

### C. 研究結果

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)ではなく、mRNAについて解析した。詳細なデータ発掘はこれからであるが、ヒト遺伝子51,000個（重複を含む）について解析し、親株Huh6での発現が1/8以下の遺伝子が1015個、逆に8倍以上多い遺伝子が2064個あり、HBV産生により多くの遺伝子発現が変動することがわかった。

また、HBx が関わる発癌経路、Src、JACS、p53 等は本系では殆ど作動していないことが判明した。

### D. 考察

HBV の遺伝子発現、複製、粒子形成は宿主の遺伝子発現に大きな影響をもたらすことが予測された。変化を伴う遺伝子にインターフェロン等の自然免疫を含め、免疫系に作動し、慢性炎症や細胞増殖、発癌に関わる遺伝子について詳細に検討する必要がある。

また、今後、本来の目的である ncsRNA や ribosome profiling に取掛かり、cccDNA の生合成・維持に関わる新規 transcript、ORF について解析していきたい。

### E. 結論

HBV の遺伝子発現、複製、粒子形成は遺伝子発現の観点で宿主細胞に多大な影響を

与えると考えられた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 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 Tying, S., ed., In-Tech ISBN 978-953-51-0186--4. pp93-104, 2012.
- 2) Ueda, K., Ohsaki, E., Nakano, K., and Zheng, X. “Characterization of Kaposi’s sarcoma-associated virus-associated lymphomas by DNA array analysis.” In "Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD). Leukemia Research and Treatment. doi:10.4061/2011/726964
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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.2012.03.001.

3. その他  
特になし

6) 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.

7) 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.

8) Ueda, K., Ohsaki, E., and Omori, H.  
“Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype; a versatile tool for Identification of the HBV Receptor and Investigation of HBV infectivity.” Biophys. Res. Comm. under revision.

9) 上田啓次. HHV-8 「病原細菌・ウイルス図鑑」新居志郎ら編、北海道大学出版会（編集中）

10) 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.

11) 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.

#### 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

抗HBV反応を増強する免疫賦活分子の探索

中本 安成 福井大学医学部第二内科 教授

**研究要旨：**宿主の免疫監視機構は肝細胞に表出している微量のB型肝炎ウイルス（HBV）抗原を正確に認識し特異的な免疫反応を誘導する。本年度は、HBV表面抗原（HBsAg）のエピトープ（CTL-L<sup>d</sup>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ヵ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。K-meansクラスタリング解析において9つの遺伝子群に分類され、なかでもクラスター5：274個の遺伝子群の発現が慢性肝炎の全経過にわたって持続していた。これより、クラスター5にウイルス産生を抑制する分子病態が含まれている可能性が示唆された。また、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。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）cccDNAは、ウイルスゲノムとすべての構成タンパクの鋳型になっているものの、その発現や制御の分子メカニズムは不明のままである。これまでウイルスタンパクの発現は、サイトカインなどの免疫機序によって制御されることが報告されてきたが、慢性に経過するHBV感染症において抗ウイルス作用に関わる免疫病態やcccDNAに及ぼす影響についての詳細な検討は行われて来なかった。本研究では、HBV慢性感染状態における抗ウイルス免疫の本態を解析するために、ウイルス蛋白（表面抗原HBsAg）の遺伝子導入マウスモデルを用いて、分子・細胞免疫機序について検討した。

B. 研究方法

既報のHBVに対する細胞障害性Tリンパ球エピトープ（L<sup>d</sup>拘束性HBs28-39）を含む免疫反応が、慢性肝炎を発症するモデルが確立されている（Nakamoto Y, et al., J. Exp. Med. 188:341, 1998; Cancer Res. 64:3326, 2004）。本モデルにおいて、胸腺摘除、骨髄再構築、脾細胞移植の操作によって、慢性肝炎を誘導し約18ヵ月の経過で肝細胞がん（肝がん）を発症するという特長がある。本研究では、経時的に得られた肝組織を用いて、網羅的発現解析（DNAチップ）を行った。また、CD4およびCD8陽性脾細胞分画を移植した際の肝組織を用いて、HBsAgの発現を免疫組織学的

に検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、動物愛護と動物福祉の観点から適切な配慮を行うため、各法令に基づき当該研究を実施した。また、実施機関の倫理委員会あるいは実験動物委員会の審査と承認を得て行った。

### C. 研究結果

1) 肝炎発症9ヵ月および18ヵ月後の免疫組織学的検討において、肝組織におけるHBsAgの染色性が著明に低下していた。

2) 経時的な網羅的発現解析において、クラスター#1-9に分類された。なかでも、クラスター5:274個の遺伝子群は肝炎の慢性期に持続的な発現亢進を示した(K-means Cluster Analysis; ANOVA)。

3) クラスター5に関するパスウェイ解析において、T-cell receptor, CSF2Rなどの受容体を介してNFkB, NFAT, STATシグナルなどが刺激される細胞内経路が活性化されていた(Fisher's Exact Test)。

4) HBsAgの肝組織における染色性の低下に関して、肝炎急性期(発症7日目)ではCD8陽性分画を移植したマウスで顕著であったが、慢性期(発症18ヵ月目)においてはCD4陽性分画を移植したマウスにおいて著明に低下していた。

### D. 考察

本研究のB型肝炎モデルにおける慢性期にHBsAg発現が低下していることから、強い抗ウイルス作用を示す免疫反応が長期間にわたり持続していることが示唆された。これまで患者検体を用いてHBV慢性感染

状態の抗ウイルス免疫に関する多くの検討がなされてきたが、その反応性の変化が微妙であることや肝臓内の病態解析には限界があったため、詳細な分子・細胞免疫機序には不明な点が多く残されてきた。本モデルの病態、経過は患者検体と酷似しており、これらの問題点を補うことに適していると考えられた。

抗ウイルス作用の分子免疫機序に関する経時的な網羅解析で示されたT-cell receptor, CSF2Rなどの受容体を介したNFkB, NFAT, STATシグナルの活性化は、これまで培養細胞や急性肝障害モデルでの抗ウイルス免疫に関わることが報告されてきたものである。本研究でみられた知見は、慢性に経過する病態に関するものであり、今後の詳細な解析によって慢性肝炎における新たな細胞内メカニズムが明らかになる可能性が示唆された。

抗ウイルス作用の細胞免疫機序について、これまで急性肝障害モデルなどを用いてCD8陽性Tリンパ球が主体であることが示されてきたが、本研究の慢性期に関する検討ではCD4陽性分画がより強く作用していた。慢性肝炎においてCD4陽性分画が強い抗ウイルス免疫を発揮する詳細な機序は、いまのところ不明であるが、慢性期における感染病態、cccDNAの制御に関わる重要な所見と考えられた。

### E. 結論

HBV表面抗原HBsAgのエピトープ(CTL-L<sup>d</sup>拘束性HBs28-39を含む)が誘導する慢性肝炎モデルの抗ウイルス反応について、分子免疫機序として274個の遺伝子

からなるクラスターの関与が示唆され、細胞免疫機序としてCD4陽性分画が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsuda H, Ito Y, Suto H, Yamakawa A, Satomi S, Ohtani M, Yamazaki Y, Kusaka Y, Shimabukuro Y, Kikuchi K, Keida Y, Azuma T, Nakamoto Y: Clinical relevance and sequence analysis of the *Helicobacter pylori* dupA region from two areas in Japan with different gastric cancer risks. *Immunogastroenterology* 2012; 1: 127-135.
- 2) Marukawa Y, Nakamoto Y, Kakinoki K, Tsuchiyama T, Iida N, Kagaya T, Sakai Y, Naito M, Mukaida N, Kaneko S: Membrane-bound form of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy in a model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2012; 19: 312-319.
- 3) 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: 3044-3054.
- 4) Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, Honda M, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y: Guideline on the use of new

anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. *Hepatol. Res.* 2012; 42: 523-542.

- 5) Miwa S, Nishida H, Tanzawa Y, Takata M, Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Kimura H, Igarashi K, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S, Tsuchiya H: TNF- $\alpha$  and Tumor Lysate Promote the Maturation of Dendritic Cells for Immunotherapy for Advanced Malignant Bone and Soft Tissue Tumors. *PLoS One.* 2012; 7: e52926.
  - 6) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Kondo TH, 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* 2012 (in press).
- ### 2. 学会発表
- 1) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: MicroRNA Dynamics in Precancerous Lesions in a Mouse Model of Chronic Hepatitis B. 第63回 **American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 56 (4, Suppl.) 315A; 一般; oral: Nov. 13, 2012.
  - 2) Naito T, Nemoto T, Matsuda H, Ohtani M, Suto H, Nakamoto Y: High Incidence of HBV Reactivation after R-CHOP and CHOP Regimens among Patients Treated with Six Immunosuppressive Chemotherapies. 第63回 **American**

**Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 56 (4, Suppl.) 643A; 一般; poster: Nov. 11, 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感染細胞のエピゲノム

橋本 真一 金沢大学医学保健研究域医学系 特任教授

研究要旨：HBV増殖感染および潜伏感染時においてエピジェネティックな制御がHBVcccDNAの遺伝子発現制御に関与していることが報告されている。しかしながらcccDNAの産生促進、抑制に関与する分子機構について詳細な検討はされていない。そこで今回、臨床検体、Full length HBV DNAを発現する培養細胞系、またHBVを感染させたヒト型肝臓キメラマウスを用いて、cccDNAの発現制御についてエピジェネティックな観点から解明する。今年度はHBV産生細胞株の準備、さらに新たなDNAメチル化測定法を検討した。従来のメチル化測定法はサンプル量を必要とし、実際の臨床サンプルでも測定は困難である。そこで、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。その結果1～10ng程度のゲノムでDNAメチル化が測定できることが明らかになった。また、この手法を用いHBV産生細胞株、HepG2. 2. 15. 7にてゲノムワイドなDNAメチル化を調べ、非産生細胞株、HepG2と比べてメチル化に差のある部位を同定した。

A. 研究目的

HBV 増殖感染および潜伏感染時においてエピジェネティックな制御がHBVcccDNAの遺伝子発現制御に関与していることが報告されている。しかしながらcccDNAの発現促進、抑制に関与する分子機構について詳細な検討はされていない。そこで今回、臨床検体、Full length HBV DNAを発現する培養細胞系、またHBVを感染させたヒト型肝臓キメラマウスを用いて、宿主ゲノム、HBVcccDNAのヒストン修飾やDNAメチル化の状態とその制御に関わるポリコム群やトライソラックス群タンパク複合体について検討し、cccDNAの発現制御について解明する。一方、cccDNAの転写活性化領域

が宿主ゲノム上に存在する可能性も考えられることから、核内で3次的に宿主ゲノムとcccDNAが近接する領域をChromosome Conformation Capture assay(3Cアッセイ)で検出し、新たなcccDNAの転写活性化領域存在の可能性を検討する。

B. 研究方法

肝細胞株であるHepG2, HBV産生細胞株HepG2. 2. 15. 7細胞からゲノムとmRNAをそれぞれ単離し、SAGE法により遺伝子発現、またDNAメチル化感受性酵素、MspJIによりメチル化を観察した。メチル化測定においてはゲノムを単離後、MspJIにより消化し、電気泳動にて30-35bpを切り出し、次

世代シーケンサーである 5500/ライブテクノロジーのリンカーを両端に付加してシーケンスした。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針の規程, 二種使用等拡散防止措置承認に関しては手続き済み。

### C. 研究結果

1, HBV 産生細胞株においてエピジェネティックな変化が cccDNA の量を変化させるか調べる目的で、HepG2. 2. 15. 7 をヒストン脱アセチル化阻害剤、TSA (500nM) 及び脱メチル化剤、5-aza-2'-deoxycytidine (1  $\mu$ M) で 3 日間処理した後、cccDNA 特異的プライマーにて real-time PCR を行った。その結果、cccDNA の細胞あたりの量の増加が観察され、エピジェネティックな変化が cccDNA の量に影響を与えていることが示された。

2, メチル化部位 (meCGNR) だけを切り出す制限酵素, MspJI を使用し, DNA メチル化を検討した。その結果、1~10ng 程度のゲノムで DNA メチル化の測定が可能となった。

3, 上記の方法を用いて HepG2 及び HBV 産生細胞株, HepG2. 2. 15. 7 のゲノムワイド DNA メチル化を次世代シーケンサーを用いて調べた。HepG2 から約 2000 万、HepG2. 2. 15. 7 から約 3000 万のゲノムにヒットした tag (配列) を得た。両細胞株間で、約 900 箇所について DNA メチル化の相違を認めた。

この変化した領域の遺伝子は、“multicellular organismal development”、“cellular component

organization”、“biological regulation”、“developmental process” に関与する遺伝子であった。

### D. 考察

今回、宿主のゲノムにおけるメチル化変化が測定できたが、cccDNA ミニクロモゾームのメチル化を宿主ゲノムと同時に観察出来なかった。この理由は精製法に問題があると考えられ、次回は精製を変えて cccDNA ミニクロモゾームのメチル化を測定する。また、本実験では HepG2 と HepG2. 2. 15. 7 を比較したが、今後は Tet-off の系が利用出来る Hep AD38 細胞を使用して、同じ細胞株内での HBV 産生の ON-OFF による宿主ゲノムと cccDNA ミニクロモゾームのエピジェネティックな変化を測定する予定である。

### E. 結論

本研究において DNA メチル化感受性酵素, MspJI を利用した、ゲノムワイド DNA メチル化解析を確立した。また、少量の細胞での適用も可能となった。さらに、この方法を用いた解析により、HBV 産生によって宿主のゲノム DNA のメチル化が大きく変化することが明らかになった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Qu, W., Hashimoto, S., Shimada, A., Nakatani, Y., Ichikawa, K., Saito, TL, Ogoshi, K, Matsushima, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Takeda, H., Morishita, S. Genome-wide genetic variations are highly



correlated with proximal DNA methylation patterns. Genome Res. 22, 1419-1425.2012

(査読有)

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

特になし

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

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 鹿児島大学 教授

**研究要旨：**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。また、ツパイを実験動物として樹立するため、全ゲノム解析を進め、今年度中に終了する予定となっている。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分子mRNAの核酸配列を解析した。これらの情報に基づき、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80種類以上の作成に着手した。ツパイのゲノム情報に基づいて解析した各種分子のアミノ酸配列をヒトとマウスで比較すると、TLR、CDマーカー等多くの分子がヒトにアミノ酸レベルでより高いホモロジーを示した。また、IL-29の様にツパイとヒトにはあるがマウスにはない分子も存在する。以上の事から、ツパイはマウスよりもヒトに近い遺伝情報を持つ実験動物である事が明らかとなった。

A. 研究目的

HBV 感染に対し新規治療法を確立するためには、実験動物モデルが不可欠であるが、現在までのところチンパンジー以外に自然感染動物が存在しない。本研究では、HBV 感染の報告がある小型動物であるツパイを実験動物として確立するため、感受性個体の確立や免疫解析ツールを確立する。

B. 研究方法

ツパイの飼育、繁殖、感染実験に必要な実験用設備の整備を行った。また、ツパイのゲノム DNA を肝臓などの組織から分離し、次世代シーケンサーで全ゲノム配列の決定を行った。独自のコンピューターソフト

を利用して免疫反応に重要な分子の ORF 配列を 100 種以上決定し、この中で抗原性の高いアミノ酸配列を抽出して合成ペプチドを作成し、ウサギに免疫して特異的なポリクローナル抗体の作成を進めた。

（倫理面への配慮）

ヒト肝臓細胞を用いた宿主遺伝子発現解析については、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(H16. 12. 28)、組換えDNA実験については、組換えDNA実験指針(H14. 1. 31)に基づき、実施する。遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、鹿児島大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会の承認を得ている(H24年5月；承認番号24002 ウイルスの

病原性に関わる宿主因子の検討)。動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(H18.6.1)に従う。

### C. 研究結果

ツパイの飼育・繁殖・感染実験に必要な飼育棚やアイソレーター、ケージなどを受注して飼育環境を整えた。また、実験に必要な動物実験等の承認申請も進めた。

ツパイ全ゲノム解析も進め、55%以上が終了した。ゲノム配列に基づく免疫関連分子(TLR, CD マーカー、サイトカイン、ケモカインなど)の ORF 配列をヒト、マウス間で相同性を比較すると、ツパイはマウスよりもほとんどの分子の配列がヒトに近い事が明らかとなった。また、IL-29 の様にヒトにあってマウスにない分子をツパイは持っていた。

### D. 考察

ツパイはかつて原始的な霊長類に分類されていたが、現在は分離されツパイ科ツパイ目に分類されている。ゲノム解析の遺伝子情報からもツパイはマウスよりもヒトに近い事が推測された。

### E. 結論

ツパイは、チンパンジーよりも小型で寿命が短く、マウスよりもヒトに近い遺伝情報を持っており、今後 HBV 研究並びに各種治療薬の効果判定に威力を発揮する可能性が期待できる。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) NE. Salem, M. Saito, Y. Kasama, M. Ozawa, T. Kawabata, S. Harada, H. Suda, K. Asonuma, A. El-Gohary, K. Tsukiyama-Kohara. Genomic polymorphisms in 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 24-reductase promoter sequences. *Microbiol Immunol*. 2012 Dec 28. doi: 10.1111/1348-0421.
- 2) S. Sekiguchi, K. Kimura, T. Chiyo, T. Ohtsuki, Y. Tobita, Y. Tokunaga, F. Yasui, K. Tsukiyama-Kohara, T. Wakita, T. Tanaka, M. Miyasaka, K. Mizuno, Y. Hayashi, T. Hishima, K. Matsushima and M. Kohara Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *Pros One*, 2012;7(12):e51656.
- 3) K. Tsukiyama-Kohara. Role of Oxidative stress in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis C virus. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 15271-8. 2012.
- 4) K. Inoue, K. Tsukiyama-Kohara, C. Matsuda, M. Yoneyama, T. Fujita, S. Kuge, M. Yoshiba, and M. Kohara. Impairment of interferon regulatory factor-3 activation by hepatitis C virus core protein basic amino acid region 1. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 30;428(4):494-9, 2012.
- 5) Saito M, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Hepatitis C virus promotes expression of the 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 24-reductase through Sp1. *J Med Virol.* 84 (5): 733-46, 2012.
- 6) Kasama Y, Saito M, Takano T, Nishimura T, Satoh M, Wang Z, Ali S.N. E. S., Harada S,

- Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. *Virus Research* 163: 405-409, 2012.
2. 学会発表
- 1) Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. Congress of European Association for the Study of the Liver (EASL2012). April 2012 Barcellona
- 2) K. Tsukiyama-Kohara, M. Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. 第11回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2012年9月兵庫
- 3) Satoh, M., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. Antibody against 3 $\beta$ -Hydroxysterol- $\Delta$ 24-Reductase Suppresses Hepatitis C Virus Infection through Betaine/GABA Transporter-1. HCV2012 Oct. Venice
- 4) 佐藤正明、齊藤誠、小原道法、小原恭子. C型肝炎ウイルスの複製に関する新規宿主因子BGT-1. 第71回日本癌学会学術総会2012年9月札幌
- 5) 小原恭子、笠間由里、小原道法. C型肝炎ウイルスのBリンパ腫発症要因解明に向けた研究. 第60回日本ウイルス学会 2012年11月大阪
- 6) Qi, X, Harada, S., Tsukiyama-Kohara, K. Elevation of apoptosis induced by mutant DHCR24 with potential MDM2 binding motif in hepatocytes. 第60回日本ウイルス学会2012年11月大阪
- 7) Takano, T., Kasama, Y., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. Modification of translocase of outer mitochondrial membrane 70 by hepatitis C virus in apoptotic response and interferon induction. 第35回日本分子生物学会 2012 12 月 福岡
- G. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
- 1) 「C型肝炎ウイルス阻害剤」 出願番号 12/241868 出願国 アメリカ 発明者 小原恭子、小原道法 他 出願人 (一般財団法人) 化学及血清療法研究所、財団法人東京都医学研究機構、国立大学法人熊本大学
- 2) 「Hepatitis C virus inhibitors」 出願番号 CA2640954 出願国 カナダ 発明者 小原恭子、小原道法 他 出願人 (一般財団法人) 化学及血清療法研究所、財団法人東京都医学研究機構、国立大学法人熊本大学
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
特になし

HBVccc肝細胞株の樹立とHBVcccの制御機構

村上 清史 金沢大学医薬保健研究域医学系、分子遺伝学 協力研究員

**研究要旨：**HBVの持続感染と再活性化の鍵となるのは、pgRNA合成の鋳型となる核内HBVcccである。HBVccc生成にはHBx機能が必須であり、IFN $\alpha$ によるHBVccc阻害効果がHBV EnhI領域にあることが報告されている。しかしHBVcccに対するそれらの作用機作は未だ不明であり、高効率HBVccc生成系の樹立による分子生物学的な解析が必須である。また、HBV複製に関与する未知の宿主因子の同定はHBVcccおよびpgRNAの制御機構解明に必要である。計画初年度の研究では、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。また、種々の肝癌細胞株の遺伝子プロファイルを検討した。

A. 研究目的

細胞株を用いて HBVccc の維持機構を解明するとともに、HBx、転写因子（HNF4）、転写補助因子（CRB, p300）を導入する系を作成し cccDNA 形成および遺伝子発現の調節機構を検討する。

種々の肝癌細胞株を用いて HBVccc の転写に関与する宿主因子を同定する。

B. 研究方法

B型肝炎ウイルス X 蛋白質の変異体を用いて、HBx の HBVccc に及ぼす影響を評価する。また、IFN- $\alpha$  が HBx のプロモーター領域にあるエンハンサー I の ISRE に

種々の肝癌細胞株（Hep3B, HepG2, Hep40, Huh1, Huh4, Huh7, SK-Hep1, MHCC97, Smmc7721）に HBV レプリコンを導

入、pgRNA および培養液中の HBs 抗原を測定し、宿主因子の cccDNA 転写に関与を検討する。

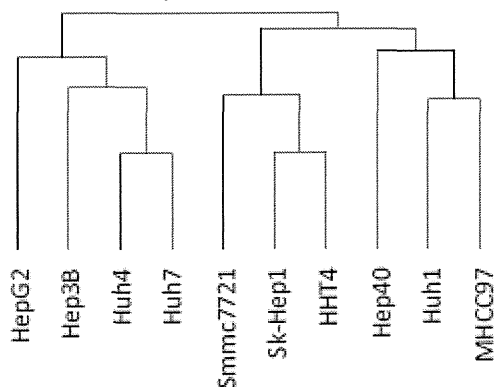
C. 研究結果

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を開始した。また、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。

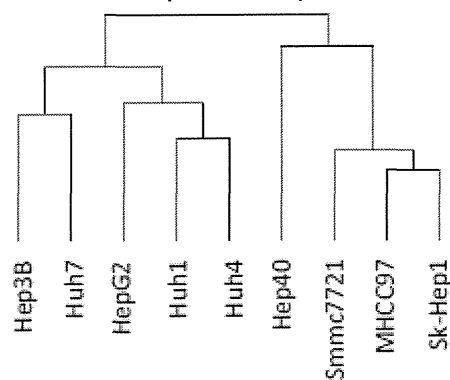
種々の肝癌細胞株（Hep3B, HepG2, Hep40, Huh1, Huh4, Huh7, SK-Hep1, MHCC97, Smmc7721）について、mRNA 発現プロファイル（Affymetrix GeneChip

Human Gene-ST 1.0 arrays) および miRNA 発現プロファイル (NanoString nCounter microRNA) を測定し発現パターンを解析した。mRNA および miRNA の発現パターンでこれらの細胞株はいくつかのサブタイプに分類された。

mRNA expression profile



miRNA expression profile



#### D. 考察

種々の肝細胞癌株を比較検討することによる HBV 複製に関与する宿主因子の同定の可能性が示唆された。

#### E. 結論

肝細胞癌株は mRNA および miRNA の発現パターンによりいくつかのサブタイプに分類され、その特徴が HBV の複製に関与している可能性が示唆された。

#### 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  
特になし

B型肝炎慢性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 名古屋大学大学院医学系研究科医療技術学専攻 教授

**研究要旨：** HBV特異的獲得免疫応答の効率よい誘導法の確立を目指し、B型肝炎慢性患者におけるT細胞エピトープの解析、マウスモデルにおける高効率免疫法確立のための基礎実験を行った。B型肝炎慢性患者16例におけるHBc抗原中のエピトープ解析では、HBc抗原の91～105番目のアミノ酸からなるペプチドに反応するT細胞の比率が最も高いことが示唆され、今後、症例数を追加しての再検証を予定している。マウス（H-2d）においては、HBs遺伝子に加えRANTES遺伝子を併用したDNA免疫法により、HBs抗原特異的CTLの誘導効率が上昇することが示唆された。今後、HBVキャリアのモデルであるHBVトランスジェニックマウスでの免疫実験を計画している。

共同研究者：石上雅敏、名古屋大学医学部附属病院

伊藤弘康、岐阜大学大学院医学系研究科病態情報解析医学

A. 研究目的

HBV cccDNA の制御と排除のためには、効率よいHBV特異的獲得免疫応答の誘導法の確立が必要である。現在、感染予防に使用されているHBs抗原ワクチンは、B型肝炎慢性疾患患者に使用した場合のウイルス制御効果が報告されているものの、効率の面で十分とは言えず、免疫時に誘導される獲得免疫応答の量的、質的解析も十分になされていない。本研究では、高効率な免疫法の確立を目的として、B型肝炎慢性患者におけるT細胞エピトープの解析、マウスモデルにおける高効率免疫法確立のための基礎研究を行った。

B. 研究方法

B型肝炎慢性患者末梢血単核球（PBMC）を、HBc抗原領域（183アミノ酸）をカバーするオーバーラッピングペプチドで刺激、flow cytometryでのT細胞内サイトカイン発現検出法により、高抗原性領域を決定した。

マウス（B10.D2、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。

（倫理面への配慮）

臨床研究は「臨床研究に関する倫理指針」に従って申請を行い、名古屋大学医学部生命倫理審査委員会での承認を取得している。マウスでの研究は同組換えDNA実験

安全委員会及び動物実験委員会での承認を取得している。

### C. 研究結果

B型慢性肝炎患者16例のPBMCを用いた解析では、HBc抗原の86~110番目のアミノ酸からなる領域、特に91~105番目のアミノ酸からなるペプチドに反応するT細胞の比率が最も高いことが明らかになった。同領域に対してはCD4+、CD8+T細胞のいずれの反応比率も高かった。また解析患者のHLA alleleに一定の傾向はなく、同領域に複数のHLA分子によって提示されるエピトープの存在が示唆された。

マウス(H-2d)においては、HBs遺伝子にケモカイン遺伝子(IP-10、Mig、RANTES)を併用したDNA免疫によってCTL誘導効率は上昇する傾向を示し、特にRANTES遺伝子の併用において顕著であった。

### D. 考察

特定のHLAに対する高結合モチーフをエピトープの候補とするのではなく、抗原全領域をカバーするペプチドを用いてエピトープ解析を行うことにより、より反応性の高いエピトープを同定できる可能性がある。今回、HBc抗原中に同定された高反応部位は、B型慢性肝炎患者において報告されるHBc抗原遺伝子欠損部位とも重なり、主要エピトープが存在することが示唆される。今後、症例数を増やし、さらに誘導される免疫応答の質的解析も行うことにより、新規ペプチドワクチンの開発に繋げて行きたい。

免疫効率を向上させるため、アジュバントの併用は有効な手段である。今回、マウスモデルにおいて、ケモカインのアジュバントとしての有用性が示唆されたため、さらにそれを詳細に検証するとともに、HBVキャリアのモデルであるHBVトランスジェニックマウスでの免疫実験を行い、B型慢性肝疾患患者への応用が可能かどうかの検証も行っていく予定である。

### E. 結論

HBc抗原をカバーするオーバーラッピングペプチドを用いた解析により、エピトープ候補となる領域を同定した。また、ケモカインをアジュバントとする免疫法の有用性を明らかにした。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Ishikawa T. Immunoregulation of hepatitis B virus infection -rationale and clinical application-. Nagoya J Med Sci 74: 217-232, 2012.
- 2) Ohtaki H, Ito H, Hoshi M, Osawa Y, Takamatsu M, Hara A, Ishikawa T, Moriwaki H, Saito K, Seishima M. High susceptibility to lipopolysaccharide-induced lethal shock in encephalomyocarditis virus-infected mice. Sci Rep 2: 1-8, 2012.
- 3) Hayashi K, Katano Y, Kuzuya T, Tachi Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Prevalence of hepatitis C virus genotype 1a in Japan and correlation of mutations in the NS5A



region and single-nucleotide polymorphism of interleukin-28B with the response to combination therapy with pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin. J Med Virol 8: 438-444, 2012.

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

特になし

HBV感染症におけるIFN産生樹状細胞の解析

考藤 達哉 大阪大学大学院医学系研究科樹状細胞制御治療学寄附講座 准教授

**研究要旨：**HBVの完全排除のためには、HBV複製抑制に加えて、免疫系が活性化することが必要条件である。樹状細胞（DC）はHBVのゲノム、蛋白などを感知し、I型、III型IFNを産生し、免疫系の活性化に関与する。DCがHBVを感知するシステムとして、TLRやC-typeレクチンなどが想定されるが、その詳細は明らかではない。本年度は、*in vitro*でHBV複製を維持できる肝癌細胞株（HepG2. 2. 15）を用いて、ヒト末梢血や肝組織から分離したDCサブセットと共培養し、DCにおけるI型、III型IFN産生機構を明らかにすることを目的とした。

HBVが複製・産生されるHepG2. 2. 15との培養によって、PDCはI型IFNとIII型IFNを産生したが、BDCA3+DC、MDCはI型、III型IFNとも産生しなかった。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からもIFNは産生されなかった。以上の結果より、PDCはHBVを認識して、I型、III型IFNを産生するサブセットであり、HBV感染症における免疫反応に中心的な役割を果たす可能性が示唆された。

A. 研究目的

樹状細胞（DC）はHBVのゲノム、蛋白などを感知し、I型、III型IFNを産生し、免疫系の活性化に関与する。DCがHBVを感知するシステムとして、TLRやC-typeレクチンなどが想定されるが、その詳細は明らかではない。本年度は、*in vitro*でHBV複製を維持できる肝癌細胞株（HepG2. 2. 15）を用いて、ヒト末梢血や肝組織から分離したDCサブセットと共培養し、DCにおけるI型、III型IFN産生機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

HBVに感染していない健康成人のPBMC

からソーティングによってDCサブセット（PDC、MDC、BDCA3+DC）を採取した。HBV複製を維持するHepG2. 2. 15または親株HepG2と共培養し、上清を回収した。上清中のI型IFN（IFN-a/b）、III型IFN（IL-28A、IL-28B、IL-29）をELISAで測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は大阪大学医学部倫理委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える。

C. 研究結果

HBVが複製・産生されるHepG2. 2. 15との培養によって、PDCはI型IFNとIII型

IFN を産生したが、BDCA3+DC、MDC は I 型、III 型 IFN とも産生しなかった。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。

#### D. 考察

PDC は HepG2. 2. 15 から放出される HBV の Virion や蛋白、HBV ゲノムを含有した細胞構成成分などを認識して IFN を産生すると考えられた。PDC による HBV の認識機構の解明は、免疫反応の制御に繋がる標的分子の同定に繋がる。

#### E. 結論

PDC は HBV を認識して、I 型、III 型 IFN を産生するサブセットであり、HBV 感染症における免疫反応に中心的な役割を果たす可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yoshio, S., Kanto, T., Kuroda, S., Matsubara, T., Higashitani, K., Kakita, N., Ishida, H., Hiramatsu, N., Nagano, H., Sugiyama, M., Murata, K., Hayashi, N., Mizokami, M. and Takehara, T., Human BDCA3+ dendritic cells are a potent producer of IFN- $\lambda$  in response to hepatitis C virus. *Hepatology* (in press)
- 2) Kakita, N., Kanto, T., Itose, I., Kuroda, S., Inoue, M., Matsubara, T., Higashitani, K., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N., Comparative analyses of regulatory T

cell subsets in patients with hepatocellular carcinoma: a crucial role of CD25(-) FOXP3(-) T cells. *Int J Cancer*. 131: 2573-2583; 2012

- 3) Kanto, T., Inoue, M., Oze, T., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Kakita, N., Matsubara, T., Higashitani, K., Hagiwara, H., Iio, S., Katayama, K., Mita, E., Kasahara, A., Hiramatsu, N., Takehara, T. and Hayashi, N., Dynamics of regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells as immune markers for virological response in pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol*. 47: 169-178; 2012
  - 4) 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 Interferon-a suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via the protein kinase C pathway. *Virology* 432: 452-459; 2012
2. 学会発表
  - 1) **Matsubara T, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Higashitani K, Miyazaki M, Hiramatsu N, Kasahara A, Takehara T.** TIE2-expressing monocytes are feasible angiogenesis-related cellular diagnostics for hepatocellular carcinoma: Involvement of inflammatory cytokines in the generation. The Liver Meeting AASLD 63rd Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA, 2012
  - 2) **Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Ishida H, Hiramatsu N,**

**Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Mizokami M, Hayashi N, Takehara T.** Human BDCA3+ dendritic cells in blood and in the liver are a potent producer of IFN-λ in response to hepatitis C virus. The Liver Meeting AASLD 63rd Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA, 2012

なし  
3. その他  
特になし

3) **Higashitani K, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Matsubara T, Kakita N, Oze T, Hiramatsu N, Mita E, Imai Y, Kasahara A, Okuno A, Takikawa O, Hayashi N, Takehara T.** Association of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the generation of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients. The Liver Meeting AASLD 63rd Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA, 2012

4) **Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Mizokami M, Hayashi N, Takehara T.** Human BDCA3+ dendritic cells are a main producer of IFN-λ and induce ISGs in response to hepatitis C virus. The 10<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best practice based on science”, Tokyo, Japan, 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