

45. Leiyun Weng, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Ying He, Jin Zhong, Tetsuya Toyoda. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype specific manner. J. Virol. 84(22):11761-70 (2010).

46. Hideko Nuriya, Kazuaki Inoue, Takeshi Tanaka, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Kyosuke Kaji, Seishu Hayashi, Shuichi Kaneko and Michinori Kohara. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based *in situ* hybridization. J. Clin. Microbiol. 48(11):3843-3851 (2010).

47. Yuri Kasama, Satoshi Sekiguchi, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Masaaki Satoh, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Motohiro Takeya, Yoichi Hiasa, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas *in vivo*. Blood 116(23):4926-4933 (2010).

48. Kenichi Satoh, Hiroki Takahashi, Chiho Matsuda, Takuya Umehara, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Mikio Zeniya and Michinori Kohara. Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. J. Med. Virol. 82(9):1545-1553 (2010).

49. Masaaki Satoh, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Sumako Iwanaga, Salem Nagla Elwy Salem Ali, Takahiro Seki, Seiji Okada, Michinori Kohara, Shinji Harada, Chieko Kai, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. Dec;33(6):e81-8 (2010).

50. Chen Y-Z, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, and Nishimura Y. Identification of SARS-COV spike protein-derived and HLA-A2-restricted human CTL epitopes by using a new muramyl dipeptidederivative adjuvant. International Journal of Immunopathology and Pharmacology 23(1):165-77 (2010).

51. Yutaka Amako, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Yuichi Hirata, Satoshi Sekiguchi, Yoshimi Tobita, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Hiromichi Yonekawa and Michinori Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* J. Virology 84(1):303-311 (2010).

52. 発明の名称： 新型インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンタンパク質遺伝子を有する組換えワクシニアウイルス

①発明者： 小原道法、安井文彦、迫田義博、喜田宏、村上利夫

②出願日： 2010年10月15日

③出願番号： 特願2010-233064

④出願人： (財) 東京都医学研究機構、国立大学法人 北海道大学、(財) 化学及血清療法研究所

⑤発明の内容の概略： 感染予防及び治療効果を示すインフルエンザウイルス HA 遺伝子を有する組換えワクシニアウイルス

53. 発明の名称：) 難治性ウイルス感染症の治療剤

①発明者： 小原道法、中川慎一郎

②出願日： 2010年9月9日

③出願番号： 特願2010-202355④出願人： (財) 東京都医学研究機構

⑤発明の内容の概略： インターフェロンを誘導して非常に強い抗 HCV, HBV 活性を示す、カチオニックリポソーム製剤

54. 発明の名称： RRM2 のアンタゴニストを有効成分として含有する C 型肝炎治療剤

①発明者： 小原道法、小原恭子、佐藤正明、須藤正幸

②出願日： 2010年8月12日

③出願番号： 特願2010-180981

④出願人： 中外製薬株式会社、(財) 東京都医学研究機構、国立大学法人 熊本大学

⑤発明の内容の概略： C型肝炎ウイルス複製に必須な宿主因子 RRM2 に対する阻害剤

H24-B割-肝炎一般-014 2015.1.27

ツパイ全ゲノム解析に基づくB型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究

- ・東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト
プロジェクトリーダー 小原 道法
- ・独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類科学研究所
センター長 保富 康宏
- ・鹿児島大学共同獣医学部・越境性動物疾病制御研究センター
教授・センター長 小原 恭子
- ・独立行政法人医薬基盤研究所・免疫学
プロジェクトリーダー 石井 健
- ・北海道大学大学院・医学研究科
准教授 押海 裕之
- ・公立大学法人名古屋市立大学院医学研究科
助教 村上 周子
- ・北海道大学大学院薬学研究院
助教 櫻井 遊
- ・愛媛大学医学部
教授 日浅 陽一

HBV感染感受性動物モデル

チンパンジー

- HBV感染実験に最適の動物モデル
- 動物愛護の観点から、実験動物としての使用できなくなった。

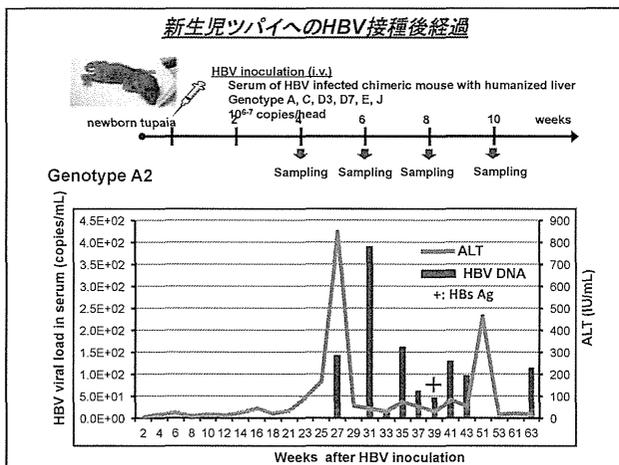
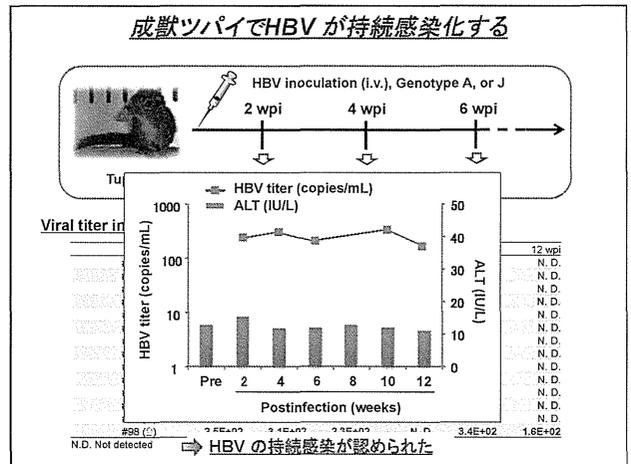
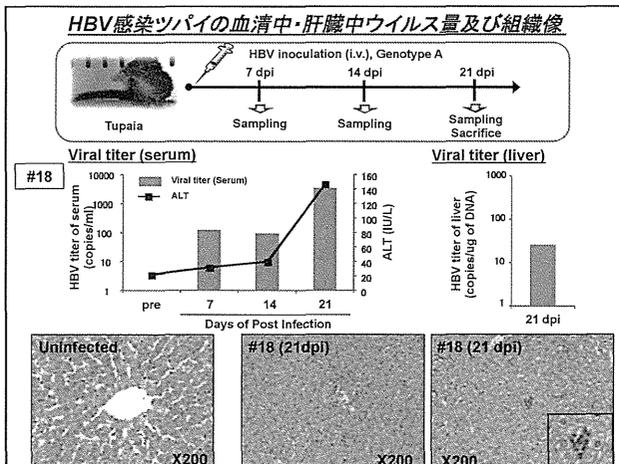
ヒト肝臓キメラマウス

- ヒトの肝臓組織を持つマウス、HBVが効率よく感染増殖
- 獲得免疫系が機能しておらず、炎症など免疫実験動物モデルとしては不適

ツパイ

- 肝炎ウイルスが感染増殖でき、肝硬変肝がんを発症する (Hepatology1996,24,1-5, Hepatology2005,41,247-56. J.Virol.2010,84,303-311)
- 獲得免疫系が機能しており、肝炎発症・ワクチン免疫実験動物モデルとして使用できる

体重100-150グラム

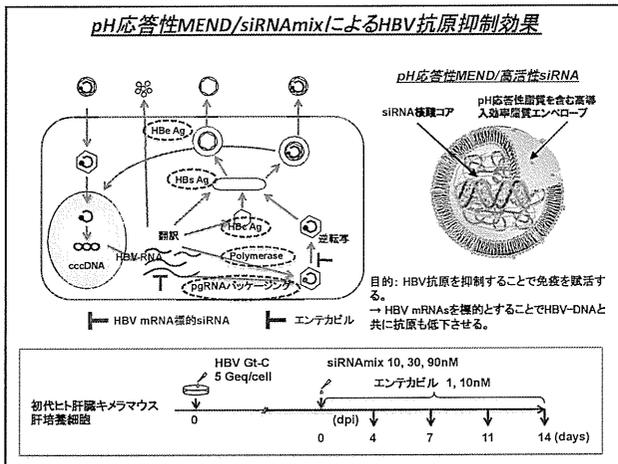
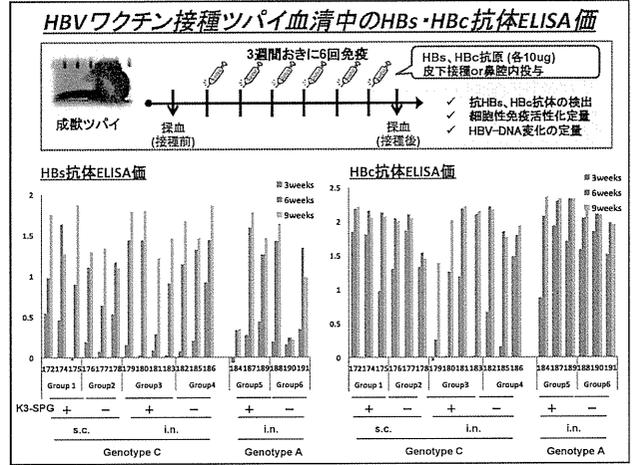
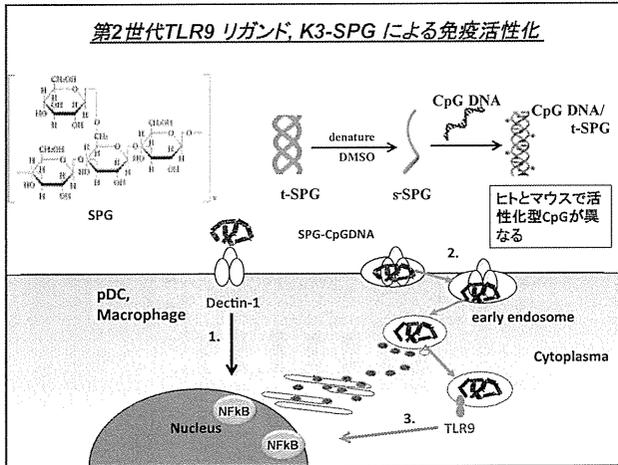
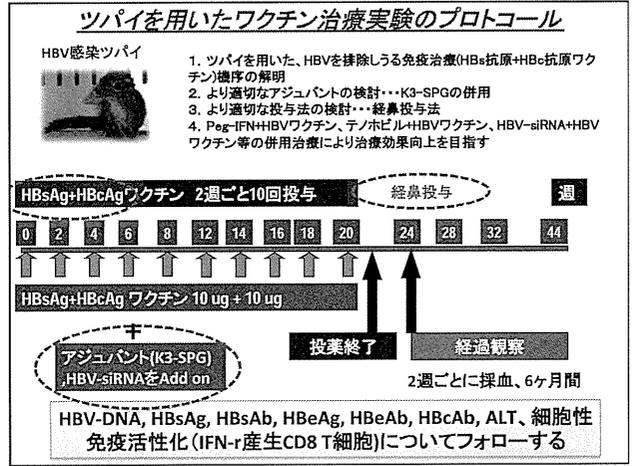
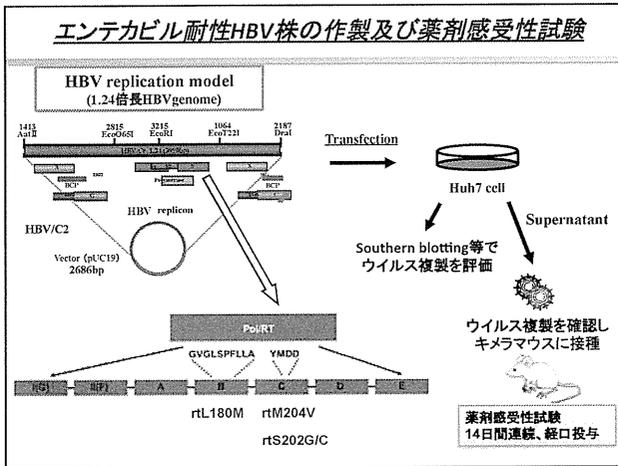


HBV高感受性ツパイ系統の選択

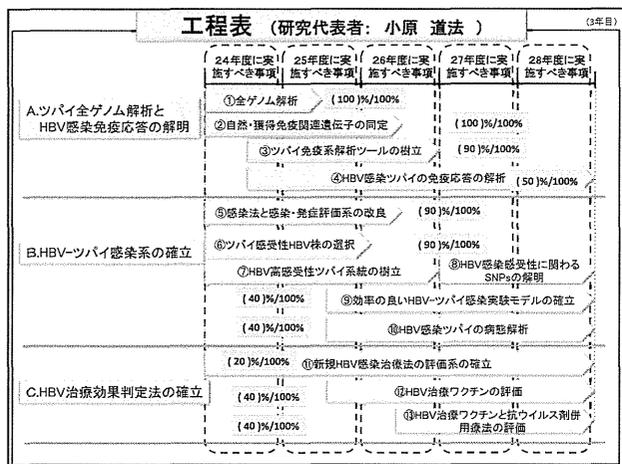
1) HBV genotype A2 (copies/mL)

w.p.i.	KU48	KU49	w.p.i.	KU51	KU52	KU53	w.p.i.	KU68	KU69	KU72
父	#19	#19	父	#15	#15	#15	父	#20	#20	#20
母	#9	#9	母	#30	#30	#30	母	#29	#29	#29
~25	0	0	~23	0	0	0	~16	0	0	0
27	140	73	25	0	0	160	18	0	16	0
31	390	67	29	180	0	110	25	120	47	110
35	160	500	35	36	0	330	29	0	400	92

w.p.i.	KU91	KU93	KU94	w.p.i.	NIB145	NIB146	NIB147	w.p.i.	NIB148	NIB149	NIB150
父	#14	#14	#14	父	T003	T003	T003	父	T002	T002	T002
母	#2	#2	#2	母	T029	T029	T029	母	T026	T026	T026
~10	0	0	0	~12	0	0	0	~12	0	0	0
12	0	46	480	16	0	59	730	16	16000	45000	76000
16	143	66	27	24	990	190	5200	24	210	890	5900
21	460	140	0	32	1300	4100	280	32	350	5100	1700



- ### まとめ
1. 繁殖
 - 1) 全てのメスが少なくとも2回目の出産をした。平均産仔数: 3.6匹、計220匹
 - 2) 仔ツパイと母ツパイを1日に30分ほど授乳同居させることで、嚙殺が無くなった。
 2. 新生児ツパイに各種HBV株を接種したところ持続感染化の成立が見られた。現在飼育されている個体のほとんどでHBV感染が確認できている (86/103匹: 83%)。概ね16週から20週のあたりでウイルス検出率が増加している。
 3. HBVに感染感受性の高い個体(ペア)を選出した。
 4. ツパイ高感受性ウイルス株を選出した。
 5. HBVの接触感染(水平感染、性的感染)が見られた。
- ↓
1. 感受性の高い系統については、繁殖ペアを維持して優先的に繁殖を行ってHBV高感受性系統の確立を進める。
 2. ツパイを用いた、HBVを排除する免疫治療抗原の選択 (small HBs抗原, large HBs抗原, HBc抗原; Genotype A or C)、経鼻投与方法などより適切な投与方法の検討する。
 3. Peg-IFN+HBVワクチン、テノホビル+HBVワクチン、MEND/HBV-siRNA等の併用治療により治療効果向上を目指す
 4. 新規治療薬候補物質の評価を進める。
 5. ワクチンメーカー、投与機材メーカーとの共同開発により早期の実用化を目指す。



【別添4】

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)

他の研究班への参加状況

【別添5】

研究代表者が、「肝炎等克服政策研究事業」または「肝炎等克服実用化研究事業」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)

ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。
 イ 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加している。
 (以下①、②を記載)
 ①(研究班名)「〇〇〇〇研究班」(研究代表者名: 〇〇〇〇)
 ② 他の研究班で担当している研究と、今回申請している研究の違い(研究内容が重複していないことを具体的に説明)

①「ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの開発に関する研究研究班」(研究代表者名: 小原道法)
 ② HCV治療を目指したDNAワクチンおよびHCV組換えワクチンアワクチンの開発を目指した研究で、慢性肝炎を発症しているHCVトランスジェニックマウスに対して接種しその治療効果を判定しており、本研究とは異なる。

合同研究会議開催状況

【別添6】

他の研究班と合同での研究会議開催状況(平成26年度)

ア 他の研究班と合同で研究会議を開催していない。
 イ 他の研究班と合同で研究会議を開催している。
 (開催している場合は、①開催日、②他の研究班の名称、③他の研究班の研究代表者名を記載してください)

平成25年12月13日 4班合同班会議

- 免疫系を保持した次世代型B型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発とその応用(研究代表者: 竹原徹郎)
- 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(研究代表者: 茶山一彰)
- ツバイ全ゲノム解析に基づくB型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究(研究代表者: 小原道法)
- ヒトチンパンジー・マウスハイブリッド技術を利用したB型肝炎ウイルス感染モデルマウスの開発(研究代表者: 山村研一)

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: 免疫系を保持した次世代型B型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発とその応用

課題番号 : H24-B創-肝炎-一般-015

予定期間 : H24 年度から H28 年度まで

研究代表者 : 竹原 徹郎

所属研究機関、部局: 大阪大学大学院 医学系研究科

職名 : 教授

委託費(決定額): 1 年目 100,000,000 円 2 年目 130,000,000 円 3 年目 143,000,000 円
計 363,000,000 円

I. 研究の意義

- (1) B 型肝炎の病態の解明や画期的な治療法の開発にはモデル動物を用いた研究が必要である。
- (2) 既存の uPA-SCID モデルでは、ウイルスに対する免疫応答を解析できない、系統維持が困難であり高価である、短命であり長期の病態解析ができないなどの欠点がある。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 免疫能を保持した安定した新規 B 型肝炎小動物モデルの開発を目的として、新規レシピエントマウスの確立、ドナー細胞の開発、イノキュラムの調整について研究を推進する。
- (2) ハイドロダイナミック法に使用する種々の HBV コンストラクトを作成し、B 型肝炎のゲノタイプの違いに依存するウイルス増殖を検討する。
- (3) マウスの免疫系をヒト細胞で再構成する方法を確立し、B 型肝炎に対するヒト免疫応答を解析できるシステムを樹立する。
- (4) TK-NOG マウスを用いて新規 HBV 治療薬の可能性を検討する。
- (5) Bcl-2 関連分子欠損マウスを用いた新規の肝細胞キメラマウスを作成し、B 型肝炎モデルの開発を行う。
- (6) 免疫寛容が成立している胎児期にヒト肝細胞を移植することで、免疫能の保たれた肝細胞キメラマウスを作成し、これにより HBV キャリアマウスを樹立し B 型肝炎治療への応用を目指す。
- (7) ES/iPS 細胞からの肝細胞・血液細胞の誘導法を確立し、同じ遺伝的背景をもつヒト細胞がマウス個体内で相互作用する新規のキメラマウスを作成し、B 型肝炎モデルへの応用を目指す。

III. 3 年間の研究成果

・研究代表者

- (1) ゲノタイプ A およびゲノタイプ C の HBV 発現プラスミドを作成した。NOD マウス、NOG マウス(T、B、NK 細胞欠損)にハイドロダイナミック法にて投与したところ、HBs 抗原血症およびウイルス血症が成立した。NOD マウスではウイルス血症は一過性であったが NOG マウスでは遷延化した。一方ゲノタイプ A の HBV を発現させた NOG マウスは 5 か月以上にわたり高いウイルス血症を示したのに対して、ゲノタイプ C の HBV を発現させた NOG マウスでは血中ウイルス量は低く、約3か月で検出感度以下となった。このことから、HBV ゲノタイプの違いによる免疫担当細胞非依存的な HBV 排除機構が存在することが示唆された。

- (2) ヒト肝細胞への置換率が 30~70%の TK-NOG マウスにゲノタイプ A、ゲノタイプ C の患者血清を投与することにより、1~2週間で持続的な感染が成立することを明らかにした。感染が成立したマウスに、ヒト PBMC を投与することにより、肝障害が誘導され、血中ウイルス量が低下することを明らかにした。ヒト肝細胞の NTCP を siRNA にて発現抑制させると、血中ウイルス量が低下することを明らかにした。

・研究分担者

- (1) HLA-DR4 を発現する NOG マウスを作成し、ヒト液性免疫反応が惹起することを確認した。hIL-2Tg/hIL-15Tg-NOG マウスにおいてヒト NK 細胞が効率的に分化誘導され、細胞傷害活性を有することを確認した。hIL-3/hGM-CSF Tg-NOG マウスでは NOG マウスに比し、移植されたヒト造血幹細胞からの骨髄球系の分化が改善することを確認した。(高橋武司)
- (2) NOG-MHC class I/class II KO マウスにヒト末梢血単核球を静注すると、肝臓より分離される単核球は経時的に増加し、移植後 28 日で約 90%がヒト細胞に置換した。NOG マウスへの移植で認められる GVH 応答は著明に抑制され、マウス免疫系ヒト化の有望なツールになることが示された。このマウスに HBs ワクチンを投与したところ、50%のマウスで HBs 抗体価の上昇がみられた。また、ハイドロダイナミック法による HBV の発現により、HBc ペプチドに対する T 細胞応答が誘導されたことから、移植されたヒト免疫細胞がマウス個体内で HBV に対して機能的に応答し得ることが明らかとなった。(巽 智秀)
- (3) ヒト臍帯血由来 CD34 陽性造血幹細胞を hIL-3/hGM-CSF Tg-NOG マウスに移植すると NK 細胞、T 細胞、B 細胞、単球への分化を認めた。(巽 智秀)
- (4) TK-NOG マウスにヒト肝細胞を移植し、30~70%の置換率をもつキメラマウスを作成した。Mcl-1 KO (C57BL 系統) マウスの免疫不全化に成功し、NOG-Mcl-1 KO の作成に成功した。ヒト末梢血単核球移植後も GVHD が起こりにくい NOG-MHC class I/class II KO マウス、もしくはヒト造血幹細胞の生着が良好な hIL-3/hGM-CSF Tg-NOG マウスと、ヒト肝細胞移植可能な TK-NOG を交配することで、ヒトの肝臓と免疫の両者の置換が可能な TK-NOG-MHC class I/class II KO マウス及び TK-NOG-hIL-3/hGM-CSF Tg マウスを作出した。(末水洋志)
- (5) Mcl-1 KO マウスおよび野生型マウスの ED16.5 の胎児の卵黄嚢静脈より GFP-Tg マウス由来の初代培養肝細胞もしくは、ヒト初代培養肝細胞を投与し、生下時においてはいずれのマウスでも投与肝細胞がマウス肝臓内に生着していることを確認した。Mcl-1 KO マウスでは生後 6 週の時点においても投与細胞の生着を確認した。(疋田隼人)
- (6) HBV のコア蛋白、pol を発現するパッケージング細胞に HBV 膜タンパク発現ベクターと EGFP もしくは分泌型高感度ルシフェラーゼ(NL1.3)をもつリコンビナント HBV プレゲノム RNA 発現ベクターを導入し、EGFP もしくは NL1.3 をもつリコンビナント HBV の作製に成功した。(上田啓次)
- (7) ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞から細胞シートを作成し、肝障害免疫不全マウスへ移植し、生着することを確認した。ヒト肝キメラマウス作成に適すると予想されるヒト iPS 細胞として、ゲノムインテグレーションフリー・ヒト iPS 細胞株を多数樹立することに成功した。(水口裕之)
- (8) ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を TK-NOG マウスへ経脾臓的に肝臓に移植した。アルブミン濃度は 2-4 mg/ml に達し、良好な生着を確認した。またこの作成したキメラマウスに HBV を投与すると血中 HBV-DNA 及び肝組織中 cccDNA を検出し、感染が成立したと考えられた。(疋田隼人)
- (9) マウス ES/iPS 細胞に対して、転写因子 Lhx2 をオンオフ発現することにより、造血幹細胞を誘導し、さらに造血細胞、免疫細胞への分化が誘導できることを明らかにした。また、ヒト iPS 細胞から血液細胞の前

駆細胞であるヘマンジオブラスト細胞を効率よく分化誘導できる培養システムを開発した。このヘマンジオブラスト細胞は、赤血球・好中球など各種血液細胞へ分化した。(北島健二)

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) ヒト肝細胞置換 TK-NOG マウスを用いて、NTCP 発現抑制による HBV 感染抑制など新規治療標的に関する in vivo 治療効果について検討を進める。
- (2) ヒト末梢血単核球および造血幹細胞移植を用いたマウス免疫系のヒト化についてさらに解析を行い、末梢血単核球と造血幹細胞の両者の移植による免疫系のヒト化も検討する。
- (3) ヒト肝細胞キメラマウスを用いた B 型肝炎モデルについて、免疫系のヒト化を行い、B 型肝炎に対するヒト免疫応答の解析を行う。
- (4) NOG 化した Mcl-1 KO マウスにヒト肝細胞を投与して、新規肝細胞キメラマウスを作成する。
- (5) EGFP もしくは NL1.3 をもつリコンビナント HBV のヒト肝細胞への感染性を検討する。
- (6) 新規に樹立した Lhx2 の発現を薬剤で誘導できるヒト iPS 細胞を用いて、ヒト iPS 細胞から造血幹細胞誘導に必要な条件を検討する。
- (7) iPS 細胞由来肝細胞を移植した TK-NOG マウスに HLA の一致した末梢血単核球もしくは造血幹細胞を移植し、肝細胞と免疫担当細胞のヒト化を行う。

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) 安価で安定した B 型肝炎モデルが作成されることにより、プルーフオブコンセプトの in vivo 実験が容易に行えるようになり、B 型肝炎に対する創薬研究が推進される。
- (2) 免疫系を保持した B 型肝炎モデルが作出されることにより、免疫系を標的とした新たな機序の抗 HBV 薬の開発に繋がる。
- (3) CCC DNA の排除を目的とした治療法の開発において有用な in vivo モデルを提供できる。

VI. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 厚生労働省で HBV 感染症の予防及び治療に関する対策を計画・施行する際の資料となることが期待される。
- (2) B 型慢性肝炎、急性肝炎、劇症肝炎の治療ガイドラインを作成する際の資料となることが期待される。

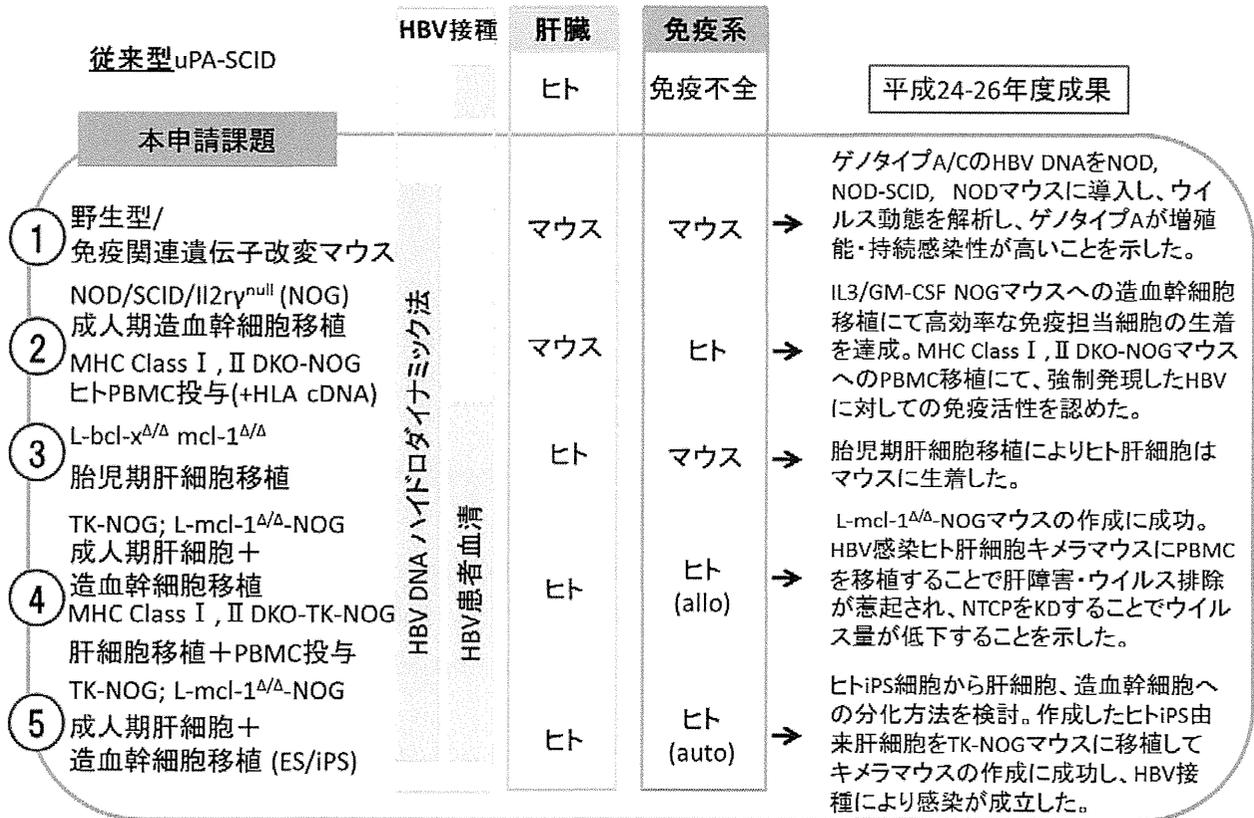
VII. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- (1) Nawa T, [Tatsumi T](#), [Hikita H](#), [Takehara T](#), et al. Interferon- α suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via the protein kinase C pathway. **Virology** 432: 452-459, 2012. (2) Kurokawa M, [Tatsumi T](#), [Takehara T](#), et al. Long-term effect of lamivudine treatment on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection. **J Gastroenterol** 47: 577-585, 2012. (3) [Hikita H](#), [Tatsumi T](#), [Takehara T](#), et al. Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: A causal link between apoptosis and carcinogenesis. **J Hepatol** 57: 92-100, 2012. (4) Nishida T, [Tatsumi T](#), [Takehara T](#), et al. Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic. **Hepatol Res** 43: 339-346, 2013. (5) Matsubara T, [Takehara T](#), et al. TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlated with angiogenesis. **Hepatology** 57: 1416-1425, 2013. (6) Yoshio S, [Takehara T](#), et al. Human BDCA3(+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C

virus. **Hepatology** **57**: 1705-1715, 2013. (7) Kodama T, Hikita H, Tatsumi T, Takehara T, et al. The Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins Bim and Bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins in healthy liver. **J Biol Chem** **288**: 30009-30018, 2013. (8) Takayama K, Mizuguchi H, et al. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction. **J Hepatol** **57**: 628-636, 2012. (9) Takayama K, Mizuguchi H, et al. Long-term self-renewal of human ES/iPS-derived hepatoblast-like cells on human Laminin 111-coated dishes. **Stem Cell Rep** **1**: 322-335, 2013. (10) Takayama K, Mizuguchi H, et al. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. **Biomaterials** **34**: 1781-1789, 2013. (11) Takayama K, Mizuguchi H, et al. Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. (in press) (12) Okada Y, Kitajima K, et al. Embryonic stem cell differentiation system for evaluating gene functions involved in physiological megakaryocytic differentiation. **Biochem Biophys Res Commun** **419**: 477-81, 2012. (13) Tanaka K, Kitajima K, et al. Tumor suppressive function of protein tyrosine phosphatase non-receptor type 23 in testicular germ cell tumors is lost upon overexpression of miR142-3p. **J Biol Chem** **288**: 23990-9, 2013. (14) Kitajima K, et al. Molecular functions of the LIM-homeobox transcription factor Lhx2 in hematopoietic progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells. **Stem Cells** **31**: 2680-9, 2013 (15) Nagamoto Y, Mizuguchi H, et al. Promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. **Biomaterials** **33**: 4526-4534, 2012. (16) Ito R, Suemizu H, et al. Efficient xenograftment in severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2 γ null mice is attributed to a lack of CD11c+B220+CD122+ cells. **J Immunol** **189**: 4313-4320, 2012. (17) Yamazaki H, Suemizu H, et al. In vivo formation of dihydroxylated and glutathione conjugate metabolites derived from thalidomide and 5-Hydroxythalidomide in humanized TK-NOG mice. **Chem Res Toxicol** **25**: 274-276, 2012. (18) Nishimura T, Suemizu H, et al. Using chimeric mice with humanized livers to predict human drug metabolism and a drug-drug interaction. **J Pharmacol Exp Ther** **344**: 388-396, 2013. (19) Yamazaki H, Suemizu H, et al. In vivo drug interactions of the teratogen thalidomide with midazolam: heterotropic cooperativity of human cytochrome P450 in humanized TK-NOG mice. **Chem Res Toxicol** **26**: 486-489, 2013. (20) Tsukada A, Suemizu H, et al. Plasma concentrations of melengestrol acetate in humans extrapolated from the pharmacokinetics established in in vivo experiments with rats and chimeric mice with humanized liver and physiologically based pharmacokinetic modeling. **Regul Toxicol Pharmacol** **65**: 316-324, 2013. (21) Gutti TL, Suemizu H, et al. Human Hepatocytes and Hematolymphoid Dual Reconstitution in Treosulfan-Conditioned uPA-NOG Mice. **Am J Pathol** **184**, 101-9, 2014. (22) Higuchi Y, Suemizu H, et al. The human hepatic cell line HepaRG as a possible cell source for the generation of humanized liver TK-NOG mice. **Xenobiotica** **44**: 146-53, 2014 (23) Moriya K, Takahashi T, et al. Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice. **PLoS One** **7**:e37892, 2012. (24) Ito R, Takahashi T, et al. Current advances in humanized mouse models. **Cell Mol Immunol** **9**: 208-214, 2012. (25) Suzuki M, Takahashi T, et al. Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/ γ cnull mouse. **Int Immunol** **24**: 243-252, 2012. (26) Ito R, Takahashi T, Suemizu H, et al. Establishment of a human allergy model using human IL-3/GM-CSF transgenic NOG mice. **J Immunol** **191**: 2890-2899, 2013.

Ⅷ. (3年間の研究成果の)概要図等

目的：HBVと肝細胞、免疫細胞の複雑な相互作用をマウス個体内で再現できる次世代型のHBV感染・増殖小動物モデルを開発する



●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7月～平成10年4月 大阪大学医学部第一内科

平成10年5月～12年9月 マサチューセッツ総合病院(MGH)消化器内科/ハーバード大学医学部

平成12年10月～17年7月 大阪大学大学院医学系研究科分子制御治療学

平成17年8月～現在 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

鎌田武信、林 紀夫

・主な研究課題

ウイルス肝炎、肝臓、細胞死、自然免疫

・これまでの研究実績

1. Impact of alpha-fetoprotein on hepatocellular carcinoma development during entecavir treatment of chronic hepatitis B virus infection. **J Gastroenterol**. In press.
2. Claudin 2 deficiency reduces bile flow and increases susceptibility to cholesterol gallstone disease in mice. **Gastroenterology** 147: 1134–1145, 2014.
3. Simeprevir for the treatment of chronic hepatitis C genotype 1 infection. **Expert Rev Anti Infect Ther**. 12: 909–917, 2014.
4. Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection. **Hepatology** 59: 2083–91, 2014.
5. Post-treatment levels of α -fetoprotein predict incidence of hepatocellular carcinoma after interferon therapy. **Clin Gastroenterol Hepatol** 12: 1186–95, 2014.
6. The Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins Bim and bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins in healthy liver. **J Biol Chem**. 288: 30009–30018, 2013.
7. Human BDCA3(+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. **Hepatology** 57:1704–1715, 2013.
8. Mcl-1 and Bcl-xL regulate Bak/Bax-dependent apoptosis of the megakaryocytic lineage at multistages. **Cell Death Diff** 11: 1856–1869, 2012.
9. Altered oligosaccharide structures reduce colitis induction in mice defective in β -1,4-galactosyltransferase. **Gastroenterology** 142: 1172–1182, 2012.
10. Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: A causal link between apoptosis and carcinogenesis. **J Hepatol** 57: 92–100, 2012.
11. Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. **J Clin Invest** 121: 3343–3356, 2011.
12. Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. **Hepatology** 54: 240–251, 2011.
13. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in

- combination with sorafenib. **Hepatology** 52: 1310–1321, 2010.
14. Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. **Gastroenterology** 138: 2487–2498, 2010.
 15. Sorafenib inhibited the shedding of MICA on hepatocellular carcinoma cells by downregulating ADAM9. **Hepatology** 51: 1264–1273, 2010.
 16. The let-7 family of microRNAs negatively regulates Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. **J Hepatol** 52: 698–704, 2010.
 17. BH3-only protein Bid participates in the Bcl-2 network in healthy liver cells. **Hepatology** 50: 1972–1980, 2009.
 18. Anti-cancer therapy inhibits MICA ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. **Cancer Res** 69: 8050–8057, 2009.
 19. Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. **Hepatology** 50: 1217–1226, 2009.
 20. Declining incidence of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan, from 1990 to 2003. **Ann Intern Med** 148: 820–826, 2008.
 21. Signal transducer and activator of transcription 3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. **Hepatology** 46: 1564–1573, 2007.
 22. Intrahepatic delivery of α -galactosylceramide-pulsed dendritic cells suppresses liver tumor. **Hepatology** 45: 22–30, 2007.
 23. Viral covalently closed circular DNA in a non-transgenic mouse model for chronic hepatitis B virus replication. **J Hepatol** 44: 267–274, 2005.
 24. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. **J Immunol** 173: 6072–6081, 2004.
 25. Concanavarin A injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an anti-tumor effect in murine liver. **Hepatology** 40: 1190–1196, 2004.
 26. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. **Gastroenterology** 127: 1189–1197, 2004.
 27. Hepatitis C virus core functions as a suppressor of cyclin-dependent kinase-activating kinase and impairs cell cycle progression. **J Biol Chem** 279: 11719–11726, 2004.
 28. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. **J Infect Dis** 190: 1919–1926, 2004.
 29. Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. **J Immunol** 171: 5423–5429, 2003.
 30. Hepatitis C virus core protein differentially regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon- γ stimuli. **J Biol Chem** 278: 28562–28571, 2003.
 31. Suppression of Bcl-xL deamidation in human hepatocellular carcinomas. **Cancer Res** 63: 3054–3057, 2003.
 32. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on interferon α -stimulated dendritic cells in

- NK cell activation: Impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 170:1249–1256, 2003.
33. Intravenous injection of naked plasmid DNA encoding hepatitis B virus (HBV) produces HBV and induces humoral immune response in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 784–788, 2003.
34. Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 34:55–61, 2001.

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)

- 「2005年度版 B型およびC型肝炎ウイルス感染者に対する治療の標準化に関するガイドライン」(平成17年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2006年度版 B型およびC型肝炎ウイルス感染者に対する治療の標準化に関するガイドライン」(平成18年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2007年度版 B型およびC型肝炎ウイルス感染者に対する治療の標準化に関するガイドライン」(平成19年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2008年度版 肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関するガイドライン」(平成20年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2009年度版 肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関するガイドライン」(平成21年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2010年度版 肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関するガイドライン」(平成22年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2011年度版 B型C型慢性肝炎・肝硬変治療のガイドライン」(平成23年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2012年度版 B型C型慢性肝炎・肝硬変治療のガイドライン」(平成24年3月 主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2013年度版 B型C型慢性肝炎・肝硬変治療のガイドライン」(平成25年3月 主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2014年度版 B型C型慢性肝炎・肝硬変のガイドライン」(平成26年3月 熊田博光、申請者は班員として参画)

免疫能を保持した次世代型B型肝炎ウイルス感染
小動物モデルの開発とその応用

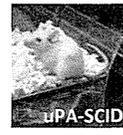
厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業
(B型肝炎創薬実用化等研究事業)

研究代表者
大阪大学大学院医学系研究科
消化器内科学

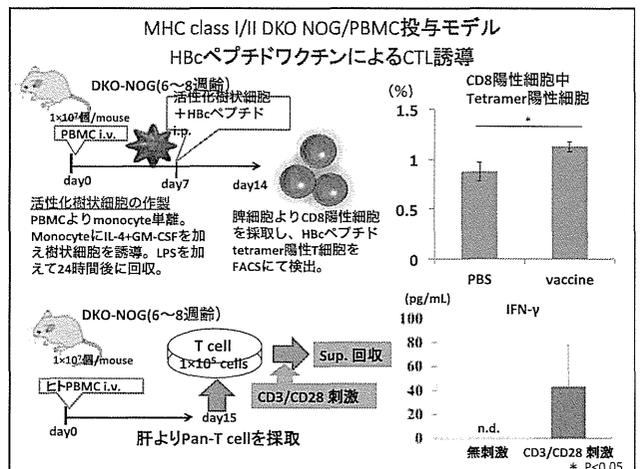
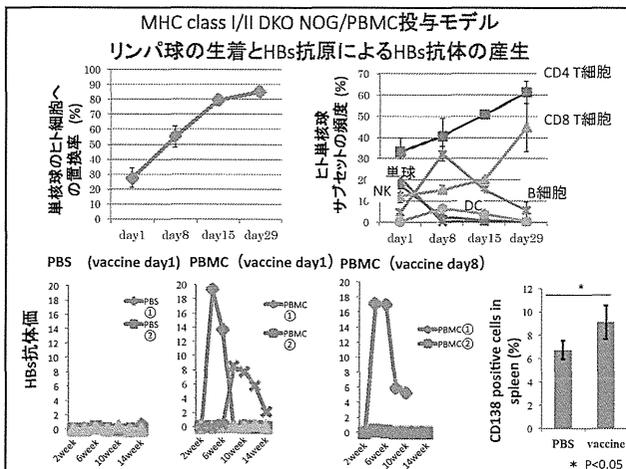
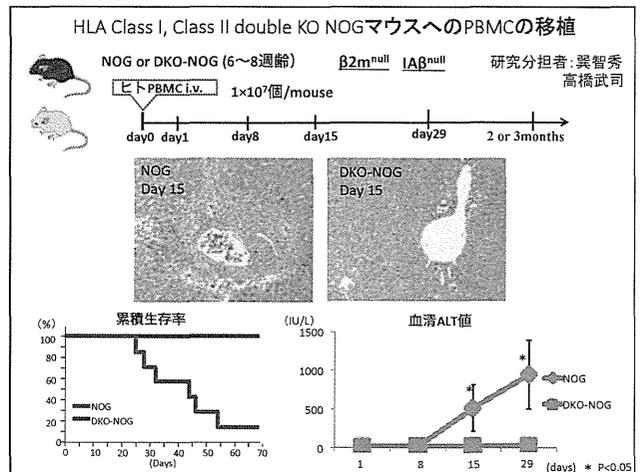
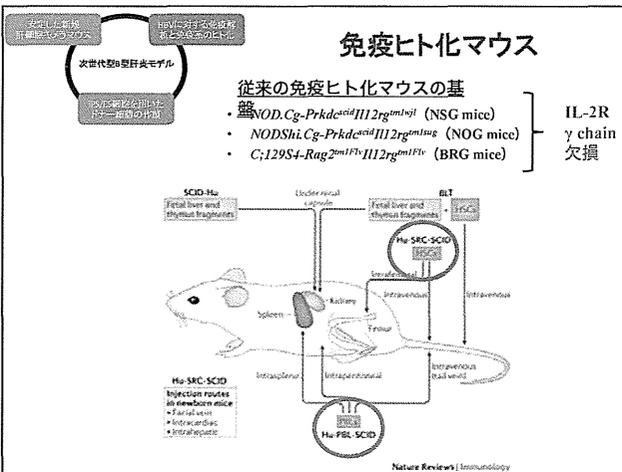
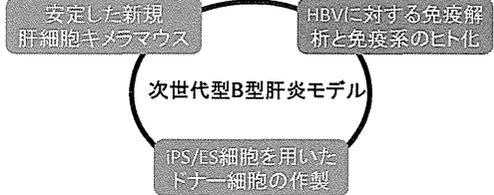
竹原 徹郎

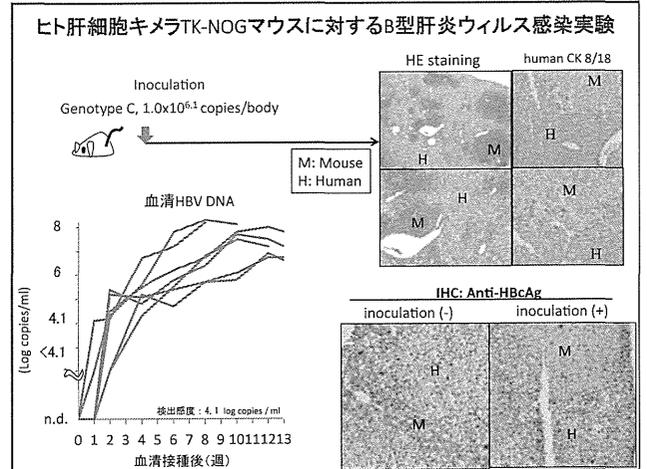
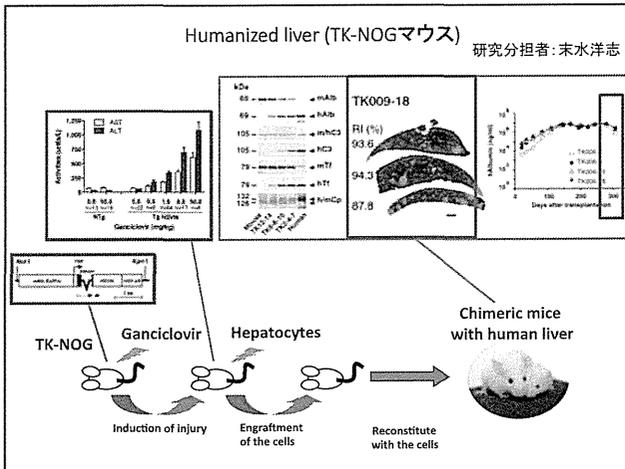
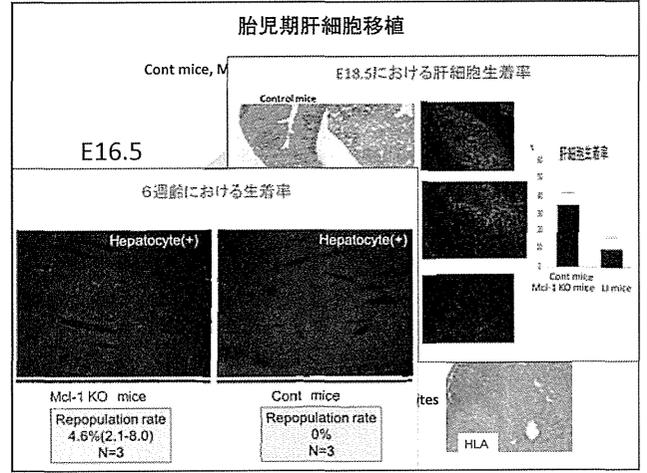
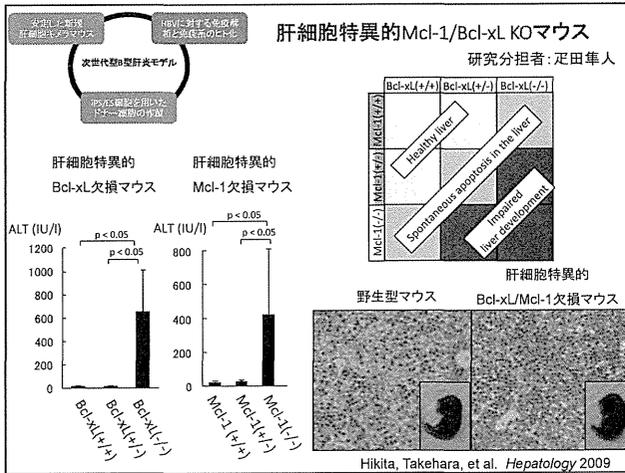
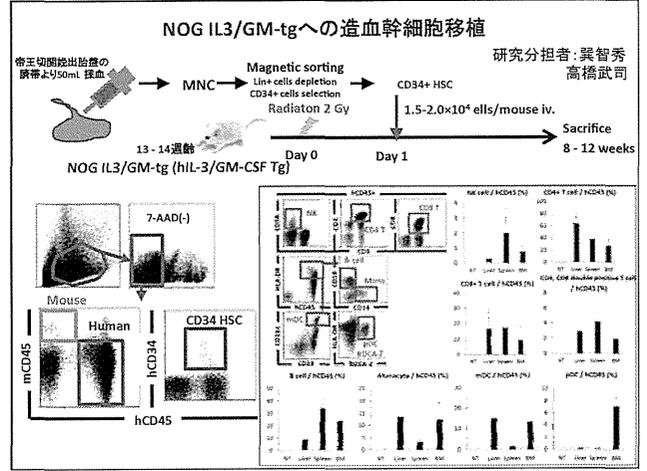
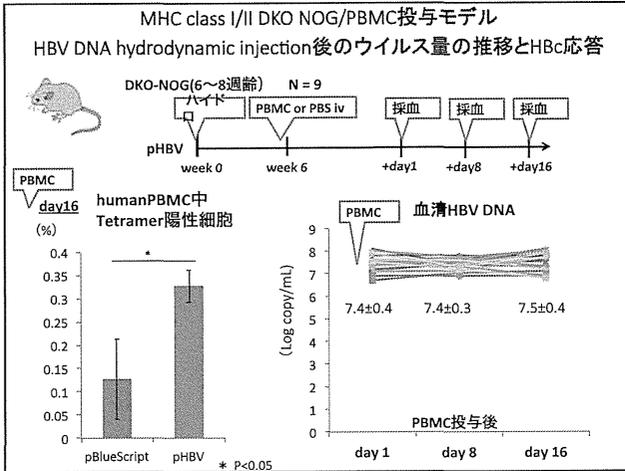
2015年1月27日

B型肝炎の病態を解明し、画期的な創薬研究を推進する
には、動物モデルの開発が必要である



- 系統維持に努力がかかる
- 長期の解析ができない
- 免疫応答の解析ができない





【別添4】

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)

他の研究班への参加状況

【別添5】

研究代表者が、「肝炎等克服政策研究事業」または「肝炎等克服実用化研究事業」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)

- ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。
- イ** 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加している。
(以下①、②を記載)

- ① (研究班名)「〇〇〇〇研究班」(研究代表者名:〇〇〇〇)
- ② 今回申請している研究との違い(研究内容に重複がないことを具体的に提示)など、その必要性・合理性の説明

「モデル動物等を用いたHCV感染病態と関連する宿主・ウイルス因子の解析と新規治療法の開発に関する研究班」(研究代表者:竹原徹郎)

マウスなどを用いてC型肝炎の宿主・ウイルス因子の解析を行う研究であり、HCVの排除やHCV排除後の発症抑制治療の開発のためには遂行すべき課題である。HCV感染はHBV感染とはレセプターも増殖・複製機構も異なっており、B型肝炎についてマウスモデルを用いて免疫との関係を解析する本研究課題とは重複しない。

【別添6】

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)

- ア 他の研究班と合同で研究会議を開催していない。
- イ** 他の研究班と合同で研究会議を開催している。
(開催している場合は、①開催日、②他の研究班の名称、③他の研究班の研究代表者名を記載してください)

平成26年12月2日 東京 4班合同班会議
動物モデル(竹原)、ツバキモデル(小原)、ハイブリッド動物モデル(山村)、動物・培養技術(茶山)

平成26年12月5日 大阪 3班合同班会議
動物モデル(竹原)、動物・培養技術(茶山)、自然免疫(藤田)

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: 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
課題番号 : H24-B創- 肝炎 一般-016
予定期間 : H24 年度から H28 年度まで
研究代表者 : 茶山一彰
所属研究機関、部局: 国立大学法人 広島大学 大学院医歯薬保健学研究院
職名 : 教授
委託費(決定額): 1 年目 100,000,000 円 2 年目 170,000,000 円 3 年目 188,100,000 円
計 458,100,000 円

I. 研究の意義

- (1) B 型慢性肝炎は核酸アナログやインターフェロンの投与により病勢のコントロールは可能となっているが、治癒(HBs 抗原の陰性化、HBs 抗体の陽性化)が得られないのでこれを解決する必要がある。
- (2) 劇症肝炎、B 型肝炎ウイルス(HBV)の再活性化で死亡する症例があり、対策を講じる必要がある。
- (3) cccDNA の排除には免疫、ワクチン療法などが考えられるが、過剰な反応を抑制する手段が必要である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HBV の研究を行うためウイルスをを安定的に感染/産生する細胞系、細胞株を提供する。
- (2) HBV が安定に持続感染する小動物を作製する。また、肝炎モデルを模倣する小動物モデルを作製する。
- (3) B 型肝炎ウイルスの持続感染を終焉させる治療を開発する。
- (2)重症の肝炎を早急に沈静化する治療を開発し、その臨床試験を実施し、治療法を確立する。

III. 3 年間の研究成果

・研究代表者(茶山一彰)

- (1) ヒト肝細胞キメラマウス由来の初代培養肝細胞を用いて 80%以上の高効率の HBV 感染細胞系を作製(立野班員との共同研究、AJP in revision)。Hep2.2.15 細胞の 10 万倍の HBV を産生する HepG2 系細胞株を樹立。
- (2) cDNA/uPA/scid を用いた安定 HBV 感染動物を作製、TK-NOG を用いた新たな感染モデルを作製(文献 3)。
- (3) uPA-scid を用いたヒト肝細胞キメラマウスとヒト血球による重症 B 型肝炎発症モデルを開発、FAS-L 抗体が細胞障害の防止に有用であることを示した(文献 1)。
- (4) HBV の産生には Ago2 が必須であり、Ago2 の抑制が HBV 産生を抑制することを示した(文献 2)。
- (5) TK-NOG マウス肝炎モデルで CTLA-4 と免疫グロブリンの融合蛋白アバタセプトが肝炎をほぼ完全に抑制することを明らかにし、重症肝炎の治療に有用であることを示した(投稿中、特許出願済み)。
- (6) HBV RNA が核酸アナログの治療効果予測と安全な終了の有用なマーカーであることを示した(文献 6,7)
- (7) B 型肝炎ウイルス感染に特徴的な血清 miRNA を明らかにし病勢との関連を明らかにした(文献 4,8,9)。
- (8) B 型肝炎ウイルスの増殖に必要な因子を特定する網羅的 siRNA screening を実施し、候補遺伝子を特定した。また、特異的に HBV を抑制する anti-sense miRNA 配列を有する LNA の網羅的 screening も実施した。
- (9) cccHBV 破壊用 CRISPR/Cas9 を開発、baculovirus で効果を確認、治療用アデノウイルスを作製した。

・研究分担者(志馬寛明) (1)HBV 感染で検知される核酸は RNA より DNA が主で、STING、MAVS による IRF3/7 依存性の IFN 誘導が重要であることを明らかにした(Innate Immun 2014 茶山との共同研究、文献 5)。HBV DNA の polymerase C 末が RIG-I、MAVS の IFN 誘導経路を阻害することを明らかにした(Oshiumi, PLoS ONE 2015)。

- ・研究分担者(加藤博己) NTCP 安定発現細胞株の樹立および各自然免疫担当分子(RLR etc)がノックダウンされた NTCP 安定発現株を作製し、HBV の感染を確認した。ヒト NTCP 発現トランスジェニックマウスを作製した。
- ・研究分担者(立野知世) 新たなホストマウスである cDNA-uPA/SCID マウスを作製した。このマウスは安定な B 型慢性肝炎の感染を維持した。このマウスを用いて HBV 感染は炎症、繊維化、apoptosis は来さないが、肝細胞分裂に影響を与えることを明らかにした。
- ・研究分担者(山本卓) (2)HBV に結合する人工タンパク質 TALE および HBV ゲノムを切断する TALEN および CRISPR システムを設計・合成し、HBV の増殖に対する影響を解析し CRISPR/Cas システムが HBV の増殖を最も強く抑制することを確認した。(2)HBV 破壊用の CRISPR/Cas9 のマルチガイドシステムを開発した。
- ・研究分担者(田原栄俊) (1)B 型肝炎・がんの組織・血清のマイクロ RNA 発現解析を行い、B型肝炎で増加するマイクロ RNA を 8 種類、減少するマイクロ RNA を 7 種同定。(2) B 型肝炎 25 例の原発巣肝癌組織、術前、術後血清の小分子 RNA の網羅的解析を次世代シーケンスで行い、予後予測のためのバイオマーカー候補を同定した。また、それらを用いた核酸医薬創生のためのデータベースを構築した。
- ・研究分担者(丸澤宏之) (1)任意の時期に全身、ならびに肝細胞特異的に HBs 抗原タンパク質を発現する 2 種類の新規モデルマウスを樹立した。(2)CRISPR/TALEN を用いたゲノム編集技術を応用し、肝培養細胞(HepG2 細胞) のウィルスセンサー遺伝子をノックアウトすることにより、HBV 感染許容性の高い培養細胞を樹立した。
- ・研究分担者(Hussein H Aly) (1)Identification of new therapeutic modalities by analyzing host factors affecting HBV life cycle.(2) Establishing immune-competent mouse model for HBV infection.
- ・研究分担者(坂口剛正) (1)B 型肝炎ウイルス P 蛋白質による宿主蛋白質合成阻害 (2)B 型肝炎ウイルス粒子形成機構研究のためのシステム構築 (3)B 型肝炎ウイルス粒子形成における宿主因子 Alix の関与 (4)B 型肝炎ウイルス粒子放出における宿主因子 tetherin の関与 (5)B 型肝炎ウイルス粒子形成における autophagy の関与 (6)B 型肝炎ウイルス不活化試験:高マンノース特異的レクチン、植物由来タンニン、エタノール製剤の効果
- ・研究分担者(阿部弘美) (1)主任研究者とともに 2 つの肝炎モデルマウスを作製した。(2)HBV 産生モデルとして HBV transgenic (HBV Tg) マウスを作製した。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) FAS-L monoclonal 抗体の作製とヒト化による治療への応用。
- (2) CTLA4 による重症肝炎の沈静化の臨床試験の進行と全国規模の臨床試験への展開。
- (3) siRNA を利用した HBV 増殖に必要な宿主因子の screening の終了と high throughput screening 系の開発。
- (4) 網羅的 anti-sense nucleic acid screening による核酸医療の開発。
- (5) HBV receptor, co-receptor の同定と monoclonal 抗体の作製、抗体医薬の開発。

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) 重症肝炎の沈静化の治療の臨床試験を倫理委員会に申請し、医師主導の治験の実施が可能となった。
- (2) 劇症肝炎、慢性肝炎の重症化、de novo B 型肝炎に対する新規治療法の開発の可能性が開けた。

VI. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 厚生労働省が掲げる「新しい肝炎総合対策」の 5 つのうちの健康管理の推進と安全・安心の肝炎治療の推進、肝硬変・肝がん患者への対応および研究の推進の 2 つに貢献する。

VII. 本研究の成果(発表文献・ガイドライン・マニュアル等)

【研究代表者】茶山一彰、【研究分担者】立野知世、阿部弘美

- (1)Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Aikata H, **Abe H**, Miki D, Ochi H, **Tateno C**, Yoshizato K,

Ohdan H and **Chayama K**. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology*. 2012; 56: 555–566.

(2) Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, **Abe H**, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Ohishi W and **Chayama K**. Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle. *PLoS One*. 2012; 7: e47490.

(3) Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, 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 **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.

(4) Arataki K, Hayes CN, Akamatsu S, Akiyama R, **Abe H**, Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Ohishi W **Chayama K**. Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol*. 2013; 85: 789–798.

(5) Leong CR, Oshiumi H, Okamoto M, Azuma M, Takaki H, Matsumoto M, **Chayama K** and Seya T. A MAVS/TICAM-1-Independent Interferon-Inducing Pathway Contributes to Regulation of Hepatitis B Virus Replication in the Mouse Hydrodynamic Injection Model. *J Innate Immun*. 2014; in press.

(6) Tsuge M, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Hiraga N, Takahashi S, Ochi H, Nelson Hayes C, Ginba H, Kawakami H and **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.

(7) Huang YW, Takahashi S, Tsuge M, Chen CL, Wang TC, Abe H, Hu JT, Chen DS, Yang SS, **Chayama K** and Kao JH. On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy. *Antivir Ther*. 2014; in press.

(8) Kohno T, Tsuge M, Hiraga N, **Abe H**, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, **Chayama K**. Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA. *J Viral Hepat*. 2014; 21: e89–97.

(9) Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, **Abe H**, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Ohishi W, Chayama K. Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection. *J Infect*. 2014; in press.

特許 2014(申請中)急性重症肝炎モデル非ヒト動物の作製方法、急性重症肝炎モデル非ヒト動物、劇症肝炎治療薬のスクリーニング方法および劇症肝炎治療薬出願番号: 特願 2014-217516 発明者: 茶山一彰

【研究分担者】山本卓 (1) Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, **Chayama K**, **Yamamoto T**. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Scientific Reports*, 4: 5400, 2014

【研究分担者】丸澤宏之 (1) 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. 288:31715–27.

【研究分担者】Hussein H Aly (1) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Takaji Wakita. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 17;443(3):808–13, 2014.

(2) Suzuki T, Oshiumi H, Miyashita H, Aly HH, Matsumoto M, Seya T, Cell Type-Specific Subcellular Localization of Phospho-TBK1 in Response to Cytoplasmic Viral DNA. *PLoS One*. Dec 9;8(12):e83639, 2013.