

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 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)

(英語) Program on the Innovative Development and the Application of  
New Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名：(日本語) 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

(英語) Development of anti-HBV drugs by identification of HBV receptor molecules  
followed by establishing an HBV infection system

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 教授 上田 啓次

所属 役職 氏名：(英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Professor, Keiji Ueda

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) HBV感染機構全容の解明とHBV感染系の構築、HBV感染モニタリング  
システムの開発と抗HBV剤探索への応用

開発課題名：(英語) Elucidation of the whole HBV infection cycle by establishment of the  
more efficient HBV infection system and its application for anti-HBV reagent search

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学大学院医学系研究科 教授 上田 啓次

所属 役職 氏名：(英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Professor, Keiji Ueda

分担研究 (日本語) HBV受容体発現細胞株の樹立と感染初期過程を標的にした抗ウイルス剤探  
索

開発課題名：(英語) Establishment of HBV-infectious cell culture system and identification  
of antiviral targeting the early step of HBV infection cycle.

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人山梨大学大学院総合研究部 教授 森石 恆司

所属 役職 氏名：(英語) University of Yamanashi Professor Kohji Moriishi

分担研究 (日本語) 発現・精製したHBV膜蛋白をプローブとした相互作用因子の網羅的分離に  
よるHBV感染受容体の分離・同定

開発課題名：(英語) Comprehensive Screening of HBV Receptors/Interaction Proteins with  
Recombinant HBV Envelope Particles

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学産業科学研究所 教授 黒田 俊一  
所属 役職 氏名: (英語) The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University,  
Professor, Shunichi Kuroda

分担研究 (日本語) 細胞表面膜画分を用いた HBV 中和抗体の作製  
開発課題名: (英語) Identification of neutralizing antibody against HBV infection.

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学微生物病研究所 助教 岡本 徹  
所属 役職 氏名: (英語) Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University Assistant  
Professor Toru Okamoto

分担研究 (日本語) HBV エンベロープタンパク質と相互作用する細胞膜表面分子の網羅的探索  
開発課題名: (英語) Comprehensive search of the cell surface molecules interacting HBV  
envelope proteins

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人金沢大学がん進展制御研究所 准教授 黒木 和之  
所属 役職 氏名: (英語) Kanazawa University Associate Professor Kazuyuki Kuroki

分担研究 (日本語) 正常ヒト肝細胞で発現する miRNA と HBV 感染関連及び HBV 感染による miRNA  
発現変動の解析  
開発課題名: (英語) Research of miRNA expressed in normal human hepatocyte in its relation  
with HBV infection and research of miRNA expression affected by HBV infection

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人島根大学大学院医学研究科 教授 吉山 裕規  
所属 役職 氏名: (英語) Shimane university Professor Hironori Yoshiyama  
分担研究 (日本語) 細胞表面の糖鎖変化と HBV 感染に関する研究  
開発課題名: (英語) Involvement of cell surface oligosaccharide in HBV infection

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学大学院医学系研究科 教授 三善 英知  
所属 役職 氏名: (英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Professor, Eiji Miyoshi

分担研究 (日本語) HBV 感染機構に関わる糖鎖構造の解析  
開発課題名: (英語) Analysis of role of glycan structures in HBV-infection mechanism

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 生物学国際交流センター 講師 三崎 亮  
所属 役職 氏名: (英語) International Center for Biotechnology, Osaka university Lecturer,  
Ryo Misaki

分担研究 (日本語) HBV 感染による病態発症機構の解析  
開発課題名: (英語) Immunological pathogenesis in HBV infection

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学大学院医学系研究科 教授 竹原徹郎

所属 役職 氏名：（英 語） Osaka University Graduate School of Medicine, Professor, Tetsuo Takehara

分 担 研 究 （日本語） HBV 感染症における免疫細胞機能の解明と免疫制御法の開発  
開 発 課 題 名：（英 語） Investigation of immune cell functions and establishment of immune regulatory therapy against HBV infection

研究開発分担者 （日本語） 国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター センター長 考藤 達哉

所属 役職 氏名：（英 語） The Research Center for Hepatitis and Immunology, National Center for Global Health and Medicine, Director General, Tatsuya Kanto

分 担 研 究 （日本語） 高純度精製 RT を用いた活性測定系の確立および HBV ポリメラーゼを標的とした新規薬剤のスクリーニングについて

開 発 課 題 名：（英 語） Establishment of an *in vitro* assay system using highly purified HBV RT and high-throughput screening for anti-HBV polymerase drugs

研究開発分担者 （日本語） 国立大学法人大阪大学大学院医学系研究科 助教 大崎 恵理子

所属 役職 氏名：（英 語） Osaka University Graduate School of Medicine, Assistant Professor, Eriko Ohsaki

## II. 成果の概要（総括研究報告）

1. 上田啓次（大阪大学 大学院医学系研究科）：HBV 膜タンパクで付着・侵入のウイルス側リガンドである preS1:2-47aa、preS2:2-55 と相互作用する宿主因子、主にミトコンドリアに局在する幾つかの分子（HBV-RX1、HBV-mit1、HBV-mit2、HBV-mit3）や heat shock protein（HBV-HSP1、HBV-HSP2）等を同定した。特に HBV-RX1 のノックダウンや機能阻害剤が cccDNA 形成に至るまでの過程で感染を抑制することが判明した。この事実は、HBV 感染サイクルで機能する宿主因子が治療の標的となり得ることを示している。
2. 森石恆司（山梨大学 大学院総合研究部）：樹立した NTCP 発現 HepG2 細胞株をもとに、Trypsin EDTA 処理による HBV 高感染性培養細胞感染法を確立した。その系を用いて、抗 HBV 剤探索を行い、胆汁酸取り込み阻害をもつジギタリス類化合物 Proscillaridin A に非常に高い抗 HBV 活性が認められた（EC50 = 7.2 nM、SI 値 75.5）。その標的機構を解析したところ接着後の感染初期過程が標的となっていることが示唆された。更に、DNA ウイルス複製に阻害活性がある CDK 阻害剤 FIT-039 に抗 HBV 活性が認められ、ウイルス接着以降の感染初期過程が主に標的になっていると思われた。さらに、FIT-039 は cccDNA 量および抗原量を低下させることも分かった。ヒト肝臓キメラマウスで抗 HBV 活性を検討したところ、エンテカビル抗 HBV 活性を増強した。以上の結果から、高感染性を示す感染培養細胞系が確立され、同定した新規抗 HBV 化合物から高い抗 HBV 活性を示す新規抗 HBV 化合物展開が期待された。
3. 黒田俊一（大阪大学 産業科学研究所）：B 型肝炎ウイルス（HBV）L タンパク質からなるバイオナノカプセル（BNC）にミリストイル基修飾（Myristoylation）した Myr-BNC が HBV 受容体である NTCP と結合することを示し、Myr-BNC を用いた網羅的スクリーニングより、NTCP 以外の HBV 受容体候補 2 分子を同定することに成功した。また、HBV 受容体アンタゴニスト探索のためのスクリーニング系を樹立し、ケミカルライブラリーから候補化合物を得た。さらに、HBV 初期感染過程の「脱殻」においてエンドソーム内で機能する膜融合ドメインを Pre-S1 領域内に同定し、新しい抗 HBV 薬の薬剤標的を見出した。その他に、HBV 感染マウス作出のため、NTCP 及び新規 HBV 受容体候補を共発現するトランスジェニックマウスの F1 系統を樹立した。
4. 岡本 徹（大阪大学 微生物病研究所）：HBV 感染に関与する NTCP 以外の細胞膜蛋白質を同定するため、細胞膜画分を超速心機で分離し、マウスに免疫して、細胞膜を認識するモノクローナル抗体（mAb）を樹立した。このうち、mAb #8-6 は HBV 感染を抑制した。#8-6 を認識する蛋白質の同定を質量分析を用いた方法で検討し、候補蛋白質を得た。この候補蛋白質を RNAi で発現を抑制したところ、HBV 感染の低下が見られたが、その影響は警備であったが、NTCP 以外に HBV 感染に関与する因子の存在が示唆された。
5. 黒木和之（金沢大学 ガン進展制御研究所）：HBV 感染関連因子探索のため、HBV の感染成立を迅速・簡便に検出できるようなマーカー遺伝子（GLuc、NanoLuc、YFP など）を組み込んだ HBV ベクターの持続的産生系を開発した。また新規に作製した iPSC より HBV in vitro 感染系に適したクローンを選択、しさらに HBV 感染が効果的に検出できる肝細胞への分化誘導法を開発した。
6. 吉山裕規（島根大学 大学院医学系研究科）：HBV 感染に伴う microRNA および RNA の発現変化を次世代シーケンス法で比較した。HepG2-NTCP 細胞に HBV を感染させると、microRNA を含む未報告の遺伝子群の発現変動と、RNA スプライシングの変化を誘導した。さらに、初代培養肝細胞においても同様な変化を認めた。
7. 三善英知（大阪大学 大学院医学系研究科）：肝がん細胞の表面糖鎖と HBV 感染性に因果関係が認められるかについてまず検討し、HBV 擬似ウイルス BNC(Bionanocapsule)の取込みは Huh6細胞と HB611細胞（HBV を産生する細胞株）間で劇的な差を認め、HB611 細胞ではコアフコースの量が著明に増加していることが分かった。HB611 細胞をインターフェロン処理すると、HBV の発現が抑制され、それに伴

いコアフコースの量も減少した。またコアフコースの生合成に関わる糖転移酵素遺伝子 *FUT8* をノックダウンすると、BNC の取り込みが減少することから、コアフコースが HBV の感染に重要な糖鎖修飾であることが推察された。

HBV の受容体 NTCP に対する抗体で免疫沈降し、ミオシン 9 の同定に成功した。また、*FUT8* のノックダウンだけでなく、コアフコースを特異的に認識する PhoSL レクチンの投与によっても、BNC の取り込みが抑制された。さらに NTCP 発現 HepG2 細胞感染系で PhoSL レクチンが HBV 感染初期過程を抑制できることも実証できた。

8. 三崎 亮(大阪大学 生物工学国際交流センター):HBV 感染系( HepG2-hNTCP-C4 細胞)で ST6Gal1 遺伝子の発現量が増加しすること、HBV 感染系( HepG2-hNTCP-C4 )でのシアル酸転移酵素阻害剤は ST6Gal1 遺伝子の発現量は抑制するが HBV 感染は阻害されず、細胞内 rcDNA 量は寧ろ増加することを示した。このことから、細胞内シアル化糖鎖の増加は HBV 感染に対する防御機構として機能しており、宿主細胞の糖鎖のシアル化増強が HBV ライフサイクルを抑制する可能性が示唆された。HBV(BNC)粒子の表面抗原糖鎖構造を改変し、糖鎖を除去した BNC の取込み効率が、酵母型、シアル型、アジアロ型糖鎖を持つ BNC と比較して 2 倍以上高いという結果から、HBV 粒子表面の L タンパク質の糖鎖がトリミングされた場合に宿主細胞への感染効率が增加することが示唆された。

9. 竹原徹郎(大阪大学 大学院医学系研究科):B 型慢性肝炎患者における免疫抑制機能を有する末梢血単核球中の MDSC の頻度は健康人、B 型慢性肝炎患者では有意差は認めなかった。しかし、B 型慢性肝炎患者においては HBV-DNA 量と MDSC の頻度には負の相関を認め、HBV-DNA 複製の増加が MDSC の誘導を抑制する可能性が示唆された。HBV 発現細胞による NK 細胞の抑制メカニズムの解析では、HBV 発現細胞では、NK 活性化分子の発現の減少により、NK 細胞の活性化が抑制されている可能性を明らかにした。

10. 考藤達哉(国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター):B 型急性肝炎患者では Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) (IFN- $\gamma$  で誘導される肝 ISG) は ALT 極期と同時に IDO 活性が亢進し、その後ケモカイン、サイトカインの連続的な活性化が HBs 抗原の消失とともに認められた。HBV 初感染の際の HBV 排除に IDO 活性の亢進と、それに続く自然免疫、獲得免疫の活性化が重要であることが明らかになった。肝細胞に誘導される IDO は NK 細胞と DC との共存下で活性増強し、HBV 複製抑制作用を発揮することが明らかになった。肝細胞に IDO を誘導する化合物や生理活性物質は、感染初期に HBV の細胞間感染伝播を抑制する効果を発揮する可能性が示唆された。

11. 大崎恵理子(大阪大学 大学院医学系研究科): HBV ポリメラーゼの RT ドメインを世界で初めて高純度精製に成功した。この RT を用いて、抗 HBV 剤探索のためのハイスループットアッセイ系の構築し、51,680 化合物の低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、阻害活性を示す約 20 化合物を見出すことに成功した。

1. Ueda, Keiji (Osaka University Graduate School of Medicine) identified HBV-RX1, HBV-mit1, HBV-mit2, HBV-mit3 as host interacting factors with preS1 and some heat shock proteins with preS2. Knockdown and inhibitors treatment against HBV-RX1 led to reduced HBV entry and in this case, cccDNA formation was especially interfered. Thus, host factors should be targets for the treatment of HBV infection.

2. Dr. Kohji Moriishi (University of Yamanashi) established the more efficient HBV-infection system based on the NTCP-expressing HepG2 cell line and found Proscillaridin A, a digitalis analogue to be highly potent against HBV amplification (EC50: 7.2nM, SI: 75.5). The target step should be early steps up to cccDNA formation. A CDK9 inhibitor, FIT039 significantly potentiated the antiviral effect of entecavir in human liver-chimeric mice. This study provided a novel HBV infection system for drug screening to identify anti-HBV agents.

3. Dr. Kuroda showed that myristoylated bio-nanocapsule (BNC; recombinant yeast-derived HBV L protein particle)

interacted with the HBV receptor, NTCP. Two candidates as non-NTCP were identified as new HBV receptors by the Myr-BNC-based comprehensive screening. The screening system using non-NTCP HBV receptors and NTCP was established, leading to the identification of new antagonists from chemical libraries. The fusogenic domain within HBV pre-S1 region indispensable for HBV uncoating process in endosomes was identified, which could be a novel target for anti-HBV drugs. Furthermore, the founders (F1) of transgenic mice coexpressing NTCP and/or non-NTCP HBV receptors were generated for the in vivo HBV infection experiments.

4. Dr. Okamoto immunized cell membrane fractionated by ultracentrifugation into mice to generate monoclonal antibodies and identify cell surface proteins involved in the HBV infection. A monoclonal antibody (mAb) #8-6 showed inhibitory activity against HBV infection. MS analysis revealed the target protein recognized by #8-6. Knockdown of target protein reduced HBV infection. Our data suggested that not only NTCP but also another molecule involved in HBV infection steps.

5. Dr. Kuroki developed a sustainable production system of recombinant HBV vectors encoding marker genes (GLuc, NanoLuc, YFP etc) that could be quickly and easily detected by HBV infection for comprehensive search of the HBV infection related factors. Clones suitable for HBV infection in vitro from newly prepared iPSCs were developed with some differentiation methods to hepatocytes that was susceptible for HBV.

6. Dr. Yoshiyama analyzed expression of microRNA and the other RNA in HBV infection with next generation sequencing. On HBV infection, some RNA transcription including microRNA was changed and also some splicing variation was found. The same expression profile was observed in HBV infection using primary human hepatocytes as well.

7. Dr. Miyoshi showed that dramatic difference of the BNC entry was observed in HB611 cells and Huh 6 cells, although their origin was the same and that core fucose was the most important glycosylation in the BNC entry. The knockdown of FUT8, which is involved in the synthesis of core fucose, suppressed the BNC entry. IP with anti-NTCP antibody followed by mass spectrometry analysis revealed that myosin 9 played a pivotal role in core-fucose-regulated BNC entry into HB611 cells. Treatment of PhoSL, which specifically recognizes core fucose, suppressed the BNC entry in HB611 cells. PhoSL suppressed HBV entry into HepG2 cells expressing NTCP. Thus, core fucose on cell surface is a promising target for HBV therapy.

8. Dr. Misaki showed that infection of HBV to HepG2 cells expressing human NTCP, HepG2-hNTCP-C4, resulted in increase of gene expression of ST6Gal1 and ST3Gal1 catalyzing sialylation of O-glycans. Treatment of a sialyltransferase inhibitor before HBV-infection suppressed the expression of sialyltransferases but not HBV-infection efficiency and amount of intracellular rcDNA of HBV increased comparing with that in uninfected cells. These results suggested that the increase of sialylation of glycans acts as a defense mechanism against the HBV-infection and the promotion of the sialylation suppresses rotation of the HBV-life cycle. Glycan-modification methods has been improved and BNC with single N-acetylglucosamine was the most infectious, suggesting that trimming of N-glycans of L protein might facilitate HBV-infection efficiency.

9. Dr. Takehara showed that the frequencies of MDSC in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients were as many as those in normal donors. The frequencies of MDSC were negatively correlated with the number of HBV DNA in chronic hepatitis B patients, suggesting that replication of HBVDNA might inhibit the induction of MDSC. The suppression of activating molecules of NK cells was suggested in HBV producing cells, which might be co-related to persistent infection of HBV.

10. Dr. Kanto revealed that in the acute hepatitis B patients, Indoleamine-2, 3-dioxygenase (IDO), an enzyme that catabolizes tryptophan to kynurenine and a probable inhibitor of HBV replication as an IFN $\gamma$  inducible gene, was enhanced in parallel with the peak of ALT elevation, followed by sequential chemokine and cytokine activation and

HBsAg clearance. These results demonstrate that sequential activation of IDO and innate and adaptive immunity should be involved in HBsAg clearance. Hepatic IDO was activated in the presence of NK cell and DC, which strongly suppressed HBV replication. Therefore, some chemical compounds or biomaterials that potentially induce IDO in hepatocytes could be candidates of anti-HBV drugs that suppress the spread of cell-to-cell dissemination of HBV.

11. Dr. Ohsaki succeeded to highly purify the RT domain of HBV polymerase in the world and developed a high-throughput assay system for finding inhibitors against RT - specific activity. We screened low molecular compound libraries of 51,680 compounds and nominated about 20 compounds showing inhibitory activity.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 25 件、国際誌 61 件)

1. 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.
2. 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.
3. Nakano, K., Katano, H., Tadagaki, K., Sato, Y., Ohsaki, E., Mori, Y., Yamanishi, K., and Ueda, K. “Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman's Disease; Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II.” *Virology* 425: 95-102, 2012. doi.org /10.1016/j.virol.2012.01.008
4. Noma, S., Ohya-Shimada, W., Kanai, M., Ueda, K., Nakamura, T., Funakoshi, H. “Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7.” *Neuroscience Res.* 73(2): 115-21. 10.1016/j.neures. 2012.
5. 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.
6. Ueda, K. “Kaposi’s Sarcoma-associated Herpesvirus Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic Insults are Evaded.” *J.Blood and Lymph* 2:3, 2012. doi.org /10.4172/2165-7831.1000e109.
7. Ueda, K. “Start or End?; one of the biggest mysteries is finally solved?” *Medical Microbiology and Diagnosis dx*.doi.org/10.4172/2165-7866.1000e101, 2013.
8. 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.
9. Ueda, K. “Change in Cellular Gene Expression by hepatitis B virus (HBV)”. pp219-232. *Epidemiology I - Theory, Research and Practice*. iConcept, 2014.
10. Ueda, K., Omori, H. “Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype Particle; a versatile tool for Identification of the HBV Receptor and Investigation of HBV infectivity.” *J. Liver*. doi.org/10.4172/2167-0889.1000169、2014.
11. Zheng, X., Ohsaki, E., and Ueda, K. “The Mechanism of Angiopoietin-1 Up-regulation in KSHV-infected PEL Cell Lines.” *J. Virol.* 89: 4786-4797, 2015.
12. Kanno, T., Uehara, T., Osawa, M., Fukumoto, H., Mine, S., Ueda, K., Hasegawa, H., and Katano, H. “Fumagillin, a potent angiogenesis inhibitor, induces Kaposi sarcoma-associated herpesvirus replication in primary effusion lymphoma cells.” *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 463: 1267-1272, 2015.

13. Ohsaki, E., and Ueda, K. “The intracellular dynamics of lytic replication components and the lytic origin of Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus.” *Annals of Virol. and Res.* 1(1): 1003-1007, 2015.
14. Retno Rahayu, Eriko Ohsaki, Hiroko Omori, Keiji Ueda. “Localization of latency-associated nuclear antigen (LANA) on mitotic chromosomes.” *Virology* 496: 51–58, 2016.
15. Madori Osawa, Sohtaro Mine, Shinichiro Ota, Kengo Kato, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Michiyo Kataoka, Hitomi Fukumoto, Yuko Sato, Takayuki Kanno, Hideki Hasegawa, Keiji Ueda, Masashi Fukayama, Takuya Maeda, Soichiro Kanoh, Akihiko Kawana, Yuji Fujikura and Harutaka Katano. “Establishing and characterizing a new primary effusion lymphoma cell line harboring Kaposi’s sarcoma–associated herpesvirus.” *Infectious Agents and Cancer* 11: 37-51, 2016.
16. 上田啓次. B型肝炎のウイルス学. 化学療法の領域 48:125-133, 2012.
17. 上田啓次. 遺伝子挿入HBVを用いた感染リセプターの探索. 肝胆膵 65 : 601-609, 2012.
18. 上田啓次. 「HBV遺伝子と関連抗原」 *Hepatology Practice*. pp2-9. 文光堂、2013.
19. 上田啓次. 「グルコシルチコイド感受性領域」 *Hepatology Practice*. pp149-151. 文光堂、2013.
20. 上田啓次. 「DNAウイルス」病原微生物学 東京化学同人 pp167-179, 2014.
21. 上田啓次. 「ウイルスの感染機構」 *プログレッシブ生命科学* 南山堂. pp234-243, 2014.
22. 上田啓次. 「細菌の感染機構」 *プログレッシブ生命科学* 南山堂. Pp244-249, 2014.
23. 上田啓次. 「ヘルペスウイルス8型とEBウイルスの重感染」高田賢蔵監修、柳井秀雄、清水則夫、吉山裕規編 *EBウイルス (改訂第3版)*. pp70-75, 2015.
24. 上田啓次. 「HBVの遺伝子構造、複製機構」新ウイルス性肝炎学 -最新の基礎・臨床研究情報- 日本臨床 73:349-356, 2015.
25. 上田啓次. 「肝炎ウイルスレセプター」ウイルス肝炎・肝癌研究の新展開 細胞 47(11) : 8-11, 2015.
26. Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Murakami S, Chen W, Okamoto T, Ueda K, Hosoya T, Matsuura Y, Ryo A, Tanaka Y, Hagiwara M, Moriishi K: Inhibitory effect of CDK9 inhibitor FIT-039 on hepatitis B virus propagation. *Antiviral Res*, 133: 156-164, 2016
27. Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, Yamashita A, Yasumoto J, Chen W, Okamoto T, Maekawa S, Watashi K, Wakita T, Ryo A, Suzuki T, Matsuura Y, Enomoto N, Moriishi K.: Hepatitis B virus efficiently infects non-adherent hepatoma cells via human sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Sci. Rep.* 5:17047, 2015
28. Yamashita A, Fujimoto Y, Tamaki M, Setiawan A, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Watashi K, Wakita T, Toyama M, Baba M, de Voogd NJ, Maekawa S, Enomoto N, Tanaka J, Moriishi K: Identification of antiviral agents targeting hepatitis B virus promoter from extracts of Indonesian marine organisms by a novel cell-based screening assay. *Mar. Drug.* 13:6759-6773. 2015.
29. Iijima M, Somiya M, Yoshimoto N, Niimi T, and Kuroda S. Nano-visualization of oriented-immobilized IgGs on immunosensors by high-speed atomic force microscopy. *Scientific Reports* 2012, 2, 790.
30. Iijima M, Yoshimoto N, Niimi T, and Kuroda S. Nanocapsule-based probe for evaluating the orientation of antibodies immobilized on a solid phase. *Analyst* 2013, 138, 3470-3477.
31. Yoshimoto N, Kida A, Jie X, Kurokawa M, Iijima M, Niimi T, Maturana AD, Nikaido I, Ueda HR, Tatematsu K, Tanizawa K, Kondo A, Fujii I, and Kuroda S. An automated system for high-throughput single cell-based breeding. *Scientific Reports* 2013, 3, 1191.
32. Iijima M, Yamamoto M, Yoshimoto N, Niimi T, and Kuroda S. Bio-nanocapsules for signal enhancement of alkaline phosphatase-linked immunosorbent assays. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2013, 77, 843-846.



33. Kida A, Iijima M, Niimi T, Maturana AD, Yoshimoto N, and Kuroda S. Cell surface-fluorescence immunosorbent assay for real-time detection of hybridomas with efficient antibody secretion at the single-cell level. *Anal. Chem.* 2013, 85, 1753-1759.
34. 曾宮正晴、良元伸男、黒田俊一. バイオナノカプセル-リポソーム複合体の生体内ピンポイント薬剤送達への応用 *ファインケミカル*, 2013, 42, 44-49.
35. 松尾英典、良元伸男、黒田俊一. バイオナノカプセルを用いた生体内ピンポイント DDS 技術の開発. *表面*, 2013, 50, 207-218.
36. 飯嶋益巳、黒田俊一. バイオナノカプセルを用いるイムノセンシング分子の整列化技術. *バイオサイエンスとバイオインダストリー*, 2013, 71, 314-317.
37. 良元伸男、黒田俊一. バイオナノカプセル. DDS の人体・環境・ものづくりへの適用技術 (監修 中川晋作) (株)NTS, 2013, 118-126.
38. 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* 2014, 4, 4242.
39. Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, and Koike K. Specific delivery of microRNA93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA. *Oncotarget* 2014, 5, 5581-5590.
40. 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.* 2014, 117, 394-400.
41. Kuroda S. Bio-nanocapsules: Nanocarriers Harboring Virus-Derived Transfection Machinery for Use as Pinpoint Drug Delivery Systems. *Nanoparticles: Drug Inhalation Therapy – Events at Air-Blood Tissue Barrier* (Akira Tsuda & Peter Gehr, eds) Francis & Taylor, publisher CRC, 2014, 235-246.
42. Somiya M, Yamaguchi K, Liu Q, Niimi T, Maturana AD, Iijima M, Yoshimoto N, and Kuroda S. One-step scalable preparation method for non-cationic liposomes with high siRNA content. *Int J Pharm.* 2015, 490, 316-323.
43. Liu Q, Jung J, Somiya M, Iijima M, Yoshimoto N, Niimi T, Maturana AD, Shin SH, Jeong SY, Choi EK, and Kuroda S. Virosomes of hepatitis B virus envelope L proteins containing doxorubicin: synergistic enhancement of human liver-specific antitumor growth activity by radiotherapy. *Int J Nanomed.* 2015, 10, 4159-4172.
44. Somiya M, Sasaki Y, Matsuzaki T, Liu Q, Iijima M, Yoshimoto N, Niimi T, Maturana AD, and Kuroda S. Intracellular trafficking of bio-nanocapsule-liposome complex: Identification of fusogenic activity in the pre-S1 region of hepatitis B virus surface antigen L protein. *J Control Rel.* 2015, 212, 10-18.
45. Somiya M., and Kuroda, S. Development of a Virus-mimicking Nanocarrier for Drug Delivery Systems: The bio-nanocapsule. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2015, 95, 77-89.
46. 飯嶋益巳、黒田俊一. バイオナノカプセルを用いたセンシング分子整列化技術によるバイオセンシングの高感度化. *生物工学会誌*, 2015, 93, 248-258.
47. 曾宮正晴, 山口琴美, 黒田俊一. バイオナノカプセル-リポソーム複合体 (virosomes) のエンドソーム脱出機構の解明と siRNA の細胞質送達技術への応用. DDS 研究の進歩 XXIV (奥直人、山田静雄、賀川義之、板井茂、並木徳之 編集), 2015, 75-80.
48. 飯嶋益巳、黒田俊一. バイオナノカプセル. DDS キャリア作製プロトコル集 (2015) (丸山一雄 監修) CMC 出版 (東京), 2015, 118-129.
49. Yoshimoto N, Ikeda Y, Tatematsu K, Iijima M, Nakai T, Okajima T, Tanizawa K, and Kuroda S. Cytokine-dependent activation of JAK-STAT pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 2016, 113, 1796-

1804.

50. Tatematsu K, Iijima M, Yoshimoto N, Nakai T, Okajima T, and Kuroda S. Bio-nanocapsules displaying various immunoglobulins as an active targeting-based drug delivery system. *Acta Biomaterialia* 2016, 35, 238-247.
51. Iijima M, Yoshimoto N, Niimi T, Maturana AD, and Kuroda S. Bio-nanocapsule-based scaffold improves the sensitivity and ligand-binding capacity of mammalian receptors on the sensor chip. *Biotechnol. J.* 2016, 11, 805-813.
52. Liu Q, Somiya M, Shimada N, Sakamoto W, Yoshimoto N, Iijima M, Tatematsu K, Nakai T, Okajima T, Maruyama A, and Kuroda S. Mutational analysis of hepatitis B virus pre-S1 (9-24) fusogenic peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016, 474, 406-412.
53. Somiya M, Liu Q, Yoshimoto N, Iijima M, Tatematsu K, Nakai T, Okajima T, Kuroki K, Ueda K, and Kuroda S. Cellular uptake of hepatitis B virus envelope L particles is independent of sodium taurocholate cotransporting polypeptide, but dependent on heparan sulfate proteoglycan. *Virology*, 2016, 497, 23-32.
54. Takamatsu S, Shimomura M, Kamada Y, Maeda H, Sobajima T, Hikita H, Iijima M, Okamoto Y, Misaki R, Fujiyama K, Nagamori S, Kanai Y, Takehara T, Ueda K, Kuroda S, and Miyoshi E. Core-fucosylation plays a pivotal role in hepatitis B pseudo virus infection: a possible implication for HBV glyco-therapy. *Glycobiology*, 2016, 26, 1180-1189.
55. Liu Q., Somiya M., and Kuroda S. Elucidation of the early infection machinery of hepatitis B virus by using bio-nanocapsule. *World J. Gastroenterol.* 2016, 22, 8489-8496.
56. 曾宮正晴、黒田俊一. 非カチオン性リポソームによる核酸医薬送達法の可能性. *Drug Delivery Systems*, 2016, 31, 35-43.
57. 曾宮正晴、黒田俊一. バイオミミック技術による DDS ナノキャリアの開発 : B 型肝炎ウイルス感染機構に基づくバイオナノカプセルを中心に. *ファインケミカル*, 2016, 45, 18-24.
58. Iijima M., and Kuroda S. Scaffolds for oriented and close-packed immobilization of immunoglobulins. *Biosens. Bioelectronics.* 2017, 89, 810-821.
59. 曾宮正晴、黒田俊一. 非カチオン性リポソームの核酸 DDS への応用. 最新 DDS 技術の先端バイオ医薬品への応用開発—ナノ DDS、リポソーム、表面修飾、プロドラッグなどの最新技術と製剤への具体的応用— 技術情報協会, 2017, 印刷中.
60. Kouwaki T, Okamoto T, Ito A, Sugiyama Y, Yamashita K, Suzuki T, Kusakabe S, Hirano J, Fukuhara T, Yamashita A, Saito K, Okuzaki D, Watashi K, Sugiyama M, Yoshio S, Standley DM, Kanto T, Mizokami M, Moriishi K, Matsuura Y. Hepatocyte factor JMJD5 regulates HBV replication through interaction with HBx, *J Virol.* 90(7):3530-42 (2016) (\*equally contribution)
61. Yoshio S, Sugiyama M, Shoji H, Mano Y, Mita E, Okamoto T, Matsuura Y, Okuno A, Takikawa O, Mizokami M, Kanto T. Indoleamine-2, 3-dioxygenase as an effector and an indicator of protective immune responses in patients with acute hepatitis B, *Hepatology.* Jan;63(1):83-94 (2016)
62. Murata T, Noda C, Narita Y, Watanabe T, Yoshida M, Ashio K, Sato Y, Goshima F, Kanda T, Yoshiyama H, Tsurumi T, Kimura H. Induction of Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1 by transcription factors AP-2 and early B cell factor. *Journal of Virology.* 2016, 90, 3873-89.
63. Nanbo A, Kachi K, Yoshiyama H, Ohba Y. Epstein-Barr virus exploits host endocytic machinery for cell-to-cell viral transmission. *Journal of General Virology.* 2016, 97, 2989-3006.
64. Sarlak G, Htoo HH, Hernandez J-F, Rizzino A, Iizasa H, Konietzko U, Checler F, Postina R, Song W, Bruno V. Sox2 functionally interacts with beta APP, the beta APP intracellular domain and ADAM10 at a transcriptional level in human cells. *Neuroscience.* 2016, 312, 153-64.

65. Torii Y, Kawada J, Murata T, Yoshiyama H, Kimura H, Ito Y. Epstein-Barr virus infection-induced inflammasome activation in human monocytes. PLoS ONE. 2017 12(4): e0175053.
66. 吉山裕規、金廣優一、Kim Hyoji、Muchtar Amrizal、Ricardo Timmy、飯笹久. 感染に伴って起こるがん： Epstein-Barr ウイルス関連胃癌を中心に、島根医学. 2016, 36, 137-43.
67. 吉山裕規. 咽頭癌とウイルス - 分子機構 -, 口腔・咽頭科. 2016, 30, 297.
68. 飯笹久. 疾患における A-to-I RNA 編集酵素 ADAR1 の役割 (特集：DNA/RNA 編集研究の新たな眺望) . Seikagaku (日本生化学会雑誌) 2016, 88, 593-9.
69. 金廣優一、飯笹久、吉山裕規. EB ウイルス感染症 (特集：古くて新しい日和見感染症) . 臨床と微生物. 2017, 44, 69-76.
70. Nakagawa T, Moriwaki K, Terao N, Nakagawa T, Miyamoto Y, Kamada Y, Miyoshi E. Analysis of polarized secretion of fucosylated alpha-fetoprotein in HepG2 cells. J. Proteome Res. 2012, 11(5), 2798-2806.
71. Kobayashi Y, Tateno H, Dohra H, Moriwaki K, Miyoshi E, Hirabayashi J, Kawagishi H. A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. J Biol Chem. 2012, 287(41) 33973-33982.
72. Nakayama K, Moriwaki K, Imai K, Shinzaki S, Kamada Y, Murata K, Miyoshi E. Mutation of GDP-mannose-4,6-dehydratase in colorectal cancer metastasis. PLOS ONE 2013, 8(7), e70298.
73. Azuma K, Serada S, Takamatsu S, Terao N, Takeishi S, Kamada Y, Naka T, Miyoshi E. Identification of sialylated glycoproteins in Doxorubicin-treated hepatoma cells with glycoproteomic analyses. J Proteome Res. 2014, 13(11), 4869-4877.
74. Asazawa H, Kamada Y, Takeda Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kim Y, Nezu R, Kuzushita N, Mita E, Kato M, Miyoshi E. Serum fucosylated haptoglobin in chronic liver diseases as a potential biomarker of hepatocellular carcinoma development. Clin Chem Lab Med. 2015, 53(1), 95-102.
75. Sato M, Kamada Y, Takeda Y, Kida S, Ohara Y, Fujii H, Akita M, Mizutani K, Yoshida Y, Yamada M, Hougaku H, Takehara T, Miyoshi E. Fetuin-A negatively correlates with liver and vascular fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease subjects. Liver Int. 2015, 35(3), 925-935.
76. Kamada Y, Ebisutani Y, Kida S, Mizutani K, Akita M, Yamamoto A, Fujii H, Sobajima T, Terao N, Takamatsu S, Yoshida Y, Takehara T, Miyoshi E. Ectopic expression of N-acetylglucosaminyl transferase V accelerates hepatic triglyceride synthesis. Hepatol Res. 2016, 46(3), E118-129.
77. Takamatsu S, Shimomura M, Kamada Y, Maeda H, Sobajima T, Hikita H, Iijima M, Okamoto Y, Misaki R, Fujiyama K, Nakamori S, Kanai Y, Takehara T, Ueda K, Kuroda S, Miyoshi E. Core-fucosylation plays a pivotal role in hepatitis B pseudo virus infection: a possible implication for HBV glycotherapy. Glycobiology 2016, 26(11), 1180-1189.
78. Iwata A, Kamada Y, Ebisutani Y, Yamamoto A, Ueda Y, Arai H, Fujii H, Takamatsu S, Maruyama N, Maeda M, Takehara T, Miyoshi E. Establishment of mouse Mac-2 binding protein enzyme-linked immunosorbent assay and its application for mouse chronic liver disease models. Hepatol Res. 2016, in press.
79. Kamada Y, Kida S, Hirano KI, Yamaguchi S, Suzuki A, Hashimoto C, Kimura A, Sato M, Fujii H, Sobajima T, Yamamoto A, Ebisutani Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Yoshida Y, Yamada M, Nagasaka H, Takehara T, Miyoshi E. Hepatic aberrant glycosylation by N-acetylglucosaminyltransferase V accelerates HDL assembly. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2016, 311(5), G859-G868
80. Takamatsu, S., Shimomura, M., Kamada, Y., Maeda, H., Sobajima, T., Hikita, H., Iijima, M., Okamoto, Y., Misaki R, Fujiyama, K., Nagamori, S., Kanai, Y., Takehara, T., Ueda, K., Kuroda, S. and Miyoshi, E. Core-fucosylation plays a pivotal role in hepatitis B pseudo virus infection: a possible implication for HBV glycol-therapy. Glycobiology (2016) 26, 1180-1189.

81. Nakabori T, Hikita H, Murai K, Nozaki Y, Kai Y, Makino Y, Saito Y, Tanaka S, Wada H, Eguchi H, Takahashi T, Suemizu H, Sakamori R, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide inhibition efficiently blocks hepatitis B virus spread in mice with a humanized liver. *Scientific Reports*. 2016, 6: 27782.
82. Yoshio, S., Sugiyama, M., Shoji, H., Mano, Y., Mita, E., Okamoto, T., Matsuura, Y., Okuno, A., Takikawa, O., Mizokami, M., and Kanto, T. Indoleamine-2, 3-dioxygenase as an effector and an indicator of protective immune responses in patients with acute hepatitis B. *Hepatology* 2016, 90, 3530-3542.
83. Aoki, Y., Sugiyama, M., Murata, K., Yoshio, S., Kurosaki, M., Hashimoto, S., Yatsushashi, H., Nomura, H., Kang, J. H., Takeda, T., Naito, S., Kimura, T., Yamagiwa, Y., Korenaga, M., Imamura, M., Masaki, N., Izumi, N., Kage, M., Mizokami, M., and Kanto, T. Association of serum IFN-lambda3 with inflammatory and fibrosis markers in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2015, 50, 894-902.
84. Higashitani, K., Kanto, T., Kuroda, S., Yoshio, S., Matsubara, T., Kakita, N., Oze, T., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Mita, E., Imai, Y., Kasahara, A., Okuno, A., Takikawa, O., Hayashi, N. and Takehara, T. Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol*. 48 660-670(2013).
85. Aketa, H., Tatsumi, T., Kohga, K., Tsunematsu, H., Aono, S., Shimizu, S., Kodama, T., Nawa, T., Shigekawa, M., Hikita, H., Sakamori, R., Hosui, A., Miyagi, T., Hiramatsu, N., Kanto, T., Hayashi, N. and Takehara, T. The combination therapy of alpha-galactosylceramide and 5-fluorouracil showed antitumor effect synergistically against liver tumor in mice. *Int J Cancer* 133, 1126-1134, 2013.
86. Nishida, T., Hiramatsu, N., Mizuki, M., Nagatomo, I., Kida, H., Tazumi, K., Shinzaki, S., Miyazaki, M., Yakushijin, T., Tatsumi, T., Iijima, H., Kiso, S., Kanto, T., Tsujii, M. and Takehara, T. Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic. *Hepatol Res*. 43(4):339-46.2013

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Purification of RT domain of the HBV polymerase and establishment of *in vitro* polymerase assay system, ポスター, 大崎恵理子, 上田啓次. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 2015/11/22, 国内
2. High-throughput screening for inhibitors of Hepatitis B virus polymerase, ポスター, 大崎恵理子, 久松啓伍, 本田知之, 上田啓次. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内
3. The roles of a viral-L1 chimeric transcript in hepatitis B virus infection, ポスター, 本田知之, 大崎恵理子, 上田啓次, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内
4. Analysis of the HBV life cycle in a HepG2 expressing human NTCP, ポスター, Retno Rahayu, 大崎恵理子, 岡本徹, 渡士幸一, 上田啓次. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内
5. 上田啓次. HBV感染症克服へ向けたHBV研究展開-受容体の分離・同定と感染系の構築を中心に-. 第61回日本ウイルス学会学術集会. シンポジウム3 HCV・HBV. 2013年11月10-12日. 国内.
6. 斎藤伸一、上田啓次. EBV溶解感染におけるCDC25A断片化機構の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2013年11月10-12日. 国内.

7. Retno Rahayu、大崎恵理子、上田啓次. KSHV LANA localization in mitotic cells. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2013年11月10-12日. 国内.
8. 大崎恵理子、上田啓次. KSHV LANAのDNA結合領域の配列特異性の検討. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2013年11月10-12日. 国内.
9. Xin Zheng、大崎恵理子、上田啓次. KSHV感染PEL細胞で高発現するAngpt-1発現制御機構の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2013年11月10-12日. 国内.
10. Hossain Md. Golzar, Keiji Ueda. Investigation of the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) amino acid sequence affecting its immunogenicity. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 2015年11月22-24日. 国内.
11. Retno Rahayu, Eriko Osaki, Keiji Ueda. Localization analysis of KSHV LANA during mitosis. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 2015年11月22-24日. 国内.
12. Eriko Ohsaki, Keiji Ueda. Purification of RT domain of the HBV polymerase and establishment of *in vitro* polymerase assay system. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 2015年11月22-24日. 国内.
13. Hossain, Md, G., and Ueda, K. “Investigation of the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) amino acid sequence affecting its immunogenicity.” The 14<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji International Conference Center. 2015/9/8-11. 国内
14. Zheng Xin、大崎恵理子、上田啓次. “KSHV感染PEL細胞株におけるAngpt-1遺伝子発現亢進のメカニズム” 第29回ヘルペスウイルス研究会. 長崎につしょうかん. 2015年6月4-6日. 国内
15. Retno Rahayu, Eriko Ohsaki, Keiji Ueda. “Localization analysis of KSHV LANA during mitosis.” 第29回ヘルペスウイルス研究会. 長崎につしょうかん. 2015年6月4-6日. 国内.
16. Golzar Md Hossain, Keiji Ueda. “Importance of Promyelocytic Leukemia Protein on Kaposi’ s sarcoma associated herpesvirus replication.” 第64回日本ウイルス学会学術集会. 2016年10月23-25日. 国内.
17. Retno Rahayu, Eriko Osaki, Toru Okamoto, Koichi Watashi, Keiji Ueda. “Analysis of the HBV life cycle in a HepG2 expressing human NTCP.” 第64回日本ウイルス学会学術集会. 2016年10月23-25日. 国内.
18. Tomoyuki Honda, Eriko Ohsaki, Keiji Ueda. “The roles of a viral-L1 chimeric transcript in hepatitis B virus infection.” 第64回日本ウイルス学会学術集会. 2016年10月23-25日. 国内.
19. Ohsaki, E., Ueda, K. High-throughput screening for inhibitors of Hepatitis B virus polymerase.” 第64回日本ウイルス学会学術集会. 2016年10月23-25日. 国内.
20. Harutaka Katano, Madori Osawa, Sohtaro Mine, Shinichiro Ohta, Kengo Kato, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Hitomi Fukumoto, Yuko Sato, Takayuki Kannno, Hideki Hasegawa, Keiji Ueda, Nsashi Fukuyama, Takuya Maeda, Soichiro Kanoh, Akihiko Kawana, Yuji Fujikura. “Establishing and characterizing a new primary effusion lymphoma cell line harboring Kaposi’ s sarcoma associated herpesvirus.” 第64回日本ウイルス学会学術集会. 2016年10月23-25日. 国内.
21. CDK9 inhibitor FIT-039 suppresses HBV propagation. Moriishi K, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Chen W, Okamoto T, Ueda K, Hosaya T, Matsuura Y, Ryo A, Tanaka Y, Hagiwara M. 口頭、第64回日本ウイルス学会総会、2016/10/24、国内

22. Anti-HBV activity of Coptidis rhizome alkaloids via targeting the viral core promoter. Yamashita A, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Moriishi K, 口頭、第 64 回日本ウイルス学会総会、2016/10/24、国内
23. Establishment of highly HBV-permissible HepG2 cell line to facilitate screening of antiviral compounds. Otoguro T, Tanaka T, Chen W, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Moriishi K, ポスター 第 64 回日本ウイルス学会総会、2016/10/24、国内
24. Inhibition of HBV propagation by treatment with CDK9 inhibitor FIT-039, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Chen W, Okamoto T, Ueda K, Hosaya T, Matsuura Y, Ryo A, Tanaka Y, Hagiwara M and Kohji Moriishi, ポスター、2016 International HBV meeting, 2016/9/21-24, Yonsei, 国外
25. Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection. ポスター Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, and Moriishi K, 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, 2014, 9. 3- 6. 国外.
26. Metachromin A, sesquiterpene from marine sponge *Dactylospongia metachromia*, exerts anti-HBV activity via inhibition of HBV core promoter. Yamashita A, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Watashi K, Wakita T, Baba M, Tamaki M, Tanaka J, Moriishi K, 口頭、2015、第 63 回日本ウイルス学会、2016/11、/22-24, 国内
27. 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、ポスター、山下篤哉、藤本雄介、田中智久、葛西宏威、児玉栄一、渡士幸一、脇田隆字、前川伸哉、榎本信幸、田中 淳一、森石恆司、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、国内
28. HBV 感染による細胞内脂肪滴形成への影響、ポスター、安本順、葛西宏威、土橋香織、渡士幸一、脇田隆字、田中智久、山下篤哉、森石恆司、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、国内
29. 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、口頭、土橋香織、葛西宏威、田中智久、陳文家、渡士幸一、脇田隆字、山下篤哉、梁明秀、岡本徹、松浦善治、森石恆司、2014 年 11 月 10 日～12 日、国内
30. Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection, 口頭 Moriishi K, The 2nd Japan-Italy Liver Workshop: “Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: Molecular Basis and Clinical Links” 2014. 11. 18-19. 国内
31. B 型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の超微形態変化の解析、ポスター、安本順、葛西宏威、吉村健太郎、山下篤哉、田中智久、竹田扇、森石恆司、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、国内.
32. iPS 細胞より分化誘導した肝細胞と HBV 感染、ポスター、黒木和之、志村瞳、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015/11/22-24、国内
33. B 型肝炎ウイルス感染の分子基盤、口頭、黒木和之、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」、2014/7/3-4
34. HBV ベクターの構築、ポスター、黒木和之、久保周子、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013/11/10-12、国内
35. Inhibition of the activity of DHBV core promoter by Retinoid-related orphan receptor · · (ROR · ·)、ポスター、黒木和之、石川隆、第 35 回日本分子生物学会年会、2012/12/11-14、

国内

36. ピロリ菌感染はEBウイルスの胃上皮細胞における感染増殖を活性化する, 口頭, 飯俣久, Timmy Richardo, 金廣優一, Hyoji Kim, 溝手朝子, 吉山裕規, 第89回日本細菌学会, ワークショップ13: Bacteria meet viral infection, 2016/3/23-25, 国内.
37. The regulatory region in the promoter for Epstein-Barr virus encoded BART microRNAs, 口頭, Hyoji Kim, Hisashi Iizasa, Yuichi Kanehiro, Timmy Richardo, Hironori Yoshiyama, ワークショップ Herpesviruses(6)W3-4-02, 第64回日本ウイルス学会, 2016/10/23-25, 国内.
38. Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART6 regulates viral latency and induces epithelial-mesenchymal transition, Hisashi Iizasa, Hyoji Kim, Hironori Yoshiyama, ポスター, 'Gordon Research Conference, Nasopharyngeal Carcinoma', 2016/6/26-7/1, 国外.
39. EBV infection induces APOBEC3-dependent mitochondrial DNA mutation in epithelial cells, Yuichi Kanehiro, Timmy Richardo, Hyoji Kim, Hisashi Iizasa, Hironori Yoshiyama, 口頭, 17<sup>th</sup> International Symposium on EBV and associated diseases, 2016/8/8-12, 国外.
40. 第104回日本泌尿器科学会 フロンティア企画シンポジウム「泌尿器科疾患における糖鎖生物学の未来を探る」臨床医学融合研究としての糖鎖生物学黎明期の始まり, 口頭発表, 三善英知, 仙台国際センター, 平成28年4月24日, 国内.
41. 2. 第52回日本肝臓学会総会 WS 糖鎖バイオマーカーを使った Ballooning Hepatocyte の予測診断, 口頭発表, 鎌田佳宏、竹原徹郎、三善英知, ホテルニューオータニ幕張, 平成28年5月20日, 国内.
42. 3. 第52回日本肝臓学会総会 がん化に関わるコアフコースは、肝細胞の脂質代謝を劇的に変化させる, 口頭発表, 山本晃子、鎌田佳宏、戎谷友佑、藤井宏修、若松可奈、高松真二、吉田雄一、竹原徹郎、三善英知, ホテルニューオータニ幕張, 平成28年5月19-20日, 国内.
43. 4. 第35回日本糖質学会年会 細胞表面糖鎖を標的としたB型肝炎ウイルスの糖鎖治療の可能性,
44. ポスター発表, 前田晴香、下村真由香、高松真二、傍嶋智明、鎌田佳宏、黒田俊一、三善英知,
45. 高知市文化プラザかるぽーと, 平成28年9月2日, 国内.
46. 5. 第41回日本肝臓学会東部会シンポジウム NAFLDの病態解明-benchから臨床へ～コアフコースを標的とした糖鎖治療法開発の基礎的検討～, 口頭発表, 鎌田佳宏、竹原徹郎、三善英知, 京王プラザホテル, 平成28年12月8日, 国内.
47. 6. 第7回グライコバイオロジクス研究会 疾患糖鎖の解析から糖鎖治療開発へ, 口頭発表, 三善英知, 大阪大学銀杏会館, 平成28年10月25日, 国内.
49. 7. AASLD meeting (アメリカ肝臓学会) An impact of cellular core-fucosylation in hepatitis B virus infection into hepatoma cell lines, 口頭発表, Takamatsu S, Shimomiura M, Kamada Y, Maeda H, Sobajima T, Hikita H, Iijima M, Okamoto Y, Misaki R, Fujiyama K, Takehara T, Ueda K, Kuroda S, Miyoshi E, San Francisco, USA サンフランシスコモスコムコンベンションセンタ, 2015年11月16日, 国外.
50. 8. 第51回肝臓学会総会 WS グライコム解析による肝癌幹細胞の糖鎖標的分子の同定と糖鎖治療の可能性についての検討, 口頭発表, 三善英知、東加奈子、世良田聡、寺尾尚子、高松真二、鎌田佳宏、仲 哲治、黒田俊一, 熊本日航ホテル/キャッスルホテル, 平成27年5月22日, 国内.
51. 9. BMB2015 (第38回日本分子生物学会、第88回日本生化学会合同大会) コアフコースを介し

- た T 細胞の活性化制御による新しい炎症性腸疾患の発症機構, ポスター発表, 藤井宏修、新崎信一郎、飯島英樹、若松可奈、傍嶋智明、桑原隆亮、高松真二、辻井正彦、谷口直之、竹原徹郎、三善英知, 神戸国際展示場, 平成 27 年 12 月 2 日, 国内.
52. 10. 第 73 回日本癌学会学術総会 HBV 感染における細胞表面上の糖鎖の関与, ポスター発表, 下村真由香、佐々木夢香、前田晴香、寺尾尚子、高松真二、鎌田佳宏、飯島益巳、疋田隼人、竹原徹郎、黒田俊一、三善英知, パシフィコ横浜, 平成 26 年 9 月 27 日, 国内.
53. 11. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会 糖鎖改変肝がん細胞における HBV の発現の変化, 口頭発表, 上田真樹子、高松真二、寺尾尚子、傍嶋智明、鎌田佳宏、三善英知, 福岡国際会議場, 平成 26 年 11 月 24 日, 国内.
54. 12. 第 8 回臨床検査学教育学会 コアフコース認識レクチン PhoSL を用いた新規腫瘍マーカー測定法の開発, 口頭発表, 下村真由香、中山小太郎純友、寺尾尚子、小林夕香、中堅三弥子、鎌田佳宏、村田幸平、三善英知, 大阪大学, 平成 25 年 8 月 28 日, 国内.
55. 「Upregulation of sialylated N-glycan expression in human hepatoblastoma cell line expressing hepatitis B virus」口頭, Surya Agung Priyambada, 三崎 亮, 岡本 徹, 岡本 雄太, 大橋 貴生, 松浦 善治, 藤山 和仁, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月, 国内
56. 「肝細胞における N-結合型糖鎖と B 型肝炎ウイルス感染効率の関係性解明」口頭, 中谷 漱志, 三崎 亮, 岡本 徹, Surya Agung Priyambada, 大橋 貴生, 松浦 善治, 藤山 和仁, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月, 国内
57. 「Cell surface N-linked glycan alteration in HepAD38 cell lines expressing hepatitis B virus」, ポスター, Surya Agung Priyambada, 三崎 亮, 岡本 徹, 岡本 雄太, 大橋 貴生, 松浦 善治, 藤山 和仁, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月, 国内
58. 「B 型肝炎ウイルスの感染は肝細胞膜糖タンパク質糖鎖構造を変化させる」ポスター, 岡本 雄太, 三崎 亮, 下村 真由香, 高松 真二, 大橋 貴生, 三善 英知, 藤山 和仁, 第 67 回生物工学会、2015 年 10 月, 国内
59. 「エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを用いた B 型肝炎ウイルス様粒子の糖鎖構造改変」, 口頭, 岡本 雄太, 三崎 亮, 飯嶋 益己, 大橋 貴生, 黒田 俊一, 藤山 和仁, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月, 国内
60. B 型慢性肝炎患者における骨髄由来抑制性免疫細胞 (MDSC) の役割 ポスター 巽 智秀、大西 良輝、西尾 啓、青野悟志、俵 誠一、板倉史晃、吉岡鉄平、向井香織、西尾公美子、疋田隼人、阪森亮太郎、宮城琢也、平松直樹、竹原徹郎 JDDW2014 (第 22 回日本消化器関連学会週間、第 18 回肝臓学会大会) 2014/10/23 国内.
61. Yoshio S, Sugiyama M, Shoji H, Mano Y, Doi H, Eiji M, Keiko K, Hoshi Y, Uchida S, Mizokami M, Tanaka J, Kanto T. Linkage of sequential chemokine activation to HBV eradication after primary exposure: comprehensive analysis from the window period to the clearance in the blood donor, patients and chimpanzees. The Liver Meeting 2016: The 67<sup>th</sup> Annual Meeting of AASLD. Boston, U.S.A, November, 2016. (Oral)
62. Yoshio S, Sugiyama M, Fukuhara T, Matsuura Y, Mizokami M, Kanto T. Human BDCA3+DCs utilize IFN-λ for inducing intrahepatic anti-viral ISGs and stimulating bystander Immune cells in HCV Infection. 23<sup>rd</sup> International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses. Kyoto, Japan, October 2016. (Oral)
63. Yoshio, S., Sugiyama, M., Shoji H, Mano Y, Aoki Y., Okamoto T., Matsuura Y., Mizokami, M., and Kanto, T. Indoleamine-2,3-dioxygenase as the intrinsic anti-HBV effector that



leads to durable immune responses in patients with acute hepatitis B; A comparative analysis with the sequence in hepatic flare. (poster) The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), 66<sup>th</sup> Annual Meeting and Postgraduate Course, San Francisco, USA Nov 13-17, 2015

64. Kanto T, Yoshio S, Sugiyama M, Mizokami M. Natural killer cells as immunological sentinels against HBV infection. The 2<sup>nd</sup> Japan-Italy Liver workshop, Hepatitis, setatosis and hepatocellular carcinoma: molecular basis and clinical links. Hiroshima, Japan, 2014.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. テレビ大阪 「願いがかなうまで2 悪いのは、私じゃない。～完全再現！ B型肝炎裁判の真実～」 2016年3月13日(日)午後2時～(録画)に抗HBV剤開発者として出演 国内

(4) 特許出願

日本：特願 2012-80791 号 (日本国特許 5458286 号)

日本：特願 2014-170680 号

日本：特願 2017-54937 号

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 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)  
(英語) Program on the Innovative Development and the Application of  
New Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語)

研究開発担当者 (日本語) 山梨大学大学院総合研究部 教授 森石恆司

所属 役職 氏名： (英語) Kohji Moriishi, Professor, Graduate Faculty of Interdisciplinary  
Research, University of Yamanashi

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究

開発課題名： (日本語) HBV 受容体発現細胞株の樹立と感染初期過程を標的にした抗ウイルス剤探索  
(英語) Establishment of HBV-infectious cell culture system and identification  
of antiviral targeting the early step of HBV infection cycle.

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

森石恆司教授 (山梨大学) らは、HBV 感染培養系を確立し、いくつかの抗 HBV 剤を同定した。樹立した NTCP 発現 HepG2 細胞株をもとに、Trypsin EDTA 処理による HBV 高感染性培養細胞感染法を確立した。その HBV 感染培養細胞系を用いて、抗 HBV 剤探索を行い、新規抗 HBV 化合物を同定を試みた。胆汁酸取り込み阻害をもつジギタリス類化合物で抗 HBV 活性を検討したところ、Proscillaridin A に非常に高い抗 HBV 活性が認められた (EC50 = 7.2 nM、SI 値 75.5)。その標的機構を解析したところ接着後の感染初期過程が Proscillaridin A の標的となっていることが示唆された。更に、DNA ウイルス複製に阻害活性がある CDK 阻害剤 FIT-039 の抗 HBV 活性を検討したところ、FIT-039 に抗 HBV 活性が認められ、ウイルス接着以降の感染初期過程が主に標的になっていると思われた。さらに、FIT-039 は cccDNA 量および抗原量を低下させることも分かった。ヒト肝臓キメラマウスで抗 HBV 活性を in vivo で検討したところ、エンテカビル抗 HBV 活性を増強した。以上の結果から、高感染性を示す感染培養細胞系が確立され、同定した新規抗 HBV 化合物から高い抗 HBV 活性を示す新規抗 HBV 化合物展開が期待された。これらの結果は新規予防治療法開発に繋がると思われる。

Professor Kohji Moriishi (University of Yamanashi) and colleagues established HBV-infectious cell culture system and identified several anti-HBV agents. NTCP-expressing HepG2 cell lines were established by using suspended cells and employed for screening of digitalis analogues to identify anti-HBV agents. Proscillaridin A exhibited an EC50 value of 7.2 nM and an SI value of 75.5 as a highest antiviral activity, compared to other compounds used in this study. Furthermore, CDK9-inhibitor FIT039, which is known as an antiviral against DNA viruses, exhibited antiviral effect on HBV infection and probably targeted early steps of HBV infection. The amount of cccDNA was decreased by treatment with FIT-039. Eventually, FIT039 significantly potentiated in vivo antiviral effect of entecavir in human liver-chimeric mice. This study provided the novel HBV-infectious cell culture system for drug screening to identify anti-HBV agents and demonstrated several novel anti-HBV agents, which will contribute to development of effective therapy and effective antivirals and to prevention against hepatitis B.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 件、国際誌 件)  
五年間分

1. Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Murakami S, Chen W, Okamoto T, Ueda K, Hosoya T, Matsuura Y, Ryo A, Tanaka Y, Hagiwara M, Moriishi K: Inhibitory effect of CDK9 inhibitor FIT-039 on hepatitis B virus propagation. *Antiviral Res*, 133: 156-164, 2016
2. Kouwaki T, Okamoto T, Ito A, Sugiyama Y, Yamashita K, Suzuki T, Kusakabe S, Hirano J, Fukuhara T, Yamashita A, Saito K, Okuzaki D, Watashi K, Sugiyama M, Yoshio S, Standley DM, Kanto T, Mizokami M, Moriishi K, Matsuura Y: Hepatocyte Factor JMJD5 Regulates Hepatitis B Virus Replication through Interaction with HBx. *Journal of Virology*, 90: 3530-3542, 2016
3. Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, Yamashita A, Yasumoto J, Chen W, Okamoto T, Maekawa S, Watashi K, Wakita T, Ryo A, Suzuki T, Matsuura Y, Enomoto N, Moriishi K: Hepatitis B virus efficiently infects non-adherent hepatoma cells via human sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Sci. Rep.* 5:17047, 2015
4. Yamashita A, Fujimoto Y, Tamaki M, Setiawan A, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Watashi K, Wakita T, Toyama M, Baba M, de Voogd NJ, Maekawa S, Enomoto N, Tanaka J, Moriishi K: Identification of antiviral agents targeting hepatitis B virus promoter from extracts of Indonesian marine organisms by a novel cell-based screening assay. *Mar. Drug.* 13:6759-6773. 2015.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

五年間分

1. CDK9 inhibitor FIT-039 suppresses HBV propagation. Moriishi K, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Chen W, Okamoto T, Ueda K, Hosaya T, Matsuura Y, Ryo A, Tanaka Y, Hagiwara M. 口頭、第 64 回日本ウイルス学会総会、2016/10/24、国内
2. Anti-HBV activity of Coptidis rhizome alkaloids via targeting the viral core promoter. Yamashita A, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Moriishi K, 口頭、第 64 回日本ウイルス学会総会、2016/10/24、国内
3. Establishment of highly HBV-permissible HepG2 cell line to facilitate screening of antiviral compounds. Otaguro T, Tanaka T, Chen W, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Moriishi K. ポスター 第 64 回日本ウイルス学会総会、2016/10/24、国内
4. Inhibition of HBV propagation by treatment with CDK9 inhibitor FIT-039. Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Chen W, Okamoto T, Ueda K, Hosaya T, Matsuura Y, Ryo A, Tanaka Y, Hagiwara M and Kohji Moriishi. ポスター、2016 International HBV meeting, 2016/9/21-24, Yonsei, 国外
5. Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection. ポスター Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, and Moriishi K, 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, 2014, 9. 3- 6. 国外.
6. Metachromin A, sesquiterpene from marine sponge *Dactylospongia metachromia*, exerts anti-HBV activity via inhibition of HBV core promoter. Yamashita A, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Watashi K, Wakita T, Baba M, Tamaki M, Tanaka J, Moriishi K, 口頭、2015、第 63 回日本ウイルス学会、2016/11、/22-24, 国内
7. 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、ポスター、山下篤哉、藤本雄介、田中智久、葛西宏威、児玉栄一、渡士幸一、脇田隆字、前川伸哉、榎本信幸、田中 淳一、森石恆司、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、国内
8. HBV 感染による細胞内脂肪滴形成への影響、ポスター、安本順、葛西宏威、土橋香織、渡士幸一、脇田隆字、田中智久、山下篤哉、森石恆司、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、国内
9. 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、口頭、土橋香織、葛西宏威、田中智久、陳文家、渡士幸一、脇田隆字、山下篤哉、梁明秀、岡本徹、松浦善治、森石恆司、2014 年 11 月 10 日～12 日、国内
10. Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection, 口頭 Moriishi K, The 2nd Japan-Italy Liver Workshop: “Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: Molecular Basis and Clinical Links” 2014.11.18-19. 国内
11. B 型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の超微形態変化の解析、ポスター、安本順、葛西宏威、吉村健太郎、山下篤哉、田中智久、竹田扇、森石恆司、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
特にございませぬ。

(4) 特許出願  
特にございませぬ。