

厚生労働科学研究委託費

肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）

Chemical Virology を基盤とした肝炎ウイルス感染増殖

規定宿主因子の同定および新規抗ウイルス剤開発

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 渡土 幸一

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

Chemical Virology を基盤とした肝炎ウイルス感染増殖

規定宿主因子の同定および新規抗ウイルス剤開発

渡土 幸一（国立感染症研究所 ウイルス第二部） ----- 1

II. 学会等発表実績 ----- 10

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 16

I. 委託業務成果報告（総括）

II. 学会等発表実績

III. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究委託費
肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）
委託業務成果報告（総括）

Chemical Virologyを基盤とした肝炎ウイルス感染増殖規定宿主因子の
同定および新規抗ウイルス剤開発

業務主任者 渡士 幸一 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨：本研究は、低分子化合物を用いたB型(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)の増殖機構の解明およびこれを標的とした抗ウイルス剤開発を目的とする。本研究の主な解析内容および成果として、(1) 独自の培養系を用いたHBV吸着・侵入阻害剤および複製阻害剤スクリーニング系の構築、(2) 上記培養系を用いたスクリーニングにより、nocodazoleがHBV複製を阻害することを同定、またその作用ステップの解析、(3) HBV感染阻害化合物の同定、(4) flutamideがHCV粒子形成過程を阻害すること、およびその作用機序の解析、(5) neoechinulin BがHCV複製過程を阻害すること、およびその作用機序の解析、などが挙げられる。以上の結果は抗HBV剤同定の基盤技術、ならびに抗HBV剤、抗HCV剤の創薬標的となる分子同定のための基礎知見を与えるものであり、今後の抗ウイルス剤開発に有用な情報を提供するものである。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)に対しては近年、ウイルス性因子を直接標的とする direct acting antivirals (DAAs)が開発され、これにより治療成績の向上が認められている。しかしながらこれらの治療薬は高価であるためさらに安価かつ効果の高い抗HCV治療の達成が望まれている。一方B型肝炎ウイルス(HBV)に対する抗ウイルス剤としてはインターフェロン類および核酸アナログのみであり、新たな系統の抗HBV剤が求められる。そこで本研究では低分子化合物をプラットフォームとしたHBV, HCV生活環分子機序の解明およびこれを標的とした創薬に資する研究をおこなう。

本研究ではこれまでに感染性HCV産生を低下させることをすでに明らかにしている

neoechinulin B および flutamide に着目し、これがどのように抗HCV効果を発揮するかを調べた。一方これまで効率よくHBV複製を再現するHep38.7-Tet細胞および高感染許容性細胞株HepG2-hNTCP-C4細胞を樹立してきたが、これを用いた抗HBV化合物のスクリーニング系を構築した。さらにこれを用いたスクリーニングをおこない、HBV感染複製阻害剤の同定およびその作用機序を解析することにより、HBV生活環の分子機構の解明および抗ウイルス剤リード化合物の探索を目指す。

これらの研究はウイルス性肝炎を土台とした肝がん発症を抑止することで医療に貢献するだけでなく、現行の高価な抗ウイルス剤を最小限の使用に留め、これらの治療に要する医療費を低減するのに有効である。

B. 研究方法

(1) HBV 感染、複製の評価

HBV 感染には、Hep38.7-Tet 細胞の培養上清を約 200 倍濃縮した培養液を感染源 HBV として用いた。この HBV を HepG2-hNTCP-C4 細胞に 4% PEG8000 存在下で 16 時間処理することにより HBV 感染をおこなった。さらに洗浄後、化合物およびウイルスを含有しない培地で 12 日間培養した後の培養上清中 HBs 抗原を ELISA 法で測定することにより、HBV 感染を評価した。

一方 HBV 複製評価には、テトラサイクリン除去により HBV(遺伝子型 D) を誘導できる Hep38.7-Tet 細胞を主に用いた。この細胞を播種して 3 日後、テトラサイクリンを含まない培地で培養を始めることにより HBV 複製を誘導し、6 日後の培養上清中 HBV DNA 量をリアルタイム PCR 法で定量することにより HBV 複製を測定した。また遺伝子型 A, C の複製活性は、HBV 発現プラスミドを HepG2 細胞にトランスフェクションした 3 日後にヌクレオキャプシド内の HBV DNA を定量することにより測定した。

(2) nocodazole の抗 HBV 作用の解析

HBV RNA はリアルタイム RT-PCR 法で定量した。ヌクレオキャプシド内 HBV RNA は、細胞を溶解後 RNase A を処理することにより細胞質に遊離する RNA を消化し、PEG 沈殿をおこなった沈降産物内から RNA を抽出することにより回収した。総 HBV core タンパク質およびキャプシドはイムノブロット法で検出した。キャプシドは細胞溶解液を native agarose gel に泳動し、これを PVDF 膜に転写することで検出した。

(3) flutamide, NeoB の抗 HCV 作用の解析
HCV 産生は、HCV JFH1 を Huh-7.5.1 細胞に MOI 0.15 で感染させ、72 時間後の培養上清を回収し、この培養上清中 HCV の感染力価をフォーカス形成アッセイで定量することにより主に評価した。細胞内 HCV は、再感染の起こらない Huh7-25 細胞に HCV JFH1 RNA を導入し、72 時間後の細胞を 4 回凍結融解することで回収した。

レプリコンアッセイには HCV 遺伝子型 2a の JFH1 および遺伝子型 1b の NN 株をコードするサブゲノムレプリコンを用い、複製活性の欠失したレプリコンとしては NS5B の酵素活性中心の GDD モチーフを GND に変異させたものを用いた。

内在性遺伝子のノックダウンは Huh-7.5.1 細胞あるいは Huh-7 細胞に、各遺伝子に対する siRNA を lipofectamine RNAiMAX で導入することによりおこなった。

脂肪滴は BODIPY493/503 で染色することにより観察した。

転写因子の活性は、ルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流にそれぞれの転写因子の結合エレメントを 2-5 回有するレポーターコンストラクトを用いたレポーターアッセイにより評価した。

C. 研究結果

(1) HBV 吸着・侵入阻害剤スクリーニング系の構築

すでに我々が樹立した HepG2-hNTCP-C4 細胞を用いて、HBV 吸着・侵入阻害剤スクリーニング系の構築をおこなった。化合物を 3 時間前処理および HBV と同時に 16 時間

処理し、細胞を洗浄後化合物を含まない培地で 12 日間培養をおこない、培地中 HBs 抗原を検出した。この実験系においては、これまで HBV 複製過程を阻害することが知られているラミブジン (LMV)、エンテカビル (ETV) では影響が見られなかったが、吸着・侵入を阻害することが報告されているヘパリン、シクロスポリン、ウルソデオキシコール酸、preS1 ペプチドの処理により有意に HBs 量を低下させることが判明した。つまりこのプロトコルに従うことにより、複製ステップ阻害剤よりもむしろ吸着・侵入を含めた HBV 生活環初期過程を阻害する化合物を評価できると考えられた。

(2) HBV 複製阻害剤スクリーニング系の構築

すでに我々が樹立した高効率 HBV 複製細胞株 Hep38.7-Tet 細胞をテトラサイクリンを含まない培地に置換し、かつ化合物処理を開始して 6 日後の培地中 HBV DNA 量を定量した。preS1 ペプチドは影響を与えない一方で、LMV および ETV は HBV DNA 量を 1/100 以下に強く低下させた。つまりこの実験系により感度よく HBV 複製阻害を評価できると考えられた。

(3) nocodazole の HBV 複製抑制効果

(2) の系を用いて化合物スクリーニングをおこなった。その結果、Hep38.7-Tet 細胞の培地中 HBV DNA を最も減少させる化合物の一つとして nocodazole を得た。Nocodazole は細胞内 HBV RNA 量に影響を与えることなくヌクレオキャプシド内 HBV RNA を減少させたこと、また細胞内 core タンパク質をほとんど変化させず、キャプシド量を減少させたことより、nocodazole

は core の多量体化を阻害すると考えられた。また nocodazole の HBV 複製抑制効果は遺伝子型 A, B, D に共通して認められた。

(4) HBV 感染阻害化合物の同定

(1) の系を用いた化合物スクリーニングにより、ジケトシクロヘキサン誘導体、インドール誘導体が HBV 感染を阻害することが明らかとなった。これらの化合物は HBV 複製には影響を与えることなく、HBV の宿主細胞への吸着・侵入を阻害することが示唆された。

(5) flutamide の HCV 粒子形成阻害作用

HCV 産生を阻害することをこれまでに見出した flutamide の抗 HCV 作用機序を解析した。Flutamide は HCV 再感染の起こらない培養系において細胞内 HCV core タンパク質量に大きな変化を与えることなく細胞内 HCV の感染力価を有意に減少させたことより、これは HCV 粒子産生を阻害すると考えられた。また flutamide の細胞内標的因子の一つ aryl hydrocarbon receptor (AhR) をロックダウンすることにより同様に HCV 産生が低下したことより、少なくとも AhR は HCV 産生を制御していると考えられた。面白いことに flutamide を処理した細胞においては、HCV 粒子形成に重要とされる肝内脂肪滴が明らかに減少していることが観察された。

(6) neoechinulin B の HCV 複製抑制作用

これまでの研究により neoechinulin B (NeoB) は HCV 産生を低下させるものとして同定されたが、これは HCV レプリコン活性を低下させ、かつ複製活性を欠失したレプリコンには大きな影響を与えなかった。これにより NeoB は HCV ゲノム複製過程を抑制すると考えられた。また NeoB は脂質代謝、ホルモン代謝、薬物代謝に関わる遺伝子群

の発現を低下させ、liver X receptor (LXR) の転写活性を抑制することが示唆された。

D. 考察

以上のように今回、HBV 吸着・侵入阻害剤および複製阻害剤を同定できるスクリーニング系を構築した。また前者の化合物スクリーニングによりジケトシクロヘキサン誘導体、インドール誘導体がそれぞれ HBV 感染を阻害することを見出した。一方、複製評価系により nocodazole が HBV 複製を阻害すること、これは複製サイクル中のキャプシド形成を阻害することが示唆された。

これまでの化合物スクリーニングから HCV 産生を阻害する化合物として同定された flutamide、NeoB は HCV 生活環中の異なるステップを阻害すると考えられた。Flutamide は AhR 阻害を介して HCV 粒子形成あるいは維持を低下させること、NeoB は LXR 転写阻害により HCV 複製を抑制すると考えられた。

E. 結論

以上のように本研究では、ウイルス生活環中の異なるステップを阻害する抗 HBV 化合物および抗 HCV 化合物を同定した。またこれらの作用機序解析の結果、AhR, LXR などの核内受容体が HCV 生活環を多段階に制御していることを明らかにした。今後さらに詳細に分子機序を解析することにより、宿主によるウイルス生活環制御機構のみならず、新規創薬標的の同定に貢献できると期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A.: The RNA Sensor RIG-I Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus. **Immunity** (in press)
- 2) Watashi K*, Wakita T.: HBV/HDV entry, species specificity and tissue tropism. **Hepatitis B and Delta Virus (Cold Spring Harbor Laboratory Press)** (in press) (* corresponding author)
- 3) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C.: Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. **Am J Pathol** (in press)
- 4) Tsukuda S, Watashi K*, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, Sugiyama M, Kojima S, Tanaka Y, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T.: Dysregulation of Retinoic Acid Receptor Diminishes Hepatocyte Permissiveness to Hepatitis B Virus Infection through Modulation of NTCP Expression. **J Biol Chem** (in press) (* corresponding author)
- 5) 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** 452: 315-321 (2014)

- 6) Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T.: Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. **J Gen Virol** 95 (Pt 12): 2658-2667 (2014)
- 7) 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** 147: 463-472 (2014) (* corresponding author)
- 8) 渡士幸一。肝炎の基礎 HBV 感染生活環と培養系。肝疾患 review 2014-2015、20-26 (2014)
- 9) 渡士幸一。B 型肝炎ウイルス感染を抑制するサイトカインの同定とその分子メカニズムの解析。Liver Forum in Kyoto 第 16 回学術集会記録集、13-17 (2014)
- 10) 渡士幸一。第 6 章 抗ウイルス薬。生命科学のためのウイルス学、143-176 (2015)

2. 学会発表

- 1) K. Watashi. Anti-HBV Approach by Interfering the Interaction between HBV large surface protein and NTCP. **2nd Japan-Taiwan Research Symposium on Hepatitis B virus**, Taipei (Taiwan), April, 2014
- 2) Watashi K, Iwamoto M, Sluder A, Matsunaga S, Ryo A, Morishita R, Kwon ATJ, Suzuki H, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Borroto-Esoda K, Sugiyama M,

Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Characterization of a culture system reproducing the NTCP-mediated HBV entry and its application to drug development. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014

- 3) Iwamoto M, Watashi K, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Ohtani N, Koiwai O, Wakita T. Microtubule-dependent hepatitis B virus (HBV) replication revealed by chemical screening on an efficient HBV-replicating cell line. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 4) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoid inhibitors abolish the host permissiveness to HBV infection by modulating NTCP expression. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 5) Matsunaga S, Miyakawa K, Watashi K, Wakita T, Ryo A. Wheat germ cell-free system-based production of hepatitis B virus X (HBx) protein for generation and characterization of monoclonal antibody. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 6) Fukasawa M, Shimizu Y, Shirasago Y, Iwamoto M, Watashi K, Tanaka Y, Wakita T, Kondoh M, Yagi K, Hanada K. Efficient HBV infection system in cell cultured cells. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**,

- Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 7) Akahori Y, Kato H, Fujita T, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Development of hepatitis B virus cell culture system using immortalized human hepatocytes producing exogenous Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
 - 8) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Takemoto K, Izaguirre-Carbonell J, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Regulation of hepatitis C virus replication by liver X receptor is disrupted by a fungi-derived neoechinulin B. **21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 9) Ohashi H, Watashi K, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Kamisuki S, Sugawara F, Wakita T. Flutamide inhibits hepatitis C virus assembly through disrupting lipid droplets. **21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 10) Saga R, Fujimoto A, Watanabe N, Matsuda M, Hasegawa M, Watashi K, Aizaki H, Nakamura N, Konishi E, Kato T, Takeyama H, Wakita T, Suzuki R. Japanese Encephalitis Virus-subviral particles harboring HCV neutralization epitopes induce neutralizing antibodies against HCV. **21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 11) Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Sato M, Kanegae Y, Watashi K, Aizaki H, Chiba J, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Single domain intrabodies against HCV core inhibit viral propagation and core-induced NF-kB activation. **21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 12) Fujimoto A, Aizaki H, Matsuda M, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Suzuki T, Wakita T. Maintenance of HCV infectivity by down-regulating hepatic lipase expression. **21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 13) Goto K, Fujimoto A, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. NS5A-associated membrane protein, embryonic lethal, abnormal vision, drosophila-like 1, regulates hepatitis C virus RNA synthesis and translation. **21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 14) Nakajima S, Watashi K. Identification of neoechinulin B that represses liver X receptor-mediated transcription and inhibits hepatitis C virus replication. **The 3rd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity**, Osaka (Japan), Oct, 2014
 - 15) 渡士幸一、Ann Sluder、松永智子、梁明秀、森下了、岩本将士、九十田千子、鈴木亮介、相崎英樹、Katyna Borroto-Esoda、田中靖人、楠原洋之、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字。B型肝炎ウイルス(HBV)Lタンパク質とNTCPの相互作用阻害による抗HBV戦略。第24

- 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014年5月
- 16) 九十田千子、渡土幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、脇田隆字。HBV感染受容体 NTCP の発現調節機構の解析およびこれを阻害する低分子化合物の抗 HBV 効果。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014年5月
- 17) 大橋啓史、渡土幸一、中嶋翔、金ソレイ、鈴木亮介、相崎英樹、紙透伸治、菅原二三男、脇田隆字。C型肝炎ウイルス粒子の構築を阻害する flutamide の作用機序の解析。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014年5月
- 18) 青柳東代、相崎英樹、藤本陽、松本喜弘、松田麻未、Su Su Hmwe、渡邊則幸、渡土幸一、鈴木亮介、市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和氣健二郎、脇田隆字。グリチルリチンによる抗 HCV 作用 - phospholipase A2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス(HCV)分泌過程に与える影響 -。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014年5月
- 19) 外山政明、濱崎隆之、岡本実佳、渡土幸一、脇田隆字、馬場昌範。HBV カプシドタンパク質を標的とした新規抗 HBV 薬の探索。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014年5月
- 20) 中嶋翔、渡土幸一。ウイルス感染培養系を基盤とした天然化合物の生理活性同定。天然物ケミカルバイオロジー 分子標的と活性制御 第 6 回公開シンポジウム、名古屋、2014年5月
- 21) 渡土幸一、相崎英樹、脇田隆字。培養系を用いた抗 B 型肝炎ウイルス化合物の同定と作用機序解析。第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014年5月
- 22) 脇田隆字、相崎英樹、渡土幸一。C 型肝炎ウイルス生活環全体を標的とした新規作用を有する抗ウイルス剤の探索。第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014年5月
- 23) 青柳東代、相崎英樹、松本喜弘、鈴木亮介、渡土幸一、市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和氣健二郎、脇田隆字。グリチルリチンによる抗 C 型肝炎ウイルス作用 - phospholipase A2 および Autophagy による HCV 分泌過程の制御 -。第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014年5月
- 24) 岩本将士、渡土幸一、九十田千子、Hussein Aly、藤本陽、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、深澤征義、小祝修、楠原洋之。ヒト NTCP 安定発現による B 型肝炎ウイルス(HBV)感染許容性の獲得とそれを用いた HBV 侵入機構の解析。第 22 回肝病態生理研究会、東京、2014年5月
- 25) 渡土幸一。肝炎ウイルス生活環を標的とした抗ウイルス剤探索と分子基盤解明。平成 26 年度 遺伝子病制御研究所研究集会 感染・免疫・炎症・発癌、札幌、2014年7月
- 26) 渡土幸一。低分子化合物を通して理解する肝炎ウイルス生活環。ウイルス学キャンプ in 湯河原、湯河原、2014年9月
- 27) 渡土幸一。宿主細胞における肝炎ウイルス感染増殖機構とこれを標的とした創薬。第 87 回日本生化学会大会、京都、2014年10月
- 28) 渡土幸一、Ann Sluder、松永智子、梁明秀、森下了、岩本将士、九十田千子、鈴木亮介、相崎英樹、Katyna Borroto-Esoda、田中靖人、楠原洋之、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字。B 型肝炎

- 炎ウイルス(HBV) large S タンパク質と NTCP の相互作用阻害による抗 HBV 戦略。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 29) 渡土幸一。ラパトアセッション - +鎖 RNA ウイルス -。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 30) 九十田千子、渡土幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、杉山真也、田中靖人、溝上雅史、脇田隆字。レチノイド阻害剤は NTCP 発現修飾を介して宿主細胞の B 型肝炎ウイルス感染感受性を消失させる。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 31) 岩本将士、渡土幸一、杉山真也、鈴木亮介、相崎英樹、田中靖人、溝上雅史、大谷直子、小祝修、脇田隆字。効率的な B 型肝炎ウイルス(HBV)複製評価系を用いた微小管依存的な HBV 複製機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 32) 中嶋翔、渡土幸一、紙透伸治、竹本健二、Jesus Izaguirre-Carbonell、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆字。天然有機化合物 Neoechinulin B を利用した liver X receptor による C 型肝炎ウイルス産生制御機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 33) 大橋啓史、渡土幸一、中嶋翔、金ソレイ、鈴木亮介、相崎英樹、紙透伸治、菅原二三男、脇田隆字。Aryl hydrocarbon receptor による脂肪滴形成及び C 型肝炎ウイルス粒子構築の制御。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 34) Hussein Aly、渡土幸一、茶山一彰、脇田隆字。The identification of a new interferon-independent host mechanism suppressing hepatitis B virus replication. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 35) 嵯峨涼平、藤本陽、渡邊則幸、松田麻未、長谷川慎、渡土幸一、相崎英樹、中村紀子、小西英二、加藤孝宣、田島茂、高崎智彦、竹山春子、脇田隆字、鈴木亮介。日本脳炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルス 2 価ワクチン抗原の発現と中和抗体の誘導。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 36) 松田麻未、鈴木亮介、嵯峨涼平、藤本陽、渡土幸一、相崎英樹、森石恆司、岡本徹、松浦善治、黒田俊一、脇田隆字。遺伝子組換え酵母由来 B 型肝炎ウイルス様粒子の細胞表面への結合に関与する宿主因子の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 37) Lingbao Kong、青柳春代、松田麻未、藤本陽、渡土幸一、鈴木亮介、山越智、堂前直、鈴木健裕、鈴木哲朗、脇田隆字、相崎英樹。Prolactin regulatory element binding protein is involved in hepatitis C virus replication by interacting with NS4B. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 38) 宮川敬、松永智子、渡土幸一、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字、梁明秀。宿主防御因子 Tetherin-BST2 による B 型肝炎ウイルス感染抑制とその回避機構の解明。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 39) 土橋香織、葛西宏威、田中智久、陳文家、渡土幸一、脇田隆字、山下篤哉、梁明秀、岡本徹、松浦善治、森石恆司。トリプシン・EDTA による NTCP 依存 HBV

感染の増強。第 62 回日本ウイルス学会
学術集会、横浜、2014 年 11 月

- 40) 山本達郎、櫻井文教、高山和雄、立花
雅史、渡土幸一、脇田隆字、飯島沙幸、
田中靖人、水口裕之。ヒト iPS 細胞由来
分化誘導肝細胞を用いた B 型肝炎ウイル
ス感染評価系の開発。第 62 回日本ウイ
ルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 41) 赤堀祐一、加藤博己、藤田尚志、渡土
幸一、脇田隆字、土方誠。ヒト NTCP 恒
常発現不死化ヒト肝細胞を用いた B 型肝
炎ウイルス培養細胞感染系の構築。第 62
回日本ウイルス学会学術集会、横浜、
2014 年 11 月
- 42) 深澤征義、清水芳実、白砂圭崇、岩本
将士、渡土幸一、田中靖人、脇田隆字、
近藤昌夫、八木清仁、花田賢太郎。効率
的な HBV 感染培養細胞系の構築に関する
研究。第 62 回日本ウイルス学会学術集
会、横浜、2014 年 11 月
- 43) 安本順、葛西宏威、土橋香織、山下篤
哉、渡土幸一、脇田隆字、田中智久、森
石恆司。HBV 感染による細胞内脂肪滴形
成への影響。第 62 回日本ウイルス学会
学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 44) 山下篤哉、藤本雄介、田中智久、葛西
宏威、児玉栄一、渡土幸一、脇田隆字、
前川伸哉、榎本信幸、田中淳一、森石恆
司。海洋生物抽出物ライブラリーソース
からの B 型肝炎ウイルス転写活性抑制化
合物の探索。第 62 回日本ウイルス学会
学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 45) 外山政明、濱崎隆之、岡本実佳、渡土
幸一、脇田隆字、馬場昌範。新規
7-deazanepanocin A 及び
7-deaza-8-azanepanocin A 誘導体の抗
HBV 効果。第 62 回日本ウイルス学会学
術集会、横浜、2014 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

1. 論文発表

- 1) Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A.: The RNA Sensor RIG-I Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus. **Immunity** (in press)
- 2) Watashi K*, Wakita T.: HBV/HDV entry, species specificity and tissue tropism. **Hepatitis B and Delta Virus (Cold Spring Harbor Laboratory Press)** (in press) (* corresponding author)
- 3) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C.: Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. **Am J Pathol** (in press)
- 4) Tsukuda S, Watashi K*, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, Sugiyama M, Kojima S, Tanaka Y, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T.: Dysregulation of Retinoic Acid Receptor Diminishes Hepatocyte Permissiveness to Hepatitis B Virus Infection through Modulation of NTCP Expression. **J Biol Chem** (in press) (* corresponding author)
- 5) 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** 452: 315-321 (2014)
- 6) Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T.: Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. **J Gen Virol** 95 (Pt 12): 2658-2667 (2014)
- 7) 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** 147: 463-472 (2014) (* corresponding author)
- 8) 渡士幸一。肝炎の基礎 HBV 感染生活環と培養系。肝疾患 review 2014-2015、20-26 (2014)
- 9) 渡士幸一。B 型肝炎ウイルス感染を抑制するサイトカインの同定とその分子メカニズムの解析。Liver Forum in Kyoto 第 16 回学術集会記録集、13-17 (2014)
- 10) 渡士幸一。第 6 章 抗ウイルス薬。生命科学のためのウイルス学、143-176 (2015)

2. 学会発表

- 1) K. Watashi. Anti-HBV Approach by Interfering the Interaction between HBV large surface protein and NTCP. 2nd **Japan-Taiwan Research Symposium on Hepatitis B virus**, Taipei (Taiwan), April, 2014
- 2) Watashi K, Iwamoto M, Sluder A, Matsunaga S, Ryo A, Morishita R, Kwon ATJ, Suzuki H, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Characterization of a culture system reproducing the NTCP-mediated HBV entry and its

- application to drug development. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 3) Iwamoto M, Watashi K, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Ohtani N, Koiwai O, Wakita T. Microtubule-dependent hepatitis B virus (HBV) replication revealed by chemical screening on an efficient HBV-replicating cell line. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
 - 4) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoid inhibitors abolish the host permissiveness to HBV infection by modulating NTCP expression. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
 - 5) Matsunaga S, Miyakawa K, Watashi K, Wakita T, Ryo A. Wheat germ cell-free system-based production of hepatitis B virus X (HBx) protein for generation and characterization of monoclonal antibody. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
 - 6) Fukasawa M, Shimizu Y, Shirasago Y, Iwamoto M, Watashi K, Tanaka Y, Wakita T, Kondoh M, Yagi K, Hanada K. Efficient HBV infection system in cell cultured cells. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
 - 7) Akahori Y, Kato H, Fujita T, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Development of hepatitis B virus cell culture system using immortalized human hepatocytes producing exogenous Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
 - 8) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Takemoto K, Izaguirre-Carbonell J, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Regulation of hepatitis C virus replication by liver X receptor is disrupted by a fungi-derived neoechinulin B. **21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 9) Ohashi H, Watashi K, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Kamisuki S, Sugawara F, Wakita T. Flutamide inhibits hepatitis C virus assembly through disrupting lipid droplets. **21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 10) Saga R, Fujimoto A, Watanabe N, Matsuda M, Hasegawa M, Watashi K, Aizaki H, Nakamura N, Konishi E, Kato T, Takeyama H, Wakita T, Suzuki R. Japanese Encephalitis Virus-subviral particles harboring HCV neutralization epitopes induce neutralizing antibodies against HCV. **21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 11) Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Sato M, Kanegae Y, Watashi K, Aizaki H, Chiba J, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Single domain intrabodies against HCV core inhibit viral propagation and core-induced NF- κ B activation. **21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Banff (Canada), Sep, 2014

- 12) Fujimoto A, Aizaki H, Matsuda M, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Suzuki T, Wakita T. Maintenance of HCV infectivity by down-regulating hepatic lipase expression. **21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Banff (Canada), Sep, 2014
- 13) Goto K, Fujimoto A, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. NS5A-associated membrane protein, embryonic lethal, abnormal vision, drosophila-like 1, regulates hepatitis C virus RNA synthesis and translation. **21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Banff (Canada), Sep, 2014
- 14) Nakajima S, Watashi K. Identification of neoechinulin B that represses liver X receptor-mediated transcription and inhibits hepatitis C virus replication. **The 3rd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity**, Osaka (Japan), Oct, 2014
- 15) 渡士幸一、Ann Sluder、松永智子、梁明秀、森下了、岩本将士、九十田千子、鈴木亮介、相崎英樹、Katyna Borroto-Esoda、田中靖人、楠原洋之、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字。B型肝炎ウイルス(HBV)Lタンパク質とNTCPの相互作用阻害による抗HBV戦略。第24回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014年5月
- 16) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、脇田隆字。HBV感染受容体NTCPの発現調節機構の解析およびこれを阻害する低分子化合物の抗HBV効果。第24回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014年5月
- 17) 大橋啓史、渡士幸一、中嶋翔、金ソルイ、鈴木亮介、相崎英樹、紙透伸治、菅原二三男、脇田隆字。C型肝炎ウイルス粒子の構築を阻害するflutamideの作用機序の解析。第24回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014年5月
- 18) 青柳東代、相崎英樹、藤本陽、松本喜弘、松田麻未、Su Su Hmwe、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和氣健二郎、脇田隆字。グリチルリチンによる抗HCV作用 - phospholipase A2 および Autophagy によるC型肝炎ウイルス(HCV)分泌過程に与える影響 -。第24回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014年5月
- 19) 外山政明、濱崎隆之、岡本実佳、渡士幸一、脇田隆字、馬場昌範。HBVカプシドタンパク質を標的とした新規抗HBV薬の探索。第24回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014年5月
- 20) 中嶋翔、渡士幸一。ウイルス感染培養系を基盤とした天然化合物の生理活性同定。天然物ケミカルバイオロジー 分子標的と活性制御 第6回公開シンポジウム、名古屋、2014年5月
- 21) 渡士幸一、相崎英樹、脇田隆字。培養系を用いた抗B型肝炎ウイルス化合物の同定と作用機序解析。第50回日本肝臓学会総会、東京、2014年5月
- 22) 脇田隆字、相崎英樹、渡士幸一。C型肝炎ウイルス生活環全体を標的とした新規作用を有する抗ウイルス剤の探索。第50回日本肝臓学会総会、東京、2014年5月

- 23) 青柳東代、相崎英樹、松本喜弘、鈴木亮介、渡土幸一、市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和氣健二郎、脇田隆字。グリチルリチンによる抗 C 型肝炎ウイルス作用 - phospholipase A2 および Autophagy による HCV 分泌過程の制御 - 。第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月
- 24) 岩本将士、渡土幸一、九十田千子、Hussein Aly、藤本陽、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、深澤征義、小祝修、楠原洋之。ヒト NTCP 安定発現による B 型肝炎ウイルス(HBV) 感染許容性の獲得とそれを用いた HBV 侵入機構の解析。第 22 回肝病態生理研究会、東京、2014 年 5 月
- 25) 渡土幸一。肝炎ウイルス生活環を標的とした抗ウイルス剤探索と分子基盤解明。平成 26 年度 遺伝子病制御研究所研究集会 感染・免疫・炎症・発癌、札幌、2014 年 7 月
- 26) 渡土幸一。低分子化合物を通して理解する肝炎ウイルス生活環。ウイルス学キャンプ in 湯河原、湯河原、2014 年 9 月
- 27) 渡土幸一。宿主細胞における肝炎ウイルス感染増殖機構とこれを標的とした創薬。第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月
- 28) 渡土幸一、Ann Sluder、松永智子、梁明秀、森下了、岩本将士、九十田千子、鈴木亮介、相崎英樹、Katyna Borroto-Esoda、田中靖人、楠原洋之、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字。B 型肝炎ウイルス(HBV) large S タンパク質と NTCP の相互作用阻害による抗 HBV 戦略。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 29) 渡土幸一。ラパトアセッション - +鎖 RNA ウイルス -。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 30) 九十田千子、渡土幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、杉山真也、田中靖人、溝上雅史、脇田隆字。レチノイド阻害剤は NTCP 発現修飾を介して宿主細胞の B 型肝炎ウイルス感染感受性を消失させる。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 31) 岩本将士、渡土幸一、杉山真也、鈴木亮介、相崎英樹、田中靖人、溝上雅史、大谷直子、小祝修、脇田隆字。効率的な B 型肝炎ウイルス(HBV)複製評価系を用いた微小管依存的な HBV 複製機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 32) 中嶋翔、渡土幸一、紙透伸治、竹本健二、Jesus Izaguirre-Carbonell、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆字。天然有機化合物 Neoechinulin B を利用した liver X receptor による C 型肝炎ウイルス産生制御機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 33) 大橋啓史、渡土幸一、中嶋翔、金ソルイ、鈴木亮介、相崎英樹、紙透伸治、菅原二三男、脇田隆字。Aryl hydrocarbon receptor による脂肪滴形成及び C 型肝炎ウイルス粒子構築の制御。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 34) Hussein Aly、渡土幸一、茶山一彰、脇田隆字。The identification of a new interferon-independent host mechanism suppressing hepatitis B virus replication. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 35) 嵯峨涼平、藤本陽、渡邊則幸、松田麻未、長谷川慎、渡土幸一、相崎英樹、中村紀子、

- 小西英二、加藤孝宣、田島茂、高崎智彦、竹山春子、脇田隆字、鈴木亮介。日本脳炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルス2価ワクチン抗原の発現と中和抗体の誘導。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 36) 松田麻未、鈴木亮介、嵯峨涼平、藤本陽、渡土幸一、相崎英樹、森石恆司、岡本徹、松浦善治、黒田俊一、脇田隆字。遺伝子組換え酵母由来B型肝炎ウイルス様粒子の細胞表面への結合に關与する宿主因子の解析。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 37) Lingbao Kong、青柳春代、松田麻未、藤本陽、渡土幸一、鈴木亮介、山越智、堂前直、鈴木健裕、鈴木哲朗、脇田隆字、相崎英樹。Prolactin regulatory element binding protein is involved in hepatitis C virus replication by interacting with NS4B. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 38) 宮川敬、松永智子、渡土幸一、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字、梁明秀。宿主防御因子 Tetherin-BST2 による B 型肝炎ウイルス感染抑制とその回避機構の解明。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 39) 土橋香織、葛西宏威、田中智久、陳文家、渡土幸一、脇田隆字、山下篤哉、梁明秀、岡本徹、松浦善治、森石恆司。トリプシン・EDTA による NTCP 依存 HBV 感染の増強。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 40) 山本達郎、櫻井文教、高山和雄、立花雅史、渡土幸一、脇田隆字、飯島沙幸、田中靖人、水口裕之。ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス感染評価系の開発。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 41) 赤堀祐一、加藤博己、藤田尚志、渡土幸一、脇田隆字、土方誠。ヒト NTCP 恒常発現不死化ヒト肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス培養細胞感染系の構築。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 42) 深澤征義、清水芳実、白砂圭崇、岩本将士、渡土幸一、田中靖人、脇田隆字、近藤昌夫、八木清仁、花田賢太郎。効率的な HBV 感染培養細胞系の構築に関する研究。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 43) 安本順、葛西宏威、土橋香織、山下篤哉、渡土幸一、脇田隆字、田中智久、森石恆司。HBV 感染による細胞内脂肪滴形成への影響。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 44) 山下篤哉、藤本雄介、田中智久、葛西宏威、児玉栄一、渡土幸一、脇田隆字、前川伸哉、榎本信幸、田中淳一、森石恆司。海洋生物抽出物ライブラリーソースからの B 型肝炎ウイルス転写活性抑制化合物の探索。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 45) 外山政明、濱崎隆之、岡本実佳、渡土幸一、脇田隆字、馬場昌範。新規 7-deazaneplanocin A 及び 7-deaza-8-azaneplanocin A 誘導体の抗 HBV 効果。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月