

- Kakinuma S, Watanabe M. Comparison between Gd-EOB-DTPA MRI and CTHA/CTAP for detection of hypervasculular hepatocellular carcinoma: efficacy of diffusion weighing image and hepatobiliary phase. APASL Liver Week 2013 (Annual Meeting of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver), Singapore, June 2013.
21. Asahina Y, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired IL28B gene induction and expression of IFN λ 4 are closely associated with a non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C patients. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.
 22. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Moriishi K. 20th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, October 6-10., 2013
 23. Moriishi K. Exploitation of host functions by hepatitis C virus. 2013 Italy-Japan Liver Workshop “Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links”, Trapani, Italy, October 20-21, 2013
 24. 葛西宏威、吉村健太郎、安本順、山下篤哉、田中智久、竹田扇、森石恆司。Probe electrospray Ionization 質量分析法 (PESI-MS) を用いた HCV 感染細胞内脂質組成の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
 25. 山下篤哉、沈暉、田中智久、葛西宏威、森石恆司。Caffeic acid phenethyl ester とその類縁化合物による HCV ゲノム複製阻害。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
 26. 安本順、葛西宏威、吉村健太郎、山下篤哉、田中智久、竹田扇、森石恆司、B 型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の超微形態変化の解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
 27. 田中智久、葛西宏威、山下篤哉、森石恆司、日本産ウマの血清から分離した non-primate hepacivirus の性状解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
 28. 森石恆司、教育セミナー：HCV に近縁なヘパシウイルスの構造と日本産ウマからの検出、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
 29. 天野稜大、山下篤哉、葛西宏威、田中智久、前川伸哉、榎本信幸、津吹政可、森石恆司、Tyrphostin とその類縁化合物による C 型肝炎ウイルス複製阻害、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日～6 日、神戸
 30. 安 成皓、中島 謙治、玉井 美保、村上 努夢、伊藤 昌彦、鈴木 哲朗、田川 陽一：“ヒト iPS 細胞由来 *in vitro* 肝組織を用いた HBV 感染・増殖モデルの開発” 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、(2013)。
 31. Sungho Ahn and Yoh-ichi Tagawa : ”High functional *in vitro* liver model consisting of human ES / iPS cell-derived hepatic lineage cells and endothelial networks” Poster Presentation. 23rd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Singapore, (2013)
 32. Shinsuke Imamatsu, Sungho Ahn, Kenzo Bamba, Hirosato Okazaki, and Yoh-ichi Tagawa : “A xeno-free slow-freezing cryopreservation medium for primate ES/iPS cells.” Oral Presentation. TERMIS-AP, Shanghai, (2013)
 33. Shinsuke Imamatsu, Sungho Ahn, Kenzo Bamba, Hirosato Okazaki, and Yoh-ichi Tagawa. A xeno-free slow-freezing cryopreservation medium for primate ES/iPS cells、日本組織培養学会第 86 回大会、筑波。(2013)
 34. 今松 伸介、安 成皓、馬場 憲三、岡崎 宏悟、田川 陽一：“霊長類 ES/iPS 細胞の単一細胞での緩慢凍結保存” 第 65 回日本生物工学会大会、広島、(2013)
 35. Miho Tamai, Yoh-ichi Tagawa : ”Recapitulation of the hepatic function using *in vitro* liver model from

- murine ES/iPS cells” CBI学会 2013年大会、東京、(2013)
36. Miho TAMAI, Hiroshi SAKAI, Shinichi Miyagawa, Eijiro ADACHI, Yoh-ichi TAGAWA : ”Reconstruction of Liver Tissues Model Composed of Murine Hepatic Progenitor Cells and Fibroblasts in Dense Collagen Fibrils” 第20回肝細胞研究会、大阪、(2013)
37. Sungho Ahn, Yoh-ichi Tagawa : ”Reconstitution of human in vitro liver model consisting of ES/iPS cell-derived hepatic cells and endothelial networks” 第20回肝細胞研究会、大阪、(2013)
38. Yuuki Taniguchi, Je-Young Ryu, Yoh-ichi Tagawa : ”Chimeric analysis of EGFP and DsRed2 transgenic mice demonstrates polyclonal maintenance of pancreas and liver” 第20回肝細胞研究会、大阪、(2013)
39. Tsutomu Murakami, Miho Tamai, Yoh-ichi Tagawa : ”In vitro sinusoid-like networks consisting of hepatocytes, endothelial cells and hepatic stellate cells” 第20回肝細胞研究会、大阪、(2013)
40. Yi Shang, Miho Tamai, Yoichi Fujiyama, Yoh-ichi Tagawa : ”Construction of hepatocyte and endothelial cell co-culture system in hybrid sponge integrated with a microfluidic device” 第20回肝細胞研究会、大阪、(2013)
41. Chonnipa Nilubol, Miho Tamai, Hidemitsu Uchisawa, Yoh-ichi Tagawa : ”Suppression of ethanol-induced liver injury in mouse by a novel tripeptide consisted of non-proteinogenic amino acids” 第20回肝細胞研究会、大阪、(2013)
42. 玉井 美保、田川 陽一 : “マウス ES/iPS 細胞由来 *in vitro* 肝器官形成モデルにおける肝細胞極性” 第86回日本生化学会大会、横浜、(2013).
43. 岡本 徹、岡本貴世子、森 嘉生、福原崇介、森石恆司、松浦善治、C型肝炎ウイルスコア蛋白質の膜内配列切断の生物学的意義、シンポジウム「非常識なプロテアーゼ反応：膜内部でのタンパク質切断」、第86回日本生化学会、横浜、2013
44. Fukuhara F, Yamamoto S, Motomura T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Okamoto T, Matsuura Y. Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. The American Society for Virology, 32nd Annual Meeting, University Park, 2013
45. Okamoto T, Sugiyama Y, Ono C, Aizawa S, Ngoc PD, Kohwaki T, Hirooka E, Fukuhara T, Yamamoto M, Matsuura Y. Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses. Melbourne, 2013
46. Fukuhara T, Yamamoto S, Shiokawa M, Wada M, Ono C, Okamoto T, Matsuura Y. Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses. Melbourne, 2013
47. Ono C, Fukuhara T, Shiokawa M, Yamamoto S, Wada M, Okamoto T, Okuzaki D, Matsuura Y. Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses. Melbourne, 2013
48. 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、2013
49. 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、2013
50. 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、2013
51. 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わる宿主因子の解析、第61回日本ウイルス学会総会、神戸、2013

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

■平成25年度 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型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究

研究分担報告書

B型肝炎ウイルス転写複製機構の解析による治療法の開発

研究分担者 齋藤 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) の複製機構は、極めて複雑であり、依然として不明な点も多い。本研究では HBV の複製機構を利用して HBV 感染細胞でのみ治療用遺伝子を搭載した HBV シュードゲノムが複製する環状分子をアデノウイルスベクター (AdV) を応用して肝臓に導入する新規治療法の開発を目的としており、HBV 複製、特に環状二本鎖 DNA (CCC) 分子を効率的に検出するシステム開発が必須である。本年度は、HBV ゲノムそのもの、プレゲノム転写効率を上昇するために CMV プロモーターを応用したもの、HBV ゲノムをタンデムに 12 コピー有する mulcos 及び AdV を用いて HBV ゲノム複製検出システムの構築を行った。その結果、HBV ゲノムの 1.2 倍長を有するプラスミドでは HBV ゲノム複製は非常に非効率的でサザン法による検出は困難であったが、CMV プロモーターや mulcos を用いることにより、HBV ゲノム複製過程で出現する不完全環状二本鎖 DNA (RC)、直鎖状二本鎖 DNA (dsL) 及び CCC の検出に成功した。また、CMV プロモーターから HBV ゲノムの 1.2 倍長を発現する AdV も効率的に HBV ゲノム複製の検出が可能であったことから、以降の検討には AdV と mulcos を応用することとした。

A. 研究目的

アデノウイルスベクター(AdV)は、肝細胞癌由来の HuH-7 細胞を含む多くの細胞に高効率で遺伝子導入が可能であり、肝炎ウイルス研究には有用性の高いベクターである。また、齋藤は、特異的プロモーターから Cre を発現するスイッチユニットと Cre 依存的に直鎖状 AdV ゲノムから環状分子として発現単位が切り出される「標的ユニット」を同一分子上に持つ「切り出し発現型」AdV の作製に成功した。この技術を用いれば、100%の細胞に AdV から HBV 様の環状分子を生成することが可能となり、この環状分子上に治療用遺伝子を搭載すれば、HBV 感染細胞でのみ相補的に環状分子が増幅し、高度に治療用遺伝子が発現するシステムの構築が可能となる。本研究では、このシステムを構築するために、HBV の複製機構を AdV を用いて解析し、HBV の増殖に必須の遺伝子を治療用遺伝子と置換することで、安全性の高い治療用ベクターを作製する。

B. 研究方法

HBV ゲノムの 1.2 倍長の S コード領域に Pol 発現には影響を与えないように点変異を加えた S 変異体 (kS) の 1.2 倍長を持つプラスミド

を構築した。kS を単独でもつプラスミド(1.2 倍長-kS)、CMV プロモーターから kS を発現するプラスミド (CMVpro-kS) 及び kS の 1.2 倍長 DNA を 12 コピータンデムで持つ 40-50kb のコスミド (multicopy-containing cosmid: mulcos) (Ikeda, Trousdale and Saito, Gene, 71:19-21, 1988) を定法通りに作製した。また CMVpro-kS を挿入した AdV も定法通りに作製した。

これらのプラスミドあるいは mulcos の HuH-7 細胞への導入は Lipofectamine LTX により行った。AdV は MOI を揃えて感染した。3 日目に細胞を回収し、総 DNA を抽出後、HBV のプローブを用いて DNA 構造を Southern 法により解析した。プラスミドあるいは mulcos の解析では、細胞表面に残存する DNA と細胞内で複製後の HBV の DNA を識別するため、細胞内で脱メチル化された分子は認識せず、大腸菌由来のメチル化 DNA のみを認識し切断する DpnI 処理を行った。

(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

HBV ゲノムの複製は、HBV ゲノムから転写された HBV ゲノム全長を持つプレゲノム RNA が、コア内で HBV 逆転写酵素 (Pol) により DNA に転写されるという極めて希な機構により行われるため、ゲノム複製効率は低い。複製過程では、直鎖状二本鎖 DNA (dsL) が生成し、最終的には不完全二本鎖 DNA (RC) を持つ粒子が細胞外に放出される。また RC の一部が核内で完全二本鎖 DNA (CCC) となる。特に CCC は HBV 感染症で重要な分子であるが、培養細胞系で検出することは極めて困難である。

本研究では、通常の HBV ゲノム 1.2 倍長を用いてまず検討を行うこととしたが、安全性を考慮して S 領域に Pol 蛋白質には影響を与えない点変異を加えた S 変異体 kS を用いた。その結果、1.2 倍長-kS では僅かに RC が検出される場合があるものの、HBV ゲノム複製の検出効率は極めて低かった。

そこで、プレゲノム量を上昇するために CMV プロモーターから 1.2 倍長を発現する CMVpro-kS を用いたところ、RC、dsL 及び CCC の安定的な検出が可能となった。また、1.2 倍長を 12 コピータンデムに挿入した mulcos-kS でも同様に HBV ゲノム複製の検出が可能であった。しかし、プラスミドや mulcos-kS の検討では DpnI 処理により細胞の内と外の DNA を識別することが必要で、1.0kb 以下の DNA の解析は困難であり、使用できる制限酵素が限られる問題が残った。

次に CMVpro-kS を発現する AdV を用いて同様の解析を行った。この場合には、細胞外には DNA の残存が無いことが確認されていること (Pei et al., BBRC, 2012)、AdV は直鎖状二本鎖 DNA をゲノムとして持つため、環状分子である HBV とは区別が可能であることなどにより複製した HBV の DNA のみの検出が容易である。これらの理由により AdV-kS を用いた解析ではプラスミドや mulcos-kS よりも鮮明に複製した HBV ゲノムの確認が可能であった。

D. 考察

本年度は、検出が困難であった複製した HBV ゲノムを細胞の総 DNA を用いた Southern 法により検出することに成功した。1.2 倍長-kS では検出効率が極めて低かったが、CMV プロモーターを応用することでプレゲノム量を上昇した結果、複製 HVC ゲノムの検出が可能になった。また今回 CMVpro-kS と同程度の複製 HBV ゲノム検出が可能であった mulcos-kS のトラン

スフェクションした重量あたりの HBV ゲノム数は、ベクターバックボーンが多くを占める 1.2 倍-kS と比べると 2 倍程度にすぎないが、1 つの細胞に確実に 12 コピーの HBV ゲノムを導入可能なシステムであると言える。この mulcos-kS では HBV 本来のプロモーターからの HBV ゲノム複製の検出が可能であり、HBV ゲノム複製研究には有用性が高いと考える。

また、AdV は肝臓細胞に高い導入効率を示すことから、HBV ゲノム複製を検出するために非常に有用なツールであり、HBV ゲノム複製効率も高かった。

E. 結論

本年度の結果を受けて、HBV ゲノム複製検出システムには CMV プロモーターの AdV-kS と本来の HBV プロモーターの mulcos-kS を応用して、以降 HBV ゲノムでの欠失可能領域や HBV 蛋白質のトランスでの供給による HBV ゲノム複製効率の定量を行っていく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, Suzuki T and Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. *Scientific Rep.*, 2013, 3, 3575.
- 2 Maekawa A, Pei Z, Suzuki M, Fukuda F, Kondo S, Saito I and Kanegae Y. Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery. *Scientific Rep.*, 2013, 3, 1136.

2. 学会発表

- 1 近藤小貴、宿主 RNAi 経路に影響を与える virus-associated RNA を欠失したアデノウイルスベクターの高効率作製法、第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会、岡山、7 月 4-6 日、2013
- 2 近藤小貴、アデノウイルスベクターから発現しているウイルス由来 miRNAs は細胞増殖関連遺伝子を制御する、第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、10 月 3-5 日、2013

- 3 Zheng Pei, Aya Maekawa, Mariko Suzuki, Yumi Kanegae, Saki Kondo, Izumu Saito, Therapeutic strategy of HBV using VA-deleted adenovirus vectors dually expressing shRNA and interferon. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Fudan University, Shanghai, October 20-23, 2013.
 - 4 Yumi Kanegae, Aya Maekawa, Zheng Pei, Mariko Suzuki, Saki Kondo, Izumu Saito, Dual-safe adenovirus vector lacking virus-associated RNA genes enhanced shRNA activity. The 21th European Society of Gene and Cell Therapy collaborative Congress 2013, Palacio Municipal de Congresos de Madrid, Madrid, October 25-28, 2013.
 - 5 Saki Kondo, Aya Maekawa, Mariko Suzuki, Yumi Kanegae, Izumu Saito, First-generation adenovirus vector expresses viral-associated (VA) RNAs that disturb cellular gene expressions. The 21th European Society of Gene and Cell Therapy collaborative Congress 2013, Palacio Municipal de Congresos de Madrid, Madrid, October 25-28, 2013.
 - 6 Aya Maekawa, Zheng Pei, Mariko Suzuki, Saki Kondo, Izumu Saito, Yumi Kanegae, Very efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery: safer alternative to current vector. The European Society of Gene and Cell Therapy 2013 Annual Meeting, Palacio Municipal de Congresos, Spain/Madrid, October 25-28, 2013.
 - 7 近藤小貴、アデノウイルスベクターから常に発現している virus-associated (VA) RNA は標的細胞内の遺伝子発現に影響を与える、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11 月 10-12 日、2013
 - 8 鈴木まりこ、アデノウイルスベクターの目的遺伝子挿入領域と向きはベクター作製や発現効率に影響を与えるか: Dual 発現 vector 作製に向けた検討、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11 月 10-12 日、2013
 - 9 近藤小貴、アデノウイルスベクターの問題点: ベクターがコードする Virus-associated (VA) RNA は宿主遺伝子発現に影響を与える、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013
 - 10 裴崢、1つの細胞に多数の DNA コピーを導入できるマルチコピーを保持したコスミドのトランスフェクションにおける有用性: B 型肝炎ウイルスゲノム複製研究への応用、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013
 - 11 前川 文、細胞特異的長期発現持続型 mini-adenovirus vector (mini-AdV)の開発、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013
 - 12 鈴木まりこ、E3 領域への目的遺伝子の挿入はアデノウイルスベクターの作製効率に影響を与えるか: ベクター/目的遺伝子キメラ mRNA の生成、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

■平成25年度 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型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究

研究分担報告書

B型肝炎ウイルス複製の miRNA による制御

研究分担者 小池 和彦 東京大学医学部 (病)・教授

研究協力者 大塚 基之 東京大学医学部 (病)・助教

研究要旨： B型肝炎ウイルス (HBV) の完全排除は困難と考えられている。その原因は、使用可能な薬剤の作用機序が限られていることとHBV cccDNAの存在と考えられる。細胞内のmicroRNAは遺伝子発現を精密に制御しており、その機能の攪乱はウイルス複製能変化や細胞癌化といった病態に深く関与することが想定されている。これらのステップにおける肝細胞内microRNAの役割を解析し、その機能を調節することによって、劇的なHBV増殖抑制、排除、病態改善が可能となりうる。私達は、宿主microRNA let-7がHBV preS2領域のmRNAの配列と高い相同性をもつために、感染細胞ではHBV mRNAがlet-7のデコイとして作用する結果、本来のlet-7の機能が損なわれ細胞内環境の恒常性が攪乱されて、細胞癌化に寄与する可能性を見出した。今後もこの分子機構解明に基づくHBVの病態改善策とウイルス排除法の開発を継続する。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス (HBV) の完全排除は困難と考えられている。使用可能な薬剤の作用機序が限られている (インターフェロンによる mRNA 破壊と逆転写酵素阻害の2通り) ことと HBV cccDNA の存在が、その理由と考えられる。HBV-DNA の細胞内動態、特に核移行から cccDNA、ミニクロモゾーム形成過程について、HBV に特徴的な分子機構が明らかになりその調節因子が同定されれば、HBV cccDNA 排除を目指した新規創薬の標的となり得る。その阻害剤スクリーニング系を構築し各種化合物ライブラリー等から探索する事により新規機序の抗

HBV 薬の開発が期待される。同様に、non-coding RNA 発現、細胞分化度など細胞要因の制御による HBV 複製制御が示されれば、key となる細胞因子に介入する阻害剤の探索が可能となる。また、再活性化、肝発がんの新たな分子機構が明らかとなれば創薬のための分子基盤となる。

HBV 複製細胞を標的とする遺伝子治療用ベクターは、本研究グループで見出される治療用候補遺伝子などを組み込む事で難治性 HBV 感染症の新規治療法となることが期待される。細胞内の microRNA は遺伝子発現を精密に制御しており、その発現の攪乱はウイルス複製

能変化や細胞癌化といった病態に深く関わるものが想定されている。これらのステップにおける肝細胞内 microRNA の役割を解析し、その発現量を調節することによって、劇的な HBV 増殖抑制、排除、病態改善が可能となりうる。

B. 方法

1) pregenomeを含む数種類のHBV-RNAと宿主microRNAとの相同性を*in silico*で解析し、ウイルスRNAと相互作用する可能性の高い宿主のmicroRNAとHBV側の塩基配列を抽出した。

2) 抽出したmicroRNAの機能の変化をHBV配列発現下でのレポーターアッセイにて、また、標的蛋白発現量の変化をwestern blottingにて、検討した。

3) この変化がHBVの塩基配列と宿主のmicroRNAの相同性に依存していることを確認するために、HBV配列の当該部位に複数の変異を導入したコンストラクトを作製し、特異性を確認した。標的miRNAの過剰発現によるレスキュー実験も行った。

4) HBV mRNAが細胞内に存在すると、宿主のmicroRNAが本来の機能を発揮するために必要なタンパク複合体 (RISC) への取り込み量がへることを想定して、RISC中の当該microRNAの量をRISCの免疫沈降産物内のPCR (RISC-IP PCR) によって検討した。

C. 結果

1) HBV の preS-2 領域の塩基配列が、宿主の microRNA の一種で癌抑制機能を持つ let-7 配列と高い相動性を持つことをデー

タベース検索から見出した。この相動性は本邦に多い HBV の genotype B・C ともに認められた。

2) Let7 の機能を評価するためのレポーターと、genotype C 由来の HBV の preS-2 mRNA を発現するコンストラクト (蛋白は発現しないよう stop コドンを挿入したもの) を用い、HBV preS-2 mRNA 存在下では let7 の機能が損なわれることを確認した。さらに、let7 の本来の標的因子である癌遺伝子 LIN28B の蛋白発現量が HBV preS2 mRNA 存在下では増強することを見出した。

3) この効果は HBV preS2 の let7 認識配列に変異を入れると見られないこと・let7 を過剰発現するとレスキューされることから、HBV preS2 mRNA が宿主 miRNA である let7 の機能を抑制するためと考えられた。

4) miRNA のマシナリー構成因子である RISC 内の let7 量は HBV preS2 mRNA を発現した細胞では少なくなることから、HBV mRNA が細胞内に存在するとおとりとして働き、let7 の本来の機能が損なわれる可能性が示唆された。

D. 考察

HBVの完全排除は困難と考えられている。その原因は、使用可能な薬剤の作用機序が限られている (インターフェロンによるmRNA破壊と逆転写酵素阻害の2通り) であること、及びHBV cccDNAの存在と考えられる。HBVの複製においては細胞への侵入後、DNAからの転写、RNAへの逆転写、terminal proteinのRNAへの結合、packaging signal ϵ によるRNAのヌクレオ

カプシド内被胞化、逆転写、タンパク翻訳、等のいくつかの段階を経る必要がある。細胞内のmicroRNAは遺伝子発現を精密に制御しており、その発現の攪乱はウイルス複製能変化や細胞癌化といった病態に深く関わることが想定されている。これらのステップにおける肝細胞内microRNAの役割を解析し、その発現量を調節することによって、劇的なHBV増殖抑制、排除、病態改善が可能となりうる。今回、我々は、HBVのpreS-2領域のmRNA塩基配列が、宿主のmicroRNAの一種で癌抑制機能を持つlet-7を吸着しその機能を攪乱する結果肝癌でもその重要性が報告されている癌遺伝子LIN28Bの発現を増強することを確認した。これは、HBVのcccDNAから転写されるpreS2 mRNA領域の存在が細胞癌化に関与していること、「HBs抗原量が癌化と相関する」と近年報告されているが、実は抗原蛋白量ではなくHBV mRNA量がその病態の本体である可能性を示唆するものである。来年度以降、更にこれらのRNAを発現したtransgenic mouseを解析しウイルスRNAの存在による宿主恒常性の攪乱機構とその対処法を検討する。

E. 結論

細胞内環境の修飾による HBV 複製制御によって HBV 排除が可能とれば、HBV キャリアにおける肝不全、肝癌発生を防ぐのみならず、HBV キャリア状態を解消することとなり、その社会的インパクトは大きい。いっぽうで、核酸アナログで排除しきれないcccDNAから産生されるHBV mRNAが宿主miRNAの機能を攪乱することで細胞

癌化などの病態に関わるという本知見は、cccDNA 残存時の肝発癌予防法の開発にもつながると考える。来年度以降も、分子機構の解明に基づく病態改善効果のための方策とウイルス排除法の開発を続けていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Enooku K, Nakagawa H, Soroida Y, Ohkawa R, Kageyama Y, Uranbileg B, Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased serum mitochondrial creatine kinase activity as a risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer* 2014 Jan 13. doi: 10.1002/ijc.28720. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24420733.
- 2) Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, Font-Burgada J, Sakamoto K, Hayakawa Y, Taniguchi K, Umemura A, Kinoshita H, Sakitani K, Nishikawa Y, Hirano K, Ikenoue T, Ijichi H, Dhar D, Shibata W, Akanuma M, Koike K, Karin M, Maeda S. Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 Jan 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24395807.
- 3) Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Koike K. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects. *J*

- Gastroenterol** 2013 Nov 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID:24258409.
- 4) Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, Moriya K, Tsutsumi T, Koike K, Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cells. **Hepatol Res** 2013 Nov 14. doi:10.1111/hepr.12275. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24224477.
- 5) Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, Moriya K, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. **Int J Cancer** 2013 Oct 15. doi: 10.1002/ijc.28547. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24174293.
- 6) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. The impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus Infection. **Hepatol Res** 2013 Oct 11. doi: 10.1111/hepr.12258. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24125181.
- 7) Uchino R, Isayama H, Tsujino T, Sasahira N, Ito Y, Matsubara S, Takahara N, Arizumi T, Toda N, Mohri D, Togawa O, Yagioka H, Yanagihara Y, Nakajima K, Akiyama D, Hamada T, Miyabayashi K, Mizuno S, Kawakubo K, Kogure H, Sasaki T, Yamamoto N, Nakai Y, Hirano K, Tada M, Koike K. Results of the Tokyo Trial of Prevention of Post-ERCP Pancreatitis with Risperidone-2: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. **Gastrointest Endosc** 2013 Jul 30. doi:pii: S0016-5107(13)02093-2. 10.1016/j.gie.2013.06.028. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23910063.
- 8) Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Tsubouchi H, Kumada H. Discrimination of fibrotic staging of chronic hepatitis C using multiple fibrosis markers. **Hepatol Res** 2013 Aug 14. doi: 10.1111/hepr.12221. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23941604.
- 9) Shibata C, Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Yoshida H, Koike K. Inhibition of microRNA122 decreases SREBP1 expression by modulating suppressor of cytokine signaling 3 expression. **Biochem Biophys Res Commun** 2013 Jul 23. doi:pii: S0006-291X(13)01224-2. 10.1016/j.bbrc.2013.07.064. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23891753.
- 10) Minami T, Tateishi R, Shiina S, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, Koike K. Spontaneous clearance of serum hepatitis C virus RNA during the clinical course of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. **Hepatol Res** 2013 Jul

11. doi:10.1111/hepr.12203. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23841664.
- 11) Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, Fushimi K, Koike K. Acute liver disease in Japan: a nationwide analysis of the Japanese Diagnosis Procedure Combination database. **J Gastroenterol** 2013 Jun 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23783841.
- 12) Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, Mizokami M, Miyakawa Y, Koike K. High levels of HBV after the onset lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. **Clin Infect Dis** 2013 May 23. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23704123.
- 13) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. **J Gastroenterol** 2013 May 22. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23689989.
- 14) Mikoshiba N, Miyashita M, Sakai T, Tateishi R, Koike K. Depressive symptoms after treatment in hepatocellular carcinoma survivors: prevalence, determinants, and impact on health-related quality of life. **Psychooncology** 2013 May 19. doi:10.1002/pon.3300. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23686523.
- 15) Ohki T, Tateishi R, Akahane M, Mikami S, Sato M, Uchino K, Arano T, Enooku K, Kondo Y, Yamashiki N, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Matsuyama Y, Omata M, Ohtomo K, Koike K. CT with hepatic arteriography as a pretreatment examination for hepatocellular carcinoma patients: a randomized controlled trial. **Am J Gastroenterol** 2013 Apr 30. doi: 10.1038/ajg.2013.109. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23629602.
- 16) Inoue Y, Tomiya T, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ikeda H, Koike K. Induction of p53-Dependent p21 Limits Proliferative Activity of Rat Hepatocytes in the Presence of Hepatocyte Growth Factor. **PLoS One** 2013;8(11):e78346. PubMed PMID: 24223793
- 17) Hikita H, Enooku K, Satoh Y, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Tateishi R, Soroida Y, Sato M, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor for sustained responses to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1. **Hepatology Res** 2013;43(10):1005-1012. PubMed PMID: 23356977.
- 18) He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalpour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatziapostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, Koike K, Karin M. Identification of liver

- cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. **Cell** 2013;155(2):384-396. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.031. PubMed PMID: 24120137.
- 19) Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Kondo Y, Akanuma M, Yoshida H, Koike K. Regulation of the expression of the liver cancer susceptibility gene MICA by microRNAs. **Sci Rep** 2013 Sep 24;3:2739. doi:10.1038/srep02739. PubMed PMID: 24061441.
- 20) Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J. Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. **Biochem Biophys Res Commun** 2013;432(1):22-27. PMID: 23376718.
- 21) Koike K. The oncogenic role of hepatitis C virus. **Recent Results Cancer Res** 2014;193:97-111. PMID: 24008295.
- 22) Uchino K, Tateishi R, Nakagawa H, Shindoh J, Sugawara Y, Akahane M, Shibahara J, Yoshida H, Koike K. Uninodular combined hepatocellular and cholangiocarcinoma with multiple non-neoplastic hypervascular lesions appearing in the liver of a patient with HIV and HCV coinfection. **J Clin Virol** 2013;57(2):173-177. PMID: 23434197.
- 23) Ohno M, Shibata C, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, Kojima K, Akanuma M, Kang YJ, Yoshida H, Otsuka M, Koike K. The flavonoid apigenin improves glucose tolerance through inhibition of microRNA maturation in miRNA103 transgenic mice. **Sci Rep** 2013 Aug 30;3:2553. doi: 10.1038/srep02553. PubMed PMID: 23989853.
- 24) Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H. Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B. **Hepatology Res** 2013;43(6):596-604. PubMed PMID: 23131000.
- 25) Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region. **J Hepatology** 2013;58(5):875-882. PubMed PMID: 23321320.
- 26) Hikita H, Nakagawa H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Yoshida H, Omata M, Soroida Y, Sato M, Gotoh H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor of liver

- cancer development in chronic hepatitis C patients. **J Gastroenterol** 2013;48(3):366-373. PMID: 22790352
- 27) Tateishi R, Shiina S, Akahane M, Sato J, Kondo Y, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Goto T, Otomo K, Omata M, Yoshida H, Koike K. Frequency, risk factors and survival associated with an intrasubsegmental recurrence after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. **PLoS One** 2013 Apr 12;8(4):e59040. doi: 10.1371/journal.pone.0059040. Print 2013. PubMed PMID: 23593129; PubMed Central PMCID: PMC3625228.
- 28) Lo PH, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of a functional variant in the mica promoter which regulates mica expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. **PLoS One** 2013 Apr 11;8(4):e61279. doi: 10.1371/journal.pone.0061279. Print 2013. PubMed PMID: 23593449; PubMed Central PMCID: PMC3623965.
- 29) Minami T, Kishikawa T, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, Koike K. Meta-analysis: mortality and serious adverse events of peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **J Gastroenterol** 2013;48(2):254-268. PMID: 22790350.
- 30) Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, Koike K, Yatomi Y. Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 2013;57:417-418. PubMed PMID: 22707340.
- 31) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, Koike K. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- κ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. **Hepatology** 2013;57:162-170. PMID: 22898998.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1.特許取得
なし

■平成25年度 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型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究

研究分担報告書

非B非C肝に発生した肝細胞癌に対する
肝切除後の長期成績
—特にB型肝炎感染歴の意義について—

研究分担者 國土 典宏 東京大学医学部肝胆膵外科、人工臓器移植外科 教授

研究要旨:近年、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)や非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の増加に伴い、非B非C肝に発生する肝細胞癌は増加傾向にあると報告されている。しかし、非B非C肝の一部にはB型肝炎への既感染症例が含まれており、HBcAb陽性例の予後については不明な点が多い。当科の肝細胞癌に対する肝切除の成績をもとに、肝炎ウイルスの抗原・抗体別の予後を解析した。nBnC症例の3分の1にはアルコール多飲歴を認め、NASHやNAFLDなどHBV、HCV肝炎症例とは異なった背景が存在すると考えられる。従って、HBcAbの意義については非ウイルス性肝障害の因子を除いて考慮しなければならない。今回の検討ではB型肝炎の既感染の意義は限定されたものであると考えられた。

A. 研究目的

非B非C肝の一部にはB型肝炎への既感染症例が含まれており、HBcAb陽性例の予後への影響を明らかにする。

B. 研究方法

1997年から2011年に肝切除を当科で行った肝細胞癌患者1486例のうち初発でAblationなどの前治療を行っていない682例を対象とした。B型、C型、非B非C型肝炎ウイルス別の無再発生存率や全生存率を検討した(倫理面の配慮)

全手術対象患者は包括的同意書を得ており、また、非介入試験での予後調査である。

C. 研究結果

B型、C型、非B非C型肝炎ウイルス別の生存期間や無再発生存期間には差を認めなかった。非B非C型かつHBc抗体陽性41例の無再発生存率は陰性例101例に比較して有意に良好であった。しかし、これを非B非C

かつアルコール多飲歴のない90例について限定して解析したところ、HBc抗体の有無による予後の差は認められなかった。

D. 考察

非B非C症例の3分の1にはアルコール多飲歴を認め、NASHやNAFLDなどHBV、HCV肝炎症例とは異なった背景が存在すると考えられる。HBcAbの意義については非ウイルス性肝障害の因子を除いて考慮すると予後への影響は限定されたものだった。

E. 結論

本解析結果からは非B非C型肝炎でHBc抗体陽性例が陰性例に比較して予後が不良という結果は得られなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shindoh J, Hasegawa K, Matsuyama Y, Inoue Y, Ishizawa T, Aoki T, Sakamoto Y, Sugawara Y, Makuuchi M, Kokudo N. Low hepatitis C viral load predicts better long-term outcomes in patients undergoing resection of hepatocellular carcinoma irrespective of serologic eradication of hepatitis C virus. *J Clin Oncol* 2013; 31:766-73.
- 2) Kishi Y, Hasegawa K, Kaneko J, Aoki T, Beck Y, Sugawara Y, Makuuchi M, Kokudo N. Resection of segment VIII for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2012; 99:1105-12.
- 3) Hasegawa K, Kokudo N, Shiina S, Tateishi R, Makuuchi M. Surgery versus radiofrequency ablation for small hepatocellular carcinoma: Start of a randomized controlled trial (SURF trial). *Hepatol Res* 2010; 40:851-2.
- 4) Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, Hasegawa K, Beck Y, Sugawara Y, Makuuchi M, Kokudo N. Significance of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatectomy. *Ann Surg Oncol* 2009; 16:2795-804.
- 5) Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, Takahashi M, Inoue Y, Sano K, Imamura H, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol* 2008; 134:1908-16.

2. 学会発表

- 1) 阪本良弘、大道清彦、山本訓史、三瀬祥弘、石沢武彰、金子順一、青木琢、長谷川潔、菅原寧彦、國土典宏. 非B非C肝に発生した肝細胞癌に対する肝切除後の長期成績—特にB型肝炎感染歴の意

- 義について—第25回日本肝胆膵外科学会 平成25年6月12日—14日、栃木
- 2) 長谷川潔、青木琢、井上陽介、佐藤彰一、石沢武彰、高橋道郎、金子順一、阪本良弘、菅原寧彦、國土典宏. 肝臓外科におけるRCTエビデンス. 第67回日本消化器外科学会. 平成25年7月、富山

H. 知的所有権の出願・取得状況
特になし

■平成25年度 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型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究
研究分担報告書

1. HBV の遺伝子発現制御機構の解析 2. スタチンによる抗酸化、抗炎症因子発現誘導の解析

研究分担者 鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授

研究要旨：HBVの遺伝子複製、転写調節などの分子機構は未だ十分解明されていない。HBV Enhancer II/Basal core promoter領域に結合し、プレゲノムプロモーター活性に関与する宿主因子を同定した。その中のひとつACIN1は、遺伝子ノックダウンによってプレゲノムプロモーター活性及びHBc抗原発現が有意に低下した。一方、スタチンによる細胞保護作用を解析し、HBV複製細胞において、Fluvastatin等のスタチンが抗酸化、抗炎症因子の発現を誘導することを見出した。

A. 研究目的

慢性B型肝炎などHBV感染症の対する治療薬として核酸アナログ製剤、インターフェロンなどが使われているが、ウイルスDNAの完全排除は困難なこと、薬剤耐性ウイルスの出現などの問題があり、根治療法は確立されていない。感染細胞の核内HBV DNAを完全に排除できる新規治療薬が開発されれば、HBVキャリアからの肝不全、肝がんの発生を防ぎ、キャリア状態の解消に繋がる。そのために、新たな創薬標的の探索また阻害剤評価系の構築が重要である。

本年度は、HBVの遺伝子発現機構を明らかにするため、転写制御領域に結合しHBV遺伝子発現に関与する宿主因子を探索、同定した。また、スタチンによる抗酸化、抗炎症因子の発現誘導を解析した。

B. 研究方法

HBV Enhancer (Enh) II/Basal core

promoter (BCP) DNA配列を末端ビオチン化修飾の形で合成した。これをヒト肝がん細胞株HuH-7の核抽出物と混和し、Factor Finder kitを用いて、DNA結合分画を調製した。この分画をトリプシン処理によりペプチド化した後、LC-MS/MS解析によってタンパク質同定を行った。

HBV遺伝子型A, B株(HBV-Aeus, -Bj56)のゲノム1.24倍長を持つ各プラスミドpUC-HBAeus, pUC-HBBj56は国立国際医療センター溝上センター長から供与された。両プラスミドから、core promoter/enhancer領域遺伝子 (nt 900-1857) をFirefly luciferaseレポーターベクターへサブクローニングし、転写活性測定に用いた。各プラスミドをLipofectamine LTXを利用してHuH-7細胞に導入した。ウイルス抗原の発現はウエスタンブロットで、転写活性はdual luciferase assay系で測定した。

(倫理面への配慮)

株化細胞および既にクローン化された遺伝子を用いた研究であり該当しない。

C. 研究結果

1. HBVの遺伝子発現制御機構の解析

質量分析によって同定したHBV Enh II/BCP結合タンパク質群について、遺伝子発現との関連が考えられるものを選び各因子に対するsiRNAを用いてHBVプレゲノム転写活性への影響を調べた。その結果、ノックダウンによってHBV転写活性が有意に低下するもの2因子を見出した。そのうちの1つACIN1はノックダウンによってHBV遺伝子型A, Bの転写活性は40%程度まで低下した。また、HBVゲノム複製細胞のHBc抗原産生もノックダウンによって低下することを確認した。

2. スタチンによる抗酸化、抗炎症因子発現誘導の解析

8種類のスタチン (Rosuvastatin, Atorvastatin, Compactin, Fluvastatin, Lovastatin, Pitavastatin, Pravastatin, Simvastatin) による抗酸化、抗炎症因子の発現誘導効果を解析した。HBV複製細胞に各スタチンを1または3 uMで添加し3日後の細胞内Heme oxygenase 1 mRNAを測定したところ、Fluvastatin, Pravastatinで有意な発現上昇が認められた。同様にGlutamate cysteine ligaseの発現を調べたところ、Atorvastatin, Fluvastatin, Pitavastatin, Simvastatinで有意な発現上昇が認められた。

D. 考察

1. HBVの遺伝子発現制御機構の解析

HBV Enh II/BCP領域は、プレゲノムRNA、HBc抗原の発現に必須であるだけでなく、HBV関連肝発がん例でこの領域の変異が蓄積することから癌化にも関与すると考えられている。しかしながら、HBV遺伝子発現制御、病態発現に重要な宿主因子との相互作用は十分に理解されていない。本年度、Enh II/BCP結合しHBV転写活性を正に制御する因子としてACIN1 (Apoptotic Chromatin Condensation Inducer 1)を同定した。このタンパク質は、caspase 3で活性化されることによりクロマチン濃縮に働く他にsplicing-dependent multiprotein exon junction complexを構成することが知られている。HBV転写制御における分子機構を明らかにしたい。

2. スタチンによる抗酸化、抗炎症因子発現誘導の解析

スタチン類は細胞内でNrf-ARE経路の活性化を誘導し、抗酸化因子、抗炎症性因子のmRNA発現を亢進させることが知られている。HBV発現細胞において肝細胞保護作用を誘導することができれば、B型慢性肝炎等の肝疾患の治療法として非常に有効である。本年度、Fluvastatin等のスタチンによって、抗酸化、抗炎症因子の発現がHBV複製細胞で確かに誘導されることが示された。今後、肝障害動物モデルでスタチンによる細胞保護作用が認められるか明らかにしたい。

E. 結論

HBV の Enh II/BCP 配列に結合し HBV 転写活性を正に制御する宿主因子を同定した。Fluvastatin 等のスタチンによる抗酸化、抗炎症因子の発現誘導を見出した。

F. 研究発表

論文発表

1. Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, Suzuki T, Tagawa Y. An in vitro liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication. *J Biosci. Bioeng* (in press).
2. Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Saito I, Suzuki T, Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. *Sci Rep* (in press).
3. Mawatari S, Uto H, Ido A, Nakashima K, Suzuki T, Kanmura S, Kumagai K, Oda K, Tabu K, Tamai T, Moriuchi A, Oketani M, Shimada Y, Sudoh M, Shoji I, Tsubouchi H. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4. *PLOS ONE* (in press).
4. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Retinoids and rexinoids inhibit hepatitis C virus independently of retinoid receptor signaling. *Microbes Infect* (in press).
5. Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal Peptidase Complex Subunit 1 Participates in the Assembly of Hepatitis C Virus through an Interaction with E2 and NS2. *PLOS Pathog* 9; e1003589, 2013.
6. Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. *PLOS ONE* 8; e68992, 2013.
7. Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi SI, Matsumoto T, Matsuura T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamaguchi T, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Imoto M, Kojima S. HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor. *Sci Rep* 3; 3243, 2013.
8. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. *Microbes Infect* 15; 45-55, 2013.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

■平成25年度 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型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究
研究分担報告書

HBV複製に関与する長鎖ノンコーディングRNAの 同定と治療への応用

研究分担者 北川 雅敏 浜松医科大学医学部分子生物学講座 教授

研究要旨：本年度はHBV複製系を用い、マイクロアレイによって探索した結果、HBV複製により著明な発現上昇を示す6種のlncRNA (UHG1-6)、発現低下を示す6種 (DHG1-6)を見出した。今後はこれらのlncRNAの機能解析とこれらlncRNAを標的としたHBV複製阻害薬の創出を目指す。

A. 研究目的

本研究ではHBV複製に関与する長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA)を同定、機能解析し、未だに未知である肝発がんや再活性化機構を解明する。以て、HBV複製に関与するlncRNAを標的とした治療薬の創成を目指す。

B. 研究方法

Hu7細胞にHBVゲノムを導入した複製システム (鈴木哲朗班員と共同)を用いて、HBVにより発現変動するlncRNAをマイクロアレイで解析し、RT-PCRで確認した。

(倫理面への配慮)

本年度は患者サンプルを用いていないが、次年度以降に必要な応じて、本学ヒトゲノム倫理委員会にシンセイ、承認後に実験を行う。

C. 研究結果

HBVにより発現変動するlncRNAをマイクロアレイで解析し、RT-PCRで確認した結果、著明な発現上昇を示す6種のlncRNA (UHG1-6)、発現低下を示す6種

(DHG1-6)を見出した。一方で、泌尿器系腫瘍の発生と関連するlncRNA UCA1が著明に発現上昇することも見出した。

D. 考察

本探索で見つかった機能未知のlncRNA UHG1-6およびDHG1-6はHBVゲノムの複製制御に関与している可能性が高い。今後は、肝炎、肝癌患者における発現変動を解析し、検証する。一方で、これらlncRNAのノックダウンおよび過剰発現によるHBV複製やcccDNA形成への影響を解析する。以て、これらlncRNAの機能および発現制御機構を明らかにし、それを阻害する分子をスクリーニングし、lncRNAを分子標的とした全く新しい治療薬の創成が可能と考えられる。

E. 結論

本年度の研究により、HBVゲノムの複製制御に関与しているlncRNA候補12種類を見出した。今後これらの機能解析とlncRNAを標的としたHBV複製阻害薬の創出を目指す。

F. 健康危険情報

無

G. 研究発表

論文発表

1. Uchida, C., Hattori, T., Takahashi, H., Yamamoto, N., Kitagawa, M., Taya, Y.: Interaction between RB protein and NuMA is required for proper alignment of spindle microtubules. *Genes Cells*, doi: 10.1111/gtc.12119 in press.
2. Miyazaki, S., Kikuchi, H., Iino I., Uehara, T., Setoguchi, T., Fujita, T., Hiramatsu, Y., Ohta, M., Kamiya, K., Kitagawa, K., Kitagawa, M., Baba, S., Komno, K.: Anti-VEGF antibody therapy induces tumor hypoxia and stanniocalcin 2 expression and potentiates growth of human colon cancer xenografts. *Int J Cancer*, doi: 10.1002/ijc.28686 in press.
3. Kotake, Y., Ozawa, Y., Harada, M., Kitagawa, K., Niida, H., Morita, Y., Tanaka, K., Suda, T. and Kitagawa, M.: YB1 binds to and represses the p16 tumor suppressor gene. *Genes Cells* 18: 999-1006, 2013.
4. Kitagawa, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Niida, H. and Ohhata, T.: Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. *Cell Mol Life Sci*. 70: 4785-4794, 2013.
5. Suzuki, S., Ohashi, N. and Kitagawa, M.: Roles of the Skp2/p27 axis in the progression of chronic nephropathy. *Cell Mol Life Sci*. 70: 3277-3289, 2013.

学会発表

1. 丹伊田浩行、北川雅敏 : Role of HBO1 for nucleotide excision repair. The 2nd Symposium of Cell Cycle Control and Cell Fate、浜松、2014
2. 丹伊田浩行、塩谷文章、松本雅記、西谷秀男、北川雅敏 : ATM/ATR-dependent phosphorylation dissociates HBO1 from replication origin. 第36回日本分子生物学会年会 神戸 2013年

3. 大畑樹也、松本美香、Martin Leeb, 柴田進和、廣瀬哲郎、北川恭子、丹伊田浩行、北川雅敏、Anton Wutz:マウスES細胞におけるXist抑制機構解析. 第36回日本分子生物学会年会 ポスター発表 神戸 2013年

4. Tatsuya Ohhata, Masatoshi Kitagawa: Investigation of long non-coding RNAs involved in regulating X-chromosome inactivation. The 13th Hamamatsu-Kyungpook Joint Medical Symposium, Plenary talk, Deagu, Korea, 2013.

5. Tatsuya Ohhata, Mika Matsumoto, Martin Leeb, Shinwa Shibata, Tesuro Hirose, Masatoshi Kitagawa, Anton Wutz: Molecular dissection of Xist repression through Tsix dependent/independent manner in undifferentiated ES cells. Gordon research conference, Epigenetics. Rhode Island, USA, 2013

6. Masatoshi Kitagawa, Kyoko Kitagawa : A novel substrate for Fbw7, the tumor suppressive ubiquitin ligase. 第72回日本癌学会総会 横浜 2013年.

7. 丹伊田浩行、塩谷文章、松本雅記、北川雅敏 : Regulation of Licensing by Cell Cycle Checkpoint. 第65回日本細胞生物学会大会 シンポジウム 名古屋 2013年

8. 北川恭子、北川雅敏 : リン酸化とユビキチン化修飾による転写因子 GATA3 タンパク質の安定性制御機構、第65回日本細胞生物学会合同年会、名古屋、2013年.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

無