

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

目的：HBV持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系を開発し、B型肝炎創薬実用化研究を推進する

HBV持続培養系開発 → HBVライフサイクル解明 → 薬剤スクリーニング

24年度研究成果

1) 最適なヒト肝細胞の選択

- ・ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞を移植したキメラマウスの作製(水口)
- ・ヒト肝細胞キメラマウスより分離したヒト肝細胞を用いたHBV感染モデルの評価(石田)。
- ・小児肝良性腫瘍に対する肝切除で得られる非腫瘍部正常肝細胞の活用(調)

2) 新規培養系開発

- ・肝細胞長期培養のためのスフェロイド形成を用いた3次元培養法の確立及び機能解析(小原、松永)。
- ・キメラマウス肝細胞による3次元培養系において、HBV感染患者血清を感染。効率的に感染・複製可能な感染源を同定した(村上)。

評価モデル ① HBV持続感染培養系 ② HBV感染キメラマウス

各種HBVクローン (HBV genotype, 変異株), 感染源, 細胞株の作成・提供

3) ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明

- ・キメラマウス由来ヒト肝細胞・培養上清 (HBV感染・非感染) 凍結ヒト肝細胞・培養上清 (HBV感染・非感染) → microRNA (落谷), リポミクス解析 (中西)
- ・HBV産生による宿主細胞における脂質代謝変動の解析(深澤)
- ・2光子励起顕微鏡を用いることで、肝臓内の免疫細胞の動態血流、肝細胞傷害を生きたマウス個体内で可視化することに成功(石井)
- ・1.2倍長のHBV plasmidをTransfectionする系においては、IFN遺伝子発現に関わる自然免疫認識分子としてRIG-Iが主要な役割を担っていた(高岡)。

4) HBV感染感受性環境の構築

- ・HBV複製を効率的に行う細胞株を樹立 (HepG2.2.157, Hep38.7-Tet細胞) (渡士)。HBV DNAおよびcccDNA量が約3-10倍に上昇。
- ・HBV粒子の可視化技術(蛍光ラベル)を用いたHBV細胞内侵入機構の解析(石川)。エンドサイトーシスによって細胞質内へ取り込まれる。
- ・ヒト肝幹細胞様の細胞をクローン化することに成功し、より効率良くHBV感染が可能な細胞を得るために複数の細胞株を構築(土方)
- ・ヒト不死化肝細胞PH5CH8細胞やL23細胞を用いた基礎的検討(池田)
- ・全長にわたりアミノ酸を網羅的に置換したx蛋白発現系を構築・発現(坂本)

## ●研究代表者の研究歴等

### ▪ 過去に所属した研究機関の履歴

1991年5月～2001年7月	名古屋市立大学医学部第二内科 研究員
1997年4月～2001年3月	名古屋市立大学大学院医学研究科 医学博士
1999年11月～2001年7月	米国立保健研究所 (NIH) 留学 (Harvey J Alter)
2001年8月～2009年9月	名古屋市立大学大学院医学研究科 臨床分子情報医学
2009年10月～現在	名古屋市立大学大学院医学研究科 ウイルス学
2006年6月～現在	国立感染症研究所ウイルス第二部 客員研究員

### ▪ 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

1991年5月～1997年3月	名古屋市立大学医学部第二内科 山本正彦、溝上雅史
1997年4月～2001年3月	名古屋市立大学大学院医学研究科 上田龍三、溝上雅史
1997年4月～現在	国立遺伝学研究所 五條堀孝
1999年～2001年	米国立保健研究所 (NIH) Visiting fellow, Harvey J Alter
2006年6月～現在	国立感染症研究所ウイルス第二部 脇田隆字
2008年10月～現在	国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター 溝上雅史

### ▪ 主な研究課題

- 1) HBVの基礎的・臨床的研究 (HBV複製モデルを用いた検討)
- 2) 世界各国における肝炎ウイルスの分子疫学 (感染ルートの解明及び拡散時期の推定)
- 3) ウイルス性肝炎におけるSNPs解析

### ▪ これまでの研究実績

#### 政策提言

新規先進医療：「IL28Bの遺伝子診断によるインターフェロン治療効果の予測評価」

厚生労働省第50回先進医療専門家会議、平成22年7月12日認可

#### 発表論文

1. *Watanabe T, Tanaka Y. Reactivation of hepatitis viruses following immunomodulationg systemic chemotherapy. Hepatol Res. 2012 in press.*
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.*
3. Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association

- study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. *PLoS One*. 2012;7(6):e39175.
4. 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.
  5. Kondo Y, Ueno Y, Ninomiya M, Tamai K, Tanaka Y, Inoue J, Kakazu E, Kobayashi K, Kimura O, Miura M, Yamamoto T, Kobayashi T, Igarashi T, Shimosegawa T. Sequential immunological analysis of HBV/HCV co-infected patients during Peg-IFN/RBV therapy. *J Gastroenterol*. 2012 in press.
  6. Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsuhashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- $\alpha$  in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut*. 2012 in press.
  7. Kani S, Tanaka Y, Matsuura K, Watanabe T, Yatsuhashi H, Orito E, Inose K, Motojuku N, Wakimoto Y, Mizokami M. Development of new IL28B genotyping method using Invader Plus assay. *Microbiol Immunol*. 2012;56(5):318-23.
  8. Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol*. 2012;86(19):10805-20.
  9. Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*. 2012;56(4):1448-56.
  10. Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hum Mol Genet*. 2011;20(17):3507-16.
  11. Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. *PLoS One*. 2011;6(10):e26620.
  12. Seto WK, Tanaka Y, Liu K, Lai CL, Yuen MF. The Effects of IL-28B and ITPA Polymorphisms on Treatment of Hepatitis C Virus Genotype 6. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(5):1007-8.
  13. Raghwani J, Thomas XV, Koekkoek SM, Schinkel J, Molenkamp R, van de Laar TJ, Takebe Y, Tanaka Y, Mizokami M, Rambaut A, Pybus OG. Origin and evolution of the unique hepatitis C virus circulating recombinant form 2k/1b.. *J Virol*. 2011;86(4):2212-20.
  14. Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N,

- Karino Y, Kumada H. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res*. 2011;42(2):139-149.
15. Wang J, Singh US, Rawal RK, Sugiyama M, Yoo J, Jha AK, Scroggin M, Huang Z, Murray MG, Govindarajan R, Tanaka Y, Korba B, Chu CK. Antiviral activity of novel 2'-fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine against wild-type and drug-resistant hepatitis B virus mutants. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21(21):6328-31.
  16. Matsuura K, Tanaka Y, Kusakabe A, Hige S, Inoue J, Komatsu M, Kuramitsu T, Hirano K, Ohno T, Hasegawa I, Kobashi H, Hino K, Hiasa Y, Nomura H, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. Recommendation of lamivudine-to-entecavir switching treatment in chronic hepatitis B responders: Randomized controlled trial. *Hepatol Res*. 2011;41(6):505-511
  17. Yokosuka O, Kurosaki M, Imazeki F, Arase Y, Tanaka Y, Chayama K, Tanaka E, Kumada H, Izumi N, Mizokami M, Kudo M. Management of hepatitis B: Consensus of the Japan Society of Hepatology 2009. *Hepatol Res*. 2011;41(1):1-21.
  18. Kusakabe A, Tanaka Y, Inoue M, Kurbanov F, Tatematsu K, Nojiri S, Joh T, Tsugane S, Mizokami M. A population-based cohort study for the risk factors of HCC among hepatitis B virus mono-infected subjects in Japan. *J Gastroenterol*. 2011;46(1):117-24.
  19. Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, Fukai K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O. Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species during hepatitis B e antigen seroconversion. *J Hepatol*. 2011;54(1):19-25
  20. Afdhal NH, McHutchison JG, Tanaka Y, et al. Pharmacogenetics and Hepatitis C Meeting Participants. Hepatitis C pharmacogenetics: state of the art in 2010. *Hepatology*. 2011;53(1):336-45.
  21. Yuen MF, Wong DK, Tanaka Y, et al. Transmissibility of hepatitis B virus (HBV) infection through blood transfusion from blood donors with occult HBV infection. *Clin Infect Dis*. 2011;52(5):624-32.
  22. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. lambda-Interferons and the single nucleotide polymorphisms: A milestone to tailor-made therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Res*. 2010;40(5):449-60.
  23. Kondo Y, Tanaka Y, et al. Hepatitis B virus replication could enhance regulatory T cell activity by producing soluble heat shock protein 60 from hepatocytes. *J Infect Dis*. 2010;202(2):202-13.
  24. Mukaide M, Tanaka Y, et al. Mechanism of entecavir resistance of hepatitis B virus with viral breakthrough as determined by long-term clinical assessment and molecular docking simulation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(2):882-9.
  25. Honda M, Sakai A, Tanaka Y, et al. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in IL28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2010;139(2):499-509.
  26. Kurbanov F, Tanaka Y, Matsuura K, et al. Positive selection of core 70Q variant genotype 1b hepatitis C virus strains induced by pegylated interferon and ribavirin. *J Infect Dis*. 2010;201(11):1663-71.
  27. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genet*. 2009;41(10):1105-9.

28. Sugiyama M, Tanaka Y, et al. Direct Cytopathic Effects of Particular Hepatitis B Virus Genotypes in uPA/SCID Mouse with Human Hepatocytes. *Gastroenterology*. 2009;136(2):652-662.
29. Tatematsu K, Tanaka Y. et al. A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype J. *J Virol*. 2009;83(20):10538-47.
30. Fung J, Lai CL, Tanaka Y.et al. The Duration of Lamivudine Therapy for Chronic Hepatitis B: Cessation vs. Continuation of Treatment After HBeAg Seroconversion. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(8):1940-6.
31. Matsuura K, Tanaka Y (corresponding author) . et al. Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes among Patients with Chronic Infection in Japan Shifting toward an Increase of Genotype A. *J Clin Microbiol*. 2009;47(5):1476-83.
32. Kusakabe A, Tanaka Y. (corresponding author) et al. A Case-Control Study for the Identification of Virological Factors associated with Fulminant Hepatitis B. *Hepatol Res*. 2009;39(7):648-56.
33. Kurbanov F, Tanaka Y, et al. When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol*. 2008;82(16):8241-2.
34. Yuen MF, Tanaka Y, et al. Risk for hepatocellular carcinoma with respect to hepatitis B virus genotypes B/C, specific mutations of enhancer II/ core promoter/ precore regions and HBV DNA levels. *Gut*. 2008;57(1):98-102.
35. Sugiyama M, Tanaka Y (equal first author), et al. Early Dynamics of Hepatitis B Virus in Chimeric Mice Carrying Human Hepatocytes Mono- or Coinfected with Genotype G. *Hepatology*. 2007;45(4):929-937.
36. Tanaka Y, Mizokami M. Genetic diversity of hepatitis B virus as an important factor associated with differences in clinical outcomes. *J Infect Dis*. 2007; 195(1):1-4.
37. Osiowy C, Giles E, Tanaka Y, Mizokami M, Minuk GY. Molecular evolution of hepatitis B virus over 25 years. *J Virol*. 2006;80(21):10307-14.
38. Sugiyama M, Tanaka Y, et al. Influences of Hepatitis B Virus Genotypes on the Intra- and Extracellular Expression of Viral DNA and Antigens. *Hepatology*. 2006;44(4):915-24.
39. Tanaka Y, Mukaide M, et al. Specific Mutations in Enhancer II/Core Promoter of Hepatitis B Virus Subgenotypes C1/C2 Increase the Risk of Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatol*.2006;45(5):646-53.
40. Ozasa A, Tanaka Y, et al. Influence of Genotypes and Precore Mutations on Fulminant or Chronic Outcome of Acute Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology*. 2006;44(2):326-34.
41. Tanaka Y, Kurbanov F, et al. Molecular Tracing of Global Hepatitis C Virus Epidemic Predicts Regional Patterns of Hepatocellular Carcinoma Mortality. *Gastroenterology*. 2006;130(3):703-714.
42. Fujiwara K, Tanaka Y, et al. Novel type of hepatitis B virus mutation - "replacement mutation" involving hepatocyte nuclear factor 1 binding site tandem repeat in chronic hepatitis B genotype E. *J Virol*. 2005;79(22):14404-14410.
43. Tanaka Y, Hanada K, et al. Molecular Evolutionary Analyses Implicate Injection Treatment for Schistosomiasis in the Initial Hepatitis C Endemic of Japan. *J Hepatol*. 2005;42(1):47-53.
44. Tanaka Y, Hasegawa I, et al. A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. *Hepatology*. 2004;40:747-755.

45. Hasegawa I, Tanaka Y, et al. A novel hepatitis B virus genotype A subtyping assay that distinguishes subtypes Aa from Ae and its application in epidemiological studies. *J Virol*. 2004;78(14):7575-7578.
46. Tanaka Y, Hanada K, et al. A comparison of molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the US will increase over the next two decades. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15584-15589.

## 特許

1. 糖タンパク質の測定方法、肝疾患の検査方法および糖タンパク質定量用試薬  
成松久、池原譲、久野敦、久野敦、田中靖人、溝上雅史、伊藤清顕、松原俊介、鶴野親是、高浜洋一、香川孝司、永井慎也。2011年10月6日。特許公開 2012-185172。財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、公立大学法人名古屋市立大学、独立行政法人国立国際医療研究センター、シスメックス株式会社。
2. C型肝炎の治療効果を予測するためのマーカー群、検査方法及び検査用キット。  
田中靖人、溝上雅史、徳永勝士。2011年3月3日。特許公開 2011-193786。財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、公立大学法人名古屋市立大学。
3. C型肝炎の治療効果を予測するためのマーカー及びC型肝炎の治療効果の予測を行う方法並びにC型肝炎の予防又は治療剤。  
田中靖人、溝上雅史、徳永勝士。2011年3月3日。特許公開 2011-41526。財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、公立大学法人名古屋市立大学。
4. HBV感染症を治療または予防するための医薬組成物。  
溝上雅史、田中靖人、杉山真也、須藤正幸。2009年12月23日。国際公開 W02009/154248。公立大学法人名古屋市立大学、中外製薬株式会社。
5. 肝炎ウイルスの生体外増殖方法およびその用途  
山口達哉、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人。2008年4月3日。国際公開 W02008/038641。東洋紡績株式会社。
6. B型肝炎ウイルスのジェノタイプCのサブタイプの識別方法及びそのためのキット。  
溝上雅史、田中靖人、向出雅一。2007年1月18日。特許公開 2007-6734。名古屋市、株式会社エスアールエル。
7. B型肝炎ウイルスのジェノタイプAのサブタイプの判別方法。  
溝上雅史、田中靖人。2005年10月6日。特許公開 2005-270031。株式会社エスアールエル。
8. B型肝炎ウイルスのジェノタイプBのサブタイプの判別方法。  
溝上雅史、田中靖人。2005年10月6日。特許公開 2005-269994。株式会社エスアールエル。

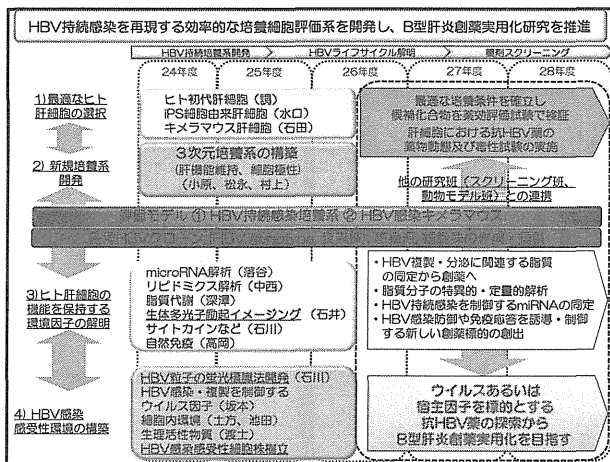
平成25年1月31日  
 肝炎免疫研究センター  
 市川

## 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

名古屋市立大学大学院 医学研究科  
 田中 靖人

## 目的

HBV根絶を目指したB型肝炎創薬実用化研究を効率良く推進するために、**HBV持続感染を再現する培養細胞評価系を開発し、HBV感染感受性・増殖機構（ライフサイクル）から病態メカニズムの解明、レセプターの同定、薬剤スクリーニング等を効率的に実施できる簡便なシステムを構築することである。**



### 1) 最適なヒト肝細胞の選択

ヒト初代肝細胞(調)  
 IPS細胞由来肝細胞(水口)  
 キメラマウス肝細胞(石田)  
 肝細胞株(土方, 池田)

小児肝臓

キメラマウス肝細胞 | ヒトIPS細胞 | 独自に樹立したヒト肝由来細胞株

	IL28B SNP	miR-122発現
ヒト肝細胞株		
Huh-7	IFN抵抗型(T/G)	高い
Lu23	IFN感受型(T/T)	高い
ヒト未分化肝細胞株		
NHKT3	IFN抵抗型(T/G)	低い
PH5CH8	IFN感受型(T/T)	低い

ヒト未分化肝細胞 (hUS-7細胞)  
 Akiyama et al. JHepatol.46:26-36,(2007)  
 ヒト肝細胞分化誘導細胞  
 PCT/JP2012/057468

HBV感染感受性の検討

### ヒトIPS由来分化誘導肝細胞の特徴 (水口班員)

FOXA2 + HNF1α + HNF1β + HNF1γ + HNF1δ + HNF1ε + HNF1ζ + HNF1η + HNF1θ + HNF1ι + HNF1κ + HNF1λ + HNF1μ + HNF1ν + HNF1ξ + HNF1ο + HNF1π + HNF1ρ + HNF1σ + HNF1τ + HNF1υ + HNF1φ + HNF1χ + HNF1ψ + HNF1ω + HNF1x + HNF1y + HNF1z + HNF1aa + HNF1ab + HNF1ac + HNF1ad + HNF1ae + HNF1af + HNF1ag + HNF1ah + HNF1ai + HNF1aj + HNF1ak + HNF1al + HNF1am + HNF1an + HNF1ao + HNF1ap + HNF1aq + HNF1ar + HNF1as + HNF1at + HNF1au + HNF1av + HNF1aw + HNF1ax + HNF1ay + HNF1az + HNF1ba + HNF1bb + HNF1bc + HNF1bd + HNF1be + HNF1bf + HNF1bg + HNF1bh + HNF1bi + HNF1bj + HNF1bk + HNF1bl + HNF1bm + HNF1bn + HNF1bo + HNF1bp + HNF1bq + HNF1br + HNF1bs + HNF1bt + HNF1bu + HNF1bv + HNF1bw + HNF1bx + HNF1by + HNF1bz + HNF1ca + HNF1cb + HNF1cc + HNF1cd + HNF1ce + HNF1cf + HNF1cg + HNF1ch + HNF1ci + HNF1cj + HNF1ck + HNF1cl + HNF1cm + HNF1cn + HNF1co + HNF1cp + HNF1cq + HNF1cr + HNF1cs + HNF1ct + HNF1cu + HNF1cv + HNF1cw + HNF1cx + HNF1cy + HNF1cz + HNF1da + HNF1db + HNF1dc + HNF1dd + HNF1de + HNF1df + HNF1dg + HNF1dh + HNF1di + HNF1dj + HNF1dk + HNF1dl + HNF1dm + HNF1dn + HNF1do + HNF1dp + HNF1dq + HNF1dr + HNF1ds + HNF1dt + HNF1du + HNF1dv + HNF1dw + HNF1dx + HNF1dy + HNF1dz + HNF1ea + HNF1eb + HNF1ec + HNF1ed + HNF1ee + HNF1ef + HNF1eg + HNF1eh + HNF1ei + HNF1ej + HNF1ek + HNF1el + HNF1em + HNF1en + HNF1eo + HNF1ep + HNF1eq + HNF1er + HNF1es + HNF1et + HNF1eu + HNF1ev + HNF1ew + HNF1ex + HNF1ey + HNF1ez + HNF1fa + HNF1fb + HNF1fc + HNF1fd + HNF1fe + HNF1ff + HNF1fg + HNF1fh + HNF1fi + HNF1fj + HNF1fk + HNF1fl + HNF1fm + HNF1fn + HNF1fo + HNF1fp + HNF1fq + HNF1fr + HNF1fs + HNF1ft + HNF1fu + HNF1fv + HNF1fw + HNF1fx + HNF1fy + HNF1fz + HNF1ga + HNF1gb + HNF1gc + HNF1gd + HNF1ge + HNF1gf + HNF1gg + HNF1gh + HNF1gi + HNF1gj + HNF1gk + HNF1gl + HNF1gm + HNF1gn + HNF1go + HNF1gp + HNF1gq + HNF1gr + HNF1gs + HNF1gt + HNF1gu + HNF1gv + HNF1gw + HNF1gx + HNF1gy + HNF1gz + HNF1ha + HNF1hb + HNF1hc + HNF1hd + HNF1he + HNF1hf + HNF1hg + HNF1hi + HNF1hj + HNF1hk + HNF1hl + HNF1hm + HNF1hn + HNF1ho + HNF1hp + HNF1hq + HNF1hr + HNF1hs + HNF1ht + HNF1hu + HNF1hv + HNF1hw + HNF1hx + HNF1hy + HNF1hz + HNF1ia + HNF1ib + HNF1ic + HNF1id + HNF1ie + HNF1if + HNF1ig + HNF1ih + HNF1ii + HNF1ij + HNF1ik + HNF1il + HNF1im + HNF1in + HNF1io + HNF1ip + HNF1iq + HNF1ir + HNF1is + HNF1it + HNF1iu + HNF1iv + HNF1iw + HNF1ix + HNF1iy + HNF1iz + HNF1ja + HNF1jb + HNF1jc + HNF1jd + HNF1je + HNF1jf + HNF1jg + HNF1jh + HNF1ji + HNF1jj + HNF1jk + HNF1jl + HNF1jm + HNF1jn + HNF1jo + HNF1jp + HNF1jq + HNF1jr + HNF1js + HNF1jt + HNF1ju + HNF1jv + HNF1jw + HNF1jx + HNF1jy + HNF1jz + HNF1ka + HNF1kb + HNF1kc + HNF1kd + HNF1ke + HNF1kf + HNF1kg + HNF1kh + HNF1ki + HNF1kj + HNF1kk + HNF1kl + HNF1km + HNF1kn + HNF1ko + HNF1kp + HNF1kq + HNF1kr + HNF1ks + HNF1kt + HNF1ku + HNF1kv + HNF1kw + HNF1kx + HNF1ky + HNF1kz + HNF1la + HNF1lb + HNF1lc + HNF1ld + HNF1le + HNF1lf + HNF1lg + HNF1lh + HNF1li + HNF1lj + HNF1lk + HNF1ll + HNF1lm + HNF1ln + HNF1lo + HNF1lp + HNF1lq + HNF1lr + HNF1ls + HNF1lt + HNF1lu + HNF1lv + HNF1lw + HNF1lx + HNF1ly + HNF1lz + HNF1ma + HNF1mb + HNF1mc + HNF1md + HNF1me + HNF1mf + HNF1mg + HNF1mh + HNF1mi + HNF1mj + HNF1mk + HNF1ml + HNF1mm + HNF1mn + HNF1mo + HNF1mp + HNF1mq + HNF1mr + HNF1ms + HNF1mt + HNF1mu + HNF1mv + HNF1mw + HNF1mx + HNF1my + HNF1mz + HNF1na + HNF1nb + HNF1nc + HNF1nd + HNF1ne + HNF1nf + HNF1ng + HNF1nh + HNF1ni + HNF1nj + HNF1nk + HNF1nl + HNF1nm + HNF1nn + HNF1no + HNF1np + HNF1nq + HNF1nr + HNF1ns + HNF1nt + HNF1nu + HNF1nv + HNF1nw + HNF1nx + HNF1ny + HNF1nz + HNF1oa + HNF1ob + HNF1oc + HNF1od + HNF1oe + HNF1of + HNF1og + HNF1oh + HNF1oi + HNF1oj + HNF1ok + HNF1ol + HNF1om + HNF1on + HNF1oo + HNF1op + HNF1oq + HNF1or + HNF1os + HNF1ot + HNF1ou + HNF1ov + HNF1ow + HNF1ox + HNF1oy + HNF1oz + HNF1pa + HNF1pb + HNF1pc + HNF1pd + HNF1pe + HNF1pf + HNF1pg + HNF1ph + HNF1pi + HNF1pj + HNF1pk + HNF1pl + HNF1pm + HNF1pn + HNF1po + HNF1pp + HNF1pq + HNF1pr + HNF1ps + HNF1pt + HNF1pu + HNF1pv + HNF1pw + HNF1px + HNF1py + HNF1pz + HNF1qa + HNF1qb + HNF1qc + HNF1qd + HNF1qe + HNF1qf + HNF1qg + HNF1qh + HNF1qi + HNF1qj + HNF1qk + HNF1ql + HNF1qm + HNF1qn + HNF1qo + HNF1qp + HNF1qq + HNF1qr + HNF1qs + HNF1qt + HNF1qu + HNF1qv + HNF1qw + HNF1qx + HNF1qy + HNF1qz + HNF1ra + HNF1rb + HNF1rc + HNF1rd + HNF1re + HNF1rf + HNF1rg + HNF1rh + HNF1ri + HNF1rj + HNF1rk + HNF1rl + HNF1rm + HNF1rn + HNF1ro + HNF1rp + HNF1rq + HNF1rr + HNF1rs + HNF1rt + HNF1ru + HNF1rv + HNF1rw + HNF1rx + HNF1ry + HNF1rz + HNF1sa + HNF1sb + HNF1sc + HNF1sd + HNF1se + HNF1sf + HNF1sg + HNF1sh + HNF1si + HNF1sj + HNF1sk + HNF1sl + HNF1sm + HNF1sn + HNF1so + HNF1sp + HNF1sq + HNF1sr + HNF1ss + HNF1st + HNF1su + HNF1sv + HNF1sw + HNF1sx + HNF1sy + HNF1sz + HNF1ta + HNF1tb + HNF1tc + HNF1td + HNF1te + HNF1tf + HNF1tg + HNF1th + HNF1ti + HNF1tj + HNF1tk + HNF1tl + HNF1tm + HNF1tn + HNF1to + HNF1tp + HNF1tq + HNF1tr + HNF1ts + HNF1tt + HNF1tu + HNF1tv + HNF1tw + HNF1tx + HNF1ty + HNF1tz + HNF1ua + HNF1ub + HNF1uc + HNF1ud + HNF1ue + HNF1uf + HNF1ug + HNF1uh + HNF1ui + HNF1uj + HNF1uk + HNF1ul + HNF1um + HNF1un + HNF1uo + HNF1up + HNF1uq + HNF1ur + HNF1us + HNF1ut + HNF1uu + HNF1uv + HNF1uw + HNF1ux + HNF1uy + HNF1uz + HNF1va + HNF1vb + HNF1vc + HNF1vd + HNF1ve + HNF1vf + HNF1vg + HNF1vh + HNF1vi + HNF1vj + HNF1vk + HNF1vl + HNF1vm + HNF1vn + HNF1vo + HNF1vp + HNF1vq + HNF1vr + HNF1vs + HNF1vt + HNF1vu + HNF1vv + HNF1vw + HNF1vx + HNF1vy + HNF1vz + HNF1wa + HNF1wb + HNF1wc + HNF1wd + HNF1we + HNF1wf + HNF1wg + HNF1wh + HNF1wi + HNF1wj + HNF1wk + HNF1wl + HNF1wm + HNF1wn + HNF1wo + HNF1wp + HNF1wq + HNF1wr + HNF1ws + HNF1wt + HNF1wu + HNF1wv + HNF1ww + HNF1wx + HNF1wy + HNF1wz + HNF1xa + HNF1xb + HNF1xc + HNF1xd + HNF1xe + HNF1xf + HNF1xg + HNF1xh + HNF1xi + HNF1xj + HNF1xk + HNF1xl + HNF1xm + HNF1xn + HNF1xo + HNF1xp + HNF1xq + HNF1xr + HNF1xs + HNF1xt + HNF1xu + HNF1xv + HNF1xw + HNF1xx + HNF1xy + HNF1xz + HNF1ya + HNF1yb + HNF1yc + HNF1yd + HNF1ye + HNF1yf + HNF1yg + HNF1yh + HNF1yi + HNF1yj + HNF1yk + HNF1yl + HNF1ym + HNF1yn + HNF1yo + HNF1yp + HNF1yq + HNF1yr + HNF1ys + HNF1yt + HNF1yu + HNF1yv + HNF1yw + HNF1yx + HNF1yy + HNF1yz + HNF1za + HNF1zb + HNF1zc + HNF1zd + HNF1ze + HNF1zf + HNF1zg + HNF1zh + HNF1zi + HNF1zj + HNF1zk + HNF1zl + HNF1zm + HNF1zn + HNF1zo + HNF1zp + HNF1zq + HNF1zr + HNF1zs + HNF1zt + HNF1zu + HNF1zv + HNF1zw + HNF1zx + HNF1zy + HNF1zz

約90%の細胞がアルブミン(ALB)、CYP3A4(最も重要な薬物代謝酵素)高発現であり、肝細胞特異的な形態を示した細胞(多角形状の形態、多核)が確認された。

分化誘導肝細胞は初代培養肝細胞と同様に肝毒性を示す薬剤によって細胞毒性を示した。

昨年5月から、世界初のヒトIPS由来肝細胞として販売

### HBV持続感染を制御するmicroRNA及び脂質の同定

ヒト肝細胞 → 肝細胞移植 → 肝細胞分離 → ヒト肝細胞

初代肝細胞 | キメラマウス肝臓 (ヒト化部位90%以上) | ヒト肝キメラマウス由来肝細胞

HBV感染効率 低い | HBV感染効率 高い | HBV感染効率 中程度

初代肝細胞 vs キメラマウス肝臓 vs 分離キメラマウス肝細胞 (in vitro)

2. HBV感染に伴うmiRNA及び脂質の変化: 持続感染に必須因子の同定

microRNA解析(落谷班員) | リポミクス解析(中西班員)

変化・変動する脂質分子の同定 → HBV感染制御 → 創薬標的候補の検証

(創薬: 生理活性脂質分子)

遺伝子発現解析 | 糖鎖解析

3D-Geno® miRNAチップ | リニアオプトアップ質量分析計 | トリアル四重質量分析計



### HBV感染細胞で変動している分子数

非感染細胞に対して感染細胞で2倍以上増加している脂質分子数

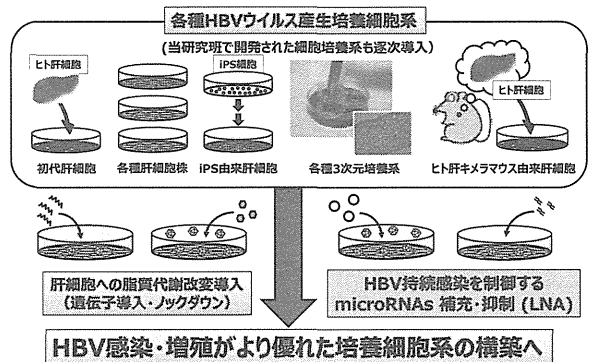
	網羅的解析	特異的解析	
キメラマウス由来ヒト肝細胞	73 分子/525 分子	39 分子/639 分子	2 分子
凍結ヒト肝細胞	63 分子/575 分子	41 分子/656 分子	2 分子
	6 分子	7 分子	

非感染細胞に対して感染細胞で1/2倍以下減少している脂質分子数

	網羅的解析	特異的解析	
キメラマウス由来ヒト肝細胞	49 分子/525 分子	27 分子/639 分子	5 分子
凍結ヒト肝細胞	112 分子/575 分子	34 分子/656 分子	4 分子
	12 分子	0 分子	

### HBV持続感染における脂質・microRNAの役割

脂質代謝変動解析・リポミクス解析・microRNA解析等の結果を総合的に利用



### 3) 新規培養系開発

スフェロイドプレート

Cell-able  
三次元細胞培養系

3次元培養系の構築  
(肝機能維持、細胞極性)  
(小原、松永、村上)

TestLiver  
(中空糸)

細胞極性の維持  
(電顕、トランスポーター等同夜性)  
肝機能の維持  
(薬物代謝能、アルブミン分泌能等)

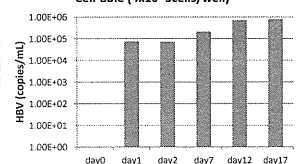
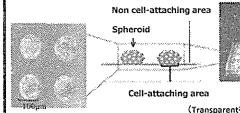
NanoCulture Plate

Microsquare

中空糸断面

### 肝機能維持に最適な3次元培養法の構築 ~HBV持続感染培養系~

Cell-able 三次元細胞培養系



HBV感染大量スクリーニング系の構築へ向けて

1. 初代培養肝細胞のHBV感染効率の上昇  
レンチウイルス又はMEND (Multifunctional Envelope-type Nano Device) による遺伝子・shRNA導入
2. 培地中に放出されるHBVの再感染性の検討  
ヒト肝臓キメラマウスへの感染実験、HBV放出量が増加した場合は初代肝細胞への再感染実験
3. キメラマウスのヒト肝細胞を取り出して遺伝子発現解析  
マウスへの導入前のヒト肝細胞と比較して、HBV感染に関する遺伝子を同定

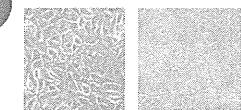
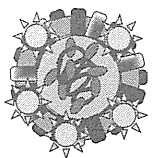
### 4) HBV感染感受性環境の構築 (ウイルス・宿主因子)

- HBV粒子の蛍光標識法開発 (石川、湯川、田中)
- 生体イメージング (石井)
- HBV感染・複製を制御するウイルス因子 (坂本)
- HBV感染感受性 (土方、池田)
- 薬剤スクリーニング系構築 (渡士、田中)

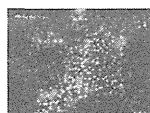
ウイルスあるいは宿主因子を  
標的とする抗HBV薬の探索から  
B型肝炎創薬実用化を目指す

独自に樹立したヒト肝由来細胞株

蛍光発色HBV粒子の作成

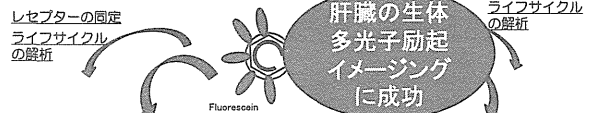


HBV-core  
expression in  
HBV-infected  
HepaRG cells



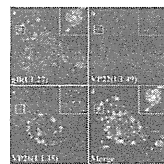
### HBVのin vitro/in vivo動態・抗ウイルス免疫の可視化

<HBV粒子の蛍光ラベリング>

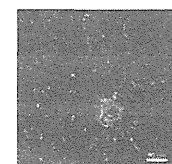


各種肝細胞/肝細胞(株)へ感染  
→HBV高感染の培養細胞探索

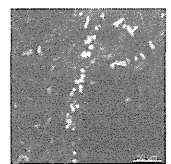
色つきマウス/ヒト肝細胞キメラマウスへ感染  
→免疫担当細胞の解析→培養系に還元 (石井班員)



Vero細胞におけるHBV可視化  
(Sugimoto et al, Journal of virology, 2008)



肝臓の傷害部位に集積するマクロファージ



感染部位(結合組織)で急速に活性化する好中球



**研究概要：HBV持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系を開発し、B型肝炎創薬実用化研究を推進する**

**TALENによるHBV感染防御や持続感染の制御**

**HBV持続感染に関連する脂質の同定から創薬へ**  
(生理活性脂質分子の同定)

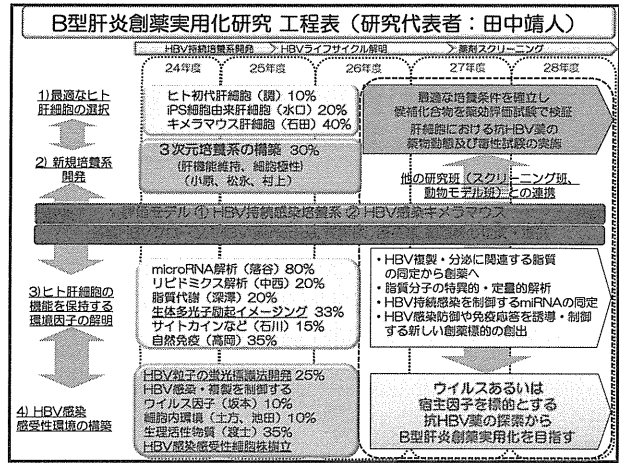
**HBV持続感染を制御する生理活性物質やmicroRNAの同定からHBV感染阻止の研究開発**

**最適な培養条件を確立し、候補化合物を薬効評価試験で検証  
肝細胞における抗HBV薬の薬物動態及び毒性試験の実施**

**HBV持続感染系の確立**

**他の研究班(スクリーニング班 動物モデル班)との連携**

**ウイルスあるいは宿主因子を標的とする抗HBV薬の探索からB型肝炎創薬実用化(個別化)を目指す**



**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 有 (無(いずれかを記載))

イ 利益相反がある場合には具体的内容(以下に記載)

**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。

① 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(研究班名)「ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報のデータベース構築・治療応用に関する研究班」  
(研究代表者:田中靖人)

②C型肝炎ウイルス感染に対する応答性や薬剤応答性の個人差に関わるヒト及びウイルス両方の遺伝子要因を同一個体内で明らかにし、統合型肝炎データベースを構築することにより、ヒト及びウイルス要因の両方を考慮した知見を得ることを目的とする研究班で、今回のB型肝炎創薬実用化研究とは重複は全くありません。

**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)

①平成24年8月30日  
②B型肝炎ウイルスの感染複製気候の解明に関する研究  
③(脇田隆字) ①①①

①平成25年1月9日  
②HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発  
③(金子周一)

## 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：ツパイ全ゲノム解析に基づくB型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究  
 課題番号：H24-B創-肝炎-一般-014  
 予定期間：H24年度からH28年度まで  
 研究代表者：小原 道法  
 所属研究機関：公益財団法人 東京都医学総合研究所  
 所属部局：ゲノム医科学研究分野  
 職名：副参事研究員・プロジェクトリーダー  
 年次別研究費(交付決定額)：1年目 100,000,000円

**I. 研究の意義**

HBV感染を防ぐワクチンや治療薬の開発には有効な実験動物モデルが必要であるが、HBVはヒト、チンパンジー以外に適正な感染動物が存在せず、治療や病態解析に用いる実験動物モデルの確立が急務となっている。ツパイはHBVの感染が認められる小型動物であり、実験動物としての実績もある。本研究では、ツパイの全ゲノムを解析し、この配列情報を基にcDNAクローニング、抗体作製を進めることで、短期間にツパイ免疫系の解析ツールを樹立する。さらに、より効率・感度の高い動物実験モデルの確立を目指し、ツパイ馴化HBV株とHBV高感受性ツパイ系統を樹立することで、ウイルス・宿主の両面からHBV-ツパイ感染実験系を改良する。これらの実験を通じて、正常な免疫機能を持つツパイをHBV感染モデル動物として確立する。本研究で開発されるHBV-ツパイ感染実験系は、HBV病原性解析やHBV感染に起因する肝炎・肝がんの治療法の開発に大きく貢献できる。

**II. 研究の目的、期待される成果**

近年開発され実用化されている、ヒト肝細胞キメラマウスにより短期的な検討は可能となったが、獲得免疫系を有しないなどの問題点もあり、より自然に近い環境でHBVが感染可能な動物モデルが求められている。原猿類に分類されていたツパイは、HBV及びHCVに感染し1~3年で慢性肝炎、肝硬変、肝がんを発症する(Amako, Kohara, JV 2010)。ツパイは肝炎ウイルス感染動物実験モデルの候補として優れているものの、これまでその免疫応答を解析するツールは殆ど存在していない。治療薬の効果を評価するにはツパイの免疫応答機構を解析するツールの作製が必須である。そこで、①ツパイの全ゲノム解析し、この情報を基にツパイ免疫関連遺伝子の同定し、その蛋白質に対する抗体を作製し、免疫機構解析ツールを確立する。さらに、②ツパイ馴化HBV株と、HBV高感受性ツパイ系統を各々樹立し、両者を組み合わせることで、慢性肝炎や肝がんをより高頻度に発症する条件を確立する。③抗ウイルス活性を持つ化合物や治療ワクチンなどの効果を検証することで動物モデルとしての資質を評価することを目的とする。これにより、ヒトに近いゲノム情報を持つ新たなB型肝炎実験動物が樹立され、病態解析や薬理効果、治療効果の実証を可能とし、新規HBV感染治療法の確立において重要な鍵となることが期待される。

**III. 1年間の研究成果**

研究代表者(小原道法)

- (1) ツパイを実験動物として樹立するため、HCV感受性の高かった1個体の全ゲノム解析を進め、95%以上のゲノムシーケンスを終了した。
- (2) さらに、別個体の全ゲノム解析を進め、SNPsの解析を試みている。
- (3) 得られたゲノム情報から小原恭子班員が同定した、ツパイの免疫反応を担うサイトカインや細胞表面マーカー、自然免疫、シグナル分子など主要な86種類を選択し、ペプチド抗体作成を行った。
- (4) 村上周子班員から供与を受けた、成人に感染後持続化したHBV・遺伝子型A株、遺伝子型B株、遺伝子型C株、HBV-J株、ギボンHBV株をヒト肝臓キメラマウスに感染させ高力化のウイルス血清を得た。これら感染血清をツパイへの感染源として用いる。

研究分担者(保富康宏)

ツパイにおける高感受性系統の樹立は非常に重要であり、現在までに未知であるHBV獲得免疫の解析は病態解明に極めて意義深い。

- (1) ツパイの導入、繁殖プロトコルを作成した。
- (2) HBV感染実験は新生児に対して行う必要があり、繁殖・感染実験・経過観察を容易にするために新世界ザルのケージを改良し、ツパイ繁殖専用ケージの作製を行った。
- (3) これにより、新生児への感染から持続感染、さらにはその個体を繁殖し垂直感染系を樹立するシステム構築を行った。

研究分担者(小原恭子)

- (1) 小原道法班員のツパイ全ゲノム配列解析結果に基づき、ツパイのサイトカインや細胞表面マーカー、レセプター、自然免疫、シグナル分子群から100種類選択し、その遺伝子配列をヒト分子との相同性から検索し、同定した。

- (2) 同定したツパイのアミノ酸配列に基づき、主要な 86 種類について抗体作成に必要なエピトープの検索を行い、その情報を小原道法班員に提供した。
- (3) この解析の結果、ツパイのアミノ酸配列の多くがマウスよりもヒトに近い事が明らかとなり、ゲノム配列からもツパイはヒトに近い動物である事が明らかとなった。
- (4) ツパイ飼育繁殖専用ケージの作製設置、専用感染実験室を整備し、飼育・感染実験環境を整えた。

#### 研究分担者(石井健)

- (1) ツパイの自然免疫関連の遺伝子の選定、クローニング、蛋白発現系の構築を目標とした。小原恭子班員との共同研究により、ツパイ TLR9 の約 3000 塩基の配列を同定、3 つのフラグメントに分けクローニングを行い、蛋白発現系の構築に成功した。

#### 研究分担者(押海裕之)

- (1) HBV の DNA が細胞質内に存在するとリン酸化した TBK1 がミトコンドリア上に凝集することを発見した。
- (2) また、細胞質内核酸認識経路に関与する DDX60 分子のノックアウトマウスを作製した。これを用い DDX60 分子が、細胞質内 DNA による I 型インターフェロン産生誘導に部分的に関与することを発見した。
- (3) さらにマイクロアレイ解析から同定した新規分子 Luple について細胞質内の DNA 刺激による炎症性サイトカインの産生に関与することを発見した。

#### 研究分担者(村上周子)

- (1) 旧世界ザルに感染するギボン HBV は、ウイルス遺伝子分子系統解析の結果、ヒト HBV 遺伝子型 J に近いことが示された。異種間感染の可能性を検討するため、ヒト肝細胞キメラマウスにギボン HBV を接種し感染を試みた。その結果、ギボン HBV はヒトに感染しうることが明らかとなった。これらウイルスを小原道法班員に供与した。
- (2) ツパイより経時的に採取可能な血液量は限られており、微量の血清による HBV 感染評価系を確立した。HBV-DNA の定量は、血清 5  $\mu$ l より、HBs 抗原、HBcr 抗原、AST、ALT、アルブミン等の評価にはそれぞれ約 2  $\mu$ l の血清で測定することが可能である高感度測定系を確立した。

#### 研究分担者(原島秀吉)

- 独自の核酸送達システムとして、核酸医薬を脂質エンベロープで封入した脂質構造体 Multifunctional envelope-type nano device (MEND) の開発に成功している。
- (1) 新規 pH 応答型カチオン性脂質である YSK05 の合成に成功し、脂質エンベロープに組み込むことにより、in vivo 肝臓へ効率よく siRNA の送達を可能とする YSK-MEND の開発を試みた。MEND の調製法の改良、脂質組成比、等の最適化を行った。
- (2) その結果、マウス肝臓へ siRNA を送達し、効率よくノックダウン (ED50: 0.06mg/kg) する YSK-MEND の開発に成功した。そこで、小原道法班員との共同研究により、HCV 感染したヒト肝臓キメラマウスへ HCV-mRNA に対する siRNA を搭載した YSK-MEND を静脈内投与したところ、HCV の感染を 1mg/kg で高効率に抑制することに成功した。

#### IV. 平成 25~28 年度の課題

- (1) ツパイ全ゲノム配列解析結果に基づき、これまでに決められていない免疫関連分子群の遺伝子配列をヒト分子との相同性から検索し、決定する。
- (2) 全ゲノム情報から、さらに必要なペプチド抗体作成、cDNA クローン化を行う。これにより、ツパイ免疫学的解析系の確立を行う。
- (3) HBV 感染ツパイ個体の全ゲノム解析を進め、SNPs と感染感受性、病態との関係の解析を進める。
- (4) 繁殖コロニーと持続感染モデルの作製を行い、垂直感染モデルの可能性を検討する。また、持続感染個体と持続感染不可の個体での免疫反応を比較検討する。
- (5) ツパイ馴化 HBV ウイルス株を樹立するため、HBV 各遺伝子型のクローンより培養細胞から感染源を作製する。HBV 感染キメラマウスの血清を感染源として、ツパイへの感染実験を行う。
- (6) 感染・発症評価系の改良を進める。
- (7) ツパイの TLR を初めとした自然免疫遺伝子のクローニングと蛋白発現系を構築する。
- (8) ツパイの B 型肝炎感染モデルにおいて TLR リガンドをはじめとした自然免疫活性化型アジュバントによる免疫療法、ワクチン療法の可能性を図る実験を行う。
- (9) DNA ウイルスに対する自然免疫応答の分子機構は十分には解明されていない。DDX60, Riplet, IPS-1, TLR3, TICAM-1, 新規分子 Luple の等のノックアウトマウスを用い、HBV 感染時に誘導される自然免疫応答機構を解明する。
- (10) DNA ウイルスに対する自然免疫応答に関与する遺伝子のクローニングとそれに対する siRNA を作製し、HBV 感染時の自然免疫応答を評価する実験系の確立を行う。
- (11) 従来の 21 塩基程度の siRNA と比較して長鎖 RNA (約 3000 塩基) である HBV cccDNA を標的とした TALEN の MEND への高効率パッケージング技術の確立を行う。
- (12) 樹立される HBV 感染ツパイにおいて、治療用核酸を搭載した最適化 MEND をもちいた治療実験を通じて、新規治療法の個体レベルでの検討を行い、ツパイの感染実験動物モデルとしての実証をおこなう。
- (13) 最適化 YSK-MEND の GMP 基準による大量製造法、製剤試験評価法の確立を図る。物性試験を通じて

品質管理された GMP 基準製造の YSK-MEND の大量製造を行い、前臨床試験への供給を目指す。

これらにより、HBV 感染ツパイの、新規抗ウイルス薬のスクリーニングや、長期的な肝線維化抑制試験などへの応用、新たなワクチンや治療薬投与時の免疫応答の評価系の確立をめざす。

## V. 行政施策への貢献の可能性

B 型肝炎に対する有効なワクチンや治療薬開発の基礎研究の推進に貢献し、新たなワクチンや治療薬、HBV 感染の新たな検査薬の開発に繋がり、より良い肝炎治療法の開発に繋がると期待される。B 型肝炎の病態の解明、予防法や治療法を確立するために有用な新たな小動物モデルの樹立により、診断や治療の新たなガイドライン策定に貢献する可能性が考えられる。

## VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

### (1) 研究代表者：小原道法

1. Satoshi Sekiguchi, Kiminori Kimura, Tomoko Chiyo, Takahiro Ohtsuki, Fumihiko Yasui, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Takaji Wakita, Masayuki Miyasaka, Kyosuke Mizuno, Kouji Matsushima and Michinori Kohara. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS ONE* (2012) in press.
2. Kazuaki Inoue, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Chiho Matsuda, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita, Shusuke Kuge, Makoto Yoshida and Michinori Kohara. Impairment of interferon regulatory factor-1 3 activation by hepatitis C virus core protein basic region 1. *BBRC* 428(4):494-499 (2012).
3. Yuichi Hirata, Kazutaka Ikeda, Masayuki Sudoh, Takuo Tsukuda, Asao Katsume, Yuko Aoki, Kunitada Shimotohno, Masahiro Nishijima, Ryo Taguchi, and Michinori Kohara. Self-enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis. *PLoS Pathog.* 2012

### (2) 研究代表分担者：保富康宏

1. Tajiri K., Imanaka-Yoshida K., Matsubara A., Tsujimura Y., Hiroe M., Aonuma K. and Yasutomi Y. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis. *J.Immunol* 2012;189:2043-2053.
2. Higashino A., Sakate R., Kameoka Y., Takahashi I., Hirata M., Yasutomi Y. and Osada N. Whole-genome sequencing and analysis of the Malaysian cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) genome. *Genome Biol.* 2012.
3. Tachibana S., Sullivan SA., Kawai S., Nakamura S., Goto N., Arisue N., Palacpac NMQ., Honma H., Yagi M., Tougan T., Katakai Y., Kaneko O., Mita T., Kita K., Yasutomi Y., Kim HR., Sutton PL., Shakhbatyan R., Horii T., Yasunaga T., Bamwell JW., Escalante AA., Carlton JM. And Tanabe K. *Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into *Plasmodium vivax* and the monkey malaria clade. *Nature Genetics* 2012; 44:1051-1055.

### (3) 研究代表分担者：小原恭子

1. Saito M, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Hepatitis C virus promotes expression of the 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\square$ 24-reductase through Sp1. *J Med Virol.* 84 (5): 733-346, 2012.
2. Kasama Y, Saito M, Nishimura T, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. *Virus Research* 163: 405-409, 2012.

### (4) 研究代表分担者：石井 健

1. Nakayama T, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) induced IgG1 and IgG4 antibody responses in young children. *Vaccine.* 2012 Dec 14;30(52):7662-6.
2. Tetsutani K, Ishii KJ. Adjuvants in influenza vaccines. *Vaccine.* 2012 Dec 14;30(52):7658-61.
3. Desmet CJ, Ishii KJ. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2012 Jun 22;12(7):479-91.

### (5) 研究代表分担者：押海裕之

1. Azuma M, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Cross-priming for antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C depends on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c(+)/CD8 $\alpha$ (+) dendritic cells. *Oncoimmunology.* 2012 Aug 1;1(5):581-592.
2. Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Role of ubiquitin ligase in innate immune response in mammal. *Seikagaku.* 2012 Jun;84(6):455-62.

### (6) 研究代表分担者：村上周子

1. Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsushashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- $\square$  in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut.*, 2012 Nov 7.
2. Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y, Murakami S, Attia FM, Khan A, Mizokami M. Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt. *J Med Virol.*, 84(4):587-95, 2012

### (7) 研究代表分担者：原島秀吉

1. Sato Y, Hatakeyama H, Sakurai Y, Akita H, Harashima H. A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity in vitro and in vivo. *J. Control. Release.* 163: 267-276 (2012).
2. 特許出願；出願番号：特願 2012-1195、発明者：原島秀吉、畠山浩人、佐藤悠介、兵藤守、櫻井遊、秋田英万、名称：脂質膜構造体に pH 依存性カチオン性を付与する剤、それにより pH 依存性カチオン性が付与された脂質膜構造体および脂質膜構造体の製造方法、出願日：2012 年 5 月 25 日

## VII. III (1 年間の研究成果)の概要図等

別添①

## ● 研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

1. 昭和48年4月 (財)日本ポリオ研究所 研究員 (ポリオウイルスの分子生物学的解析)
2. 昭和57年1月 北里大学薬学部公衆衛生学教室講座研究員 (ポリオウイルス遺伝子機能の解析)
3. 昭和59年5月 東京大学医学部細菌学教室受託研究員 (ポリオウイルス遺伝子機能の解析)
4. 平成元年4月 東燃、総合研究所、基礎研究所、免疫工学グループ・グループヘッド (C型肝炎ウイルスの分子生物学的解析)
5. 平成4年4月 東京都臨床医学総合研究所、微生物研究部門・室長 (C型肝炎ウイルスの分子生物学的解析)
6. 平成16年4月 東京都臨床医学総合研究所、部長、SARS, C型肝炎等感染症プロジェクト (現・感染制御プロジェクト)・プロジェクトリーダー (C型肝炎ウイルスの分子生物学的解析) プロジェクト制の導入に伴い部門名称の変更

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

1. 野本 明男：東京大学名誉教授、微生物科学研究所所長
2. 服部 信：東京都立駒込病院・元院長
3. 下遠野 邦忠：京都大学名誉教授、千葉工業大学客員教授
4. 溝上 雅史：国立国際医療研究センター、肝炎免疫研究センター長
5. 徳久剛史：千葉大学医学部教授
6. 宮村 達男：前国立感染症研究所所長
7. 脇田 隆宇：国立感染症研究所ウイルス二部部長

### ・主な研究課題

1. ポリオウイルスの神経病原性の研究 (ポリオウイルスの増殖機能と神経病原性が相関していることを示した)
2. ポリオウイルス生ワクチン株の全塩基配列の決定および病原性 発現遺伝子領域の研究 (弱毒及び強毒ポリオウイルス株の各遺伝子領域のキメラクローンを用いて神経毒力を担う領域を明らかにした。)
3. ポリオウイルスの複製と病原性発現に関する研究 (5'非翻訳領域の塩基変異による翻訳効率の変化が病原性の強さに関与していることを明らかにした。)
4. C型肝炎ウイルス遺伝子のクローニング及び遺伝子機能研究 (C型肝炎ウイルスは内部認識機構により翻訳が開始されること、および遺伝子群の解析からグループに分類し、それぞれの病原性が異なることを明らかにした。)
5. C型肝炎ウイルス粒子構造の解析と複製、病原性発現に関する研究 (免疫電顕法によりウイルス粒子を同定した。)
6. C型肝炎ウイルス遺伝子を発現したトランスジェニックマウスが肝炎肝がんを発症することを明らかにした。
7. HCVの複製にスフィンゴミエリンが重要であること、合成酵素阻害剤が治療薬として有望であることを明らかにした。)

### ・これまでの研究実績

1. *Satoshi Sekiguchi, Kiminori Kimura, Tomoko Chiyo, Takahiro Ohtsuki, Yoshimi Tobita, Yuko Tokunaga, Fumihiko Yasui, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Takaji Wakita, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Kyosuke Mizuno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Kouji Matsushima and Michinori Kohara. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. PLoS ONE (2012) in press.*
2. Tsunamasa Watanabe, Fuminaka Sugauchi, Yasuhito Tanaka, Kentaro Matsuura, Hiroshi Yatsunashi, Shuko Murakami, Sayuki Iijima, Etsuko Iio, Masaya Sugiyama, Takashi Shimada, Masakazu Kakuni, Michinori Kohara, Masashi Mizokami. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- $\alpha$  in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. Gut (2012) in press.

3. Fumihiko Yasui, Masayuki Sudoh, Masaaki Arai, Michinori Kohara. Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication. *J. Med. Virol.* (2012) in press.
4. Leiyun Weng, Xiao Tian, Yayi Gao, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Takaji Wakita, Michinori Kohara, Tetsuya Toyoda. Different mechanisms of hepatitis C virus RNA polymerase activation by cyclophilin A and B in vitro. *BBA - General Subjects* (2012) in press.
5. Jun Aoki, Yuka Kowazaki, Takahiro Ohtsuki, Rumiko Okamoto, Kazuteru Ohashi, Seishu Hayashi, Hisashi Sakamaki, Michinori Kohara and Kiminori Kimura. Kinetics of Peripheral Hepatitis B Virus-specific CD8+ T Cells in Patients with Onset of Viral Reactivation. *J. Gastroenterology* (2012) in press.
6. **Kazuaki Inoue, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Chiho Matsuda, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita, Shusuke Kuge, Makoto Yoshida and Michinori Kohara. Impairment of interferon regulatory factor-1 3 activation by hepatitis C virus core protein basic region 1. *BBRC 428(4):494-499 (2012).***
7. **Yuichi Hirata, Kazutaka Ikeda, Masayuki Sudoh, Akemi Suzuki, Yuko Tokunaga, Leiyun Weng, Masatoshi Ohta, Yoshimi Tobita, Ken Okano, Kazuhisa Ozeki, Kenichi Kawasaki, Takuo Tsukuda, Asao Katsume, Yuko Aoki, Takuya Umehara, Satoshi Sekiguchi, Tetsuya Toyoda, Kunitada Shimotohno, Tomoyoshi Soga, Masahiro Nishijima, Ryo Taguchi, and Michinori Kohara. Self-enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis. *PLoS Pathog.* 2012 Aug;8(8):e1002860. Epub 2012 Aug 16. (2012).**
8. Qiang Wang, Shijian Zhang, Hongbing Jiang, Jinalan Wang, Leiyun, Weng, Yingying Mao, Satoshi Sekiguchi, Fumihiko Yasui, Michinori Kohara, Philippe Buchy, Vincent Deubel, Ke Xu, Bing Sun and Tetsuya Toyoda. PA from an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus activates viral transcription and replication, and induces apoptosis and interferon expression. *Virology Journal* (2012) in press.
9. Naoko Kubota, Yasutaka Inayoshi, Naoko Satoh, Takashi Fukuda, Kenta Iwai, Hiroshi Tomoda, Michinori Kohara, Kazuhiro Kataoka, Akira Shimamoto, Yasuhiro Furuichi, Akio Nomoto, Akira Naganuma and Shusuke Kuge. HSC90 is required for nascent hepatitis C virus core protein stability in yeast cells. *FEBS letter* (2012) in press.
10. Hideyuki Konishi, Koichi Okamoto, Yusuke Ohmori, Hitoshi Yoshino, Hiroshi Ohmori, Motooki Ashiara, Yuichi Hirata, Atsunori Ohta, Hiroshi Sakamoto, Natsuko Hada, Asao Katsume, Michinori Kohara, Kazumi Morikawa, Takuo Tsukuda, Nobuo Shimma, Graham Foster, William Alazawi, Yuko Aoki, Mikio Arisawa, and Masayuki Sudoh. An orally available, small-molecule interferon inhibits hepatitis C virus replication. *Sci. Comm* 2: 259 : 1 – 9 (2012).
11. Leiyun Weng; Michinori Kohara; Takaji Wakita; Kunitada Shimotohno; Tetsuya Toyoda. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene* 496:79-87 (2012).
12. Makoto Saito, Michinori Kohara, Yuri Kasama and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus induces overexpression of 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 24-reductase through Sp1. *J. Med. Virol.* 84:733-746 (2012).
13. Yuri Kasama, Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Masaaki Satoh, Zhongzhi Wang, Nagla Elwy, Shinji Harada, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. *Virus Res.* 163: 405-409 (2012).
14. 発明の名称： 肝炎ウイルスの感染・増殖方法  
①発明者：小原道法、林仁寿、池谷武志  
②出願日：2012年7月4日  
③出願番号：特願 2012-150818  
④出願人：公益財団法人東京都医学総合研究所；株式会社トランスパレント  
⑤発明の内容の概略：HBV, HCV in vitro 3D培養系と感染増殖に関する



15. 発明の名称： ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベータートランスジェニックマウス  
①発明者：小原道法、寺社下 浩一、川瀬 洋介、向谷 知世、大下 浩樹、浜村 理子  
②出願日：2012年4月27日  
③出願番号：特願 2012-102814  
④出願人：(財)東京都医学総合研究所；中外製薬(株)；(株)フェニックスバイオ  
⑤発明の内容の概略：ヒト肝臓キメラマウス作成のための肝炎発症トランスジェニックマウスに関する
16. 発明の名称： 新型インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンタンパク質遺伝子が組み込まれた B5R 遺伝子欠損組換えワクシニアウイルス  
①発明者：小原道法、安井 文彦  
②出願日：2012年4月18日  
③出願番号：特願 2012-094872  
④出願人：(財)化学及血清療法研究所；(財)東京都医学総合研究所  
⑤発明の内容の概略：インフルエンザウイルス組換え B5R 遺伝子欠損ワクシニアウイルスに関する
17. Masaaki Satoh, Makoto Saito, Takashi Takano, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Yasumasa Nishito, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Masayuki Sudo, Chieko Kai, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1. *J Infect Dis.* 204(8):1172-80 (2011).
18. Tomoko Chiyo, Satoshi Sekiguchi, Masahiro Hayashi, Yoshimi Tobita, Yumi Kanegae, Izumu Saito, and Michinori Kohara. Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice. *Virus Res.* 160(1-2):89-97 (2011).
19. Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masahiro Hayashi, Yuichi Hirata, Masaaki Satoh, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Masayuki Sudo, and Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology* 55(3):512-21 (2011)
20. Kiminori Kimura, Michinori Kohara. *Frontiers of Model Animals for Human Diseases. Experimental Animals* 60(2), 93-100 (2011).
21. Takashi Takano, Michinori Kohara, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Makoto Saito, Chieko Kai, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J. Med. Virol.* 83:801-809 (2011).
22. Kiminori kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* 89:433-442 (2011).
23. Masaaki Arai, Hidenori Suzuki, Yoshimi Tobita, Asako Takagi, Koichi Okamoto, Atsunori Ohta, Masayuki Sudoh, Kunitada Shimotohno, Michinori Kohara. Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. *Arch. Virol.* 156:295-304 (2011).
24. Kayo Yoshikawa, Aya Ogata, Chiho Matsuda, Michinori Kohara, Hideo Iba, Yukio Kitade, Yoshihito Ueno. Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance. *Bioconjugate Chemistry* 22:42-49 (2011).
25. 発明の名称： バイオアッセイ用プレート及びアッセイ方法  
①発明者：高井 まどか、福島 達郎、小原道法  
②出願日：2011年12月8日  
③出願番号：特願 2011-268549  
④出願人：東京大学；(財)東京都医学総合研究所  
⑤発明の内容の概略：微量高感度測定系に関する

26. 発明の名称： 抗インフルエンザウイルス活性を有するペプチド

①発明者：小原道法、佐々木 亨、パトリック・リード

②出願日：2011年9月27日

③出願番号：特願 2011-211100

④出願人：財団法人東京都医学総合研究所、ペプチドリーム株式会社

⑤発明の内容の概略：抗インフルエンザウイルス活性を有する特殊環状ペプチド等に関する

27. 発明の名称： 新型インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンタンパク質遺伝子を有する DI<sub>s</sub> 株由来組換えワクシニアウイルス

①発明者：小原道法、安井 文彦、喜田 宏、迫田 義博、石井 孝司

②出願日：2011年8月31日

③出願番号：特願 2011-189251

④出願人：(財)東京都医学総合研究所；北海道大学；国立感染症研究所長；(財)化学及血清療法研究所

⑤発明の内容の概略：インフルエンザウイルスワクチンに関する

28. Leiyun Weng, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Ying He, Jin Zhong, Tetsuya Toyoda. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype specific manner. J. Virol. 84(22):11761-70 (2010).

29. Hideko Nuriya, Kazuaki Inoue, Takeshi Tanaka, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Kyosuke Kaji, Seishu Hayashi, Shuichi Kaneko and Michinori Kohara. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based *in situ* hybridization. J. Clin. Microbiol. 48(11):3843-3851 (2010).

30. Yuri Kasama, Satoshi Sekiguchi, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Masaaki Satoh, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Motohiro Takeya, Yoichi Hiasa, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas *in vivo*. Blood 116(23):4926-4933 (2010).

31. Kenichi Satoh, Hiroki Takahashi, Chiho Matsuda, Takuya Umehara, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Mikio Zeniya and Michinori Kohara. Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. J. Med. Virol. 82(9):1545-1553 (2010).

32. Masaaki Satoh, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Sumako Iwanaga, Salem Nagla Elwy Salem Ali, Takahiro Seki, Seiji Okada, Michinori Kohara, Shinji Harada, Chieko Kai, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. Dec;33(6):e81-8 (2010).

33. Chen Y-Z, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, and Nishimura Y. Identification of SARS-COV spike protein-derived and HLA-A2-restricted human CTL epitopes by using a new muramyl dipeptidederivative adjuvant. International Journal of Immunopathology and Pharmacology 23(1):165-77 (2010).

34. Yutaka Amako, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Yuichi Hirata, Satoshi Sekiguchi, Yoshimi Tobita, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Hiromichi Yonekawa and Michinori Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* J. Virology 84(1):303-311 (2010).

35. 発明の名称： 新型インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンタンパク質遺伝子を有する組換えワクシニアウイルス

①発明者：小原道法、安井文彦、迫田義博、喜田宏、村上利夫

②出願日：2010年10月15日

③出願番号：特願 2010-233064

④出願人：(財)東京都医学研究機構、国立大学法人 北海道大学、(財)化学及血清療法研究所

⑤発明の内容の概略：感染予防及び治療効果を示すインフルエンザウイルス HA 遺伝子を有する組換えワクシニアウイルス

19. 発明の名称：) 難治性ウイルス感染症の治療剤

①発明者：小原道法、中川慎一郎

②出願日：2010年9月9日

③出願番号：特願2010-202355④出願人：(財)東京都医学研究機構

⑤発明の内容の概略：インターフェロン $\lambda$ を誘導して非常に強い抗HCV, HBV活性を示す、カチオニッククリポソーム製剤

36. 発明の名称：RRM2のアンタゴニストを有効成分として含有するC型肝炎治療剤

①発明者：小原道法、小原恭子、佐藤正明、須藤正幸

②出願日：2010年8月12日

③出願番号：特願2010-180981

④出願人：中外製薬株式会社、(財)東京都医学研究機構、国立大学法人 熊本大学

⑤発明の内容の概略：C型肝炎ウイルス複製に必須な宿主因子RRM2に対する阻害剤

37. Tomohiro Nishimura, Michinori Kohara, Kosuke Izumi, Yuri Kasama, Yuichi Hirata, Ying Huang, Masahiro Shuda, Hideko Nuriya, Yuko Tokunaga, Masaaki Sato, Makoto Saito, Chieko Kai and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus impairs P53 via persistent over-expression of 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 24-reductase. J. Biol. Chem. 284(52):36442-36452 (2009).

38. Uto H, Stuver SO, Hayashi K, Kumagai K, Sasaki F, Kanmura S, Numata M, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Kohara M, Tsubouchi H. Increased rate of death related to presence of viremia among hepatitis C virus antibody-positive subjects in a community-based cohort study. Hepatology. Aug;50(2):393-9. (2009)

39. Keigo Machida, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Eiji Seike, Shigenobu Tóne, Yukiko Hayashi, Yuri Kasama, Masumi Shimizu, Hidemi Takahashi, Chyoji Taya, Hiromichi Yonekawa, Nobuyuki Tanaka, and Michinori Kohara. Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins. Gastroenterology 137(1):285-96. (2009).

40. Leiyun Weng, Jiamu Du, Jingling Zhou, Jianping Ding, Takaji Wakita, Michinori Kohara, Tetsuya Toyoda. Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain. Arch Virol. 154(5):765-773. (2009).

41. Yoshihito Ueno, Yuuji Watanabe, Aya Shibata, Kayo Yoshikawa, Takashi Takano, Michinori Kohara, Yukio Kitade. Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing universal overhangs. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 17(5):1974-81. (2009).

42. 発明の名称：抗C型肝炎ウイルス効果を有するベンゾフラン誘導体

①発明者：小原道法、安井文彦、須藤正幸

②出願日：2009年4月8日

③出願番号：特願2009-93608

④出願人：中外製薬株式会社、財団法人東京都医学研究機構

⑤発明の内容の概略：C型肝炎ウイルスの複製を阻害する抗酸化剤

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

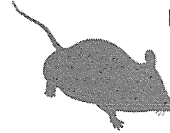
- ・東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト  
プロジェクトリーダー 小原 道法
- ・独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医学研究センター  
センター長 保富 康宏
- ・鹿児島大学共同獣医学部・越境性動物疾病制御研究センター  
教授・センター長 小原 恭子
- ・独立行政法人医薬基盤研究所・免疫学  
プロジェクトリーダー 石井 健
- ・北海道大学大学院・医学研究科  
講師 押海 裕之
- ・公立大学法人名古屋市長立大学院医学研究科  
助教 村上 周子
- ・北海道大学大学院薬学研究院  
教授 原島 秀吉

既存のHBV感染感受性動物モデル



チンパンジー

- HBV感染実験に最適の動物モデル。
- 動物愛護の観点から、実験動物としての使用ができなくなった。



ヒト肝臓キメラマウス

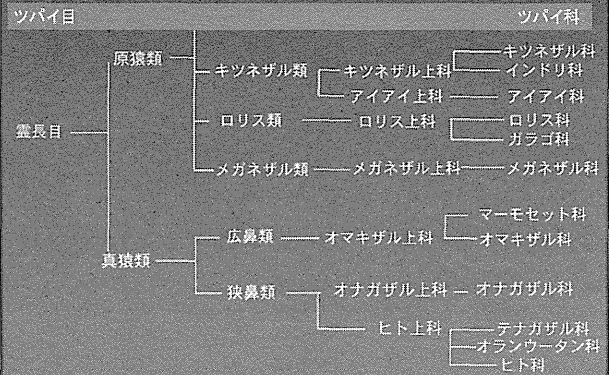
- ヒトの肝臓組織を持つマウス。HBVが効率よく感染。
- 獲得免疫系が機能しておらず、免疫実験動物モデルとしては不適。

ツパイ(ツパイ目ツパイ科)



HCVに感染感受性を示し、肝硬変や肝がんを発症する。

ツパイの分類



ツパイのHCV感染病態モデルを確立した

inoculation of HCV  
1. HCR6 (GH patient serum)  
2. Reconstituted clonal virus

Monitor  
- serum ALT concentration  
- HCV RNA  
(Quantitative real-time RT-PCR)  
- Anti-HCV Ab (ELISA)

1 year 2 years 3 years  
Liver Biopsy Blood sampling  
Tupaia belangeri

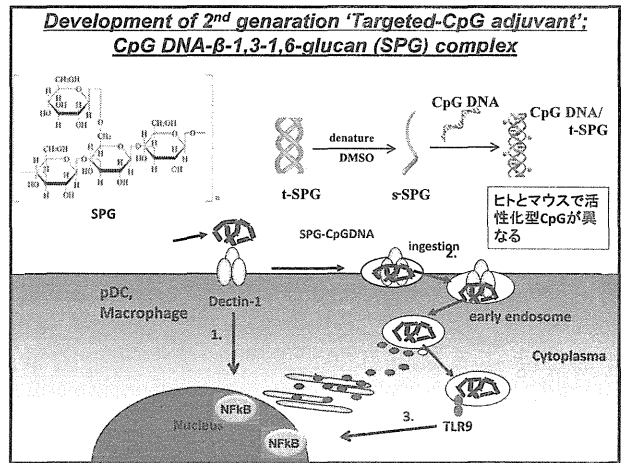
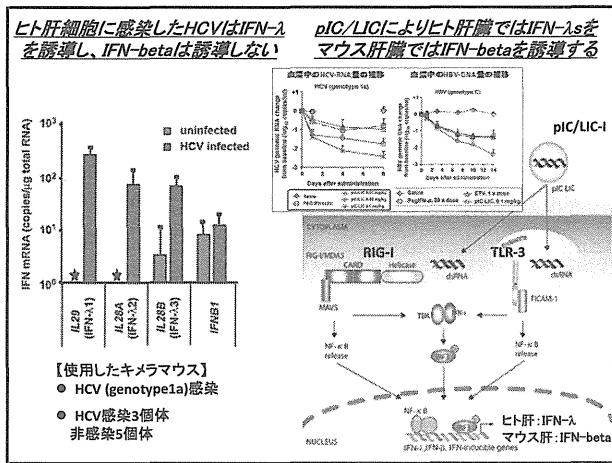
正常 肝硬変 肝腫瘍 (J Virology 84 303-311, 2010)

(Nature 474 S14-15, 2011) ツパイ(ツパイ科ツパイ目)

The murine candidate

Since it is the first time that a murine has been reported to be a candidate for HCV infection, we have investigated the possibility of HCV infection in the murine candidate.

THE TUPAIA OF THE SISKIYOU



**ツパイ(ツパイ科ツパイ目)**

HCVに感染感受性を示し、肝硬変や肝がんを発症する。さらに、HBVにも感染感受性を示す。  
 (Hepatology1996,24,1-5, Hepatology2005,41,247-56.)

体重100グラムと小型なので多数個体の取り扱いが容易である

**ツパイの解決すべき課題**

1. 実験動物としての研究は、ほとんど進んでいない。とりわけ、その免疫系の仕組みに関する知見は少ない。
2. 感染感受性に個体差があり、治療薬評価系として使いにくい。

**本研究の目的**

1. ツパイ免疫系解析システムの開発
2. 高感受性HBV-ツパイ感染実験系の確立

↓

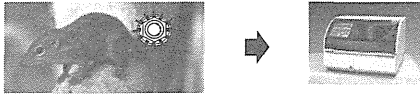
1. HBV感染に対する病態及び免疫応答の解明
2. ツパイを用いたHBV治療効果判定法を確立し、非臨床試験への応用

**1. 免疫系解析システムの確立・免疫応答の解明**

- ツパイ全ゲノム解析 (55%終了 (2月95%終了))
- ゲノム情報に基づく免疫関連遺伝子の同定
- 同定した遺伝子に基づくペプチド抗体群、cDNAライブラリーを構築
- 免疫系解析システムの確立 (FACS、サイトカイン定量系を樹立)
- HBV感染ツパイの免疫応答の解明

## 2. 高感受性HBV-ツパイ感染実験系の確立

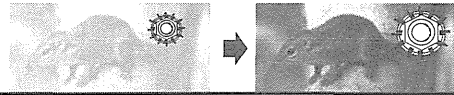
- 感染方法と感染・発症評価系の確立



- ツパイ高増殖性HBV株の樹立

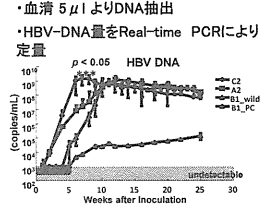


- HBV高感受性ツパイの確立



## ツパイ発症評価系の確立・高増殖性HBV株の作出

1. 微量HBV-DNA量の評価

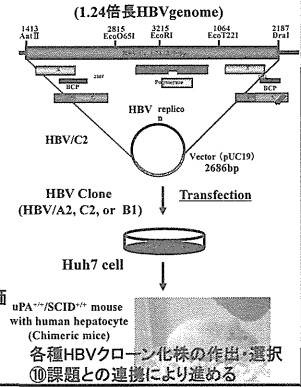


2. 肝臓中cccHBV-DNA量の評価

・HBV-cccDNA量をReal-time PCRにより正確に評価

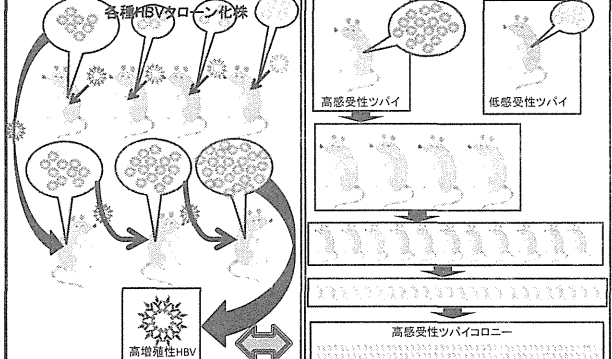
3. 微量血清中各種マーカー量の評価
- ヒト肝細胞キメラマウスにおけるHBV感染実験において微量サンプルからのHBs抗原、HBe抗原、ALT等の測定を行った実績がある

4. 血清中HBV株のクローン化



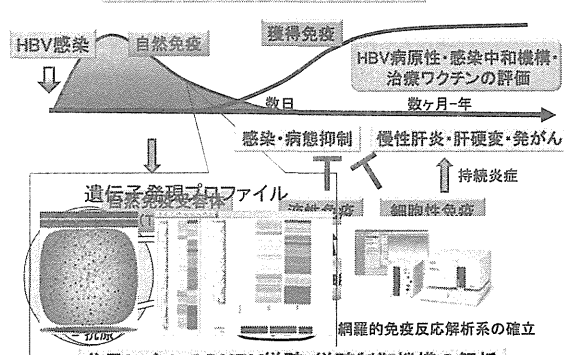
## 高感受性HBV-ツパイ感染系の確立

- ツパイ高増殖性ウイルスの樹立



## ツパイでのHBV病原性・免疫反応解析

### 個体レベルでの病態・免疫応答解析



## ツパイ全ゲノム解析のストラテジー

● 作業プロセス

Genome Characteristics	Common Genome	Complex Genome
Chromosome position	Insertion at homologous region	Heterologous region by polymerase
Nucleic acid length	<math>\pm 0.5\%</math>	> 0.5%
GC content	35% - 45%	> 50% or < 20%
Repeat number	<math>\pm 5\%</math>	> 50%

Strategy for Common Genomes



Strategy for Complex Genomes



© 2011

## CD81

c型肝炎ウイルスレセプター

ヒトとツパイの分子相同性: 227 / 236 (96%)

ヒトとマウスの分子相同性: 217/236 (91%)

Human	1	MGVVGCTKCIKYLLEFVFNFWFLAGK	ILGVALWLRHDPQTNNLVLLELGD	PAPEPTFYV	60
Tupaia	1	MGVVGCTKCIKYLLEFVFNFWFLAGV	ILGVALWLRHDPQTNNLVLLELGD	PAPEPTFYV	60
Human	61	GIYILIAVAVMMFVGLGCGYAIQBSCLL	GGFTTCLVILFACVAAAGVGFVNDQIA		120
Tupaia	61	GIYILIAVAVMMFVGLGCGYAIQBSCLL	GGFTTCLVILFACVAAAGVGFVNDQIA		120
Human	121	KDVKQFYDQALQAVVDDDEANNAKAVVKT	FHETLNCCGSGTLEPLTTSVLKNNLCP	SGSN	180
Tupaia	121	KDVKQFYDQALQAVVDDDEANNAKAVVKT	FHETLDCGSGSTLEPLTTSVLKNNLCP	SGSN	180
Human	181	VISNLFKEDCHQKIDDLFSGKLYLGIAAIV	VAVIMIFEMILSMVLC	CGIRNSVY	236
Tupaia	181	IISNLFKEDCHQKIDDLFSGKLYLGIAAIV	VAVIMIFEMILSMVLC	CGIRNSVY	236