

1012.

- (14) 石田雄二、柳愛美、吉実康美、山崎ちひろ、横道博、渡士幸一、脇田隆字、茶山一彰、立野知世、ヒト肝細胞キメラマウス由来の初代培養ヒト肝細胞を用いた in vitro HBV 感染モデル、第 8 回 広島肝臓プロジェクト研究センター、シンポジウム、広島、1012.
- (15) 佐能正剛、堀口彩、藤本真美、成富洋一、佐藤公也、河村章生、杉原数美、立野知世、堀江透、北村繁幸、太田茂、ヒト肝細胞移植キメラマウス (PXB mice®) を用いた医薬品のヒト血中動態予測とその応用、第 8 回 広島肝臓プロジェクト研究センター、シンポジウム、広島、1012.
- (16) 立野知世、山本敏誠、吉里勝利、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた PPAR- α agonist のヒト肝細胞への作用に関する解析、第 39 回日本毒性学会学術年会、仙台、2012.
- (17) Tateno C, Yanagi A, Yamasaki C, Yoshizane Y, Ishida Y. Induction of growth arrest and mitochondrial compromise in human hepatocytes by telomere shortening during mitosis through in vivo passage. FASEB Summer Research Conference 2012 Liver Biology: Fundamental Mechanisms & Translational Applications, Snowmass Village, 2012.
- (18) Tanaka J, Fukumuro M, Masumori S, Nakajima M, Hayashi M, Ishida Y, Kakuni M, Tateno C. Micronucleus Assay and Comet Assay Using a Human Hepatocyte Chimeric Mice. 43th EMS Annual meeting, Washington, 2012.
- (19) Pang H, Pan S, Saldivia V, Kaczmarek S, Morikawa Y, Tateno C and de Lannoy I. Evaluation of the Metabolite Profile of Clozapine in PXB- and C57BL/6 Mice Following Intravenous and Oral Dosing of CLZ. 18th North American Regional Meeting ISSX Meeting. Dallas, 2012
- (20) Ishida Y, Yanagi A, Yoshizane Y, Yamasaki C, Chayama K, Tateno C. A new in vitro hepatitis B virus infection model using fresh primary human hepatocytes isolated from humanized mouse liver AASLD, Boston, 2012
- (21) Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Ishida Y, Tateno C. In vitro evaluation of the utility of human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice®)、日本薬物動態学会第 27 回年会、千葉、2012
- (21) Fujimoto M, Sanoh S, Naritomi Y, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Predictability of human pharmacokinetics by allometric scaling in chimeric mice with humanized liver. 日本薬物動態学会第 27 回年会、千葉、2012
- (22) Nozawa K, Ambo T, Ito S, Kamimura H, Aoyama S, Hamamura S, Ohshita H, Tateno C, Adachi Y, Ninomiya S. Retrospective prediction of circulating human metabolites of ziprasidone by Cyp3a KO chimeric mice with humanized liver 日本薬物動態学会第 27 回年会、千葉、2012
- (23) Ambo T, Nozawa K, Ito S, Kamimura H, Aoyama S, Hamamura S, Ohshita H. Tateno C, Adachi Y, Ninomiya S. Retrospective prediction of circulating human metabolites of torcetrapib by Cyp3a KO chimeric mice with humanized liver 日本薬物動態学会 第 27 回年会、千葉、2012
- (24) Ohara Y, Sanoh S, Sugihara K, Kishino T, Tayama Y, Uramaru N, Tateno C, Kitamura S, Ohta S. Comparison of aldehyde oxidase activity in liver of human, mice, and chimeric mice with humanized liver. 日本薬物動態学会第 27 回年会、千葉、2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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）
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究
分担研究報告書（平成24年度）

TALE を用いた B 型肝炎ウイルスの増殖を抑制するシステムの開発
研究分担者 山本 卓 広島大学大学院理学研究科

研究要旨：本研究では、B型肝炎ウイルス（HBV）の増殖を抑制するシステムを確立するために、HBVのコアプロモーターに結合する人工タンパク質のTALEを設計・合成し、in vitroでの結合活性を調べた。その結果、転写因子の結合する配列に強く結合する4種類のTALEタンパク質について強い結合活性が確認された。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）の共有結合性閉環状型 DNA（cccDNA）は肝細胞の核内に存在し、ウイルス増殖の際の複製中間体として働く。抗ウイルス薬投与後も cccDNA は肝細胞に残存することから、この DNA の完全除去が完全治療につながると考えられる。そこで本研究では、cccDNA を標的として結合あるいは切断する人工タンパク質を設計・作製し、肝炎ウイルスの増殖を抑制する作用について検討することを目的とする。

B. 研究方法

HBV のコアプロモーター領域の転写調節因子 FTF や HNF4 の結合する保存配列を 4 か所選び、人工 DNA 結合タンパク質 TALE の作製を試みた。分担者らが開発した Golden Gate 法の改良法により 4 種類の TALE を構築し、大腸菌を用いて TALE タンパク質を合成し、ゲルシフトアッセイにより標的配列への結合を解析した。さらに、HBV のコアプロモーターを標的とする人工酵素 TALEN の作製を試みた。

C. 研究結果

HBV のコアプロモーターに結合する 4 種類の TALE タンパク質について、ゲルシフトアッセイによって結合を調べたところ、結合が非常に弱いことがわかった。そこで、TALE の結合リピートを改良し、再度ゲルシフトアッセイによって結合を解析し、TALE の強い結合を検出した。さらに、コアプロモーターに結合する TALEN を構築し、SSA アッセイによって切断活性を確認した。

D. 考察

これまで HBV に結合するジンクフィンガー（ZF）タンパク質の作製とその発現による増殖抑制が報告されている。しかしながら、その抑制の効果は高いとは言い難い。その原因とし、増殖抑制効果を期待できる配列に ZF タンパク質を作製することが困難であったことが考えられる。これに対して TALE は標的配列を自由に選ぶことができる利点がある。これらのことから本実験で作製した TALE および TALEN の増殖抑制効果を示すことができれば、様々なウイルスに対応できる除去法を示すことが可能になる。

E. 結論

独自の方法によって HBV のプロモーターに結合する人工タンパク質 TALE の効率的な作製方法を確立した。今後は、作製した TALE のウイルス増殖抑制効果を調べる計画である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mashimo T, Kaneko T, Sakuma T, Kobayashi J, Kunihiro Y, Voigt B, Yamamoto T and Serikawa T. Efficient gene targeting by TAL effector nucleases coinjected with exonucleases in zygotes. *Scientific Reports*, 2013, in press
- 2) Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki KI, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S and Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells*, 2013 in press
- 3) Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Horch H, Hamaguchi N, Nakamura T, Bando T, Ohuchi H, Yamamoto T Noji S and Mito T. Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. *Nature commun*, 2012, 3:1017
- 4) Ochiai H, Sakamoto N, Fujita K, Suzuki KI, Sakuma T, Nishikawa M, Miyamoto T, Matsuura S, Shibata T and Yamamoto T. Zinc-finger nuclease-mediated targeted insertion of reporter genes for

quantitative imaging of gene expression in sea urchin embryo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(27) : 10915-10929

2. 学会発表

- 1) 山本 卓、ゲノム編集技術を用いた様々な生物や培養細胞における標的遺伝子の改変、the 110th RIKEN BRC セミナー、つくば、2013
- 2) Takashi Yamamoto, Genome editing in cultured cells and various organisms using engineered nucleases, 国立遺伝学研究所 1615th Biological Symposium, 三島、2012
- 3) 李 紅梅, 藤本直子, 笹川典子, 山本 卓, ウォルツェン クヌート, 櫻井英俊, 山中伸弥, 堀田秋津、Duchenne 型筋ジストロフィー患者由来 iPS 細胞における TALEN を用いたゲノム上でのエクソンススキッピング、第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ「人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集」、福岡、2012
- 4) 落合 博, 宮本達雄, 金井昭教, 細羽康介, 佐久間哲史, 野地澄晴, 山本 卓, 松浦伸也、人工ヌクレアーゼを利用した遺伝子間領域に存在する一塩基変異導入によるヒト疾患モデル細胞の樹立、第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ「人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集」、福岡、2012
- 5) 山本 卓、ZFN 法と TALEN 法を用いたゲノム編集時代の到来、第 35 回日本分子生物学会年会シンポジウム「ゲノムデザイン、進化」、福岡、2012
- 6) 山本 卓、人工ヌクレアーゼ (ZFN や TALEN) を用いたゲノム編集研究の現状と可能性、DNA 鑑定学会第 5 回大会、東京、2012
- 7) 山本 卓, 西川綾美, 佐久間哲史「TALE を用いた B 型肝炎ウイルスの増殖を抑えるシステムの開発」H24 年度厚生労働省 B 型

- 肝炎創薬実用化等研究班会議、広島、2012
- 8) 山本 卓, 「人工ヌクレアーゼを基盤とするゲノム編集技術の現状と可能性」第6回家畜DNA西郷シンポジウム(2012.10.5, 福島)
- 9) 山本 卓, 動物におけるゲノム編集技術の開発と応用、新植物育種技術(New plant breeding techniques)に関する技術開発の現状とその産業利用へ向けての課題・JBAセミナー、東京、2012
- 10) 山本 卓、様々な生物での標的遺伝子改変を可能にするゲノム編集技術とその可能性、日本動物学会、形態形成・イモリネットワーク共催シンポジウム、大阪、2012
- 11) 山本 卓、人工ヌクレアーゼを基盤とする動物でのゲノム編集、日本学術会議公開シンポジウム「新しい遺伝子組換え技術の開発と植物研究・植物育種への利用」、東京、2012
- 10) Sakuma T, Hosoi S, Ochiai H, Miyamoto T, Matsuura S, Sakamoto N, Noji S, Yamamoto T. Advanced methods for the construction, evaluation and application of TALENs、第45回日本発酵生物学会年会、神戸、2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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）
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究
分担研究報告書（平成24年度）

革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究

研究分担者 田原 栄俊 広島大学大学院医歯薬保健学研究院
細胞分子生物学研究室 教授

研究要旨：次世代シーケンサーを用いたB型肝炎患者の血液中マイクロRNAの網羅的解析を行うことによりHBVに特異的なmiRNAの発現変動を明らかにする目的で、非HBV健常人、低HBV患者、高HBV患者における血漿中エクソソームのマイクロRNAの発現を次世代シーケンサーで解析し、HBVのウイルス量にともない増加するmiRNAおよびHBVの感染の有無により変化するmiRNAを見いだすことができた。また、肝臓におけるHBVの産生機構におけるエクソソーム（細胞外小胞）の分泌を検討したが、MASPIN、TSAP6およびmiR-22などの関与を見いだすことはできなかったが、HBVの産生機構におけるエクソソーム（細胞外小胞）の分泌の関与を調べるための方法を確立することができた。

A. 研究目的

健常人、肝炎、肝がん患者から血液を採取して、血漿中のエクソソーム中に存在するマイクロRNAを精製し、次世代シーケンサーにより網羅的な解析をおこなう。肝炎、肝がんへの特異性を見るために他の消化器癌との比較もあわせて行う。本研究では、非ウイルス性の肝炎・肝がん、ウイルス性の肝炎・肝がんにおけるマイクロRNAのプロファイリングをデータベース化し、将来的な血液を用いた簡便な検査を視野に入れたものを構築する。また、HBVの産生におけるエクソソーム分泌機構の関与についても解析を行い、その関与の有無を明らかにする。

B. 研究方法

- ①健常人、肝炎、肝がん患者から血液を採取して、血漿画分からウイルスRNAを精製する。
- ②健常人、肝炎、肝がん患者から血液を採取してエクソソーム中のマイクロRNAを精製する。
- ③精製したウイルスRNAウイルスを簡易型次世代シーケンサーIon PGM システムを用いて、シーケンスを行い変異箇所の網羅的解析を行う。
- ④エクソソームから精製したマイクロRNAを用いて、次世代シーケンサーIon Proto

nシステムを用いて、網羅的解析を行い疾患により変動するマイクロRNAを明らかにする。

これらの解析結果をデータベース化してウイルス肝炎、肝がんとの相関、ウイルスの変異型との相関を解析し、肝炎診断、治療の足がかりとする。

⑤細胞培養液および血漿中のエクソソーム解析において、粒子解析装置であるqNanoを用いて解析を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は、平成13年3月に3省（文部科学省、厚生労働省、経済産業省）合同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」ならびに関連8学会によって作成された「遺伝学的検査に関するガイドライン」に準拠して行う。具体的には、資料は最初に連結可能匿名化し、広島大学医学部付属病院の指定する個人情報管理者の下に、一般医学研究よりも厳格な管理を行う。資料提供者からの質問・意見等に関しては、各病院が責任を持って対応する。

C. 研究結果

非HBV健常人、低HBV患者、高HBV患者における血漿中エクソソームのマイクロRNAの発現を次世代シーケンサーで解析

するために最適なRNAの精製方法を検討して、血漿分離からmiRNAの生成過程における方法の確立を行った。その結果、400 μ Lの血漿から次世代シーケンサー解析に適するプロトコルの確立ができた。この方法を用いて、非HBV健常人、低HBV患者、高HBV患者における血漿中エクソソームのマイクロRNAの発現を次世代シーケンサーで解析したところ、約300種のmiRNAの発現を検出することができた。それらのうちmiR-122はウイルス量依存的に増加していた。その他、ウイルス量に依存して増加する新規マイクロRNA、低下するmiRNAを複数同定することができた。これらのマイクロRNAのうち、ウイルス量と共に増加するmiRNAとウイルス量に関係なくHBVの感染、非感染で顕著に異なるmiRNAを見いだすことができた。

血液中に存在するマイクロRNAの多くは、細胞などから分泌されるエクソソームに内包されて分泌される。そこで、HBVのウイルス産生とエクソソーム産生の相関性を見るために、エクソソーム分泌阻害におけるHBVの産生量を比較した。そこで、研究者らがこれまでに明らかにしたエクソソーム分泌系に関わる分子としてがん抑制遺伝子のMASPINに着目して、HBV感染HepG2細胞を用いてこの遺伝子の発現をsiRNAを用いてノックダウンした。MASPINをノックダウンした細胞でHBVのDNAを定量したところ、コントロールと比較して優位な変化は見いだせなかった。また、CHMP4についても同様にsiRNAでノックダウンしたが、コントロールと比較して優位な変化は見いだせなかった。さらに筆者らが見いだした増殖抑制miRNAの一つであるmiR-22については、その強制発現およびanti-miR-22発現ベクターを用いた実験を、HBV感染HepG2細胞を用いておこなったが、いずれも顕著なウイルス産生の変化は見いだせなかった。

D. 考察

本年度は、次世代シーケンサーを用いたHBV患者の血清を用いたmiRNAのシーケンス解析を行い、HBV感染により変動するmiRNAを見いだすことができた。今後は、解析症例を増やすことにより分泌されるmiRNAのデータベースを構築して、健常人とHBV患者でのマイクロRNAの配列解析を発現量と共に解析する必要があると考えられる。一方で、ウイルスの量と共に増加するmiRNAは、ウイル

スの産生メカニズムに関わっている可能性も有り、今後HBV感染組織でのmiRNA発現解析も同一患者で行い、HBV産生におけるmiRNAの関与を明らかにしたい。

HBVのウイルス産生機構におけるエクソソームの分泌機構との関与については全く報告がなく、今回、複数の候補遺伝子の関与を考え、siRNAを用いたノックダウン実験を行ったが、いずれもその関与を見いだす結果を示せなかった。今後、他の分泌機構に関与する分子のノックダウン試みるなどされにその可能性を追求していく必要がある。

E. 結論

本年度は、HBV患者の血清を用いて次世代シーケンサーで解析ができる体制を整えることができた。さらに、HBVのウイルス量にともない増加するmiRNAおよびHBVの感染の有無により変化するmiRNAを見いだすことができた。また、HBVの産生とエクソソームの分泌の関与を解析する方法を確立することができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] D. Xu, H. Tahara, The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging, *Adv Drug Deliv Rev* (DOI information: 10.1016/j.addr.2012.07.010), (2012).
- [2] X. Zhang, K. Horibata, M. Saijo, C. Ishigami, A. Ukai, S. Kanno, H. Tahara, E.G. Neilan, M. Honma, T. Nohmi, A. Yasui, K. Tanaka, Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair, *Nat Genet* 44 (2012) 593-597.
- [3] M. Sato, K. Shin-ya, J.I. Lee, M. Ishihara, T. Nagai, N. Kaneshiro, G. Mitani, H. Tahara, J. Mochida, Human telomerase reverse transcriptase and glucose-regulated protein 78 increase the life span of articular chondrocytes and their repair potential, *BMC Musculoskelet Disord* 13 (2012) 51.
- [4] Y. Kudo, S. Iizuka, M. Yoshida, T. Tsunematsu, T. Kondo, A. Subarnbhesaj, E.M. Deraz, S.B. Siriwardena, H. Tahara, N. Ishimaru, I. Ogawa, T. Takata, Matrix Metalloproteinase-13 (MMP-13) Directly and Indirectly

y Promotes Tumor Angiogenesis, *J Biol Chem* 287 (2012) 38716-38728.

2. 学会発表

(1) 田原栄俊、Senescence-associated microRNAs, a novel approach to tumor suppression, 9th AACR-JCA Joint Conference, Hyatt Regency Maui, 2013

(2) 池田梢、岡本沙矢香、玉置彩、嶋本顕、田原栄俊、膵臓がんで変化する血漿中miRNAの探索とバイオマーカーとしての応用、第35回日本分子生物学会年会、マリンメッセ福岡、2012

(3) 福永早央里、石原えりか、佐々木康介、塩谷文章、嶋本顕、田原栄俊、細胞老化を調節するマイクロRNAの同定と機能解析、第35回日本分子生物学会年会、マリンメッセ福岡、2012

(4) 石原えりか、藏元達谷、嶋本顕、塩谷文章、田原栄俊、細胞老化における miR-22 の機能、第35回日本分子生物学会年会、2012

(5) 岡田恵、中村亜由美、宗岡美紗、田原栄俊、細胞老化によって増加するexosome分泌のメカニズム解析、第35回日本分子生物学会年会、マリンメッセ福岡、2012

(6) 福永早央里、石原えりか、佐々木康介、竹下文隆、嶋本顕、落谷孝広、田原栄俊、老化関連microRNAによる膵臓がんの増殖抑制、第71回日本癌学会学術総会、さっぽろ芸文館、2012

(7) 田原栄俊、老化誘導miRNAによるがんのマイクロマネジメント、第71回日本癌学会学術総会、札幌市教育文化会館、2012

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

宿主細胞による HBV ゲノム修飾の解析、抗 HBV 免疫応答を惹起する
新規肝炎モデルマウスの開発
研究分担者 丸澤 宏之 京都大学医学研究科 消化器内科

研究要旨： HBV感染者では、単一の宿主内においても多様な変異を伴ったウィルスクローンの集合体として感染が成立しており、このようなウィルス変異クロンの存在が抗ウィルス療法への成否と密接に関係している。本研究課題では、薬剤誘導性に肝細胞特異的にCreタンパクを発現する遺伝子改変マウスと、CreによるLoxPの組換え作用によりHBVウィルス抗原を発現する遺伝子改変マウスを新たに作成し、これらの2種のモデルマウスを交配することにより、ヒト肝炎を模倣した免疫応答の惹起が可能な新規B型肝炎モデルマウスの開発を目指す。また、宿主遺伝子編集酵素による抗HBV活性の全体像を明らかにし、*in vitro*ならびに *in vivo*でのウィルスゲノムへの不活化変異の誘導系を構築・検証する。

A. 研究目的

B型肝炎ウィルス(HBV)感染症では、C型肝炎ウィルス感染症の大部分が慢性肝炎という基本病態を呈するのとは対照的に、急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌、無症候性キャリアと、きわめて多様な臨床病像を呈することが特徴である。このようなHBV感染により形成されるさまざまな病態は、ウィルス側の要因と宿主側の因子の両者の相互作用により形成されている。

HBV感染による多様な病態の形成に関与する宿主側の要因としては、ウィルスが感染した肝細胞に対する免疫応答が中心的な役割を果たしている。加えて、インターフェロンや核酸アナログ製剤によるHBVに対する抗ウィルス療法に際しても、背景に存在する免疫系の応答機構の理解が、HBs抗原の消失など臨床的治癒状態を達成するためには必須となる。したがって、HBV治療における新しい創薬ターゲットを探求する

ためには、HBVにより惹起される多様な免疫応答を模倣したモデルマウスの樹立が重要となる。しかしながら、ヒトでは幼少時にHBV感染した場合には無症候性キャリアとなるのと同様に、マウスでも胎児期にわずかでもHBV抗原提示が存在すると免疫寛容状態となってしまう、肝炎を発症しないことが知られている。このため、薬剤誘導性に成人期にHBV抗原タンパクを肝細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスがひとつのモデル候補となりうるが、HBVは自らのゲノム中に promoter や enhancer モチーフを有していることから、胎児期から完全にウィルス抗原タンパクの発現を抑制したモデルの構築がきわめて困難である。そこで、薬剤誘導性に肝細胞特異的に Cre タンパクを発現する遺伝子改変マウスと、CreによるLoxPの組換え作用により内在性ウィルス promoter 配列を含まないHBV抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウスを新規に作成し、これらの2種のモデルマウス

を交配することにより、肝炎としての免疫応答の惹起が可能な B 型肝炎モデルマウスの新規開発を目指すことを本研究課題の目的とする。

一方、HBV 感染病態を特徴づけるウィルス側の要因としては、ウィルスゲノム配列に生じた非常に多様な塩基変化をもつ HBV 変異クローンがさまざまな臨床病態形成に深く関与していることがあげられる。事実、HBV 感染者では、単一の宿主内においても互いに類似の配列を有する多数の変異クローンの集合体としてウィルス感染が成立しており、このような性質は quasispecies nature と総称されている。この、quasispecies を構成する多彩な変異ウィルスクローンが、HBV 感染時の病態形成や抗ウィルス治療への感受性・抵抗性と深く関連することが知られている。このようにきわめて高い遺伝子変異が HBV ゲノムに生じる要因としては、これまではウィルス側の因子が重要と想定されてきた。すなわち、ウィルスゲノムの複製の際に生じる読み間違いが、修復されることなくそのまま子孫に受け継がれ、複製時のエラーが修復されることなく個々のウィルスクローンに蓄積していくことで、多様な遺伝子変異をもつウィルスクローンの集合体を産み出す原動力となっているものと考えられている。

他方、遺伝子情報をコードしている DNA や RNA の配列に変異を導入する活性をもつ複数のヒト遺伝子編集酵素が近年、同定されている。この遺伝子編集酵素の中心を占めるのが、Apolipoprotein B100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC) ファミリーである。APOBEC ファミリー分子は塩基配列上の

シチジン (C) を脱アミノ化する酵素活性を有しており、その結果、標的となる DNA や RNA の塩基配列が変化をきたす作用を有している。遺伝子編集酵素群の生理的役割は現時点では不明なものが多いが、複数の分子は生体に感染したウィルスに対する防御機構として機能していることが明らかになりつつある。この中でも、APOBEC3G, APOBEC3F, APOBEC3C は HBV のゲノム配列に高頻度に C→T/G→A への遺伝子変異を誘導する作用をもつことが報告され、APOBEC ファミリー分子が感染時にウィルス遺伝子に塩基変化を導入することにより、ウィルスを不活化する役割を担っていると考えられるようになった。我々のこれまでの検討結果からも、肝炎ウィルス感染とそれに伴う炎症反応、ならびにインターフェロン産生反応により、肝細胞にこれらの遺伝子編集酵素群のいくつかが特異的に発現誘導されることが明らかとなってきた。興味深いことに、*in vitro* における肝培養細胞の解析から、HBV 感染にともなって産生されるインターフェロンの刺激により、肝細胞に APOBEC3G の転写が活性化され発現誘導されてくることがわかった。そこで、これらの遺伝子編集酵素による抗ウィルス活性ならびに遺伝子異常の導入活性の可能性に着目し、HBV ゲノムに生じる遺伝子変異の生成に宿主側の分子が寄与していることを検証することにより、新しい抗 HBV 制御機構を明らかにすることを本研究の目的とする。本年度は、HBV に生じているウィルス変異の包括的な解析 platform を構築するとともに、実際の B 型肝炎症例で検出される HBV ゲノムの全体像を掌握することを目

標として、次世代シーケンサーを用いたウィルスゲノムの deep sequencing 解析を進めた。

B. 研究方法

1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

まずはじめに、薬剤誘導性に肝細胞で特異的に Cre タンパクを発現する遺伝子改変マウスの作成を行った。マウス作成のためのコンストラクトとしては、Cre を誘導可能にするために、estrogen 受容体部分に点突然変異を複数導入し、内在性 estrogen に反応せず、tamoxifen に反応する性質をもった変異型 estrogen 受容体 (ERT2) と Cre の融合タンパク質をヒト Albumin promoter 配列の下流に挿入したコンストラクトを作成した。このコンストラクトを用いてマウス胚への injection を実施し、F0, F1 マウスを取得した。また、Cre による LoxP の組換え作用により promoter 配列を含まない個々の HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウス作成のためのコンストラクトとしては、まず CAG promoter 下流に loxP で挟んだ緑色蛍光タンパク (GFP) を置き、その下流に HBs 抗原の遺伝子配列を配置したものを作成した。すなわち、Cre の存在しない状況ではマーカー分子としての GFP を発現し、Cre の存在下では LoxP の組換え作用により HBs 抗原を発現することが期待できる構造としている。このコンストラクト作成を行い、マウス胚への injection を実施した。

2. HBV ゲノムの網羅的変異解析；

HBV ゲノムに生じた包括的な変異解析には、ゲノムアナライザー II X (イルミナ社)、GS Junior (Roche 社)、の 2 種類の次世代シー

ケンサーを併用した。解析対象サンプルとしては、ヒト急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎～肝硬変症例の肝組織ならびに血清から抽出した DNA を用い、high-fidelity な増幅反応により HBV amplicon を作成した。引き続き、超音波発生器を用いて約 100 bps から 500bps の長さに断片化し、核酸の両側断端を酵素処理により修復した後、その断端にアダプター配列タグの付加を行い、ゲノムアナライザー解析に適した約 200-400bps の長さの核酸のみを選別・抽出した。次に、抽出されたそれぞれの核酸サンプルに、インデックス・タグのいずれかを付加し、サンプルの調整を行った。これらの調整済サンプルを、全長 HBV 塩基配列の特定にはゲノムアナライザー II X を用いたペアエンド法により両端 76 塩基を読み取る大規模並列シーケンス解析を実施するとともに、特定の HBV ゲノム領域の deep sequencing 解析には GS Junior による解析を併用し、双方の結果の validation 作業にも適用した。

(倫理面への配慮)

肝疾患患者等からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるように十分に配慮した。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」(平成 17 年 6 月 29 日一部改正)及び「疫学研究に関する倫理指針」(平成 19 年 8 月 16 日全部改正)並びに「臨床研究に関する倫理指針」(平成 20 年 7 月 31 日全部改正)に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。そ

の際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供試料や個人情報をご適正に管理保存した。

組換え DNA 実験を含む遺伝子組換え生物等の第二種使用等については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)、「同施行規則」(平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号)、「研究開発等に関わ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核酸防止措置などを定める省令」(平成 16 年文部科学省・環境省令第一号)、その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じた。

動物実験に関しては、「動物の保護および管理に関する法律」等に基づく「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」(平成 18 年 6 月 1 日一部改正)に従った。また、当該所属機関の動物実験委員会に申請し承認を受けた後、実施した。

C. 研究結果

1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

本年度はモデルマウス作成のためのコンストラクト作成と、マウス胚への injection、F0 マウスの獲得までの作業を完了した。薬剤誘導性に肝細胞で特異的に Cre タンパクを発現する遺伝子改変マウス作成のためのコンストラクトとしては、変異型 estrogen 受容体 (ERT2) と Cre の融合タンパク質をヒト Albumin promoter 配列の下流に挿入したベクターを構築した。このコンストラクトをマウス胚に injection し、

F0 マウスを 2 ライン確保することができた。他方、Cre による LoxP の組換え作用により HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウス作成のためのコンストラクトとしては、CAG promoter 下流に loxP で挟んだ GFP を挿入し、その下流に HBs 抗原の遺伝子配列を配置したベクターを作成した。上記、誘導型 Cre 発現コンストラクトと同様に、HBs 抗原発現用コンストラクトもマウス胚への injection を実施し、F0 マウスを 7 ライン確保することに成功した。

2. HBV ゲノムの網羅的変異解析；

HBV 感染者の体内 quasispecies nature を構成する多彩な変異ウイルスクローンの網羅的な解析 platform を構築することにより、臨床病態と関連した HBV ゲノム変異を絞り込むことを目標とし、ゲノムアナライザー II X (イルミナ社)、GS Junior (Roche 社)、の 2 種類の次世代シーケンサーを併用したウイルスゲノム解析を行った。

HBV 感染クローンの quasispecies nature は、各病態間で著しく異なった多様性を呈しており、慢性肝炎/肝硬変例と急性/劇症肝炎の肝組織中の HBV クローンの多様性を比較したところ、ウイルスクローンの多様性の指標のひとつである Shannon entropy の各塩基平均値は、急性/劇症肝炎例で 0.007 であったのに対して慢性肝炎/肝硬変例では 0.034 であり ($p < 0.05$)、慢性肝疾患ではきわめて多様なウイルスクローンによりその病態が形成されていることがわかった。他方、慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療中の症例では、血中ウイルスが未検出となった後も、肝組織から検出さ

れる HBV クローン中には既知の薬剤耐性変異をもつ変異ウイルスが一定の頻度で検出されることが確認されたため、抗ウイルス薬投与開始後には潜在的に治療抵抗性ウイルスクローンが肝組織中で相対的な比率上昇をきたしている可能性が示唆された。

D. 考察

薬剤誘導性に任意の時期に HBV 抗原タンパクを肝細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成することにより、ヒト B 型肝炎病態を模倣した新しい B 型肝炎モデル動物の構築を目指すことを本研究課題の目標としている。同時に、次世代シーケンサーにより、多様な肝疾患病態を呈する肝組織に感染した HBV ゲノムの特徴を明らかにすることができれば、各臨床病態に関連した HBV ゲノムの特徴をもつモデルマウスの樹立も将来的には可能となることが期待できる。

E. 結論

肝炎としての免疫応答の惹起が可能な B 型肝炎モデルマウスの新規開発を目指し、薬剤誘導性に肝細胞特異的に Cre タンパクを発現するモデル、GFP 発現をマーカー分子とした Cre 依存性に HBV 抗原タンパクを発現するモデル、という 2 種類の遺伝子改変マウスの作成と、さまざまな HBV 関連臨床病態に相関した肝組織中の HBV ゲノムの次世代シーケンサー解析を行った。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, Kou T, Yazumi S, Fujiwara T, Tsuchiya S, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing. PLoS ONE. 2012; 7: e35052.
- 2) Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Nishijima N, Chiba T, Uemoto S. Efficacy and safety of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living donor liver transplantation. Hepatol Res. 2012; 43: 67-71.
- 3) Okuyama S, Marusawa H, Matsumoto T, Ueda Y, Matsumoto Y, Endo Y, Takai A, Chiba T. Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. Int J Cancer. 2012; 130: 1294-1301.
- 4) Chiba T, Marusawa H, Ushijima T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs. Gastroenterology. 2012; 143: 550-563.
- 5) Osaki Y, Ueda Y, Marusawa H, Nakajima J, Kimura T, Kita R, Nishikawa H,

Saito S, Henmi S, Sakamoto A, Eso Y, Chiba T. Decrease in alpha-fetoprotein levels predicts reduced incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection receiving interferon therapy. J Gastroenterol. 2012; 47: 444-451.

- 6) Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Mori A, Ogawa K, Yoshizawa A, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Chiba T. Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. J Viral Hepat. 2012; 19: 32-38.

2. 学会発表

- (1) 池田敦之、丸澤宏之、千葉勉. 次世代シーケンサーの肝疾患診療への応用. 第 54 回日本消化器病学会. 2012/10/10-13. 神戸国際展示場、ポートピアホテル、神戸国際会議場. 兵庫.
- (2) 高橋健、那須章洋、丸澤宏之. C型肝炎ウイルス薬剤耐性クローンの次世代ゲノムアナライザー解析. 第 54 回日本消化器病学会. 2012/10/10-13. 神戸国際展示場、ポートピアホテル、神戸国際会議場. 兵庫.
- (3) 那須章洋、丸澤宏之、千葉勉. 本邦における薬剤耐性 HCV クローンの潜在頻度の次世代シーケンサー解析. 第 48 回

日本肝臓学会総会. 2012/6/7-8. 石川県立音楽堂、ホテル日航金沢、ANA クラウンプラザホテル金沢. 石川.

- (4) 金秀基、上田佳秀、丸澤宏之、羽賀博典、上本伸二、千葉勉. 肝移植後 C 型肝炎治療の重大な有害事象. 第 48 回日本肝臓学会総会. 2012/6/7-8. 石川県立音楽堂、ホテル日航金沢、ANA クラウンプラザホテル金沢. 石川.

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特記事項なし

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）
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究
分担研究報告書（平成24年度）

The discovery of host restriction factors required for HBV entry
(infection) into mouse cells.

研究分担者 Hussein Hassan Aly Ibrahim 国立感染症研究所・ウイルス第二部
主任研究官

研究要旨： Considerable numbers of patients with chronic hepatitis B virus (HBV) develop progressive liver-related complications, i.e. liver cirrhosis, hepatic decompensation, hepatic failure, and hepatocellular carcinoma. Several antiviral drugs are used in patients with chronic hepatitis B (CHB) to block complications. However, these drugs are endowed with limited therapeutic efficacy and considerable adverse effects. Circumstantial evidences have shown that antiviral drugs are neither able to eradicate all forms of HBV DNA including ccc DNA nor they are capable of inducing appropriate levels of immune modulation in CHB patients. On the other hand, HBV replication and liver damages remain controlled in many chronic HBV-infected subjects by host immunity. An immune-competent small animal model system that support the entire HBV life cycle is required to understand why anti-HBV immune response fail to control HBV infection in some patients. Except for the entry step, mouse hepatocytes were previously shown to support all steps of HBV life cycle. This shows that there are some host restriction factors that prevent HBV from infecting mouse cells. We are aiming to identify these factors and using it to establish immunocompetent transgenic mouse model that can support the entire HBV life cycle.

A. 研究目的 Aim

The final target of this study is to understand the anti-HBV immune response and to utilize this knowledge for the development of novel and evidence-based therapeutic regimen for chronic HBV infection. To accomplish this, the primary aim of this study is to first establish an immunocompetent small animal model supporting HBV infection. The intermediate objective is to assess if an evidence-based and innovative therapy can be developed for chronic HBV-infected subjects with retrieved information. The final target is to provide a strategy and road map of immune therapy for CHB patients.

B. 研究方法 Method

In order to establish immunocompetent HBV small animal model system we are aiming to first discover the human restriction host factors that limit HBV infectivity to only human hepatocytes. To discover the host factors required for HBV infection we are using the induced pluripotent stem cells (IPS) cells. These cells were previously shown to pass into 4 different stages until they differentiate into human hepatocytes (Definitive endoderm, Hepatic specification, Immature hepatocytes, Mature hepatocytes.)

1- HBV infection into differentiated IPS cells:

We are aiming to establish IPS cell culture in our laboratory. And while differentiating

these cells into mature hepatocytes, we are going to challenge every stage of differentiation with HBV infection.

-HBV virus inoculum will be derived from the medium supernatant of HepG2-4A5 cells. The supernatant will be concentrated with PEG, and will be used for infection.

2- Identification of HBV permissive stage of differentiation:

IPS cells infected with HBV in different stages of differentiation will be analyzed for HBV permissiveness using real time PCR for HBV-DNA, ELISA detection of HBV surface and core antigens. The stage that support HBV infectivity will be then identified.

2- Identifying Factors required for HBV entry.

Using microarray analysis to differentiation the genes expression profile between the differentiation stage that allowed for HBV replication, and the previous non permissive stage. The genes related to proteins with a surface membrane localization will be then identified.

siRNA to these genes will be purchased and used to silence the expression of these genes in the HBV-permissive stage of differentiation.

Using these siRNA the human host factors required for HBV entry will be identified. These genes will be then cloned and will be overexpressed in the HBV non permissive stages. If HBV entry is found, then the

identification will be concluded.

3- Establishment of immune competent transgenic mouse carrying these human genes supporting HBV infection.

4- Study of HBV immunopathogenesis.

(倫理面への配慮) Ethical

All mice that will be used in this study will receive human care and permissions from institutional review board to conduct the study.

C. 研究結果 result

This work is still undergoing.

Different types of IPS cells are purchased.

IPS cells culture were successfully established.

Differentiation of IPS stem cells into mature hepatocytes was also successfully established.

HBV infection into different stages of differentiation is undergoing now.

D. 考察 discussion

This work is still undergoing. The successful differentiation of IPS cells into mature hepatocytes is expected to be an important tool for the discovery of host factors required for HBV life cycle.

E. 結論 conclusion

We successfully established IPS cells culture, and differentiation into mature hepatocytes. HBV infection into different stages of differentiation is undergoing. This system is expected to reveal several host factors required for HBV life cycle.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1- Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for analysis of the hepatitis C virus life cycle. *Microbiology Immunology*; 56(1): 1-9, 2012.
- 2- Oshiumi H, Aly HH, Funami K, Matsumoto M, Seya T. Multi-step regulation of type I interferon induction by hepatitis C virus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013 Jan 5
- 3- Abe Y, Aly HH, Imamura, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 synthase inhibitor 1 and prostaglandin I2 receptor agonist are potent anti-Hepatitis C virus (HCV) drugs. *Gastroenterology*, in publication.

2. 学会発表

19th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses, Venice, Italy, October 2012.

- 1- Aly HH, Watashi K, Watanabe N, Kato T, Wakita T. Construction of Hepatitis C virus genotype 4a clone.
- 2- Aly HH, Shimotohno K, Wakita T,

Oshiumi H, Seya T. HCV particles production from mouse hepatocytes.

- 3- Abe Y, Aly HH, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 synthase plays a key role in production of infectious HCV particles.
- 4- Watanabe N, Date T, Aly HH, Aizaki H, Wakita T. Neutralization antibody induction by immunization with E2 proteins purified from different cells. 19th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses, Venice, Italy, October 2012.

The 34th Naito Conference, Sapporo, October 2012.

- 5- Aly HH, Shimotohno K, Oshiumi H, Wakita T, Seya T. HCV particles production from mouse hepatocytes.

G. 知的所得権の出願・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

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）
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究
分担研究報告書（平成24年度）

革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じた HBV 排除への創薬研究
研究分担者 阿部 弘美 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 助教

研究要旨：ヒト肝細胞キメラマウスに B 型肝炎患者由来の血清を接種し HBV 感染させたマウスに健常人末梢血単核球を投与し HBV 感染細胞と NK 細胞間における Fas/FasL 経路を介した HBV 感染肝細胞死が誘導されるヒト劇症肝炎モデルを作製した。肝炎モデルではヒトの免疫反応を含めた創薬研究を実施し、さらに HBV 産生モデルとして HBV transgenic (HBV Tg) マウスも作製し、HBV の複製、出芽などウイルスのライフサイクルの各段階において HBV 排除を目的とした創薬研究を実施する。

A. 研究目的

肝炎モデルを改良し慢性 B 型肝炎モデルを作製、また HBV 産生モデルとして HBV Tg マウスを作製し HBV 感染細胞の排除機構、cccDNA の排除、HBV 粒子分泌抑制、HBV 蛋白に対する抗体産生促進する因子の探索を目的とする。

B. 研究方法

肝炎モデルを NOG-scld, NOD-scld を背景としたマウスを用いてヒト肝細胞、ヒト免疫細胞を移植し慢性 B 型肝炎モデルを作製する。

3.5kb pregenome RNA を生成するような 1.4 倍長の HBV ゲノムを C57BL/6J-Jcl マウス受精卵へ導入し HBV 産生マウスを作製する。得られた個体の血清中 HBV DNA、HBs 抗原、HBe 抗原、HBV ゲノム複製の状態など特徴をつかみ安定して実験に使用できるような系統を樹立する。

最近、HBs 抗原と関連する miRNA に関

する研究が報告されている。そこで、本研究では、B 型慢性肝炎患者と健常人の血清中 microRNA を比較し、HBV 特異的 miRNA の同定、臨床経過との関連を調べた。

C. 研究成果

NOD-scld マウスを用いた肝炎モデルでは uPA-scld マウスを用いた劇症肝炎モデルでは生着しなかった T 細胞の生着が認められた。

HBV Tg マウスは 4 種類のファウンダーマウスを得た。これらのマウスは C57BL/6J-Jcl マウスと交配させることによって F1 を得て安定的に実験に使用可能な系を選ぶ予定である。

B 型慢性肝炎患者 10 例と健常人 10 例の血清中 microRNA を Toray 3D array system を用いて解析を行った結果、miR-122, miR-22 が HBs 抗原の量と関連していること、さらに miRNA の成熟に関する Argonaute2 (Ago2) は HBV 感染細胞

内で HBc 抗原、HBs 抗原と共局在していることを明らかにした。

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

D. 考察

NOD-scid マウスを用いることで長期ヒト血球細胞の生着が期待できる。

microRNA と臨床経過との関連から、miR-122, miR-22 が HBs 抗原産生に関与していることが示唆された。また、血中の miRNA は Ago2 と結合していること、HBV 感染肝細胞内において Ago2 と HBc、HBs は共局在していることから Ago2 が HBV の粒子形成に関与していることが示唆された。Ago2 と HBV 蛋白の結合を特異的に阻害するような低分子化合物は新たな HBV 治療薬となる可能性がある。

E. 結論

改良型肝炎モデル、HBV Tg マウスを用いることで炎症反応の制御、HBV のライフサイクルに関する研究が促進され、宿主免疫を制御しながら HBV のライフサイクルを標的とした創薬研究が可能となる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Abe H, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Ohishi W, Chayama K. Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle.

PLoS One. 2012. 7: e47490

2. 学会発表

特になし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

平成24年度 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Abe H, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Ohishi W, <u>Chayama K.</u>	Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle.	PLoS One.	7(10)	e47490	2012
Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Nelson Hayes C, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, <u>Chayama K.</u>	Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer by Fas/FasL interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse.	Hepatology	56(2)	555-66	2012
Arataki K, Hayes CN, Akamatsu S, Akiyama R, Abe H, Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W, <u>Chayama K.</u>	Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis B.	J Med Virol	85(5)	789-98	2013
<u>Seya, T.</u> , M. Azuma, and M. Matsumoto.	Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer.	Exp. Opin. Target. Therap.	in press		2013
Tatematsu, M., F. Nishikawa, <u>T. Seya</u> , M. Matsumoto.	Toll-like receptor 3 recognizes single-stranded RNA with incomplete stem structures.	Nat Commun.	in press		2013
Oshiumi, H., K. Funami, H. H. Aly, M. Matsumoto, <u>T. Seya</u> .	Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus.	Arch. Immunol. Therap. Exp.	in press		2013
Toscano, F., Y. Estornes, F. Virard, A. Garcia-Cattaneo, A. Pierrot, B. Vanbervliet, K. Funami, <u>T. Seya</u> , M. Matsumoto, J. J. Pin, T. Renno, S. and Lebecque, K.	Cleavage of TLR3 by cathepsins generates two fragments that remain associated to form a functional receptor.	J. Immunol.	190	764-773	2013
<u>Seya T</u> , Shime H, Takaki H, Azuma M, Oshiumi H, Matsumoto M.	TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis.	Oncoimmunol	1	917-923	2012