

201321009A

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

HBV cccDNAの制御と排除を目指す 新規免疫治療薬の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子周一

平成26 (2014) 年 3 月

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

HBV cccDNAの制御と排除を目指す
新規免疫治療薬の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 周一

平成26(2014)年 3月

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

研究組織

<u>研究代表者</u>		
金子 周一	金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学	教授
<u>研究分担者</u>		
今村 道雄	広島大学病院 消化器・代謝内科	診療講師
中本 安成	福井大学医学部内科学 (2)	教授
橋本 真一	金沢大学医薬保健研究域医学系血液情報統御学	特任教授
村上 清史	金沢大学医薬保健研究域医学系	協力研究員
石川 哲也	名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻病態解析学講座	教授
考藤 達哉	(独) 国立国際医療研究センター国府台病院 肝疾患先進医療研究室	室長
高橋 健	京都大学医学部附属病院・消化器内科	助教
加藤 孝宣	国立感染症研究所ウイルス第二部	室長
村口 篤	富山大学大学院医学・薬学研究部・免疫学講座	教授
池田 裕明	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座	准教授
石井 健	(独) 医薬基盤研究所・アジュバント開発プロジェクト	プロジェクト リーダー
水腰 英四郎	金沢大学医薬保健研究域医学系	准教授

目 次

I. 総括研究報告

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

金子 周一 ----- 1

II. 分担研究報告

1. HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

金子 周一 ----- 7

2. HBV感染マウスを用いたHBV cccDNA制御に関する研究

今村 道雄 ----- 12

3. 抗HBV反応を増強する免疫賦活分子の探索

中本 安成 ----- 14

4. HBV感染細胞のエピゲノム

橋本 真一 ----- 17

5. HBVccc肝細胞株の樹立とHBVcccの制御機構

村上 清史 ----- 20

6. HBV特異的免疫応答誘導の高効率化の試み		
石川 哲也	-----	23
7. HBV感染症におけるNK-DC相互作用の解析		
考藤 達哉	-----	26
8. B型肝炎における自然免疫応答の解明		
高橋 健	-----	29
9. B型肝炎ウイルス感染が宿主のアポトーシスに与える影響の解析		
加藤 孝宣	-----	31
10. TCRクローニングとTCRを用いた細胞治療		
村口 篤	-----	34
11. HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発		
池田 裕明	-----	37
12. ペプチド+アジュバント併用療法の開発		
石井 健	-----	41

13. HBV由来細胞傷害性T細胞エピトープの同定とペプチドワクチンの開発

水腰 英四郎

----- 44

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 47

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 51

I. 総括研究報告

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：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：B型肝炎慢性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の再活性化機構を制御することが重要である。本研究は免疫を用いて、cccDNAに対する新たな治療法の開発研究を行っている。本研究は大きく3つの課題、1) cccDNAの存在様式、および遺伝子発現調節機構の研究、2) cccDNA感染細胞に対する免疫監視機構の研究、3) cccDNA感染細胞に対する免疫治療法の開発、を設定している。1) では、従来から課題であったcccDNAの測定系が開発された。また、抗ウイルス剤によってHBV複製が低下した肝臓におけるcccDNAの存在様式が示された。2) では、最新の免疫学によるケモカイン、サイトカインの動態が報告された。また、ウイルス排除における樹上細胞の役割が明らかにされた。3) では、標的とする抗原エピトープの同定がすすめられ、TCRクローニングとヒトへの導入の基礎研究がすすんだ。また、有効なアジュバントの研究が進められた。全体として研究計画は順調に進捗した。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）のcccDNAは、ウイルス増殖が大きく低下し、血液中にHBsAg、HBV DNAが検出されない症例においても、生涯にわたって肝組織中に見いだされる。cccDNAはウイルスcoreタンパクに加え、histoneや他の核タンパクとminichromosomeを形成して核内に存在し、現行の抗ウイルス治療に抵抗性である。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。即ち、B型肝炎慢性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の再活性化機構を制御することが重要である。再活性化は、宿主の免疫が低下するとみられる一方で、HBs抗体が陽性の

症例では稀にしかみられない。こうした事実から、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されていない。cccDNAの制御と排除を行う治療法を開発するためには、cccDNAの存在様式と遺伝子発現の調節機構といったcccDNA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cccDNA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。

本研究は世界最先端の免疫学の技術を用いたcccDNAの制御と排除をめざす開発研究を行う。3つの研究要素よりなり、1) cccDNAの存在様式、および遺伝子発現調節

機構の研究、2) cccDNA感染細胞に対する免疫監視機構の研究、3) cccDNA感染細胞に対する免疫治療法の開発を行う。

B. 研究方法と研究結果と考察

本研究では最先端の免疫学の技術を用い、cccDNA の制御と排除を行う新規治療薬の開発研究を目指す。分担研究者の報告は、それぞれに分担研究報告書がつけられているため総括して記載した。

(倫理面への配慮)

各種の倫理指針を遵守して研究を実施した。

・研究代表者 (金子周一)

核酸アナログを平均5年服用中の23例の肝組織遺伝子発現を解析した。内13例は核酸アナログ投与前の肝組織が解析可能であり、核酸アナログ投与前と投与中の肝内遺伝子発現の変化を解析した。HBcrAg陽性12例と陰性11例の肝組織に於ける遺伝子発現を比較した。HBcrAg陽性例ではDNA損傷、アポトーシス、蛋白翻訳、組織修復に関する遺伝子群の発現亢進を認め、免疫応答関連遺伝子の発現低下を認めた。また、末梢血液のpDCの遺伝子発現変化では、HBcrAg陽性例ではpDCの機能の低下を示唆する遺伝子変化を認めた。HBcrAg陽性例ではHBVの複製に伴うCapase3, p53, NRF2の発現上昇が認められる一方、HBVの転写亢進に働くCEBP α , PPAR, HNF4, Sp1の発現上昇が認められた。

・研究分担者 (今村道雄)

HBV を感染させたヒト肝細胞キメラマウ

スからヒト肝細胞を摘出し DNA を抽出し real-time PCR にて HBV DNA を測定した。抽出した DNA をヌクレアーゼ処理し、primer を 17 塩基から 25 塩基に伸ばし PCR を行うことにより、血中 HBV DNA は検出されず、マウス肝臓内の cccDNA を特異的に検出することが可能となった。HBV 患者血清投与 8 週後、マウス血中 HBV DNA は 10^{10} copy/mL、肝臓内 cccDNA は 6.02 copies/hepatocyte であった。ETV または PegIFN α を 12 週間投与したところ肝臓内 cccDNA はそれぞれ 5.1, 4.7 copies/hepatocyte であったが、両者を併用投与することにより肝臓内 cccDNA は 0.7 copies/hepatocyte に低下した。Entecavir は比較的安全性の高い薬剤であり、高容量投与も今後考慮すべき治療法と思われた。

・分担研究者 (橋本真一)

HBV 感染細胞株、並びに PXB マウス由来新鮮ヒト肝細胞を用い、エピジェネティック薬剤であるヒストンメチル化阻害剤及びヒストン脱アセチル化阻害剤の HBV 複製に対する影響について検討した。その結果、ヒストンアセチル化、ヒストンメチル化の変化が HBV の複製に影響することが明らかとなった。HepG2 と HepG2.2.15 の比較により、HBV による宿主の DNA メチル化変化は観察されたが、cccDNA 自身のメチル化変化は HepG2 のような細胞株では観察されなかった。複製が盛んな系では、cccDNA の DNA メチル化の変化を観察することは難しい可能性がある。今後、ヒト肝細胞の長期培養や患者サンプルを用いて検査する必要

があると考えられた。エピジェネティック薬剤を用い HBV 複製について検討した結果、HBV の複製にそれらが影響を与えることが明らかとなった。

・分担研究者（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。また、HBx を HepG2 細胞に導入して遺伝子発現パターンを包括的に検討することにより HBx が影響を与える転写因子の同定を行った。siRNA による HBx 発現抑制の実験において、HBx 発現の 60% 抑制で HBV の複製が約 40% 抑制された。247 例の HBV による肝細胞癌組織とその背景肝組織の遺伝子発現データを用いた検討で、HBx 関連遺伝子群は肝細胞癌症例を癌幹細胞性の有無により分類し、その分類は予後に影響を及ぼすことが見出された。HBx は HBV の複製に必須の蛋白質であり、その転写活性を調節することで HBV の複製を制御できる可能性が示唆された。HBx の転写活性化能の解明が予後不良な HBV 関連肝癌の予後改善に繋がる可能性が示唆された。

・研究分担者（中本安成）

HBs 抗原のエピトープ（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。肝炎の経過中に得ら

れた肝組織での発現遺伝子プロファイル（K-means クラスタリング解析）において、ウイルス産生の持続的な低下と逆相関して発現亢進している遺伝子群（クラスター 5：274 個の遺伝子群）が同定された。この遺伝子群が誘導する細胞内シグナルに関する検討において、ケモカイン CCL5/CCR5 分子が関連する STAT3 および NFκB 経路が亢進（RNA・タンパクレベル）していることが示された。これより、HBV 産生を制御する免疫反応に関わる候補遺伝子（群）が示唆された。

・分担研究者（石川哲也）

マウス(H-2^d)を、 α -galactosylceramide (α -GalCer)をアジュバントとして HBs 抗原とともに免疫すると、HBs 抗原単独での免疫の場合と比較して、HBs 抗原特異的 CTL の誘導効率は有意に上昇した。indoleamine2,3-dioxygenase (IDO) 阻害剤である 1-methyl-d-tryptophan (1-MT) と α -GalCer との併用は、CTL 誘導効率をさらに上昇させた。また、HBs 抗原を樹状細胞 (DC) にターゲティングすることにより、HBs 抗原特異的 CTL の誘導効率が上昇することが示唆された。今回の検討では、 α -GalCer、1-MT の併用、DC ターゲティングのいずれも、マウスモデルにおいて HBs 抗原特異的免疫応答の誘導効率を上昇させた。今後、これらの組合せによる、さらなる免疫応答誘導の高効率化が、HBV キャリアのモデルである HBV トランスジェニックマウスにおける HBV 排除をもたらすかどうかを検討する。

・分担研究者（考藤達哉）

HBV に感染していない健康成人の PBMC

からソーティングによって DC サブセット (PDC、MDC、BDCA3+DC) と NK 細胞を採取した。1.4 倍長の HBV ゲノムを Huh7 に遺伝子導入する系 (HBV-Huh7) を用いた。各 DC、NK 細胞との共培養系を用いて、HBV 複製抑制における IFN/ISG 系、DC、NK の相互作用に関して検討した。NK 細胞は HBV-Huh7 との共培養で IFN- γ を産生し、HBV 複製を抑制した。DC と HBV-Huh7 との共培養では、PDC は IFN- α 、IFN- λ を産生し、NK の CD69 発現を亢進させ、HBV 複製抑制効果を増強した。以上の結果より、PDC は HBV を認識して、NK との相互作用により NK を更に活性化し、HBV 複製抑制に関与することが示された。HBV の認識機構や NK-PDC 相互作用の機序の解明は、治療標的の同定に繋がる可能性がある。

・分担研究者(高橋 健)

B 型肝炎自然発症モデルマウス作成：HBs 抗原を Cre 存在下に発現する HBs 抗原コンディショナルトランスジェニックマウスを作成した。また、タモキシフェン投与により任意の時期に肝臓特異的に Cre を発現する Alb-Cre-ERT2 マウスを準備し、タモキシフェン投与による肝臓での Cre 発現を確認した。ヒト肝細胞置換キメラマウス由来 HBV 感染肝細胞：ヒト肝細胞置換免疫不全マウス *fah*^{-/-}、*rag-2*^{-/-}、*il-2rg*^{-/-} に HBV を感染させた。9 LogGE/ml 以上の血中 HBV 量を有する高キメラ率マウスより HBV 感染ヒト肝組織を採取した (米国テキサス・ベイラーカレッジとの共同研究)。B 型肝炎自然発症モデルマウスに関しては、タモキシフェン投与前に Cre 発現の leak

があると HBs 抗原に対して免疫寛容状態となり、免疫応答が弱く肝炎の程度も軽度となる可能性がある。この点に関して今後十分に評価検討する必要がある。

・分担研究者 (加藤孝宣)

培養細胞での複製とウイルス粒子生成が可能で 1.4 倍長の HBV ゲノムを持つコンストラクトを作製した。遺伝子型 Ae 株、Bj 株、C 株、D 株を発現するコンストラクト HBV の複製モデルを用い、HBV 複製が宿主細胞のアポトーシスに与える影響を解析した。遺伝子型 Ae 株、Bj 株、C 株、D 株それぞれの HBV 複製コンストラクトを培養細胞内に導入し、その後 TNF- α と Actinomycin D で処理することによりアポトーシス感受性に与える影響について検討を行った。その結果、遺伝子型 Bj 株の導入細胞では最も高いアポトーシス陽性率を示し、遺伝子型 C 株の遺伝子導入ではアポトーシス陽性率が低下していた。さらに遺伝子型 Bj 株の HBe 抗原を欠損させたコンストラクトを導入した細胞ではアポトーシス刺激に対する反応性も低下していたことから、遺伝子型 Bj 株の強いアポトーシス感受性には HBe 抗原が関わっていると考えられた。

・分担研究者 (水腰英四郎)

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。また陽性コントロールとし

でサイトメガロウイルス由来のペプチドを1種類と、すでにこれまでにCTLエピトープとして報告されているHBV由来のペプチドを4種類作製した。また、これらのペプチドと42例のHBV感染患者のリンパ球を用いて、ELISPOTアッセイを行った。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、このうち3例以上において高頻度に陽性反応が認められたペプチドは6種類であった。1つのペプチドにつき、少なくとも10例以上の症例でCTLの誘導を試みたところ、2つのペプチドにおいて、CTLの誘導が可能であった。ELISPOTアッセイで計測された末梢血中CTLのfrequencyとCTLアッセイにおいて計測された細胞傷害活性の程度は、これまでに報告されているウイルス由来エピトープに対するものと比較して同等であった。20例のHBV非感染者におけるELISPOTアッセイによる検討では、HBV感染者と比べ、ペプチドに対する陽性反応の頻度は低かった。

・分担研究者（村口 篤）

末梢血中の抗原特異的プライマリーT細胞から単一細胞レベルで、迅速にヒトTCRを取得するための技術（hTEC10: human TCR efficient cloning within 10 days）を開発した。本年度はIFN- γ 分泌や活性化マーカーであるCD137（4-1BB）を指標に抗原特異的プライマリーT細胞の検出およびTCR遺伝子の取得を試みた。その結果、IFN- γ 分泌やCD137を指標に取得したTCR α/β 遺伝子のうち、85%程度が四量体を用いて取得したTCR α/β 遺伝子と

一致した。よって、IFN- γ 分泌やCD137発現を指標にした検出法でもhTEC10を応用可能であることが確認できた。また、TCR遺伝子の増幅方法をこれまでの5' RACE法からLeader primer法に変更することでクローニング効率を大幅に改善することができた。本技術はHBV抗原特異的TCRの解析・取得に有効であることが確認された。

・分担研究者（池田裕明）

腫瘍抗原NY-ESO-1を認識するTCR遺伝子導入ヒトT細胞を重度免疫不全NOGマウスに輸注し、抗腫瘍効果と輸注T細胞の動態を解析した。MAGE-A4特異的TCR遺伝子導入T細胞輸注療法の臨床試験検体を用いて、輸注療法の効果を予測する候補因子を同定した。また、独自開発の内因性TCRに対するsiRNAを搭載した新規レトロウイルスベクターを用いて、非自己リンパ球を用いたTCR遺伝子導入リンパ球輸注療法が可能となることを検証した。TCR遺伝子導入リンパ球の輸注療法を効果的に評価するインビボ評価系が改良され、輸注療法の効果を予測する因子が同定された。また、非自己のリンパ球を用いたTCR改変T細胞輸注療法の可能性が示された。

・分担研究者（石井 健）

アジュバントを独自にカテゴリー化し、それぞれでどのような免疫反応が誘導できるかを検討した。認可されたアラム（Alum）アジュバントに代表される粒子アジュバント。強い細胞性免疫を誘導するTLRリガンド；主にTLR9リガンドである

CpGDNA や TLR3 リガンドの dsRNA などについて検討した。新たに β グルカンであるシゾフィラン (SPG) で CpG をくるんだ凝集塊のないナノサイズの新規 CpG ODN の作製に成功した。この CpG と SPG の複合体、CpG-SPG はヒト抹消血単核球に作用し、強力に IFN- α 、IFN- γ の産生を誘導した。実際に CpG-SPG はマウスにおいて強力なワクチンアジュバントとして働き、興味深い事にタンパク抗原と混ぜるのみで、強い CTL 活性を誘導する事が出来た。同様にペプチド抗原と混合するのみでの免疫でも非常に強い CD8T 細胞を誘導することができた。また、この複合体はカニクイザルにおいても、強力なアジュバント活性を示した。

C. 結論

研究計画の 2 年目にあたる本年度は全体として計画通りに進捗した。本研究は 1) cccDNA の存在様式、および遺伝子発現調節機構の研究、2) cccDNA 感染細胞に対する免疫監視機構の研究、3) cccDNA 感染細胞に対する免疫治療法の開発、を実施している。1) では、従来から課題であった正確な cccDNA の測定系が開発された。また、抗ウイルス剤によって複製が低下した肝臓における cccDNA の存在様式が示された。2) では、最新の免疫学によるケモカイン、サイトカインの動態が報告された。また、ウイルス排除における樹上細胞の役割が明らかにされた。3) では、標的とする抗原エピトープの同定がすすめられ、TCR クローニングとヒトへの導入の基礎研究がすすんだ。また、アジュバントの効果が報告された。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

各分担研究報告書を参照。

F. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

特許出願

発明人: 石井健 小檜山康司 青枝大貴

発明の名称: 免疫賦活活性を有するオリゴヌクレオチド含有複合体及びその用途

出願番号: 特願2013-1962062. 実用新案登録

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

II. 分担研究報告

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）
分担研究報告書

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：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発のため、今回HBcrAg陽性例と陰性例の肝組織に於ける遺伝子発現を比較した。HBcrAg陽性例ではDNA損傷、アポトーシス、蛋白翻訳、組織修復に関する遺伝子群の発現亢進を認め、免疫応答関連遺伝子の発現低下を認めた。また、末梢血液のpDCの遺伝子発現変化ではHBcrAg陽性例ではpDCの機能の低下を示唆する遺伝子変化を認めた。パスウェイ解析ではHBcrAg陽性例ではHBVの複製に伴うCapase3, p53, NRF2の発現上昇が認められる一方、HBVの転写亢進に働くCEBP α , PPAR, HNF4, Sp1の発現上昇が認められた。その他、未報告の転写因子の発現亢進も認められた。これらはHBVの複製を支持する宿主因子と考えられ、新規治療のターゲットになり得ると考えられた。

A. 研究目的

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発のため、B型慢性肝炎例に於けるコア関連抗原（HBcrAg）に注目し、HBcrAg陽性例と陰性例に於ける肝組織及び末梢血樹状細胞の遺伝子発現を解析した。

B. 研究方法

核酸アナログを平均5年服用中の23例の肝組織遺伝子発現を解析した。内13例は核酸アナログ投与前の肝組織が解析可能であり、核酸アナログ投与前と投与中の肝内遺伝子発現の変化を解析した。遺伝子発現プロファイリングはAffymetrics gene chip (133U Plus 2.0)にて解析した。また、末梢血の形質細胞様樹状細胞(pDC)の遺伝子発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究において試料提供者、その家族・血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて十分な配慮を行った。本解析は遺伝子発現及び蛋白の発現についての解析であるが、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省・経済産業省）に準じた十分な対応を行い、患者よりの試料採取については、金沢大学の「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」で承認された説明文書を用いてインフォームドコンセントを得て行っており、十分な対応を行った。

C. 研究結果

13例の核酸アナログ投与前と投与中の肝組織の組織学的変化はF因子で $0.87 \pm 0.69/5$ 年、A因子で $0.92 \pm 1.03/5$ 年であり、著名な組織学的改善を認めた。遺伝子

発現解析では、肝機能・代謝遺伝子・肝再生に関わる遺伝子群の発現上昇を認めた。一方、炎症・線維化関連の遺伝子群の著名な改善が認められた。さらに核酸アナログ投与中の症例 10 例を追加し、核酸アナログ投与中 HBcrAg 陽性例 12 例と HBcrAg 陰性例 11 例で肝内遺伝子発現を比較した。HBcrAg 陽性例 12 例は全例ゲノタイプ C であり、HBcrAg 陰性例 11 例ではゲノタイプ C が 6 例、ゲノタイプ B が 3 例、判定保留が 2 例であった。また、HBcrAg 陽性例で 11 例が HBV-DNA 陽性 (<2.1(+))、HBcrAg 陰性例で 4 例が HBV-DNA 陽性 (<2.1(+):3 例、2.8:1 例) であった。肝組織学的進展度は HBcrAg 陽性例で線維化の進行した症例が認められた。HBcrAg 陽性例と陰性例で肝組織内の遺伝子発現を比較すると、HBcrAg 陽性例では DNA 損傷、アポトーシス、蛋白翻訳、組織修復に関する遺伝子群の発現亢進を認め、免疫応答関連遺伝子の発現低下を認めた。また、末梢血液の pDC の遺伝子発現変化では HBcrAg 陽性例では pDC の機能の低下を示唆する遺伝子変化を認めた。HBcrAg 陽性例の肝で発現増加する遺伝子 1204 個 ($p < 0.05$) のシグナルパスウェイを MetaCore™ にて作成したところ、幾つかのパスウェイの中心となる Hub (ハブ) 遺伝子が同定された。興味深いことに Hub 遺伝子として Capase3, p53, NRF2 の発現亢進があり、これらは HBV 感染に伴う DNA 損傷、アポトーシスを反映していると考えられた。また、これまでに HBV の転写を促進すると報告されている CEBP α , PPAR, HNF4, Sp1 の発現亢進も認められた。その他、これまで

に報告されていぬ転写因子群の発現亢進を認めた。

D. 考察

今回、HBcrAg 陽性例と陰性例の肝組織に於ける遺伝子発現を比較した。HBcrAg 陽性例では HBV の複製に伴う Capase3, p53, NRF2 の発現上昇が認められた。また HBV の転写促進に働く CEBP α , PPAR, HNF4, Sp1 の発現上昇も認められた。HBV 転写促進に働く遺伝子群は従来、肝細胞機能を維持する遺伝子群であり、肝線維化の進行に伴って通常は発現が低下する。しかし、HBcrAg 陽性例では肝線維化進行例が多いにも関わらず、これらの遺伝子群の発現上昇が認められた。また、HBcrAg 陽性例では pDC の機能の低下を示唆する遺伝子変化を認めた。HBV 持続感染の機序の 1 つに HBcrAg 陽性肝細胞が宿主免疫から逃避する可能性が示唆された。

E. 結論

HBcrAg 陽性例と陰性例の肝組織に於ける遺伝子発現が明らかとなった。HBcrAg 陽性肝では HBV の複製亢進に伴う遺伝子変化が見られた。同時に HBV の複製を支持する転写因子の亢進が見られ、治療のターゲットになり得ると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M Honda, T Shirasaki, T Shimakami, A Sakai, R Horii, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, H Okada, K Murai, M Nakamura, E Mizukoshi, S Kaneko. Hepatic interferon-stimulated genes are

- differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. Hepatology (in press)
- 2) T Terashima, T Yamashita, K Arai, H Sunagozaka, M Kitahara, H Nakagawa, T Kagaya, E Mizukoshi, M Honda, S Kaneko. Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib. Hepatol Res (in press)
 - 3) H Takayama, H Misu, H Iwama, K Chikamoto, Y Saito, K Murao, A Teraguchi, F Lan, A Kikuchi, R Saito, N Tajima, T Shirasaki, S Matsugo, KI Miyamoto, S Kaneko, T Takamura. Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P gene via an AMPK-FoxO3a Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes. J Biol Chem 289(1):335-45, 2014
 - 4) S Sha Zeng, T Yamashita, M Kondo, K Nio, T Hayashi, Y Hara, Y Nomura, M Yoshida, T Hayashi, N Oishi, H Ikeda, M Honda, S Kaneko. The Transcription Factor SALL4 Regulates Stemness of EpCAM-positive Hepatocellular Carcinoma. J Hepatol 60(1):127-34, 2014.
 - 5) E Kobayashi, E Mizukoshi, H Kishi, T Ozawa, H Hamana, T Nagai, H Nakagawa, A Jin, S Kaneko, A Muraguchi. A new cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. Nature Medicine 19(11):1542-6, 2013.
 - 6) M Higashimoto, Y Sakai, M Takamura, S Usui, A Nasti, K Yoshida, A Seki, T Komura, M Honda, T Wada, K Furuichi, T Ochiya, S Kaneko. Adipose tissue-derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression. Eur J Immunol 43(11):2956-68, 2013.
 - 7) H Takamura, S Nakanuma, H Hayashi, H Tajima, K Kakinoki, S Sakai, I Makino, H Nakagawara, T Miyashita, K Okamoto, K Nakamura, K Oyama, M Inokuchi, I Ninomiya, H Kitagawa, S Fushida, T Fujimura, I Ohnishi, M Kayahara, T Tani, K Arai, T Yamashita, T Yamashita, H Kitamura, H Ikeda, S Kaneko, Y Nakanuma, O Matsui, T Ohta. Evaluation of eligibility criteria in living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma by α -SMA-positive cancer-associated fibroblasts. Oncol Rep 30(4):1561-74, 2013.
 - 8) A Seki, S Y akai, T Komura, A Nasti, K Yoshida, M Higashimoto, M Honda, S Usui, M Takamura, T Takamura, T Ochiya, K Furuichi, T Wada, S Kaneko. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. Hepatology 58(3):1133-42, 2013.
 - 9) F Arihara, E Mizukoshi, M Kitahara, Y Takata, K Arai, T Yamashita, Y Nakamoto, S Kaneko. Increase in CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its

- impact on prognosis. Cancer Immunol Immunother 62(8):1421-30, 2013.
- 10) K Kimura, Y Nakamura, Y Inaba, M Matsumoto, Y Kido, SI Asahara, T Matsuda, H Watanabe, A Maeda, F Inagaki, C Mukai, K Takeda, S Akira, T Ota, H Nakabayashi, S Kaneko, M Kasuga, H Inoue. Histidine augments the suppression of hepatic glucose production by central insulin action. Diabetes 62(7):2266-77, 2013.
- 11) T Shirasaki, M Honda, T Shimakami, R Horii, T Yamashita, Y Sakai, A Sakai, H Okada, R Watanabe, S Murakami, M Yi, SM Lemon, S Kaneko. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. J Virol 87(9):5270-86, 2013.
- 12) M Honda, T Yamashita, T Yamashita, K Arai, Y Sakai, A Sakai, M Nakamura, E Mizukoshi, S Kaneko. Peretinoin, an acyclic retinoid, improves the hepatic gene signature of chronic hepatitis C following curative therapy of hepatocellular carcinoma. BMC Cancer 13:191, 2013.
- 13) T Ueda, M Honda, K Horimoto, S Aburatani, S Saito, T Yamashita, Y Sakai, M Nakamura, H Takatori, H Sunagozaka, S Kaneko. Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling. Genomics 101(4):238-48, 2013.
- 14) 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 57(4):1484-97, 2013.
- 15) 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 57(4):1448-57, 2013.
- 16) Y Hodo, M Honda, A Tanaka, Y Nomura, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, E Mizukoshi, A Sakai, M Sasaki, Y Nakanuma, M Moriyama, S Kaneko. Association of Interleukin 28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. Clin Cancer Re 19(7):1827-37, 2013.
- 17) T Otoda, T Takamura, H Misu, T Ota, S Murata, H Hayashi, H Takayama, A Kikuchi, T Kanamori, KR Shima, F Lan, T Takeda, S Kurita, K Ishikura, Y Kita, K Iwayama, KI Kato, M Uno, Y Takeshita, M Yamamoto, K Tokuyama, S Iseki, K Tanaka, S Kaneko. Proteasome dysfunction mediates obesity-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. Diabetes 62(3):811-24, 2013.
- 18) T Oze, N Hiramatsu, E Mita, N Akuta, N Sakamoto, H Nagano, Y Itoh, S Kaneko, N Izumi, H Nomura, N Hayashi, T Takehara. A multicenter survey of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin

combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. Hepatol Res 43(1):35-43, 2013.

19) T Yamashita, S Kaneko. Treatment strategies for hepatocellular carcinoma in Japan. Hepatol Res 43(1):44-50, 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

特になし

HBV感染マウスを用いたHBV cccDNA制御に関する研究

分担研究者：今村 道雄 広島大学病院 消化器・代謝内科 診療講師

研究要旨：HBVのcccDNAを制御または排除する新規治療法の開発には、その有効性の評価が可能となるモデル動物が必要である。HBV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて肝臓内cccDNAを定量するシステムを構築することにより、cccDNAを制御または排除する治療法の開発に有用なものとなる。HBV感染マウスの肝臓からDNA抽出、ヌクレアーゼ処理後にreal-time PCRにて測定することにより、肝臓内cccDNAを特異的に測定することが可能であった。高容量のEntecavirあるいはPegIFN α の単独投与により肝臓内cccDNAは低下しなかったが、両剤を併用投与することにより肝臓内cccDNAは著明に低下した。

A. 研究目的

HBV持続感染マウスを用いて肝臓内cccDNAを制御する治療法を開発する。

B. 研究方法

HBVを感染させたヒト肝細胞キメラマウスからヒト肝細胞を摘出しDNAを抽出しreal-time PCRにてHBV DNAを測定した。一部はS1ヌクレアーゼ処理後、real-time PCRにてcccDNAを測定した。またマウスに2 mg/kgのEntecavir（連日経口投与）、30 μ g/kgのPegIFN α （週2回皮下注）を単独あるいは併用投与し、肝臓内HBV cccDNA量を測定した。

（倫理面への配慮）

投与する血清は患者の同意が得られているものを使用した。

C. 研究結果

抽出したDNAをヌクレアーゼ処理し、

primerを17塩基から25塩基に伸ばしPCRを行うことにより、血中HBV DNAは検出されず、マウス肝臓内のcccDNAを特異的に検出することが可能となった。HBV患者血清投与8週後、マウス血中HBV DNAは 10^{10} copy/mL、肝臓内cccDNAは6.02 copies/hepatocyteであった。ETVまたはPegIFN α を12週間投与したところ肝臓内cccDNAはそれぞれ5.1、4.7 copies/hepatocyteであったが、両者を併用投与することにより肝臓内cccDNAは0.7 copies/hepatocyteに低下した。

D. 考察

高容量のentecavirおよびPegIFN α を併用投与することにより肝臓内cccDNAは低下した。Entecavirは比較的安全性の高い薬剤であり、高容量投与も今後考慮すべき治療法と思われた。