

Sakamoto, H., Yasukawa, H., Masuhara, M., Tanimura, S., Sasaki, A., Yuge, K., Ohtsuka, A., Fujita, T., Ohta, T., Furukawa, Y., Iwase, S., Yamada, H., and Yoshimura, A.: A janus Kinase Inhibitor, JAB, Is an Interferon-g-Inducible Gene and Confers Resistance to Interferons: *Blood*, *92*, 1668-1676, (1998)

Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E. and Fujita, T.: Direct Triggering of the Type I Interferon System by Virus Infection: Activation of a Transcription Factor Complex Containing IRF-3 and CBP/p300: *The EMBO Journal*, *17*, 1087-1095, (1998)

Endo, T. A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanekura, Y., Komiya, S., Yoshimura, A.: A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases: *Nature*, *387*, 921-924, (1997)

Watanabe, N., Iwamura, T., Shinoda, T., and Fujita, T.: Regulation of NFkB1 Proteins by the Candidate Oncoprotein BCL-3: Generation of NF-kB Homodimers from Cytoplasmic Pool of p50/p105 and Nuclear Translocation: *The EMBO Journal*, *16*, 3609-3620, (1997)

Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Sato, M., Ozato, K. and Fujita, T.: Autocrine amplification of type I interferon gene expression mediated by interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3): *Journal of Biochemistry*, *120*, 160-169 (1996)

Nelson, N., Kanno, Y., Hong, C., Contursi, C., Fujita, T., Fowlkes, B.J., O'Connell, E., Hu-Li, J., Paul, W.E., Jankovic, D., Sher, A.F., Coligan, J.E., Thornton, A., Appella, E., Yang, Y. and Ozato, K.: Expression of interferon regulatory factor (IRF) family proteins in lymphocytes. Induction of Stat 1 and ICSBP expression by T cell activation: *Journal of Immunology*, *156*, 3711-3720 (1996)

Hirai R. and Fujita, T.: A human transforming growth factor-b type II receptor that contains an insertion in the extracellular domain: *Experimental Cell Research*, *223*, 135-141 (1996)

Suhara, W., Yoneyama, M., Yonekawa, H. and Fujita T.: Structure of mouse interferon stimulated gene factor 3g (ISGF3g/p48) cDNA and chromosomal localization of the gene: *Journal of Biochemistry*, *119*, 231-234 (1996)

Fujita T., Nolan G. P., Liou H-C., Scott M. and Baltimore D.: The candidate Proto-oncogene *bcl-3* encodes a transcriptional co-activator that activates NF-kB p50 homodimers: *Genes and Development* *7*, 1354-1363, (1993)

Scott M., Fujita T., Liou H-C., Nolan G. P. and Baltimore D.: The p65 subunit of NF-kB regulates IκB by two distinct mechanisms: *Genes and Development* 7, 1266-1276, (1993)

Nolan G. P., Fujita T., Bhatia, K., Huppi C., Liou H-C., Scott M. and Baltimore D.: The *bcl-3* proto-oncogene encodes a nuclear IκB-like molecule that preferentially interacts with NF-kB p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner: *Mol. Cell. Biol.* 13, 3557-3566, (1993)

Liou H-C., Nolan G.P., Ghosh S., Fujita T. and Baltimore D.: The NF-kB p50 precursor, p105, contains an internal IκB-like inhibitor that preferentially inhibits p50: *EMBO J.* 11, 3003-3009, (1992)

Fujita T., Nolan G. P., Ghosh S. and Baltimore D.: Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-kB: *Genes and Development* 6, 775-787, (1992)

Watanabe N., Sakakibara J., Hovanessian A.G., Taniguchi T. and Fujita T.: Activation of IFN-β element by IRF-1 requires a posttranslational event in addition of IRF-1 synthesis: *Nucleic Acids Res.* 19, 4421-4428, (1991)

Harada H., Willison, K., Sakakibara, J., Miyamoto M., Fujita T. and Taniguchi T.: Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated: *Cell* 63, 303-312, (1990)

Itoh S., Harada H., Fujita T., Miura T. and Taniguchi T.: Sequence of a cDNA coding for human IRF-2: *Nucl. Acids Res.* 17, 8372, (1989)

Fujita T., Miyamoto M., Kimura Y., Hammer J. and Taniguchi T.: Involvement of a *cis*-element that binds an H2TF-1/NF-kB like factor(s) in the virus-induced interferon-β gene expression: *Nucl. Acids Res.* 17, 3335-3346, (1989)

Fujita T., Reis L.F.L., Watanabe N., Kimura Y., Taniguchi T. and Vilcek J.: Induction of transcription factor IRF-1 and interferon-β mRNA by cytokines and activators of second messenger pathways: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9936-9940, (1989)

Harada H., Fujita T., Miyamoto M., Kimura Y., Maruyama M., Furia A., Miyamoto M. and Taniguchi T.: Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes: *Cell* 58, 729-739, (1989)

Fujita T., Kimura Y., Miyamoto, M., Sudo Y., Barsoumian E. and Taniguchi T.: Induction of endogenous IFN-α and IFN-β genes by a regulatory transcription factor, IRF-1: *Nature* 337, 270-272, (1989)

Miyamoto M., Fujita T., Kimura Y., Maruyama M., Harada H., Sudo Y., Miyata T. and Taniguchi T.: Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN- β gene regulatory elements: *Cell* 54, 903-913, (1988)

Fujita T., Sakakibara J., Sudo Y., Miyamoto M., Kimura Y. and Taniguchi T.: Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN- β gene regulatory elements: *EMBO J.* 7, 3397-3405, (1988)

Fujita T., Shibuya H., Hotta H., Yamanishi K. and Taniguchi T.: Interferon- β gene regulation: tandemly repeated sequences of a synthetic 6 bp oligomer function as a virus-inducible enhancer: *Cell* 49, 357-367, (1987)

Maruyama M., Shibuya H., Harada H., Hatakeyama M., Seiki M., Fujita T., Inoue J-I., Yoshida M. and Taniguchi T.: Evidence for aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop by HTLV-1-encoded p40^X and T3/Ti complex triggering: *Cell* 48, 343-350, (1987)

Fujita T., Shibuya H., Ohashi T., Yamanishi K. and Taniguchi T.: Regulation of human interleukin-2 gene: functional DNA sequences in the 5' flanking region for the gene expression in activated T lymphocytes: *Cell* 46, 401-407, (1986)

Fujita T., Ohno S., Yasumitsu H. and Taniguchi T.: Delimitation and properties of DNA sequences required for the regulated expression of human interferon- β gene: *Cell* 41, 489-496, (1985)

Kashima N., Nishi-Takaoka C., Fujita T., Taki S., Yamada G., Hamuro J. and Taniguchi T.: Unique structure of murine interleukin-2 as deduced from cloned cDNAs: *Nature* 313, 402-404, (1985)

Fuse A., Fujita T., Yasumitsu H., Kashima N., Hasegawa K. and Taniguchi T.: Organization and structure of the mouse interleukin-2 gene: *Nucl. Acids Res.* 12, 9323-9331, (1984)

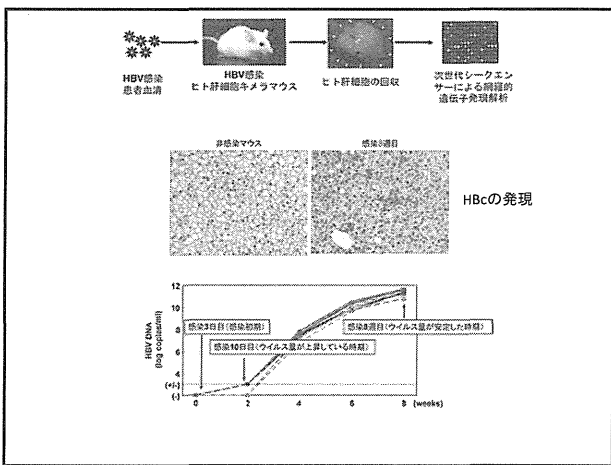
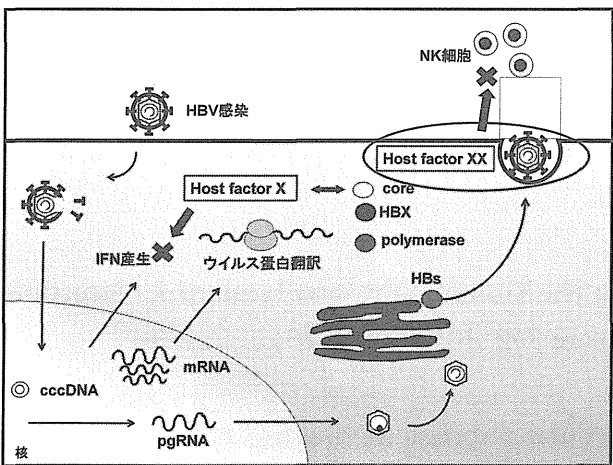
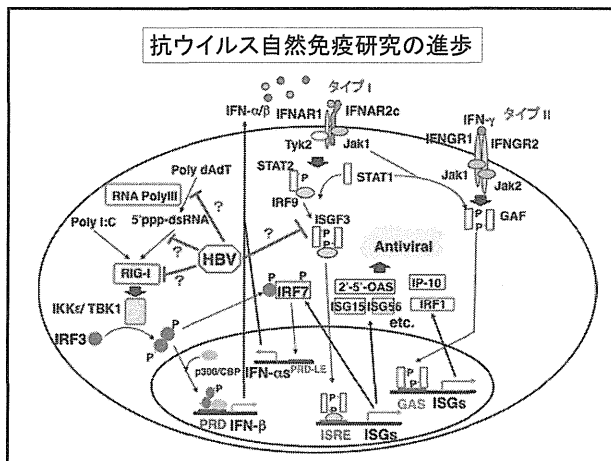
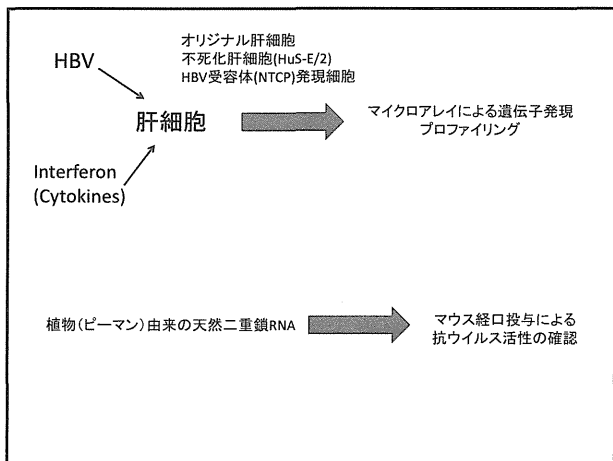
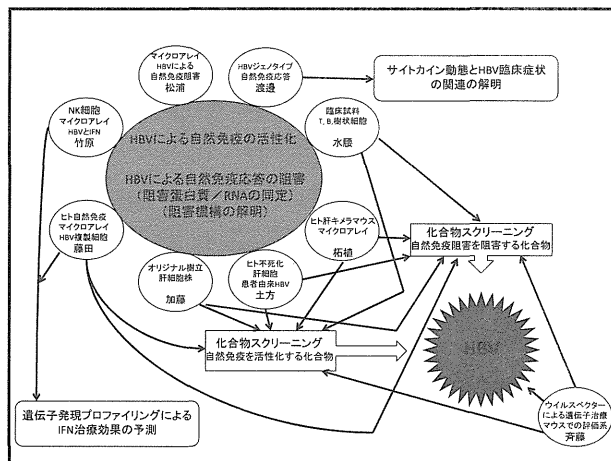
Fujita T., Takaoka C., Matsui H. and Taniguchi T.: Structure of the human interleukin 2 gene: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7437-7441, (1983)

Taniguchi T., Matsui H., Fujita T., Takaoka C., Kashima N., Yoshimoto R. and Hamuro J.: Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2: *Nature* 302, 305-310, (1983)

Fujita T. and Kohno S.: Studies on interferon priming: cellular response to viral and nonviral inducers and requirement of protein synthesis: *Virology* 112, 62-69, (1981)

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

研究代表
京都大学ウイルス研究所
藤田尚志

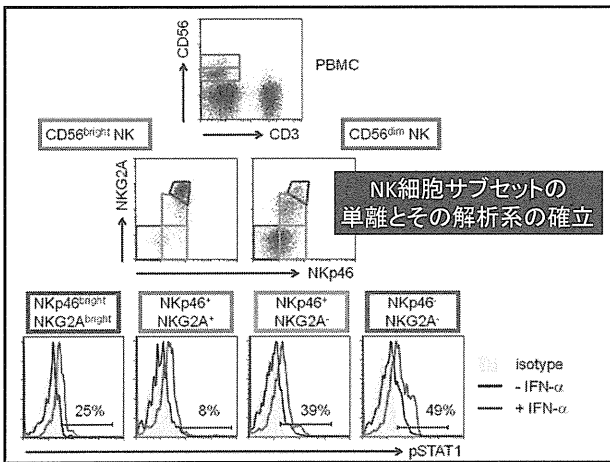
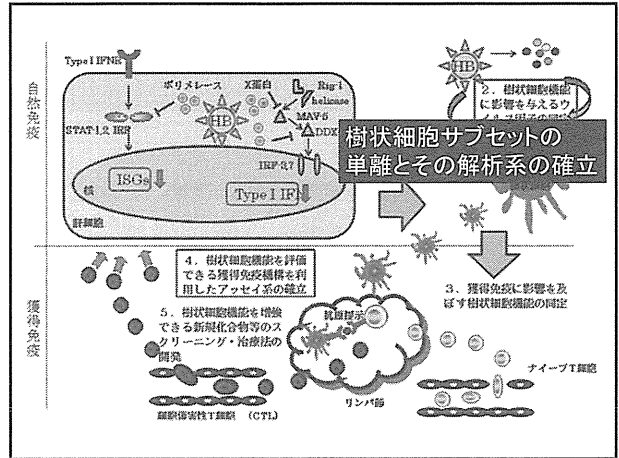


HBV genotype と 病原性の関連

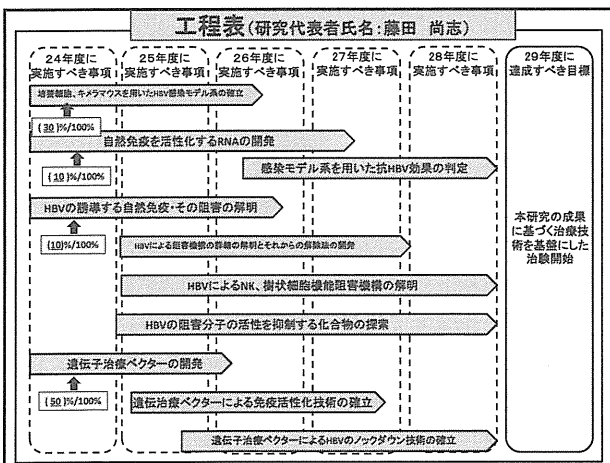
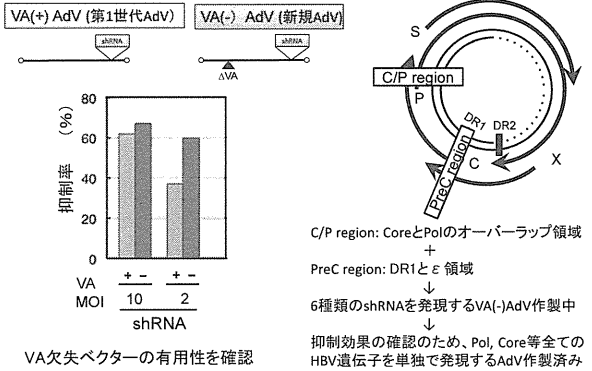
- 病態への影響
 - 慢性化・発がんへの影響
- 治療反応性への影響
 - IFNを用いた抗ウイルス効果の違い

H24年度の研究成果

- HBV遺伝子型によるウイルス複製効率の差異を*in vitro*と*in vivo* (キメラマウス) モデルで明らかとした
- 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
- 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



HBV感染治療用ベクターの開発と新規ベクターの供給 (斎藤)



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)

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1月19日	7班合同班長会議
竹原徹郎	免疫系を保持した次世代型B型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発とその応用
茶山一彰	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
小原道法	ツハイ全ゲム解析に基づく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 ①②③
山村研一	ヒト/チンパンジー・マウスハイブリッド技術を利用したB型肝炎ウイルス感染モデルマウスの開発
金子周一	HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発
藤田尚志	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
田中靖人	B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究

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：HBV cccDNA の制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発課題番号：H24-B創・肝炎一般-010予定期間：H24年度からH28年度まで研究代表者：金子 周一所属研究機関：金沢大学所属部局：医薬保健研究域医学系職名：教授年次別研究費(交付決定額)：1年目 100,960,000 円**I. 研究の意義**

- (1) B型肝炎ウイルス (HBV) は現在の抗ウイルス薬治療に抵抗性である。
- (2) HBV の cccDNA の存在様式は十分にわかっていない。
- (3) HBV の cccDNA に対する免疫機構は十分にわかっていない。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HBV に対する新しい治療薬の開発に期待。
- (2) HBV の cccDNA の存在様式を明らかにする。
- (3) HBV の cccDNA に対する免疫機構を明らかにする。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者(金子周一) 10例のB型慢性肝炎およびB型慢性肝炎を背景として発生した肝細胞がんサンプルを用いてエクソームシーケンス解析とトランスクリプトーム解析を行った。コントロールとして10例のC型慢性肝炎および肝細胞がんサンプルを用いて、肝炎ウイルスによる違いを、エクソームシーケンスとトランスクリプトームとの関連から解析した。

・研究分担者(今村道雄) ヒト肝細胞キメラマウスにHBV陽性患者血清またはHBV全長発現 plasmid を transfection した肝癌細胞株の培養上清を投与することにより、野生型あるいは変異型HBV感染マウスの作製が可能となった。HBV感染早期において樹状細胞がNK細胞を活性化し、Fas/FasL pathway を介して感染肝細胞のアポトーシスを誘導することを見出した。

・研究分担者(上田啓次) ヒト肝癌培養細胞株 Huh6 にHBVゲノムをタンデム化して組込んだ細胞 HB611 は、HBV を産生する。HBV の産生による宿主遺伝子発現プロファイルの変化について検討した。今回は non-coding short RNA (ncsRNA) を除いた mRNA について解析した。

・研究分担者(中本安成) 本年度は、HBV表面抗原(HBsAg)のエピトープ(CTL-L^d拘束性HBs28-39を含む)が誘導する慢性肝炎において、ウイルス産生を制御する分子免疫機序について検討した。慢性肝炎マウスモデルにおいて18ヵ月の経過中に得られた肝組織について発現遺伝子プロファイルを解析した。免疫細胞学的検討として慢性肝炎を誘導する細胞分画について検討したところ、肝細胞障害にはCD8陽性分画が作用しているものの、ウイルス産生の制御にはCD4陽性分画が強く作用している可能性が示唆された。

・研究分担者(橋本真一) 今年度はHBV感染細胞株の準備とエピゲノム解析の準備をした。B型肝炎ウイルス(HBV)産生培養細胞株である HepG2.2.15 細胞と非産生細胞からゲノムを単離後、メチ

ル化されている部位だけを切り出すことが出来る制限酵素 MspJI を使用し、DNA メチル化を検討した。

- ・研究分担者(小原恭子) 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を進めた。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の分子の mRNA の核酸配列を解析した。免疫反応の解析に必要な抗体の作成を共同研究者の小原道法博士(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を既に 80 種類作成した。

- ・研究分担者(村上清史) HBx ORF、HBV EnhI 及び Enh II など HBV 転写制御域等に変異を持つ各種 HBV レプリコン系の構築と、トランスに働く野生型及び各領域に変異を持つ HBx 発現系を準備し、HBV 持続産生細胞から HBV 粒子の高効率な産生条件の検討と濃縮 HBV 粒子を用いた感染系の構築の検討を開始した。

- ・研究分担者(石川哲也) マウス (H-2d) においては、HBs 及びケモカイン遺伝子 (IP-10、Mig、RANTES) を含むプラスミド DNA での免疫により HBs 抗原特異的 CTL の誘導効率の比較を行った。HepG2.2.15 との培養によって、PDC は I 型 IFN を産生し、BDCA3+DC は III 型 IFN を多量に産生した。HBV 陰性の親株や UV によって HBV 複製を不活化した細胞との共培養では、いずれの DC から IFN は産生されなかった。IFN 産生が確認された系では、肝癌細胞に ISG15、Mx1 などの ISG が強く誘導された。

- ・研究分担者(考藤達哉) HepG2.2.15 との培養によって、PDC は I 型 IFN を産生し、BDCA3+DC は III 型 IFN を多量に産生した。HBV 陰性の親株や UV によって HBV 複製を不活化した細胞との共培養では、いずれの DC から IFN は産生されなかった。IFN 産生が確認された系では、肝癌細胞に ISG15、Mx1 などの ISG が強く誘導された。DC は HBV を認識して、I 型、III 型 IFN を産生し、肝細胞の ISG 誘導に関与することが明らかになった。

- ・研究分担者(高橋 健) ヒト急性・慢性 B 型肝炎における免疫学的活性化状態の差異を明らかにするため、急性肝炎と慢性肝炎の急性増悪例を対象とし、各症例における末梢血単核球を経時的に分離採取し RNA 抽出を行った。これらのサンプルを用いてマイクロアレイ解析(Agilent Technologies, SuperPrint G3 Human GE 8x60K Ver.2.0)を行い、それぞれの症例内での経時的な遺伝子発現プロファイルを解析した。急性肝炎症例で特徴的なこととしては、複数の Toll-like receptor (TLR) の発現亢進が確認された。

- ・研究分担者(加藤孝宣) B 型肝炎患者血清中から DNA を抽出し、2 組のプライマーセットを用い HBV ゲノム全長を増幅した。増幅した PCR fragment をクローニングした後に、各 fragment 5 本ずつのシーケンスを確認し、患者中で増殖している HBV のコンセンサス配列を決定した。得られたコンセンサス配列を元に、HBV のすべての ORF を発現するような 1.25 倍長の HBV ゲノムを持つコンストラクトを構築した。

- ・研究分担者(村口 篤) モデルシステムとして、HLA-A24 陽性のボランティアの末梢血リンパ球の中から、EB ウイルス特異的 T 細胞を検出し、その TCR を取得することを試みた。EB ウイルス特異的 T 細胞は、EB ウイルス由来ペプチドと HLA-A24 分子の複合体の四量体を用い、フローサイトメータを用い検出・回収した。回収した単一の細胞より RT-PCR 法により、TCR cDNA を増幅し、それを TCR 陰性の T 細胞株に遺伝子導入し、TCR を細胞表面に発現させた。取得した TCR が EB ウイルス特異的か否かを、ペプチド/MHC 四量体による染色により解析した。

- ・研究分担者(池田裕明) ①TCR 改変ヒト T 細胞輸注療法の効果、安全性を評価するインビボ評価系を確立した。②独自開発の siTCR 技術に、2A ペプチドの導入とジスルフィド結合を組合せ、導

入 TCR 遺伝子の発現を高めると共により安全性の高い新規ベクターの開発を行った。③エクトロピックレトロウイルスベクターによる TCR 遺伝子導入リンパ球輸注療法のマウスモデルを確立し、様々なベクター構造や輸注プロトコールの同種インビボ評価系を確立した。

・研究分担者(石井 健) ペプチドワクチンの候補アジュバントの選定と全臨床試験の予備実験をモデル抗原を用いて行った。人で既に上市されて用いられているアラムアジュバントをコントロールとして TLR9 リガンドである CpGODN やその他 TLR リガンド、粒子アジュバント、新規アジュバントを用いて抗原特異的な免疫反応のキャラクタライゼーションを行った。

・研究分担者(小原道法) 3 種類の組換えワクチニアウイルス (HCVCN2-、HCVCN5-、HCVN25-RVV) を構築し、これら HCV-RVV を申請者らが作製した慢性 C 型肝炎のモデルマウスである HCV/Cre-Tg マウスに接種した。HBV 遺伝子型 C の 1) preS1-S2-S、2) preS2-S、3) S 蛋白質領域を LC16m8 株の HA 遺伝子領域に組み込んだ HBV-rVV を 3 種類作製し、その蛋白質発現を確認した。

・研究分担者(水腰英四郎) B 型肝炎ウイルス(HBV) genotype C の large S 領域、pre-core/core 領域、HBx 領域、polymerase 領域のアミノ酸配列を基に、コンピュータソフト(BIMAS)を用いて、HLA-A24 拘束性細胞障害性 T 細胞(CTL)エピトープの予測を行った。免疫学的解析に用いるためのペプチドを作製した。これらのペプチドとヒトリンパ球を用いて、ペプチドに反応しインターフェロンガンマを産生する CTL を検出するための、ELISPOT アッセイシステムを構築した。

IV. 平成 25～28 年度の課題

- (1) cccDNA を測定するシステムの確立と治療応用
- (2) cccDNA 合成に影響を与える ncsRNA の治療応用
- (3) 抗 HBV 反応を増強する免疫賦活薬の開発
- (4) Epigenome と HBV cccDNA 発現調節機構
- (5) ツパイ HBV 感染実験モデルの樹立と免疫治療薬の薬効評価
- (6) HBVccc 肝細胞株の樹立と HBVccc の制御機構
- (7) HBV 免疫寛容打破のための高効率免疫法の開発
- (8) 樹状細胞、Exosome と Natural adjuvant の検討
- (9) HBV 免疫関連分子の機能解析
- (10) HBV ゲノムをターゲットにした人工 DNA ヌクレアーゼ (TALEN) の作製
- (11) 標的とする抗原同定と TCR をクローニング
- (12) HBV 特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞の効果、安全性を評価
- (13) HBV の既知の envelope、core 領域エピトープを含んだペプチド+アジュバント
- (14) HBV の envelope あるいは core 領域を含んだ rVV 株
- (15) ペプチドワクチンの作製

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) B 型肝炎治療を変えることが期待される
- (2) 他の TCR を用いた細胞療法、ワクチン療法の開発に応用が期待される。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

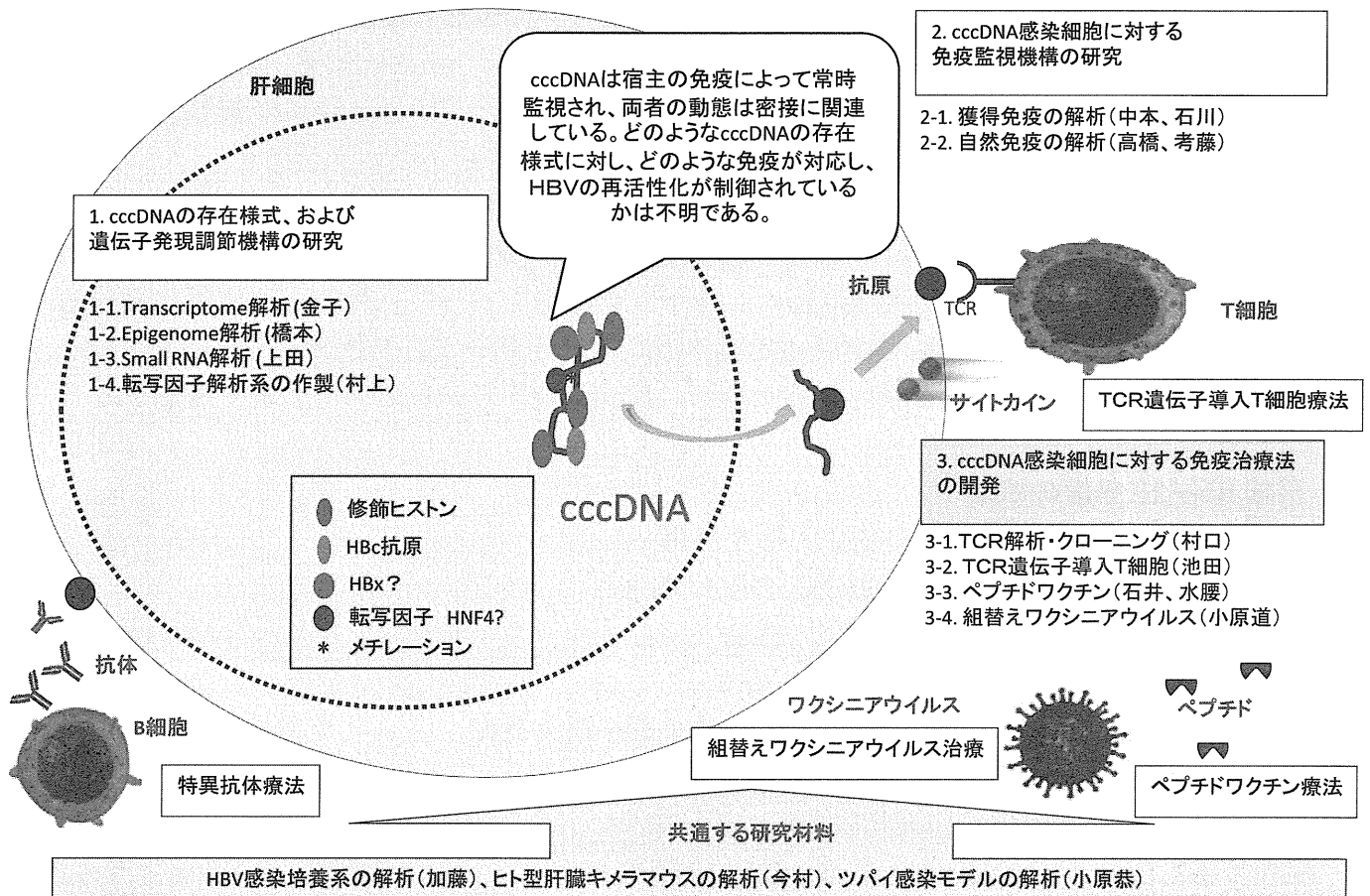
初年度は特になし。

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

研究課題名: HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

H24年度に行われた研究成果を全体計画の中の概要図に示した(研究者名)



●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 62 年～平成元年	米国国立衛生研究所(NIH)客員研究員
平成 5 年～平成 7 年	米国南カリフォルニア大学客員教授
平成 8 年～平成 16 年	金沢大学医学部第一内科 講師・助教授
平成 16 年～	金沢大学大学院医学系研究科恒常性制御学 (消化器内科) 教授
平成 18 年～平成 21 年	金沢大学医学部長 (併任)
平成 24 年～	金沢大学学長補佐 (研究担当) (併任)

▪ 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

昭和 58 年～昭和 61 年	金沢大学 服部 信教授、吉川 寛教授、村上清史助教授
昭和 62 年～平成元年	米国国立衛生研究所(NIH) Robert H Purcell
平成 5 年～平成 7 年	米国南カリフォルニア大学 French Anderson
平成 8 年～平成 15 年	金沢大学 小林健一教授

▪ 主な研究課題

- ・ 肝炎ウイルスによる肝炎の解析と治療に関する研究
- ・ 肝発癌の解析と、肝癌診断および治療に関する研究

▪ これまでの研究実績

1. T Yamashita, M Honda, Y Nakamoto, M Baba, K Nio, Y Hara, SS Zeng, TH Kondo, H Takatori, T Yamashita, E Mizukoshi, H Ikeda, Y Zen, H Takamura, XW Wang, S Kaneko. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Hepatology (in press)
2. E Mizukoshi, T Yamashita, K Arai, H Sunagozaka, T Ueda, F Arihara, T Kagaya, T Yamashita, K Fushimi, S Kaneko. Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. Hepatology (in press)
3. T Yamashita, S Kaneko. Treatment strategies for hepatocellular carcinoma in Japan. Hepatol Res (in press)
4. A Kitao, O Matsui, N Yoneda, K Kozaka, S Kobayashi, W Koda, T Gabata, T Yamashita, S Kaneko, Y Nakanuma, R Kita, S Arii. Hypervascular Hepatocellular Carcinoma: Correlation between Biologic Features and Signal Intensity on Gadoteric Acid-enhanced MR Images. Radiology 265(3):780-9, 2012.
5. Y Sakai, I Tatsumi, M Higashimoto, A Seki, A Nasti, K Yoshida, K Kawaguchi, T Wada, M Honda, T Komura, S Kaneko. Association of changes in the gene expression profile of blood cells with the local tumor inflammatory response in a murine tumor model. Biochem Biophys Res Commun 428(1):36-43, 2012.
6. E Mizukoshi, K Fushimi, K Arai, T Yamashita, M Honda, S Kaneko. Expression of chondroitin-glucuronate C5-epimerase and cellular immune responses in patients with hepatocellular carcinoma. Liver Int 32(10):1516-26, 2012.
7. H Shugo, T Ooshio, M Naito, K Naka, T Hoshii, Y Tadokoro, T Muraguchi, A Tamase, N Uema, T Yamashita, Y Nakamoto, T Suda, S Kaneko, A Hirao. Nucleostemin in Injury-Induced Liver Regeneration. Stem Cells Dev 21(16):3044-54, 2012.
8. H Okada, M Honda, JS Campbell, Y Sakai, T Yamashita, Y Takebuchi, K Hada, T Shirasaki, R Takabatake, M Nakamura, H Sunakozaka, T Tanaka, N Fausto, S Kaneko. Acyclic retinoid targets

- platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. *Cancer Res* 72(17):4459-71, 2012.
9. H Mizuno, M Honda, T Shirasaki, T Yamashita, T Yamashita, E Mizukoshi, S Kaneko. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in association with hTERT is a potential biomarker for hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 32(7):1146-55, 2012.
 10. S Kaneko, J Furuse, M Kudo, K Ikeda, M Honda, Y Nakamoto, M Onchi, G Shiota, O Yokosuka, I Sakaida, T Takehara, Y Ueno, K Hiroishi, S Nishiguchi, H Moriwaki, K Yamamoto, M Sata, S Obi, S Miyayama, Y Imai. Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. *Hepatol Res* 42(6):523-542, 2012.
 11. T Yamashita, K Arai, H Sunagozaka, T Ueda, T Terashima, T Yamashita, E Mizukoshi, A Sakai, Y Nakamoto, M Honda, S Kaneko. Randomized, Phase II Study Comparing Interferon Combined with Hepatic Arterial Infusion of Fluorouracil plus Cisplatin and Fluorouracil Alone in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* 81(5-6):281-90, 2011.
 12. M Kudo, K Imanaka, N Chida, K Nakachi, WY Tak, T Takayama, JH Yoon, T Hori, H Kumada, N Hayashi, S Kaneko, H Tsubouchi, DJ Suh, J Furuse, T Okusaka, K Tanaka, O Matsui, M Wada, I Yamaguchi, T Ohya, G Meinhardt, K Okita. Phase III study of sorafenib after transarterial chemoembolisation in Japanese and Korean patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 47(14):2117-27, 2011.
 13. A Kitao, O Matsui, N Yoneda, K Kozaka, R Shinmura, W Koda, S Kobayashi, T Gabata, Y Zen, T Yamashita, S Kaneko, Y Nakanuma. The uptake transporter OATP8 expression decreases during multistep hepatocarcinogenesis: correlation with gadoxetic acid enhanced MR imaging. *Eur Radiol* 21(10):2056-66, 2011.
 14. H Sunagozaka, M Honda, T Yamashita, R Nishino, H Takatori, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, S Kaneko. Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 129(7):1576-85, 2011.
 15. Y Tanaka, M Kurosaki, N Nishida, M Sugiyama, K Matsuura, N Sakamoto, N Enomoto, H Yatsuhashi, S Nishiguchi, K Hino, S Hige, Y Itoh, E Tanaka, S Mochida, M Honda, Y Hiasa, A Koike, F Sugauchi, S Kaneko, N Izumi, K Tokunaga, M Mizokami. Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hum Mol Genet* 20(17):3507-16, 2011.
 16. Y Takata, Y Nakamoto, A Nakada, T Terashima, F Arihara, M Kitahara, K Kakinoki, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, E Mizukoshi, S Kaneko. Frequency of CD45RO(+) subset in CD4(+)CD25(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 307(2):165-73, 2011.
 17. M Honda, K Takehana, A Sakai, Y Tagata, T Shirasaki, S Nishitani, T Muramatsu, T Yamashita, Y Nakamoto, E Mizukoshi, Y Sakai, T Yamashita, M Nakamura, T Shimakami, M Yi, SM Lemon, T Suzuki, T Wakita, S Kaneko; Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition Impairs Interferon Signaling through mTOR and FoxO pathways in Patients with Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 141(1):128-140. e2, 2011.
 18. T Yamashita, M Honda, S Kaneko. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 26(6):960-4, 2011.
 19. E Mizukoshi, Y Nakamoto, K Arai, T Yamashita, A Sakai, Y Sakai, T Kagaya, T Yamashita, M Honda, S Kaneko. Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 53(4):1206-16, 2011.
 20. Y Nakamoto, E Mizukoshi, M Kitahara, F Arihara, Y Sakai, K Kakinoki, Y Fujita, Y Marukawa, K Arai, T Yamashita, N Mukaida, K Matsushima, O Matsui, S Kaneko. Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. *Clin Exp Immunol* 163(2):165-77, 2011.
 21. K Kakinoki, Y Nakamoto, T Kagaya, T Tsuchiyama, Y Sakai, T Nakahama, N Mukaida, S Kaneko. Prevention of intrahepatic metastasis of liver cancer by suicide gene therapy and chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 delivery in mice. *J Gene Med* 12(12):1002-13, 2010.

22. J Furuse, T Okusaka, S Kaneko, M Kudo, K Nakachi, H Ueno, T Yamashita, K Ueshima. Phase I/II study of the pharmacokinetics, safety and efficacy of S-1 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Cancer Sci 101(12):2606-11, 2010.
23. Y Iwasaki, Y Shiratori, S Hige, S Nishiguchi, H Takagi, M Onji, H Yoshida, N Izumi, Y Kohgo, K Yamamoto, N Sato, A Shibuya, H Saito, M Sata, K Suzuki, S Kaneko, M Moriyama, and M Omata. A randomized trial of 24 versus 48 weeks of peginterferon α -2a in patients infected with chronic hepatitis C virus genotype 2 or low viral load genotype 1: a multicenter national study in Japan. HepatoInt Int (in press)
24. J Furuse, T Okusaka, S Kaneko, M Kudo, K Nakachi, H Ueno, T Yamashita, K Ueshima. Phase I/II study of the pharmacokinetics, safety and efficacy of S-1 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Cancer Sci 101(12):2606-11, 2010.
25. H Misu, T Takamura, H Takayama, H Hayashi, N Matsuzawa-Nagata, S Kurita, K Ishikura, H Ando, Y Takeshita, T Ota, M Sakurai, T Yamashita, E Mizukoshi, T Yamashita, M Honda, K Miyamoto, T Kubota, N Kubota, T Kadowaki, HJ Kim, IK Lee, Y Minokoshi, Y Saito, K Takahashi, Y Yamada, N Takakura, S Kaneko. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. Cell Metab 12(5):483-95, 2010.
26. S Kaneko, M Sata, T Ide, T Yamashita, S Hige, E Tomita, S Mochida, Y Yamashita, Y Inui, SR Kim, N Komada, T Mikami, S Satoh, S Morita, K Takaguchi, N Hirashima, Y Nishio, D Watanabe, K Kioka, K Fujiwara. Efficacy and safety of double filtration plasmapheresis in combination with interferon therapy for chronic hepatitis C. Hepato Res 40(11):1072-1081, 2010.
27. H Nuriya, K Inoue, T Tanaka, Y Hayashi, T Hishima, N Funata, K Kaji, S Hayashi, S Kaneko, Kohara M. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based in situ hybridization. J Clin Microbiol 48(11):3843-51, 2010.
28. M Honda, M Nakamura, M Tateno, A Sakai, T Shimakami, T Shirasaki, T Yamashita, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, S Kaneko. Differential interferon signaling in liver lobule and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. J Hepatol 53(5):817-26, 2010.
29. M Honda, Y Sakai, T Yamashita, T Yamashita, A Sakai, E Mizukoshi, Y Nakamoto, I Tatsumi, Y Miyazaki, H Tanno, S Kaneko; Hokuriku Liver Study Group. Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system cancers. Biochem Biophys Res Commun 400(1):7-15, 2010.
30. A Kitao, Y Zen, O Matsui, T Gabata, S Kobayashi, W Koda, K Kozaka, N Yoneda, T Yamashita, S Kaneko, Y Nakanuma. Hepatocellular Carcinoma: Signal Intensity at Gadoteric Acid-enhanced MR Imaging--Correlation with Molecular Transporters and Histopathologic Features. Radiology 256(3):817-26, 2010.
31. N Iida, Y Nakamoto, T Baba, H Nakagawa, E Mizukoshi, M Naito, N Mukaida, S Kaneko. Antitumor Effect after Radiofrequency Ablation of Murine Hepatoma Is Augmented by an Active Variant of CC Chemokine Ligand 3/Macrophage Inflammatory Protein-1 α . Cancer Res 70(16):6556-65, 2010.
32. M Honda, A Sakai, T Yamashita, Y Nakamoto, E Mizukoshi, Y Sakai, T Yamashita, M Nakamura, T Shirasaki, K Horimoto, Y Tanaka, K Tokunaga, M Mizokami, S Kaneko; Hokuriku Liver Study Group. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in IL28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. Gastroenterology 139(2):499-509, 2010.
33. T Shirasaki, M Honda, H Mizuno, T Shimakami, H Okada, Y Sakai, S Murakami, T Wakita, S Kaneko. La Protein Required for Internal Ribosome Entry Site-Directed Translation Is a Potential Therapeutic Target for Hepatitis C Virus Replication. J Infect Dis 202(1):75-85, 2010.
34. T Yamashita, M Honda, K Nio, Y Nakamoto, T Yamashita, H Takamura, T Tani, Y Zen, S Kaneko. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. Cancer Res 70(11):4687-97, 2010.
35. E Mizukoshi, Y Nakamoto, K Arai, T Yamashita, N Mukaida, K Matsushima, O Matsui, S Kaneko. Enhancement of tumor-specific T cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 126(9):2164-74, 2010.
36. Y Wu, Y Y Wang, Y Nakamoto, Y-Y Li, T Baba, S Kaneko, C Fujii, N Mukaida. Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in the liver. Oncogene 29(15):2228-37, 2010.

37. Y Hodo, SI Hashimoto, M Honda, T Yamashita, Y Suzuki, S Sugano, S Kaneko, K Matsushima. Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. Genomics 95(4):217-23, 2010.
38. T Yamashita, J Ji, A Budhu, M Forgues, W Yang, HY Wang, H Jia, Q Ye, LX Qin, E Wauthier, LM Reid, H Minato, M Honda, S Kaneko, ZY Tang, XW Wang. EpCAM-Positive Hepatocellular Carcinoma Cells Are Tumor-Initiating Cells With Stem/Progenitor Cell Features. Gastroenterology 136(3):1012-1024, 2009.
39. S Ura, M Honda, T Yamashita, T Ueda, H Takatori, R Nishino, H Sunakozaka, Y Sakai, K Horimoto, and S Kaneko. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. Hepatology 49(4):1098-1112, 2009.
40. Y Sakai, M Honda, H Fujinaga, I Tatsumi, E Mizukoshi, Y Nakamoto, and S Kaneko. Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. Cancer Res 68(24):10267-10279, 2009.
41. S Nakamura, T Takamura, N Matsuzawa-Nagata, H Takayama, H Misu, H Noda, S Nabemoto, S Kurita, T Ota, H Ando, K Miyamoto, S Kaneko. Palmitate Induces Insulin Resistance in H4IIEC3 Hepatocytes through Reactive Oxygen Species Produced by Mitochondria. J Biol Chem 284(22):14809-14818, 2009.
42. H Ando, T Takamura, N Matsuzawa-Nagata, KR Shima, S Nakamura, M Kumazaki, S Kurita, H Misu, N Togawa, T Fukushima, A Fujimura, S Kaneko. The hepatic circadian clock is preserved in a lipid-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. Biochem Biophys Res Commun 380(3):684-688, 2009.
43. H Ando, T Takamura, N Matsuzawa-Nagata, KR Shima, T Eto, H Misu, M Shiramoto, T Tsuru, S Irie, A Fujimura, and S Kaneko. Clock gene expression in peripheral leucocytes of patients with type 2 diabetes. Diabetologia 52(2):329-335, 2009.
44. T Yamashita, M Honda, H Takatori, R Nishino, H Minato, H Takamura, T Ohta, and S Kaneko. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. J Hepatology 50(1):100-110, 2009.
45. BK Popivanova, K Kitamura, Y Wu, T Kondo, T Kagaya, S Kaneko, M Oshima, C Fujii, N Mukaida. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. J Clin Invest 118(2):560-570, 2008.
46. T Takamura, H Misu, N Matsuzawa-Nagata, M Sakurai, T Ota, A Shimizu, S Kurita, Y Takeshita, H Ando, M Honda, S Kaneko. Obesity upregulates genes involved in oxidative phosphorylation in livers of diabetic patients. Obesity 16(12):2601-2609, 2008.
47. H Minagawa, T Yamashita, M Honda, Y Tabuse, K Kamijo, A Tsugita, and S Kaneko. Comparative analysis of proteome and transcriptome in human hepatocellular carcinoma using 2D-DIGE and SAGE. Protein J 27(7-8):409-419, 2008.
48. T Tsuchiyama, Y Nakamoto, Y Sakai, N Mukaida, and S Kaneko. Optimal amount of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy against hepatocellular carcinoma by M1 macrophage activation. Cancer Sci 99(10):2075-2082, 2008.
49. N Iida, Y Nakamoto, T Baba, K Kakinoki, YY Li, Y Wu, K Matsushima, S Kaneko, and N Mukaida. Tumor cell apoptosis induces tumor-specific immunity in a CC chemokine receptor 1- and 5-dependent manner in mice. J Leukoc Biol 84(4):1001-1010, 2008.
50. E Mizukoshi, M Honda, K Arai, T Yamashita, Y Nakamoto, and S Kaneko. Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. J Hepatol 49(6):946-954, 2008.
51. N Matsuzawa-Nagata, T Takamura, H Ando, S Nakamura, S Kurita, H Misu, T Ota, M Yokoyama, M Honda, K Miyamoto, and S Kaneko. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. Metabolism 57(8):1071-1077, 2008.
52. R Nishino, M Honda, H Takatori, H Minato, Y Zen, M Sasaki, H Takamura, K Horimoto, T Ohta, Y Nakanuma, and S Kaneko. Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma. J Hepatol 49(2):207-216, 2008.

53. R Teramoto, H Minagawa, M Honda, K Miyazaki, Y Tabuse, K Kamijo, T Ueda, S Kaneko. Protein expression profile characteristic to hepatocellular carcinoma revealed by 2D-DIGE with supervised learning. Biochim Biophys Acta 1784(5):764-772, 2008.

特許権利確定 3件

審査中 6件

出願済み 4件

政策提言：肝炎研究7カ年戦略（平成20年、平成21年）

肝がん診療ガイドライン（2005年版、2009年度版）

肝がんに対する新規抗がん剤使用に関する指針（2010年度版、2011年度版）

B型肝炎創薬実用化等研究事業

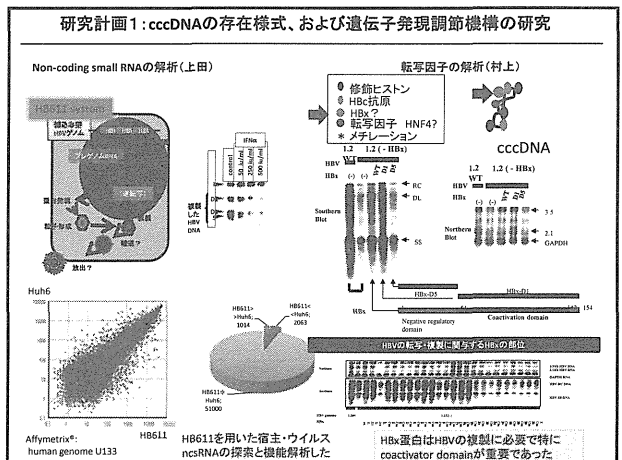
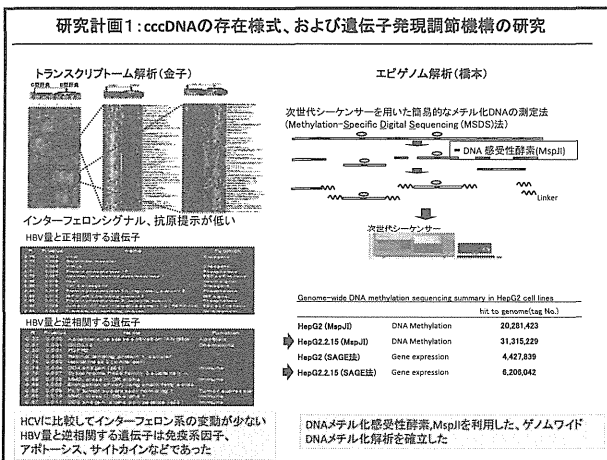
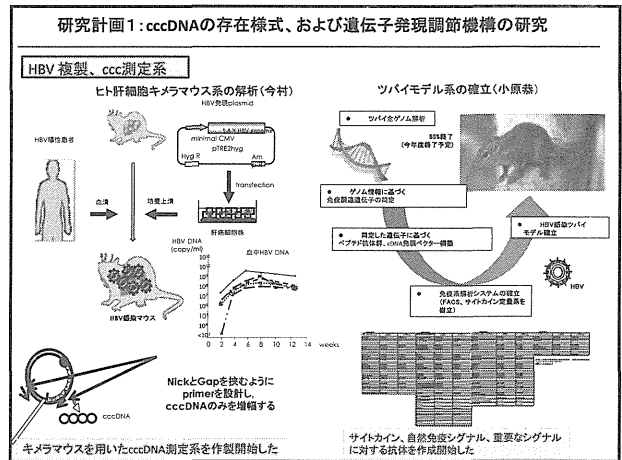
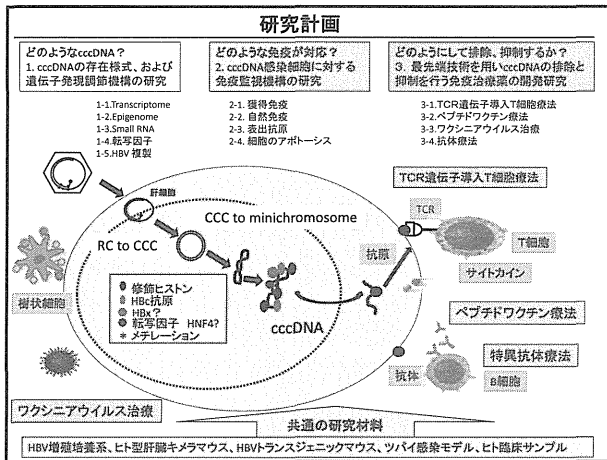
研究課題名：
HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

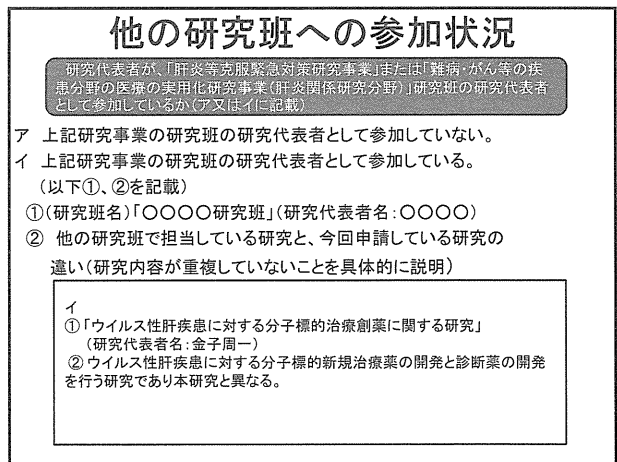
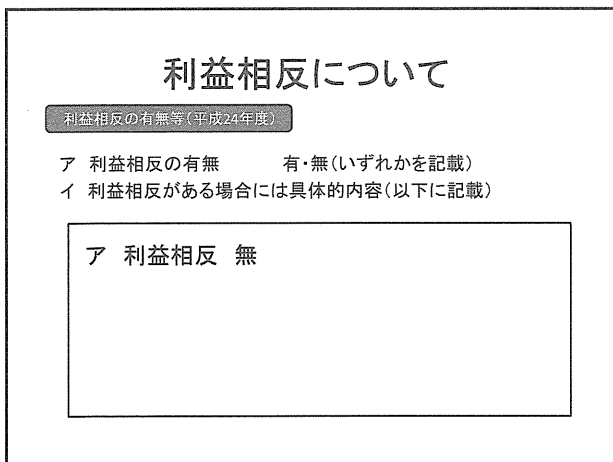
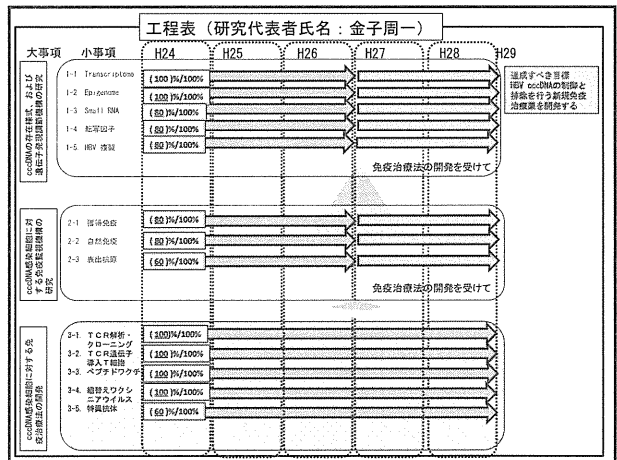
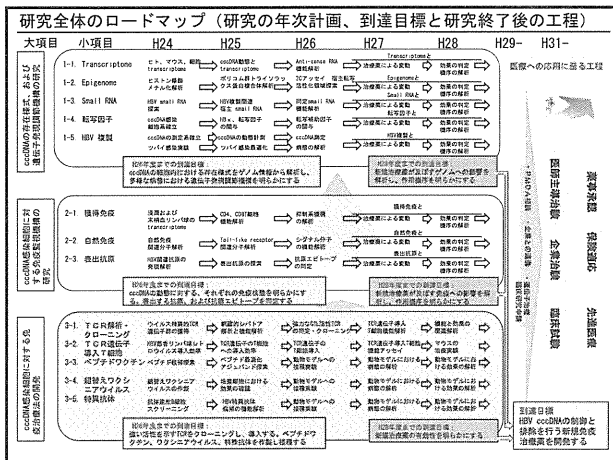
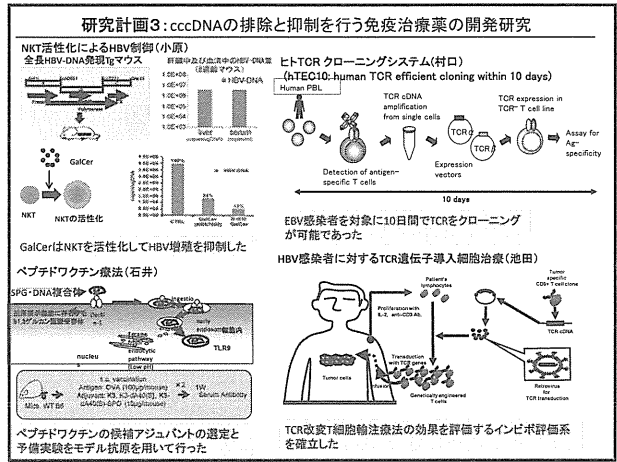
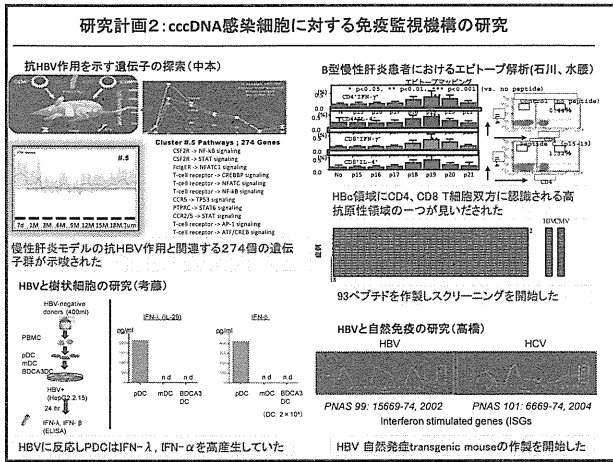
研究代表者
金沢大学
医薬保健研究域医学系
金子周一

研究の目的

目的：
免疫によってHBV感染を排除あるいは制御する治療法を開発する。

背景：
ウイルス増殖が低下しHBVの再活性化がみられない症例の予後は良好である。B型肝炎肝炎の治療においては、肝炎ウイルスの増殖を低下させcccDNAを中心とするHBVの再活性化を制御することが重要である。この再活性化はcccDNAと宿主の免疫応答によって制御されていると考えられる。しかし、再活性化に関わる免疫監視機構はほとんど明らかにはされていない。





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)

イ

①平成25年1月9日

②B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究

③田中靖人

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

課題番号 : H24-B創-肝炎-一般-011
予定期間 : H24年度からH28年度まで
研究代表者 : 溝上 雅史
所属研究機関 : 国立国際医療研究センター
所属部局 : 肝炎・免疫研究センター
職名 : 肝炎・免疫研究センター長
年次別研究費(交付決定額) : 1年目 200,000,000円

I. 研究の意義

- (1) B型肝炎に対する従来の医薬品や治療法では、肝細胞核内の HBVDNA に直接作用して HBV 複製を根本的に停止させることが出来なかった。
- (2) ウイルスペクターを用いずに安全かつ特異的に肝臓へ治療物質を輸送する手段の開発が望まれている。
- (3) HBV 感染が成立すると、その完全な排除は不可能で HBV が活性化するリスクを一生負うことになり、特に免疫抑制を伴う疾患や治療では、HBV 感染が障害となることがある。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 本研究では、HBV 複製の鋳型となる cccDNA とインテグレーションされた HBVDNA に対して、HBVDNA 配列特異的に作用する人工キメラ遺伝子 (Zinc Finger Nuclease, ZFN もしくは TAL Effector Nucleases, TALENs) を設計することで HBVDNA を切断と不活化することを目的とする。
- (2) それにより、これまで困難とされていた細胞核内の HBVDNA を不活化し、HBV の持続感染を根本的な手段により解決へ導く。
- (3) 新規のドラッグデリバリーシステム (DDS) として、高分子ポリマーを応用した自己会合型のナノ粒子を設計することで、その粒子内に低分子化合物もしくは核酸医薬品を封入する。さらに、肝臓特異的な輸送能がある分子を修飾させる。
- (4) このナノ粒子の開発により、肝臓特異的に輸送できるナノデバイスが完成すれば、様々な治療応用が可能のため、既存または将来開発される薬剤の輸送手段を改善でき、汎用性がある。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者

- (1) HBV ゲノム内に保存されている保存領域を抽出し、HBV 遺伝子型に依存せずに ZFN/TALEN の結合が得られる領域を選び出した。
- (2) 上記で設計した領域に対して、TALEN を合成し、その切断活性を検討した。

・ **研究分担者(片岡 一則)**

- (1) ポリエチレングリコールを応用した自己会合型の分子を合成した。その分子と DNA, RNA を共存させることで DNA 等を内包したナノ粒子が形成されることを確認した。
- (2) 上記の自己会合分子をさらに改良することで、二重膜様の構造を持つ粒子の作製に成功し、この粒子内に蛋白を取り込ませるところまで確認できた。
- (3) ナノ粒子をマウスに投与することで、肝臓で輸送遺伝子が発現していることを確認した。

・ **研究分担者(中西 真)**

- (1) ZFN/TALEN の細胞への影響を評価するために、1 細胞単位で細胞分裂を評価する実験系を確立した。
- (2) DNA が切断された箇所を集積する蛋白 (53BP1, γ -H2AX) を蛍光染色することで、切断箇所を定量的に観察する手法を確立した。
- (3) DNA 切断後に老化へ向かう細胞を定量的に観察するための染色手法を確立した。

・ **研究分担者(武冨 紹信)**

- (1) 外科手術後の切除肝臓を細胞レベルに分離し、細胞種ごとに保存するシステムを確立した。
- (2) 年間約 50 例の検体を保存する作業フローを確立した。
- (3) 取得した肝臓細胞から初代培養までのシステムを確立した。

・ **研究分担者(田中 榮司)**

- (1) ZFN/TALEN の効果を評価する基準としての HB コア関連抗原の有用性を明らかとした。
- (2) HBVDNA と HBVRNA を併せて検出する方法を確立し、ZFN/TALEN の評価方法として運用可能とした。

・ **研究分担者(星野 真一)**

- (1) mRNA の安定化には、ポリ A 鎖が 30 塩基以上必要であることを明らかとした。
- (2) 5 末端構造にアンチリバースキャップを用いることでその分解を抑制することが示された。
- (3) mRNA を環状化することで通常の mRNA 分解経路から回避させるために、プローブトリガーゼの処理により、分子内環状化を成功させた。

・ **研究分担者(杉山 真也)**

- (1) 既に構築した ZFN での HBVDNA 切断活性を哺乳細胞株を用いて、その中の cccDNA に対する切断活性を検証し、70%前後の切断活性を確認した。
- (2) 臨床検体中の cccDNA 量を検証するために、手術切除片を用いて定量を実施したところ、0.04 コピー/cell であることを明らかとした。
- (3) ZFN 蛋白質を大腸菌で発現条件の検討を進め、可溶性画分への目的蛋白の移行を進めるタグを選定した。

IV. 平成 25~28 年度の課題

- (1) ZFN/TALEN の最適化とそれらの活性を簡易に検出する実験系の確立
- (2) ナノ粒子の病態マウスモデルへの接種とその遺伝子発現の検証
- (3) DNA 切断活性が細胞へ与える影響の評価
- (4) 安全性と切断活性の評価法として、外科材料を用いた ex vivo 系の確立とその効果評価
- (5) RNA 輸送と RNA 分解速度のコントロール手法の確立
- (6) 臨床応用時の HBVDNA 切断効果の評価手法の血液マーカーでの検討