

201228010A

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

人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした
肝臓内 HBVDNA 不活化を目指した新規治療法の開発

(H24-B 創-肝炎-一般-011)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 溝上 雅史

平成 25(2013)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化研究事業

人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした
肝臓内 HBVDNA 不活化を目指した新規治療法の開発

(H24-B 創-肝炎-一般-011)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 溝上 雅史

平成 25(2013)年 3 月

***** 目 次 *****

I. 総括研究報告書	
研究代表者：溝上雅史	01
II. 分担研究報告書	
1. 研究分担者：片岡一則	05
2. 研究分担者：中西 真	09
3. 研究分担者：武富紹信	13
4. 研究分担者：田中榮司	17
5. 研究分担者：星野真一	21
6. 研究分担者：杉山真也	25
III. 研究成果の刊行一覧	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	39

I. 総括研究報告書

HBV 特異的な人工キメラ遺伝子の開発

研究代表者：溝上雅史 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

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）の感染により、ウイルスゲノムのインテグレーションとウイルスのミニゲノムである cccDNA の形成が生じる。HBV の完全排除に至るには、これら2つの形態に対するアプローチが必要で、これらのウイルスゲノムを不活化しない限り B型肝炎の完治は達し得ない。そこで、人工キメラ遺伝子（ZFN, TALEN）を利用することで、HBVゲノムの特異的な切断と不活化を目指す。HBVゲノム内に保存されている保存領域を抽出し、HBV 遺伝子型に依存せずに ZFN/TALEN の結合が得られる領域を選び出した。上記で設計した領域に対して、ZFN/TALEN を複数種類合成し、その切断活性を酵母の実験系で検討したところ、いずれも良好な切断活性を得た。

今後はそれらを利用してさらに特異性の検証をすべく、哺乳細胞中での切断活性を評価することで効果と安全性を検証していく。

研究分担者

片岡 一則	東京大学大学院工学系研究科・医学系研究科
中西 真	名古屋市立大学大学院医学研究科
武富 紹信	北海道大学大学院医学研究科
田中 榮司	信州大学医学部消化器内科
星野 真一	名古屋市立大学大学院薬学研究科
杉山 真也	国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター 肝疾患研究部

A. 研究目的

本研究は、肝細胞内に残存する B型肝炎ウイルス（HBV）ゲノムを不活化することを目的として、特異的な結合能を持つ人工キメラ遺伝子を合成し、さらに、その肝臓特異的なデリバリーを利用して遺伝子を不活化することを目指している。

HBV 感染が成立するとそのウイルスゲノムは肝細胞ゲノムへインテグレーションすることが知られている。また、細胞核中でミニゲノムを形成し、cccDNA という形態をとって長期に渡り残存する。これらのウイルスゲノムは細胞核内にあることから低分子化

合物といった従来の薬剤では排除することが出来ない。

そこで、Zinc finger 蛋白と制限酵素を組み合わせた人工キメラ遺伝子を合成することで核内での HBVゲノム切断を行う。この切断では非相同性の再合成が伴うため、その遺伝子が不活化されることが知られている。

B. 研究方法

(1) 我々が構築した肝炎ウイルスデータベースは 3000 本以上の配列を収集しており、NCBI 内のデータとリンクして最新のデータを表示している。そのデータを利用して、

HBV ゲノム内で保存されている領域を抽出した。

(2) それらに対して、Zinc finger nuclease (ZFN) と TAL Effector Nuclease (TALEN) といった 2 種類の人工キメラ遺伝子の合成を実施した。

(3) 合成した人工キメラ遺伝子の切断活性を酵母の実験系で検証した。

C. 研究結果

(1) 肝炎ウイルスデータベースから HBV の全ゲノム配列を取り出し、分子系統解析を実施した。その結果、遺伝子型 A-D の間で最も diversity が低い領域、つまり、高度の保存された領域を抽出したところ、6 つの保存領域を得た。

(2) 各領域に対して、ZFN と TALEN の合成を行った。作業の優先度を考慮して、HBV 複製と発がんに関与すると言われている HBX を優先的な標的として考え、そこに対する合成を進めた。保存された HBX 領域に対して、コンピューターによる標的領域の選定を実施したところ、3箇所 of 標的部位を決定できた。その結果に従って、ZFN1/2, 3/4, 5/6 を構築した。

TALEN についても同様に専用のソフトウェアで合成を予測した上で合成を実施した。その結果、TALEN1/2, 3/4, 5/6, 7/8, 9/10, 11/12 を構築した。

(3) 上記で合成した ZFN と TALEN の活性を酵母の MEL-I アッセイで検証した。その結果、合成した ZFN の 3 種類、TALEN の 6 種類とも良好な活性を得た。

D. 考察

報告されている HBV ゲノム配列を利用することで、高度に保存された領域を抽出でき、

そこから人工キメラ遺伝子の合成に成功した。酵母の実験系での検証が終了したため、哺乳細胞中での活性を確認する必要がある、その点は分担研究者らとの共同研究となる。

人工キメラ遺伝子は二種類が、分子の大きさの違いや配列認識能力の違いがあるため、本研究にとって最適なものを選ぶ必要があるといえる。

E. 結論

HBV 遺伝子型に依存しない高度保存領域を抽出することに成功し、それらの領域に対する人工キメラ遺伝子合成を得た。

F. 研究発表 (本研究に関わるもの)

1. 論文発表

- 1) Sunbul M, Sugiyama M, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Khan A, Elkady A, Tanaka Y, and Mizokami M. Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey. *Microbiol Immunol.* 2012 in press
- 2) Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2012;7(9):e44743.
- 3) Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S,

- Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. *PLoS One*. 2012;7(6):e39175.
- 4) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet*. 2012 Jun 19;13:47.
- 5) Zhou B, Wang Z, Yang J, Sun J, Li H, Tanaka Y, Mizokami M, Hou J. Novel evidence of HBV recombination in family cluster infections in western China. *PLoS One*. 2012;7(6):e38241.
- 6) Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y, Murakami S, Attia FM, Hassan AA, Hassan MF, Shedid MM, Abdel Reheem HB, Khan A, Mizokami M. Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt. *J Med Virol*. 2012 Apr;84(4):587-95.
2. 学会発表
- 1) 新海登, 田中靖人, 松浦健太郎, 溝上雅史.
B型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の継続と終了をめぐる B型慢性肝炎患者における核酸アナログ中止症例の検討 中止後長期観察例、プレコア/コアプロモーター変異をふまえて.
第48回日本肝臓学会総会, 石川、金沢, 2012.06.7-8
ワークショップ.
- 2) 楠本茂, 田中靖人, 田中榮司, 溝上雅史.
B型肝炎再活性化の現状と今後の展開 リツキシマブ+ステロイド併用悪性リンパ腫治療中のB型肝炎ウイルス再活性化のリスク.
第48回日本肝臓学会総会, 石川、金沢, 2012.06.7-8
ワークショップ.
- 3) 澤井裕美, 西田奈央, 松田浩一, 馬渡頼子, 田中靖人, 溝上雅史, 徳永勝士.
HBV陽性肝癌における感受性候補 SNPの東アジア集団での検証.
第21回日本組織適合性学会大会, 2012.09.15
- 4) 伊藤清頭, 溝上雅史.
Cohort研究からみたウイルス性肝炎の解明 B型慢性肝炎に関する全国調査結果.

- 第16回日本肝臓学会大会・第54回日本消化器病学会大会・第50回日本消化器がん検診学会大会 (JDDW), 神戸, 2012.10-11
シンポジウム.
- 5) 正木尚彦, P.K. S, 溝上雅史.
東アジアにおける肝疾患の問題点と治療の特色 開発途上国ネパールにおけるB型肝炎診療の実態.
第16回日本肝臓学会大会・第54回日本消化器病学会大会 (JDDW), 神戸, 2012.10-11
パネルディスカッション.
- 6) 西田奈央, 田中靖人, 澤井裕美, 杉山真也, 馬渡頼子, 徳永勝士, 溝上雅史.
日本人および韓国人におけるB型肝炎慢性化、B型肝炎ウイルス排除を規定するHLA-DP遺伝子の同定.
第16回日本肝臓学会大会 (JDDW), 神戸, 2012.10-11
ポスターセッション.
- 7) 楠本茂, 田中靖人, 溝上雅史.
B型肝炎再活性化の予知・予防そして治療 B細胞性リンパ腫治療における、月1回のHBV-DNAモニタリングはHBV再活性化による肝炎発症対策として有用である.
第16回日本肝臓学会大会・第54回日本消化器病学会大会 (JDDW), 神戸, 2012.10-11
パネルディスカッション.
- 8) 澤井裕美, 西田奈央, 松田浩一, 馬渡頼子, 田中靖人, 溝上雅史, 徳永勝士.
中国集団におけるB型肝炎由来肝癌感受性SNPの東アジア集団での検証.
- 第16回日本肝臓学会大会 (JDDW), 神戸, 2012.10-11
ポスターセッション.
- 9) 西田奈央, 田中靖人, 澤井裕美, 杉山真也, 馬渡頼子, 徳永勝士, 溝上雅史.
東アジア集団におけるB型肝炎慢性化、HBV排除を規定するHLA-DP遺伝子の同定.
第35回日本分子生物学会, 福岡, 2012.12.11-14
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

Ⅱ. 分担研究報告書

人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした肝臓内 HBVDNA 不活化を目指した新規治療法の開発

研究分担者：片岡一則 東京大学大学院工学系研究科・医学系研究科

研究要旨： 本分担研究では、肝臓に対して高効率に mRNA を導入する手段の確立を目指している。mRNA はホストゲノムへの挿入が無く安全に治療用タンパク質を生体に供給できるため臨床応用に有望であるが、生体内で急速に分解されること、かつ強い免疫原性を有することから、その *in vivo* 応用はこれまで困難であった。そこで粒径 50 nm の高分子ナノミセルに mRNA を内包させ、ハイドロダイナミクス法にてマウス肝臓へ投与を行ったところ、投与後の炎症反応・毒性を最小限に抑えたまま、ほぼすべての肝細胞に対して効率的な mRNA 発現を得ることに成功した。さらに導入した mRNA の機能発現を検証する目的で、造血因子エリスロポエチンを発現する mRNA を導入したところ、有意な造血効果が得られた。

A. 研究目的

本研究は新規 B 型肝炎治療の構築を目的として、肝臓へ高効率に治療用タンパク質を供給するための核酸デリバリー技術の開発を行うものである。従来の核酸デリバリーにおいて主に用いられていたプラスミド DNA(pDNA)は、ランダムにホストゲノムへ挿入されるゲノムの変異を誘発すること、さらに挿入された pDNA からの発現が制御できなくなることといった安全面での問題から臨床応用が難しい。そこで、本研究ではこのような危険性を生じない mRNA の導入を検討している。一方で、mRNA には生体内でヌクレアーゼによって急速に分解される、強い免疫原性を有するといった問題があった。そこで、粒径 50 nm の高分子ナノミセルに mRNA を内包させることでこれらの問題の解決を目指した。

本年度は、レポータータンパク質を発現する mRNA を内包させたナノミセルを、マウス肝臓へ導入することで、タンパク質発現効率や毒性の評価を行った。さらに導入した mRNA の機能発現を検証する目的で、造血

因子エリスロポエチンを発現する mRNA を導入し、造血作用を評価した。

B. 研究方法

1) 高分子ナノミセルの調製

ポリアスパラギン酸(PA_{sp})の側鎖にジエチレントリアミン(DET)を導入した PA_{sp}(DET)とポリエチレングリコール(PEG)からなるブロック共重合体(PEG-PA_{sp}(DET))を合成した(PEG の分子量 12,000、ポリアミノ酸の重合度 57)。高分子ナノミセルは HEPES バッファー中で mRNA とポリマー溶液を混合することで調製した。

2) ハイドロダイナミクス法による肝臓への mRNA の導入

ナノミセル溶液を生理食塩水で希釈した後、マウス全血量と同程度である 1.8 ml を尾静脈より 5 秒間で投与した。この方法はハイドロダイナミクス法と呼ばれ、静水圧の上昇により肝臓に高効率に核酸が導入されることが知られている。

3) レポーターを用いた mRNA 導入効率の評価

ルシフェラーゼ発現 mRNA を導入した後、IVIS imaging system を用いることで生きたマウスより発光の経時変化を定量した。また、GFP 発現 mRNA を導入し肝臓の組織切片の免疫組織学的染色を行うことで、組織中の mRNA 発現の分布を評価した。

4) 投与後の炎症反応と組織傷害の評価

肝組織中の炎症性サイトカイン遺伝子の発現量を定量 PCR にて調べた。また、血漿中の肝逸脱酵素 AST, ALT を定量することで、投与に伴う肝組織の傷害を評価した。

5) エリスロポエチン発現 mRNA の導入による造血効果

エリスロポエチン発現 mRNA を導入後、ヘマトクリット値(血液中の血球成分の体積率)を測定することで、投与に伴う造血効果を評価した。

C. 研究結果

1) mRNA 導入効率の評価

ハイドロダイナミクス法にてマウス肝臓へルシフェラーゼ発現 mRNA を導入したところ、ナノミセルを用いた場合、キャリアを用いずに mRNA の単独投与を行った場合(naked mRNA)と比べて、10 倍以上高い発現効率を得られた。肝臓における導入 mRNA のコピー数も、ナノミセル群で naked mRNA 群と比べて 4 倍高かったことから、ナノミセルに内包された mRNA の生体内での安定性が向上したためと考えられた。

GFP 発現 mRNA を用いてナノミセル投与後の発現の分布を調べたところ、肝組織中の

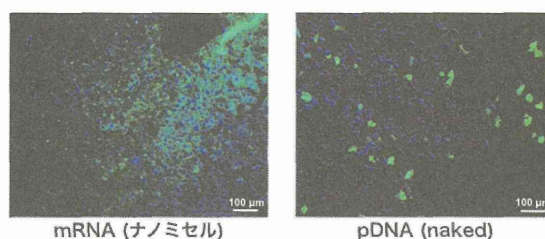


図 1 肝組織における GFP 発現の分布

GFP 発現 mRNA、pDNA を導入し、1 日後に免疫組織学的染色を行った。青：核、緑：GFP

ほぼすべての細胞に比較的均一な強度の発現が観られた(図 1)。一方で naked pDNA および pDNA 内包ナノミセルを用いて同様の方法で導入を行ったところ、一部の細胞で強い発現を認めたものの多くの細胞で全く発現は観察されなかった。

2) 投与後の炎症反応と毒性

投与 4 時間後に肝臓における炎症性分子(インターロイキン-6、腫瘍壊死因子(TNF)- α 、インターフェロン- β 1)の産生を定量したところ、ナノミセル群で naked mRNA 群と比べて炎症反応の軽減を認めたことから、mRNA をナノミセルに内包させることでその免疫原性を効果的に制御できることが分かった。また、投与 24 時間後の炎症性分子の産生は未投与群と同程度まで軽減されており、さらに投与 48 時間後の血漿肝酵素(AST, ALT)値も臨床的に許容されるレベルであったことから、投与に伴う組織傷害は一過性のものであることが分かった。

3) エリスロポエチン発現 mRNA の導入

本研究で用いた mRNA 導入法により、疾患治療を行うのに十分なレベルのタンパク質発現効率を得られるかを調べるために、エリスロポエチン発現 mRNA 導入後の造血効

果を観察した。ナノミセル投与群で投与7日後に有意な造血効果を示した。

D. 考察

本研究は、B型肝炎の新規治療法の構築を目指し、肝臓への高効率な mRNA 導入を可能とするシステムの開発を行うものである。mRNA は生体内で不安定であり、かつ高い免疫原性を有するのでその *in vivo* での導入は困難であったが、本研究にて高分子ナノミセルに mRNA を内包させることでこれらの問題が回避された。結果的に、投与に伴う炎症反応や組織傷害性を低いレベルに抑えた状態で、高いタンパク質発現効率を得ることに成功した。さらに、エリスロポエチン発現 mRNA 導入によって生理的効果を及ぼすのに十分な量のタンパク質発現効率を得られたことから、B型肝炎への治療用タンパク質の導入においても優れた治療効果を示すことが期待される。

肝炎治療を目的とした場合、感染したすべての肝細胞において均一にタンパク質発現が得られることが望まれる。pDNA 導入では、肝組織中の発現の分布が不均一であり多数の細胞で発現が観られなかったが、mRNA ではほぼすべての細胞で発現するという特徴があった。従って、高分子ナノミセルを用いた mRNA 導入は肝炎治療に向けて有望なシステムとなると考えられた。

E. 結論

mRNA 内包高分子ナノミセルを用いることで、マウス肝臓において毒性を抑えたまま高効率なタンパク質発現を得ることに成功した。

F. 研究発表（本研究に関わるもの）

1. 論文発表

- 1) S. Uchida, K. Itaka, Q. Chen, K. Osada, T. Ishii, MA. Shibata, M. Harada-Shiba, K. Kataoka, PEGylated polyplex with optimized PEG shielding enhances gene introduction in lungs by minimizing inflammatory responses. *Mol Ther.* 20 (6) 1196-1203 (2012)
- 2) Q. Chen, K. Osada, T. Ishii, M. Oba, S. Uchida, T. A. Tockary, T. Endo, Z. Ge, H. Kinoh, M. R. Kano, K. Itaka, K. Kataoka, Homo-cationer integration into PEGylated polyplex micelle from block-cationer for systemic antiangiogenic gene therapy for fibrotic pancreatic tumors. *Biomaterials* 33 (18) 4722-4730 (2012)
- 3) R. J. Christie, Y. Matsumoto, K. Miyata, T. Nomoto, S. Fukushima, K. Osada, J. Halnaut, F. Pittella, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Kataoka, Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano* 6 (6) 5174-5189 (2012)
- 4) M. Kumagai, S. Shimoda, R. Wakabayashi, Y. Kunisawa, T. Ishii, K. Osada, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, K. Nakano, Effective transgene expression without toxicity by intraperitoneal administration of PEG-detachable polyplex micelles in mice with peritoneal dissemination. *J. Control. Release* 160 (3) 542-551 (2012)
- 5) F. Pittella, K. Miyata, Y. Maeda, T. Suma, S. Watanabe, Q. Chen, R. J. Christie, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer

- hybrid nanoparticles. *J. Control. Release* 161 (3) 868-874 (2012)
- 6) T. Suma, K. Miyata, Y. Anraku, S. Watanabe, R. J. Christie, H. Takemoto, M. Shioyama, N. Gouda, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Kataoka, Smart multilayered assembly for biocompatible siRNA delivery featuring dissolvable silica, endosome-disrupting polycation, and detachable PEG. *ACS Nano* 6 (8) 6693-6705 (2012)
- 7) M. Naito, T. Ishii, A. Matsumoto, K. Miyata, Y. Miyahara, K. Kataoka, A phenylboronate-functionalized polyion complex micelle for ATPTriggered release of siRNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51 (43) 10751-10755 (2012)
- 8) T. Endo, K. Itaka, M. Shioyama, S. Uchida, K. Kataoka, Gene transfection to spheroid culture system on micropatterned culture plate by polyplex nanomicelle: a novel platform of genetically-modified cell transplantation. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 2 (5) 398-405 (2012)
- 9) M. Sanjoh, K. Miyata, R. J. Christie, T. Ishii, Y. Maeda, F. Pittella, S. Hiki, N. Nishiyama, K. Kataoka, Dual environment-responsive polyplex carriers for enhanced intracellular delivery of plasmid DNA. *Biomacromolecules* 13 (11) 3641-3649 (2012)
- 10) S. Uchida, K. Itaka, H. Uchida, K. Hayakawa, T. Ogata, T. Ishii, S. Fukushima, K. Osada, K. Kataoka, In vivo messenger RNA introduction into the central nervous system using polyplex nanomicelle. *PLOS ONE* 8 (2) e56220 (2013)
2. 学会発表
- 1) 片岡一則 核酸医薬品デリバリーのための超分子ナノキャリア設計 情報機構セミナー「核酸医薬の開発戦略と今後の展望」招待講演 2012.5
- 2) K. Kataoka Smart Supramolecular Nanostructures from Block Copolymers for Gene and Drug Delivery 9th World Biomaterials Congress 基調講演 2012.6
- 3) K. Kataoka Medical Innovation through Polymer Chemistry: Supramolecular Structures of Block Copolymers as Smart Nanodevices for Gene and Drug Delivery IUPAC World Polymer Congress 2012 (IUPAC MACRO 2012) 基調講演 2012.6
- 4) K. Kataoka Fine-Tuning of Polycationic Nanomaterials for Enhanced Nucleic Acid Delivery Kyoto Cell-Material Integration 2012 口頭 2012.11
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした肝臓内 HBVDNA 不活化を目指した新規治療法の開発

研究分担者：中西 真 名古屋市立大学大学院医学研究科教授

研究要旨：本研究は、HBV 複製の鋳型となる cccDNA、あるいはゲノム DNA 内に組み込まれた HBVDNA に対して、HBVDNA 配列特異的に作用する人工キメラ遺伝子を実験的に設計し、細胞内／個体内において HBVDNA を切断して不活性化することを目的としている。本研究はこの目的達成のため、人工キメラ遺伝子により生じる HBVDNA 切断効果を検証する技術の開発と、細胞内に生じる DNA 二重鎖切断による副作用を明らかにする目的で行われた。

A. 研究目的

平成 24 年度の研究目的は、細胞内に生じる DNA 二重鎖切断の高感度検出法の確立と、DNA 二重鎖切断が生じた場合における細胞内情報伝達経路の活性化、および細胞反応の解析を行うものである。具体的に、細胞内情報伝達経路については、とりわけ ATM-Chk2 経路の活性化を、細胞反応については早期細胞老化誘導、アポトーシス、および細胞周期チェックポイント活性化の側面から解析を行うものである。

B. 研究方法

細胞内に生じる DNA 二重鎖切断を同定する目的で、ヒト正常線維芽細胞に低線量の電離放射線を照射し、生じた DNA 二重鎖切断をリン酸化 H2AX (γ H2AX) 抗体で染色し、切断部位を同定する。またこの時、ATM のリン酸化、Chk2 のリン酸化について解析を行う。1 カ所の DNA 二重鎖切断が生じた場合の細胞応答、あるいは切断部位の同定を行う目的で、ヒト正常線維芽細胞内に存在しない制限酵素部位(I-SceI)を導入し、制限酵素 I-SceI 発現アデノウイルスを感染させた

後の細胞応答、切断部位同定について上記と同様の方法で解析する。

DNA 二重鎖切断による細胞応答を解析する目的で、I-SceI 部位導入細胞に I-SceI を細胞周期時期特異的に発現させ、短期細胞周期停止については FACS、アポトーシスについては TUNEL 染色で、早期細胞老化については SA-beta gal 染色で解析を行った。

C. 研究結果

低線量の電離放射線を細胞に照射したところ、照射量に依存して細胞内に γ H2AX の foci 形成を認めた。この foci は DNA 二重鎖切断部位に集積する ATM のリン酸化、あるいは 53BP1 の集積と完全に一致した。一方、ATM のリン酸化量、あるいは Chk2 のリン酸化量についても照射量に依存して増加した。I-SceI 導入細胞を用いた実験では、細胞内に生じた一カ所の DNA 二重鎖切断が、 γ H2AX 抗体により認識されることが明らかになった。また一カ所の DNA 二重鎖切断が ATM-Chk2、あるいは ATR-Chk1 経路等の DNA 損傷応答を活性化するのに十分であることも分かった。

一方、この DNA 二重鎖切断を G2/M 期に誘導すると早期細胞老化が、また G1 期に導入した場合には短期細胞周期停止が誘導されることが分かった。またアポトーシスについては 1 カ所の DNA 二重鎖切断では誘導されないことが分かった。

D. 考察

本研究は、HBVDNA 配列特異的に作用する人工キメラ遺伝子による cccDNA、あるいはゲノム DNA 内に組み込まれた HBVDNA に対する切断効率の簡便な検証法の確立と、非特異的 DNA 切断による副作用の予防を目的としている。人工キメラ遺伝子による DNA 鎖切断は多く見積もっても数カ所程度であることが予想されるため、効果の検証と副作用の判断は低頻度の DNA 二重鎖切断誘導系を用いる必要がある。この点において、我々が確立している I-SceI 切断部位導入細胞を用いた、誘導的 DNA 二重鎖切断法を利用することで、数カ所の DNA 二重鎖切断により誘導される細胞応答、および情報伝達経路活性化機構が可能となる。本成果を次年度以降の実際の人工キメラ遺伝子に応用することで、HBV の根治療法の確立に寄与したい。

E. 結論

本研究により、細胞内に生じた 1 カ所の DNA 二重鎖切断の認識が可能となった。またこの誘導法により、1 カ所の DNA 二重鎖切断により誘導される細胞応答、あるいは DNA 損傷応答伝達機構の解析が可能となった。この結果、低頻度の DNA 二重鎖切断で早期細胞老化が誘導され得る可能性が示唆された。

F. 研究発表（本研究に関わるもの）

1. 論文発表

Shimada M, Nakanishi M. Response to DNA damage: why do we need to focus on protein phosphatases? *Front Oncol.* 2013 (査読有)

Liu N, Matsumoto M, Kitagawa K, Kotake Y, Suzuki S, Shirasawa S, Nakayama KI, Nakanishi M, Niida H, Kitagawa M. Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signalling. *EMBO J.* 31(10) 2365-77 2012 (査読有)

Sato S, Takahashi S, Asamoto M, Nakanishi M, Wakita T, Ogura Y, Yatabe Y, Shirai T. Histone H1 expression in human prostate cancer tissues and cell lines. *Pathol Int.* 62(2) 84-92 2012 (査読有)

Delhase M, Kim SY, Lee H, Naiki-Ito A, Chen Y, Ahn ER, Murata K, Kim SJ, Lautsch N, Kobayashi KS, Shirai T, Karin M, Nakanishi M. TANK-binding kinase 1 (TBK1) controls cell survival through PAI-2/serpinB2 and transglutaminase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(4) E177-86 2012 (査読有)

2. 学会発表

中西 真 Role of DNA damage responses in induction of premature senescence. 平成 24 年 4 月 26 日～28 日ソウル市 Hallym-NCGG-Extended Symposium

中西 真 Maintaining the integrity of genomic information by cell cycle checkpoints.

平成 24 年 9 月 18 日～21 日札幌市

第 71 回日本癌学会学術総会

中西 真 Role of DNA damage
responses in induction of premature
senescence.

平成 24 年 11 月 25 日～28 日淡路島
3R シンポジウム

中西 真 Novel histone modifications
couple maintenance DNA methylation with
DNA replication.

平成 24 年 11 月 29 日～30 日鳴門市
日仏がん学会

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした 肝臓内HBVDNA不活化を目指した新規治療法の開発

研究分担者：武富紹信 北海道大学大学院医学研究科 消化器外科学 I

研究要旨： 本研究は肝内の HBV DNA を不活化し、肝炎、肝硬変、肝発癌の病因を除去する方法論を確立することが目的である。北海道大学消化器外科学 I の役割は、a) ヒト細胞ソースを提供する、b) 前記細胞を用いて新規治療法の効果を検証する、ことである。目標達成のために、HBV 感染肝癌患者の手術(切除)組織を用いた、以下の 1)-4) の検討が必要である。

1) 癌組織の初代培養細胞の継代培養、2) 非癌部組織の初代培養および継代培養、3) 癌細胞の株化、4) 上記の細胞を凍結保存後に再培養。

本検討に用いた切除組織は書面で同意を得た症例のみを対象とし、北海道大学の臨床研究に関する倫理委員会の承認の下で行った。H24 年度は 1), 2) を行い、癌部、非癌部の一部の細胞種の初代培養に成功した。われわれのルーチンの protocol により、切除組織から癌細胞のみならず、非癌部細胞の初代培養も可能であることが確認された。

今後、3)4) の検討に進むと共に、HBV 感染癌細胞、HBV 感染非癌部肝細胞の至適培養条件を明らかにし、細胞内の HBV DNA の推移を評価する。これらの細胞が肝線維化に与える影響を明らかにするために、星細胞あるいは繊維芽細胞との共培養系を検討する。

A. 研究目的

本研究は肝臓内に存在する HBV DNA を不活化し、肝炎、肝硬変、肝発癌の病因を除去する新しい方法論を確立することが目的である。北海道大学消化器外科学 I (分担研究者：武富紹信) は、切除組織、血清、DNA/RNA を収集、保管するノウハウを有し、約 4000 検体(うち肝癌 700 例以上)の癌部、非癌部を臨床情報(予後)とともに蓄積している。

本課題の目的は、a) ヒト細胞ソースを提供する、b) 前記細胞を用いて新規治療法の効果を検証する、ことである。

B. 研究方法

目標達成のために HBV 感染肝癌患者の手術(切除)組織を用いて下記 1)2) の検討を行った。本検討に用いた切除組織は、

術前に書面で同意を得た症例のみを対象とし、北海道大学の臨床研究に関する倫理委員会の承認の下で行った。

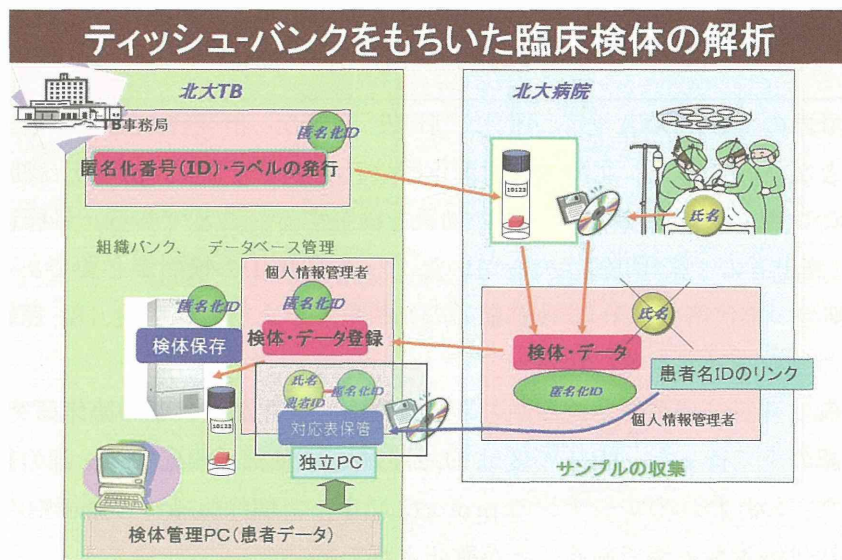
- 1) 癌組織の初代培養細胞の継代培養
- 2) 非癌部組織の初代培養および継代培養
- 3) 癌細胞の株化
- 4) 上記の細胞を凍結保存後に再培養。

切除肝は切除後直ちに冷生食に浸漬し、可及的速やかに処理を開始した。組織は原発性肝癌取扱い規約に従って、約 1cm 厚に割を入れ、癌部、非癌部を 5mm 角以上、1 個以上を採取した。組織片は氷冷冷生食に浸漬し、直ちに細胞培養室に搬送した。

肝細胞、肝癌細胞は常法の如くコラゲナーゼを主とするプロテアーゼで消化、金属メッシュでシングルセル化した。通

常のDMEM液に非働化FBS(10%)、F12栄養液、抗生物質を添加したものを基本培地とし、必要に応じて成長因子を添加

した。細胞外基質コーティング済培養皿を使用した。

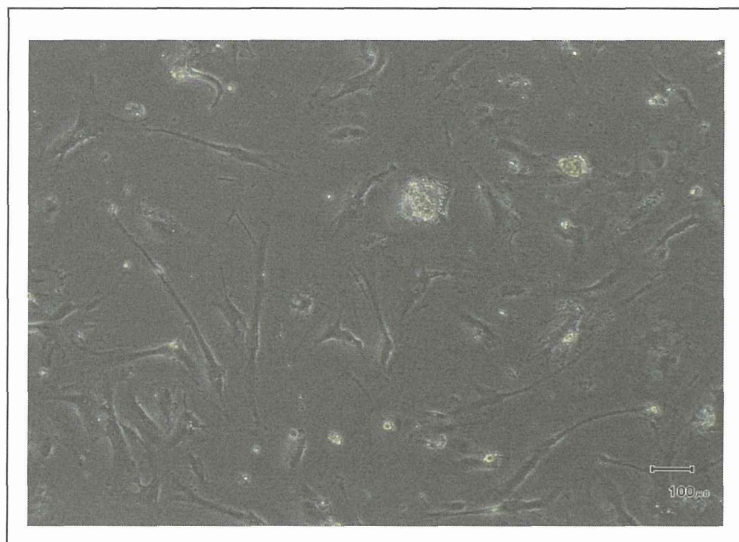


C. 研究結果

切除肝組織の癌部組織、非癌部組織から細胞の分離、培養に成功した。また、血管成分の単離、培養にも成功した。これらの細胞が肝細胞由来かは明らかではない。しかし、長期培養は困難であり、細胞を増やすことも困難であった。

細胞死の大部分は単離時および最初に培養皿に播いた段階までに起こっていた。

[図： 切除組織から得られた初代培養細胞]



D. 考察

H24年度の検討では1)2)のうち、初代培養ができるようになったことのみが達成された。長期の培養、株化、凍結保存、解凍後再培養、などの次のステップにつながる成果と言える。しかし、安定した細胞ソースの提供のためには、単離から継代培養まで早期に失う細胞数をいかに抑制するかが重要である。

膵島移植などの細胞移植や肝臓を含む臓器移植の分野では、組織の虚血や冷蔵、単離操作、復温、再酸素化などの過程で複合的な障害が惹起されることが知られている。虚血再灌流障害、あるいは、低酸素再酸素化障害を抑制するために、臓器保存法の改良、抗酸化、抗炎症、抗アポトーシス治療が試みられ、有効性が報告されている。臓器保存における臓器、細胞保護の概念を取り入れることにより、初代培養細胞の収率を上げることが可能ならずであり、今後の重要な検討課題で

あろう。また、株化、冷凍保存・再培養の実現、それらの細胞における肝炎ウイルスの動態、などの評価も次年度以降の課題である。

E. 結論

手術(切除)組織からの癌細胞、非癌細胞の単離、培養が可能になった。しかし、収率を上げるためにはさらなる検討が必要である。

F. 研究発表（本研究に関わるもの）

1. 論文発表：Ⅲ.研究成果の刊行一覧参照
2. 学会発表：なし

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：特記すべきことなし

新規治療法の効果判定マーカーとその特性

研究分担者：田中榮司 信州大学医学部消化器内科教授

研究協力者：松本晶博 信州大学医学部消化器内科講師

研究要旨：肝細胞内 HBV DNA を不活化する新規薬物の開発を目指すためには、肝細胞内 HBV DNA 量のモニターが可能な新しいウイルスマーカーの開発が必要である。これまでの研究で、HBs 抗原、HBcr 抗原 (HB コア関連抗原)、HBV RNA などの有用性が示唆されているが、新薬の効果モニターでの有用性は必ずしも明らかにされていない。今回の研究ではこれらのマーカーの特徴を明らかにし、新規薬物の効果モニターでの有効な使用方法を検討する。

HBs 抗原の検討では前向きに 10 年間長期間経過観察を行った HBV キャリア 101 例を対象とした。HBV DNA 量はリアルタイム PCR 法 (ロシュ)、HBs 抗原量は CLEIA 法 (シスメックス)、HBcr 抗原量は CLEIA 法 (富士レビオ) で測定した。In house の HBV DNA と HBV RNA の測定は以下の方法で行った。RNA のみの測定では DNAase 処理と逆転写の両方を行い、DNA のみの測定では DNAase 処理と逆転写の両方とも行わず、RNA と DNA の同時測定では DNAase 処理を行わず逆転写処理のみを行い、その後に RT-PCR 法で核酸を増幅した。PCR 用のプライマーは S 領域で選定した。

HBs 抗原量はほぼ正規分布し、その中央値は 3.2 log IU/ml であった。HBs 抗原量が低い症例では高い症例に比較し年齢が高く、ウイルスの活動性が低い傾向がみられた。HBs 抗原量低下速度の分布を見ると急速低下群と非急速低下群の 2 群に分けることが可能であり、その cut-off 値は -04 log IU/年であった。急速低下群と非急速低下群の間で年齢に差はなかったが、ウイルスの活動性は急速低下群で有意に低い傾向がみられた。

HBV DNA と HBV RNA の in house 測定系では DNA と RNA 共に 2.0 log copies/ml 近くの測定感度が得られた。また、DNase 処理が適切に行われ、DNA 量が 9 log IU/ml 程度にならないと影響が出ないことが明らかになった。

HBs 抗原量は幅広い分布を示し、自然経過で不変か低下した。HBs 抗原量の低値と低下速度の増加はウイルスの活動性の低下を示唆した。新規薬物の効果モニターに HBs 抗原量を用いることが推奨されるが、その評価には自然経過を加味する必要がある。また、高感度で特異性の高い HBV RNA 量測定系を開発した。

A. 研究目的

本研究は肝細胞内 HBV DNA の不活化が可能な新規薬物の開発を目指している。この開発の過程において、ex vivo ないし vivo における新規薬物の効果をモニターする方法が必要である。通常の抗ウイルス薬では血中の HBV DNA 量の測定が有用であるが、これは肝細胞内の HBV DNA 量を必ずしも反映しない。このため、今回のプロジェクトでは肝細胞内の HBV DNA 量をモニター可能な新しいマーカーが必要となる。これまでの研究で、HBs 抗原、HBcr 抗原 (HB コア関連抗原)、HBV RNA などがその候補としてあげられているが、新薬の効果モニターに有用であるかは明らかにされていない。本研究ではこれらのマーカーの特徴を検討し、新規薬物の効果モニターへの応用が可能か否かを検討した。

B. 研究方法

HBs 抗原量の検討では前向きに 10 年間長期間経過観察を行った HBV キャリア 101 例を対象と

した。

HBV DNA 量はリアルタイム PCR 法 (ロシュ)、HBs 抗原量は CLEIA 法 (シスメックス)、HBcr 抗原量は CLEIA 法 (富士レビオ) で測定した。

In house の HBV DNA と HBV RNA の測定方法は表 1 に示した。RNA のみの測定では DNAase 処理と逆転写の両方を行い、DNA のみの測定では DNAase 処理と逆転写の両方とも行わず、RNA と DNA の同時測定では DNAase 処理を行わず逆転写処理のみを行った。PCR 用のプライマーは HBV 遺伝子の S 領域で選定した。

本研究は信州大学医学部倫理委員会の承認を受けて行った。

C. 研究結果

図 1 に対象とした 101 例について HBs 抗原量の分布を示した。HBs 抗原量はほぼ正規分布し、その中央値は 3.2 log IU/ml であった。表 2 に中央値で 2 群に分けその背景因子を比較した。HBs 抗原量が低い症例では高い症例に比較し、年齢が高く