

- る細胞極性の構築” 細胞を創る研究会 5.0、横浜、(2012).
40. 内沢 秀光、白川 和浩、齋藤 ゆかり、Nilubol Chonnipa、玉井 美保、田川 陽二: “シジミ由来トリペプチド  $\beta$ -Ala-Orn-Orn の肝保護効果及び GABA-Orn-Orn の存在” 日本食品科学工学会東北支部大会、盛岡、(2012).
41. 福原崇介: 一般講演: C型肝炎ウイルスの肝細胞指向性における miR-122 と脂質代謝の役割: 第 11 回 Hepatitis Expert Meeting、東京、8 月 25 日、2012.
42. 福原崇介、本村貴志、松浦善治: パネルディスカッション: HCV の非肝臓系細胞株に対する感染培養システムの確立と肝外病変成立に関わる宿主因子の同定: JDDW、神戸、10 月 11 日、2012.
43. 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: 一般講演: HCV 感染の肝細胞指向性は miR-122 の発現と脂質代謝によって規定される: 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11 月 13 日、2012.
44. 塩川舞、福原崇介、小野慎子、山本聡美、岡本徹、松浦善治: 一般講演: C 型肝炎ウイルスの粒子産生に關与するヒト肝細胞特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立: 同上
45. 小野慎子、福原崇介、塩川舞、岡本徹、松浦善治: 一般講演: 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: 同上
46. 伊藤昌彦、鈴木亮介、福原崇介、松浦善治、脇田隆宇、鈴木哲朗: 一般講演: HuH-7 由来オーバル様細胞における HCV 感受性の解析: 同上
47. Kouwaki T, Pham DN, Fukuhara T, Okamoto T, and 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.
48. Fukuhara T, Motomura T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Okamoto T, Shirabe K, Maehara Y, and Matsuura Y. Quasispecies Plays an Important Role in Cell Tropism of Hepatitis C Virus. 同上
49. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Okamoto T, and Matsuura Y. Involvement of Human Liver-specific Factors in a Complete Propagation of Hepatitis C Virus. 同上
50. Ono C, Fukuhara T, Shiokawa M, Okamoto T, and Matsuura Y. Establishment of Mouse Liver Cell Lines Susceptible to Hepatitis C Virus Infection. 同上
51. Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Kato H, Okamoto T, and Matsuura Y. miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus infection. The American Society for Virology, 31th Annual Meeting, University of Wisconsin-Madison, July 20-26, 2012.

52. Fukuhara T, Shiokawa M, Arimoto M, Ono C, Katoh H, Kambara H, Okamoto T, and Matsuura Y. MiR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of HCV infection. 19th International Meeting on HCV and Related Viruses, Venice, Italy, October, 5-9, 2012.

H.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

1. 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. 北川雅敏、高芸、北川恭子「癌治療用組成物」(特許登録番号4967137号 2012年4月13日)

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

■平成24年度 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)

## B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究 研究分担報告書

### B型肝炎ウイルス転写複製機構の解析による治療法の開発

研究分担者 齋藤 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 (HBV) は、環状 DNA として細胞内で増幅するが、齋藤は直鎖状のアデノウイルスゲノムから環状分子を生成する新しい技術を開発している。本法を用いて、HBV の感染細胞でのみアデノウイルスベクター (AdV) から切り出された治療用遺伝子搭載の環状分子が増幅する新規治療法の開発を試みる。HBV の転写複製機構を用いたこの治療法は、高い特異性と治療効果が期待できる新規の方法である。本年度は、全ての HBV 遺伝子を独立して発現する計 10 種類の AdV を作製し、発現の確認を行った。

#### A. 研究目的

アデノウイルスベクター (AdV) は、肝細胞癌由来の HuH-7 細胞を含む多くの細胞に高効率で遺伝子導入が可能であり、肝炎ウイルス研究には有用性の高いベクターである。また、齋藤は、特異的プロモーターから Cre を発現するスイッチユニットと Cre 依存的に直鎖状 AdV ゲノムから環状分子として発現単位が切り出される「標的ユニット」を同一分子上に持つ「切り出し発現型」AdV の作製に成功した。この技術を用いれば、100% の細胞に AdV から HBV 様の環状分子を生成することが可能となり、この環状分子上に治療用遺伝子を搭載すれば、HBV 感染細胞でのみ相補的に環状分子が増幅し、高度に治療用遺伝子が発現するシステムの構築が可能となる。本研究では、このシステムを構築するために、HBV の複製

機構を AdV を用いて解析し、HBV の増殖に必須の遺伝子を治療用遺伝子と置換することで、安全性の高い治療用ベクターを作製する。

#### 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するウイルス関連 RNA (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 Hde-12 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 CsCl 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。

また、目的とする治療用遺伝子の挿入領域の検討および HBV の複製研究を簡便に行うことを可能とするため、HBV の Pol 領域に silent mutation を加えて Pol を発現するが S を発現しない様に設計したプラスミドを構築した。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。(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 1 件の通常ベクターの要望があり、供給した。

HBV の各々の遺伝子を独立して発現する AdV の作製を行った。その結果、Pol、PreCore、Core、PreS 及び S を独立して EF1 $\alpha$  プロモーターから発現する VA 残存及び欠失ベクター、計 10 種類の AdV を得た。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。これらのベクターは全て、班員に供給が可能である旨、班会議などを通じて周知した。

また、本研究では目的遺伝子となる治療用遺伝子を HBV のゲノムと置換して挿入する。そのための挿入領域を検討するために、

HBV が粒子として放出されてしまう場合には組換え生物としての対応が必要となる。そこで Pol の発現には影響を与えず S のみが非発現となる様に改変を加えた。そのために、Pre-S1 に 2 カ所、Pre-S2 に 1 カ所及び S に 3 カ所の変異を加え、Pol のアミノ酸を変えないようにこれらの開始コドンに変異を加えるあるいは終始コドンに置換した。これらの変異により、以降の実験は全て P2 レベルでの解析が可能となった。現在、Pol を AdV によりトランスで供給し、HBV ゲノムを複製しながら、治療用遺伝子の挿入可能な領域を検討している。

また、AdV から HBV 感染細胞特異的環状分子を挿入する治療法の開発に向け、特異的プロモーターとして  $\alpha$ -フェトプロテインプロモーターを持つコスミドカセットの作製を行っている。

### D. 考察

本年度は、HBV のほぼ全ての遺伝子を独立して発現する AdV の作製に成功するとともに、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、AdV を用いた Pol のトランスでの供給法及び複製システム構築など多岐にわたるシステム構築のために必要な検討を網羅的に行った。これまでの予備的な解析から、Pol のトランスによる供給方法についての知見が得られたため、現在より効率的な方法及び必要領域の特定にむけて解析を行っている。本法は、HBV 感染細胞でのみ AdV から治療用遺伝子を含む環状分子が供給され、その環状分子から高度に治療用遺伝子が発

現するという、新たな治療法であるとともに、HBV複製機構の解析、HBV関連miRNAの同定などを可能にする。そのために、miRNAを干渉することが知られているVA RNAを除去する形でもAdVを作製しており、今後班員に供給を行っていく。

#### 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、S非発現PoI遺伝子の構築、及び各々のHBV遺伝子発現を独立して解析可能なプライマーの設定など、予定以上の進展もあった。今後はHBV様環状分子生成法の開発に向け、PoIトランス供給システムの改良を行うとともに、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 Biohys Res Commn* 2012; 417:945-950.

#### 2. 学会発表

- 1) 前川 文、裴 崢、近藤 小貴、鐘ヶ江 裕美、斎藤 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) 裴崢、史国利、近藤小貴、伊藤昌彦、鐘ヶ江裕美、鈴木哲朗、斎藤泉. 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

■ 平成 24 年度 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)

## B 型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究 研究分担報告書

### B 型肝炎ウイルス複製の miRNA による制御

研究分担者 **小池 和彦** 東京大学医学部 (病)・教授

研究協力者 **大塚 基之** 東京大学医学部 (病)・教授

研究要旨： B型肝炎ウイルス (HBV) の完全排除は困難と考えられている。その原因は、使用可能な薬剤の作用機序が限られていることと HBV cccDNA の存在と考えられる。細胞内の microRNA は遺伝子発現を精密に制御しており、その発現の攪乱はウイルス複製能変化や細胞癌化といった病態に深く関わるということが想定されている。これらのステップにおける肝細胞内 microRNA の役割を解析し、その発現量を調節することによって、劇的な HBV 増殖抑制、排除が可能となりうる。私達は、既に、in silico の解析から、microRNA let-7 が HBV ゲノムのある箇所と高い相同性をもつことを見いだしており、microRNA と HBV の相互作用を更に詳細に検討することで、microRNA 制御による HBV 増殖の高度抑制が期待される。

#### A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) の完全排除は困難と考えられている。使用可能な薬剤の作用機序が限られている (インターフェロンによる mRNA 破壊と逆転写酵素阻害の 2 通り) ことと HBV cccDNA の存在が、その理由と考えられる。HBV-DNA の細胞内動態、特に核移行から cccDNA、ミニクロモゾーム形成過程について、HBV に特徴的な分子機構が明らかになりその調節因子が同定されれば、HBV cccDNA 排除を目指した新規創薬の標的となり得る。その阻害剤スクリーニング系を構築し各種化合物ライブラリー等から探索する事により新規機序の抗 HBV 薬の開発が期待される。同様に、

non-coding RNA 発現、細胞分化度など細胞要因の制御による HBV 複製制御が示されれば、key となる細胞因子に介入する阻害剤の探索が可能となる。また、再活性化、肝発がんの新たな分子機構が明らかとなれば創薬のための分子基盤となる。

HBV 複製細胞を標的とする遺伝子治療用ベクターは、本研究グループで見出される治療用候補遺伝子などを組み込む事で難治性 HBV 感染症の新規治療法となることが期待される。細胞内の microRNA は遺伝子発現を精密に制御しており、その発現の攪乱はウイルス複製能変化や細胞癌化といった病態に深く関わるということが想定されている。これらのス

テップにおける肝細胞内 microRNA の役割を解析し、その発現量を調節することによって、劇的な HBV 増殖抑制、排除が可能となりうる。

## B. 方法

pregenomeを含む数種類のHBV-RNAと宿主microRNAとの相同性を*in silico*で解析し、ウイルスRNAと相互作用する可能性の高い宿主のmicroRNAとHBV側の塩基配列を抽出した。それらのmicroRNAによるHBV複製への影響のスクリーニングを行った。

## C. 結果

1年目の本年は、HBVのpreS-2領域の塩基配列が、宿主のmicroRNAの一種で癌抑制機能を持つlet-7を吸着しその機能を攪乱する可能性があることをデータベース検索からみだし、実際にHBV-RNA存在下においてlet-7の機能が減弱することを*in vitro*で確認した。

## D. 考察

HBVの完全排除は困難と考えられている。その原因は、使用可能な薬剤の作用機序が限られている（インターフェロンによるmRNA破壊と逆転写酵素阻害の2通り）であること、及びHBVcccDNAの存在と考えられる。HBVの複製においては細胞への侵入後、DNAからの転写、RNAへの逆転写、terminal proteinのRNAへの結合、packaging signal  $\varepsilon$  によるRNAのヌクレオカプシド内被胞化、逆転写、タンパク翻訳、等のいくつかの段階を経る必要がある。細

胞内のmicroRNAは遺伝子発現を精密に制御しており、その発現の攪乱はウイルス複製能変化や細胞癌化といった病態に深く関与することが想定されている。これらのステップにおける肝細胞内microRNAの役割を解析し、その発現量を調節することによって、劇的なHBV増殖抑制、排除が可能となりうる。私達は、microRNAが肝腫瘍の悪性化に関与すること(Nature Commun 2011)、microRNA機能にかかわる宿主因子RACK1の同定(PLoS ONE 2011)などを明らかにしてきた。今回、我々は、HBVのpreS-2領域の塩基配列が、宿主のmicroRNAの一種で癌抑制機能を持つlet-7を吸着しその機能を攪乱する可能性があることをデータベース検索からみだし、実際にHBV-RNA存在下においてlet-7の機能が減弱することを*in vitro*で確認した。来年度以降、更に数種類のHBV-RNAをそれぞれ発現するが、タンパク発現の影響を無くしたプラスミドを作成し、microRNAの相同部分に変異を入れた対照プラスミドも作成する。それらを用いて、当該microRNAによるHBV複製への影響、逆にHBV複製によるmicroRNA発現への影響を検討する。

## E. 結論

細胞内環境の修飾によるHBV複製制御によってHBV排除が可能とれば、HBVキャリアにおける肝不全、肝癌発生を防ぐのみならず、HBVキャリア状態を解消することとなり、その社会的インパクトは大きい。本年度は、microRNAの一種で癌抑制機能を持つlet-7を吸着しその機能を攪乱する可能性があることをデータベース検索から

みいだし、実際に HBV-RNA 存在下において let-7 の機能が減弱することを *in vitro* で確認した。来年度以降にこれを更に発展させる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J. Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 Jan 31. doi:pii: S0006-291X(13)00183-6. 10.1016/j.bbrc.2013.01.093. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23376718.
- 2) Hikita H, Enooku K, Satoh Y, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Tateishi R, Soroida Y, Sato M, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor for sustained responses to pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy for Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatology* 2013 Jan 3. doi:10.1111/hepr.12061. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23356977.
- 3) Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region. *J Hepatol* 2013 Jan 12. doi:pii: S0168-8278(13)00011-1. 10.1016/j.jhep.2012.12.024. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23321320.
- 4) Gotoh H, Enooku K, Soroida Y, Sato M, Hikita H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Yamazaki T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement observed at a general health examination: A cross-sectional study. *Hepatology* 2012 Nov 27. doi: 10.1111/hepr.12029. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23279215.
- 5) Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H. Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2012 Nov 2. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01115.x. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23131000.
- 6) Ohki T, Isogawa A, Iwamoto M, Ohsugi M, Yoshida H, Toda N, Tagawa K, Omata M, Koike K. The effectiveness of liraglutide in nonalcoholic Fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus compared to sitagliptin and pioglitazone. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:496453.



- Epub 2012 Aug 13. PubMed  
PMID:22927782.
- 7) Kurano M, Hara M, Tsuneyama K, Okamoto K, Iso-O N, Matsushima T, Koike K, Tsukamoto K. Modulation of lipid metabolism with the over-expression of NPC1L1 in mice liver. *J Lipid Res* 2012 Aug 13. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22891292.
- 8) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, Koike K. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- $\kappa$ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. *Hepatology* 2013;57:162-170. PubMed PMID: 22898998.
- 9) Hikita H, Nakagawa H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Yoshida H, Omata M, Soroida Y, Sato M, Gotoh H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 2012 Jul 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22790352.
- 10) Minami T, Kishikawa T, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, Koike K. Meta-analysis: mortality and serious adverse events of peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2012 Jul 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22790350.
- 11) Okushin K, Asaoka Y, Fukuda I, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Mikami S, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Tateishi R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Koike K. IGF-II producing hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: metabolic complications and a foresight to molecular targeting therapy to the IGF signal. *Case Rep Gastroenterol* 2012;6(3):784-789. PubMed PMID: 23341802.
- 12) Yanagimoto S, Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Kato M, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis B in patients coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. *J Infect Chemother* 2012;18(6):883-890. PubMed PMID: 22760340.
- 13) Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, Koike K, Yatomi Y. Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013;57:417-418. PubMed PMID: 22707340.
- 14) Shiina S, Tateishi R, Imamura M, Teratani T, Koike Y, Sato S, Obi S, Kanai F, Kato N, Yoshida H, Omata M, Koike K. Percutaneous ethanol injection for hepatocellular carcinoma: 20-year outcome and prognostic factors. *Liver Int* 2012;32(9):1434-1442. PubMed PMID: 22712520.
- 15) Uchino K, Obi S, Tateishi R, Sato S, Kanda M, Sato T, Arano T, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Yamashiki N, Goto T, Shiina S,

- Omata M, Yoshida H, Koike K. Systemic combination therapy of intravenous continuous 5-fluorouracil and subcutaneous pegylated interferon alfa-2a for advanced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2012;47(10):1152-1159. PubMed PMID: 22438097.
- 16) Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, Koike K. Mortality and morbidity of hepatectomy, radiofrequency ablation, and embolization for hepatocellular carcinoma: a national survey of 54,145 patients. *J Gastroenterol* 2012;47(10):1125-1133. PubMed PMID: 22426637.
- 17) Yoshikawa T, Takata A, Otsuka M, Kishikawa T, Kojima K, Yoshida H, Koike K. Silencing of microRNA-122 enhances interferon- $\alpha$  signaling in the liver through regulating SOCS3 promoter methylation. *Sci Rep* 2012;2:637. Epub 2012 Sep 6. PubMed PMID: 22957141.
- 18) Mikami S, Tateishi R, Akahane M, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Computed Tomography Follow-up for the Detection of Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Initial Radiofrequency Ablation: A Single-center Experience. *J Vasc Interv Radiol* 2012;23(10):1269-1275. doi:10.1016/j.jvir.2012.06.032. PubMed PMID: 22999746.
- 19) Nakagawa H, Isogawa A, Tateishi R, Tani M, Yoshida H, Yamakado M, Koike K. Serum gamma-glutamyltransferase level is associated with serum superoxide dismutase activity and metabolic syndrome in a Japanese population. *J Gastroenterol* 2012;47(2):187-194. PubMed PMID: 21976134.
- 20) Soroida Y, Ohkawa R, Nakagawa H, Satoh Y, Yoshida H, Kinoshita H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Shiina S, Sato T, Obi S, Hoshino T, Nagatomo R, Okubo S, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased activity of serum mitochondrial isoenzyme of creatine kinase in hepatocellular carcinoma patients predominantly with recurrence. *J Hepatol* 2012;57(2):330-336. PubMed PMID:22521349.
- 21) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Kudo Y, Goto T, Yoshida H, Koike K. A miRNA machinery component DDX20 controls NF- $\kappa$ B via microRNA-140 function. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;420(3):564-569. PubMed PMID: 22445758.
- 22) Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Arano T, Uchino K, Enooku K, Goto E, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Ikeda H, Shiina S, Omata M, Koike K. Assessment of disease progression in patients with transfusion-associated chronic hepatitis C using transient elastography. *World J Gastroenterol* 2012;18(12):1385-1390. PubMed PMID: 22493553; PubMed Central PMCID: PMC3319966.
- 23) Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G,

- Yoshida H, Aburatani H, Koike K. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci* 2012;103(4):670-676. PubMed PMID: 22320381.
- 24) Goto E, Masuzaki R, Tateishi R, Kondo Y, Imamura J, Goto T, Ikeda H, Akahane M, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Value of post-vascular phase (Kupffer imaging) by contrast-enhanced ultrasonography using Sonazoid in the detection of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2012;47(4):477-485.
- 25) Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Sato T, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Yoshida H, Omata M, Koike K. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors. *Am J Gastroenterol* 2012;107(4):569-577. PubMed PMID: 22158026.
- 26) Enooku K, Tateishi R, Kanai F, Kondo Y, Masuzaki R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Evaluation of molecular targeted cancer drug by changes in tumor marker doubling times. *J Gastroenterol.* 2012;47(1):71-78. PMID: 21935635.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1.特許取得

なし

■ 平成24年度 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)

## B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究 研究分担報告書

### HBs抗原陰性・HBc抗体陽性患者における 肝切除・肝移植術後補助療法計画

研究分担者 國土 典宏 東京大学医学部肝胆膵外科、人工臓器移植外科 教授

研究要旨: HBs抗原が陰性化しているB型肝炎キャリア (HBc抗体高力価陽性) が少なからず存在している。近年増加しているB型およびC型肝炎ウイルス陰性患者に発生した肝細胞癌の中には、実際はB型肝炎に関連して発生したものが含まれている可能性がある。この一群では肝細胞癌に対する肝切除後の予後を調査し、特にHBc抗体陽性症例切除後の再発状況や長期成績を明らかにする。さらに、HBc抗体陽性例が潜在的なB型肝炎陽性例である場合に、B型肝炎の抗ウイルス剤の投与が、肝細胞癌に対する肝切除後や肝移植後の肝内再発予防に有効性があるか否かを臨床試験で検証する。

#### A. 研究目的

HBc抗体陽性の肝細胞癌に対する肝切除術後の再発状況や長期成績を明らかにし、B型肝炎キャリアとして取り扱うべきか否かを明らかにする。

#### B. 研究方法

1997年から2011年に肝切除を当科で行った肝細胞癌患者1486例のうち初発でAblationなどの前治療を行っていない682例を対象とした。B型、C型、非B非C型肝炎ウイルス別の無再発生存率や全生存率を検討した (倫理面の配慮)

全手術対象患者は包括的同意書を得ており、また、非介入試験での予後調査である。

#### C. 研究結果

B型、C型、非B非C型肝炎ウイルス別の生存期間や無再発生存期間には差を認めなかった。非B非C型かつHBc抗体陽性41例の無再発生存率は陰性例101例に比較して有意に良好であった。全生存期間には差を認めなかった。HBc抗体陰性例は陰性例に比較して門脈浸潤陽性例が有意に多い傾向にあった(31% vs. 10%,  $p=0.008$ )。

#### D. 考察

非B非C型についてはHBc抗体陽性例は陰性例より予後不良となることを予想していたが、実際は有意に良好であった。脈管侵襲は肝細胞癌術後の重要な予後因子であるため、脈管侵襲の頻度の差が両群の予後の差をもたらしたと考えられたが、その原因は不明である。また、HBc抗体の測定方法は時代とともに変遷しており、HBc抗体陰性例の中には陽性例も一部含まれている可能性がある。

#### E. 結論

本解析結果からは非B非C型肝炎でHBc抗体陽性例に対して、特にB型肝炎の抗ウイルス剤を投与する合理的な説明は難しいことになるが、HBc抗体の測定誤差の問題もあり、さらなる検討を行う予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Shindoh J, Hasegawa K, Matsuyama Y, Inoue Y, Ishizawa T, Aoki T, Sakamoto Y,

- Sugawara Y, Makuuchi M, Kokudo N. Low hepatitis C viral load predicts better long-term outcomes in patients undergoing resection of hepatocellular carcinoma irrespective of serologic eradication of hepatitis C virus. *J Clin Oncol* 2013; 31:766-73.
- 2) Kishi Y, Hasegawa K, Kaneko J, Aoki T, Beck Y, Sugawara Y, Makuuchi M, Kokudo N. Resection of segment VIII for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2012; 99:1105-12.
- 3) Hasegawa K, Kokudo N, Shiina S, Tateishi R, Makuuchi M. Surgery versus radiofrequency ablation for small hepatocellular carcinoma: Start of a randomized controlled trial (SURF trial). *Hepatol Res* 2010; 40:851-2.
- 4) Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, Hasegawa K, Beck Y, Sugawara Y, Makuuchi M, Kokudo N. Significance of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatectomy. *Ann Surg Oncol* 2009; 16:2795-804.
- 5) Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, Takahashi M, Inoue Y, Sano K, Imamura H, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol* 2008; 134:1908-16.
2. 学会発表
- 1) 阪本良弘、大道清彦、山本訓史、三瀬祥弘、石沢武彰、金子順一、青木琢、長谷川潔、菅原寧彦、國土典宏. 非B非C肝に発生した肝細胞癌に対する肝切除後の長期成績－特にB型肝炎感染歴の意義について－第25回日本肝胆膵外科学会 平成25年6月12日－14日、栃木、2013 (発表予定)
- 2) Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, Izumi N, Ichida T, Kudo M, Ku Y, Sakamoto M, Nakashima O, Matsui O, Matsuyama Y, Liver Cancer Study Group of Japan. A prospective cohort study using a Japanese nationwide survey to evaluate the therapeutic effects of surgery and percutaneous ablation for hepatocellular carcinoma. *ASCO Annual Meeting* 2012, Chicago, 2012
- 3) Kokudo N. Strategies for improving patient survival after liver resection for HCC. *IASGO* 2012, Thailand, 2012.
- H. 知的所有権の出願・取得状況  
特になし

■ 平成 24 年度 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)

## B 型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究 研究分担報告書

### HBV の遺伝子複製、発現制御機構の解析

研究分担者 鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授

研究要旨： HBVの遺伝子型依存的な複製増殖、病態発現の分子機構は未解明である。HBV遺伝子型AとCの遺伝子発現調節を比較解析した。その結果、遺伝子型Cは遺伝子型Aに比べ、1)HBe抗原を高産生すること、2) HBe抗原、HBc抗原、プレゲノムの発現を制御するcore promoter/enhancer活性が高いことが示された。この転写活性の差はenhancer II, basal core promoterの違いに起因する可能性が示された。

#### A. 研究目的

慢性B型肝炎などHBV感染症の対する治療薬として核酸アナログ製剤、インターフェロンなどが使われているが、ウイルスDNAの完全排除は困難なこと、薬剤耐性ウイルスの出現などの問題があり、根治療法は確立されていない。感染細胞の核内HBV DNAを完全に排除できる新規治療薬が開発されれば、HBVキャリアからの肝不全、肝がんの発生を防ぎ、キャリア状態の解消に繋がる。そのために、新たな創薬標的の探索また阻害剤評価系の構築が重要である。

本年度は、HBVの遺伝子型に特徴的な遺伝子発現機構の解析を行った。

#### B. 研究方法

HBV遺伝子型A, B, C株(HBV-Aeus, -Bj56, -CAT)のゲノム1.24倍長を含む各プラスミドpUC-HBAeus, pUC-HBBj56, pUC-HBCATは国立国際医療センター 溝上センター長から供与された。pUC-HBAeus及びpUC-HBCATから、core promoter/enhancer領域遺伝子

(nt 900-1857)をFirefly luciferaseレポーターベクターへサブクローン化した。さらに、core promoter/enhancer領域の一部を遺伝子型AとCで置き換えた種々の変異体を作製した。各プラスミドをLipofectamine LTXを利用してヒト肝がん細胞株HuH-7に導入した。ウイルス抗原の発現はELISA法で、転写活性はdual luciferase assay系で測定した。

(倫理面への配慮)

株化細胞および既にクローン化された遺伝子を用いた研究であり該当しない。

#### C. 研究結果

pUC-HBAeus, pUC-HBBj56, pUC-HBCATをトランスフェクション (TF) した一過性HBV複製細胞の培養上清を経時的に5日目まで回収しHBV抗原を測定した所、HBs抗原はTF後1-5日とも遺伝子型Aが最も高値でついで遺伝子型Bであった。HBe抗原は、TF後1日目はどの型も同等であっ

たが、2日目以降は遺伝子型Cが他に比べ有意に高い値を示した。

HBV 遺伝子型AとCの core promoter/enhancer 遺伝子からの転写活性をレポーターアッセイで比較すると遺伝子型C由来の方が高活性を示すことがわかった。この遺伝子領域には enhancer I, NRE, enhancer II, basal core promoter が含まれることが知られている。遺伝子型Cの高転写活性の責任領域を明らかにするため、各部分領域をA型とC型でスワップしレポーターアッセイを行った。その結果、enhancer IIと basal core promoter 領域をC型からA型に置換すると転写活性が低下すること、その逆の場合、活性が亢進することが示された。

#### D. 考察

HBV遺伝子型Cは遺伝子型Aに比べ、1)HBe抗原を高産生すること、2)HBe抗原、HBc抗原、プレゲノムの発現を制御するcore promoter/enhancer活性が高いことが示された。この転写活性の差はenhancer II, basal core promoterの違いに起因する可能性が示された。この領域の190塩基は両遺伝子型間で94%一致しているものの11塩基異なっており、その中には転写因子結合部位が含まれる可能性がある。HBVの遺伝子型Cは他の型に比べ、肝がん発生率が高いことが疫学的に示されているが複製増殖、宿主因子との相互作用における特徴については全くと言ってよいほど明らかでない。本研究は、HBVの遺伝子型依存的な病態発現機構の解明に向けた一歩となる可

能性が考えられる。

#### E. 結論

HBVの遺伝子型依存的な転写活性調節に enhancer II, basal core promoter 遺伝子が関与する可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Suzuki T. Morphogenesis of infectious hepatitis C virus particles. *Front. Microbiol.* 3: 38 (2012).
2. Ando T., Imamura H., Suzuki R., Aizaki H., Watanabe T., Wakita T, and Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathog.* 8: e1002561 (2012).
3. 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*, 432: 29-38 (2012).
4. Fukazawa H, Suzuki T., Wakita T, Murakami Y. A cell-based, microplate colorimetric screen identifies 7,8-benzoflavone and green tea gallate catechins as inhibitors of the hepatitis C virus. *Biol Pharm Bull.* 35: 1320-1327 (2012).
5. Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T., Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of Hepatitis C Virus Genotype 3a

in Cultured Cells.  
Gastroenterology 144: 56-58 (2013).

6. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. Microbes Infect. 15: 45-55 (2013).

G. 知的所有権の出願・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



■平成24年度 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)

## B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究 研究分担報告書

### 長鎖ノンコーディング RNA を標的とした 肝発がん機構の解明に関する研究

研究分担者 北川 雅敏 浜松医科大学・医学部・教授

研究要旨：本研究では、B型肝炎の再活性化および肝発がんの機構の解明を目指し、HBVによって変動する宿主の長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA)を同定し、機能の解析を行ない、分子標的として診断治療法の創成を目指す。H24年度は、HBxによって発現が変動するlncRNAをマイクロアレイ解析によって検索し、4種の発現が低下する機能未知のlncRNAを見出した。H25年度はその検証と機能解析を行なう。

#### A. 研究目的

B型肝炎の再活性化およびHBV肝がんの診断治療法の創成は厚生労働行政の観点からも極めて重要な課題である。しかしながらそれらの分子メカニズムは未だに不明と言って良い。そこで本研究では、現在のがん研究のトピックスのひとつである長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA)に注目し、B型肝炎の再活性化および肝発がんの機構の解明のブレークスルーを目指す。まず、HBVによって変動する宿主のlncRNAを同定し(H24-25年度)、HBV感染系や臨床サンプルでの検証および機能の解析を行なう(H25-26年度)。さらにその知見を基にlncRNAを分子標的とした診断治療法の創成を目指す(H26-28年度)。

#### B. 研究方法

本年度はHBVのXタンパク質(HBx)の標的宿主lncRNAを見出す事を目指した。そのため、ヒト肝がん細胞株Huh7にHBx-C発

現プラスミドをトランスフェクションし、HBxを発現させ、48時間後に細胞を集めてRNAを抽出、cDNAを合成した。まず、①既知の癌関連lncRNAの変動をQRT-PCRにて解析した。次に、②アジレント社のマイクロアレイSurePrint G3を用いてlncRNAの発現を網羅的に検索した。変動が見られたlncRNAはQRT-PCRで確認した。

(倫理面の配慮)

現時点では実験動物やヒト検体を用いていない。次年度以降、必要に応じて本学の該当する委員会等に申請し承認後に該当実験を行なう。

#### C. 研究結果

① *ANRIL*、*HOTAIR*、*HULC*等の既知の癌関連lncRNAで、顕著な変動を示すものは見つからなかった。一方で、②マイクロアレイによる網羅的検索を行なった結果、HBxによって発現抑制される4種の

lncRNAを見出し、QRT-PCRで確認した。一方で、HBxで発現変動するコーディング遺伝子の検索は研究計画外であるが、発現上昇する1種と抑制される1種を見出した。さらなる解析が必要である。

#### D. 考察

今回見出されたHBxによって発現抑制されるlncRNAはがん抑制遺伝子である可能性が示唆される。よってH25年度に肝がん細胞株、HBV感染細胞系を用いた検証を行なう必要がある。その上で、HBV由来肝がんのヒト生検サンプルでの検証を行なうか検討する。一方でこれらlncRNAの肝発がんにおける機能やHBxによる発現抑制機構を分子生物学的手法で解析する事が重要と考えられる。それらの知見は、今まで不明であったHBVによる肝発がん等の機構解明のブレークスルーとなる事が期待される。さらにそれを基に、lncRNAを分子標的とした治療薬の創成が期待できる。一方で、今回の解析はマイクロアレイによるもので、全てのlncRNAをカバーしているわけではなく、さらに次世代シーケンスを用いたlncRNAの網羅的解析も必要と考えている。

#### E. 結論

HBxによって発現が低下する機能未知の4種のlncRNAを見出した。これらはがん抑制遺伝子である可能性が示唆され、今後は種々の方向から解析し、分子標的としての検証を行なう事が必要である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

- 1) Kitagawa M, Kotake Y, Ohhata T. Long non-coding RNA involved in cancer development and cell fate determination. *Curr Drug Targets* 2012; 13:1616-1621.
- 2) Egawa K, Kitagawa K, Inoue K, Takayama M, Takayama C, Saitoh S, Kishino T, Kitagawa M, Fukuda A. Decreased tonic inhibition in cerebellar granule cells causes motor dysfunction in a mouse model of Angelman syndrome. *Sci Transl Med* 2012; 4: 163ra157.
- 3) Suzuki S, Ohashi N, Kitagawa M. Roles of the Skp2/p27 axis in the progression of chronic nephropathy. *Cell Mol Life Sci*: 10.1007/s00018-012-1232-x, in press.
- 4) Liu N, Matsumoto M, Kitagawa K, Kotake Y, Suzuki S, Shirasawa S, Nakayama KI, Nakanishi M, Niida H, Kitagawa M. Chk1 phosphorylates the tumor suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signaling. *EMBO J* 2012; 31:2365-2377.
- 5) Kitagawa K, Kitagawa M. The SCF ubiquitin ligases involved in hematopoietic lineage. *Curr Drug Targets* 2012; 13:1641-1648.
- 6) Niida H, Kitagawa M. Regulation of DNA replication licensing. *Curr Drug Targets* 2012; 13:1588-1592.
- 7) Suzuki S, Fukasawa H, Misaki T, Togawa A, Ohashi N, Kitagawa K, Kotake Y, Niida H, Liu N, Nakayama K, Nakayama KI, Yamamoto T, Kitagawa M. The amelioration of renal damage in Skp2-deficient mice is canceled by p27<sup>Kip1</sup> deficiency in Skp2<sup>-/-</sup> p27<sup>-/-</sup> mice. *PLoS ONE* 2012; 7: e31249.
- 8) Fukasawa H, Fujigaki Y, Yamamoto T, Hishida A. Kitagawa M. Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway and Organ Fibrosis. *Curr Medici Chem* 2012; 19: 893-900.

##### 2.学会発表

- 1) 大畑樹也、神武洋二郎、北川雅敏 : Recent Progress of long non-coding RNA research. 第71回日本癌学会総会 シンポ

ジウム 札幌 2012年

2) 北川雅敏、劉寧：Chk1 phosphorylates the tumor suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signaling. 第45回日本発生物学会、第64回日本細胞生物学会合同年会、ワークショップ 神戸、2012年.

北川雅敏、高芸、北川恭子「癌治療用組成物」（特許登録番号 4967137 号 2012年 4月13日）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

なし

■ 平成 24 年度 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)

## B 型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究 研究分担報告書

### 肝細胞分化と HBV 増殖機構の解明および HBV 蛋白の機能解析に関わる研究

研究分担者 朝比奈 靖浩 東京医科歯科大学 教授

研究要旨：HBV は成熟肝細胞でのみで複製するとされるが、定常状態の肝細胞が一定の速度で turn over しているにも関わらず、複製中間体の cccDNA が核内に残存し続ける原因は不明である。本研究では、細胞周期が静止し幹細胞類似形質を持つ細胞など、肝細胞の分化状態の違いが HBV ライフサイクルに与える影響を解明し、従来の薬剤開発とは視点を異にする細胞分化機構を標的とした新規治療の創出に新たな知的・技術的基盤を確立することを目的とする。本年度は、ヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆細胞株を用いた細胞分化度を調節し得る培養系を構築した。本系を用いた HBV 培養・増殖系を確立し、細胞分化度の変化が HBV ライフサイクルに与える影響の解析することは、従来の薬剤開発とは視点を異にする細胞分化機構を標的とした新規治療の創出に新たな知的・技術的基盤を確立するために有用である。

#### A. 研究目的

定常状態の肝細胞が一定の速度で turn over しているにも関わらず、HBV 複製中間体の cccDNA が核内に残存し続ける原因は不明である。本研究では、「細胞周期が静止し幹細胞類似形質を持つ細胞において cccDNA が保存されることが一因」との仮説に基づき、肝細胞の分化状態の違いが HBV ライフサイクルに与える影響を解明し、従来の薬剤開発とは視点を異にする細胞分化機構を基軸とした新規治療の創出に新たな知的・技術的基盤を確立することを目的とした。

#### B. 研究方法

入手可能なヒト肝細胞及びヒト肝幹・前

駆細胞株等を用いて細胞分化度を調節しうる培養系を確立する。分化度の異なる細胞における HBV 発現培養系を確立し、HBV 増殖、cccDNA、宿主遺伝子発現の関係性を網羅的に解析する。これにより cccDNA が肝内に存在し続ける機構に関連する因子を標的とした低分子化合物のスクリーニングを行う。

(倫理面の配慮)

本研究における遺伝子組換え実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく「研究開発二種省令・研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」に準拠し遂行する。研究の施行に当た