF	IP	epitope
# 49	-	A and C	-	o	-	RT

WB, recombinant protein overexpression lysate
IF, overexpression



HBsAg/HBcAgワクチンによる免疫療法の開発

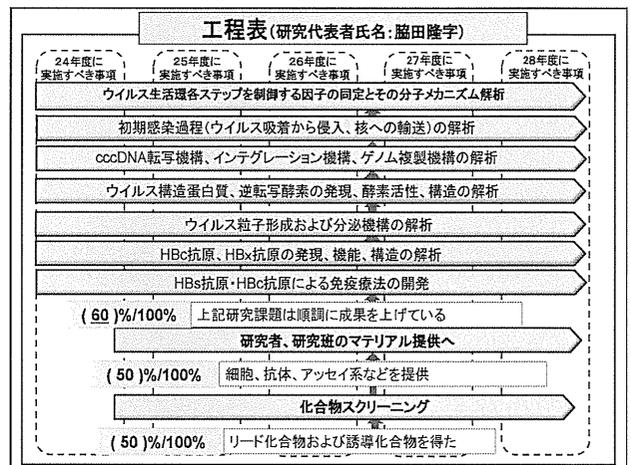
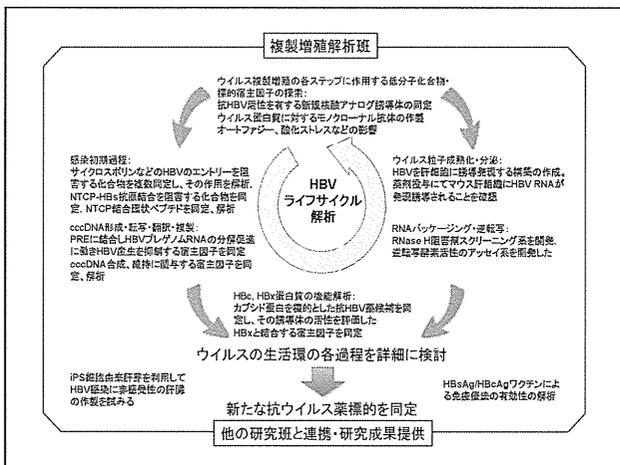
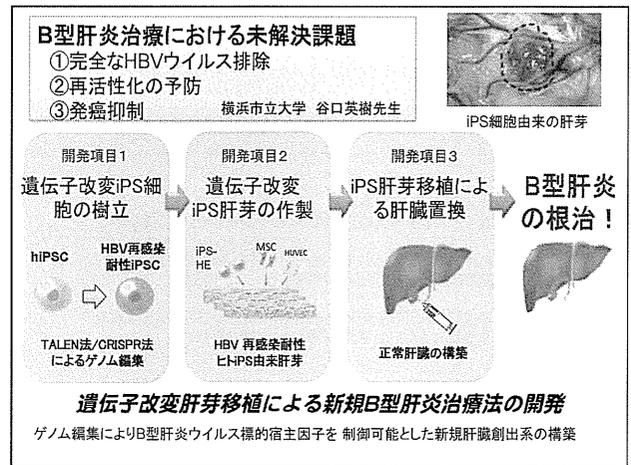
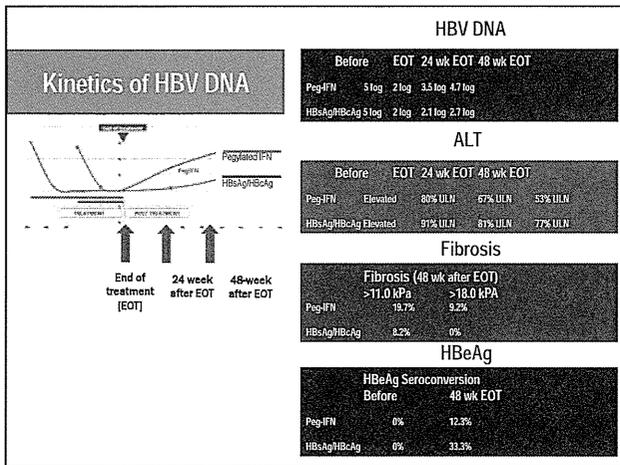
東芝病院 アクバル先生

HBsAg/HBcAg治療的ワクチンのHBV transgenic Miceを用いた安全性、有効性、作用機序の解析.
Akbar et al. Antivir Res 2012;96:59

HBsAg/HBcAg治療的ワクチンの慢性B型肝炎患者に対する安全性、有効性、作用機序の解析(Phase III Clinical Trial).
Mahtab, Akbar et al. Hepatol Int 2013; 7(4):981-989

慢性B型肝炎患者におけるHBsAg/HBcAg治療的ワクチンと Pegylated IFNとの有効性比較試験 (Phase III clinical Trial).
Akbar et al. Hepatology (Abstract) (AASLD 2013)

Treatment Free, One Year Follow Up of Phase III clinical Trial



利益相反について

利益相反の有無等 (平成26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

他の研究班と合同での研究会議開催状況（平成26年度）

平成26年12月19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（脇田隆字）
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）
HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた感染阻害低分子化合物およびレセプター探索（下遠野邦志）

平成 26 年度 肝炎等克服実用化研究事業 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、部局：国立大学法人大阪大学

職名：教授

委託費(決定額)：1 年目 195,000,000 円 2 年目 200,000,000 円 3 年目 230,000,000 円
計 625,000,000 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、未だに有効かつ簡便な感染系がない。
- (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) BV 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。
- (5) 糖鎖修飾はウイルス感染や病態発症と深く関わるが、HBV 感染機構や病態との関わりは不明である。
- (6) 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 受容体全容の解明は、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 持続感染に関わる免疫抑制機構の解明は、病態発症機構の解明、新規治療戦略を具体化する。

III. 3 年間の研究成果

・研究代表者(概要図 1)

- (1) HBV の preS1~HBsN 末 (PS1-SSN) と相互作用因子として分離・同定した HBV-RX1 が、実際に preS1(2-47aa) と結合することを確認した。付着・侵入における機能は否定的な結果を得たが、HBV 生活環における機能が示唆された。HBV 産生細胞 HB611 を用いて、HBV-RX1 ノックダウン細胞を構築した。
- (2) 種々の肝癌由来培養細胞株で NTCP-V5His を発現による HBV 感染系を構築した。

・研究分担者(森石恒司)(概要図 2)

- (1) NTCP 発現 HepG2 細胞株を樹立し、Trypsin・EDTA 処理(T/E 処理感染)による感染効率を向上させる HBV 感染系を確立した。このことは HBV の感染が細胞間接着面から起こることを示唆している。
- (2) 本感染系で抗 HBV 化合物をスクリーニングし、Digitalis 類及びスタチン類の一部に抗 HBV 活性を認めた。

・研究分担者(岡本 徹)(概要図 3)

- (1) ヒト NTCP トランスジェニックマウス (NTCP-TG) を作製し、ヒト NTCP が HBV の機能的受容体であることを証明した。
- (2) 新規 HBV 受容体候補分子を探索するため、HepG2 細胞の膜画分を免疫し、ハイブリドーマを樹立した。

・研究分担者(黒木和之)(概要図 4)

- (1) 感染成立を迅速・簡便に検出する各種蛍光蛋白質、ルシフェラーゼをマーカー遺伝子として組み込んだ HBV ベクター (リコンビナント HBV; recHBV) 完成させた。
- (2) 本ウイルスを用い、HuH7 細胞が利用できること、iPS 細胞より分化誘導して得た肝細胞が recHBV 感染することを示した。

・研究分担者(黒田俊一)(概要図 5)

- (1) 酵母発現・精製した HBV L 蛋白粒子 (BNC) が NTCP/HepG2 感染系で HBV の感染を抑制することを証明

した。

(2) 一方、ヒト正常肝実質細胞と BNC の結合は NTCP 非依存的であることから、NTCP 以外の受容体の存在が予測された。ヒト正常肝実質細胞から 11 種の BNC 結合蛋白を単離した。

(3) BNC と結合する HBV 感染抑制候補化合物を複数個分離した。

・研究分担者(斎藤伸一)

(1) プレバチルスを用いた NTCP 発現系でその発現を確認し、本系が NTCP 大量発現・精製に有効であることが示された。

・研究分担者(三善英知)(概要図 6)

(1) 肝癌由来細胞への BNC の取込み(NTCP 非依存的)にはフコースとシアル酸の増加が重要であり、フコシル化の中でも特にコアフコースの増加が重要であることがわかった。本実験は NTCP 非依存的な HBV の感染過程にコアフコース修飾蛋白が関わっていることを示唆している。

・研究分担者(三崎 亮)(概要図 5)

(1) HBV 様ウイルス粒子を発現するヒト肝癌細胞では、a1,6-フコース結合を持つ糖鎖の含量が顕著に増加し、a1,6-フコース転移酵素の発現量も増加する。逆に HBV を産生する HB611 においても Huh6 細胞と比較して同様の結果が得られたことから、HBV 増殖が a1,6-フコース転移酵素の発現を惹起することが分かった。

・研究分担者(竹原徹郎)

(1) 免疫抑制機能を有する MDSC(Myeloid Derived Suppressor Cell)の頻度は、B 型慢性肝炎患者では HBV-DNA 量に負の相関を認め、HBV 複製の増加が MDSC の誘導を抑制する可能性が示唆された。

・研究分担者(考藤達哉)(概要図 7)

(2) 免疫抑制作用をもつ Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) やインタフェロン刺激遺伝子 (ISG) は、NK 細胞、pDC と HBV 産生 HuH7 との共培養によって誘導され、HBV 複製を抑制する。IDO 欠失 Huh7 では、HBV 複製抑制効果は減弱することから、NK-pDC 相互作用による HBV 複製抑制には IDO が関与することを明らかにした。

・研究分担者(大崎恵理子)(概要図 8)

(1) HBV ポリメラーゼ (HBVpol) の RT ドメインを大腸菌で発現させ、かなりの高純度 (80-90%)、高収量 (1-2 mg/ 10 培養液) で精製出来た。

(2) また、本精製 HBVpol の逆転写活性、DNA 依存性 DNA 合成活性の検出に成功した。

IV. 今後考えられる新たな課題

(1) NTCP 発現ヒト肝癌培養細胞株による HBV 感染系の HBV 産生効率は悪い。HBV 付着・侵入から、cccDNA 形成、遺伝子発現、複製、放出の過程に関わる宿主因子を詳細に解明し、高効率 HBV 感染・増殖系を樹立するとともに、創薬の標的を見極める。

(2) recHBV による感染モニタリングシステム(付着・侵入、cccDNA 形成、遺伝子発現まで)を確立する。

(3) NTCP 以外にもしくは共役して機能する受容体の分離・同定から HBV 受容体の全容を明らかにする。

(4) 得られたハイブリドーマから、HBV 感染を阻害できる抗体をスクリーニングし、新たな HBV 受容体の同定し、新たな感染阻害剤の開発を目指す。

(5) NTCP-TG による個体レベルでの HBV 感染・病態発症機構、免疫作動機構を解明する。

(6) HBV 産生に重要であることが分かったコアフコースの生成に関わる FUT8 の阻害薬開発を目指す。また、NTCP の阻害薬(サイクロスポリンなど)と FUT8 阻害薬の併用により、より有効な HBV の感染阻害が出来ないか検討する。

(7) HBV 粒子糖鎖及び受容体側糖鎖修飾と HBV 感染性について解析する。

(8) IDO 選択的阻害剤(1-MT)による IDO の抑制が抗 HBV 免疫活性の増強に繋がる可能性を明らかにする。

(9) ハイスループット抗 HBVpol 剤のスクリーニング系を確立する。立体構造解明に向けた一層の純度、収量の向上を図る。

V. 実用化(ワクチン、診断薬、治療薬の開発等)への貢献の可能性

(1) HBV 感染系の構築と HBV 生活環の解明は、新たな標的を見出し、新規抗 HBV 剤開発、ワクチンデザインの開発、新たな B 型肝炎の治療戦略の考案に貢献する。

(2) NTCP-TG による HBV 感染系の構築は、HBV 感染経路、病態発症機構の解明から感染阻止法、治療戦略の考案、開発に貢献する。

(3) HBVpol のハイスループットアッセイ系の確立は、新規抗 HBV 剤開発を迅速化させる。

(4) HBV 感染がもたらす免疫抑制機構の解明は新たな B 型肝炎の治療戦略の考案に貢献する。

VI. 行政施策への貢献の可能性

(1) 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。

(2) 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。

(3) HBV 感染症を制御する新たな予防戦略、治療戦略を考案することが可能になる。

VII. 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.**, 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.” **J. Liver** doi.org/10.4172/2167-0889.1000169, 2014.
- (2) **Ueda, K.** “Change in Cellular Gene Expression by hepatitis B virus (HBV).” pp211–231 in **Epidemiology I–Theory, Research and Practice**. iConcept Press Ltd. 2014.

研究分担者(森石恒司)

- (1) Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama–Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, **Moriishi K.** Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus. **J. Virol.**, 88: 13352–13366, 2014.
- (2) Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, **Moriishi K**, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H: EFdA, a Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV–1 Ex Vivo Infection of Langerhans Cells within Epithelium. **J. Invest. Dermatol.**, 134: 1158–1161, 2014.
- (3) Furuta A, Salam KA, Akimitsu N, Tanaka J, Tani H, Yamashita A, **Moriishi K**, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N: Cholesterol sulfate as a potential inhibitor of hepatitis C virus NS3 helicase. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, 29: 223–229, 2014.
- (4) Allen SJ, Mott KR, Matsuura Y, **Moriishi K**, Kousoulas KG, Ghiasi H: Binding of HSV–1 Glycoprotein K (gK) to Signal Peptide Peptidase (SPP) Is Required for Virus Infectivity. **PLOS one**, 9: e85360, 2014.

研究分担者(黒田俊一)

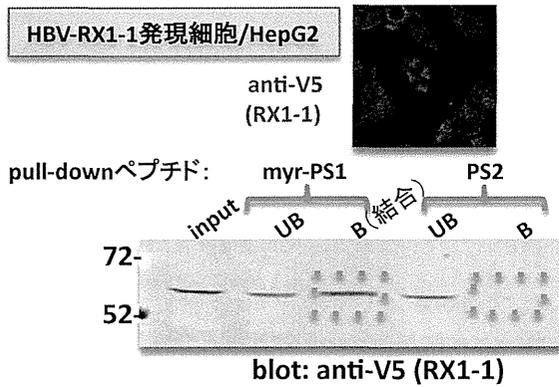
- (1) Miyata T, Tafuku S, Harakuni T, Tadano M, Yoshimoto N, Iijima M, Matsuo H, **Kuroda S.** and Arakawa T. A bio–nanocapsule containing envelope (E) protein domain III of Japanese encephalitis virus (JEV) protects mice against lethal JEV infection. **Microbiol. Immunol.** 57: 470–477, 2014.
- (2) Ninomiya K, Noda K, Ogino C, **Kuroda S.**, and Shimizu N. Enhanced OH radical generation by dual–frequency ultrasound with TiO₂ nanoparticles: Its application to targeted sonodynamic therapy. **Ultrason Sonochem** 21: 289–294, 2014.
- (3) Yoshimoto N, Tatematsu K, Iijima M, Niimi T, Maturana AD, Fujii I, Kondo A, Tanizawa K, and **Kuroda S.** High–throughput de novo screening of receptor agonists with an automated single–cell analysis and isolation system. **Scientific Reports** 4: 4242, 2014.
- (4) Nakamura Y, Hasebe A, Takahashi K, Iijima M, Yoshimoto N, Maturana AD, Ting K, **Kuroda S.** and Niimi T. Oligomerization–induced conformational change in the C–terminal region of NELL1 is necessary for the efficient mediation of murine MC3T3–E1 cell adhesion and spreading. **J. Biol. Chem.** 289: 9781–9794, 2014.
- (5) Yoshimoto N., and **Kuroda, S.** Single–cell–based breeding: Rational strategy for the establishment of cell lines from a single cell with the most favorable properties. **J. Biosci. Bioeng.** 117: 394–400, 2014.

研究分担者(三善英知)

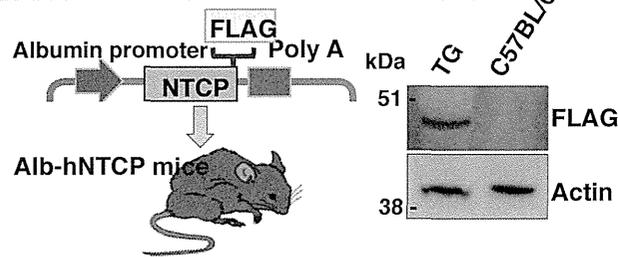
- (1) Azuma K, Shinzaki S, Asazawa H, Kuroki E, Kawamoto S, Kamada Y, Hayakawa K, **Miyoshi E.** Twin studies on the effect of genetic factors on serum agalactosyl immunoglobulin G levels. **Biomedical Reports** 2: 213–216, 2014.
- (2) Onuki K, Sugiyama H, Ishige K, Kawamoto T, Ota T, Ariizumi S, Yamato M, Kadota S, Takeuchi K, Ishikawa A, Onodera M, Onizawa K, Yamamoto M, **Miyoshi E.**, Shoda J. Expression of *N*–acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. **J Gastroenterol.** 49(4), 702–714, 2014.
- (3) Sato M, Kamada Y, Takeda Y, Kida S, Ohara Y, Fujii H, Akita M, Mizutani K, Yoshida Y, Yamada M, Hogaku K, Takehara T, **Miyoshi E.** Fetuin A negatively correlates with liver and vascular fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease subjects. **Liver International** in press.
- (4) Tomita Y, Azuma K, Nonaka Y, Kamada Y, Tomoeda M, Kishida M, Tanemura M, **Miyoshi E.** Pancreatic Fatty Degeneration and Fibrosis as Predisposing Factors for Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Pancreas** 43(7), 1032–41, 2014.
- (5) Furukawa K, Kawamoto K, Eguchi H, Tanemura M, Tanida T, Tomimaru Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kobayashi S, Nonaka Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kumada T, Satomura S, Ito T, Serada S, Naka T, Mori M, Doki Y, **Miyoshi E.**, Nagano H. Clinicopathological significance of leucine–rich alpha2–glycoprotein–1 in sera of patients with pancreatic cancer. **Pancreas.** in press.
- (6) Asazawa H, Kamada Y, Takeda Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kim Y, Nezu R, Kuzushita N, Mita E, Kato M, **Miyoshi E.** (2014) Serum fucosylated haptoglobin in chronic liver diseases as a potential biomarker of hepatocellular carcinoma development. **Clin Chem Lab Med.** in press.
- (7) Kamada Y, Sato M, Kida S, Akita M, Mizutani K, Fujii H, Sobajima T, Yoshida Y, Shinzaki S, Takamatsu S, Takehara T, **Miyoshi E.** *N*–Acetylglucosaminyltransferase V exacerbates concanavalin A–induced mouse hepatitis. **Molecular Medicine Reports.** in press.

Ⅷ. (3年間の研究成果の)概要図等

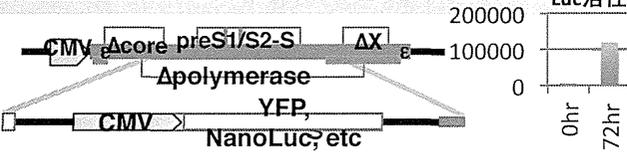
1. HBV-RX1-1はpreS1(PS1)と結合する



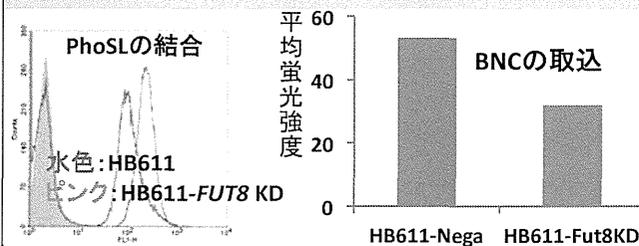
3. hNTCP-TGを樹立、HBV感染を確認した



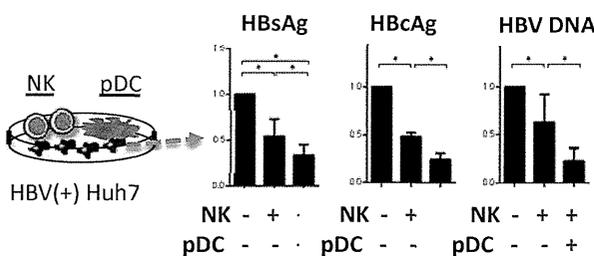
4. iPSから分化誘導した肝細胞へのrHBV感染性を実証した



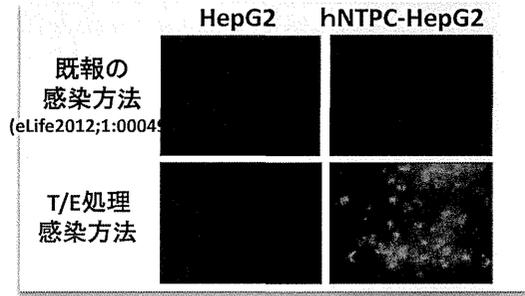
6. BNCの取込にはコアフォーカスが重要



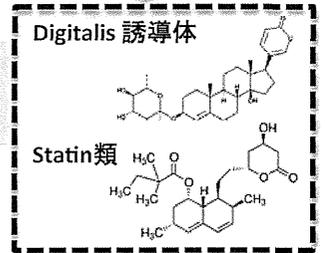
7. PDCとNKの相互作用によってHBV複製は抑制される-また、IDO欠失により、HBV複製抑制効果は減弱する



2-1. T/E処理はHBV感染を向上させる

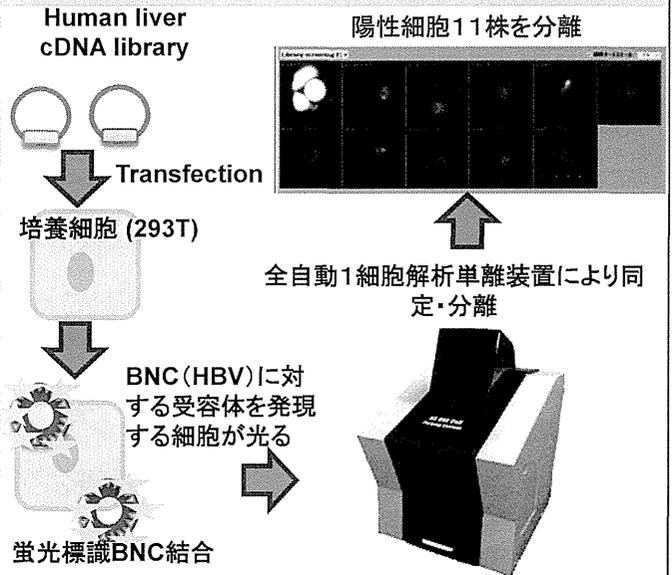


抗HBV化合物スクリーニング

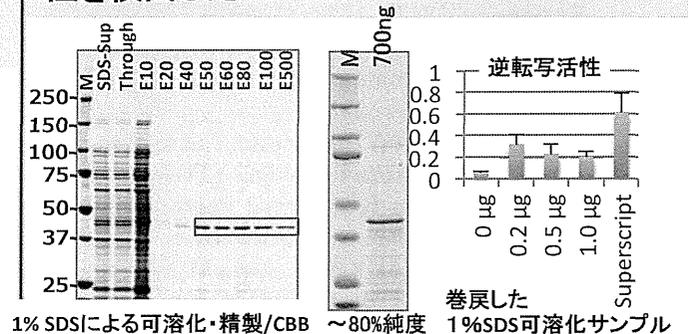


2-2. 抗HBV化合物を同定した

5. 1細胞単離解析装置を用いて、11個の新規受容体因子を分離した



8. HBVpol: ~80%純度で精製が可能、活性を検出した



●研究代表者の研究歴等

・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(上田啓次研究室)

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(上田啓次研究室)

・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、干坂修

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
- 12) カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス潜伏感染複製 origin 決定に関わるエピジェネティクス
- 13) カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス潜伏感染で高発現するアンジオポエチン-1 の発現誘導機構とその生理作用
- 14) カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス潜伏感染ウイルス因子 LANA と相互作用する分子の網羅的分離・同定とその機能解析

・これまでの研究実績

- (3) *Ueda, K., 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." J. Liver doi.org/10.4172/2167-0889.1000169,*

2014.

- (4) Ueda, K. “Change in Cellular Gene Expression by hepatitis B virus (HBV).” pp211-231 in *Epidemiology I- Theory, Research and Practice*. iConcept Press Ltd. 2014.
- (5) 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*. 1000e102, 2013.
- (6) Ueda, K. “Start or End? ; one of the biggest mysteries is finally solved?” *Medical Microbiology and Diagnosis*. doi.org/10.4172/2165-7866.1000e101, 2013.
- (7) Ueda, K. “Kaposi’s Sarcoma-associated Herpesvirus Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic Insults are evaded.” doi.org/10.4172/2165-7831.1000e109. *J.Blood and Lymph* 2:3, 2012.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) 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.
- (11) 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.
- (12) 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.
- (13) 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.
- (14) 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.
- (15) 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.

- (16) 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.
- (17) 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.
- (18) 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.
- (19) 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.
- (20) 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.
- (21) 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.
- (22) 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.
- (23) Chen, J., Ueda, K., Sakakibara, S., Okuno, T., Yamanishi. (2000) "Transcriptional regulation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor gene." **J. Virol.** 74 (18): 8623-8634.
- (24) 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.
- (25) 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.
- (26) 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.

- (27) 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.
- (28) 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.
- (29) 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.
- (30) 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.
- (31) 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.
- (32) 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.
- (33) 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.
- (34) 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.
- (35) 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.
- (36) 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.
- (37) 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.
- (38) 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.
- (39) 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.
- (40) 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.