

201321013A

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

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

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小原 道法

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

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

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小原 道法

平成26(2014)年3月

# ツパイ全ゲノム解析に基づく B 型肝炎ウイルス

## 感染感受性小動物モデルの開発に関する研究

### 研究組織

<u>研究代表者</u>		
小原 道法	公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・感染制御プロジェクト	プロジェクトリーダー
<u>研究分担者</u>		
保富 康宏	独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	センター長
小原 恭子	国立大学法人鹿児島大学・越境性動物疾病制御研究センター	教授・センター長
石井 健	独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・アジュバント開発プロジェクト	プロジェクトリーダー
押海 裕之	国立大学法人北海道大学・大学院医学研究科	講師
村上 周子	公立大学法人名古屋市立大学・大学院医学研究科	助教
櫻井 遊	国立大学法人北海道大学・大学院薬学研究院	特任助教
日浅 陽一	国立大学法人愛媛大学・大学院医学系研究科	教授

# 目次

## I. 総括研究報告

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

小原 道法 .....1

## II. 分担研究報告

1. ツパイ全ゲノムの解析、免疫学的解析系の確立、治療薬を用いた動物モデルの評価  
小原 道法 ..... 1 1

2. HBV 高感受性ツパイ系統の樹立・獲得免疫系の解析  
保富 康宏 ..... 1 6

3. ツパイ免疫学的解析系の確立、感染・発症評価系の改良、効率の良い HBV-ツパイ感染実験モデルの確立  
小原 恭子 ..... 2 3

4. ツパイ免疫学的解析系の確立、動物モデルの評価  
石井 健 ..... 2 7

5. ツパイ自然免疫系の解析  
押海 裕之 ..... 3 2

6. ツパイ高感染性 HBV の馴化・選択  
村上 周子 ..... 3 5

7. 肝細胞を標的とした薬物送達システムの開発  
櫻井 遊 ..... 3 8

8. ツパイを用いた B 型肝炎治療ワクチンによる免疫療法の確立  
日浅 陽一 ..... 4 1

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 4 5

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 5 3

# I. 総括研究報告

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）

総括研究報告書

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

研究代表者：小原 道法 東京都医学総合研究所  
感染制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

**研究要旨：**B型肝炎ウイルス（HBV）は、難治性の肝疾患を引き起こす病原体として世界中で問題となっているが、有効な根治治療法は確立されていない。HBVはヒト、チンパンジー以外に適正な感染動物が存在せず、治療や病態解析に用いる実験動物モデルの確立が急務となっている。近年、ヒトの肝臓細胞を持つ免疫不全マウスが開発され、HBV研究の様々な領域で威力を発揮している。しかし、このマウスは獲得免疫系が機能しておらず、ウイルスの病原性解析や治療効果の判定に用いることはできない。

原猿類に分類されていたツパイは、HBV及びHCVに感染し1～3年で慢性肝炎、肝硬変、肝がんを発症する事が我々を含めた研究者から報告されている。ツパイは肝炎ウイルス感染動物実験モデルの候補として優れているものの、これまでその免疫応答を解析するツールは殆ど存在していない。治療薬の効果を評価するにはツパイの免疫応答機構を解析するツールの作製が必須である。そこで、①ツパイの全ゲノム解析し、この情報を基に免疫機構解析ツールを確立する。②ツパイ馴化HBV株と、HBV高感受性ツパイ系統を各々樹立し、両者を組み合わせることで、慢性肝炎や肝がんをより高頻度に発症する条件を確立する。③抗ウイルス活性を持つ化合物や治療ワクチンなどの効果を検証することで病態解析や薬理効果、治療効果の実証を可能とし、新規HBV感染治療法の確立において大きく貢献すると期待される。

**研究分担者：**

保富康宏：独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター センター長

小原恭子：鹿児島大学・共同獣医学部 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リーダー

押海裕之：北海道大学・大学院医学研究科 講師

村上周子：名古屋市立大学・大学院医学研究科 特任助教

櫻井 遊：北海道大学・大学院薬学研究

院 特任助教

日浅 陽一：愛媛大学大学院消化器・内分泌・代謝内科学講座 教授

**A. 研究目的**

HBV感染を防ぐワクチンや治療薬の開発には有効な実験動物モデルが必要であるが、これまでに感染感受性が報告された動物モデルはチンパンジーのみである。しかしチンパンジーは、動物愛護の観点から、実験動物としての使用が制限されており、安楽殺が禁止されているため実験終了後も飼育が必要である。以上の点から、チンパンジ

一に代わる実験動物モデルの確立が急務となっている。

原猿類に分類されていたツパイ（ツパイ科ツパイ目）にHCVが感染する事を見いだして報告してきた。ツパイはラット程度の大きさで寿命は4-7年である。HCVがツパイに感染すると1~3年で慢性肝炎、肝硬変、肝がんを発症する事を確認しており（JV 2010）、飼育コストも低い事からチンパンジーに変わる感染実験動物モデルとして期待されている（The turn of the shrew. Nature 2011）。また、HBVのツパイ初代肝臓細胞における増殖効率はヒト初代肝細胞のそれに匹敵し、個体としてのツパイもHBVに感受性である事が報告されている（Hepatology 1996）。

その一方で、ツパイを実験動物とする医学的研究はほとんど行われていないため、ウイルス感染動態の解析ならびに治療効果の評価を行う上で不可欠な免疫系に関する知見は、ほとんど得られてない。このように、ツパイはHBV感染実験モデルとして高いポテンシャルを持つが、実際の応用には、ツパイの免疫系ならびにHBV感染に対する免疫応答の解明と、効率の良いHBV感染の成立と、安定的な発症を可能とするためのHBV-ツパイ感染実験系の改良が必要である。また、B型肝炎ウイルスに対するワクチンは存在しており、現在も接種されている。しかしながら、現状のワクチンでは効果が十分ではなく、数回の接種が必要である。そのため、より効果的で安全なワクチンの開発のために、新規アジュバントの開発が重要であると考えられる。

## B. 研究方法

### 研究代表者（小原道法）

本研究では、①次世代シーケンスを用いてツパイの全ゲノム解析し、②この情報を基にツパイ免疫関連遺伝子の同定と、③その応答解析に必要な実験ツール（免疫系宿主因子のcDNAや特異抗体など）を調製した

上で、④HBV感染ツパイの免疫応答を解析する事を目指した。まず、1歳齢のツパイにHBVを $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  copies/head、静脈内接種を行い、その後、経時的な採血および剖検による臓器の採材を実施した。採取した血清はリアルタイムPCR法によるウイルス遺伝子の定量、肝臓は同方法によるウイルス遺伝子の定量およびHE染色による病理学的な解析を実施した。

### 研究分担者（保富康宏）

#### (1) 飼育管理

雄10頭と雌20頭を中国より輸入し、こちらの環境に順化させた。通常は昨年度作製した特性ケージにて個別飼育を行っている。飼料は新世界ザル用の固型飼料を基本とし、嗜好性のある副食として、リンゴ、バナナ、ウズラ卵を与えている。

#### (2) ケージ及び巣箱の改良

交配のための雌雄同居の際に、雌が雄から攻撃された場合に逃げ込む場所を確保するため、巣箱が2ヶ所に設置可能な交配時専用のケージの作製を試みた。巣箱についても中の状態が確認しやすく、腐食しにくいプラスチック製巣箱の作製を試みた。

#### (3) 繁殖・育成

出産予定日のある程度予測する必要性と雄から雌への攻撃の可能性を少なくするため、交配時の雌雄同居は5日間とした。妊娠期間が42~45日であるが、妊娠が成立した場合は4週目から体重が増加するため、体型の変化と合わせて妊娠を確定した。分娩後は仔ツパイの体重を毎日測定すると共に、授乳状況によって人工哺育を行っている。

#### (4) HBV 感染実験

接種するウイルス株は肝細胞キメラマウス血清で高い力価を持つ Genotype A のウイルス株を用いた。生後24時間以内の仔ツパイの腹腔内もしくは皮下へ $1 \times 10^7$ コピー/100  $\mu$ L のウイルスを接種した。接種後、定期的に採血を行い、血中ウイルス量の検出はS 遺伝子に設計された Taqman PCR に

よって実施した (J Med Virol 2004)。

#### (5) HBV 分子クローンの作製

ツパイに接種したウイルス株から DNA を抽出した。48クローンの全長 DNA 配列を決定し、コンセンサス配列の決定を試みた。得られたコンセンサス配列を基にして HBV ゲノム全長の1.24倍長の分子クローンの作製を試みた。

#### 研究分担者 (小原恭子)

2匹のツパイ肝臓から DNA を抽出し、次世代シーケンサーで全ゲノム配列の決定を行った。これらから予測される cDNA に基づき、各種免疫系・シグナル分子に対するペプチド抗体を作成した (134種)。

ツパイの繁殖には♀15匹、♂10匹を使用した。♀は15匹全頭出産できたが、♂は10頭中8匹であった。

FACS の解析機器は FACSVerse™ (Becton Dickinson) を導入した。

新生児への HBV 接種は、生後 0 日目に  $10^6 \sim 2 \times 10^7$  の HBV, genotype A2, C, J の腹腔内接種を行った。一部個体では、その後腹腔内か静脈内に HBV の追加接種を行った。生後 4 週目から各個体 0.5mL 採血を行ってウイルス量と ALT 値の測定をした。HBV 量は定量 PCR で、ALT は測定キット (和光) を用いた。その後 2 週間隔で測定を続けている。

#### 研究分担者 (石井健)

本研究では、自然免疫受容体である Toll 様受容体 9 (TLR9) のリガンドである CpG オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) と、多糖である  $\beta$  グルカンとの複合体を作製した。この複合体 (CpG-SPG) をヒト細胞に処理し自然免疫活性化能を解析した。動物実験として、マウスまたはカンクイザルにインフルエンザスプリットワクチンと共に接種し、アジュバント効果を評価した。マウスにおいては、免疫後インフルエンザウイルスを感染させる事で、感染防御能を評価した。

#### 研究分担者 (押海裕之)

ツパイに HBV を感染させ、感染後の各臓器に於ける自然免疫関連遺伝子の発現プロファイルを調べ、生体レベルでの自然免疫応答を解明した。また、ヒトやツパイ由来の肝細胞等を用い、HBV 感染時の自然免疫応答を試験管内のレベルでも検証した。

#### 研究分担者 (村上周子)

(1) HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウスより採取した血清と、急性期の HBV 感染患者血清について、HBV-DNA 量を揃えて高感度 HBs 抗原測定系 (HBsAg-HQ (富士レビオ); Shinkai N, et al. J Clin Microbiol. 2013) を用いて測定した。

(2) ツパイに HBV を接種後、HBV-DNA を検出した血清サンプルについて、超高感度 HBs 抗原測定系 (ICT-CLEIA (シスメックス); Takeda et al, J Clin Microbiol. 2013) により HBs 抗原が検出できるかを検討した。

#### 研究分担者 (櫻井遊)

これまで独自の脂質である YSK05 と呼ぶ脂質を用いてきたが、保存安定性に欠けるといった問題があった。そのため、リノレイン酸を出発物質として、新規の脂質 YSK13 の合成を行い、活性の比較を行った。MEND の siRNA キャリアとしての活性は健常マウスである ICR マウスに対して肝臓実質で発現している血清第七因子に対する siRNA を投与し、24 h 後の血清中の第七因子活性を測定することで評価した。HBV の pre-genomic RNA (pgRNA) に対する siRNA を封入し、細胞に 10-90 nM となるように添加したのち、HBV-DNA 量を測定した。HBV 感染ヒト肝臓キメラマウスに対しては、siRNA 量として 5.0 mg/kg となるように静脈内投与を行い、2 週間血清中 HBV-DNA 量の測定を行った。また、長期保存安定性試験のために、調製した MEND を 4°C で 105 日間まで保存し、上記と同様の方法で ICR マウスの肝臓での血清第



七因子のノックダウン効果を指標として評価した。

#### 研究分担者（日浅陽一）

研究は、臨床的検討と基礎的検討を行った。我々は、過去にHBs抗原ワクチンを治療に用いた臨床研究をしており、通常のHBs抗原ワクチン投与でHBs抗体ができない無反応者に対して、HBs抗原パルス樹状細胞を投与して、HBs抗体の誘導に成功した症例や、HBs抗原パルス樹状細胞をHBV感染者に投与して投与して、HBs抗原の陰性化およびHBs抗体陽転に成功した症例を経験している。また、HBV遺伝子を持続発現するトランスジェニックマウスを用いて、HBs抗原投与により、同抗原特異的なCTLを誘導できること証明している。また、HBs抗原に加えて、HBc抗原の投与により、HBc抗原特異的なCTLの誘導や、それに伴うHBV-DNAの低下作用が報告されている。このような背景から、まず臨床的検討として、GMPグレードのHBs抗原およびHBc抗原治療ワクチンの投与を、ペグインターフェロン(peg-IFN)治療と比較して行い、ワクチンによる免疫効果および治療効果について検討した。対象はB型慢性肝炎と診断された患者で、同意を取得後無作為に、HBs抗原+HBc抗原治療ワクチン群(ワクチン群)とPeg-IFN治療群(IFN群)の2群に振り分け治療を行った。また、基礎的研究として、HBVを持続感染させたツパイに、HBs抗原+HBc抗原治療ワクチンを30 mgを投与して、14日後のHBsおよびHBc抗体の発現について検討し、免疫治療効果を見た。

#### （倫理面への配慮）

患者由来の組織や血清の使用に当たっては各研究機関の倫理委員会において承認を受ける。提供者には「インフォームド・コンセント」を書面で行う。動物の管理は法律に従って行い、各研究機関の動物実験委員会の承認を得る。

#### C. 研究結果

##### 研究代表者（小原道法）

- (1) 次世代シーケンスを用いてツパイの全ゲノム解析し、95%とほぼすべての遺伝子を解析することに成功した。
- (2) 得られたゲノム情報から同定した、ツパイの免疫反応を担うサイトカインや細胞表面マーカー、自然免疫、シグナル分子など主要な免疫系宿主因子 134 種類を選択し、ペプチド抗体作成を行った。さらにこの配列情報を基に cDNA クローニング(84 種類終了)を行った。
- (3) 成人に感染後持続化したHBV・遺伝子型A株、遺伝子型B株、遺伝子型C株、HBV-J株、ギボンHBV株をヒト肝臓キメラマウスに感染させ高力化のウイルス血清を得た。これら感染血清をツパイへの感染源として用いた。
- (4) 成獣ツパイに遺伝子型A, C, JのHBVを接種し経日的に採血し経過を観察し、全てのツパイに感染が成立し、肝臓組織の異常所見は感染3日後という早期から現れることが明らかとなった。
- (5) 感染後7日目の個体からは、12個体中3個体(25%)で血清よりHBVの遺伝子が検出され、感染後14日目では、26個体中14個体(54%)よりウイルス遺伝子が検出された。

##### 研究分担者（保富康宏）

###### (1) 飼育管理

施設にツパイを導入した直後に数頭が死亡したが、それ以降はF1個体も含めて安定して飼育方法が確立された。

###### (2) ケージ及び巣箱の改良

交配時の雌雄同居用のケージとして、巣箱を2ヶ所に設置可能なケージを作製した。現時点では、同居時の怪我は確認されていない。巣箱の改良によって内部の観察が容易になり、保育行動にも変化は認められていない。

###### (3) 繁殖・育成

中国より輸入した個体をF0として交配

計画を立て実施した。これまでの出生数は68頭、死産・流産を含む死亡数は21頭で、保育中を含めて離乳できた個体は47頭（雄23頭、雌24頭）であった。妊娠が確認されていない雌2頭を除くと、妊娠までの平均交配数は1.9回、平均出生数は約3頭で、離乳率は約70%であり、良好な繁殖が確立された。

#### (4) HBV 感染実験

生後24時間以内または生後約2ヶ月の個体に、腹腔内、皮下もしくは静脈内にHBVを接種した。これまでに接種した個体数は、34頭で、13頭は非接種のコントロール群とした。血中ウイルス量の定量解析が終了した2個体からHBVゲノムDNAが検出され、定量結果は $8.2 \times 10^1$ コピー/mlと $8.0 \times 10^1$ コピー/mlであった。

#### (5) HBV 分子クローンの作製

ツパイに接種しているウイルス株から全長ゲノムDNAを増幅し、塩基配列決定を行ったところ、48クローン中24クローンが同一配列であった。GenBankに登録されているGenotype Aと比較した結果、Subgenotype A2であると確認された。得られたコンセンサス配列を基に、2種類の断片を作製し、pUC19ベクターに組み込むことで分子クローンを作製した。

#### 研究分担者（小原恭子）

作成した抗体は全てアフィニティー精製され、力価も50万倍程度(ELISA価)のものが得られた。今後はFACSなどで免疫反応の解析などに主に使用していく。

今年度までに生まれたツパイは60匹であり、HBV genotype A2(patient1, patient 4), genotype J, genotype Cを接種した。A2 patient1は3匹接種し、A2 patient 4は6匹である。また、Jは3匹、Cは1匹接種後、2週間おきに採血をおこなった。また、生後18週になった genotype C接種個体1匹あるいはJ接種個体2匹を解剖して解析したところ、全ての個体で脾臓又は肝臓にHBV-DNAが検出さ

れた。その他の個体については、さらに血中のウイルスDNA量とALTを継続して測定している。

また、HBV genotype A2 patient 4の感染クローン作成を行い、90%の核酸配列を決定した。

#### 研究分担者（石井健）

TLR9のリガンドであるCpG ODNは、ワクチンのアジュバントとして期待されている。しかしながら、強く自然免疫応答を誘導するCpG ODNは容易に凝集してしまい、臨床試験は限られたCpG ODNでのみ行われて来た。今回我々は、新たにβグルカンであるシゾフィラン(SPG)でCpG ODNをくんだ凝集塊のないナノサイズの新規複合体の作製に成功した。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や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。インフルエンザワクチンとCpG-SPGをマウスに接種する事で、その後の致死量のインフルエンザウイルス感染を完全に防ぐ事に成功した。CpG ODNに関しては、マウスと霊長類での反応性の違いが懸念されていたため、カニクイザルにインフルエンザワクチンとCpG-SPGを接種し、その後の獲得免疫応答を検討した。その結果、カニクイザルにおいても強力なアジュバントとして働くことがあきらかとなった。

#### 研究分担者（押海裕之）

HBV感染後のツパイの各臓器別の遺伝子発現を詳細に調べたところ、通常のウイルス感染で最初に生じるI型インターフェロンの遺伝子発現上昇は、HBV感染では観察されなかった。これは、HBVがI型インターフェロン産生を生体内において効率よく抑制することを示唆している。一方で、自然免疫のどの経路が活性化しているかを詳

細に検討したところ、ウイルス DNA を認識する経路は殆ど活性化しておらず、ウイルス由来の RNA を認識する DDX60 経路が肝臓特異的に活性化していることを発見した。また、ヒトの肝細胞を用いた試験管内の反応から、DDX60 分子が HBV の抑制に働くことを示唆する結果を得た。

また、HBV による自然免疫抑制機構についてヒト培養細胞を用いて詳細に調べたところ、細胞質内 DNA 認識経路が抑制されているのに対し、MyD88 依存的な経路は殆ど抑制されていなかった。

ウイルス感染時の自然免疫応答に於いて、TBK1 分子が非常に重要な働きをすることが知られている。我々はツパイとヒトとマウスの細胞を用い、TBK1 分子のリン酸化を活性化の指標として比較検討したところ、この TBK1 の活性化機構には細胞特異性や種得異性があることを発見した。これにより、TBK1 のリン酸化を指標とすることで、ツパイの臓器や組織や細胞のそれぞれに於ける自然免疫活性化機構を特定できると期待される。今後、TBK1 のリン酸化を指標として、HBV 感染後のツパイの各細胞での自然免疫応答経路の活性化状態を検討していく予定である。

#### 研究分担者（村上周子）

(1) 高感度 HBs 抗原測定系による測定の結果、HBV-DNA 量と HBsAg 値は相関を示した。特に患者血清には個体差があり、必ずしもウイルス量に対する HBsAg 値は一定ではないが、患者血清では 10 copy/mL、キメラマウス血清では  $10^3$  copy/ml まで検出できた。

(2) 超高感度 HBs 抗原測定系を用いた結果、HBV-DNA を確認したツパイ血清は 2-3 倍希釈で液量を調整することにより HBs 抗原を検出することができた。

#### 研究分担者（櫻井遊）

従来脂質の YSK05 および新規脂質 YSK13 の血清第七因子の阻害活性を比較した。そ

の結果、YSK05 の肝臓における 50%有効量  $ED_{50}$  は 0.06 mg/kg であった。一方で、YSK13 は 0.015 mg/kg と約 4 倍の活性を示すことが明らかとなった。YSK13 を含む MEND に HBV pgRNA に対する siRNA を搭載し、細胞系およびヒト肝臓キメラマウスにおけるウイルスの抑制活性を評価した。その結果、in vitro・in vivo の両方において約 2 週間ウイルス抑制効果が認められた。また、105 日間保存した YSK13 を含む MEND は、従来の YSK05 の場合とは異なり調製当初と粒子径などの物性に变化は見られなかった。また、このものをマウスに投与した際の血清第七因子の抑制活性も調製当初と変化がなく、保存安定性に優れたシステムの開発に成功した。

#### 研究分担者（日浅陽一）

臨床的検討において、登録された症例は、B型慢性肝炎と診断された患者151名であり、HBs抗原+HBc抗原治療ワクチンを投与したワクチン群は75名、Peg-IFNを投与して治療したIFN群は76名であった。

ワクチン群に有害事象はみられず、IFN群の約25%に発熱、倦怠感がみられた。ワクチン群63.9%は治療終了時にHBV-DNAが陰性(<250 copies/ml)、治療後24週でも62.5%が陰性であった。

基礎的検討では、HBVを投与してHBV-DNAが検出できているツパイのうち、9匹にHBs抗原+HBc抗原治療ワクチンを投与し(抗原投与群)、コントロールとして同治療ワクチンを接種していない7匹(抗原未接種群)と比較して、HBsおよびHBc抗体の発現について検討した。抗体の測定は投与した抗原ワクチンを用いたELISA用プレートを作成して比色定量した。定量は投与前の血清と、投与後14日の血清で行い、その定量値の差をグラフにして示す。その結果、抗原投与群では未接種群に比べて明らかにHBsおよびHBc抗体の発現がみられており、同治療ワクチンの投与により免疫修飾され、効果的に抗体の発現が得られることがツパイモ

デルで証明された。

#### D. 考察

本年度は計画通りに研究を実施した。得られた結果をさらに発展させ以下の研究を進める。

##### 研究代表者（小原道法）

ゲノム解析の遺伝子情報からツパイはマウスよりもヒトに近い事が推測された。ヒトにおいても HBV 感染患者の 10~20%は慢性肝炎が進行し、やがては肝硬変・肝細胞癌を発症することから、ツパイの病態の違いを決定する因子を特定することで、ヒトにおける病態の発症機序およびウイルス排除機構の解明につながるものと期待される。

##### 研究分担者（保富康宏）

免疫機能を有したまま唯一 HBV 感染モデルと成りえるツパイであるが、実験動物としては確立されていない状態である。本研究では、安定的にツパイを飼育管理・繁殖・育成方法について良好な結果が得られたことにより、安定的にツパイでの研究が推進可能となった。

解析の途中ではあるが、ウイルス接種を行った個体の一部では血中からウイルスゲノムが検出され、HBV 高感受性ツパイ系統の樹立に大きく期待できる。また、遺伝子配列の明らかな分子クローンが作製できたことから、今後は均一な品質のウイルスを使用していくことで、HBV のツパイに対する感受性の詳細な解析が行えると期待できる。

##### 研究分担者（小原恭子）

今年度はツパイの繁殖の確立に成功した。今年度はツパイでのウイルスの感染を定量 PCR で検出したが、村上班員らによる超高感度 HBs 抗原測定系の感度が良いという結果が得られているため、今後この系を用いてツパイ体内のウイルス遺伝子量と抗原蛋白量の動態を解析する必要がある。

同時に新生児には今年度は主に HBV を腹腔内に接種を行ったが、皮下接種も報告されており、今後投与法の検討を行う予定である。

##### 研究分担者（石井健）

本研究で新たに開発した核酸多糖複合体 (CpG-SPG) は強力なアジュバントとして働く事を、マウスとカニクイザルを用いた実験により示した。実際に、臨床で使用されているインフルエンザワクチンのアジュバントとしても効果が高かったことから、新規ワクチンのアジュバントとして有用であると考えられる。また、カニクイザルでの効果と、ヒト細胞における強力な自然免疫活性化能から、ヒトへの応用も期待される。しかしながら、安全性に関しては証明する事が困難であり、今後製剤化と共に安全性の確立が重要な課題である。また、インフルエンザワクチンのみならず、他のウイルスワクチンへの応用可能かをあきらかにしていくことが、今後の課題である。

##### 研究分担者（押海裕之）

DNA をゲノムに持つ DNA ウイルス感染時の自然免疫応答で主要な役割を持つ TBK1 分子の活性化を指標に研究を進めたところ、TBK1 の活性化機構には種特異性があり、ヒトとマウスに於いて異なっていることが示唆された。今後、ツパイとヒト、マウスを比較することで、ツパイの自然免疫システムがヒト型かどうかの検証をすることで、ツパイを用いた小型動物モデルの有用性を評価できると期待される。

我々が同定した Luple 分子は、自然免疫で働き、DNA ウイルス感染時の IL-6 産生に関与する。IL-6 は HBV の排除に働くことが示唆されており、Luple 分子が新たな治療薬の標的の候補分子の一つになりうることを期待される。

##### 研究分担者（村上周子）

高感度および超高感度 HBs 抗原測定系

により、低ウイルス量サンプルの HBs 抗原評価の可能性を確認した。今回の検討において患者血清でウイルス量に対する HBsAg 値に個体差が認められた。これは、感染の時相や HBs 抗体価の違いによるものであると示唆された。

HBV 感染キメラマウスにおいては、血清  $1-2\mu\text{l}$  を測定に用いた。実験動物より経時的に採取が可能な血液量は少量であるため、サンプルを希釈して測定できるこの系は極めて有用である。また、感染初期からの観察が期待できる。

ツパイによる HBV 高感染モデル・肝炎モデルを確立するため、今後はこの測定系を用いてツパイへの高感染 HBV 株の選定を行う。

#### 研究分担者（櫻井遊）

脂質組成の最適化により健常マウス肝臓におけるノックダウン活性が ED50 を指標に  $0.015\text{ mg/kg}$  を示す YSK13-MEND を構築することに成功した。これは、世界で最も強力な siRNA キャリアである pH 応答性リポソーム (Lipid nanoparticle; LNP) のノックダウン活性 ( $0.01\text{ mg/kg}$ ) に近い値を示しており、YSK13-MEND は強力なノックダウン活性を有することを示唆している。新規に合成した YSK13 は構造的に体内の分解酵素や加水分解の影響を受け辛いことが考えられる。このため、従来の脂質と比較して *in vivo* の環境でより高活性であり、また溶液中での保存で安定性を示したと考えられる。

今後はツパイ肝臓への核酸送達に向け、YSK05-MEND のツパイにおける有用性の評価が課題である。

#### 研究分担者（日浅陽一）

今回行った、HBs 抗原+HBc 抗原の治療ワクチンを用いた免疫治療により、IFN 治療に比べて、高率の HBV-DNA の陰性化、およびその作用の持続が得られることがわかった。また、副作用として ALT 上昇がみら

れるものの重篤例はなく、一過性であり、治療後はむしろ ALT の持続陰性化がみられ、肝炎の治療として有効であり、かつ高い安全性が確認された。

また、ツパイを用いた基礎的検討では、まずツパイに HBV が感染し、感染が持続することが確認され、その動物検体を用いて、HBs 抗原+HBc 抗原の治療ワクチンを投与することで、同抗原に対する抗体が1回の投与で確認された。このことは、HBs 抗原+HBc 抗原の治療ワクチンが免疫治療として有効であることを動物モデルで証明したと同時に、今後、さらに有効な治療プロトコルの作成や、抗原投与後の免疫機序の解析、HBs 抗原が HBs 抗体産生を促すメカニズムについての解析が、この HBV 持続感染ツパイモデルを用いて可能であることを示している。

#### E. 結論

ツパイに HBV を感染すると、肝炎を引き起こし、また持続的に感染することが明らかとなり、ツパイがヒトにおける HBV 感染モデル動物として有用であることが明らかとなった。持続感染を示したツパイに関してはウイルスの詳細な検討も必要と考えられる。加えて宿主側因子の解明の必要性もある。

HBV に対して自然免疫を維持したまま感受性を持つツパイにおいて飼育管理・繁殖・育成方法を確立した。また、HBV 感染の成立も確認され、HBV 分子クローンも作製されたことから、HBV 高感受性ツパイ系統の樹立に向けて大きく期待できることとなった。さらに、ツパイ馴化ウイルス株とウイルス高感受性ツパイ系統の樹立などを通じて、HBV-ツパイ感染実験系の精度を高め、ウイルスの病原性や種々の治療法の効果を、より効率よく詳細に解析できる様にしていく。ツパイは、チンパンジーよりも小型で寿命が短く、マウスよりもヒトに近い遺伝情報を持っており、今後 HBV 研究並びに各種治療薬の効果判定に威力を発揮す

る可能性が期待できる。

HBs 抗原+HBc 抗原の治療ワクチン接種による免疫治療は安全で、かつ HBV-DNA および ALT を持続陰性化する治療法となりうる事が証明された。また、HBV 持続感染ツパイモデルでも効率の良い HBs および HBc 抗体誘導が確認された。今後、同 HBV 持続感染ツパイモデルを用いて、HBs 抗原+HBc 抗原の治療ワクチンの免疫機序を解析していくとともに、ワクチンの投与量、投与方法を含めた、より治療効果の高い治療法の確立を目指す。

今回の研究により、新規アジュバントの開発に成功した。このアジュバントはマウスと霊長類における反応性の違いを克服出来た事から、ヒトへの応用が期待される。

また、新規 pH 応答性脂質 YSK05 を含む YSK05-MEND は、最適化によりマウス肝臓で従来より 10 倍以上高いノックダウン活性を示した。ツパイ肝臓への核酸医薬の導入に効果を発揮することが期待できる。

ツパイ動物モデルを用いた解析から、HBV は感染初期から自然免疫応答を抑制し特に I 型インターフェロン産生を阻害していることが解明された。また、HBV 感染初期の自然免疫応答として DDX60 分子に依存した経路は抑制を受けず活性化していた。培養細胞を用いた試験管内の解析から、MyD88の経路が抑制を受けておらず、今後、

ツパイ動物モデルを用いた生体内での解析により、MyD88の機能がHBV感染時に抑制を受けないかどうかの検証が重要である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

各分担研究報告書を参照

## H. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

(1) 出願日：平成25年6月21日、

出願番号： 特願2013-130908

発明の名称：HBV特異的人工DNAヌクレアーゼ

発明者：公益財団法人東京都医学総合研究所；小原道法

出願人：公益財団法人東京都医学総合研究所、株式会社フェニックスバイオ

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## II. 分担研究報告

ツパイ全ゲノムの解析、免疫学的解析系の確立、治療薬を用いた動物モデルの評価

小原 道法 東京都医学総合研究所

感染制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）は、難治性の肝疾患を引き起こす病原体として世界中で問題となっているが、有効な根治治療法は確立されていない。HBVはヒト、チンパンジー以外に適正な感染動物が存在せず、治療や病態解析に用いる実験動物モデルの確立が急務となっている。近年、ヒトの肝臓細胞を持つ免疫不全マウスが開発され、HBV研究の様々な領域で威力を発揮している。しかし、このマウスは獲得免疫系が機能しておらず、ウイルスの病原性解析や治療効果の判定に用いることはできない。

原猿類に分類されていたツパイは、HBV及びHCVに感染し1～3年で慢性肝炎、肝硬変、肝がんを発症する事が我々を含めた研究者から報告されている。ツパイは肝炎ウイルス感染動物実験モデルの候補として優れているものの、これまでその免疫応答を解析するツールは殆ど存在していない。治療薬の効果を評価するにはツパイの免疫応答機構を解析するツールの作製が必須である。そこで、①ツパイの全ゲノム解析し、この情報を基に免疫機構解析ツールを確立する。②ツパイ馴化HBV株と、HBV高感受性ツパイ系統を各々樹立し、両者を組み合わせることで、慢性肝炎や肝がんをより高頻度に発症する条件を確立する。③抗ウイルス活性を持つ化合物や治療ワクチンなどの効果を検証することで病態解析や薬理効果、治療効果の実証を可能とし、新規HBV感染治療法の確立において大きく貢献すると期待される。

そこで本研究では、ツパイの全ゲノムを解析行い、この配列情報を基にcDNAクローニング（84種類終了）、抗体作製（134種類終了）を進めた。成獣ツパイに遺伝子型A, C, JのHBVを接種し経日的に採血し経過を観察し、全てのツパイに感染が成立し、肝臓組織の異常所見は感染3日後という早期から現れることが明らかとなった。

## A. 研究目的

HBV感染を防ぐワクチンや治療薬の開発には有効な実験動物モデルが必要であるが、これまでに感染感受性が報告された動物モデルはチンパンジーのみである。しかしチンパンジーは、動物愛護の観点から、実験動物としての使用が制限されており、安楽殺が禁止されているため実験終了後も飼育が必要である。以上の点から、チンパンジーに代わる実験動物モデルの確立が急務と

なっている。

原猿類に分類されていたツパイ（ツパイ科ツパイ目）にHCVが感染する事を見いだして報告してきた。ツパイは中国・雲南省原産とされ、ラット程度の大きさで寿命は4-7年である。HCVがツパイに感染すると1～3年で慢性肝炎、肝硬変、肝がんを発症する事を確認しており（JV 2010）、飼育コストも低い事からチンパンジーに変わる感染実験動物モデルとして期待されている（The



turn of the shrew. Nature 2011)。また、HBVのツパイ初代肝臓細胞における増殖効率はヒト初代肝細胞のそれに匹敵し、個体としてのツパイもHBVに感受性である事が報告されている(Hepatology 1996)。

その一方で、ツパイを実験動物とする医学的研究はほとんど行われていないため、ウイルス感染動態の解析ならびに治療効果の評価を行う上で不可欠な免疫系に関する知見は、ほとんど得られてない。このように、ツパイはHBV感染実験モデルとして高いポテンシャルを持つが、実際の応用に向けて、ツパイの免疫系ならびにHBV感染に対する免疫応答の解明と、効率の良いHBV感染の成立と、安定的な発症を可能とするためのHBV-ツパイ感染実験系の改良を進める。

## B. 研究方法

本研究では、①次世代シーケンスを用いてツパイの全ゲノム解析し、②この情報を基にツパイ免疫関連遺伝子の同定と、③その応答解析に必要な実験ツール（免疫系宿主因子のcDNAや特異抗体など）を調製した上で、④HBV感染ツパイの免疫応答を解析する事を目指した。まず、1歳齢のツパイにHBVを $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  copies/head、静脈内接種を行い、その後、経時的な採血および剖検による臓器の採材を実施した。採取した血清はリアルタイムPCR法によるウイルス遺伝子の定量、肝臓は同方法によるウイルス遺伝子の定量およびHE染色による病理学的な解析を実施した。

### （倫理面への配慮）

動物実験については、「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。また、東京都医学総合研究所動物実験委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

1. 次世代シーケンスを用いてツパイの全ゲノム解析し、95%とほぼすべての遺伝

子を解析することに成功した。

2. 得られたゲノム情報から同定した、ツパイの免疫反応を担うサイトカインや細胞表面マーカー、自然免疫、シグナル分子など主要な免疫系宿主因子 134 種類を選択し、ペプチド抗体作成を行った。さらにこの配列情報を基に cDNA クローニング(84 種類終了)を行った。

3. 成人に感染後持続化したHBV・遺伝子型A株、遺伝子型B株、遺伝子型C株、HBV-J株、ギボンHBV株をヒト肝臓キメラマウスに感染させ高力化のウイルス血清を得た。これら感染血清をツパイへの感染源として用いた。

4. 成獣ツパイに遺伝子型A, C, JのHBVを接種し経日的に採血し経過を観察し、全てのツパイに感染が成立し、肝臓組織の異常所見は感染3日後という早期から現れることが明らかとなった。

5. 感染後7日目の個体からは、12個体中3個体(25%)で血清よりHBVの遺伝子が検出され、感染後14日目では、26個体中14個体(54%)よりウイルス遺伝子が検出された。

## D. 考察

ヒトにおいてもHBV感染患者の10~20%は慢性肝炎が進行し、やがては肝硬変・肝細胞癌を発症することから、ツパイの病態の違いを決定する因子を特定することで、ヒトにおける病態の発症機序およびウイルス排除機構の解明につながるものと期待される。

## E. 結論

ツパイにHBVを感染すると、肝炎を引き起こし、また持続的に感染することが明らかとなり、ツパイがヒトにおけるHBV感染モデル動物として有用であることが明らかとなった。持続感染を示したツパイに関して

はウイルスの詳細な検討も必要と考えられる。加えて宿主側因子の解明の必要性もある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sayeh Ezzikouri, Makoto Ozawa, Michinori Kohara, Naima Elmdaghri, Soumaya Benjelloun, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Recent Insights into Hepatitis B Virus-Host Interactions. *J. Med. Virology* (2014) in press.

2. Yuri Kasama, Takuo Mizukami, Hideki Kusunoki, Jan Peveling-Oberhag, Yasumasa Nishito, Makoto Ozawa, Michinori Kohara, Toshiaki Mizuochi, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. B-cell-intrinsic Hepatitis C virus expression leads to B-cell-lymphomagenesis and induction of NF- $\kappa$ B signaling. *PLoS ONE* (2014) in press.

3. Masaaki Arai, Yuko Tokunaga, Asako Takagia, Yoshimi Tobita, Yuichi Hirata, Yuji Ishida, Chise Tateno, Michinori Kohara. Isolation and characterization of highly replicable hepatitis C virus genotype 1a strain HCV-RMT. *PLoS ONE* 8(12):e82527. (2013).

4 Takeshi Wada, Michinori Kohara and Yasuhiro Yasutomi. : DNA vaccine expressing the non-structural proteins of hepatitis C virus diminishes the expression of HCV proteins in a mouse model. *Vaccine* 31(50):5968-74 (2013)

5.Asao Katsume, Yuko Tokunaga, Yuichi Hirata, Tsubasa Munakata, Makoto Saito, Hitohisa Hayashi, Koichi Okamoto, Yusuke Ohmori, Isamu Kusanagi, Shinya Fujiwara, Takuo Tsukuda, Yuko Aoki, Klaus Klumpp, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Ahmed EI-Gohary, Masayuki Sudo, Michinori Kohara : A Serine Palmitoyltransferase Inhibitor Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Human Hepatocytes. *Gastroenterology* 145(4):865-73 (2013)

6.Kazuya Shiogama, Ken-ichi Inada, Michinori Kohara, Hidemi Teramoto, Yasuyoshi Mizutani, Takanori Onouchi and Yutaka Tsutsumi. : Demonstration of hepatitis C virus RNA with high sensitivity in situ hybridization employing a locked nucleic acid probe in humanized liver of infected chimeric mice and in needle-biopsied human liver.

*Int. J. Hepatol.* ID249535, 7pages  
doi.org/10.1155/2013/249535 (2013)

7.Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Kazuhiro Kimura, Masayuki Saito and Michinori Kohara: 4E-BP1 regulates the differentiation of white adipose tissue. *Genes to Cells* 18(7):602-607 (2013) DOI: 10.1111/gtc.12059

8.Shinichiro Nakagawa, Yuichi Hirata, Takeshi Kameyama, Yuko Tokunaga, Yasumasa Nishitoh, Kazuko Hirabayashi, Junichi Yano, Takahiro Ochiya, Chise Tateno, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Kazuaki Inoue, Makoto Yoshiba, Akinori Takaoka and Michinori Kohara: Targeted induction of interferon- $\lambda$  in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. *PLoS ONE* 8(3):e59611(2013)

9. Watanabe T., Sugauchi F, Tanaka Y., Matsuura M., Yatsushashi H., Murakami S., Iijima S., Iio E., Sugiyama M., Shimada T., Kakuni M., Kohara M., Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- $\alpha$  in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut* 62(9):1340-6 (2013)

10. Aoki J., Kowazaki Y., Ohtsuki T., Okamoto R., Ohashi K., Hayashi S., Sakamaki S., Kohara M., Kimura K. : Kinetics of peripheral hepatitis B virus-specific CD8+ T cells in patients with onset of viral reactivation. *J. Gastroenterology* 48(6):728-37 (2013)

11. Yasui F., Sudoh M., Arai M., Kohara M.: Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication. *J. Medical Virology* 85(2):241-9 (2013)

### 2. 学会発表

1.Kyoko Tsukiyama-Kohara., Yutaka Amako., Michinori Kohara.: Chronic hepatitis C Virus model in Tupaia belangeri. HCV Animal Models and Vaccine Development 2013.5.17 Tallinn (Estonia)

2.Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Tomoko Fujiyuki, Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida, Yasushi Itoh, Kazumasa Ogasawara, Shosaku Hattori, Chieko Kai, Michinori Kohara: Protection of cynomolgus monkeys from H5N1 HPAI virus

challenge by recombinant influenza vaccine based on vaccinia virus vector. Options for the Control of Influenza VIII 2013.9.5-10. Cape Town (South Africa)

3. 徳永優子、平田雄一、棟方 翼、斉藤 誠、須藤正幸、小原恭子、小原道法：宿主因子阻害剤NA808と直接的複製阻害剤の併用による抗HCV活性 第72回日本癌学会学術総会 2013. 10. 3-5. パシフィコ横浜

4. Yuko Tokunaga, Asao Katsume, Tsubasa Munakata, Makoto Saito, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara : Anti-HCV activity of host inhibitor NA808 with DAAs. 20<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2013.10.6-10. Melbourne (Australia)

5. Tsubasa Munakata, Takeshi Haraguchi, Hideo Iba, Michinori Kohara. : A crosstalk between HCV replication and host lipogenesis is mediated by miRNAs. 20<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2013.10.6-10. Melbourne (Australia)

6. Takahiro Ohtsuki, Kiminori Kimura, Yuko Tokunaga, Michinori Kohara. Tissue macrophages are responsible for inflammatory liver disease in the hepatitis C virus transgenic mice. 20<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2013.10.6-10. Melbourne (Australia)

7. Naoki Yamamoto, Yuichi Hirata, Tsubasa Munakata, Chihiro Yamasaki, Chise Tateno, Michinori Kohara. : Establishment of efficient HBV infection and replication system *in vitro*. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses 2013.10.21. Shanghai (China)

8. Kyoko Tsukiyama-Kohara, Yuichi Hirata, Takahiro Sanada, Naoki Yamamoto, Fumihiko Yasui, Michinori Kohara. Development of Tupaia belangeri for small animal infection model of hepatitis B virus, according to the genomic research. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses 2013.10.20-23. Shanghai (China)

9. Makoto Saito, Makoto Ozawa, Fumihiko Yasui, Toru Sasaki, Tsubasa Munakata, Yoshimi Tobita, Risa Ito, Keisuke Munekata, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Akira Sakurai, Futoshi Shibasaki, Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida, Patrick C Reid, Kiichi Kubota, Hiroaki Suga, Michinori Kohara: Influenza viral hemagglutinin-targeted macrocyclic peptides as an antiviral agent. 7<sup>th</sup> Vaccine & ISV Congress 2013.10.27-29 Barcelona (Spain)

10. 棟方 翼、原口 健、伊庭英夫、小原道法：マイクロRNAによるC型肝炎ウイルス複製制御と宿主脂肪酸合成経路のクロストーク 第61回日本ウイルス学会 2013. 11. 10 神戸

11. 安井文彦、桑原一彦、飛田良美、棟方 翼、

斉藤 誠、七戸新太郎、迫田義博、喜田 宏、阪口薫雄、小原道法：GANPトランスジェニックマウスを用いたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスHA に対する汎クレード高親和性中和単クローン抗体の開発 第61回日本ウイルス学会 2013. 11. 10 神戸

12. 安井文彦、桑原一彦、飛田良美、棟方 翼、斉藤 誠、七戸新太郎、迫田義博、喜田 宏、阪口薫雄、小原道法：GANPトランスジェニックマウスを用いたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスHAに対する汎クレード高親和性中和単クローン抗体の開発 第61回日本ウイルス学会 2013. 11. 10 神戸

13. 菅田謙治、安永純一郎、三浦未知、小原道法、松岡雅雄：組換えウイルスを用いた抗HTLV-1ワクチンの作製とMacaque属での応用 第61回日本ウイルス学会 2013. 11. 10 神戸

14. 徳永優子、棟方 翼、斉藤 誠、勝目朝夫、須藤正幸、小原道法：肝臓選択的セリンパルミトイル基転移酵素阻害剤による抗HCV作用 第61回日本ウイルス学会 2013. 11. 12 神戸

15. 大槻貴博、木村公則、徳永優子、林 幸子、小原道法：C型肝炎トランスジェニックマウスにおいて肝臓内組織炎症性M2マクロファージが慢性肝炎を引き起こす 第61回日本ウイルス学会 2013. 11. 12 神戸

16. 安井文彦、宗片圭祐、倉石 武、服部正策、藤幸知子、米田美佐子、迫田義博、喜田 宏、甲斐知恵子、小原道法：カニクイザルのH5N1高病原性トリインフルエンザ組換えワクチニアワクチンの単回接種による長期防御効果の検討 第17回日本ワクチン学会 2013. 11. 30-12. 1 三重

17. 宗片圭祐、安井文彦、伊藤 靖、石井孝司、七戸新太郎、喜田 宏、小笠原一誠、小原道法：ワクチニアウイルスDis株を母体としたインフルエンザHA組換えワクチンの混合接種によるカニクイザルでの発症防御効果 第17回日本ワクチン学会 2013. 11. 30-12. 1 三重

18. 小原道法：ワクチニアLC16m8株 (HCV, SARS, Influenza) ベクター 第17回日本ワクチン学会学集会 2013. 11. 30 (三重)

19. Naoki Yamamoto, Tsubasa Munakata, Yasumasa Nishito, Yuji Ishida, Michinori Kohara: Analysis of HBV persistent infection and replication *in vitro*. 第36回日本分子生物学会 2013.12.3-6 神戸

20. Kimura Kiminori, Kohara Michinori: Tissue macrophages are responsible for inflammatory liver disease in the hepatitis C virus transgenic mice. 第42回日本免疫学会 2013.12.12 千葉

## G. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

1) 出願日：平成25年6月21日、出願番号：特願2013-130908  
発明の名称：HBV特異的人工DNAヌクレアーゼ  
発明者：公益財団法人東京都医学総合研究所；小原道法  
出願人：公益財団法人東京都医学総合研究所、株式会社フェニックスバイオ

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし