

- acute phase of dengue virus infection. *Archiv. Virol.* in press
- 2) Tougan,T., Aoshi,T., Coban,C., Katakai,Y., Kai,C., Yasutomi,Y., Ishii,KJ. and Horii,T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum.Vac.Immunother.* 2012 in press
- 3)Karamatsu,K., Matsuo,K., Inada,H., Tsujimura,Y., Shiogama,Y., Matsubara,A., Kawano,M. and Yasutomi,Y. Single systemic administration of Ag85B of mycobacteria DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Asthma Allergy* 2012;5:71-79.
- 4) Nomaguchi,M., Yokoyama,M., Kono,K., Nakayama,E.E., Shioda T., Saito,A., Akari,H., Yasutomi,Y., Matano,T., Sato,H. and Adachi,A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microve. Infect.* in press
- 5) Yoshida,T., Omatsu,T., Saito,A., Katakai,Y., Iwasaki,Y., Iijima,S., Kurosawa,T., Hamano,M., Nakamura,S., Takasaki,T., Yasutomi,Y., Kurane,I Akari,H. CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins *Archives Virol* 2012;15::363-368.
- 6) Tajiri,K., Imanaka-Yoshida,K., Matsubara,A., Tsujimura,Y., Hiroe,M., Naka,T.,Shimojo,N., Sakai,S., Aonuma,K. and Yasutomi,Y. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis. *J.Immunol* 2012;189;2043-2053.
- 7) Uchdida,A., Sasaguri,H., Kimura,N., Tajiri,M., Ohkubo,T., Ono,F., Sakaue,F., Kanai,K., Hirai,T., Sano,T., Shibuya,K., Kobayashi,M., Yamamoto,M., Yokota,S., Kuboddera,T., Tomori,M., Sakaki,K., Enomoto,M., Hirai,Y., Kumagai,J., Yasutomi,Y., Mochizuki,H., Kuwabara,S., Uchihara,T., Mizusawa,H. and Yokakota,T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain* 2012;135;833-846.
- 8) Saito,A., Kono,K., Nomaguchi,M., Yasutomi,Y., Adachi,A., Shioda,T., Akari,H. and Nakayama,E. E. Geographical genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *J.Gen.Virol.* 2012;93:594-602.
- 9) Higashino,A., Sakate,R., Kameoka,Y., Takahashi,I., Hirata,M., Tanuma,R., Masui,T., Yasutomi,Y. and Osada,N. Whole-genome sequencing and analysis of the Malaysian cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) genome. *Genome Biol.* 2012 Epub
- 10) Tachibana,S., Sullivan,SA., Kawai,S., Nakamura,S., Goto,N., Arisue,N., Palacpac,NMQ., Honma,H., Yagi,M., Tougan,T., Katakai,Y., Kaneko,O., Mita,T., Kita,K., Yasutomi,Y., Kim,HR., Sutton,PL., Shakhbatyan,R., Horii,T., Yasunaga,T., Bamwell,JW., Escalante,AA., Carlton,JM. And Tanabe,K. Plasmodium cynomolgi genome sequences provide insight into Plasmodium vivax and the monkey malaria clade. *Nature*

Genetics 2012; 44:1051-1055.

2.学会発表

1) 渡邊健太、松尾和浩、保富康宏：ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスをベクターとした粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発 第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜 2012年11月17-18日

2) 和田 剛、小原 道法、保富 康宏：C型肝炎モデルマウスを用いた治療用DNAワクチンの検討 第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜 2012年11月17-18日

3) 和田 剛、小原 道法、保富 康宏：HCV-DNA ワクチンの細胞性免疫誘導能とC型肝炎モデルマウスを用いた治療効果についての検討 第60回日本ウイルス学会 大阪 2012年11月13-15日

4) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏：強力な細胞性免疫を誘導する Ag85B 発現弱毒エイズウイルスの防御免疫機構の解析 第60回日本ウイルス学会 大阪 2012年11月13-15日

5) Okamura,T., Matsuo,K., Yasutomi,Y. : Induction of protective immune responses against pathogenic AIDS virus infection in

monkeys infected with non-pathogenic AIDS virus carrying an adjuvant molecule.

第41回日本免疫学会 神戸 2012年12月5日-7日

6) TSUJIMURA,Y., YASUTOMI,Y. : Suppressive effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, to inflammatory responses in human bronchial epithelial cells. 第41回日本免疫学会 神戸 2012年12月5日-7日

7) Tajiri,K., Imanaka-Yoshida,K., Hiroe,M., Shimojo,N., Sakai,S., Aonuma,K., Yasutomi,Y.: Suppressor of Cytokine Signaling 1 in Dendritic Cells Inhibits Myocardial Inflammation in Experimental Autoimmune Myocarditis. Basic

Cardiovascular Sciences 2012 scientific sessions, 2012.7.23-26, New Orleans, USA

8) 田尻和子、下條信威、町野智子、酒井俊、今中一吉田恭子、廣江道昭、保富康宏、青沼和隆：スタチンはCD4陽性T細胞のTh1/Th17細胞への分化を抑制し心臓の炎症を制御する。第16回心血管内分泌代謝学会、2012.11.23-24、東京

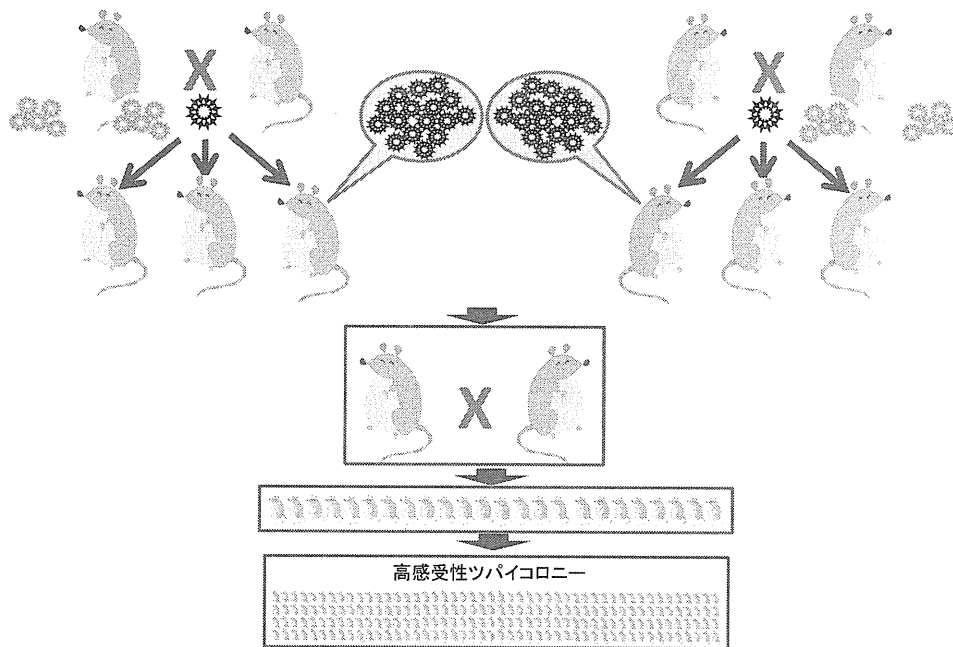


図1 HBV高感受性ツパイの作製

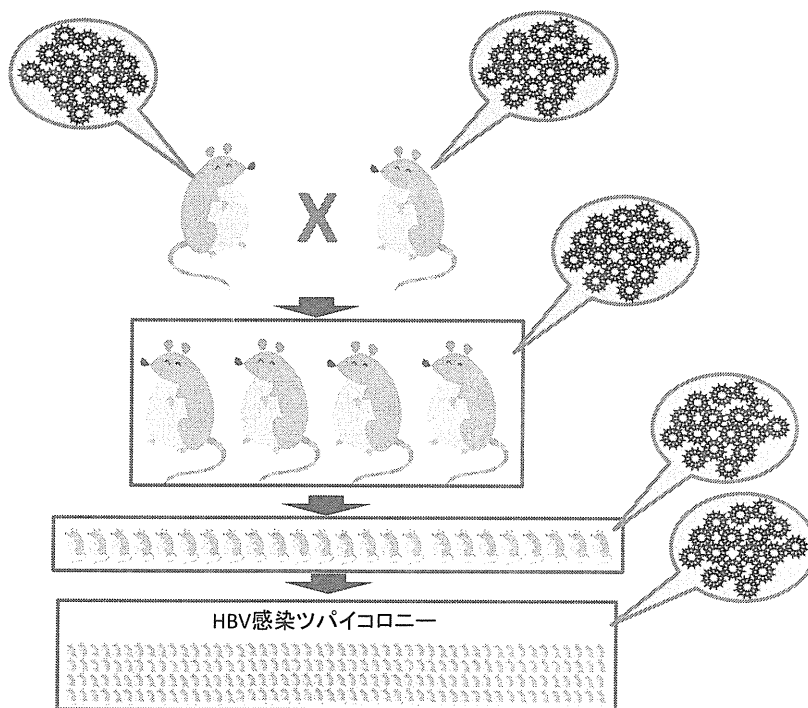


図2 HBV感染ツパイコロニーの作製

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

ツパイ全ゲノム解析に基づくB型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究
ツパイ免疫学的解析系の確立、感染・発症評価系の改良、効率の良いHBV-ツパイ感染実験
モデルの確立

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並びに実験に必要な各種申請を進めた。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分子のアミノ酸配列に由来する合成ペプチドに対する抗体の作成を本研究の代表者である小原道法博士（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100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 の様にヒトにあつてマウスにない分子をツパイは持っていた。

また、ヒトとマウスで機能が異なる事が知られている TLR9 のツパイ由来遺伝子をクローニングし、本班の研究分担者 石井教授とともに解析の準備を進めた。

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 β -hydroxysterol Δ 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 β -hydroxysterol Δ 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.
(和文)
1. C型肝炎ウイルス感染モデル 小原道法、木村公則、小原恭子 *Animal Models 感染症* (野本明男、喜多正和編) pp188-197 (2012).
2. 肝炎ウイルスモデル 小原道法、木村公則、小原恭子 *Animal Models がん* (中村卓郎編) pp346-355 (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 β -Hydroxysterol- Δ 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關与する新規宿主因子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
3. 「C型肝炎の予防、治療又は改善用組成物」 特願2011-125440 出願日 平成23年6月3日 発明者 小原恭子、松森昭、西村知裕、小原道法 出願人 国立大学法人熊本大学、松森昭、(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
4. 「RRM2のアンタゴニストを有効成分として含有するC型肝炎治療剤」 特願2010-180981 出願日 平成22年8月12日 発明者 小原道法、小原恭子、佐藤正明、須藤正幸 出願人 国立大学法人熊本大学、財団法人東京都医学研究機構、中外製薬株式会社
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

ツパイ免疫学的解析系の確立、動物モデルの評価

石井健、（独）医薬基盤研究所、アジュバント開発プロジェクトリーダー

研究要旨：本研究はツパイゲノム解析で得られた情報を基に、自然免疫ならびに獲得免疫系の解析に重要と考えられるツパイ遺伝子を、ヒトやマウスのホモログと比較しながら同定する。また、これらの情報を用いつつ、ツパイ免疫系解析ツールの樹立、特にツパイの免疫応答の解析を可能にする実験系の確立を目指す。本年度は、小原恭子先生のご協力の下、ツパイ TLR 7, 9 の配列を同定、発現系の構築、蛋白発現系の構築に成功した。これらの TLR リガンドは種特異性がヒトとマウスで存在し、ツパイでの機能解析を行うことが今後の B 型肝炎の予防、治療につながる免疫療法の解析に重要であると考えられる。

A. 研究目的

ツパイゲノム解析で得られた情報を基に、自然免疫ならびに獲得免疫系の解析に重要と考えられるツパイ遺伝子を、ヒトやマウスのホモログと比較しながら同定する。また、これらの情報を用いつつ、ツパイ免疫系解析ツールの樹立、特にツパイの免疫応答の解析を可能にする実験系の確立を目指す。

B. 研究方法

上記ゲノム配列から得られた情報から、ツパイの免疫反応を制御する遺伝子群の解析を試みる。まず、

- 1) ツパイ自然免疫関連遺伝子のクローニング
- 2) 同上遺伝子群の発現系の構築、蛋白の発現、抽出、精製の準備
- 3) ヒト、マウスとのオルソログの遺伝子発現実験にてその機能比較試験をするための準備

C. 研究結果

本年度はツパイの自然免疫関連の遺伝子の選定、クローニング、蛋白発現系の構築を目標とした。小原恭子先生のご協力の下、ツパイ TLR9 の約 3000 塩基の配列を同定、3つのフラグメントに分けクローニングを行い、蛋白発現系の構築に成功した。また、TLR7 等ほかの自然免疫遺伝子群のクローニング、発現系実験の準備を開始した。

その他の成果として、B型肝炎予防、治療に向けた新たな免疫療法の可能性を持つ、免疫制御物質、アジュバントのスクリーニングを開始した。

D. 考察

TLR9 遺伝子は全長が長く、クローニング、発現系、蛋白精製も含め非常にチャレンジングであるが、初年度中に今後のマウス、ヒトとの比較実験にめどがついたことは良いスタートが切れたと考えている。

E. 結論

上記の通り、ツパイのTLRを初めとした自然免疫遺伝子のクローニングと蛋白発現系を構築することが出来た。今後、TLRを初め自然免疫関連遺伝子におけるツパイを用いた研究が今後のB型肝炎の予防、治療につながることを期待したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, Komatsu K, Akira S, Kawai T. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23388631.

2) Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:168.

3) Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, Ishii KJ, Horii T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum Vaccin Immunother*. 2013 9(2). [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23291928.

4) Shiraishi K, Hamano M, Ma H, Kawano K, Maitani Y, Aoshi T, Ishii KJ, Yokoyama M. Hydrophobic blocks of PEG-conjugates play a significant role in the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon. *J Control Release*. 2013 165(3):183-90.

5) Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, Kaneko O, Nakagawa A, Horii T, Akira S, Ishii KJ, Coban C. Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. *Cell Host Microbe*. 2012 12(5):705-16.

6) Nakayama T, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) induced IgG1 and IgG4 antibody

responses in young children. *Vaccine*. 2012 30(52):7662-6.

7) Tetsutani K, Ishii KJ. Adjuvants in influenza vaccines. *Vaccine*. 2012 30(52):7658-61.

8) Shoji M, Tachibana M, Katayama K, Tomita K, Tsuzuki S, Sakurai F, Kawabata K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. Type-I IFN signaling is required for the induction of antigen-specific CD8(+) T cell responses by adenovirus vector vaccine in the gut-mucosa. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 425(1):89-93.

9) Desmet CJ, Ishii KJ. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat Rev Immunol*. 2012 12(7):479-91.

10) Nakayama T, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions. *Vaccine*. 2012 30(26):3885-90.

11) 石井健 「概論；宿主の生態バリア」
実験医学（増刊）編集 笹川千尋、柳雄介、大野博司、石井健 感染・共生・生態防御システム 2012 30(20): 134-137

12) 石井健 「概論；感染・共生・生体防御研究から生まれる新たな疾患予防、治療法のターゲット」 実験医学（増刊）編集 笹川千尋、柳雄介、大野博司、石井健 感染・共生・生態防御システム 2012 30(20): 172-175(13)

13) 城内直、石井健 「細胞外核酸の生物学的意義と臨床応用」 実験医学（増刊）編集 笹川千尋、柳雄介、大野博司、石井健 感染・共生・生態防御システム 2012 30(20): 209-216(14)

14) 青枝大貴、石井健 「ワクチン開発研究の展開」免疫学 Update 南山堂 編集 審良静男他 2012 p190-200

15) 青枝大貴、石井健 「自然免疫研究と次世代ワクチン」 医学のあゆみ 2012

243(1):122-128

16) 青枝大貴、石井健「ワクチン」免疫学
コア講義 南山堂 編集 熊ノ郷淳他

2012 p262-271

17) 小檜山康司, 石井健. 自然免疫メカニ
ズムを利用するワクチンアジュバント開発.

THE LUNG 2012 20(4):54-61.

18) 鉄谷耕平、石井健. アジュバント開発
研究の新展開：自然免疫から審査行政.

ファームテクジャパン 2012,28(4): 45-52.

19) 鉄谷耕平、石井健. ワクチンアジュバ
ントの現状と展望. レギュラトリーサイエ
ンス学会誌 2012, 2(2): 149-158.

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

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

ツパイ全ゲノム解析に基づくB型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究
(24261101)

押海裕之、北海道大学大学院医学研究科、講師

研究要旨：HBV感染の小型動物モデルの確立は非常に重要である。自然免疫応答はウイルスの排除に重要であり、そこで働く分子の解明は創薬の新たなターゲット分子の同定やワクチン開発につながる。本研究に於いて、我々はHBV感染時の自然免疫で働く新規分子Lupleを同定することで、創薬の標的となる新たな候補分子を発見した。また、自然免疫応答で重要な働きをするTBK1の活性化状態を指標に、DNAをゲノムに持つDNAウイルス感染時の自然免疫応答のメカニズムには種特異性が有ることを発見した。これは、ツパイ動物モデルに於いて、HBV感染時の自然免疫応答を解析する新たなツールとなる。

A. 研究目的

HBVを防ぐワクチンや治療薬の開発には有効な動物実験モデルが必要であるが、これまで、感染の小型動物モデルが存在しなかった。そのため、HBVの感染が報告されている原猿類に属するツパイを用い、HBV感染の小型動物モデルの作製は非常に重要である。しかし、実験動物として使用されるマウスと違い、ツパイの免疫系は十分には解明されておらず、その解析ツールも十分ではない。

そこで、ツパイ動物実験モデルを用い、HBV感染時の免疫応答を詳細に調べること、肝癌発症のメカニズムの解明や、ワクチンと治療薬の開発を目指す。さらに、ツパイの免疫系解析ツールの開発も同時に行う。

B. 研究方法

リン酸化したTBK1分子に特異的な抗体を用い、TBK1の活性化状態を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。使用した細胞は、ヒトの細胞としては、HeLa細胞や肝実質細胞由来のHuH7やHepG2細胞を使用し、マウス細胞としては、Raw細胞やL929細胞に加え、マウス肝臓より新たに株化した細胞を使用した。

Luple遺伝子を、ヒト細胞よりクローニングし、p125lucレポータープラスミドやNF- κ Bレポータープラスミドを用いシグナル活性化機構を解析した。HBVとしては全ゲノムをコードしたプラスミドを使用し、HepG2細胞へ形質導入することで細胞に感染粒子を形成させ解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の動物実験指針に基づいて行い、遺伝子組換え実験も北海道

大学の遺伝子組換え実験指針に基づいて行った。本年度の研究に於いては、ヒトのサンプルを用いておらず、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

HBV 感染時の自然免疫応答のメカニズムはヒトに於いてもまだ十分に解明されていない。ウイルスの DNA による I 型インターフェロン産生には、TBK1 分子のリン酸化による活性化が必須である。まず、TBK1 のリン酸化を指標に研究を進めたところ、TBK1 活性化の様式が、ヒト細胞とマウス細胞で異なることを発見した。特に、ヒト肝細胞に於いては、ミトコンドリア外膜上に存在する IPS-1 が重要な役割を果たすのに対し、マウス肝細胞に於いては、小胞体上に存在する STING 分子が重要であった。これは HBV 感染時の自然免疫応答には種特異性があることを示唆している。

また、HBV 感染時の自然免疫応答に関与する新規分子として Luple と名付けた新規 DNA ヘリケース分子を同定した。Luple はウイルス感染時には、主に細胞質内に局在することを共焦点顕微鏡による観察により明らかになった。また、N 末端領域に存在するアンキリンリピート部位が、NF- κ B 活性化を誘導する領域であることを発見した。ウイルス感染実験からは、Luple は I 型インターフェロン産生には関与せず、主に、IL-6 の産生を誘導することを発見した。IL-6 は HBV の排除に働くことが報告されている。

TLR3 分子はこれまで RNA ウイルスのみならず DNA をゲノムに持つ DNA ウイルス感

染時の自然免疫応答に非常に重要な働きをすることが知られている。TLR3 のアダプター分子である TICAM-1 のノックアウトマウスを使用し、ウイルス感染時の自然免疫応答に重要な樹状細胞によるクロスプレゼンテーションに、TLR3-TICAM-1 経路が非常に重要であることを証明した。これは、HBV 感染時の CTL 誘導やそれによる肝炎発症のメカニズムの解明、さらに、ワクチン開発に繋がることが期待される。

ウイルス由来の RNA を認識する RIG-I 分子は、ユビキチン化を受け活性化する。我々が発見した Riplet ユビキチンライゲースは RIG-I 分子をユビキチン化することをこれまでに発見していたが、あらたに、Riplet により RIG-I のリプレッサー部位が K63 鎖を介したポリユビキチン化を受けること、これが、RIG-I 依存的な I 型インターフェロン産生に必須であることを解明した。これは、HBV 由来の RNA が宿主自然免疫を活性化するかどうかの検討を行う上での重要な知見となる。

D. 考察

DNA をゲノムに持つ DNA ウイルス感染時の自然免疫応答で主要な役割を持つ TBK1 分子の活性化を指標に研究を進めたところ、TBK1 の活性化機構には種特異性があり、ヒトとマウスに於いて異なっていることが示唆された。今後、ツパイとヒト、マウスを比較することで、ツパイの自然免疫システムがヒト型かどうかの検証をすることで、ツパイを用いた小型動物モデルの有用性を評価できると期待される。

我々が同定した Luple 分子は、自然免疫

で働き、DNA ウイルス感染時の IL-6 産生に関与する。IL-6 は HBV の排除に働くことが示唆されており、Luple 分子が新たな治療薬の標的の候補分子の一つになりうると期待される。

E. 結論

自然免疫で重要な働きをする TBK1 分子のリン酸化状態を指標とすることで、HBV 感染時の自然免疫活機構解析の新たなツールを確立した。

新規分子 Luple を単離することで創薬のターゲットとなる新たな候補分子を発見した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Seya T, Shime H, Takaki H, Azuma M, Oshiumi H, Matsumoto M. TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis. *Oncoimmunology* 1(6): 917-923, 2012.
- 2) Azuma M, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Cross-priming for antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C depends on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c(+)/CD8 α (+) dendritic cells. *Oncoimmunology* 1(5): 581-592. 2012

2. 学会発表

- 1) Oshiumi H, Matsumoto M, and Seya T. Riplet ubiquitin ligase plays essential role in RIG-I-mediated

type I interferon production, and is targeted by hepatitis C virus 第 41 回日本免疫学会学術集会 兵庫県 2012年

- 2) 押海裕之 松本美佐子 瀬谷司 C型肝炎ウイルスが、Riplet ユビキチンライゲースを分解し RIG-I 依存的な I 型インターフェロン産生を抑制するメカニズムの解明 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012年
- 3) Oshiumi H, Matsumoto M, and Seya T. Riplet ubiquitin ligase is essential for TRIM25-mediated RIG-I activation and is targeted by Hepatitis C virus International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting ToKyo 2012

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

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

ツパイ高感染性 HBV の馴化・選択

村上 周子 名古屋市立大学大学院医学研究科 特任助教

研究要旨：ツパイによる新規 B 型肝炎ウイルス（HBV）感染モデル動物の確立を目的として、HBV 高感染株の検討を行っている。(1) HBV 接種後の感染評価において、実験動物より経時的に採取可能な血液量は限られているため、微量の血清による HBV 感染評価系を確立した。(2) 感染源の検討として、旧世界ザルに感染するギボン HBV をウイルス遺伝子分子系統解析した結果、ヒト HBV 遺伝子型 J に近いことが明らかとなった。(3) ギボン HBV をヒト肝細胞キメラマウスに接種した結果、感染の成立を確認した。ツパイは進化学的にヒトよりもギボンに近いことから、ギボン HBV はツパイにも感染する可能性が考えられる。

共同研究者氏名

田中靖人

名古屋市立大学大学院医学研究科

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス（HBV）には、A-J までの遺伝子型が特定されており、それぞれの臨床病態は異なる。HBV の病態を解析し、新規治療薬を開発するためには、HBV 各遺伝子型を感染させた肝炎モデル動物による長期的かつ詳細な解析が必須である。

HBV と同種のウイルスは、げっ歯類や鳥類にも存在するが、その病態はヒト HBV を再現するものではなく、肝炎モデル動物としては限界がある。近年開発され実用化されている、ヒト肝細胞キメラマウスは、短期的な検討には有用性の高い感染モデル動物であるが、獲得免疫系を有しないなどの問題点もあり、実際の宿主で起こってい

る現象を十分に再現できていない。そのため、より自然に近い環境で HBV が感染可能な動物モデルが求められている。

今回の研究班では、ツパイを宿主とする HBV 感染試験を行う。現在までに我々は、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた HBV の感染実験を展開し、クローンによる感染・複製効率の違いや薬剤感受性の違いを検討してきた。この経験に基づき、ツパイへの HBV 感染源の作成、およびツパイにおける HBV 感染の評価系の確立について検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) HBV 接種後の感染評価において、実験動物より経時的に採取可能な血液量は限られており、極めて少量である。そこで、微量の血清による HBV 感染評価系を検討した。

2) 旧世界サルに感染するギボン HBV 感染血清からウイルス DNA を抽出し、ウイルス遺伝子分子系統解析を行った。

3) ギボン由来 HBV をキメラマウスに接種し、感染を試みた。

(倫理面への配慮)

患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ギボン血清についてはタイでの倫理審査を通過している。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

C. 研究結果

1) HBV-DNA の定量は、血清 5 μ l より DNA を抽出し、高感度リアルタイム PCR により測定が可能となった。HBs 抗原、HBcr 抗原なども高感度測定系を確立し、AST、ALT、アルブミン等の生化学的評価は、それぞれ約 2 μ l の血清を希釈して測定することが可能であることを確認した。

2) ギボン HBV は、ウイルス遺伝子分子系統解析の結果、S 領域において、ヒト HBV 遺伝子型 J に近いことが示された。

3) 血清中 HBV-DNA, HBs 抗原、HBcr 抗原および肝細胞内 cccDNA を検出した。キメラマウス血清より抽出した HBV-DNA 配列は、接種したギボン HBV-DNA 配列と同一であった。以上のことから、ギボン HBV はヒトに感染しうることが明らかとなった。

D. 考察

微量血清サンプルにおける HBV 感染評価系は、約 15 μ l の血清サンプル量で評価に必要な HBV-DNA 測定および生化学検

査が可能である。

ギボン HBV からヒト肝細胞キメラマウスへの異種間感染が成立することを確認した。ツパイは進化学的にヒトよりもギボンに近いことから、ギボン由来の HBV はツパイに感染する可能性が示唆された。今後、ツパイに HBV を感染させた肝炎モデルを確立し、HBV 遺伝子型や各種変異体における感染効率の違い、HBV に起因する肝線維化や肝発癌メカニズムの解析、さらには新規抗ウイルス薬のスクリーニングなどへの応用を検討したい。

E. 結論

微量血清からの HBV 感染評価系を確立した。ツパイより採取可能な血液量は少量であるが、HBV の感染評価は可能である。

ギボン HBV よりヒト肝細胞キメラマウスへの異種間感染が可能であることを示した。次年度よりツパイ高感染性 HBV 株の樹立を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakamoto T, Tanaka Y, Kani S, Sugiyama M, Watanabe T, Iijima S, **Murakami S**, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the Dependence of Hepatitis B Virus Genotype G on Co-infection with Other Genotypes for Viral Replication. J Viral. Hepat., in press.
- 2) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsushashi H, **Murakami**

S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon-1 in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. Gut., 2012 Nov 7. [Epub ahead of print]

3) 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., 84(4):587-95, 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
なし

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

B型肝炎ツパイ肝臓を標的としたリポソーム型核酸送達システムの開発

原島秀吉、北海道大学大学院薬学研究院、教授

研究要旨：

B型肝炎ウイルス(HBV)に対する有効な治療法としてHBVのcccDNAを直接標的とした核酸医薬への期待が高まっている。しかし、核酸医薬による治療の実現には、標的肝臓への有効な送達システムが必要不可欠である。我々はリポソーム型核酸キャリア(MEND)の開発を進めている。新規に合成開発したpH応答性カチオン性脂質YSK05を搭載したYSK05-MENDによってsiRNAを健常マウス肝臓へ送達したところ、標的遺伝子を高効率でノックダウン可能であった。小原博士(研究代表者)らが構築したHCVに対する高効率siRNAをYSK05-MENDで送達することでHCVトランスジェニックマウス、HCV感染ヒト肝臓キメラマウスで治療効果を誘起することに成功した。HBVの核酸による治療へYSK05-MENDの有用性が示された。

A. 研究目的

難治性肝疾患を引き起こすB型肝炎ウイルス(HBV)に対する有効な治療法として、HBV-mRNA と cccDNA (covalently closed circular DNA) を直接標的とした高活性 siRNA (short interference RNA) や TALEN (Transcription activator like effectors nuclease) などの核酸医薬に大きな期待が寄せられている。核酸を薬として用いる場合、生体内の酵素による分解を防ぎ、標的臓器の機能させたい標的細胞の中に有効な形で核酸を送達する必要がある。本研究ではツパイ肝臓へ核酸医薬を送達するリ送達システムの開発を最終目的として、多機能性エンベロープ型ナノ構造体 MEND (Multifunctional envelope-type nano device) による

siRNA のマウス肝臓への送達とヒト C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染ヒト肝臓キメラマウスにおける治療への応用を試みた。

B. 研究方法

新規 pH 応答性カチオン性脂質 YSK05 を独自に設計・合成し、YSK05 を MEND の脂質膜に含む YSK05-MEND への siRNA の効率的封入法を構築した。次に標的遺伝子として第 7 因子に対する siRNA を封入した YSK05-MEND を、健常マウスへ静脈内投与し、血清第 7 因子タンパク質量からノックダウン活性を評価し、YSK05-MEND の脂質組成などの最適化を計った。蛍光標識 siRNA を封入した YSK05-MEND を投与し、肝臓における YSK05-MEND の送達性を評価した。さ

らに、YSK05-MEND に小原博士（研究代表者）らが見出した HCV に対する高効率 siRNA を封入し、HCV トランジェニックマウス、また HCV を感染させたヒト肝臓キメラマウスへ静脈内投与し、治療効果について検討した。本研究は、北海道大学の定める「遺伝子組換え実験等安全管理規程」、並びに「動物実験に関する規定」に基づく承認を取得し遂行している。

C. 研究結果

1. YSK05-MEND の最適化と健常マウス肝臓におけるノックダウン評価

脂質の種類や組成比を検討した。その結果、健常マウスへ静脈内投与後に血清第7因子量を指標にノックダウン活性を評価したところ、50%抑制可能な投与量 (ED₅₀) が、0.06 mg/kg で、最適化前 1.0mg/kg から 10 倍以上活性を向上させることに成功した (Figure 1 左図)。また、蛍光標識 siRNA の分布を肝臓切片で観察した結果、YSK05-MEND により肝実質細胞に広く siRNA が送達されている様子が観察された (Figure 1 右図)。

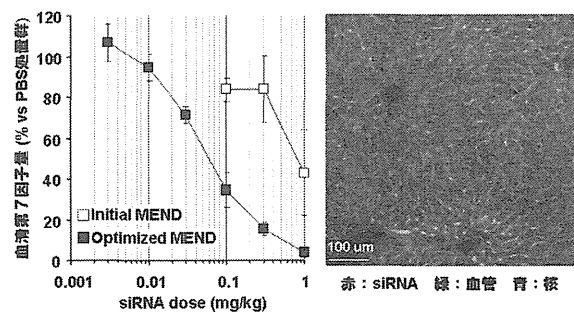


Figure 1 健常マウスにおける機能評価

2. HCV 治療への応用

In vivo 肝臓において高いノックダウン

活性を示す最適化 YSK05-MEND に、小原博士（研究代表者）らが見出した、HCV に対する高効率 siRNA を封入した。小原らによって樹立された Cre/lox/HCV-MxCre トランスジェニックマウスによる慢性肝炎発症モデルに対して静脈内投与 (1 mg siRNA /kg) 後、肝臓切片を作成し観察したところ、非治療群で観察されていたリンパ球等の炎症細胞の浸潤し慢性肝炎の症状が抑制され、正常化している様子が観察された (Figure 2 上図)。さらに HCV を感染させ6週間を経たヒト肝臓キメラマウスへ YSK05-MEND (1mg/kg×2回) を静脈内投与したところ、投与後2週間まで、血中の HCV mRNA 量の抑制が持続していることを確認した (Figure 2 下図)。

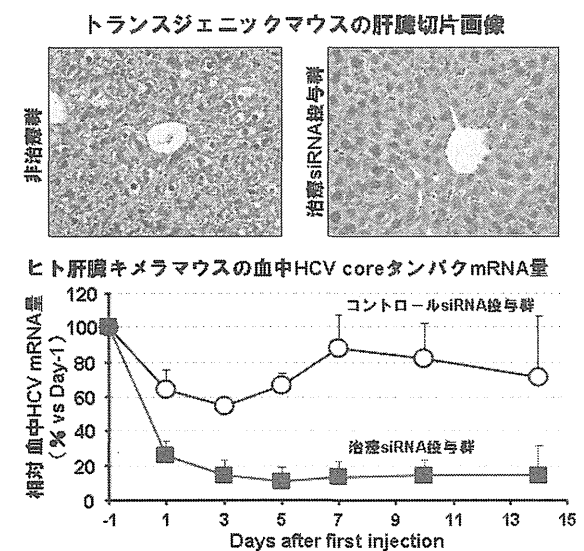


Figure 2 HCV 治療への応用

D. 考察

脂質組成の最適化により健常マウス肝臓におけるノックダウン活性が ED₅₀ を指標に 0.06 mg/kg を示す YSK05-MEND を

構築することに成功した。これは、世界で最も強力な siRNA キャリアである pH 応答性リポソーム (Lipid nanoparticle; LNP) のノックダウン活性 (0.02mg/kg; Semple SC, et al. *Nat. Biotech.*, 28, 172-, 2010) に近い値を示しており、YSK05-MEND は強力なノックダウン活性を有することを示唆している。これらの結果は、YSK05-MEND が HBV に対する核酸医薬の送達にも有用であることを示唆している。またヒト肝臓と類似構造を有するヒト肝臓キメラマウスにおいて HCV 抑制効果が認められたことは、YSK05-MEND がヒト肝臓において有用である可能性を示している。今後はツパイ肝臓への核酸送達に向け、YSK05-MEND のツパイにおける有用性の評価が課題である。

E. 結論

新規 pH 応答性脂質 YSK05 を含む YSK05-MEND は、最適化によりマウス肝臓で従来より 10 倍以上高いノックダウン活性を示した。また HCV に対する高効率 siRNA を YSK05-MEND で送達することで、HCV トランスジェニックマウス、HCV 感染ヒト肝臓キメラマウスで治療効果を得ることに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sato Y, Hatakeyama H, Sakurai Y, Hyodo M, Akita H, Harashima H. A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity in vitro and in

vivo. *J. Control. Release*, 163: 267-276 (2012)

2) Sato Y, Hatakeyama H, Hyodo M, Akita H, Harashima H. Development of an Efficient Short Interference RNA (siRNA) Delivery System with a New pH-Sensitive Cationic Lipid. *YAKUGAKU ZASSHI* 132(12): 1355-1363 (2012)

2. 学会発表

1) 末光永里奈、林泰弘、梶本和昭、佐藤悠介、Afsana Akhter、櫻井遊、畠山浩人、兵藤守、加地範匡、馬場嘉信、原島秀吉. Mogat1 siRNA搭載型in vivoデリバリーシステムを用いた2型糖尿病予防効果の検証. 日本薬学会北海道支部第139回例会. 2012年12月8日. 札幌(札幌コンベンションセンター)

2) Hayashi Y, Kajimoto K, Sato Y, Suemitsu E, Akhter A, Sakurai Y, Hatakeyama H, Hyodo M, Kaji N, Baba Y, Harashima H. An integrated strategy with DNA microarray and non-viral in vivo siRNA delivery to discover novel therapeutic targets for type 2 diabetes. 10 th Annual Discovery on Target. 2012年10月1-3日. Copley Marriott Hotel. Boston, MA, USA.

3) 佐藤悠介、畠山浩人、兵藤守、秋田英万、原島秀吉. siRNA搭載pH応答性MENDのin vivoにおける機能評価. 日本薬剤学会第27年会. 2012年6月26日. 兵庫(神戸国際会議場)

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

・出願

出願番号：特願 2012-11952

発明者：原島秀吉、畠山浩人、佐藤悠介、
兵藤守、櫻井遊、秋田英万

名称：脂質膜構造体に pH 依存性カチオン性を付与する剤、それにより pH 依存

性カチオン性が付与された脂質膜構造体
および脂質膜構造体の製造方法

出願日：2012年5月25日

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し