

E. 結論

HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて肝臓内 cccDNA を測定するシステムを構築した。高容量の entecavir および PegIFN α の併用療法により cccDNA が制御される可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochem Biophys Res Commun* 441:230-5, 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

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

抗HBV反応を増強する免疫賦活分子の探索

分担研究者：中本 安成 福井大学医学部内科学(2)領域 教授

研究要旨：宿主の免疫監視機構は肝細胞に表出している微量のB型肝炎ウイルス（HBV）抗原を正確に認識し特異的な免疫反応を誘導する。2年間の研究課題として、HBV表面抗原（HBsAg）のエピトープ（CTL-L^d拘束性HBs28-39を含む）が誘導する慢性肝炎において、ウイルス産生を制御する分子免疫機序について検討した。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径路が亢進（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。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）cccDNAは、ウイルスゲノムとすべての構成タンパクの鋳型になっているものの、その発現や制御の分子メカニズムは不明のままである。これまでウイルスタンパクの発現は、サイトカインなどの免疫機序によって制御されることが報告されてきたが、慢性に経過するHBV感染症において抗ウイルス作用に関わる免疫病態やcccDNAに及ぼす影響についての詳細な検討は行われて来なかった。本研究では、HBV慢性感染状態における抗ウイルス免疫の本態を解析するために、ウイルス蛋白（表面抗原HBsAg）の遺伝子導入マウスモデルを用いて、分子・細胞免疫機序について検討した。

B. 研究方法

既報のHBVに対する細胞障害性Tリンパ球エピトープ（L^d拘束性HBs28-39）を含む免疫反応が、慢性肝炎を発症するモデルが確立されている（Nakamoto Y, et al., J. Exp. Med. 188:341, 1998; Cancer Res. 64:3326, 2004）。本モデルにおいて、胸腺摘除、骨髄再構築、脾細胞移植の操作によって、慢性肝炎を誘導し約18ヵ月の経過で肝細胞がん（肝がん）を発症するという特長がある。本研究では、経時的に得られた肝組織を用いて、RNAレベルの網羅的発現解析（DNAチップ）を行った。また、発現変動を認めた分子についてタンパクレベルの検討として、Western blot法および免疫組織学的に検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験については、動物愛護と動物福祉の観点から適切な配慮を行うため、各法令に基づき当該研究を実施した。また、実施機関の倫理委員会あるいは実験動物委員会の審査と承認を得て行った。

C. 研究結果

1) 肝炎発症9ヵ月および18ヵ月後の免疫組織学的検討において、肝組織におけるHBsAgの染色性が著明に低下していた。

2) 経時的な網羅的発現解析において、クラスター#1-9に分類された。なかでも、クラスター5:274個の遺伝子群は肝炎の慢性期に持続的な発現亢進を示した(K-means Cluster Analysis; ANOVA)。

3) クラスター5に関するパスウェイ解析(Fisher's Exact Test)に基づいて、ケモカイン CCL5/CCR5分子およびその下流のSTAT3、NFκB経路の発現が亢進していることが明らかとなった。またこれらの発現亢進は肝炎慢性期を通じて持続していた。

4) CCL5/CCR5の下流シグナルにあたるRas/MAPK, Cdc42/Rac1/PAK1, RhoA, Crk, Rap1, PKCの発現亢進は認めなかった。

5) タンパクレベルの検討として、Western blot法においてSTAT3やNFκBp65/RelAの発現が肝組織で持続的に亢進していることが分かった。

6) 免疫組織学的な検討において、肝炎慢性期(3ヵ月目以降)の肝細胞でSTAT3の発現が亢進していた。

D. 考察

慢性肝炎モデルの経過中にHBVに対する抗ウイルス作用を発揮する分子病態を網

羅的発現解析により検討した。その結果、ウイルス抗原HBsAgの低下と逆相関する変動を示す細胞内シグナルとして、CCL5/CCR5およびその下流のSTAT3経路が示唆された。

CCL5についてはCD4陽性Tリンパ球が高発現することが知られている。昨年度の検討において、CD4陽性Tリンパ球がウイルスタンパクの抑制に関与しているという結果を得たこととも矛盾しない。さらに、その代表的な受容体であるCCR5の発現も同時に亢進していた。これらの結果は、慢性肝炎の病態においてこのケモカインリガンド/レセプターが活性化していることを示唆するものであった。

CCR5は肝細胞に発現していることが知られており、ウイルス産生や肝細胞の分化・生存に関与することが報告されている(J. Virol. 84:5860,2010; PLoS One 8:e53992,2013)。そこで、肝細胞内におけるCCL5/CCR5の下流で活性化しているシグナル分子を探索したところ、既報の多くの候補のなかで、STAT3経路が活性化していることが観察された。

STAT3経路に関しては、HBVの複製に関わっているとの報告が散見される(PLoS Pathog. 7:e1002159,2011; J. Virol. 86:9599,2012)。これらの事実から、ケモカイン CCL5/CCR5分子が肝細胞内のSTAT3経路を介してHBVのウイルス産生、cccDNAを制御している可能性が示唆された。

E. 結論

B型慢性肝炎モデルを用いた網羅的発現

遺伝子解析において、HBV産生を制御する免疫候補分子として、ケモカイン CCL5/CCR5 およびその下流の STAT3 経路が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S: Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013; 57: 1484-1497.

2) 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.* 2013; 62: 1421-1430.

3) Nakagawa H, Mizukoshi E, Iida N, Terashima T, Kitahara M, Marukawa Y, Kitamura K, Nakamoto Y, Hiroishi K, Imawari M, Kaneko S: In vivo immunological antitumoreffect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequencyablation. *Cancer Immunol Immunother.* 2014 (in press).

4) Miyake Y, Yamamoto K, Matsushita H, Abe M, Takahashi A, Umemura T, Tanaka A, Nakamuta M, Nakamoto Y, Ueno Y, Saibara T, Takikawa H, Yoshizawa K, Ohira H, Zeniya M, Onji M, Tsubouchi H; Intractable

Liver and Biliary Diseases Study Group of Japan: Multicenter validation study of anti-programmed cell death-1 antibody as a serological marker for type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatol. Res.* 2014 (in press).

2. 学会発表

1) Ohtani M, Suto H, Nakamoto Y: Clinical evaluation of patency capsule system in high risk patients for video capsule endoscopy. **Japan Digestive Disease Week 2013 (Tokyo)**; 一般; oral: Oct. 12, 2013.

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

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感染細胞のエピゲノム

分担研究者：橋本 真一 金沢大学医学保健研究域医学系 特任教授

研究要旨：HBV増殖感染および潜伏感染時においてエピジェネティックな制御がHBV cccDNAの遺伝子発現制御に関与していることが報告されている。しかしながらcccDNAの複製促進、抑制に関与する分子機構について詳細な検討はされていない。そこで臨床検体、Full length HBV DNAを発現する培養細胞系、またHBVを感染させたヒト型肝臓キメラマウスを用いて、cccDNAの複製制御についてエピジェネティックな観点から解明する。今年度は、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。

A. 研究目的

HBV 増殖感染および潜伏感染時においてエピジェネティックな制御がHBVcccDNAの遺伝子発現制御に関与していることが報告されている。しかしながら cccDNA の発現促進、抑制に関与する分子機構について詳細な検討はされていない。そこで今回、臨床検体、Full length HBV DNA を発現する培養細胞系、またHBVを感染させたヒト型肝臓キメラマウスを用いて、宿主ゲノム、HBV cccDNA のヒストン修飾や DNA メチル化の状態とその制御に関わるポリコム群やトライソラックス群タンパク複合体について検討し、cccDNA の潜在化機構、複製制御について解明する。

B. 研究方法

肝細胞株である HepG2, HBV 産生細胞株

HepG2.2.15.7 細胞からゲノムと mRNA をそれぞれ単離し、SAGE 法により遺伝子発現、また、HepG2、HepG2.2.15 の DNA メチル化メチル化の変化を Infinium Methylation Assay 法を用いて調べた。また、Hep38.7-Tet の系において ATP-dependent DNase 処理により cccDNA を単離し、cccDNA の CpG Island(1379-1625, 2268-2486) について DNA メチル化をバイサルファイト法にて調べた。

一方、エピゲネティック薬剤を用い HBV 複製について、ヒストンメチル化阻害剤 (BIX01294, Chaetocin) 及びヒストン脱アセチル化阻害剤 (SAHA, TSA)、DNA メチル化阻害剤 (5-aza-deoxycytidine) で NF- κ B 活性化剤 (prostratin) を HBV 感染細胞株 (Hep38.7, KHB、PXB キメラマウス由来ヒト肝細胞) を処理し HBV のコピー

数を測定した。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針の規程, 二種使用等拡散防止措置承認に関しては手続き済み。

C. 研究結果

HepG2 と HBV 感染細胞株である HepG2.2.15 の宿主 DNA メチル化の変化を調べた結果、メチル化に差があった領域はゲノム中 1,341 カ所、見出され、それらは、multicellular organismal development に関与する遺伝子領域であった。一方、Hep38.7-Tet の HBV コピー数を増加させる系において cccDNA のメチル化をバイサルファイト法にて直接測定したが、顕著な変化は観察されなかった。

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で HBV 感染細胞株 (Hep38.7, KHB 細胞) を処理したところ BIX01294, prostratin, SAHA で cccDNA の細胞当りのコピー数の増加が観察された。更に、PXB マウス由来新鮮ヒト肝細胞において同様の試薬を用いて HBV 複製に対する影響を調べた。その結果、ヒストンメチル化阻害剤, ヒストン脱アセチル化阻害剤で細胞内の HBV DNA の増加する傾向が観察された。しかし、prostratin は細胞の HBV DNA の量を低下させる傾向があった。

D. 考察

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。短期

間の培養や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。しかし、細胞種によってその効き方が異なっていた。実際には、細胞株は増殖性に富んでおり、臨床検体と異なることが考えられる。そこで今後、キメラマウス由来の肝細胞を使い、生体により近いと条件で実験する必要がある。今回のエピジェネティック薬剤を使用した HBV 複製では、細胞株、ヒト肝細胞で同様に HBV DNA が増加する傾向が観察されたが、prostratin においては、ヒト肝細胞についてだけ HBV 量を低下させた。prostratin は、CD4⁺T 細胞に感染している HIV を再活性化するが、健康な細胞へのウイルス感染を阻害することが知られている。また、proastartin は、エピジェネティック薬剤と相乗的に働くことが知られている。このことから HBV においても何らかの機構で複製を低下させている可能性が示唆され、今後、ヒト細胞による再現性も含めて詳細に検討する予定である。

E. 結論

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を用い HBV 複製について検討した結果、ヒストンアセチル化、メチル化が HBV の複製に影響を与えることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hashimoto, S., K. Ogoshi, A. Sasaki, J. Abe, W. Qu, Y. Nakatani, B. Ahsan, K. Oshima, F. H. Shand, A. Ametani, Y. Suzuki, S. Kaneko, T. Wada, M. Hattori, S. Sugano, S. Morishita, and K. Matsushima. Coordinated changes in DNA methylation in antigen-specific memory CD4 T cells. *J. Immunol.*, 190, 4076-4091 (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

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

HBVccc肝細胞株の樹立とHBVcccの制御機構

分担研究者：村上 清史 金沢大学医薬保健研究域医学系 分子遺伝学 研究員

研究要旨：HBVの持続感染と再活性化の鍵となるのは、pgRNA合成の鋳型となる核内HBVcccである。HBVccc生成にはHBx機能が必須であり、IFN α によるHBVccc阻害効果がHBV EnhI領域にあることが報告されている。しかしHBVcccに対するそれらの作用機作は未だ不明であり、高効率HBVccc生成系の樹立による分子生物学的な解析が必須である。また、HBV複製に関与する未知の宿主因子の同定はHBVcccおよびpgRNAの制御機構解明に必要である。計画2年度の研究では、初年度に引き続き、HBx ORF、HBV EnhI及びEnhII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。

A. 研究目的

細胞株を用いてHBVcccの維持機構を解明するとともに、HBx、転写因子（HNF4）、転写補助因子（CRB, p300）を導入する系を作成しcccDNA形成および遺伝子発現の調節機構を検討する。

種々の肝癌細胞株を用いてHBVcccの転写に関与する宿主因子を同定する。

B. 研究方法

HBxのsiRNAを作成し、HepG2.2.15細胞に導入してHBxがHBV複製に及ぼす影響を検討した。

野生型HBx、HBx-D5（転写活性化能を有しないHBxドメイン）、空ベクターをHepG2細胞に導入しRNAを抽出、マイクロ

アレイ法にて遺伝子発現パターンの包括的検討を行った。

Ingenuity Pathway Analysis (IPA)ソフトウェアを用いて、HBx導入が影響を及ぼす転写因子の同定を行った。

247例のHBVによる肝細胞癌組織とその背景肝のマイクロアレイによる遺伝子発現データを用いて、同定した野生型HBx関連遺伝子の臨床的意義を検討した。

C. 研究結果

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（図1）。

図1a. HBx発現量

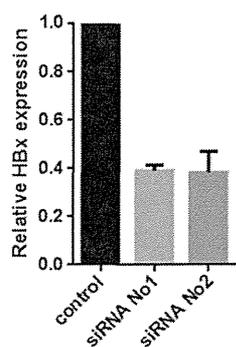
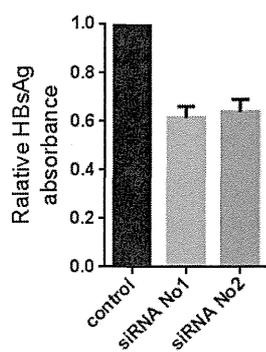
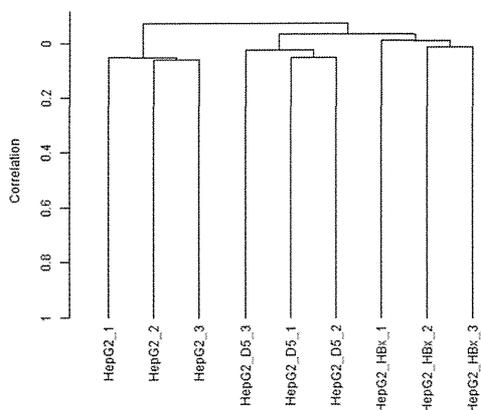


図1b. 培養液中HBs抗原量



遺伝子発現の包括的検討により、野生型 HBx 導入細胞は空ベクター導入細胞と異なった遺伝子発現パターンを有していた (図 2)。

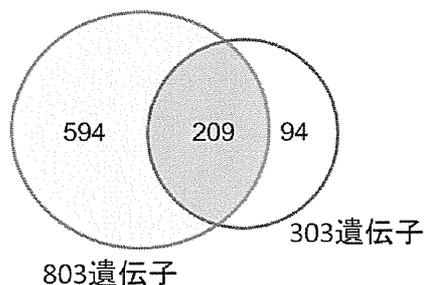
図2. Clustering analysis



発現パターンの比較により、野生型 HBx 関連遺伝子 773 個、HBx-D5 関連遺伝子 303 個が同定され、HBx-D5 関連遺伝子の 69% が野生型 HBx 関連遺伝子と重複していた (図 3)。

図3. HBx関連遺伝子とHBx-D5関連遺伝子

HBx関連遺伝子 (p<0.001, FDR<0.1) HBx-D5関連遺伝子 (p<0.001, FDR<0.1)



IPA 解析により、HBx 導入により活性される 14 個の転写因子、抑制される 10 個の転写因子が同定された。

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。また、背景肝の解析では HBV 複製の強さにより分類することが分かった。

D. 考察

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。さらに HBx は幹細胞性を有する肝細胞癌で高発現しており、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。

E. 結論

HBx は HBV の複製に必須の蛋白質であり、その発現が正常肝細胞におけるウイルス複製能の活性化および肝細胞癌細胞における幹細胞性の導入、維持に関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S. J

Viol. 2013 May; 87(9): 5270-86

2. 学会発表

- 1) Transcription Coactivator Function of Hepatitis B virus X protein. Oishi N, Xuyang W, Kaneko S, Murakami S. Internal Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Shanghai, 2013
- 2) Hepatitis B virus X protein and the oncogenic gene c-myc and Ras induce tumorigenic transformation and stem cell-like features in immortalized human hepatocytes. Oishi N, Xuyang W, Murakami S, Kaneko S. The Liver Meeting 2013, The American Association for the study of Liver Diseases (AASLD), 64th Annual Meeting and Postgraduate Course, Washington DC, 2013

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

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特異的免疫応答誘導の高効率化の試み

分担研究者：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 教授

研究要旨：臨床応用可能な効率よいHBV特異的獲得免疫応答誘導法の確立を目指し、マウスモデルにおける基礎実験を行った。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。今後、これらの免疫法の組合せによるHBV排除効果を、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で検討することを計画している。

共同研究者：石上 雅敏 名古屋大学医学部附属病院
伊藤 弘康 岐阜大学大学院医学系研究科病態情報解析医学

A. 研究目的

HBV cccDNA の制御と排除のためには、効率よいHBV特異的獲得免疫応答の誘導法の確立が必要である。現在、感染予防に使用されているHBs抗原ワクチンは、B型慢性肝疾患患者に使用した場合のウイルス制御効果が報告されているものの、効率の面で十分とは言えない。本研究では、高効率な免疫法の確立を目的として、マウスモデルにおける基礎研究を行った。

B. 研究方法

B10.D2マウス（H-2^d）をHBs抗原により免疫、脾細胞を回収し、HBs抗原特異的CTL活性、Dimer Xを用いたHBs28-39

（HBs抗原28-39番目のアミノ酸よりなるL^d拘束性エピトープ）特異的CD8陽性細胞比率、ELISPOT（IFN- γ 陽性細胞を検出）によるHBs特異的T細胞数などを解析し、HBs抗原特異的免疫応答の誘導効率を評価した。HBs抗原に加えて、 α -GalCerをアジュバントとして併用した場合、IDO阻害剤である1-MTを併用した場合の免疫応答誘導効率の変化について検討した。また、HBs抗原粒子（BNC：脂質二重膜上にlarge S蛋白を含む中空粒子、酵母由来）表面に抗体結合部位を有する構造物（ZZ-BNC）にCD11c抗体を付加し、DCへのターゲティングによる免疫応答誘導効率の変化についても検討した。

(倫理面への配慮)

マウスでの実験は同組換え DNA 実験安全委員会及び動物実験委員会での承認を取得した。

C. 研究結果

B10.D2マウス (H-2d) において、 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 HBs28-39特異的 CD8陽性細胞比率 (Dimer X) が40%程度であったのに対し、 α -GalCer 併用の場合は80%程度 (いずれも in vitro 刺激を3回施行後) と有意に上昇した。HBs 抗原+ α -GalCer に加え1-MT を併用した場合、HBs 抗原+ α -GalCer での HBs 抗原特異的 T 細胞数 (ELISPOT、 10^6 個あたりの IFN- γ 陽性細胞数) が40個程度、HBs28-39特異的 CD8陽性細胞比率 (Dimer X、in vitro 再刺激後) が26%であったのに対し、1-MT 併用では、それぞれ80個程度 (10^6 個あたり)、55%と、HBs 抗原特異的免疫応答の誘導効率は、さらに2倍程度に上昇した。CD11c 抗体付加 ZZ-BNC を用いた DC への HBs 抗原のターゲティングは、HBs 抗原特異的 T 細胞数 (ELISPOT)、及び HBs28-39 特異的 CD8 陽性細胞比率 (Dimer X) をともに上昇させることが示唆された。

D. 考察

抗原特異的免疫応答誘導効率を向上させるため、アジュバント、免疫作動薬の併用は有効な手段である。今回、用いた α -GalCer は咽頭癌、肺癌などでの臨床試験が進行中であり (国内)、1-MT について

は固形癌に対する臨床試験が進められている (国外)。また、抗原特異的免疫応答誘導に重要な役割を果たす DC への抗原のターゲティングも免疫応答誘導効率向上の有効な手段と考えられる。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し、さらに B 型慢性肝疾患患者への応用が可能かどうかの検証を行っていく予定である。

E. 結論

マウスモデルにおいて、HBV 抗原特異的免疫応答誘導の高効率化について検討し、 α -GalCer、1-MT の併用、抗原の DC へのターゲティングが有効な方法であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito H, Ando T, Ando K, Ishikawa T, Saito K, Moriwaki H, Seishima M. Inhibition of IDO expression enhances the induction of HBsAg specific CTLs. (Submitted)
- 2) Komori Y, Arisawa A, Takai M, Yokoyama K, Honda M, Hayashi K, Ishigami M, Katanano Y, Goto H, Ueyama J, Ishikawa T, Wakusawa Y. Ursodeoxycholic acid inhibits overexpression of P-glycoprotein induced by doxorubicin in HepG2 cells. Eur J Pharma-

col 724: 161–167, 2014.

3) Hayashi K, Ishigami M, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Ito Y, Kimura H, Katano Y, Goto H. A pediatric case of hepatitis B virus sub-genotype A2 in Japan. Clin J Gastroenterol 6:383–385, 2013.

4) Hayashi K, Katano Y, Masuda H, Ishizu I, Kuzuya T, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Ishikawa T, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Pegylated interferon monotherapy in patients with chronic hepatitis C with low viremia and its relationship to mutations in the NS5A region and the single nucleotide polymorphism of interleukin-28B. Hepatol Res 43: 580–588, 2013.

5) Honda T, Katano Y, Kuzuya T, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Ishikawa T, Toyoda H, Kumada T, Yamamoto K, Matsushita T, Kojima T, Takamatsu J, Goto H. Comparison of the efficacy of ribavirin plus peginterferon alfa-2b for chronic hepatitis C infection in patients with and without coagulation disorders. J Med Virol 85:228–234, 2013.

2. 学会発表

1) 伊藤弘康、安藤達也、石川哲也、清島満。インドールアミン酸素添加酵素の発現抑制を用いたHBV特異的細胞障害性T細胞誘導効果の検討。第60回日本臨床検査医学会学術集会。神戸,2013.

2) 山田達也、中川伸吾、吉住寧真、加納由貴、加納綾乃、石川哲也。ヒト肝癌細胞株間での各種炎症刺激に対するケモ

カイン産生能の比較。第60回日本臨床検査医学会学術集会。神戸, 2013.

3) 伊藤弘康、大瀧博文、安藤達也、安藤量基、石川哲也、森脇久隆、清島満。マウスB型急性肝炎モデルにおけるインドールアミン酸素添加酵素の解析。第49回日本肝臓学会総会。東京, 2013.

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

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感染症におけるNK-DC相互作用の解析

分担研究者：考藤 達哉 国立国際医療研究センター
肝炎・免疫研究センター 肝疾患先進医療研究室長

研究要旨：HBVの完全排除のためには、HBV複製抑制に加えて、免疫系が活性化することが必要条件である。樹状細胞（DC）がHBVを関知するシステムとして、TLRやC-typeレクチンなどが想定されるが、その詳細は明らかではない。前年度はin vitroでHBV複製を維持できる肝癌細胞株（HepG2.2.15）を用いて、ヒト末梢血から分離したDCサブセットと共培養することで、PDCはIFN- α/β 、IFN- λ を産生することを明らかにした。

本年度は、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。この系ではHBVゲノムの複製から粒子形成までを再現できる。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。

A. 研究目的

樹状細胞（DC）はHBVのゲノム、蛋白などを感知し、I型、III型IFNを産生し、免疫系の活性化に関与する。DCがHBVを関知するシステムとして、TLRやC-typeレクチンなどが想定されるが、その詳細は明らかではない。またNK細胞はIFN- γ 産生を介してHBV感染細胞の障害やHBV複製抑制に関与する。効率のよいDC-NK活性化がHBV複製の抑制に重要であると考えられるが、その詳細は明らかでない。今年度はHBV抑制効果に関与するDC-NK相互作用の機序と、その責任分子を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

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。HBV-Huh7を、ヒト末梢血から分離したDCサブセットとNK細胞と共培養し、I型、II型、III型IFNの産生と肝細胞ISGの誘導、及びHBV複製抑制効果との関連性を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は国立国際医療研究センター倫理審査委員会の承認を受けており、事前に被

験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える。

C. 研究結果

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。PDC は HBV-Huh7 との共培養で 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。IFN- α の産生量に依存して、HBV-Huh7 細胞内に ISG15、IFIT1、MxA などの抗ウイルス ISG が誘導された。ISG の誘導と HBV 複製抑制効果は関連した。

D. 考察

NK 細胞、PDC は HBV 感染肝がん細胞を異なる機序で認識することで活性化し、IFN を産生すると考えられた。NK 細胞と PDC の共存では IFN- α 、 γ 、 λ 産生量が増加したことより、NK-PDC 相互作用により活性化が増強される。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。

E. 結論

HBV の複製抑制に PDC と NK の相互活性化作用が関与しており、I 型、II 型、III 型 IFN の産生を介する肝細胞 ISG の誘導が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsubara, T., **Kanto, T.**, Kuroda, S., Yoshio, S., Higashitani, K., Kakita, N., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Hiramatsu, N.,

Kasahara, A., Tomimaru, Y., Tomokuni, A., Nagano, H., Hayashi, N. and Takehara, T., TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlates with angiogenesis. *Hepatology* 57: 1416-1425. 2013.

2) Kodama, T., Hikita, H., Kawaguchi, T., Saito, Y., Tanaka, S., Shigekawa, M., Shimizu, S., Li, W., Miyagi, T., **Kanto, T.**, Hiramatsu, N., Tatsumi, T. and Takehara, T., The Bcl-2 Homology Domain 3 (BH3)-only Proteins Bim and Bid Are Functionally Active and Restrained by Anti-apoptotic Bcl-2 Family Proteins in Healthy Liver. *J Biol Chem* 288: 30009-30018. 2013

2. 学会発表

1) Yoshio S, **Kanto T**, Kuroda S, Matsubara T, Sugiyama M, Murata K, Mizokami M, Hayashi N, Takehara T. Human BDCA3+ dendritic cells as a potent interferon- λ producer and an enhancer of helper T cell and natural killer cell responsive to hepatitis C virus. The Liver Meeting AASLD 64th Annual Meeting and Postgraduate Course, Washington, DC, USA, 2013.

2) Yoshio S, **Kanto T**, Kuroda S, Matsubara T, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Mizokami M, Hayashi N, Takehara T. Human BDCA3+ DCs contribute to the induction of intrahepatic ISGs as a potent interferon- λ producer in HCV infection. The Liver Meeting AASLD 64th Annual Meeting and Postgraduate Course, Washington, DC, USA, 2013

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

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

B型肝炎における自然免疫応答の解明

分担研究者：高橋 健 京都大学医学部附属病院 消化器内科 助教

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）のcccDNAは宿主の核内に長期にわたり安定して存在し、ウイルスRNA産生のための鋳型として機能する。cccDNAは現在の抗HBV治療薬の要である核酸アナログ製剤では駆除できず、cccDNAの存在こそがHBVの完全排除が困難な大きな原因となっている。cccDNAの制御と排除のための新たな治療法を確立するには、免疫系によるcccDNAの制御機構の解明が重要であるが、現在は不明な点が多い。本分担研究では、B型肝炎における宿主免疫応答、特に自然免疫の役割を解明する。具体的には、新規作成したB型肝炎自然発症モデルマウス由来の免疫細胞や、HBV感染ヒト肝細胞を研究対象とし、新たな遺伝子発現解析手法であるRNA-seqを用いてB型肝炎における自然免疫応答の包括的評価を行う。

A. 研究目的

従来B型肝炎においては、C型肝炎と異なり、I型インターフェロン誘導に代表される自然免疫応答がみられないと考えられてきたが、B型肝炎における自然免疫の役割は獲得免疫のそれと比較して未だ十分に解明されているとはいえない。そこで、本研究では新たな実験ツールを用い、B型肝炎での自然免疫活性化機構を解明することを目的とし、最終的にはcccDNA排除のための新たな免疫治療の開発へつなげる。

B. 研究方法

- ① 任意の時期に肝臓特異的に HBs 抗原を発現する B 型肝炎自然発症モデルマウスを作成し、肝炎惹起後に時系列で免疫担当細胞を採取する。
- ② ヒト肝細胞置換キメラマウスに HBV を

感染させ、HBV 感染肝細胞を採取する。

- ③ ①, ②で得られた検体の遺伝子発現変動を次世代シーケンサーRNA-seq で解析し、特に自然免疫関連遺伝子に着目して、その発現プロファイルの変化を評価する。

（倫理面への配慮）

動物実験に関しては「動物の愛護及び管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従う。当該所属機関の動物実験委員会に申請し承認を受けた後、実施する。

C. 研究結果

- ① 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。今後、両マウスを交配して得られたマウスでタモキシフェン投与による肝炎惹起を試みる。

② 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）。

③ 次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析：新たな実験手法であり、Pilot study による実験系の確立を試みた。健康人末梢血単核細胞を採取後、*in vitro* でサイトカイン（IFN α , IFN γ , TNF α ）刺激し RNA-seq を行った。多くのサイトカイン誘導遺伝子が検出され、特に IFN α 刺激では、既知の IFN 誘導性遺伝子のみならず、未知の遺伝子においても発現誘導が確認された。

D. 考察

すでに、HBV 感染ヒト肝細胞の準備と RNA-seq の実験系の確立は終了しており、この点に関しては今後の研究遂行にあたって特記すべき問題はないと考える。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。

E. 結論

タモキシフェン投与により肝臓特異的に HBs 抗原を発現するマウスを作成した。また、遺伝子改変マウスからは得られない HBV 感染ヒト肝細胞を準備した。自然免疫関連遺伝子の発現プロファイルの解析手段である RNA-seq の実験系の立ち上げを完了した。今後は、タモキシフェン投与により肝炎惹起を試みたうえで肝炎発症後のマウス由来の免疫細胞を採取し、HBV 感染ヒト肝細胞と併せて RNA-seq を行い、HBV 感染における自然免疫応答の有無やその活性化機構を包括的に解明する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Wieland SF, **Takahashi K**, Boyd B, Whitten-Bauer C, Ngo N, de la Torre JC, Chisari FV. Human plasmacytoid dendritic cells sense lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells *in vitro*. *J Virol.* 88(1):752-7, 2014.

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

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

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

分担研究者：加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究要旨：B型肝炎ウイルス（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。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）は血液中のウイルス粒子内では不完全2本鎖DNAとして存在している。肝細胞に感染すると核内で完全2本鎖となり、covalently closed circular DNA (cccDNA)と呼ばれる閉環らせん状のDNAとして存在する。このcccDNAは、B型肝炎寛解後、血中にHBs抗原やHBV-DNAが検出されない状態でも肝細胞内に存在し、免疫能が低下した時などにHBVが再活性化し肝炎が再燃する事が知られている。従って、B型肝炎の根本的治療にはcccDNAの排除が必要であるが、現行治療で用いられている核酸アナログなどの薬剤ではcccDNAを排除することは難しく、cccDNAが存在する肝細胞を免疫機構により排除することが必要である。

そこで本研究では、HBVの培養細胞での

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の解析を行った。培養細胞にHBV発現コンストラクトを導入し、アポトーシス刺激を加える事で、HBV複製が免疫細胞により誘導される宿主のアポトーシスに与える影響を評価した。

B. 研究方法

培養細胞での複製とウイルス粒子生成が可能な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を用い、HepG2細胞に遺伝子導入した。さらにHBV導入細胞をTNF- α とActinomycin Dで処理することによりアポトーシスを誘導した。HBV陽性細胞と陰性細胞は、HBV遺伝子導入細胞を固定した後に抗HBe抗体による染色を行いFlow Cytometryにより選別した。ア

ポトーシス細胞の検出は活性化された各種 Caspase を蛍光染色することにより行った。
(倫理面への配慮)

本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株およびHBV株であり倫理面での問題はない。HBV複製モデルに用いたHBV発現コンストラクトは患者血清中から分離された株を用いており大臣確認実験にはあたらない。

C. 研究結果

HBV 遺伝子型 Ae 株, Bj 株, C 株, D 株の 1.4 倍長ゲノムを持つコンストラクトを HepG2 細胞へ遺伝子導入することにより、約 7~10%の細胞が HBV 陽性であった。さらにこれらの細胞を TNF- α と Actinomycin D で処理することによりアポトーシスを誘導した。その結果、すべての遺伝子型の HBV 陽性細胞において陰性細胞よりも多くの細胞が活性化型 Caspase 陽性となり、HBV の複製によりアポトーシスの感受性が高くなっていると考えられた。それぞれの遺伝子型の株において、HBV 陰性細胞と陽性細胞のアポトーシス陽性率の比を比較したところ、遺伝子型 Ae 株では 3.0 倍、Bj 株では 3.6 倍、C 株では 2.4 倍、D 株では 2.9 倍と遺伝子型 Bj 株複製細胞で最も強くアポトーシスが誘導されていた。

さらにアポトーシスに関わる Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3/7 において、どの Caspase が遺伝子型 Bj 株の強いアポトーシス感受性に関わっているかを検討したところ、遺伝子型 Bj 株導入細胞ではすべての活性化型 Caspase の陽性率が高く、Caspase-8 のシグナルの感受性が高くなっ

ていると考えられた。

そこで、遺伝子型 Bj 株のアポトーシス感受性に寄与する HBV のゲノム領域を明らかにするために、遺伝子型 Bj 株の発現コンストラクトのプレコア領域に Stop コドンを導入し、HBe 抗原が生成されないコンストラクトを作成した (Bj/STP 株)。このコンストラクトを HepG2 細胞に導入し、アポトーシス刺激に対する感受性を通常の遺伝子型 Bj 株および遺伝子型 C 株と比較した。その結果、Bj/STP 株では通常の Bj 株よりも活性化型 Caspase 陽性細胞率が低下しており、Bj 株の HBe 抗原がアポトーシス誘導に対する高い感受性に関与していると考えられた。

D. 考察

遺伝子型 Ae 株, Bj 株, C 株, D 株を発現するコンストラクトを HepG2 細胞に導入し、TNF- α と Actinomycin D で刺激する事により、それらの HBV 株の複製がアポトーシス感受性に与える影響を検討した。その結果、Bj 株の複製細胞において、アポトーシス刺激に対する感受性が最も強くなっていた。さらにその高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。

E. 結論

今回の検討により、HBV 感染が免疫細胞によるアポトーシス誘導に対して感受性を上げていることが示された。その効果は HBV の遺伝子型により差があり、遺伝子型 Bj 株では最も強く、遺伝子型 C 株では最も低かった。これらの結果から、遺伝子型