

## B型肝炎ウイルスの複製に対する宿主免疫応答の影響

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

**研究要旨：** B型肝炎に対するインターフェロン (IFN)治療の奏効率は低い。また、標準治療薬である逆転写酵素阻害剤は、核内に存在する cccDNA には影響しないことから根治は難しく、発癌のリスクも持続する。従って、B型肝炎ウイルス (HBV)の感染を根治するには、免疫応答に関わる新たな宿主因子の同定とその分子を標的とした創薬が必要である。本研究では、HBV コア蛋白質と相互作用する宿主因子を質量分析法で 22 種類同定し、それらの因子をノックダウンした肝癌細胞株 (HepG2)を樹立し、IFN 応答と HBV の複製に関与する宿主因子を探索した。また Natural Killer (NK)細胞は自然免疫系において重要な働きを担っているが、HBV 複製細胞株と健常人末梢血由来の NK 細胞を共培養することによって、HBV 感染では樹状細胞を介さずに NK 細胞の活性化が抑制されていることが示唆された。

### A. 研究目的

HBV は肝癌を発症するウイルスであり、世界では 4 億人もの感染者が存在する。B型肝炎に対する IFN 治療の奏効率は低く、さらに、標準治療である逆転写酵素阻害剤は、核内に存在する cccDNA には影響しないことから根治は難しい。そのため、HBV 感染を根治するには、免疫応答に関わる新たな宿主因子の同定と、それらの分子を標的とした創薬が重要である。現行療法で HBV の排除が困難な原因としては、HBV による宿主自然免疫応答の回避機構の存在が考えられる。本研究では、HBV コア蛋白質と相互作用し IFN 応答とウイルス複製に関与する宿主因子の同定と、HBV 感染における NK 細胞の抑制化機構の解明を目的とした。

### B. 研究方法

HepG2 細胞と HBV が複製している HepG2.2.15 細胞を IFN $\alpha$  で処理し、IFN 応答遺伝子 (ISG15, MxA) の発現を PCR 法で定量した。HBV コア蛋白質を強制発現させた 293T 細胞を質量分析法で解析し、HBV コア蛋白質と相互作用する宿主因子を同定した。これらの宿主因子を shRNA でノックダウンした HepG2 細胞株を樹立し、各細胞株に 1.28 倍長の HBV-DNA を導入して、IFN 応答やゲノム複製への影響を検討した。

健常人から採取した NK 細胞を HepG2 細胞、Huh7 細胞、および HBV 複製細胞株である

HepG2.2.15 細胞、T23 細胞、YE12 細胞と共培養後、IFN $\alpha$  (500U/ml) で刺激し、上清中の IFN $\gamma$  を ELISA 法で定量した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存する。

### C. 研究結果

HepG2.2.15 細胞において、IFN 刺激後の ISG15/MxA の発現が HepG2 細胞に比して抑制されていた。質量分析法で同定された、HBV コア蛋白質と相互作用する 22 種の宿主因子のうち、KAP0、TIF1B、FUCA2 をノックダウンした HepG2 細胞では、IFN 刺激後の MxA の発現がコントロール細胞に比べて亢進しており、特に FUCA2 ノックダウン細胞では、1.28 倍長 HBV-DNA 導入後の上清中ゲノム量が低下していた。HepG2 細胞や Huh7 細胞と共培養した NK 細胞に比べて、HBV 複製細胞株である HepG2.2.15 細胞、T23 細胞、および YE12 細胞と共培養した NK 細胞は、IFN $\gamma$  産生能が低下していた。1.28 倍長 HBV-DNA 導入後の HepG2 細胞においても同様の結果であったが、HBV の各蛋白質を個別に導入した HepG2 細胞との共培養では

NK 細胞の活性化抑制は認められなかった。HepG2.2.15 細胞、T23 細胞、および YE12 細胞の培養上清で NK 細胞を培養しても、同様に IFN $\gamma$  産生能の低下が認められた。

#### D. 考察

HBV コア蛋白質が宿主因子を介して IFN 応答を抑制している可能性が示唆された。今後は、HBV の複製細胞株である HepG2.2.15 細胞でも同様に、コア蛋白質と相互作用する各因子のノックダウン細胞株を樹立し、結果の再現性を確認する。また、Taqman array 法を用いて、HBV 感染時に NK 細胞活性を抑制する宿主因子の同定を進める。これらの宿主因子が、宿主免疫応答を賦活化し HBV 排除へとつながる新たな創薬のターゲットと成り得るか否かの検討を、今後更に進めて行く予定である。

#### E. 結論

HBV コア蛋白質の発現や HBV の感染によって、宿主因子を介した宿主自然免疫応答の回避機構の存在が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J. Virol.*, 2013, 87, 489-502.
- 2 Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, and Matsuura Y. Expression of miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with HCV. *J. Virol.*, 2012, 86, 7918-7933.
- 3 Abe T, Fukuhara T, Wen X, Ninomiya A, Moriishi K, Maehara Y, Takeuchi O, Kawai T, Akira S, and Matsuura Y. CD44 participates in the IP-10 induction in cells replicating HCV RNA through an interaction with TLR2 and hyaluronan. *J. Virol.*, 2012, 86, 6159-6170.

- 4 Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. *J. Virol.* 2012, 86, 1382-1393.
- 5 Fukuhara T, and Matsuura Y. Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection. *J. Gastroenterol.*, 2012, doi:10.1007/s00535-012-0661-5.
- 6 Moriishi K, and Matsuura Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.*, 2012, 3, 54, doi:10.3389/fmicb.2012.00054.
- 7 Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, and Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology*, 2012, 432, 29-38.
- 8 Kobayashi F, Yamada S, Taguwa S, Kataoka C, Naito S, Hama Y, Tani H, Matsuura Y, and Sugahara K. Specific interaction of the envelope glycoproteins E1 and E2 with liver heparan sulfate involved in the tissue tropism infection by hepatitis C virus. *Glycoconj. J.*, 2012, 29, 211-220.
- 9 Tripathi L.P, Kambara H, Moriishi K, Morita E, Abe T, Mori Y, Chen Y.A, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28 $\gamma$  Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study. *J. Proteome Res.*, 2012, 11, 3664-3679.
- 10 Kondo M, Moriishi K, Wada H, Noda T, Marubashi S, Wakasa K, Matsuura Y, Doki Y, Mori M, and Nagano H. Upregulation of nuclear PA28 $\gamma$  expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Exp. Ther. Med.*, 2012, 3, 379-385.

##### 2. 学会発表

- 1 松浦善治、C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関する宿主因子第132回日本薬学会年会、札幌、3月28-30日、2012
- 2 Yoshiharu Matsuura, Expression of miR122 and lipid metabolism determine the cell

- tropism of hepatitis C virus, 7th International Virus Assembly Symposium, Menorca, May, 13-17, 2012.
- 3 松浦善治、C型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略〜HCVの増殖を制御する宿主側因子について〜: 第48回日本肝臓学会総会、金沢、6月7-8日, 2012
  - 4 Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Yoshiharu Matsuura, miR122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of hepatitis C virus infection. The American Society for Virology, 31st Annual Meeting, University of Wisconsin-Madison, Madison, July 21-25, 2012.
  - 5 Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of mouse liver cell lines susceptible to hepatitis C virus infection, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
  - 6 Mai Shiokawa, Takasuke Fukuhara, Chikako Ono, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of human liver-specific factors in a complete propagation of hepatitis C virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
  - 7 Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
  - 8 Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Masaru Arimoto, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura. miR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of HCV infection. 19th International Meeting on HCV and Related Viruses, Venice, October, 5-9, 2012.
  - 9 Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus, The 34<sup>th</sup> Naito Conference, 札幌、10月16日-19日, 2012
  - 10 Yoshiharu Matsuura: Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, The 34<sup>th</sup> Naito Conference, 札幌, 10月16日-19日, 2012
  - 11 塩川 舞、福原崇介、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生に關与するヒト肝臓特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
  - 12 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本 徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臓細胞株の樹立、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
  - 13 福原崇介、塩川 舞、小野慎子、山本聡美、寒原裕登、加藤大志、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、C型肝炎ウイルスの細胞親和性はmiR-122の発現と脂質代謝系によって規定される、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
  - 14 加藤大志、岡本 徹、福原崇介、寒原裕登、森田英嗣、森 嘉生、神谷 亘、松浦善治、日本脳炎ウイルスコアタンパク質による Stress Granule 抑制機構の解析、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
  - 15 松田麻未、鈴木亮介、渡士幸一、相崎英樹、松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆字、C型肝炎ウイルスの一過性感染性粒子を用いた細胞内侵入機構の解析、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
  - 16 Yoshiharu Matsuura, miR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of hepatitis C virus infection: The 10th JSH Single Topic Conference, 東京, 11月21-22日, 2012.
  - 17 Kowaki T, Ngoc PH, Fukuhara T, Okamoto T, Matsuura Y, Identification of host factors interact with hepatitis B virus X protein. 第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
  - 18 塩川 舞、福原崇介、小野慎子、岡本 徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生に關与するヒト肝臓特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
  - 19 福原崇介、本村貴志、塩川 舞、小野慎子、寒原裕登、岡本 徹、調 憲、前原喜彦、松浦善治、C型肝炎ウイルスの細胞親和性における Quasispecies の意義、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
  - 20 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本 徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスに感受性を示

すマウス肝臓細胞株の樹立、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月 11 日-14 日, 2012

- 21 葛西宏威、河上國洋、平田有佳理、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、岡本 徹、松浦善治、楠木正己、森石恆司、HCV 複製に関わる新規宿主因子 FKBP6 : FKBP6 は NS5A と結合し HCV 複製を制御する、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月 11 日-14 日, 2012

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

*in vitro*、*in vivo* HBV 感染・複製系を用いたヒト肝細胞内免疫応答の解析

分担研究者 柘植 雅貴 広島大学自然科学研究支援開発センター

研究要旨：

HBV は、特定の動物にしか感染しないことから、モデル動物を使用した研究は困難であった。近年、ヒト肝細胞キメラマウスが開発され、HBV の持続感染動物モデルの作製が可能となった。本研究では、同マウスモデルを使用し、マウス肝に生着したヒト肝細胞の遺伝子発現解析を行い、HBV がヒトの生体内でどのように免疫寛容を誘導し、持続感染を成立させるメカニズムを検討する。現在、HBV 感染 3 日後、10 日後、8 週後の HBV 感染キメラマウスを作製し、マウス肝臓内のヒト肝細胞を採取。採取したヒト肝細胞内の total RNA を抽出した後、シーケンス用ライブラリーを作製。現在、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析を進行中である。今後、遺伝子発現プロファイルより抽出された HBV の感染時期によって影響を受ける遺伝子群を解析し、HBV の持続感染メカニズムを明らかにするとともに、持続感染を阻害する物質の探索を行う予定である。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) は、ヒトやチンパンジーといった限られた動物種にのみ感染することから、*in vitro*、*in vivo* における HBV の感染・複製のメカニズムを解析することは困難であった。2001 年以降、マウスの肝臓が高度にヒト肝細胞へと置換されたヒト肝細胞キメラマウスが開発され、当大学においても、より高度にヒト肝細胞へと置換されたキメラマウスが開発された。当研究室では、HBV 感染患者血清から HBV 発現プラスミドをクローニングし、そのプラスミドを培養細胞に遺伝子導入することによって HBV 発現細胞株 (*in vitro* HBV 複製系) を樹立するとともに、理学部との共同研究により、ヒト肝細胞キメラマウスに HBV を感染させることによって、*in vivo* HBV 感染・複製系を構築した。さらに、90% 以上のマウス肝組織がヒト肝細胞に置換されたキメラマウスを用いることにより、HBV 感染が直接的にヒト肝細胞に及ぼす影響について、cDNA microarray を用いた解析を行ってきた。

本研究では、HBV が感染した後に起こる肝細胞内の遺伝子変化を解析し、HBV が免疫寛

容を獲得し、持続感染を生じるメカニズムを解析する。さらに、この免疫寛容のメカニズムを阻害することによる肝細胞からの HBV 排除を目指した治療法を探索する。

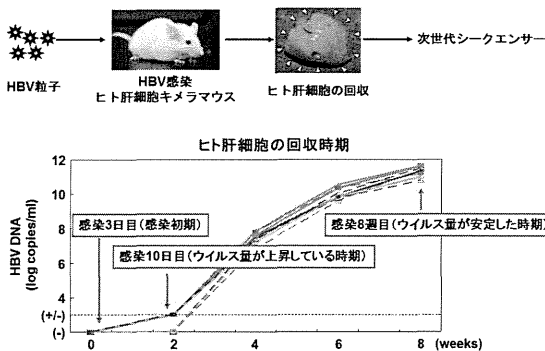
B. 研究方法

① HBV 感染マウスの作製

90% 以上のマウス肝組織がヒト肝細胞に置換されたキメラマウスに HBV genotype C 感染患者血清を接種し、HBV 感染マウスを作製した (各群 N=5)。HBV のキメラマウスへの感染を確認するため、患者血清接種後、1~2 週おきにマウス血清中の HBV DNA を測定し、HBV の感染を確認した。

本研究では、時間経過に伴うヒト肝細胞内の遺伝子発現の変化を観察することが目的であることから、図 1 の如く、感染 3 日後、10 日後、8 週後に HBV 感染マウスを sacrifice し、マウス肝組織を採取した。コントロールとして、HBV 非感染マウスの肝組織を使用した (N=5)。

図1. 本研究のプロトコール



② ヒト肝細胞からの total RNA 抽出と遺伝子発現解析

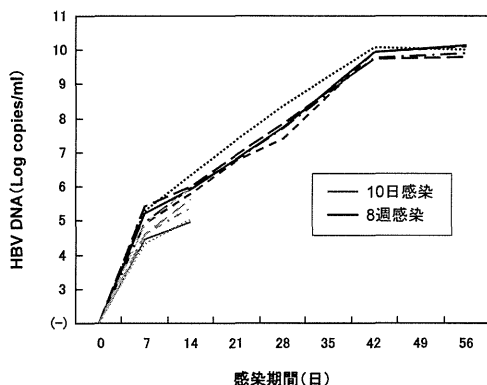
各感染期間が終了し、採取されたマウス肝臓内のヒト肝細胞から、マッハライ・ナーゲル社 NucleoSpin RNA II にて total RNA を抽出。その後、mRNA の網羅的解析を行うため、ペアエンド法を用いた次世代シーケンサー (HiSeq2000) によるシーケンス解析を開始した。

C. 研究結果

③ HBV 感染マウスの作製

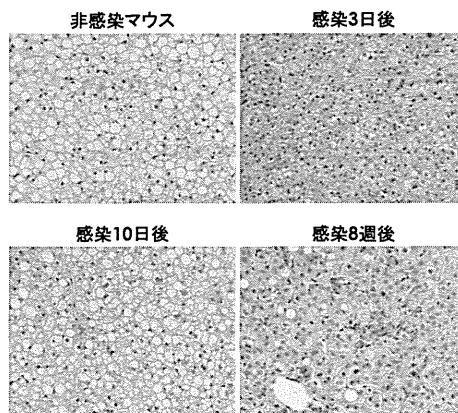
ヒト肝細胞キメラマウスに HBV 感染患者血清を接種後、感染 3 日後、10 日後に HBV 感染マウスを sacrifice し、マウス肝臓を採取した。また、感染 10 日後、感染 8 週後に肝臓を採取するマウスに関しては、患者血清接種後、1~2 週おきにマウス血清中の HBV DNA を測定した結果、図 2 の如く、感染 10 日後のマウスでは血清中の HBV DNA 量は 5 Log copies/ml 程度に、感染 8 週後では 10 Log copies/ml 前後にまで上昇し、キメラマウスへの HBV 感染が確認された。

図2. HBV 感染キメラマウスにおける血中 HBV DNA 量の変化



また、採取したマウス肝臓の一部を用いて、ヒト肝細胞内の HBc 抗原の発現について検討した。その結果、感染 3 日目の組織では明らかな HBc 発現は確認できなかったが、10 日目の組織ではわずかながら HBc 発現が認められ、感染 8 週目にはほとんどすべてのヒト肝細胞において HBc の発現が認められた。

図3. キメラマウス肝臓内におけるHBc抗原の発現



④ ヒト肝細胞からの total RNA 抽出と遺伝子発現解析

採取したマウス肝臓内のヒト肝細胞から、total RNA を抽出。Nanodrop および Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて RNA の濃度および純度を検討したところ、468~1573ng/μl の total RNA の回収が確認でき、またその純度も良好であった。さらに、電気泳動にてサンプルの品質を確認した後、シーケンスライブラリーを作製。現在、HiSeq2000 (Illumina 社) にてシーケンス解析中である。

D. 考察

臨床現場において、インターフェロン治療により、ヒト血清中の HBV DNA 量は減少し、肝炎が鎮静化することが知られているが、そのインターフェロンによる抗ウイルス効果は十分とは言えない。これは、HBV 感染に伴い、ヒトの生体内における免疫応答が阻害され、免疫寛容が誘導されることが原因の一つと考

えられる。これまでに当研究室で行ってきた検討結果では、高度な免疫不全状態にあるヒト肝細胞キメラマウスに生着したヒト肝細胞内において、HBV 感染に伴い、インターフェロン投与に対する反応性が著しく低下することが明らかとなっている。つまり、HBV が自然免疫に対し、抑制的に働き、生体内におけるウイルス排除機構を回避しているものと推察される。そこで、本研究では、HBV 感染早期からのヒト肝細胞内の遺伝子発現を経時的に観察することにより、HBV が免疫寛容状態を獲得するメカニズムを解明できる可能性がある。B 型慢性肝炎において、免疫寛容状態に強く関与している遺伝子の発現をコントロールすることで、免疫寛容状態を脱却し、生体内における HBV 排除機構を活性化できる可能性があり、自然免疫を標的とした新たな B 型慢性肝炎治療戦略の構築が期待できる。

## E. 結論

HBV 感染早期からのヒト肝細胞内の遺伝子発現を経時的に観察することにより、HBV が免疫寛容状態を獲得するメカニズムを解明できる可能性があり、免疫寛容状態が維持された状態と考えられる B 型慢性肝炎において、免疫寛容状態を脱却することによる、HBV 排除機構の活性化を目指した新たな B 型慢性肝炎治療戦略の構築が期待できる。

## F. 研究発表(本研究に関わるもの)

### 1. 論文発表

- 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, Chayama K. Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle. PLoS One. 7(10): e47490, 2012.
- Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes

CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle. Hepatology 56(2): 555-66, 2012.

- 柘植雅貴、今村道雄、茶山一彰「ヒト肝細胞キメラマウスを用いた抗 HBV 薬剤感受性評価と臨床への応用」肝胆膵 65(4): 591-600, 2012
- 柘植雅貴、平賀伸彦、茶山一彰「HBV RT 領域変異株におけるテノホビルの抗ウイルス効果の検討」消化器内科 54(5): 575-581, 2012
- 柘植雅貴、茶山一彰「B 型肝炎の抗ウイルス療法 ③核酸アナログ(ラミブジン/アデホビル/エンテカビル/テノフォビル)」インフォームドコンセントのための図説シリーズ 肝炎ウイルス - B 型・C 型 38-43, 2012

### 2. 学会発表

- Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Shoichi Takahashi, Hidenori Ochi, C Nelson Hayes, Kazuaki Chayama 「The effects on gene expression profiles in human hepatocytes by HBV and HCV infection」22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) ポスター
- Eisuke Murakami, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Shoichi Takahashi, Hidenori Ochi, C Nelson Hayes, Kazuaki Chayama 「Evaluation of antiviral effects of nucleos(t)ide analogues for hepatitis B virus using in vitro and in vivo models」

22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) ポスター

- ・森奈美、柘植雅貴、茶山一彰「血液悪性腫瘍に対する化学療法施行例における HBV 再活性化と核酸アナログ製剤による再活性化予防効果の解析」第 16 回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション 1
- ・小林知樹、柘植雅貴、福原崇之、柘木慶一、苗代典昭、中原隆志、本田洋士、宮木大輔、長沖祐子、河岡友和、高木慎太郎、平松 憲、今村道雄、川上由育、兵庫秀幸、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰「当院における B 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果の検討」第 54 回日本消化器病学会大会 ポスター
- ・柘植雅貴「薬剤耐性 HBV に対する核酸アナログの抗ウイルス効果」Hepatology Meeting in Japan 2012 一般演題
- ・柘植雅貴、今村道雄、茶山一彰「HBV 薬剤耐性変異株に対するテノホビルの抗ウイルス効果」第 48 回日本肝臓学会総会 ワークショップ 5
- ・村上英介、柘植雅貴、今村道雄、小林知樹、福原崇之、柘木慶一、苗代典昭、中原隆志、本田洋士、宮木大輔、長沖祐子、河岡友和、高木慎太郎、平賀伸彦、平松 憲、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰「HBV 既往感染者に対する血液悪性疾患化学療法時の核酸アナログ製剤による HBV 再活性化予防についての検討」第 48 回日本肝臓学会総会 一般演題
- ・森奈美、柘植雅貴、茶山一彰、川上由育「B 型慢性肝炎に対する Lamivudine, interferon- $\alpha$  による Sequential therapy における治療効果と Th1/Th2 バランスの検討」広島・山口肝疾患研究会
- ・小林知樹、柘植雅貴、福原崇之、柘木慶一、苗代典昭、中原隆志、本田洋士、宮木大輔、長沖祐子、河岡友和、高木慎太郎、平松 憲、

今村道雄、川上由育、兵庫秀幸、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰「当院における B 型慢性肝炎 7 例に対するペグインターフェロン (PEG-IFN)  $\alpha$ -2a の治療成績」第 98 回消化器病学会中国地方会 一般演題

- ・ Masataka Tsuge, Tomohiko Kohno, Nobuhiko Hiraga, Hiromi Abe, Daiki Miki, Michio Imamura, Shoichi Takahashi, Hidenori Ochi, C Nelson Hayes, Kazuaki Chayama 「 Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication with targeting to HB core region 」 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) ポスター

G. 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  
なし



## B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究

分担研究者：渡邊綱正

分担研究課題：HBV ジェノタイプ別 IFN シグナル阻害効果の検討

研究要旨：これまで本邦で多く認められたB型肝炎ウイルス（HBV）遺伝子型Bや遺伝子型Cとは異なる遺伝子型A（HBV/A）が近年は蔓延している。HBV遺伝子型により臨床病態および治療効果が異なることが明らかとされるが、そのメカニズムは不明である。HBV遺伝子型による病態の違いを自然免疫の観点から解析し、感染するウイルスに応じた治療法の開発を目的とした。HBV粒子産生プラスミドの遺伝子導入による細胞培養系の解析と、自然免疫能を保持するヒト肝細胞置換キメラマウスのHBV感染モデルを用いて、HBV遺伝子型によるウイルス学的ならびにIFN応答性の差異を明らかとした。また、臨床サンプルからHBV/AとHBV/Gの組み換えウイルスが単離され、この解析から遺伝子型Gの複製能力は弱く、遺伝子型Aのコア蛋白を利用してウイルス複製を増強させていることを明らかとした。

### A. 研究目的

従来から本邦に多く存在するB型肝炎ウイルス（HBV）の遺伝子型Bや遺伝子型Cとは異なる遺伝子型A（HBV/A）が近年蔓延している。これは若年者層における水平感染の増加に伴うと考えられる。また、HBV遺伝子型により臨床病態および治療効果が異なることも明らかとされているが、そのメカニズムは不明である。HBVの遺伝子型による病態の違いを自然免疫の観点から解析し、感染ウイルスの遺伝子型に応じた治療法の開発を目的とした。

### B. 研究方法

臨床サンプルから分離された異なる遺伝子型のHBV全長配列（遺伝子型Ae、Bj、Ce、D）をクローニングし、HBVウイルス粒子産生プラスミドを作成し細胞培養系による解析を行った。また、獲得免疫が除去されたSCIDマウスを背景とするヒト肝細胞置換キメラマウスのHBV感染モデルを用いて、異なる遺伝子型のHBVクローンをを用いた自然免疫応答を検討した。なお、今回の検討ではインフォームドコンセント取得さ

れた症例のみを取り扱い、使用にあたっては連結不可能匿名化を行うことで被験者のプライバシーは完全に保護することとした。本試験で結果を公表する際は、被験者・協力者を特定できる情報を含まないこととし、ヘルシンキ宣言の精神、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して実施した。

### C. 研究結果

HBV粒子産生プラスミドを用いて異なる遺伝子型のHBV感染性粒子を作成し、キメラマウスへの感染を確認した。キメラマウス感染後の血清HBV-DNA量の推移は感染させた遺伝子型により異なり、本邦の垂直感染の主な遺伝子型であるHBV/Ceが最も早く血中ウイルス量のピークに達し（ $10^8$ - $10^9$  copies/mL）、次に遺伝子型Aが感染ピークを迎えた。一方、遺伝子型Bは劇症肝炎で多く認めるプレコア変異を挿入した場合にウイルス複製が亢進し、持続感染が成立した。次に、遺伝子型Cと遺伝子型AのHBV持続

感染キメラマウスに対して、ペグインターフェロン (PEG-IFN) 単独投与群と低分子化合物を併用した PEG-IFN+化合物 X 投与群の血中 HBV-DNA 推移を比較検討したところ、遺伝子型 C では投与 2 週間で血中ウイルス量が約 1/100 に減少したのに対し、遺伝子型 A では効果が弱く、約 1/10 の減少であった。

一方、臨床サンプルから HBV 遺伝子型 A と遺伝子型 G の組み換えウイルスが単離され、このウイルス学的解析から遺伝子型 G の複製能力は弱く、遺伝子型 A のコア蛋白を利用してウイルス複製を増強させていることを明らかとした。

#### D. 考察

HBV が効率的に持続感染する培養細胞系は樹立されていない。したがって、HBV 蛋白発現ユニットを保持する発現プラスミドを肝臓由来の培養細胞株 (今回は HuH7 細胞を使用) にトランスフェクションする実験系が用いられる。本邦の HBV 感染例は、現在では感染 HBV 遺伝子型が多岐にわたり、さらに HBV 遺伝子型により病態が異なることも明らかとなっている。したがって、今回は各種遺伝子型の HBV 粒子産生プラスミドを細胞導入する系の確立と HBV 感染モデルを用いた自然免疫応答の解析を行い、異なる遺伝子型 HBV 感染に対する宿主応答、特に自然免疫修飾作用を検討した。HBV 遺伝子型により IFN による抗ウイルス効果が異なり、遺伝子型特異的な IFN 応答性阻害作用が示唆された。今後、この HBV 遺伝子型特異的な治療応答性への修飾因子を明らかとすることにより、遺伝子型特異的な治療法の開発を目指す。

#### E. 結論

HBV 粒子産生プラスミドの遺伝子導入による細胞培養系の解析と、自然免疫能を保持するヒト肝細胞置換キメラマウスの HBV 感染モデルを用いて、HBV 遺伝子型によるウイルス学的なら

4) おける interferon-inducible protein-10

びに IFN 応答性の差異を明らかとした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Sandalova E, Laccabue D, Boni C, Watanabe T, Tan A, Zong ZH, Ferrari C, Bertolotti A. Increased Levels of Arginase in Patients With Acute Hepatitis B Suppress Antiviral T Cells. *Gastroenterology*. 2012;143:78-87.

2) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, and Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- $\alpha$  in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *GUT*. 2012 in press.

3) Watanabe T, and Tanaka Y. Reactivation of hepatitis viruses following immunomodulating systemic chemotherapy. *Hepatol Res*. 2013;43:113-21.

4) Kani S, Tanaka Y, Matsuura K, Watanabe T, Yatsushashi H, Orito E, Inose K, Motojuku N, Wakimoto Y, Mizokami M. Development of new IL28B genotyping method using Invader Plus assay. *Microbiol Immunol*. 2012;56:318-23.

##### 2. 学会発表

1) HIV 合併 HBV 感染例において核酸アナログ add-on ペグインターフェロン併用療法による HBs 抗原セロコンバージョンの可能性. 渡邊綱正、横幕能行、杉浦互、田中靖人. JDDW2012. 平成 24 年 10 月 10 日~11 日. 神戸.

2) B 型肝炎既往感染患者における HBs 抗体価の性差. 飯尾悦子, 渡邊綱正, 松浦健太郎, 日下部篤宣, 新海登, 藤原圭, 宮木知克, 野尻俊輔, 城卓志, 田中靖人. 第 16 回日本肝臓学会大会. 平成 24 年 10 月 10 日~11 日. 神戸.

3) 核酸アナログを投与した B 型慢性肝炎患者に値の動態. 新海登, 松浦健太郎, 渡邊綱

正, 村上周子, 宮木知克, 藤原圭, 日下部篤宣, 飯尾悦子, 野尻俊輔, 城卓志, 田中靖人. 第16回日本肝臓学会大会. 平成24年10月10日～11日. 神戸

5) HIV 合併 HBV 感染例に対するペグインターフェロン治療. 渡邊綱正, 横幕能行, 今村淳治, 杉浦互, 田中靖人. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会. 平成24年11月24日～26日. 横浜 口演.

6) HIV 合併例を含めた B 型急性肝炎症例の検討. 渡邊綱正, 杉浦互, 田中靖人. 第39回日本肝臓学会東部会. 平成24年12月6日～7日. 東京. シンポジウム.

7) Immune restoration hepatitis B associated with anti-retroviral therapy for human immunodeficiency virus.

Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Iio E, Shinkai N, Matsuura K, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, Tanaka Y.

International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep. 22-25, 2012. London.

8) Characteristics of anti-HBs titers by gender and age in HBV-resolved patients. Iio E, Watanabe T, Tanaka Y, Matsuura K, Shinkai N, Nojiri S, Joh T. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 9-13, 2012. Boston.

## G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

## 自然免疫を用いたHBV感染細胞の排除に関する研究

水腰英四郎 金沢大学附属病院消化器内科 講師

**研究要旨：**B型肝炎ウイルス（HBV）感染は、肝硬変・肝細胞癌などの重篤な病態の原因になっている点で、我が国の重要な感染症の1つである。HBVに対する治療薬としては、数種類の抗ウイルス薬が使用されているが、ウイルスの完全排除に至る確率は低く、新しい機序を持つ新薬の開発が必要である。HBVは宿主の免疫機構を回避する方法を獲得していることが報告されており、HBVの完全排除もしくは長期にわたる増殖抑制を目的とした治療法を開発するためには、そうした免疫抑制機構の基本的な動態を解明するとともに、そうした動態にあるHBVに対して、どのような免疫が作動しているかを明らかにして研究開発を行うことが必要である。

本研究では、HBV感染細胞に対する免疫監視機構とHBVによる免疫抑制機構の解明を行い、HBV感染細胞に対する免疫治療法の開発を行う。特に宿主免疫機構のうち、自然免疫を用いた治療法の開発を行う予定であるが、その中でも自然免疫と獲得免疫との橋渡しの役割を果たす樹状細胞にフォーカスを当てて研究を行う。本年度はこれらの研究を遂行するための基礎的研究として、HBV感染患者における樹状細胞機能の解析準備と、獲得免疫の反応を検出するためのツールとしてHBV由来細胞傷害T細胞エピトープの同定を行った。

### A. 研究目的

HBV感染が宿主の自然免疫機構（特に樹状細胞）に与える影響を解析し、その抑制機構を解除することによってHBV感染細胞に対する免疫治療法を開発を行う。

### B. 研究方法

はじめに、健常者・HBV感染患者・C型肝炎ウイルス（HCV）感染患者の生検肝組織を用いて包括的発現遺伝子解析を行い、HBV感染患者において免疫に関連する遺伝子の発現が、健常者やHCV感染患者と比べて変化しているのかどうかを検討した。

次に、こうした発現遺伝子解析の結果と樹状細胞機能の関連を検討するために、樹状細胞における発現遺伝子解析を行うこととした。樹状細胞は機能や表面マーカーの違いから数種類（サブセット）に分類されるが、本年度の研究ではそれぞれのサブセットにおける機能を解析するために、患者末梢血における樹状細胞の分離と、目的とする樹状細胞のソーティング、発現遺伝子解析のためのRNAの抽

出方法を確立した。

最後に、樹状細胞機能を解析するためのツールとしてHBV由来細胞傷害T細胞エピトープの同定を試みた。本検討ではHBV genotype Cのlarge S領域、pre-core/core領域、HBx領域、polymerase領域のアミノ酸配列を基に、コンピュータソフト（BIMAS）を用いて、HLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞（CTL）エピトープの予測を行った。次にHLA-A24分子への結合予測スコアが5.0以上のエピトープをもつペプチドを作製し、ELISPOTアッセイにて18例のHBV感染患者の末梢血リンパ球での免疫反応を検討した。倫理面への配慮として、本研究では臨床研究・疫学研究・ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守する。本研究に関しては、研究施設内の倫理委員会として、1）医学倫理審査委員会と2）ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の2つの承認を今年度に得た。

### C. 研究結果

肝組織における発現遺伝子解析では、

Cancer Genome Anatomy Project(CGAP)の免疫関連分子 1844 個から、健常者・HBV 感染患者・HCV 感染患者の肝組織で発現レベルが異なる遺伝子 521 個(p<0.005)を同定した。これらのうち、特にHBV 感染患者の肝組織において発現レベルの低下が認められたものとして、TLR1・TLR2・TLR4・CD53・CD86 等、自然免疫に関連するものも多数含まれていた。

HBV 患者末梢血における樹状細胞の分離・ソーティング・発現遺伝子解析のための RNA の抽出方法の検討では、末梢血 50ml から  $10^7$  個の末梢血単核球を採取し、HLA-DR/Lin1/CD123/CD11c/CD80/CD83/CD86/CD40/CCR7 等の抗体を用いて樹状細胞を各サブセットに分離した後に、表面マーカーの解析と RNA を効率的に精製できる方法を確立した。

HBV 由来 CTL エピトープの同定に関する研究では、コンピュータにて予測された CTL エピトープのうち、large S 領域から 28 種類、pre-core/core 領域から 13 種類、HBx 領域から 4 種類、polymerase 領域から 44 種類のエピトープを、結合予測スコアが高い順に選択し、免疫学的解析に用いるためのペプチドを作製した。また、これらのペプチドとヒトリンパ球を用いて、ペプチドに反応しインターフェロンガンマを産生する CTL を検出するための、ELISPOT アッセイシステムを構築した。

これまでに 18 例の HBV 感染患者末梢血リンパ球の解析を終了しており、93 種類の HBV 由来ペプチドのうち 32 種類において、少なくとも 1 人以上の患者において陽性反応を認めた。また少なくとも 1 つのペプチドに陽性反応が出た患者は 18 人中 11 人であり、このうち 10 人が、核酸アナログ製剤による治療を行っている患者であった。

#### D. 考察

予備研究として行った HBV 感染患者の肝組

織を用いた発現遺伝子解析結果からは HBV 感染による免疫抑制機構の基本的な動態に関与している因子の候補が同定された。本研究結果に、今回確立した末梢血樹状細胞サブセットを用いた発現遺伝子情報を加えることで、HBV の樹状細胞に対する免疫抑制機構がより明らかになると考えられる。今後はこれらの検討を進めていく予定である。

一方、HBV 由来ペプチドと患者末梢血リンパ球を用いた ELISPOT アッセイ法にて、HBV 由来 CTL エピトープを同定できる可能性が高まった。またエピトープスクリーニングには現在核酸アナログ製剤により B 型肝炎の治療を行っている症例のサンプルが適していることが示唆された。今後はさらにエピトープの同定を進めるとともに、これらのエピトープ中から樹状細胞機能の解析に有用なものを選択し、同細胞の機能解析や新規治療開発のモニタリングに使用する予定である。

#### E. 結論

HBV 感染による免疫抑制機構の基本的な動態に関与している因子の候補を同定した。また樹状細胞機能を詳細に解析するための手法を確立した。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし。
2. 学会発表  
なし。

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし

## HBVに対する自然免疫応答の解析

分担研究者： 竹原 徹郎

大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学・教授

研究要旨：ウイルス感染に対する宿主免疫応答において自然免疫は重要な役割を果たす。Hepatitis B Virus (HBV) に対する自然免疫応答を解析することにより、B型肝炎における慢性化成立・抗ウイルス治療抵抗性の機序を解明することとした。

自然免疫において Natural killer (NK) 細胞と Interferon (IFN) は重要な役割を果たす。本年度は、B型肝炎患者におけるNK細胞の表現型・IFN応答性について解析を行い、以下のことを明らかにした。(1)末梢血におけるCD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK細胞の頻度は、B型肝炎患者と健常者とで有意な差を認めなかった。(2)CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK細胞は、活性型レセプターNKp46と抑制性レセプターNKG2Aとの発現程度によって4つのサブセット、NKp46<sup>-</sup>NKG2A<sup>-</sup>、NKp46<sup>+</sup>NKG2A<sup>-</sup>、NKp46<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup>、NKp46<sup>high</sup>NKG2A<sup>high</sup>、に分類された。(3)上記サブセットの中でNKp46<sup>+</sup>NKG2A<sup>-</sup> 分画において、B型肝炎患者で健常者に比し有意に頻度が高かった。(4) *in vitro* でのIFN- $\alpha$ 刺激で誘導されるリン酸化STAT1の程度は4つのサブセットによって異なっており、NKp46<sup>-</sup>NKG2A<sup>-</sup>とNKp46<sup>+</sup>NKG2A<sup>-</sup>とでSTAT1リン酸化の程度が強かった。

NK細胞の活性は、活性型レセプターからのシグナルと抑制性レセプターからのシグナルとのバランスによって決まる。また、NK細胞はIFN- $\alpha$ 刺激によるSTAT1リン酸化を介して細胞傷害活性が誘導される。したがって、今回明らかとなった4つのNK細胞サブセットのうち、NKp46<sup>+</sup>NKG2A<sup>-</sup> サブセットは、活性型レセプター陽性かつ抑制性レセプター陰性であり、さらにIFN- $\alpha$ 刺激によるSTAT1リン酸化の程度も大きいことから、最もNK細胞活性が強力なサブセットであると考えられる。さらに、B型肝炎患者において健常者に比べてこのサブセットの頻度が高いことから、NKp46<sup>+</sup>NKG2A<sup>-</sup> NK細胞サブセットがB型肝炎の病態に関与している可能性が示唆された。

共同研究者

宮城琢也 大阪大学消化器内科学 助教

との発現程度によってサブセットに区別した。それぞれのサブセットにおいて、IFN- $\alpha$ によって伝達される細胞内シグナルをSTAT1リン酸化の程度として評価した。

### A. 研究目的

B型肝炎における慢性化の成立機序や抗ウイルス治療抵抗性の機序を解明するには、ウイルス側因子と宿主側因子とを包括的に理解する必要がある。ウイルス感染に対する宿主免疫応答において自然免疫、特に Natural killer (NK) 細胞や Interferon (IFN) は重要な役割を果たす。今回我々は、宿主側因子としてNK細胞とIFNとに焦点をあて、NK細胞の表現形やIFN応答性について解析することとした。

### B. 研究方法

B型肝炎患者と健常者とを対象とし、末梢血単核球を単離したうえでFACS解析を行った。細胞表面マーカーとしてCD56・CD3によりNK細胞を同定した。さらに、NK細胞活性型レセプターNKp46と抑制性レセプターNKG2A

### C. 研究成果

(1)末梢血単核球に占めるCD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK細胞の頻度は、B型肝炎患者と健常者とで有意差を認めなかった。

(2)CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK細胞はNKp46とNKG2Aとの発現程度によって4つのサブセット、すなわち、NKp46<sup>-</sup>NKG2A<sup>-</sup>、NKp46<sup>+</sup>NKG2A<sup>-</sup>、NKp46<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup>、NKp46<sup>high</sup>NKG2A<sup>high</sup>、に分類された。

(3)上記サブセットの中でNKp46<sup>+</sup>NKG2A<sup>-</sup>分画において、B型肝炎患者で健常者に比して有意に頻度が高かった。

(4) *in vitro* でのIFN- $\alpha$ 刺激でリン酸化されるSTAT1の程度が、4つのサブセットによって異なっていた。すなわち、NKp46<sup>-</sup>NKG2A<sup>-</sup>  $\neq$  NKp46<sup>+</sup>NKG2A<sup>-</sup> > NKp46<sup>high</sup>NKG2A<sup>high</sup> >

NKp46+NKG2A+ となっていた。このサブセット間の差異は、B 型肝炎患者・健常者ともに認められた。

#### D. 考察と結論

NK 細胞が活性型レセプターと抑制性レセプターとの発現様式によって4つのサブセットに分類されることが明らかとなった。NK 細胞の活性は、活性型レセプターからのシグナルと抑制性レセプターからのシグナルとのバランスによって決まる。したがって、これらのサブセットによって、NK 細胞活性が異なっているものと考えられる。また、サブセットによって IFN- $\alpha$  刺激による STAT1 のリン酸化の程度が異なっていた。IFN- $\alpha$  刺激による STAT1 のリン酸化によって NK 細胞における細胞傷害活性が誘導されることから、これらのサブセットによって、細胞傷害活性の誘導度合いも異なっているものと考えられる。

なかでも、NKp46+NKG2A- サブセットは、活性型レセプターが陽性かつ抑制性レセプターが陰性であり、さらに IFN- $\alpha$  刺激による STAT1 のリン酸化の程度も大きいことから、最も NK 細胞活性が強力なサブセットであることが予想される。また、B 型肝炎患者において健常者に比べてこのサブセットの頻度が高いことから、NKp46+NKG2A- NK 細胞サブセットが B 型肝炎の病態に関与している可能性が示唆される。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

1. KOHGA, K., TATSUMI, T., TSUNEMATSU, H., AONO, S., SHIMIZU, S., KODAMA, T., HIKITA, H., YAMAMOTO, M., OZE, T., AKETA, H., HOSUI, A., MIYAGI, T., ISHIDA, H., HIRAMATSU, N., KANTO, T., HAYASHI, N. & TAKEHARA, T. (2012) Interleukin-1 $\beta$  enhances the production of soluble MICA in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 61, 1425-32.
2. NAWA, T., ISHIDA, H., TATSUMI, T., LI, W., SHIMIZU, S., KODAMA, T., HIKITA, H., HOSUI, A., MIYAGI, T., KANTO, T., HIRAMATSU, N., HAYASHI, N. & TAKEHARA, T. (2012) Interferon- $\alpha$  suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via the protein kinase C pathway. *Virology*, 432, 452-9.
3. SHIMIZU, S., TAKEHARA, T., HIKITA, H., KODAMA, T., TSUNEMATSU, H.,

MIYAGI, T., HOSUI, A., ISHIDA, H., TATSUMI, T., HIRAMATSU, T. K., FUJITA, N., YOSHIMORI, T. & HAYASHI, N. (2012) Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 131, 548-57.

4. HIKITA, H., KODAMA, T., SHIMIZU, S., LI, W., SHIGEKAWA, M., TANAKA, S., HOSUI, A., MIYAGI, T., TATSUMI, T., KANTO, T., HIRAMATSU, N., MORII, E., HAYASHI, N. & TAKEHARA, T. (2012) Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: A causal link between apoptosis and carcinogenesis. *J Hepatol*, 57, 92-100.

##### 学会発表

本研究に関する今年度の学会発表はなし

#### F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## HBV感染治療用ベクターの開発と新規ベクターの供給

研究分担者 斎藤 泉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨：B型肝炎ウイルスに対する治療法として、肝臓における発現効率の高い非増殖型アデノウイルスベクター（AdV）を用いて、インターフェロンと治療用遺伝子を同時発現する日本発のHBV用デュアルベクターを開発する。本年度は、shRNAの候補として高保存領域の5領域を設定し、shRNAを設計、合成するとともに、ウイルス関連RNA（VA RNA）欠失AdVとして作製した。また、各々のHBVタンパク質を単独で発現するAdVをVA残存、欠失の形で計10種類作製するとともに、各々の遺伝子発現を独立して測定可能なreal-time PCR用プライマーを設計・合成し、shRNAの抗ウイルス効果を評価するためのシステムを構築した。また班員に対するAdVの供給として、今年度は10種類のAdVを作製し、供給した。

### A. 研究目的

HBVに対する治療法として、ウイルスmRNAに対するsiRNAの応用が期待されるが、AdVは肝臓への遺伝子導入効率、発現効率ともに優れており有用性の高いツールである。しかし従来のAdVにはウイルス由来の2種類のVA RNAが発現しており、治療用遺伝子として導入したshort-hairpin RNA（shRNA）と競合拮抗して抗ウイルス効果を減弱する例をHCVで見いだした。VA RNA欠失AdVの効率的作製は困難であったが、斎藤は新規作製法の開発に成功した（本年度特許出願）。本研究では、この新規VA RNA欠失AdVにHBVに対するshRNAの候補を複数挿入し、最も有用性の高いshRNAを同定後、インターフェロン遺伝子を同時に発現するデュアルベクターを開発し、作用機序の異なる2つの治療用遺伝子に依る相加的効果を有したAdVを開発する。

### B. 研究方法

AdVの作製は、申請者の開発した「完全長ウイルスゲノム導入法」を用いて、ベクター上に唯一残存し発現しているVA RNAの両側に部位特異的組換え酵素FLPの標的配列であるFRTを挿入したコスミドカセットを用いて行った。この新規VA欠失AdV作製法は、通

常のベクター産生細胞である293細胞を用いて通常のAdVを作製するとともに、必要に応じてVA RNAを欠失する場合にはFLPを高度に発現する293細胞株であるhde12細胞にAdVを感染することにより90%以上のVA RNA領域を環状に切り出すことが可能であり、VA欠失AdVとして応用が可能である。AdVの精製はCsCl1のステップ勾配により行い、力価測定は新規に開発したreal-time PCR法により行った。

更に、HBVの全ての遺伝子の発現を独立的に解析可能なreal-time PCRのプライマーを設計し、解析を行った。

shRNAはDR1及びDR2など高度保存領域に5つ設計し、現在VA保持あるいは欠失AdVを作製している。

（倫理面の配慮）

本研究は遺伝子治療用ベクター作製であり、現時点では倫理面に抵触する研究は行っていない。

### C. 研究結果

班員へのAdVの供給は、要望に応じて行った。本年度は10件の通常ベクターの要望があり、供給した。



HBV の Pol、Pre-Core、Core、Pre-S 及び S を独立して EF1 $\alpha$  プロモーターから発現する VA 保持及び欠失ベクター、計 10 種類の AdV を作製した。VA RNA はベクター作製に必要であり、VA 欠失 AdV を高力価で作製が可能であるのは、我々の開発し報告した新規 VA 欠失 AdV のみである。この作製法を用いて作製したこれらのベクター力価は、特に Pol と Core の力価が低かったものの、10 の 7 乗レベルでの回収が可能であり、real-time PCR で mRNA の発現を確認した。

HBV に先駆け、HCV に対する shRNA の抗ウイルス効果を IRES に対する 2 種類の shRNA を用いて検討した。その結果、VA 保持 AdV でも約 40%の抑制効果が認められたが、同じ shRNA を発現する VA 欠失 AdV ではその抑制率は 60%に達しており、shRNA による抗ウイルス薬の開発には VA 欠失 AdV が有用であることを確認した。

現在、5 種類の HBV に対する shRNA を VA 保持あるいは欠失 AdV として作製しており、HBV における VA 欠失 AdV の有用性の検証を進めている。そのために、各々の HBV 遺伝子を独立して発現する AdV を同様に VA 保持あるいは欠失 AdV として用いて、各々の遺伝子発現を独立して検出可能である real-time PCR システムを用いて検討している。

#### D. 考察

本年度は、当初の予定通り、HBV のほぼ全ての遺伝子を独立して発現する AdV の作製、全ての遺伝子を独立して測定可能な real-time PCR 用プライマーの設定、タンパク質レベルでの解析法のセットアップを行うとともに、VA 欠失 AdV 作製法が完成したため、全ての AdV を VA 保持と欠失両方で作製した。

近年 VA RNA が細胞内で miRNA 様 small RNA にプロセスされ、複数の細胞遺伝子発現を抑制していたことが報告された。抗ウイルス薬として考えた時、ベクターそのものによ

る細胞への影響は副反応にも繋がる可能性があり、排除することが好ましいが、これまでは作製法が無く、1/1000 以下の力価を持つベクターしか報告されていなかった。我々の開発した VA 欠失 AdV は、高力価での調製が可能である。また先行していた HCV の研究においても、shRNA を VA RNA が競合拮抗し、shRNA の効果を減弱させており、HBV においても VA RNA が同様の作用を及ぼす可能性が極めて強いため、今後は慎重に検討を加えるとともに、HBV に対する shRNA と  $\alpha$ -interferon を同時発現するデュアルベクターを我々の開発した「低炎症 VA 欠失型」AdV で作製し、検討を進める。

#### E. 結論

本年度は、予定していた HBV の全ての遺伝子を発現する AdV の作製に成功するとともに、各々の HBV 遺伝子発現を独立して解析可能なプライマーの設定、高度保存領域に対する shRNA の設計及び AdV の作製など、予定以上の進展もあった。今後は、shRNA の効果を AdV レベルで確認し、最適化したのち HBV の複製抑制効果を検討するとともに、班員への AdV の作製及び供給を更に進めていく。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Maekawa A, Pei Z, Suzuki M, Fukuda H, Ono Y, Kondo S, Saito I, Kanegae Y. Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery. *Scientific Reports* 2013; 3:1136.
- 2) Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a

versatile tool for study of virus assembly and infection. Virology 2012; 432:29-38.

- 3) Pei Z, Kondo S, Kanegae Y, Saito, I. Copy number of adenoviral vector genome transduced into target cells can be measured using quantitative PCR: Application to vector titration. Biochem Bioophys Res Commn 2012; 417:945-950.

## 2. 学会発表

- 1) 前川 文、裴 嶢、近藤 小貴、鐘ヶ江 裕美、齋藤 泉. 高力価VA RNAs欠失アデノウイルスベクター新規作製法の開発。第60回日本ウイルス学会学術総会, Osaka, 2012.
- 2) 裴嶢、史国利、近藤小貴、伊藤昌彦、鐘ヶ江裕美、鈴木哲朗、齋藤泉. VA RNA欠失型アデノウイルスベクターを用いたC型肝炎治療法の開発。第60回日本ウイルス学会学術総会, Osaka, 2012.

## H. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

VA遺伝子破壊アデノウイルスベクターおよびそれを調製するための前駆体ベクター

特願2012-213069

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
柘植雅貴、ほか（柘植）	ヒト肝細胞キメラマウスを用いた抗 HBV 薬剤感受性評価と臨床への応用	「肝胆膵」編集委員会	肝胆膵	アークメディア	東京	2012	65(4) : 591-600
柘植雅貴、ほか（柘植）	HBV RT 領域変異株におけるテノホビルの抗ウイルス効果の検討	消化器内科編集委員会	消化器内科	科学評論社	東京	2012	54(5) : 575-581
柘植雅貴、ほか（柘植）	B型肝炎の抗ウイルス療法 ③核酸アナログ（ラミブジン / アデホビル / エンテカビル / テノフォビル）	熊田博光	インフォームドコンセントのための図説シリーズ 肝炎ウイルス - B型・C型	医歯薬ジャーナル	大阪	2012	38-43

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻	ページ	出版年
Dansako H, Yamane D, Welsch C, McGivern DR, Hu F, Kato N, Lemon SM.	Class A scavenger receptor 1 (MSR1) restricts hepatitis C virus replication by mediating toll-like receptor 3 recognition of viral RNAs produced in neighboring cells.	PLoS Pathogens	in press		2013
Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N.	Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA.	Virus Research	167	74-85	2012
Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N.	PML tumor suppressor protein is required for HCV production.	Biochemical and Biophysical Research Communications	430	592-597	2013
土方 誠	培養細胞による HBV 感染増殖系の構築とその応用	肝胆膵	65・(4)	571-579	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻	ページ	出版年
Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, <u>Matsuura Y.</u>	Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation.	J.Virol.	87	489-502	2013
Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, and <u>Matsuura Y.</u>	Expression of miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with HCV.	J.Virol.	86	7918-7933	2012
Abe T, Fukuhara T, Wen X, Ninomiya A, Moriishi K, Maehara Y, Takeuchi O, Kawai T, Akira S, and <u>Matsuura Y.</u>	CD44 participates in the IP-10 induction in cells replicating HCV RNA through an interaction with TLR2 and hyaluronan.	J.Virol.	86	6159-6170	2012
Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and <u>Matsuura Y.</u>	Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122.	J.Virol.	86	1382-1393	2012
Fukuhara T, and <u>Matsuura Y.</u>	Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection.	J. Gastroenterol.		doi:10.1007/s00535-012-0661-5.	2012
Moriishi K, and <u>Matsuura Y.</u>	Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection.	Front. Microbiol.		doi:10.3389/fmicb.2012.00054.	2012
Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, <u>Matsuura Y.</u> , Saito I, Wakita T, and Suzuki T.	Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection.	Virology	432	29-38	2012
Kobayashi F, Yamada S, Taguwa S, Kataoka C, Naito S, Hama Y, Tani H, <u>Matsuura Y.</u> , and Sugahara K.	Specific interaction of the envelope glycoproteins E1 and E2 with liver heparan sulfate involved in the tissue tropism infection by hepatitis C virus.	Glycoconj. J.	29	211-220	2012
Tripathi L.P, Kambara H, Moriishi K, Morita E, Abe T, Mori Y, Chen Y.A, <u>Matsuura Y.</u> , and Mizuguchi K.	Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28 $\gamma$ Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study.	J. Proteome Res.	11	3664-3679	2012