

他の研究班への参加状況

研究代表者が、「肝炎等克服緊急対策研究事業」または「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（肝炎関係研究分野）」研究班の研究代表者として参加しているか（ア又はイに記載）

ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。

イ 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加している。

（以下①、②を記載）

①（研究班名）「〇〇〇〇研究班」（研究代表者名：〇〇〇〇）

② 他の研究班で担当している研究と、今回申請している研究の違い（研究内容が重複していないことを具体的に説明）

①「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（肝炎関係研究分野）」研究班（研究代表者：成松久）

②「肝疾患病態指標血清マーカーの開発と迅速、簡便かつ安価な測定法の実用化」—線維化や肝癌での特異的血清マーカーの開発などが主目的であり、HBVの糖鎖解析による感染阻害などの創薬ターゲットの探索やワクチン開発をめざす本研究とは、全く研究内容が重ならない。

合同研究会議開催状況

他の研究班と合同での研究会議開催状況（平成24年度）

ア 他の研究班と合同で研究会議を開催していない。

イ 他の研究班と合同で研究会議を開催している。

（開催している場合は、①開催日、②他の研究班の名称、③他の研究班の研究代表者名を記載してください）

平成24年7月31日 合同研究会議 国立感染症研究所

- ・B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究（脇田隆宇）
- ・B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と感染系の樹立及び感染系による病原体機構の解析と新規抗HBV剤の開発（上田啓次）
- ・HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた感染阻害低分子化合物およびレセプター探索（下遠野邦忠）

平成24年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業 『成果概要』

研究課題：B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

課題番号：H24-B創-肝炎-一般-008

予定期間：H24年度からH28年度まで

研究代表者：加藤直也

所属研究機関：東京大学

所属部局：医科学研究所

職名：特任准教授

年次別研究費(交付決定額)：1年目 130,000,000円

I. 研究の意義

- (1) B型肝炎ウイルス(HBV)による肝発癌抑止は肝臓病学の最重要課題の一つ
- (2) HBVによる肝発癌に自然免疫系、特にMICAを発現するHBV感染肝細胞とNK細胞との攻防が重要な役割を果たす
- (3) HBV増殖を制御しても肝癌の発生は必ずしも制御できない
- (4) 抗ウイルス療法とは異なる自然免疫系の制御による肝発癌抑止戦略が必要

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) ゲノムワイド関連解析を駆使しHBVによる肝発癌における自然免疫系の役割を解明
- (2) HBVによる肝発癌に関わる自然免疫系分子を同定
- (3) B型肝炎発癌に関わる自然免疫系分子の発現調節が可能な薬剤とmicroRNAを探索
- (4) HBV発癌に関わる自然免疫系分子の発現調節により肝発癌を抑止する創薬が期待

III. 1年間の研究成果

・研究代表者

- (1) B型肝炎にMICA遺伝子多型が関連
- (2) B型肝炎患者ではMICA遺伝子多型に応じて血中MICAが上昇
- (3) 血中MICA高値のB型肝炎患者は予後不良

・研究分担者(横須賀 収)

- (1) HBe抗原が自然免疫に関わるRIPK2と相互作用しIL-6などのサイトカイン産生に影響
- (2) RIPK2はNF- κ B依存性分子を介してepithelial to mesenchymal transitionに関与

・研究分担者(小池和彦)

- (1) microRNA25-106bクラスター由来のmicroRNAがMICA遺伝子発現に関与

・研究分担者(松田浩一)

- (1) B型肝炎にMICA遺伝子多型が関連
- (2) 中国人でのB型肝炎リスクであるKIF1B多型が日本人においては関連しない
- (3) MICAプロモーター領域のアレル特異的に転写因子SP-1が結合しMICA遺伝子発現を高めた

・研究分担者(地主将久)

- (1) NKG2D は発現は F4/80(+)CD11b(+)腫瘍内 Mac でも特に CD206^{high} MHC-II (-)の M2 サブタイプに限局
- (2) 肝臓内 Mac では脾臓、リンパ節など他組織 Mac と比較して高い NKG2D 発現
- (3) NKG2D 陽性 Mac は NK 細胞と異なりリガンド陽性腫瘍細胞への細胞障害活性を認めず

・研究分担者(室山良介)

- (1) MICA プロモーター下流にレポーターをもつプラスミドを保持する肝癌細胞株を樹立
- (2) MICA 発現を上昇/減少させる薬剤スクリーニングを開始

IV. 平成 25～28 年度の課題

- (1) HBV による肝発癌における自然免疫系の役割を解明
- (2) HBV による肝発癌に関わる新たな自然免疫系分子の同定
- (3) MICA 発現調節による肝発癌抑止法の開発
- (4) NK 細胞と肝癌細胞との細胞間相互作用の解明

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 自然免疫制御という新たな発想より HBV による発癌予測マーカー・発癌予防薬の開発を行う
- (2) HBV による肝発癌予防に貢献することにより肝癌治療による高額医療費の抑制を実現
- (3) 肝癌死による就労可能人口の低下を防止することにより厚労福祉施策へ貢献

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

・研究代表者

- (1) Kumar V, Lo PHY, 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: e44743

・研究分担者(横須賀収)

- (1) Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Imazeki F, Yokosuka O. Knockdown of receptor-interacting serine/threonine protein kinase-2 (RIPK2) affects EMT-associated gene expression in human hepatoma cells. *Anticancer Res* 2012; 32: 3775-3783
- (2) Wu S, Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Roger T, Shirasawa H, Nomura F, Yokosuka O. Hepatitis B virus e antigen physically associates with receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2 and regulates IL-6 gene expression. *J Infect Dis* 2012; 206: 415-420

・研究分担者(小池和彦)

- (1) 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- κ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. *Hepatology* 2012 (Epub ahead of print)

- (2) Yoshikawa T, Takata A, Otsuka M, Kishikawa T, Kojima K, Yoshida H, Koike K. Silencing of microRNA-122 enhances interferon- α signaling in the liver through regulating SOCS3 promoter methylation. *Sci Rep* 2012; 2: 637
- (3) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Kudo Y, Goto T, Yoshida H, Koike K. A miRNA machinery component DDX20 controls NF- κ B via microRNA-140 function. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 420 :564-569

• 研究分担者(松田浩一)

- (1) Kumar V, Lo PHY, 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: e44743
- (2) 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; 13: 47

• 研究分担者(地主将久)

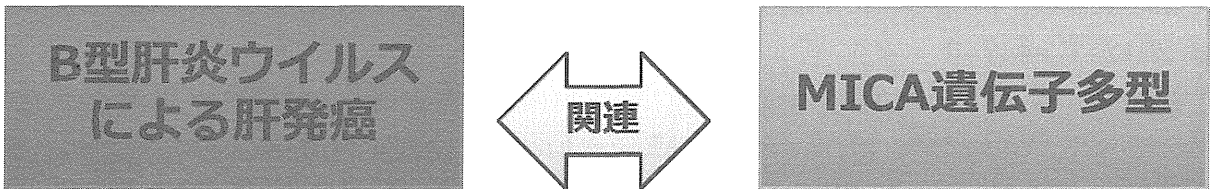
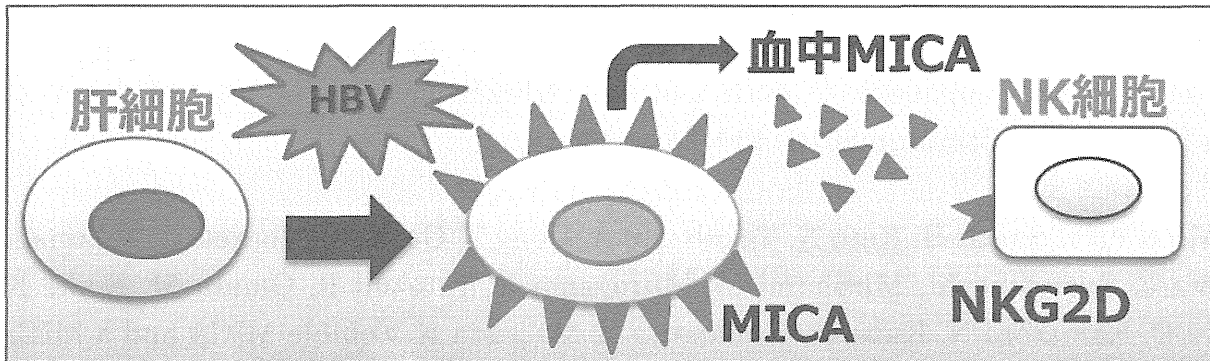
- (1) Jinushi M. Regulatory mechanisms of nucleic acid-mediated innate immune responses in tumor microenvironments. *OncoImmunol* 2012 (in press)
- (2) Jinushi M, Chiba S, Baghdadi M, Yoshiyama H. Regulation of cancer stem cell activities by tumor-associated macrophages. *Am J Cancer Res* 2012; 2: 529-539
- (3) China S, Baghdadi M, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Gorman JV, Colgan JD, Hirashima M, Uede T, Takaoka A, Yagita H, Jinushi M. Tumor-infiltrating dendritic cells suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through TIM-3-HMGB1 interaction. *Nat Immunol* 2012; 13: 832-842

• 研究分担者(室山良介)

- (1) Kumar V, Lo PHY, 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: e44743

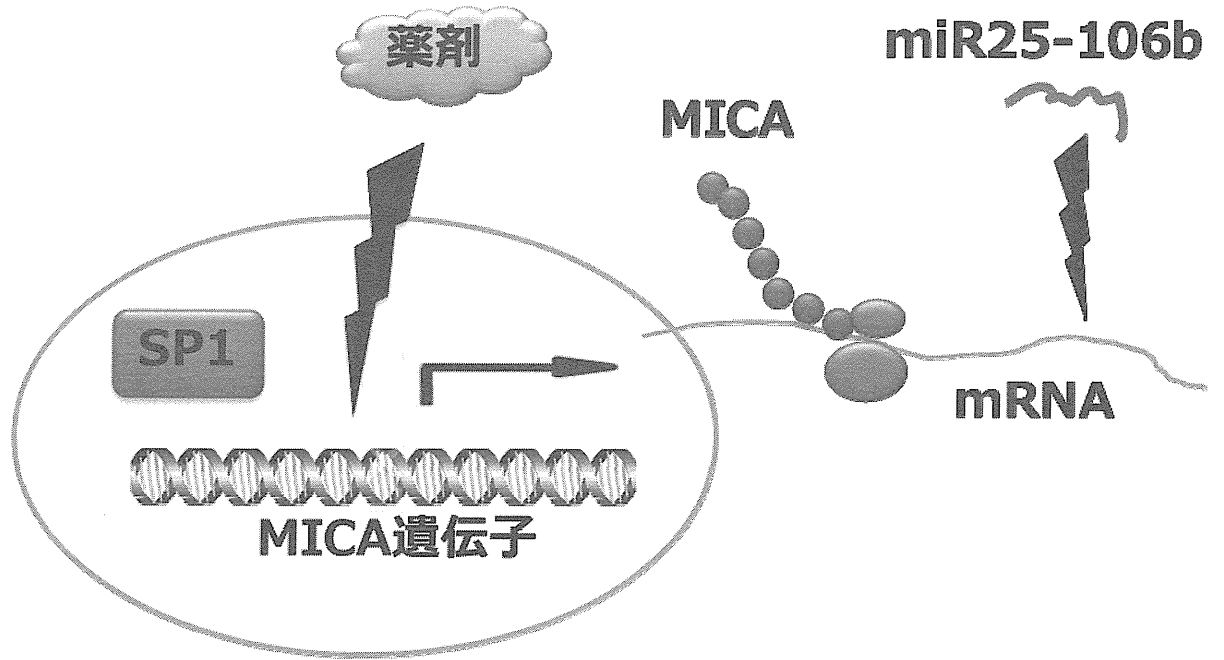
Ⅶ. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図等

B型肝炎ウイルスによる肝発癌とMICA発現は関連



- B型肝炎ウイルス感染により血中MICAは上昇
- 肝癌リスク型MICA遺伝子多型で血中MICAは上昇
- 血中MICA高値のB型肝炎患者は予後不良

MICA発現調節による肝発癌抑止法の開発



●研究代表者の研究歴等●過去に所属した研究機関の履歴

- ・昭和61年-平成3年 千葉大学医学部第一内科
- ・平成4年 国立がんセンター研究所ウイルス部
- ・平成5年-平成20年 東京大学医学部第二内科/消化器内科

●主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- ・小俣政男：元東京大学大学院医学系研究科消化器内科教授、現山梨県病院機構理事長
- ・下遠野邦忠：元京都大学ウイルス研究所教授、現千葉工業大学教授

●主な研究課題

- ・B型肝炎
- ・C型肝炎
- ・肝癌

●これまでの研究実績

- (1) Kumar V, Lo PHY, 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: e44743
- (2) Li Q, Yu CH, Yu JH, Liu L, Xie SS, Li WW, Yang X, Fan WB, Gai ZT, Chen SJ, Kato N. ABO blood group and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in patients with chronic hepatitis B. *PLoS One* 2012; 7: e29928.
- (3) Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Nakagawa H, Koike K, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2011; 43: 455-458
- (4) Kojima K, Takata A, Vadnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, Kondo Y, Kang YJ, Kishikawa T, Kato N, Xie Z, Zhang WJ, Yoshida H, Omata M, Nepveu A, Koike K. MicroRNA122 is a key regulator of α -fetoprotein expression and biologically aggressive behavior of hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 2011; 2: 338
- (5) Chang J-H, Kato N, Muroyama R, Taniguchi H, Guleng B, Dharel N, Shao R-X, Tateishi K, Jazag A, Kawabe T, Omata M. Double-stranded-RNA-activated protein kinase inhibits hepatitis C virus replication but may be not essential in interferon treatment. *Liver Int* 2010; 30: 311-318
- (6) Hu Z, Muroyama R, Kowatari N, Chang J, Omata M, Kato N. Characteristic mutations in hepatitis C virus core gene related to the occurrence of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100: 2465-2468
- (7) Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Yoshida H, Sato S, Kato N, Kanai F, Sugioka Y, Ikeda H, Shiina

- S, Kawabe T, Omata M. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. *Hepatology* 2009; 49: 1954-1961
- (8) Dharel N, Kato N, Muroyama R, Taniguchi H, Otsuka M, Wang Y, Jazag A, Shao R-X, Chang J-H, Adler MK, Kawabe T, Omata M. Potential contribution of tumor suppressor p53 in the host defense against hepatitis C virus. *Hepatology* 2008; 47: 1136-1149
- (9) Shao R-X, Kato N, Lin L-J, Muroyama R, Moriyama M, Ikenoue T, Watabe H, Otsuka M, Guleng B, Ohata M, Tanaka Y, Kondo S, Dharel N, Chang J-H, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Absence of tyrosine kinase mutations in Japanese colorectal cancer patients. *Oncogene* 2007; 26: 2133-2135
- (10) Wang Y, Kato N, Amarsanaa J, Dharel N, Otsuka M, Taniguchi H, Kawabe T, Omata M. Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology* 2006; 130: 883-892
- (11) Kato N, Ji G, Wang Y, Baba M, Hoshida Y, Otsuka M, Taniguchi H, Moriyama M, Dharel N, Goto T, Shao R-X, Matsuura T, Ishii K, Shiina S, Kawabe T, Muramatsu M, Omata M. Large-scale search of single nucleotide polymorphisms for hepatocellular carcinoma susceptibility genes in patients with hepatitis C. *Hepatology* 2005; 42: 846-853
- (12) Hoshida Y, Kato N, Yoshida H, Wang Y, Tanaka M, Goto T, Otsuka M, Taniguchi H, Moriyama M, Imazeki F, Yokosuka O, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein and hepatitis activity are associated through transactivation of interleukin-8. *J Infect Dis* 2005; 192: 266-275
- (13) Otsuka M, Kato N, Moriyama M, Taniguchi H, Wang Y, Dharel N, Kawabe T, Omata M. Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* 2005; 41: 1004-1012
- (14) Shao R-X, Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Hoshida Y, Moriyama M, Kawabe T, Omata M. Acyclic retinoid inhibits human hepatoma cell growth by suppressing fibroblast growth factor-mediated signaling pathways. *Gastroenterology* 2005; 128: 86-95
- (15) Otsuka M, Kato N, Shao R-X, Hoshida Y, Ijichi H, Koike Y, Taniguchi H, Moriyama M, Shiratori Y, Kawabe T, Omata M. Vitamin K2 inhibits the growth and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells via protein kinase A activation. *Hepatology* 2004; 40: 243-251
- (16) Goto T, Kato N, Yoshida H, Otsuka M, Moriyama M, Shiratori Y, Koike K, Matsumura M, Omata M. Synergistic activation of the serum response element-dependent pathway by hepatitis B virus x protein and large-isoform hepatitis delta antigen. *J Infect Dis* 2003; 187: 820-828
- (17) Wang Y, Kato N, Hoshida Y, Yoshida H, Taniguchi H, Goto T, Moriyama M, Otsuka M, Shiina S, Shiratori Y, Ito Y, Omata M. Interleukin-1 β gene polymorphisms associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2003; 37: 65-71
- (18) Kato J, Kato N, Moriyama M, Goto T, Taniguchi H, Shiratori Y, Omata M. Interferons specifically suppress the translation from the internal ribosome entry site of hepatitis C virus through a double-stranded RNA-activated protein kinase-independent pathway. *J Infect Dis*

2002; 186: 155-163

- (19) Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Otsuka M, Maeda S, Kato J, Omata M. Hepatitis C virus core protein activates NF- κ B-dependent signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factor. *J Biol Chem* 2001; 276: 16399-16405
- (20) Ono SK, Kato N, Shiratori Y, Kato J, Goto T, Schinazi RF, Carrilho FJ, Omata M. The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance. *J Clin Invest* 2001; 107: 449-455
- (21) Goto T, Kato N, Ono-Nita SK, Yoshida H, Otsuka M, Shiratori Y, Omata M. Large isoform of hepatitis delta antigen activates serum response factor associated transcription. *J Biol Chem* 2000; 275: 37311-37316
- (22) Otsuka M, Kato N, Lan K-H, Yoshida H, Kato J, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein enhances P53 function through augmentation of DNA-binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem* 2000; 275: 34122-34130
- (23) Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K-H, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000; 32: 405-412
- (24) Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Lan K-H, Yoshida H, Carrilho FJ, Omata M. Susceptibility of lamivudine-resistant hepatitis B virus to other reverse transcriptase inhibitors. *J Clin Invest* 1999; 103: 1635-1640
- (25) Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Masaki T, Lan K-H, Carrilho FJ, Omata M. YMDD motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication and lamivudine resistance: a study by in vitro full-length viral DNA transfection. *Hepatology* 1999; 29: 939-945
- (26) Masaki T, Okada M, Shiratori Y, Rengifo W, Matsumoto K, Maeda S, Kato N, Kanai F, Komatsu Y, Nishioka M, Omata M. pp60^{c-src} activation in hepatocellular carcinoma of humans and LEC rats. *Hepatology* 1998; 27: 1257-1264
- (27) Kato N, Lan K-H, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997; 71: 8856-8859
- (28) Shiratori Y, Kato N, Yokosuka O, Imazeki F, Hashimoto E, Hayashi N, Nakamura A, Asada M, Kuroda H, Tanaka N, Arakawa Y, Omata M for the Tokyo-Chiba Hepatitis Research Group. Predictors of the efficacy of interferon therapy in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1997; 113: 558-566
- (29) Togo G, Toda N, Kanai F, Kato N, Shiratori Y, Kishi K, Imazeki F, Makuuchi M, Omata M. A transforming growth factor β type II receptor gene mutation common in sporadic cecum cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1996; 56: 5620-5623
- (30) Niwa Y, Matsumura M, Shiratori Y, Imamura M, Kato N, Shiina S, Okudaira T, Ikeda Y, Inoue T, Omata M. Quantitation of α -fetoprotein and albumin messenger RNAs in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; 23: 1384-1392
- (31) Kanai F, Shiratori Y, Yoshida Y, Wakimoto H, Hamada H, Kanegae Y, Saito I, Nakabayashi H,

- Tamaoki T, Tanaka T, Lan K-H, Kato N, Shiina S, Omata M. Gene therapy for α -fetoprotein-producing human hepatoma cells by adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Hepatology* 1996; 23: 1359-1368
- (32) Shiratori Y, Shiina S, Imamura M, Kato N, Kanai F, Okudaira T, Teratani T, Tohgo G, Toda N, Ohashi M, Ogura K, Niwa Y, Kawabe T, Omata M. Characteristic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B- and C- viral infection in Japan. *Hepatology* 1995; 22: 1027-1033
- (33) Kawai S, Imazeki F, Yokosuka O, Ohto M, Shiina S, Kato N, Omata M. Clonality in hepatocellular carcinoma: analysis of methylation pattern of polymorphic X-chromosome-linked phosphoglycerate kinase gene in females. *Hepatology* 1995; 22: 112-117
- (34) Komatsu Y, Shiratori Y, Kawase T, Hashimoto N, Han K, Shiina S, Matsumura M, Niwa Y, Kato N, Tada M, Ikeda Y, Tanaka M, Omata M. Role of polymorphonuclear leukocytes in galactosamine hepatitis: mechanism of adherence to hepatic endothelial cells. *Hepatology* 1994; 20: 1548-1556
- (35) Matsumura M, Niwa Y, Kato N, Komatsu Y, Shiina S, Kawabe T, Kawase T, Toyoshima H, Ihori M, Shiratori Y, Omata M. Detection of alpha-fetoprotein mRNA, an indicator of hematogenous spreading hepatocellular carcinoma, in the circulation: a possible predictor of metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994; 20: 1418-1425
- (36) Kato N, Yokosuka O, Hosoda K, Ito Y, Ohto M, Omata M. Quantification of hepatitis C virus by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: increase of the virus in advanced liver disease. *Hepatology* 1993; 18: 16-20
- (37) Kato N, Yokosuka O, Hosoda K, Ito Y, Ohto M, Omata M. Detection of hepatitis C virus RNA in acute non-A, non-B hepatitis as an early diagnostic tool. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 800-807
- (38) Hosoda K, Omata M, Yokosuka O, Kato N, Ohto M. Non-A, non-B chronic hepatitis is chronic hepatitis C: a sensitive assay for detection of hepatitis C virus RNA in the liver. *Hepatology* 1992; 15: 777-781
- (39) Hosoda K, Omata M, Yokosuka O, Kato N, Ohto M. Nucleotide sequences of 5'-1 of hepatitis C virus in patients with chronic liver disease. *Gastroenterology* 1992; 102: 1039-1043
- (40) Omata M, Yokosuka O, Takano S, Kato N, Hosoda K, Imazeki F, Tada M, Ito Y, Ohto M. Resolution of acute hepatitis C after therapy with natural beta interferon. *Lancet* 1991; 338: 914-915
- (41) Hosoda K, Yokosuka O, Omata M, Kato N, Ohto M. Detection and partial sequencing of hepatitis C virus RNA in the liver. *Gastroenterology* 1991; 101: 766-771
- (42) Kato N, Yokosuka O, Omata M, Hosoda K, Ohto M. Detection of hepatitis C virus ribonucleic acid in the serum by amplification with polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 1990; 86: 1764-1767

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 研究発表会
2013/1/31(木)
国立国際医療研究センター国府台病院
肝炎・免疫研究センター1階研修室

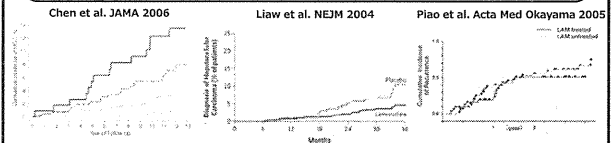
B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

東京大学 医科学研究所
疾患制御ゲノム医学ユニット
加藤 直也

B型肝炎においては、抗ウイルス療法とは異なる肝発癌抑止戦略が必要である

B型肝炎は核酸アナログによりコントロール可能な病気になるつつある

- 経口薬でほとんど副作用がない
- HBV増殖を抑えHBV DNA量を劇的に減らす
- ALT値を下げる(正常化させる)
- 肝組織所見を改善させる
- エンテカビル/テノホビルでは耐性出現もほとんどない

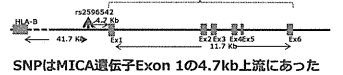


肝機能正常でもHBV DNA量に応じて0.1~1%/年の発癌
ラミブジン治療でも発癌リスク低下はただか1/2
ラミブジン治療しても肝機能を良くするが肝癌の再発は減らない

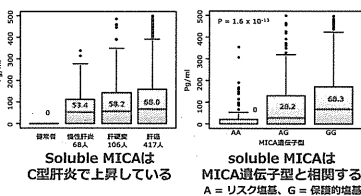
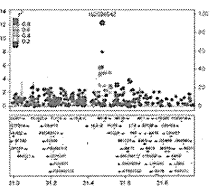
我々の研究では、HBV DNA組み込み由来HBxこそが肝発癌に重要な役割を担っており、核酸アナログによる肝炎沈静化・肝硬変の抑止だけでは発癌を回避できない可能性がある

C型肝炎における肝発癌にはMICAが重要な役割を果たしている

C型肝炎関連SNPはMICAに存在した
MICA: MHC class I chain-related protein A



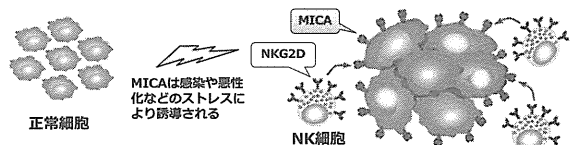
SNPはMICA遺伝子Exon 1の4.7kb上流にあった



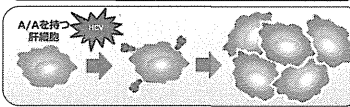
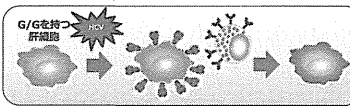
- C型肝炎においてはsoluble MICAが低いほど肝癌になりやすい
- C型肝炎発癌には自然免疫が重要な役割を担っている
 - MICA発現調節によりC型肝炎による肝発癌抑止が可能

Nature Genetics 2011

MICAの抗腫瘍自然免疫における役割



自然免疫を担当する細胞の一種である“NK (natural killer) 細胞”は、細胞表面上にMICAを発現している細胞を攻撃目標として認識し、生体から排除する

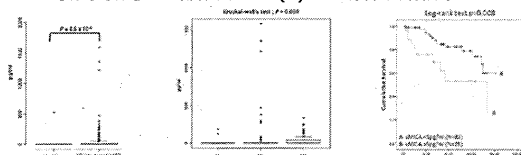


NK細胞活性化受容体であるNKG2Dが腫瘍細胞に発現されたリガンドであるMICAに結合することで、NK細胞による細胞障害や炎症性サイトカイン放出が惹起され、MICA発現腫瘍細胞排除につながり、発癌が抑止される

MICA遺伝子SNPはB型肝炎にも関連している

SNP	Comparison	Chr	Locus	Case MAF	Control MAF	P*	OR†	95% CI
rs2596542	HCC vs. Healthy control	6	MICA	0.294	0.112	0.023	1.19	1.03-1.4
rs2596542	HCC vs. CHS	6	MICA	0.294	0.220	0.197	1.13	0.94-1.36

しかしながらC型肝炎リスク塩基(A)はB型肝炎では保護的塩基

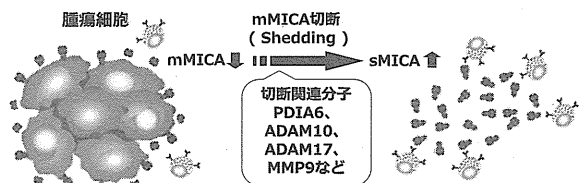


B型肝炎でもsoluble MICAは高い
B型肝炎でもsoluble MICAはG(リスク塩基)ほど高い
Soluble MICAが高いほど予後悪い!

- B型肝炎においてはsoluble MICAが高いほど肝癌になりやすい
- B型肝炎発癌にも自然免疫が重要な役割を担っている
 - C型肝炎との違いは何か?

PLoS One 2012

B型肝炎では膜型MICA(mMICA)の切断によりsoluble MICA(sMICA)が増え、sMICAはdecoyとして働き、NK細胞のサーベイランスを回避している可能性がある

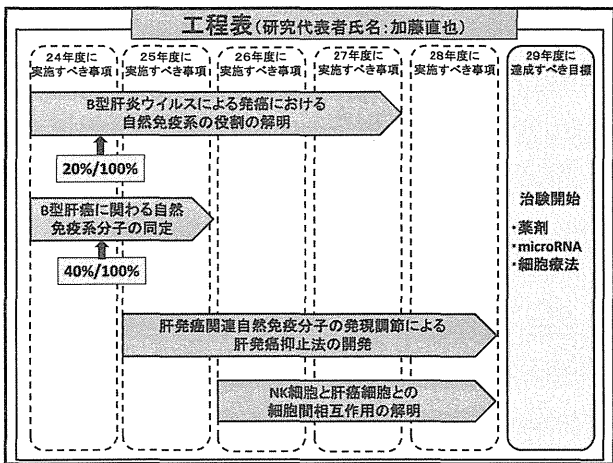
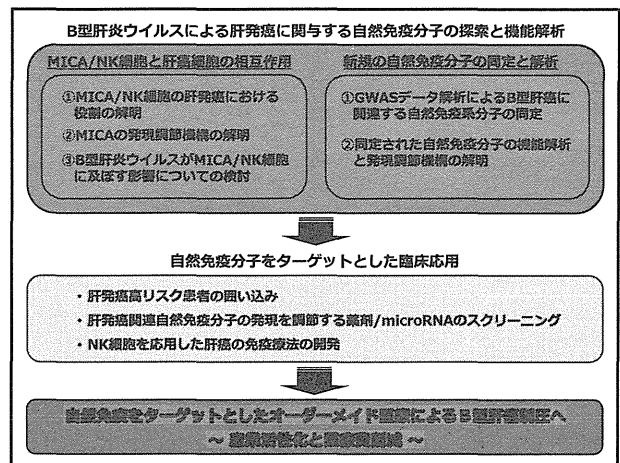
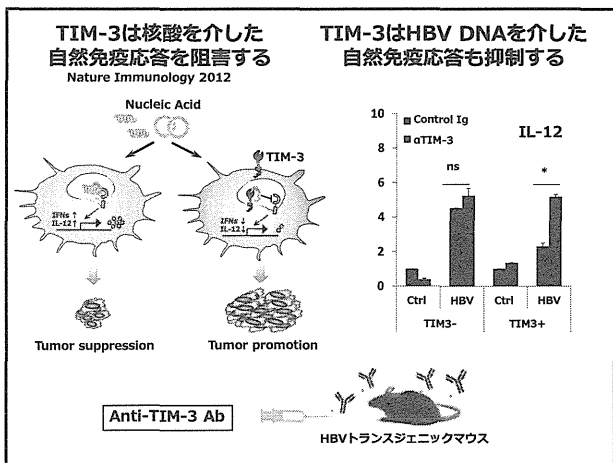


- HBx蛋白はMICA切断関連分子を誘導する (Lara-Pezzi et al. J Clin Invest 2002)
- HCCはsMICAによりNK細胞による細胞障害から逃避している (Jinushi et al. J Hepatol 2005)

したがってB型肝炎を抑制するには

- 膜型MICAの発現を増やす
- Soluble MICAを減らす = MICA切断関連分子を阻害
- NK細胞を増やす or 活性化する

創薬標的



利益相反について

利益相反の有無等(平成24年度)

ア 利益相反の有無 無

他の研究班への参加状況

研究代表者が、「肝炎等克服緊急対策研究事業」または「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(肝炎関係研究分野)」研究班の研究代表者として参加しているか(ア又はイに記載)

ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。

合同研究班会議開催状況

他の研究班と合同での研究班会議開催状況(平成24年度)

ア 他の研究班と合同で研究班会議を開催していない。

平成 24 年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究

課題番号：H24-B創-肝炎-一般-009

予定期間：H24年度からH28年度まで

研究代表者：藤田 尚志

所属研究機関：京都大学

所属部局：ウイルス研究所

職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：1年目 260,000,000円

I. 研究の意義

- (1)HBV は持続感染となった場合、完治させる治療法がなく、肝硬変、肝臓がんの原因となっており、新たな治療法の開発が期待されている。
- (2)HBV はヒトの肝臓で増殖するが、感染の実験系が確立しておらず、抗ウイルス薬剤の効果を的確に検討する系の確立は重要である。
- (3)ウイルスは免疫系を阻害することによりその存在を図っているが、その機構の解明はHBV に対する新たな治療法の開発に必須である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1)自然免疫は細胞に備わるウイルス増殖抑制機構であり、その活性化はウイルスの感染排除に重要と考えられるがHBV に対する自然免疫機構は解明が進んでいない。
- (2)HBV による免疫系の阻害機構を解明し、新たな治療法の開発の基盤とする。
- (3)複数のストラテジーによってHBV 感染の治療法の糸口を開発することにより、新たな薬剤の開発、遺伝子治療法の開発へつなげる。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者

- (1)ヒト自然免疫マイクロアレイ解析法を確立し、ウイルス感染による遺伝子活性化が的確にモニターできる系を立ち上げた。
- (2)ピーマン由来の二重鎖RNA をマウスに経口投与し、腸、肝臓などの組織でインターフェロン関連の遺伝子が活性化されることを見出した。また投与したマウスにEMCV を感染させ、ウイルスによる致死率が減少する事を確認した。HBV に対する効果解析の基礎が確立した。

・研究分担者(加藤宣之)

- (1)HBV 蛋白質を恒常的に発現するヒト培養細胞を作製した。
- (2)インターフェロン産生に対する影響を解析できるHBV の細胞内増殖モデルを作成した。

▪ 研究分担者(土方誠)

- (1) ヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞の自然免疫機構を解析し、この細胞が初代培養ヒト肝細胞と極めて類似した自然免疫機構を有すること、今後の研究に有用であることを明らかにした。
- (2) HuS-E/2 細胞はウイルス非感染状態においても極微量な活性のあるインターフェロン α 1 を産生しており、ウイルス感染に対して迅速な応答を示すことを明らかにした。

▪ 研究分担者(松浦善治)

- (1) HBV のポリメラーゼに加え、コア蛋白質もインターフェロンの誘導を抑制することを発見した。
- (2) HBV コア蛋白質と相互作用するいくつかの宿主因子を同定した。
- (3) HBV は樹状細胞を介さずに、直接 NK 細胞の活性を抑制する可能性を提示した。

▪ 研究分担者(柘植雅貴)

- (1) HBV genotype C 感染患者血清をヒト肝細胞キメラマウスに接種し、HBV 持続感染マウスを作製した。この系を用いて HBV による宿主遺伝子発現への影響を検討する。

▪ 研究分担者(渡邊綱正)

- (1) HBV 遺伝子型によるウイルス複製効率の差異を *vitro* と *vivo* モデルで明らかとした。
- (2) 病態に伴う特異的なウイルス遺伝子変異がウイルス複製能を増強させることを明らかとした。
- (3) 臨床検体から分離した遺伝子型 A と遺伝子型 G の組み換えウイルスの解析を行った

▪ 研究分担者(水腰英四郎)

- (1) HBV 感染患者における樹状細胞(DC)を plasmacytoid DC と myeloid DC に分離し、それぞれの細胞表面マーカーを患者末梢血単核球において同時に解析できるシステムを確立した。

▪ 研究分担者(竹原徹郎)

- (1) NK 細胞活性型レセプターNKp46 と抑制性レセプターNKG2A との発現多寡によって、NK 細胞をサブセットに区別し、それぞれのサブセットにおける IFN シグナルをフローサイトメトリーにて定量化する系を確立した。

▪ 研究分担者(斎藤泉)

- (1) 本研究を遂行するために、HBV の Pol、Large S、Small S、Pre-Core 及び Core を発現するアデノウイルスベクター (AdV) を作製した。遺伝子発現抑制に関しては、Pol と Core および PreC を標的と設定し、6 種類の shRNA を発現する AdV を作製中である。これらの AdV を班員に供給した。

IV. 平成 25～28 年度の課題

- (1) HBV 蛋白質を発現するヒト培養細胞 (オリジナル肝細胞株、HuS-E/2 等) を用いて HBV 感染と自然免疫応答の詳細を解析する。
- (2) 各種阻害薬や遺伝子ノックダウンにより抗 HBV 効果の分子機構を明らかにする (細胞培養、キ

メラマウスを用いた検討)。

(3) 自然免疫を阻害することが明らかとなったコア蛋白質と相互作用した宿主因子の中から、自然免疫に関与するものを詳細に検討し、同定された宿主因子の創薬標的としての可能性を検討する。

(4) HBV の NK 細胞の活性制御機構を明らかにし、正常化する方法の開発を行う。

(5) DC の機能に影響を与える宿主因子の同定およびウイルス因子の同定。DC 機能を増強できる新規化合物等のスクリーニング・治療法の開発。

(6) 異なる HBV 遺伝子型の感染に対する宿主応答の解析から、ウイルス遺伝子型特異的な自然免疫修飾作用を検討する。

(7) 遺伝子発現、ノックダウンを行うためのベクターの作製および班員への供給を行い、HBV 感染に対する新規治療方法の開発を行う。

V. 行政施策への貢献の可能性

(1) 宿主免疫応答を賦活化することで、B 型肝炎ウイルスを排除できる治療法が可能になれば、患者の大きな福音となるだけでなく、医療経済学的にも莫大な利益をもたらすと考えられる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

▪ 研究分担者(渡邊綱正)

(1) Sandalova E, Laccabue D, Boni C, Watanabe T, Tan A, Zong ZH, Ferrari C, Bertolotti A. Increased Levels of Arginase in Patients With Acute Hepatitis B Suppress Antiviral T Cells. *Gastroenterology*, 143; 78-87, 2012.

(2) Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Fuminaka S, Mizokami M. Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. *J Viral Hepat*, 2012 in press

▪ 研究分担者(竹原徹郎)

(1) Nawa T, Ishida H, Tatsumi T, Li W, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Hosui A, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N, Takehara T. Interferon- α suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via the protein kinase C pathway. *Virology* 432: 452-459, 2012

▪ 研究分担者(斎藤泉)

(1) 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. *BBRC* 417: 945-950 (2012).

(2) Kanegae Y, Terashima M, Kondo S, Fukuda H, Maekawa A, Pei Z, Saito I. High-level expression by tissue/cancer-specific promoter with strict specificity using a single adenoviral vector. *Nucleic Acids Res.* 39:e7 (2011).

●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和 57 年 7 月 (財) 癌研究会癌研究所生化学部嘱託研究員 (谷口維紹 部長)
昭和 59 年 4 月 大阪大学細胞工学センター 助手 (谷口維紹 教授)
平成 2 年 7 月 米国ホワイトヘッド研究所 ポストドクトラルフェロー (Prof. David Baltimore)
平成 3 年 7 月 ロックフェラー大学 ポストドクトラルフェロー (Prof. David Baltimore)
平成 5 年 4 月 東京都臨床医学総合研究所 腫瘍細胞研究部門 室長
平成 17 年 9 月 京都大学ウイルス研究所 教授

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

河野晴也 博士 (国立予防衛生研究所・故人)
谷口維紹 教授 (現・東京大学)
David Baltimore 教授 (現・カリフォルニア工科大学)
米山光俊 教授 (現・千葉大学)

・主な研究課題

インターフェロンプライミングの研究: インターフェロン β 遺伝子のプロモーター解析: インターフェロン遺伝子を制御する IRF 転写因子の発見: ウイルス感染が IRF-3 を活性化し、インターフェロン遺伝子活性化することを発見: ウイルス RNA センサーの発見とその機能解析。

・これまでの研究実績

Onomoto K, Jogi M, Yoo JS, Narita R, Morimoto S, Takemura A, Sambhara S, Kawaguchi A, Osari S, Nagata K, Matsumiya T, Namiki H, Yoneyama M, Fujita T.: Critical Role of an Antiviral Stress Granule Containing RIG-I and PKR in Viral Detection and Innate Immunity. PLoS One. 2012;7(8):e43031. Epub 2012 Aug 13.

Ouda, R., Onomoto, K., Takahashi, K., Edwards, M.R., Kato, H., Yoneyama, M. and Fujita, T.: Retinoic Acid-inducible Gene I-inducible miR-23b Inhibits Infections by Minor Group Rhinoviruses through Downregulation of the Very Low Density Lipoprotein Receptor. J. Biol. Chem. 286, 26210-219 (2011)

Onomoto K., Morimoto S., Kawaguchi T., Toyoda H., Tanaka M., Kuroda M., Uno K., Kumada K., Matsuda F., Shimotohno K., Fujita T. and Murakami Y.: Dysregulation of IFN System Can Lead to Poor Response to Pegylated Interferon and Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C. PLoS One 2011 Volume 6 | Issue 5 | e19799

Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, Yoneyama M and Fujita T.: Virus-Infection or 5'ppp-RNA Activates Antiviral Signal through Redistribution of IPS-1 Mediated by MFN1. PLoS Pathog. 2010 Jul 22;6(7):e1001012.

Sato T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. :LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 107, 1512-7 (2010)

Sato, S., Hoshino, K., Sato, T., Fujita, T., Kawakami, Y., Fujita, T. and Kuwana, M.: RNA helicase encoded by melanoma differentiation-associated gene 5 is a major autoantigen in patients with clinically amyopathic dermatomyositis: association with rapidly progressive interstitial lung disease. Arthritis & Rheumatism. 60, 2193-2200 (2009)

Takahasi, K., Kumeta, H., Tsuduki, N., Narita, R., Shigemoto, T., Hirai, R., Yoneyama, M., Horiuchi, M., Ogura, K., Fujita, T., Inagaki, F.: Solution Structures of MDA5 and LGP2 C-terminal Domains: Identification of the RNA Recognition Loop in RIG-I Like Receptors. J. Biol. Chem. 284, 17465-17474 (2009)

Shigemoto, T., Kageyama, M., Hirai, R., Zheng, J-P., Yoneyama, M., Fujita, T.: Identification of loss of function mutations in human genes encoding RIG-I and mda5: Implications for resistance to type I diabetes. J. Biol. Chem. 284, 13348-13354 (2009)

Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Sato, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, TS., Fujita, T., Akira, S.: Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. J Exp Med. 7, 1523-1527 (2008)

Takahasi K, Yoneyama M, Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, Narita, R., Gale Jr. M., Inagaki F. and Fujita T: Non-self RNA-Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. Molecular Cell. 29, 428-440 (2008)

Arimoto K., Takahashi H., Hishiki T., Konishi H., Fujita T., Shimotohno K.: Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. Proc Natl Acad Sci U S A. 104, 7500-5 (2007)

Onoguchi, K., Yoneyama, M., Takemura, A., Akira, S., Taniguchi, T., Namiki, H., and Fujita, T.: Viral Infections Activate Types I and III Interferon Genes through a Common Mechanism. J. Biol. Chem, 282, 7576-7581 (2007)

Saito, T., Hirai, R., Loo., Yueh-Ming., D, Owen., C, L. Johnson., S., C. Shinha., Akira, S., Fujita T and Gale Jr., M. : Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 582-7 (2007)

Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai,

T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C-S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T. and Akira, S.: Differential role of MDA5 and RIG-I in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441, 101-105 (2006)

Yoshikawa T., Iwasaki T., Ida-Hosonuma M., Yoneyama M., Fujita T., Horie H., Miyazawa M., Abe S., Simizu B., and Koike S.: Role of alpha/beta interferon response in the acquisition of poliovirus susceptibility of kidney cells in culture. *J. Virology* 80, 4313-25 (2006)

Loo, Y-M., Owen, D.M., Li, K., Erickson, A.K., Johnson, C.L., Fish, P.M., Carney, D.S., Wang, T., Ishida, H., Yoneyama, M., Fujita T., Saito, T., Lee, W.M., Hagedorn, C.H., Lau, D.T., Weinman, S.A., Lemon, S.M., Gale Jr. M.: Viral and therapeutic control of IFN- β promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 6001-6 (2006)

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y-M., Gale Jr., M., Akira, S., Kato A. and Fujita, T.: Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicase RIG-I, MDA5 and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *J. Immunology* 175, 2851-2858, (2005)

Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S.: Cell Type-Specific Involvement of RIG-I in Antiviral Response. *Immunity* 23, 19-28, (2005)

Ida-Hosonuma, M., Iwasaki, T., Yoshikawa, T., Nagata, N., Sato, Y., Sata, T., Yoneyama, M., Fujita, T., Taya, C., Yonekawa H. and Koike, S.: The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J. Virology* 79, 4460-4469, (2005)

Foy, E., Li, K., Sumpter Jr., R., Loo, Y-M., Johnson, C. L., Wang, C., Fish, P., Yoneyama, M., Fujita, T., and Gale Jr., M.: Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of RIG-I signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 2986-2991, (2005)

Sumpter Jr., R., Loo, Y-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. and Gale Jr., M.: Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J. Virology* 79, 2689-2699, (2005)

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. and Fujita, T.: The RNA helicase, RIG-I, plays an essential role for double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology* 7: 730-737, (2004)

Mori, M., Yoneyama, M., Ito, T., Takahashi, K., Inagaki, F. and Fujita, T.: Identification of Ser 386 of Interferon Regulatory Factor 3 as Critical Targets for Inducible Phosphorylation that Determines Activation. *J. Biol. Chem.* 279: 9698-9702, (2004)

Takahashi, K., Suzuki, N., Horiuchi, M., Mori, M., Suhara, W., Okabe, Y., Fukuhara, Y., Terasawa, H., Akira, S., Fujita, T., and Inagaki, F: X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nature Structural Biology.* 10: 922-927, 2003

Watanabe, N., Wachi, S, and Fujita, T.: Identification and characterization of BCL-3-binding protein: implications for transcription and DNA repair or recombination. *J. Biol. Chem.* 278: 26102-26110, 2003

Yamamoto, M., Shintaro Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. and Akira, S.: Essential role of TIRAP/Mal for activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4: *Nature*, 420, 324-329, (2002)

Sato, S., Takeuchi, O., Fujita, T., Tomizawa, H., Takeda, K. and Akira, S.: A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting Myd88-dependent and -independent pathways: *International Immunology*, 14, 783-791, (2002)

Suhara, W., Yoneyama, M., Kitabayashi, I. and Fujita, T.: Direct involvement of CREB-binding protein/p300 in sequence-specific binding of virus-activated interferon regulatory factor-3 holocomplex: *J. Biol. Chem.*, 277, 22304-22313, (2002)

Iwamura, T., Yoneyama, M., Koizumi, N., Okabe, Y., Namiki, H., Samuel, C. E. and Fujita, T.: PACT, a double-stranded RNA binding protein acts as a positive regulator for type I interferon gene induced by Newcastle disease virus: *BBRC*, 282, 515-523, (2001)

Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J-i., Mühlradt, P. F., Sato, S., Hoshino, K. and Akira, S.: MyD88-independent activation of IRF-3 and induction of interferon-g-inducible genes in response to lipopolysaccharide: *The Journal of Immunology*, 167, 5887-5894, (2001)

Iwamura, T., Yoneyama, M., Yamaguchi, K., Suhara, W., Mori, W., Shiota, K., Okabe, Y., Namiki, H. and Fujita, T.: Induction of IRF-3/-7 Kinase and NF- κ B in Response to Double-stranded RNA and Virus infection: *Common and Unique Pathways : Genes to Cells*, 6, 375-388, (2001)

Suhara, W., Yoneyama, M., Iwamura, T., Yoshimura, S., Tamura, K., Namiki, H., Aimoto, S. and Fujita, T.: Analyses of Virus-Induced Homomeric and Heteromeric Protein Associations between IRF-3 and Coactivator CBP/p300: *J. Biochem.*, 128, 301-307, (2000)