

- 研究セミナー、東京、12月9日、2013
7. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Takashi Motomura, Mai Shiokawa, Chikako Ono, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. The American Society for Virology, 32nd Annual Meeting, University of Pennsylvania, University Park, July 20-24, 2013.
 8. Toru Okamoto, Yukari Sugiyama, Chikako Ono, Sayaka Aizawa, Pham Duc Ngoc, Takahisa Kohwaki, Eiji Hirooka, Takasuke Fukuhara, Masahiro Yamamoto, Yoshiharu Matsuura, Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
 9. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Masami Wada, Chikako Ono, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
 10. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
 11. 福原 崇介、塩川 舞、小野 慎子、山本 聡美、和田 真実、岡本 徹、野田 健司、吉森 保、松浦 善治、HCV 感染により誘導されるオートファジーの性状、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、11 月 10 日-12 日、2013
 12. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、山本聡美、和田真実、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、miR-122 ノックアウト Huh7 細胞における HCV 増殖、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、11 月 10 日-12 日、2013
 13. 和田真実、福原崇介、山本聡美、塩川舞、小野慎子、岡本徹、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの粒子産生における VLDL 関連タンパク質の役割、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、11 月 10 日-12 日、2013
 14. 山本聡美、福原崇介、塩川 舞、小野慎子、岡本 徹、松浦善治、B 型肝炎ウイルスの増殖に関与する宿主因子の解析、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、11 月 10 日-12 日、2013

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

in vitro、*in vivo* HBV 感染・複製系を用いたヒト肝細胞内免疫応答の解析

分担研究者：氏名 柘植 雅貴

所属 広島大学自然科学研究支援開発センター・助教

研究要旨：

本研究では、HBV がヒトの生体内で免疫寛容を誘導し、持続感染を成立させるメカニズムを解明するため、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HBV の直接的な作用によるヒト肝細胞内遺伝子発現の変化を解析する。HBV 感染 3 日後、10 日後、8 週後の HBV 感染キメラマウス肝よりヒト肝細胞を採取。採取したヒト肝細胞内の total RNA を抽出後、次世代シーケンサー（Illumina HiSeq™ 2000）にて遺伝子発現プロファイルを作成した。HBV 感染 8 週間後のヒト肝細胞内では、137 遺伝子の発現亢進と 18 遺伝子の発現抑制が確認された。パスウェイ解析では、免疫応答に関連する複数のパスウェイが抽出され、HBV 感染に伴い、ヒト肝細胞内で免疫応答が惹起されていることが示された。発現亢進した上位 20 遺伝子について、cDNA マイクとアレイデータと比較したところ、発現情報の得られた 16 遺伝子中 15 遺伝子において、再現性が確認でき、次世代シーケンサーの再現性が高いことが示された。現在、発現変化の大きかった上位遺伝子について、HBV 感染との関連性を検討中であり、メカニズムの解明により、新たな HBV 治療薬の開発の手掛かりとなりうると考える。

A. 研究目的

マウスの肝臓が高度にヒト肝細胞へと置換されたヒト肝細胞キメラマウスが開発により、B 型肝炎ウイルス（HBV）持続感染マウスの作製が可能となり、*in vitro* HBV 複製系とともに、HBV の感染・増殖メカニズムを解明するための有用な *in vivo* モデルとして注目されている。このヒト肝細胞キメラマウスは、90%以上のマウス肝組織がヒト肝細胞に置換されており、免疫不全マウス由来であることから、HBV 感染後も肝炎の発症はなく、HBV が感染・増殖することにより、直接的にヒ

ト肝細胞に及ぼす影響を解析することが可能である。

本研究では、HBV が感染した後に起こる肝細胞内の遺伝子変化を次世代シーケンサーを用いて解析し、HBV が免疫寛容を獲得し、持続感染を生じるメカニズムを解析する。さらに、これらの解析結果を以前に当研究室で行った cDNA マイクロアレイデータと比較し、本研究の再現性を確認する。

B. 研究方法

検討 1：HBV 感染マウスの作製と次世代シーケンサー解析

昨年度報告したように、90%以上のマウス肝組織がヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスに HBV genotype C 感染患者血清を接種し、HBV 感染マウスを作製（各群 N=4）。非感染マウスおよび HBV 感染 3 日後、10 日後、8 週後の HBV 感染マウスを sacrifice し、マウス肝組織より、ヒト肝細胞採取し、total RNA を抽出した。その後、mRNA の網羅的解析を行うため、ペアエンド法を用いた次世代シーケンサー（HiSeq2000）によるシーケンス解析を施行した。

検討 2: 次世代シーケンサーと cDNA マイクロアレイによる解析結果の比較

これまでに当研究室では、Agilent 社 Whole Human Genome 4x44K を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行い、HBV によるヒト肝細胞での遺伝子発現への影響について報告してきた。そこで、さらに高感度となった次世代シーケンサーによる解析結果との比較を行い、解析の再現性について検討した。

（倫理面への配慮）

患者血清の使用に際し、疫学研究に関する倫理指針に従った研究計画書を作成し、当大学での審査を受けている。また、十分なインフォームドコンセントの後患者血清を採取し、匿名化された状態で凍結保存している。また、遺伝子組換え実験に関しては、当大学での機関承認実験（24-137）および文部科学省での大臣確認実験（23 受文科振第 2212 号、25 受文科振第 183 号）として第二種使用等拡散防止措置確認を受け、研究を行っている。

C. 研究結果

検討 1: HBV 感染マウスの作製と次世代シーケンサー解析

ヒト肝細胞キメラマウス 12 頭に対

し、HBV 感染患者血清を接種したところ、感染 10 日後、8 週後のマウス血中 HBV DNA 量は、それぞれ 5 Log copies/ml、10 Log copies/ml 程度にまで上昇し、キメラマウスへの HBV 感染が確認された。そこで、これらのマウス肝組織より、ヒト肝細胞を採取し、次世代シーケンサーにて網羅的遺伝子発現プロファイルの作成を行った。68,818 遺伝子の発現プロファイルより、非感染マウスと HBV 感染 8 週後のマウスとの 2 群間で、有意に発現が変化した遺伝子を抽出したところ、HBV 感染により有意に発現制御された遺伝子として、155 遺伝子（発現亢進：137、発現抑制：18）が抽出された。

図1. HBV感染8週目に有意な発現変化を認めた遺伝子によるクラスター解析

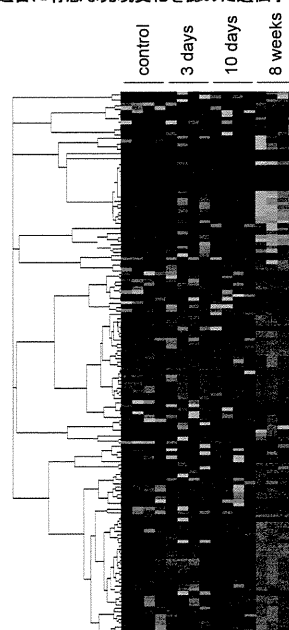


図 1 に示すように、155 遺伝子のクラスター解析では、非感染マウス、感染 10 日目のマウスに比して、8 週目のマウスにおいて遺伝子発現量が大きく変化していることが考えられた。一方、感染 3 日目のマウスでは、個体差が大きく、特徴的な発現変化は認められなかった。

そこで、これら 155 遺伝子が関与するパスウェイについて検討を行ったところ、表 1 に示すように、Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031) や Toll receptor signaling pathway (P00054) といった免疫応答に関与するパスウェイが強く制御されていることが示された。

表1. HBV感染により影響を受けるPathwayの解析
(analyzed by PANTHER)

Pathway	Numbers of genes	Ratio
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)	7	5.10%
Gonadotropin releasing hormone receptor pathway (P06664)	5	3.70%
Apoptosis signaling pathway (P00006)	4	2.90%
Integrin signalling pathway (P00034)	4	2.90%
p53 pathway (P00059)	3	2.20%
Huntington disease (P00029)	2	1.50%
Toll receptor signaling pathway (P00054)	2	1.50%
T cell activation (P00053)	2	1.50%
Angiogenesis (P00005)	1	0.70%
Interleukin signaling pathway (P00036)	1	0.70%
Alzheimer disease-presenilin pathway (P00004)	1	0.70%
Interferon-gamma signaling pathway (P00035)	1	0.70%
Nicotine degradation (P05914)	1	0.70%
Dopamine receptor mediated signaling pathway (P05912)	1	0.70%
p53 pathway by glucose deprivation (P04397)	1	0.70%
Parkinson disease (P00049)	1	0.70%
PDGF signaling pathway (P00047)	1	0.70%
Nicotine pharmacodynamics pathway (P06587)	1	0.70%
Notch signaling pathway (P00045)	1	0.70%
B cell activation (P00010)	1	0.70%
Fructose galactose metabolism (P02744)	1	0.70%
Transcription regulation by bZIP transcription factor (P00055)	1	0.70%
Glycolysis (P00024)	1	0.70%
General transcription regulation (P00023)	1	0.70%
TGF-beta signaling pathway (P00052)	1	0.70%
Ascorbate degradation (P02729)	1	0.70%
TCA cycle (P00051)	1	0.70%

Total genes: 136 genes, Pathway hits: 48

検討 2: 次世代シーケンサーと cDNA マイクロアレイによる解析結果の比較

以前、当研究室では、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HBV 感染に伴うヒト肝細胞内の遺伝子発現変化について報告した (Tsuge M, et al. Journal of Infectious Diseases, 2011)。そこで、本研究で施行した次世代シーケンサーの結果と cDNA マイクロアレイの結果を比較し、再現性を確認した。次世代シーケンサー解析にて発現亢進が認められた上位 20 遺伝子について、比較を行ったところ、発現プロファイルが確認可能であった 16 遺伝子中 15 遺伝子は cDNA マイクロアレイにおいても発現亢進が確認された (表 2)。

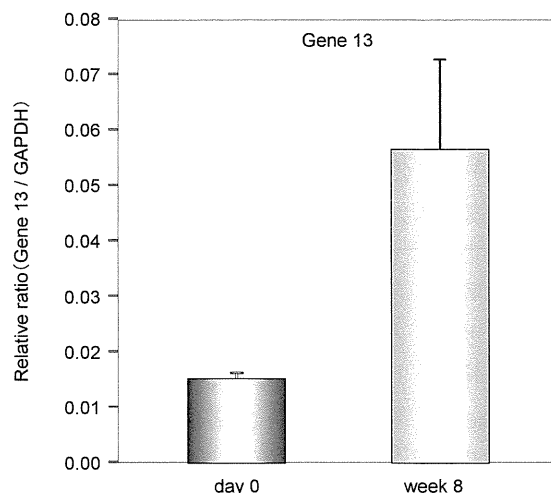
遺伝子 13 のみ、cDNA マイクロアレイによる再現性が確認できなかったため、リアルタイム PCR にて mRNA

発現を確認した結果、次世代シーケンサーの結果と同様、有意な発現亢進が確認された (図 2)。

表2. HBV感染8週目に発現上昇を認めた上位20遺伝子

Gene symbol	chr	Gene expression		Ratio (HBV_8w/Control)	マイクロアレイデータ
		control	HBV_8w		
Gene 1	chr4	0.15	69.99	439.59	Undet.
Gene 2	chr17	0.17	70.33	418.77	6.00
Gene 3	chr4	0.06	9.77	171.25	11.73
Gene 4	chr15	0.06	6.47	114.56	5.98
Gene 5	chr2	0.84	51.88	82.14	4.30
Gene 6	chr1	0.01	1.06	81.57	Undet.
Gene 7	chr11	0.67	28.15	57.28	4.49
Gene 8	chr1	0.02	2.10	33.82	Undet.
Gene 9	chr11	1.62	43.21	24.25	1.78
Gene 10	chr11	0.03	1.08	23.10	3.08
Gene 11	chr9	0.06	2.05	22.32	3.28
Gene 12	chr1	0.35	5.59	15.45	1.59
Gene 13	chr1	0.24	2.59	14.03	0.56
Gene 14	chr9	0.04	0.49	13.93	7.64
Gene 15	chr11	8.51	99.56	12.55	3.81
Gene 16	chr11	0.04	0.50	11.88	Undet.
Gene 17	chr14	0.19	2.30	11.16	2.63
Gene 18	chr5	0.28	3.06	10.56	1.53
Gene 19	chr8	0.17	1.73	10.20	8.98
Gene 20	chr19	2.31	22.81	10.06	4.76

図2. real time PCRによるヒト肝細胞内の遺伝子発現確認



D. 考察

本研究は、HBV 感染に伴うヒト肝細胞の遺伝子発現変化について、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて行った。ヒト肝細胞キメラマウスは、免疫不全マウス由来であることから、HBV 感染に伴う肝炎の発症はなく、肝細胞内の遺伝子発現変化を観察することにより、HBV 感染に伴う直接的なヒト肝細胞への影響を観察することが可能と考えられる。今回行った次世代シーケンサー解析の結果、ヒト肝細胞では、HBV 感染に伴い、155 の遺伝子が発現制御された。特に、パスウェイ解析の結果 (表 1) に見られるように、ヒト肝細胞内では、Inflammation mediated

by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031) や Toll receptor signaling pathway (P00054) といった免疫応答に關与するパスウェイが強く影響を受けており、ヒト肝細胞内において複雑な免疫反応が生じていると考えられた。

一方、次世代シーケンサーより得られた遺伝子発現プロファイル解析により、有意に発現亢進した上位 20 遺伝子について、cDNA マイクロアレイ解析で得られた遺伝子発現プロファイルと比較したところ、20 遺伝子中 15 遺伝子において、同様の発現亢進が確認された。一方で、4 遺伝子においては、cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現が確認できなかった。これらの遺伝子は、低発現量であるために cDNA マイクロアレイでは検出できなかった可能性もあり、次世代シーケンサーがより高感度に遺伝子発現変化を検出できる可能性を示しているものと考えられた。また、次世代シーケンサーと cDNA マイクロアレイの結果が相反した gene 13 においても、real time PCR の結果、次世代シーケンサーの結果を再現した結果であり、次世代シーケンサーの再現性の高さを示した結果となった。

現在、次世代シーケンサーにて抽出された遺伝子に關し、HBV 増殖との関連性を解析中であり、今後、HBV が肝細胞内での免疫応答を回避するメカニズムの解明を目指す予定である。

E. 結論

HBV 感染後、HBV の直接的な作用により、ヒト肝細胞内で多くの遺伝子、特に免疫応答に關与する遺伝子が発現制御されていることが示された。抽出された遺伝子の中には、HBV 感染との関連性が十分に明らかとなっていない遺伝子が多く含まれており、HBV 感染と遺伝子発現制御のメカニズムを解明することにより、新たな作用点

からの HBV 治療の開発が期待できる。

F. 健康危険情報

本研究は、保存血清およびマウス、培養細胞株を用いた検討であり、患者に健康被害を与える可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masaki K, Takaki S, Hyogo H, Kobayashi T, Fukuhara T, Naeshiro N, Honda Y, Nakahara T, Ohno A, Miyaki D, Murakami E, Nagaoki Y, Kawaoka T, Tsuge M, Hiraga N, Hiramatsu A, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Takahashi S, Arihiro K. and Chayama K, Utility of controlled attenuation parameter measurement for assessing liver steatosis in Japanese patients with chronic liver diseases. *Hepatol Res*, 2013.
- 2) Tsuge M, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Hiraga N, Takahashi S, Ochi H, Nelson Hayes C, Ginba H, Matsuyama K, Kawakami H. and Chayama K, Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol*, 2013. 48(10): p. 1188-204.
- 3) Tsuge M. and Chayama K, Availability of monitoring serum HBV DNA plus RNA during nucleot(s)ide analogue therapy. *J Gastroenterol*, 2013. 48(6): p. 779-80.
- 4) Naeshiro N, Kakizawa H, Aikata H, Kan H, Fujino H, Fukuhara T, Kobayashi T, Honda Y, Miyaki D, Kawaoka T, Tsuge M, Hiramatsu A, Imamura M, Kawakami Y, Hyogo H, Ishikawa M, Awai K. and Chayama K, Percutaneous transvenous embolization for portosystemic shunts associated with encephalopathy: Long-term outcomes in 14 patients. *Hepatol Res*, 2013.

- 5) Ohishi W, Cologne J.B, Fujiwara S, Suzuki G, Hayashi T, Niwa Y, Akahoshi M, Ueda K, Tsuge M. and Chayama K, Serum interleukin-6 associated with hepatocellular carcinoma risk: A nested case-control study. *Int J Cancer*, 2013.
- 6) Arataki K, Hayes C.N, Akamatsu S, Akiyama R, Abe H, Tsuge M., Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W. and Chayama K, Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol*, 2013. 85(5): p. 789-98.
- 7) Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M., Abe H, Hayes C.N, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T. and Chayama K, A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013.
- 8) 柘植雅貴、茶山一彰「HBVの感染実験系」*Hepatology Practice* 第1巻 B型肝炎の診療を極める、文光堂、185-192、2013
- 9) 柘植雅貴、茶山一彰「B型肝炎、D型肝炎」カラー版 *消化器病学*、西村書店、1150-1155、2013
- 2.学会発表
- 1) 占部綾子、柘植雅貴、茶山一彰「当院におけるB型急性肝炎の解析」第40回日本肝臓学会西部会 ワークショップ
- 2) Masataka Tsuge, Eisuke Murakami, Michio Imamura, Hiromi Abe, Daiki Miki, Nobuhiko Hiraga, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiroyuki Ginba, Kazuhiro Matsuyama, Hiroiku Kawakami, Kazuaki Chayama. Monitoring serum HBV RNA is useful for predicting rebound of hepatitis after the discontinuation of nucleotide analogue therapy in chronic hepatitis B patients. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2013) ポスター
- 3) Eisuke Murakami, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Tomokazu Kawaoka, Atsushi Ohno, Takashi Nakahara, Daiki Miki, Hiromi Abe, Michio Imamura, Hiroshi Aikata, Hidenori Ochi, C Nelson Hayes, Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato, Kazuaki Chayama. Antiviral effect of tenofovir disoproxil fumarate on drug-resistant HBV clones and different susceptibility between HBV genotype A and C. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2013) ポスター
- 4) Nami Mori, Masataka Tsuge, Yoshiiku Kawakami, Hiroiku Kawakami, Kazuaki Chayama. Th1/2 ratio was associated with anti-viral effects of sequential therapy with lamivudine and interferon- α in HBe antigen-positive chronic hepatitis B patients. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2013) ポスター
- 5) 柘植雅貴、村上英介、茶山一彰「薬剤耐性HBVに対するテノホビル抗ウイルス効果と genotype による相違」第17回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション
- 6) 村上英介、柘植雅貴、菅 宏美、藤野初江、小林知樹、福原崇之、梶木慶一、大野敦司、苗代典昭、中原隆志、本田洋士、宮木大輔、占部綾子、横山聡榮、河岡友和、三木大樹、平賀伸彦、平松 憲、今村道雄、兵庫秀幸、川上由育、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰「当

院における核酸アナログ製剤の治療効果の解析」第17回日本肝臓学会大会 ポスター

第99回日本消化器病学会総会、一般演題

7) 柘植 雅貴、村上英介、平賀 伸彦、阿部弘美、今村 道雄、茶山 一彰
「薬剤耐性 HBV に対する核酸アナログ製剤の抗ウイルス効果の検討と genotype による相違」第9回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム

H. 知的財産権の出願・登録状況
(※予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

8) 柘植雅貴、高橋祥一、茶山一彰
「HBV 感染に伴うヒト肝細胞内免疫応答の変化」第49回日本肝臓学会総会 シンポジウム

9) 村上英介、柘植雅貴、平賀伸彦、阿部弘美、大野敦司、本田洋士、河岡友和、三木大樹、今村道雄、相方 浩、高橋祥一、越智秀典、茶山一彰「薬剤耐性 B 型肝炎ウイルスに対するテノホビルの抗ウイルス効果の検討」第49回日本肝臓学会総会 一般演題

10) 柘植雅貴、平賀伸彦、今村道雄、越智秀典、高橋祥一、茶山一彰「ヒト肝細胞キメラマウスを用いた HBV・HCV 感染に伴うヒト肝細胞内遺伝子発現変化の解析」第50回日本臨床分子医学会 ポスター

11) 村上英介、柘植雅貴、大野敦司、本田洋士、河岡友和、三木大樹、平賀伸彦、今村道雄、相方 浩、高橋祥一、越智秀典、茶山一彰「薬剤耐性 B 型肝炎ウイルスに対するテノホビルの抗ウイルス効果と Genotype による相違の検討」第99回日本消化器病学会総会、一般演題

12) 柘植雅貴、森 奈美、村上英介、相坂康之、吉良臣介、河岡友和、高木慎太郎、平松 憲、今村道雄、兵庫秀幸、川上由育、相方 浩、高橋祥一、茶山一彰「悪性腫瘍に対する化学療法施行により HBV 再活性化を来した 33 症例の検討」

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

分担研究者：渡邊綱正

分担研究課題：HBV ジェノタイプ別 IFN シグナル阻害効果の検討

研究要旨：我が国には従来存在するB型肝炎ウイルス(HBV)の主要な株である遺伝子型Bおよび遺伝子型Cに加えて最近増加傾向にある遺伝子型Aが存在する。HBV遺伝子型ごとに病態の違いや治療効果の差が報告されているが、昨年度、ヒト肝臓置換キメラマウスを用いた検討により *in vivo*における増殖能が遺伝子型によって異なることを明らかにした。本年度はこの差異を生じるメカニズムの1つとしてHBV感染により宿主肝細胞で誘導される自然免疫応答の差異に着目し検討を行った。HBVゲノム保有プラスミドを遺伝子導入する系と、初代ヒト肝細胞へHBVを感染させる系の2つの *in vitro*培養系を用いた検討から、HBV宿主肝細胞がインターフェロンλ 遺伝子発現を誘導すること、また誘導の強さはHBV遺伝子型によって異なることを明らかとした。

A. 研究目的

現在、我が国に存在するB型肝炎ウイルス(HBV)は遺伝子型B、遺伝子型Cのみではなく、若年者層を中心に遺伝子型Aも蔓延している。これまでに検討されたHBV遺伝子型による臨床的病態の差から、HBV感染時の宿主応答も遺伝子型により異なることが予測される。昨年度までに、臨床サンプルから分離した異なる遺伝子型のHBV全長配列(遺伝子型Ae、Bj、Ce、D)を発現するプラスミドを作成し、細胞培養を用いた評価系を確立した。本年度は、昨年度までの培養細胞系に加え、新たな細胞培養として初代ヒト肝細胞を用いたHBV感染系を使用し、HBV遺伝子発現ならびにHBV感染時における自然免疫応答の有無を明らかとし、感染ウイルスの遺伝子型に応じた治療法の開発を目的とした。

B. 研究方法

遺伝子導入：遺伝子型A、B、C、Dをもとに作成した1.24倍長HBVゲノム保有プラスミド(pHBV/Ae-1.24, Bj-1.24, CAT-1.24, D60-1.24)を肝がん由来培養細胞株HepG2にトランスフェクションし、経時的に培養上清および細胞内RNAを回収した。トランスフェクション試薬はPromega社FuGENE6を用いた。培養上清のHBs抗原濃度をELISA法を用いて定量した。

初代ヒト肝細胞へのHBV感染：ヒト肝細胞置換キメラマウスから取得した初代ヒト肝細胞を24-wellマルチプレートで培養し、遺伝子型CのHBV含有血清を感染させた。感染条件は細胞あたりHBVゲノム5コピーの感染源を4%PEG8000含有培地へ懸濁し、

細胞へ24時間暴露させた。感染後培地で細胞を3回洗浄したのち経時的に培養上清および細胞内RNAを回収し、上清中のHBs抗原濃度を定量した。

HBV DNA、mRNA HBsAg の発現解析：培養上清中のHBV DNAはG&Eサイエンス社SMITEST EX R&Dを用いて抽出した。細胞内RNAはニッポンジーン社ISOGENを用いて抽出した。DNAおよびRNA量は定量PCR法（TaqMan法）により定量した。

サイトカイン遺伝子群の発現解析：自然免疫関連サイトカインのうち各種インターフェロン（IFN）遺伝子群IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ （ $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$ ）、および炎症性サイトカインIL-6、TNFの遺伝子発現を定量PCR法（TaqMan法）により測定した。同様に感染後経時的に各種インターフェロンおよび炎症性サイトカインの遺伝子発現を定量PCR法により測定した。

なお、今回の検討ではインフォームドコンセントが取得された血液のみを取り扱い、使用にあたっては連結不可能匿名化を行うことで被験者のプライバシーは完全に保護した。本試験で結果を公表する際は、被験者・協力者を特定できる情報を含まないこととし、ヘルシンキ宣言の精神、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して実施した。

C. 研究結果

HBV 遺伝子産物は HepG2 細胞の IFN- λ を誘導する

最初に、HBV 遺伝子産物が自然免疫応答を誘発するかどうか樹立肝がん細胞を用いて検討した。1.24倍長HBVゲノム保有プラスミドをHepG2細胞株へトランスフェクションすると、24時間から48時間にかけてIFN- $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$ 遺伝子の発現が誘導された。誘導の強さは遺伝子型Bが最も強く、遺伝子型AおよびCは中間的、遺伝子型Dが最も弱かった。一方IFN- β とTNFは弱く誘導されたがIFN- α やIL-6は全く誘導を認めなかった。

初代ヒト肝細胞を利用した *in vitro* HBV 感染増殖系の検討

最近、ヒト肝細胞置換キメラマウスから取得した初代ヒト肝細胞をプレート上で培養する方法が確立された。最初にHBV感染能とウイルス増殖の経時的推移について検討した。初代ヒト肝細胞をHBV含有血清に暴露すると、24時間後から暴露した細胞内でHBV mRNAが検出され、12日目にかけて発現量が増大した。洗浄により感染源を除去した後に、培養上清中のHBsAgおよびHBV DNAレベルは徐々に上昇した。また、12日目における蛍光免疫染色を行い、細胞内HBsAg、HBcAgタンパクが検出されHBV感染成立を確認した。さらに12日目のHBsAgおよびHBV DNAレベルは暴露したウイルス量を数倍上回っていることから、HBVが初代ヒト肝細胞内で複製していることが強く示唆された。一方、感染52日目に回収した培養上清を未処理の初代ヒト肝細胞に暴露すると同様にHBV感染が成立することから、培養上清中に感染能を有するウイルス粒子（Dane粒子）が産生されていることが確認された。

次に初代ヒト肝細胞内におけるHBVの感染過程および複製過程について詳細に検

討した。感染中和抗体である HBV 免疫ヒトグロブリン (HBIG) を感染源と混合した後細胞へ暴露すると、曝露後 52 日間にわたって培養上清中 HBsAg、HBV DNA とともに全く検出されず、初代ヒト肝細胞への HBV 感染は HBsAg を介することを確認した。HBV の複製は感染細胞の核内に存在する cccDNA から転写される鋳型 RNA (pgRNA) がコア粒子に取り込まれ、逆転写反応を経て rcDNA に変換する過程を含む。初代ヒト肝細胞に逆転写酵素阻害剤ラミブジンおよびテノホビルを添加すると、培養上清中 HBV DNA レベルは低下し、ウイルス粒子産生阻害を確認した。

以上の検討から、今回新たに応用した初代ヒト肝細胞を用いた HBV 感染系は、ウイルス粒子の細胞への侵入、複製、感染性粒子形成を含む HBV 生活感を *in vitro* で再現できていることが示された。

HBV 感染は初代ヒト肝細胞の IFN- λ を誘導する

上述の初代ヒト肝細胞を用いて HBV 感染に伴う初期の細胞応答を検討した。HBV 遺伝子型 C の血清を感染させると、48 時間後に IFN- λ 1、 λ 2、 λ 3 の発現が誘導された。HepG2 細胞株の結果と同じく IFN β 、TNF の誘導は弱く IFN α 、IL-6 はほとんど発現しなかった。

D. 考察

1. 24 倍長 HBV ゲノムをトランスフェクションする方法により HepG2 細胞株で IFN- λ 遺伝子発現が誘導され IFN- α/β の誘導は弱いことを明らかとした。またヒト肝臓置換キメラマウスから取得した初代ヒト肝細胞は HBV の特異的な細胞への侵入、逆転写過程を含むウイルス複製、感染性粒子形

成までの HBV 生活感をすべて再現することを示した。さらに初代ヒト肝細胞においても HBV 感染が IFN- α/β ではなく IFN- λ を誘導することを明らかにした。

IFN 遺伝子誘導は感染細胞の Toll 様受容体群などの病原体センサーが HBV ゲノムから産生されるウイルス RNA あるいはタンパクを認識することによると考えられる。これらウイルス由来分子の産生量は遺伝子型により異なることをすでに我々は見いだしており、遺伝子型の違いによる IFN- λ 応答の強弱に関連する可能性が示唆される。さらに、HBV に感染したヒト肝臓置換キメラマウスに対するペグインターフェロン (PEG-IFN) 投与の HBV 抑制効果は遺伝子型 A に比べて遺伝子型 C が強いことから、遺伝子型によってウイルス因子による IFN 応答阻害に差異がある可能性も示唆された。

今後、HBV 由来 RNA あるいはタンパクを認識する病原体センサーやそれらが認識するウイルス側の分子の同定、遺伝子型ごとの宿主肝細胞の IFN 応答の差異が HBV 由来因子の干渉に起因する可能性を探る。さらに宿主の自然免疫を修飾して HBV を制御する薬剤等の探索を目指す。

E. 結論

HBV 粒子産生プラスミドの遺伝子導入による細胞培養系、および初代ヒト肝細胞 *in vitro* 培養を用いて、HBV 感染により IFN- λ が誘導されること、誘導の強さは HBV 遺伝子型によって異なることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S,

- Iijima S, Matsuura K, Shinkai N, Watanabe T, Poovorawan Y, Tanaka Y. Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in Thai population. PLoS One. 2014. 9(1):e86007.
- 2) Watanabe T*, Wong DK*, Tanaka Y, Seto WK, Lee CK, Fung J, Lin CK, Huang FY, Lai CL, Yuen MF. Role of HLA-DP polymorphisms on chronicity and disease activity of hepatitis B infection in Southern Chinese. PLoS One, 2013. 8; e66920 (* equal contributors)
- 3) Arata S, Nozaki A, Takizawa K, Kondo M, Morimoto M, Numata K, Hayashi S, Watanabe T, Tanaka Y, Tanaka K. Hepatic failure in pregnancy successfully treated by online hemodiafiltration: Chronic hepatitis B virus infection without viral genome mutation. Hepatol Res. 2013. 43(12):1356-60
- 4) Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. Journal of Viral Hepatitis. 2013. 20(4):e27-36
2. 学会発表
- 1) Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Murakami S, Iio E, Matsunami K, Iijima S, Omagari K, Shinkai N, Sugiura W, Tanaka Y. Incomplete prophylactic effect of nucleot(s)ide analogues using in vitro hepatitis B virus infection model. Mar. 12-15, Brisbane. 2014.
- 2) Wong D, Watanabe T, Tanaka Y, Seto WK, Lee CK, Fung J, Lin CK, Huang FY, Lai CL, Yuen MF. Role of HLA-DP polymorphisms on chronicity and disease activity of hepatitis B infection in the Chinese. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver. June 6-10, Singapore. 2013.
- 3) 平嶋昇, 渡邊綱正, 岩瀬弘明. 当院における急性B型肝炎の臨床経過. 第40回日本肝臓学会西部会. 岐阜. 平成25年12月6日～7日.
- 4) 飯尾悦子, 松居剛志, 狩野吉康, 村上周子, 新海登, 渡邊綱正, 城卓志, 田中靖人. 次世代シーケンサーを用いたB型肝炎ウイルス Entecavir 耐性変異パターンの検討. 第40回日本肝臓学会西部会. 岐阜. 平成25年12月6日～7日.
- 5) 戸塚雄一郎, 野崎昭人, 荒田慎寿, 羽尾義輝, 道端信貴, 石井寛裕, 近藤正晃, 福田浩之, 沼田和司, 田中克明, 渡邊綱正, 田中靖人, 前田慎. 妊娠を契機に重症化し, on-line hemodiafiltration により救命し得たB型肝炎の1例. 第40回日本肝臓学会西部会. 岐阜. 平成25年12月6日～7日.
- 6) 林佐奈衣, 村上周子, 飯島沙幸, 渡邊綱正, 田中靖人. HBV Genotype F における肝細胞癌特異的ウイルス変異の同定. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 平成25年11月10日～12日.
1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

自然免疫を用いたHBV感染細胞の排除に関する研究

-HBV感染患者における樹状細胞の解析-

水腰英四郎 金沢大学医薬保健研究域医学系 准教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）感染は、肝硬変・肝細胞癌などの重篤な病態の原因になっている点で、我が国の重要な感染症の1つである。HBVに対する治療薬としては、数種類の抗ウイルス薬が使用されているが、ウイルスの完全排除に至る確率は低く、新しい機序を持つ新薬の開発が必要である。HBVは宿主の免疫機構を回避する方法を獲得していることが報告されており、HBVの完全排除もしくは長期にわたる増殖抑制を目的とした治療法を開発するためには、そうした免疫抑制機構の基本的な動態を解明するとともに、そうした動態にあるHBVに対して、どのような免疫が作動しているかを明らかにして研究開発を行うことが必要である。本研究では、HBV感染患者における樹状細胞の解析を行い、健常者と比較して低下している樹状細胞の遺伝子を同定する。また、こうした遺伝子の変化によって生じる樹状細胞の機能を明らかにするとともに、同機能を回復させることによる、新しいHBV感染に対する治療方法の開発を行う。本年度はこれらの研究を遂行するために、健常者とHBV感染患者の樹状細胞表面マーカーの測定と発現遺伝子解析を行った。

A. 研究目的

HBV感染患者の樹状細胞（Dendritic cell; DC）において機能低下を来している分子を同定することにより、これらの分子の機能改善によるHBV感染症の新しい治療法を開発を行う。

B. 研究方法

はじめに、HBV感染患者58例と健常者19例の末梢血単核球分画を採取し、フローサイトメーターを用いて樹状細胞の表面マーカーの発現レベルを測定した。樹状細胞の分離ははじめにSSCとFSCを用いた単核球分画

を分離し、さらにLineage陰性・HLA-DR陽性分画を抽出し、その後CD123陽性分画のplasmacytoid DCとCD11c陽性分画のmyeloid DCに分けて解析を行った。DCの細胞表面マーカーとしては各種抗体を用いて、CD80、CD83、CD86、CD40、CCR7の発現レベルを測定した。

次に、58例のHBV感染患者の中から、肝機能が正常なHBVキャリアー7例、未治療のB型慢性肝炎患者6例、核酸アナログ製剤による治療を受けているB型慢性肝炎患者12例において、上記方法によりDCをplasmacytoid DCとmyeloid DCに分けて、

それぞれソーティングし、分離した細胞からRNAの抽出を行った。抽出されたRNAはcDNAに逆転写後、マイクロアレイ法にて発現遺伝子解析を行った。発現遺伝子解析におけるチップにはAffymetrix Human 133U Plus 2.0を、解析ソフトにはBRB-Array-Tool (NCBI) とパスウェイ解析にはMetaCore™ (Thomson Reuters, NY, USA) を使用した。

また、樹状細胞機能を評価するためのツールとして、HBV特異的HLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞(CTL)エピトープの同定を試みた。具体的にはHBV genotype Cのアミノ酸配列を基に、コンピュータソフト(BIMAS)を用いて、エピトープの予測を行い、インターフェロンγELISPOTアッセイ法にて、HBV感染患者末梢血リンパ球に高頻度に認識されるエピトープを同定した。最後に同エピトープに対する免疫反応とDCの表面マーカーの発現レベルとの関連性を検討した。

倫理面への配慮として、本研究では臨床研究・疫学研究・ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守しており、本研究に関しては、研究施設内の倫理委員会として、医学倫理審査委員会の承認を取得した。

C. 研究結果

HBV感染患者におけるDCの解析では、健常者と比べて、myeloid DCの数が減少していた。一方、plasmacytoid DCの数には有意な差は認められなかった。また、HBV感染患者におけるDCでは、健常者と比べて、myeloid DCにおけるCD80、CD83、CD40、CCR7の発現レベルが亢進していた。

各DCサブセットにおける、発現遺伝子解析では、plasmacytoid DC、myeloid DCのいずれにおいても、各患者群の病態を全体の遺伝子を用いて群別することはできなかったが、 $p < 0.05$ でパスウェイ解析を行うことが可能であった。各患者群での発現遺伝子の差を検討したところ、未治療のB型慢性肝炎患者では肝機能正常HBVキャリアーと比較して、plasmacytoid DCで3642個の遺伝子、myeloid DCで191個の遺伝子の発現低下が認められた。同様に、核酸アナログ製剤による治療を受けているB型慢性肝炎患者においても発現レベルが低下している遺伝子が検出されたが、一部の遺伝子では未治療群と比べ、その発現レベルの改善を認めた。

コンピュータにて予測されたCTLエピトープのうち、large S 領域から 28 種類、pre-core/core 領域から 13 種類、HBx 領域から 4 種類、polymerase 領域から 44 種類のエピトープを、結合予測スコアが高い順に選択し、免疫学的解析に用いるためのペプチドを作製した。これまでの結果では、93 種類の HBV 由来ペプチドのうち 47 種類において、少なくとも 1 人以上の患者において陽性反応を認めた。また、HBV 感染患者をこれらのペプチドに対する免疫応答が検出された群と検出されなかった群に分けて、DC の表面マーカーの発現との関連性を検討したところ、免疫応答が検出された群では、plasmacytoid DC における CD80、CD83、CD40、CCR7 と、myeloid DC における CD86 の発現レベルが高値であった。

D. 考察

本年度の研究結果からは、HBV 感染患者では健常者と比べ、DC における遺伝子発現が大きく変化しており、一部のものではその発現が抑制されることによって、表面マーカーの変化や DC の機能低下を来していると考えられた。また、こうした DC 機能の変化が、HBV に対する CTL の反応にも影響を与えていることが示唆された。核酸アナログ製剤による治療には、こうした HBV による DC の遺伝子変化の一部を改善させる効果があると考えられた。

E. 結論

HBV感染患者では健常者と比較し、DC数や表面マーカーに変化が生じており、これらの変化はDCの各サブセットによって異なっていた。また、免疫関連遺伝子の発現はHBV感染状態によって異なっており、未治療の慢性B型肝炎患者では発現低下を認める遺伝子が多く存在した。これらの結果から、HBV感染患者における樹状細胞数やその機能調節を行うことにより、ウイルスに対する宿主の免疫応答を改善し、HBV排除に向けた新しい治療方法の開発が可能になると考えられる。また、HBV由来HLA-A24拘束性CTLエピトープには未知のものが多く存在すると考えられることから、今後、DCの機能解析に有用なものをさらに同定していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nagai T, Nakagawa H, Jin A,

Kaneko S, Muraguchi A. A novel cloning and expression system yields and validates TCR molecules from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. *Nature Medicine*. 19:1542-6, 2013.

2) Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Arihara F, Kagaya T, Yamashita T, Fushimi K, Kaneko S. Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 57: 1448-57, 2013.

3) Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S. Increase in CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol Immunother*. 62:1421-30, 2013.

2. 学会発表

なし。

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし

厚生労働省科学研究費
B型肝炎創薬実用化等研究事業
分担研究報告書

HBV に対する自然免疫応答の解析

研究分担者： 竹原 徹郎
大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学・教授

研究要旨：ウイルス感染に対する宿主免疫応答において自然免疫は重要な役割を果たす。Hepatitis B Virus (HBV) に対する自然免疫応答を解析することにより、B型肝炎におけるウイルス排除および慢性化の機序を解明することを目的とした。自然免疫において Natural killer (NK) 細胞は重要な役割を果たすが、多数の抑制型レセプターと活性型レセプターの発現によりその機能は調整されている。本年度は、B型肝炎患者及び健常者血液から末梢血単核球を分離し、NK細胞ならびにそのレセプターの表現型・IFN 応答性について Flow Cytometry で解析を行った。末梢血における CD56⁺CD3⁻ NK細胞の頻度は、HBVDNA ≥ 4 log copies/ml の B型肝炎患者で、健常者および HBVDNA < 4 log copies/ml の B型肝炎患者よりも低下した。また、NK細胞は活性型レセプターNKp46 と抑制性レセプターNKG2A との発現程度によって、NKp46⁻NKG2A⁻、NKp46⁺NKG2A⁻、NKp46⁺NKG2A⁺、NKp46^{high}NKG2A^{high} に分類された。その中でNKp46⁺NKG2A⁻亜分画はHBVDNA量と負の相関関係を、NKp46^{high}NKG2A^{high}はHBVDNA量と正の相関関係を認めた。*in vitro*でのIFN- α 刺激で誘導されるリン酸化STAT1の程度は4つの亜分画によって異なっており、NKp46⁺NKG2A⁻とでSTAT1リン酸化の程度が強かった。4つのNK細胞亜分画のうち、NKp46⁺NKG2A⁻亜分画は、活性型レセプター陽性かつ抑制性レセプター陰性で、さらにIFN- α 刺激によるSTAT1リン酸化の程度も大きいことから、最もNK細胞活性が強力な亜分画であると考えられる。この亜分画がウイルス量と負の相関関係で、ウイルス量高値の際には減少しており、B型肝炎の宿主免疫からの逃避に関連している可能性があると考えられた。また、NKp46^{high}NKG2A^{high}亜分画はサイトカインを分泌能が高いとされているNK brightの割合が1/3程度を占めるが、ウイルス量とは正の相関関係にあり、ウイルス感染の結果宿主免疫応答が起こり、割合が増加している可能性が考えられた。B型慢性肝炎の病態形成において、NK細胞の各亜分画の関与が示唆された。

共同研究者

院生

宮城琢也 大阪大学消化器内科学 助教

吉岡鉄平 大阪大学消化器内科学 大学 A. 研究目的

B 型肝炎ウイルスの排除において、自然免疫は重要な役割を果たす。ウイルス感染時、宿主の免疫から逃れ慢性化する機序を解明するには、初期応答である自然免疫の役割を解析する必要がある。本研究では自然免疫の中でも NK 細胞とそのレセプターに注目し、B 型肝炎ウイルス感染時の NK 細胞の表現型や IFN 応答性について解析することで、B 型肝炎ウイルスに対する宿主免疫応答およびその慢性化の機序を明らかにすることとした。

B. 研究方法

B 型肝炎患者 64 例と健康人 28 例を対象とし、末梢血単核球を単離し Flow Cytometry で解析を行った。B 型肝炎患者はさらに高ウイルス群 19 例 (HBVDNA ≥ 4 Log copies/ml) と低ウイルス群 45 例 (HBVDNA < 4 Log copies/ml) に分けて解析を行った。細胞表面マーカーとして CD56・CD3 により NK 細胞を同定した。また NK 細胞活性型レセプター NKp46 と抑制型レセプター NKG2A との発現程度によって亜分画に区別した。それぞれの亜分画において、HBVDNA 量との相関及び IFN- α によって伝達される細胞内シグナルを STAT1 リン酸化で評価した。

C. 研究成果

(1) 末梢血単核球に占める CD56⁺CD3⁻ NK 細胞の頻度は、B 型肝炎患者全体と健康人とで有意差を認めなかったが、高ウイルス群は低ウイルス群及び健常群に比べて有意に NK 細胞の頻度が減

少した。

(2) CD56⁺CD3⁻ NK 細胞は NKp46 と NKG2A の発現程度によって亜分画に分けることが可能であった。すなわち、NKp46⁻NKG2A⁻、NKp46⁺NKG2A⁻、NKp46⁺NKG2A⁺、NKp46^{high}NKG2A^{high} に分類された。NKp46^{high}NKG2A^{high} 亜分画は NK bright 分画の約 32-46% を占める集団であることが確認された。

(3) 上記亜分画のうち NKp46⁺NKG2A⁻ 分画は高ウイルス群で頻度が低下し、HBVDNA 量と負の相関を認めた ($P < 0.05$)。また NKp46^{high}NKG2A^{high} 亜分画は高ウイルス群で頻度が増加し、HBVDNA 量と正の相関を認めた ($P < 0.05$)。

(4) *in vitro* での IFN- α 刺激でリン酸化される STAT1 の程度が、4 つの亜分画によって異なっていた。すなわち、NKp46⁻NKG2A⁻ \approx NKp46⁺NKG2A⁻ $>$ NKp46^{high}NKG2A^{high} $>$ NKp46⁺NKG2A⁺ となっていた。この亜分画間の差異は、B 型肝炎患者・健康人ともに認められた。

D. 考察と結論

高ウイルス群で NK 細胞の頻度が有意に低下した。この結果は B 型肝炎ウイルスが宿主の自然免疫を回避する機構の表現型の一部である可能性がある。

また NK 細胞が活性型レセプター NKp46 と抑制型レセプター NKG2A の発現様式によって亜分画に分類されることが明らかにされ、さらに NKp46⁺NKG2A⁻ 亜分画および NKp46^{high}NKG2A^{high} 亜分画は HBVDNA 量とそれぞれ負および正の相関があること

が明らかとなった。NK 細胞の活性は、活性型レセプターからのシグナルと抑制性レセプターからのシグナルとのバランスによって決まり、これらの亜分画によって、NK 細胞活性が異なっているものと考えられる。NKp46+NKG2A⁻ 亜分画は、活性型レセプターが陽性かつ抑制性レセプターが陰性で、さらに IFN- α 刺激による STAT1 のリン酸化の程度も大きいことから、最も NK 細胞活性が強力な亜分画であることが予想される。また NKp46^{high}NKG2A^{high} 亜分画にはサイトカイン分泌能が高いとされる bright NK が多く含まれており、高い細胞障害機能を有している可能性がある。NKp46+NKG2A⁺・NKp46^{high}NKG2A^{high} はそれぞれウイルス量と負及び正の相関関係があり、NKp46⁺NKG2A⁻ は B 型肝炎の宿主免疫からの逃避・慢性化に、NKp46^{high}NKG2A^{high} はウイルスによる NK 細胞の活性化に関連している可能性があると考えられる

これらの亜分画ごとに IFN γ 分泌能や細胞障害活性を測定しその機能を明らかにすることで、B 型肝炎慢性化の機序あるいは新たな治療標的の開発につながる可能性があると考えられた。

E. 研究発表

論文発表

1. Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Tanaka S, Shigekawa M, Nawa T, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in

mice. *J Hepatol* 59: 1239–1245, 2013

2. Nishida T, Hiramatsu N, Mizuki M, Nagatomo I, Kida H, Tazumi K, Shinzaki S, Miyazaki M, Yakushijin T, Tatsumi T, Iijima H, Kiso S, Kanto T, Tsujii M, Takehara T. Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic. *Hepatol Res* 43: 339–346, 2013

学会発表

本研究に関する今年度の学会発表はなし

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
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
研究分担報告書

HBV 感染治療用ベクターの開発と新規ベクターの供給

分担研究者 斎藤 泉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）に対する治療用として、肝臓における発現効率の高い非増殖型アデノウイルスベクター(AdV)を用いて、インターフェロンと治療用遺伝子を同時発現する日本発のHBV治療用デュアルベクターを開発する。本年度はHBVゲノム高度保存領域に設定した6種類のshRNAを発現するAdVをウイルス随伴RNA（VA RNA）欠失AdVとして作製し、その評価を行った。HBVゲノム複製を効率的に検出するシステムの開発中であるため、shRNAの評価は、設計したshRNA配列を発現単位内に有するpreCoreを発現するAdVを用いて行った。その結果、6種類のshRNAはいずれも良好な発現抑制効果を示した。そのうち、最も発現抑制効率の高いものでは、60%の発現抑制効果を示した。shRNAの有効性の検討のため、HBVゲノム複製を効率的に検出するシステムの開発も同時に行い、HBVプレゲノム量を上昇するためのCMVプロモーターを併用したアデノウイルスベクターを用いたシステムの開発に成功した。

A. 研究目的

HBVに対する治療法として、ウイルスmRNAに対するsiRNAの応用が期待されるが、非増殖型アデノウイルスベクター（AdV）は肝臓への遺伝子導入効率、発現効率ともに優れており有用性の高いツールである。しかし従来のAdVにはウイルス由来の2種類のVA RNAが発現しており、治療用遺伝子として導入したshort-hairpin RNA (shRNA)と競合拮抗して抗ウイルス効果を減弱する例をHCVで見いだした。VA RNA欠失AdVの効率的作製は困難であったが、斎藤は新規作製法の開発に成功した。本研究では、この新規VA RNA欠失AdVにHBVに対するshRNAの候補を複数挿入し、最も有用性の高いshRNAを同定後、インターフェロン遺伝子を同時に発現するデュアルベクターを開発し、作用機序の異なる2つの治療用遺伝子に依る相加的効果を有したAdVを開発する。

B. 研究方法

HBVに対するshRNAはHBVゲノムのDR1領域近傍の高度保存領域に6種類設計した。shRNAをヒトU6プロモーターから発現する発現単位をアデノウイルスゲノムのE4領域右側に挿入したVA欠失AdVを作製した。VA欠失AdVは、VA RNAコード領域の両側にFLPの標的配列FRTを持つプレベクターを通常の293細胞で作製し、十分に力価を上昇した後、ヒト型温度安定型FLP発現293細胞へ感染することにより90%以上のVA RNA領域が環状に切り出されていたことを確認し、実験に供した。

shRNAの効果判定には、設計したshRNAをコード領域中に持つpreCore発現VA欠失AdVとの共感染により行った。preCoreを特異的に検出可能なリアルタイムPCR用プライマーを用いてpreCoreのRNA量を定量し、shRNAの効果判定した。

HBVゲノム複製は極めて効率が低いいため、HBVプレゲノム量を上昇するためにCMVプロモーターを応用した。HBVゲノムのSコード領域にPol発現に影響を与え

ないように点変異を加えた 1.2 倍長 HBV-DNA(kS)を CMV プロモーターから発現する AdV を作製し、HuH-7 細胞に導入後 3 日目に細胞総 DNA を抽出し、Southern 法により複製した HBV ゲノム検出を試みた。(倫理面への配慮)

本年度の研究に当たっては、既に報告されている HBV を用いており、特に倫理面に抵触する検討は行っていない。

C. 研究結果

本研究で新たに設計した 6 種類の shRNA は全て有意に preCore の RNA 発現を抑制した。特に shRNA-1 は多重感染価 (MOI) 4 でも 40%、MOI 20 では 60%の高い抑制効果を示した。本研究で応用した VA 欠失 AdV は、HCV を用いた解析から shRNA と VA RNA の競合拮抗が起こらないため、shRNA による特異的 RNA 量減少効果を高めることが期待できるため、有用性が高いと考える。

今後は、本研究で開発した shRNA の効果を HBV ゲノム複製システムで検討するが、HBV ゲノム複製効率は極めて低い。本研究ではスクリーニングにおける安全性を考慮して S コード領域に点変異を加えることで Pol の発現に影響を与えないが S のみをノックアウトした S 欠失 HBV ゲノム(kS)を用いて解析を行っているが、汎用されている 1.2 倍長の S 欠失 HBV ゲノムを持つプラスミドを用いた予備的な検討では複製した完全二本鎖 DNA (CCC)や不完全二本鎖 DNA (RC)の検出は困難であった。そこで CMV プロモーターを応用してプレゲノム量を増加したところ、同じ HBV ゲノムを用いても CCC と RC の検出に成功した。

そこで、肝臓細胞への導入効率が高い AdV に CMV プロモーターから S 欠失 HBV ゲノム(kS)を発現する発現単位を挿入し、HuH-7 細胞を用いて同様の解析を行ったところ、プラスミドよりも良好な HBV ゲノム複製が容易に確認されたため、今後の解析にはこの AdV を用いることに決定した。

班員への供与に関しては、ZFN を発現す

る AdV や VA 欠失 AdV などの供給が可能になったことを周知した。

D. 考察

本年度は、昨年度に設定した shRNA の有用性が高いことを明らかにした。VA RNA は成熟の過程で shRNA と同様の機序でプロセスされるため、shRNA の効果を減弱する可能性が示唆されてきたが、HCV を用いた検討によりこの可能性を実証し報告した (Pei *et al.*, *Sci. Rep.*, 2013)。本研究で応用している VA 欠失 AdV は HBV に対する shRNA においても同様に有用性が高いと考える。

また、これまで構築してきた各々の HBV 遺伝子を独立して発現する AdV と RNA 定量システムを応用して、shRNA の効果判定が可能となり、効率よく研究が推移した。

HBV ゲノム複製検出システムについては、1.2 倍長 HBV ゲノムでは検出が困難であったが、CMV とアデノウイルスベクターの併用により Southern 法での CCC 及び RC の検出が可能となった。今後は定量性と簡便性を兼ね合わせた半定量 PCR やリアルタイム PCR のシステムを開発し、定量的な解析と Southern 法の併用により、shRNA の HBV ゲノム複製抑制効果の検討を進めていく。

また HCV の shRNA では、効果の異なる複数の shRNA の共感染により HCV ゲノム複製抑制効果が上昇していたため、HBV においても 6 種類の shRNA の効果的な組み合わせを検討する。

E. 結論

HBV に対する有用性の高い shRNA を同定し、HBV ゲノム複製検出システム確立もほぼ目処がたった。今後は shRNA の HBV ゲノム複製抑制効果について検討を行う。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表