

201228009A

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化等研究事業

HBV cccDNAの制御と排除を目指す 新規免疫治療薬の開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子周一

平成25 (2013) 年3月

厚生労働科学研究費補助金

B型肝炎創薬実用化等研究事業

HBV cccDNAの制御と排除を目指す
新規免疫治療薬の開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 周一

平成25（2013）年 3月

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

研究組織

| | | |
|--------------|-----------------------------------|----------------|
| <u>研究代表者</u> | | |
| 金子 周一 | 金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学 | 教授 |
| <u>研究分担者</u> | | |
| 今村 道雄 | 広島大学病院 消化器・代謝内科 | 診療講師 |
| 上田 啓次 | 大阪大学大学院医学系研究科・感染免疫医学講座ウイルス学 | 教授 |
| 中本 安成 | 福井大学医学部内科学 (2) | 教授 |
| 橋本 真一 | 金沢大学医薬保健研究域医学系血液情報統御学 | 特任教授 |
| 小原 恭子 | 鹿児島大学共同獣医学部 | 教授 |
| 村上 清史 | 金沢大学医薬保健研究域医学系 | 協力研究員 |
| 石川 哲也 | 名古屋大学大学院 医学系研究科・医療技術学専攻病態解析学講座 | 教授 |
| 考藤 達哉 | 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学・樹状細胞制御治療学寄附講座 | 寄附講座准教授 |
| 高橋 健 | 京都大学医学部附属病院・消化器内科 | 助教 |
| 加藤 孝宣 | 国立感染症研究所ウイルス第二部 | 室長 |
| 村口 篤 | 富山大学大学院医学・薬学研究部・免疫学講座 | 教授 |
| 池田 裕明 | 三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座 | 准教授 |
| 石井 健 | 独立行政法人医薬基盤研究所・アジュバント開発プロジェクト | プロジェクト リーダー |
| 小原 道法 | 公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野 | 副参事研究員 |
| 水腰英四郎 | 金沢大学附属病院・消化器内科 | 講師 |

目 次

I. 総括研究報告

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

金子 周一 ----- 1

II. 分担研究報告

1. HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

金子 周一 ----- 7

2. ヒト肝細胞キメラマウスを用いたB型肝炎ウイルス感染モデル

今村 道雄 ----- 11

3. HBV感染細胞で増減するnon-coding short RNAの発現プロファイルと
HBV増殖制御機構の解析

上田 啓次 ----- 13

4. 抗HBV反応を増強する免疫賦活分子の探索

中本 安成 ----- 16

5. HBV感染細胞のエピゲノム

橋本 真一 ----- 20

| | |
|--|---------|
| 6. HBV感染モデルツパイを用いた新規治療効果の解析 | |
| 小原 恭子 | -----23 |
| 7. HBVccc肝細胞株の樹立とHBVcccの制御機構 | |
| 村上 清史 | -----26 |
| 8. B型慢性肝炎患者におけるエピトープ解析と高効率免疫法確立の試み | |
| 石川 哲也 | -----28 |
| 9. HBV感染症におけるIFN産生樹状細胞の解析 | |
| 考藤 達哉 | -----31 |
| 10. B型肝炎における自然免疫応答の解明 | |
| 高橋 健 | -----34 |
| 11. B型肝炎ウイルス感染が宿主の細胞周期および アポトーシスに与える影響の解析 | |
| 加藤 孝宣 | -----36 |
| 12. cccDNA感染細胞に対する免疫治療法の開発：抗原およびT細胞受容体の同定 | |
| 村口 篤 | -----39 |

| | |
|---------------------------------------|---------|
| 13. HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発 | |
| 池田 裕明 | -----43 |
| 14. ペプチド+アジュバント併用療法の開発 | |
| 石井 健 | -----47 |
| 15. 遺伝子組み換えワクシニアウイルス株の樹立と治療効果の解析 | |
| 小原 道法 | -----50 |
| 16. HBV由来細胞傷害性T細胞エピトープの同定とペプチドワクチンの開発 | |
| 水腰英四郎 | -----53 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | -----55 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | -----61 |

I. 総括研究報告

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

研究代表者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：B型慢性肝炎の治療においては肝炎ウイルスの増殖を低下させcccDNAを中心とするHBVの再活性化機構を制御することが重要である。本研究は免疫を用いて、cccDNAに対する新たな治療法の開発研究を行う。本年度は1) cccDNAの存在様式、および遺伝子発現調節機構の研究、2) cccDNA感染細胞に対する免疫監視機構の研究、3) cccDNA感染細胞に対する免疫治療法の開発、を開始した。1) 存在様式の解析を行う基盤研究として、B型慢性肝炎におけるエクソームとトランスクリプトームの解析を行った。Non-coding RNAとエピゲノム解析のための検出系を作製した。2) 免疫系の監視機構を解析するために、B型肝炎における末梢血単核球の発現遺伝子解析、ケモカイン解析、CTL誘導、TLR解析、樹状細胞の動態を明らかにした。また、HBVトランスジェニックマウスにおける発現遺伝子解析を実施した。3) HLA24拘束性CTLエピトープの予測を行った。ペプチドワクチンのアジュバント、TCR改変ヒトT細胞移入の基礎実験、TCR治療のモデル開発を行った。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）のcccDNAは、ウイルス増殖が大きく低下し、血液中にHBsAg、HBV DNAが検出されない症例においても、生涯にわたって肝組織中に見いだされる。cccDNAはウイルスcoreタンパクに加え、histoneや他の核タンパクとminichromosomeを形成して核内に存在し、現行の抗ウイルス治療に抵抗性である。ウイルス増殖が低下し、HBVの再活性化がみられない症例の予後は良好である。即ち、B型慢性肝炎の治療においては、肝炎ウイルスの増殖を低下させ、cccDNAを中心とするHBVの再活性化機構を制御することが重要である。再活性化は、宿主の免疫が低下

するとみられる一方で、HBs抗体が陽性の症例では稀にしかみられない。こうした事実から、再活性化はcccDNAと宿主の免疫応答によって制御されていると考えられる。しかし、再活性化に関わる免疫監視機構はほとんど明らかにされていない。cccDNAの制御と排除を行う治療法を開発するためには、cccDNAの存在様式と遺伝子発現の調節機構といったcccDNA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cccDNA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。

本研究は世界最先端の免疫学の技術を用いたcccDNAの制御と排除をめざす開発研究

を行う。3つの研究要素よりなり、1) cccDNAの存在様式、および遺伝子発現調節機構の研究、2) cccDNA感染細胞に対する免疫監視機構の研究、3) cccDNA感染細胞に対する免疫治療法の開発を行う。

B. 研究方法

本研究では最先端の免疫学の技術を用い、cccDNAの制御と排除を行う新規治療薬の開発研究を目指す。分担研究者の報告は、それぞれに分担研究報告書がつけられているため総括して記載した。

(倫理面への配慮)

各種の倫理指針を遵守して研究を実施した。

・研究代表者(金子周一)

10例のB型慢性肝炎およびB型慢性肝炎を背景として発生した肝細胞がんサンプルを用いてエクソームシーケンス解析とトランスクリプトーム解析を行った。コントロールとして10例のC型慢性肝炎および肝細胞がんサンプルを用いて、肝炎ウイルスによる違いを、エクソームシーケンスとトランスクリプトームとの関連から解析した。

・研究分担者(今村道雄)

ヒト肝細胞キメラマウスにHBV陽性患者血清またはHBV全長発現 plasmid を transfection した肝細胞株の培養上清を投与することにより、野生型あるいは変異型HBV感染マウスの作製が可能となった。HBV感染早期において樹状細胞がNK細胞を活性化し、Fas/FasL pathway を介して感染肝細胞のアポトーシスを誘導すること

を見出した。

・研究分担者(上田啓次)

ヒト肝癌培養細胞株 Huh6 に HBV ゲノムをタンデム化して組込んだ細胞 HB611 は、HBV を産生する。HBV の産生による宿主遺伝子発現プロファイルの変化について検討した。今回は non-coding short RNA (ncsRNA) を除いた mRNA について解析した。

・研究分担者(中本安成)

本年度は、HBV 表面抗原 (HBsAg) のエピトープ (CTL-L^d 拘束性 HBs28-39 を含む) が誘導する慢性肝炎において、ウイルス産生を制御する分子免疫機序について検討した。慢性肝炎マウスモデルにおいて18 ヶ月の経過中に得られた肝組織について発現遺伝子プロファイルを解析した。免疫細胞学的検討として慢性肝炎を誘導する細胞分画について検討したところ、肝細胞障害には CD8 陽性分画が作用しているものの、ウイルス産生の制御には CD4 陽性分画が強く作用している可能性が示唆された。

・研究分担者(橋本真一)

今年度は HBV 感染細胞株の準備とエピゲノム解析の準備をした。B 型肝炎ウイルス (HBV) 産生培養細胞株である HepG2. 2.15 細胞と非産生細胞からゲノムを単離後、メチル化されている部位だけを切り出すことが出来る制限酵素 MspJI を使用し、DNA メチル化を検討した。

・研究分担者(小原恭子)

ツパイの感染実験を行うため、飼育設備や感染実験用設備の整備を進めた。現在55%以上のゲノムシーケンスが終了しており、そのゲノム情報から免疫反応を担うツパイの分子の mRNA の核酸配列を解析した。免疫反応の解析に必要な抗体の作成を共同研究者の小原道法博士（東京都医学研究所）と進めた。今年度はサイトカインや CD マーカー、レセプター、自然免疫、シグナル分子などを認識する主要な抗体を既に 80 種類作成した。

・研究分担者(村上清史)

HBx ORF、HBV EnhI 及び Enh II など HBV 転写制御域等に変異を持つ各種 HBV レプリコン系の構築と、トランスに働く野生型及び各領域に変異を持つ HBx 発現系を準備し、HBV 持続産生細胞から HBV 粒子の高効率な産生条件の検討と濃縮 HBV 粒子を用いた感染系の構築の検討を開始した。

・研究分担者(石川哲也)

マウス (H-2d) においては、HBs 及びケモカイン遺伝子 (IP-10、Mig、RANTES) を含むプラスミド DNA での免疫により HBs 抗原特異的 CTL の誘導効率の比較を行った。

・研究分担者(考藤達哉)

HepG2. 2. 15 との培養によって、PDC は I 型 IFN を産生し、BDCA3+DC は III 型 IFN を多量に産生した。HBV 陰性の親株や UV によって HBV 複製を不活化した細胞との共培養では、いずれの DC から IFN は産生されなかった。IFN 産生が確認された系では、肝癌細胞に ISG15、Mx1 などの ISG が

強く誘導された。DC は HBV を認識して、I 型、III 型 IFN を産生し、肝細胞の ISG 誘導に関与することが明らかになった。

・研究分担者(高橋 健)

ヒト急性・慢性 B 型肝炎における免疫学的活性化状態の差異を明らかにするため、急性肝炎と慢性肝炎の急性増悪例を対象とし、各症例における末梢血単核球を経時的に分離採取し RNA 抽出を行った。これらのサンプルを用いてマイクロアレイ解析 (Agilent Technologies, SuperPrint G3 Human GE 8x60K Ver. 2. 0) を行い、それぞれの症例内での経時的な遺伝子発現プロファイルを解析した。急性肝炎症例で特徴的なこととしては、複数の Toll-like receptor (TLR) の発現亢進が確認された。

・研究分担者(加藤孝宣)

B 型肝炎患者血清中から DNA を抽出し、2 組のプライマーセットを用い HBV ゲノム全長を増幅した。増幅した PCR fragment をクローニングした後に、各 fragment 5 本ずつのシーケンスを確認し、患者中で増殖している HBV のコンセンサス配列を決定した。得られたコンセンサス配列を元に、HBV のすべての ORF を発現するような 1. 25 倍長の HBV ゲノムを持つコンストラクトを構築した。

・研究分担者(村口 篤)

モデルシステムとして、HLA-A24 陽性のボランティアの末梢血リンパ球の中から、EB ウイルス特異的 T 細胞を検出し、その TCR を取得することを試みた。EB ウイルス

特異的 T 細胞は、EB ウイルス由来ペプチドと HLA-A24 分子の複合体の四量体を用い、フローサイトメータを用い検出・回収した。回収した単一の細胞より RT-PCR 法により、TCR cDNA を増幅し、それを TCR 陰性の T 細胞株に遺伝子導入し、TCR を細胞表面に発現させた。取得した TCR が EB ウイルス特異的か否かを、ペプチド/MHC 四量体による染色により解析した。

・研究分担者(池田裕明)

①TCR 改変ヒト T 細胞輸注療法の効果、安全性を評価するインビボ評価系を確立した。②独自開発の siTCR 技術に、2A ペプチドの導入とジスルフィド結合を組合せ、導入 TCR 遺伝子の発現を高めると共により安全性の高い新規ベクターの開発を行った。③エコトロピックレトロウイルスベクターによる TCR 遺伝子導入リンパ球輸注療法のマウスモデルを確立し、様々なベクター構造や輸注プロトコールの同種インビボ評価系を確立した。

・研究分担者(石井 健)

ペプチドワクチンの候補アジュバントの選定と全臨床試験の予備実験をモデル抗原を用いて行った。人で既に上市されて用いられているアラムアジュバントをコントロールとして TLR9 リガンドである CpGODN やその他 TLR リガンド、粒子アジュバント、新規アジュバントを用いて抗原特異的な免疫反応のキャラクタライゼーションを行った。

・研究分担者(小原道法)

3 種類の組換えワクチニアウイルス (HCVCN2⁻、HCVCN5⁻、HCVCN25-RVV) を構築し、これら HCV-RVV を申請者らが作製した慢性 C 型肝炎のモデルマウスである HCV/Cre-Tg マウスに接種した。HBV 遺伝子型 C の 1) preS1-S2-S、2) preS2-S、3) S 蛋白質領域を LC16m8 株の HA 遺伝子領域に組み込んだ HBV-rVV を 3 種類作製し、その蛋白質発現を確認した。

・研究分担者(水腰英四郎)

B 型肝炎ウイルス (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 拘束性細胞障害性 T 細胞 (CTL) エピトープの予測を行った。免疫学的解析に用いるためのペプチドを作製した。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。

C. 結論

本年度は 1) cccDNA の存在様式、および遺伝子発現調節機構の研究、2) cccDNA 感染細胞に対する免疫監視機構の研究、3) cccDNA 感染細胞に対する免疫治療法の開発を開始した。今後は(1) cccDNA を測定するシステムの確立と治療応用、(2) cccDNA 合成に影響を与える ncsRNA の治療応用、(3) 抗 HBV 反応を増強する免疫賦活薬の開発、(4) Epigenome と HBV cccDNA 発現調節機構、(5) ツパイ HBV 感染実験モデルの樹立と免疫治療薬の薬効評価、(6)

HBVccc 肝細胞株の樹立と HBVccc の制御機構、(7) HBV 免疫寛容打破のための高効率免疫法の開発、(8) 樹状細胞、Exosome と Natural adjuvant の検討、(9) HBV 免疫関連分子の機能解析、(10) HBV ゲノムをターゲットにした人工 DNA ヌクレアーゼ (TALEN) の作製、(11) 標的とする抗原同定と TCR をクローニング、(12) HBV 特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞の効果、安全性を評価、(13) HBV の既知の envelope、core 領域エピトープを含んだペプチド+アジュバント、(14) HBV の envelope あるいは core 領域を含んだ rVV 株、(15) ペプチドワクチンの作製、を課題とする。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

各分担研究報告書を参照。

F. 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

特になし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

研究代表者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発のため、B型慢性肝炎における肝組織遺伝子発現の特徴を明らかにすることを目的とした。B型慢性肝炎36例、C型慢性肝炎35例及びB型肝炎17例、C型肝炎17例の肝組織を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。B型慢性肝炎とC型慢性肝炎の肝組織に於ける遺伝子発現の解析から、B型慢性肝炎では細胞死の誘導、免疫系の抑制が起こっていた。さらに、HBV-DNA量との関連から、HBVが癌遺伝子を誘導し、獲得免疫を抑制している可能性も示唆された。発癌過程に於ける解析では、HBVの転写産物とAP1シグナルを介したB型肝炎組織の遺伝子発現制御の存在が明らかとなった。

A. 研究目的

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発のため、B型慢性肝炎における肝組織遺伝子発現の特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

B型慢性肝炎36例、C型慢性肝炎35例及びB型肝炎17例、C型肝炎17例の肝組織を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。肝組織よりRNAを分離し、mRNAをT7ポリメラーゼによるlinear amplification法にて均等に増幅し、Cy5でラベルした。一方、正常肝組織より得られたmRNAをCy3でラベルし、スライド上のcDNAに競合的にハイブリさせた。マイクロアレイにはSAGE (serial analysis of gene expression) 法により様々な肝疾患で発現する遺伝子より選出された約1万クローンを有するIn-house cDNAマイクロ

アレイを使用した。発現解析はBRB-array tool (NCBI)を用いた。またパスウェイ解析にはMetaCore (GeneGo)による遺伝子情報を用い、さらにGraphical Gaussian modeling (GGM)により、各クラスター間の因果関係を算出することによって、慢性肝炎から肝癌に至るパスウェイの変化を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究において試料提供者、その家族・血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて十分な配慮を行った。本解析は遺伝子発現及び蛋白の発現についての解析であるが、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省)に準じた十分な対応を行い、患者よりの試料採取については、金沢大学の「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」で承認された説明文書を用いてインフォームドコンセントを得て

行っており、十分な対応を行った。

C. 研究結果

B 型慢性肝炎と C 型慢性肝炎では肝組織に於ける遺伝子発現の違いが認められた。B 型慢性肝炎では抗原提示分子、IFN シグナル、PDGF シグナル、コレステロール合成経路の発現低下が見られた。一方、細胞死、DNA 修復、ペルオキシソームの発現亢進が見られた。また、肝浸潤リンパ球をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) にて採取し、網羅的遺伝子発現解析を行うと、B 型慢性肝炎の浸潤リンパ球で Th1 優位の T 細胞シグナルの増加が見られた。一方 C 型慢性肝炎では Th2 優位の T 細胞シグナルの増加とケモカインの発現誘導が見られた。肝組織に於ける HBV-DNA 量と相関する遺伝子を相関係数と有意水準から検出すると、HBV-DNA 量と正相関する遺伝子として Raf, Myc, Vav3 などの癌遺伝子、Notch シグナルの Hes1、幹細胞の自己複製に関わる遺伝子との関連性が認められた。また、HBV-DNA 量と逆相関する遺伝子としてケモカイン、クラス II 抗原提示分子、CD4、CD8 抗原など獲得免疫関連分子が認められた。

B 型肝炎及び C 型肝炎の遺伝子発現解析では、B 型肝炎では血管新生・細胞周期関連遺伝子の発現増加を認め、C 型肝炎では免疫応答に関与する遺伝子の発現亢進が認められた。GGM を用いた慢性肝炎から肝癌の遺伝子発現に影響を及ぼす遺伝子の探索の結果、B 型慢性肝炎では DNA 修復反応に関与する遺伝子が肝癌の AP1 シグナルを中心とした遺伝子発現制御に関与していた。

また、B 型肝炎組織では AP1 シグナルが細胞死や代謝関連の遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。興味深いことに HBV の転写産物が肝癌の AP1 シグナルの発現と密接に関わっていることがパスウェイ解析から明らかとなった。

一方、C 型慢性肝炎では、STAT1 シグナル及び PTEN シグナルが、肝癌の EGR1 シグナルと関連している可能性が示された。

D. 考察

B 型慢性肝炎と C 型慢性肝炎の肝組織に於ける遺伝子発現の解析から、B 型慢性肝炎では細胞死の誘導、免疫系の抑制が起こっていた。さらに、HBV-DNA 量との関連から、HBV が癌遺伝子を誘導し、獲得免疫を抑制している可能性も示唆された。発癌過程に於ける解析では、HBV の転写産物と AP1 シグナルを介した B 型肝炎組織の遺伝子発現制御の存在が明らかとなった。

E. 結論

1. B 型慢性肝炎における Transcriptome の特徴として DNA 損傷、アポトーシス誘導、転写因子、癌遺伝子の活性化が明らかとなった。
2. HBV-DNA 上昇に伴う免疫抑制作用が示唆された。
3. HBV 肝癌発症と HBV 遺伝子発現との関連が示唆され発癌予防には HBV の完全排除が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* (in press)
 - 2) Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Arihara F, Kagaya T, Yamashita T, Fushimi K, Kaneko S. Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* (in press)
 - 3) Mizuno H, Honda M, Shirasaki T, Yamashita T, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in association with hTERT is a potential biomarker for hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2012;32:1146-55.
 - 4) Mizukoshi E, Fushimi K, Arai K, Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Expression of chondroitin-glucuronate C5-epimerase and cellular immune responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2012;32:1516-26.
 - 5) Okada H, Honda M, Campbell JS, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, Shirasaki T, Takabatake R, Nakamura M, Sunagozaka H, Tanaka T, Fausto N, Kaneko S. Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. *Cancer Res* 2012;72:4459-71.
 - 6) Kitao A, Matsui O, Yoneda N, Kozaka K, Kobayashi S, Koda W, Gabata T, Yamashita T, Kaneko S, Nakanuma Y, Kita R, Arii S. Hypervascular hepatocellular carcinoma: correlation between biologic features and signal intensity on gadoxetic acid-enhanced MR images. *Radiology* 2012;265:780-9.
 - 7) Oishi N, Kumar MR, Roessler S, Ji J, Forgues M, Budhu A, Zhao X, Andersen JB, Ye QH, Jia HL, Qin LX, Yamashita T, Woo HG, Kim YJ, Kaneko S, Tang ZY, Thorgeirsson SS, Wang XW. Transcriptomic profiling reveals hepatic stem-like gene signatures and interplay of miR-200c and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2012;56:1792-803.
 - 8) Shugo H, Ooshio T, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Muraguchi T, Tamase A, Uema N, Yamashita T, Nakamoto Y, Suda T, Kaneko S, Hirao A. Nucleostemin in injury-induced liver regeneration. *Stem Cells Dev* 2012;21:3044-54.
2. 学会発表
- 1) Nio K, Yamashita T, Honda M, Okada H, and Kaneko S. Involvement of chromatin remodeling enzyme CHD4 in chemoresistance of EpCAM+ hepatic cancer stem cells. the 63st Annual Meeting of the American Association for the Study

of Liver Diseases, Oral, Boston, U.S.A. Nov
12th 2012.

- 2) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y,
Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Nio K,
Hara Y, Wang XW, and Kaneko S. Distinct
liver cancer stem cells defined by EpCAM
and CD90 in human hepatocellular
carcinoma. 日本癌学会学術集会 2012
2、口演、札幌、2012年9月19日
- 3) 山下太郎、本多政夫、金子周一 肝癌
幹細胞の多様性と進化、シンポ、
JDDW2012、口演、神戸、2012年11月11
日
- 4) 山下太郎、本多政夫、金子周一 肝細
胞癌の分子分類、教育基調シンポ、第
48回日本肝癌研究会、口演、金沢、
2012年7月20日

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

特になし

ヒト肝細胞キメラマウスを用いたB型肝炎ウイルス感染モデル

今村 道雄 広島大学病院 消化器・代謝内科 診療講師

研究要旨：HBVのcccDNAを制御または排除する新規治療法の開発には、その有効性の評価が可能となるモデル動物が有用である。本研究の目的は、ヒト肝細胞キメラマウスを用いてHBV感染マウスを作製し、肝臓内HBVcccDNAを定量するシステムを構築することである。本年度は準備期間として治療の評価が可能となるHBV感染マウスの作製を行った。HBV患者血清あるいはHBV発現plasmidを用いて、野生型あるいは変異型HBV感染マウスを作製した。これらのマウスは抗ウイルス剤の効果判定に有用であった。今後、本マウスを用いて肝臓内cccDNAを測定するシステムを構築し、cccDNAを制御または排除する新規治療法の評価に応用する。

A. 研究目的

HBV 持続感染マウスを用いて肝臓内cccDNA を測定するシステムを作製し、cccDNA の制御と排除を目指す新規治療の効果判定に利用する。

B. 研究方法

ヒト肝細胞キメラマウスにHBV陽性患者血清あるいは、1.4倍長のHBV発現plasmidをHepG2細胞にtransfectionした培養上清を静脈内投与した。2週おきにマウス血中HBVDNA量を測定し、投与8週後、マウス肝組織を免疫組織学的に検討した。

（倫理面への配慮）

投与する血清は患者の同意が得られてものを使用した。

C. 研究結果

HBV血清投与により、マウス血中HBVDNAは 10^6 - 10^8 copy/mLに上昇した。抗ヒトアルブミン抗体および抗HBc抗原抗体を用いた免疫染色により、置換されたヒト肝細胞に特異的にHBVが感染していることが確認された。野生型あるいはラミブジン耐性変異（rtL180M+M204V）を挿入したHBV発現plasmidをHepG2細胞にtransfectionし、48時間後に回収した細胞培養上清をマウスに投与したところマウス血中HBVDNAは定量可能となった。これらのマウスに30 mg/kgのラミブジンを2週間連日経口投与したところ、血中HBVDNAは野生型HBV感染マウスでは2-3 log copy/mL低下したのに対し、ラミブジン耐性変異型HBV感染マウスではほとんど低下しなかった。これらの結果から作製したHBV感染マウスは薬剤の評価に有用と思われた。

D. 考察

患者血清およびHBV 発現 plasmid を用いて野生型あるいは変異型 HBV 感染マウスが作製された。これらマウスは新規治療法の効果判定に有用と思われる。

E. 結論

野生型あるいは変異型 HBV 感染マウスを作製した。今後、本マウスを用いて肝臓内 cccDNA を測定するシステムを構築していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Nelson Hayes C, 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 by Fas/FasL interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology* 56(2):555-566, 2012

2. 学会発表

1) Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, C. Nelson Hayes, Masataka Tsuge, Shoichi Takahashi, Hiroshi Aikata, Hiromi Abe, Daiki Miki, Hidenori Ochi, Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato, Hideki Ohdan, Kazuaki Chayama. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer by Fas/FasL interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. The 63th Annual Meeting of the American Association for the Study

of Liver Diseases. Boston, 2012

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

特になし

HBV感染細胞で増減するnon-coding short RNAの発現プロファイルと

HBV増殖制御機構の解析

上田 啓次 大阪大学大学院 教授

研究要旨： 外来微生物による感染ストレスは、免疫系を中心にした感染個体におけるグローバルな生体反応を引き起こす。ウイルスの場合、細胞内へ侵入することが、そのウイルスの感染サイクルを完遂する最低条件になるが、感染した細胞内においても様々な抗ウイルス反応が起こりうる。ウイルスはこの反応に対して、自己遺伝子産物により宿主の機能を修飾して巧みに娘ウイルス産生へと向かわせる。本現象に関わる機能性RNAとしてmicroRNA (miRNA)が注目されているが、本課題では、HBV感染に伴い、miRNAを含め、どのようなnon-coding RNA (ncsRNA)が発現し、どのような機能を発揮することでウイルス増殖の制御、特にcccDNAの生成・維持に関わっているのかを解析する。本研究過程では、恒常的にHBVを産生するように仕組んだ細胞（HB611）とその親細胞株において、どのような遺伝子発現プロファイルの差があるのかを含め、ncsRNA発現の差異、ribosome RNA profiling等種々の観点からHBV感染・増殖における宿主遺伝子発現、新規のHBVの転写産物、ORFを探索し、cccDNA産生と維持機構について解明する。本年度は、恒常的にHBVを産生するように仕組んだHB611とその親株Huh6における遺伝子発現プロファイル解析により、HBV増殖により5%程度の宿主遺伝子発現が16分の1以下に低下し、2%程度の遺伝子が16倍以上増加することが解った。

A. 研究目的

恒常的にHBVを産生するように仕組んだ細胞（HB611）とその親細胞株において、どのような遺伝子発現プロファイルの差があるのかを含め、ncsRNA発現の差異、ribosome RNA profiling等種々の観点からHBV感染・増殖における宿主遺伝子発現、新規のHBVの転写産物、ORFを探索し、cccDNA産生と維持機構について解明する。最大の目標は、これらの解析からcccDNAの生合成・維持に関わる新規の因子、特に

宿主或はウイルス ncsRNA、新規ウイルス ORFを見出すことである。

B. 研究方法

HB611細胞及びHuh6細胞からRNAを抽出し、Affymetrix®製DNAアレイ、human genome U133を用いて遺伝子発現プロファイルを解析した。

（倫理面への配慮）

本年度の研究実施に当たっては該当する事項はないものと思われる。