

ヒスパニック)を 2.5×10^5 個脾臓より移植し、移植後3週目、6週目、それ以降は1週間に1回、マウス血中ヒトアルブミン(h-A1b)濃度を免疫比濁法にて測定し、32または34週令(移植後28または31週)に剖検し、肝臓、血液を採取した。

また、昨年度作製した、同じドナー細胞を用いたHBV感染(14週間)、非感染cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウス(26週齢で剖検)の凍結保存肝臓組織を遺伝子発現解析、細胞サイズ測定に用いた。

cDNA-uPA/SCIDへミキメラマウスへのHBV感染

2YFを移植した14週令(移植後11週)のcDNA-uPA/SCIDへミキメラマウス11匹を、HBV長期感染試験(20週)に使用した。11匹のうち、5匹にHBV Genotype Cを眼窩静脈叢より 1.0×10^7 copies/mL 100 μ L接種した。残りの6匹はHBV非感染コントロールとして同様に飼育した。HBV感染の翌週から週に1回、動物にイソフルラン麻酔を施し、眼窩静脈叢より約50 μ Lを採血した。2 μ Lをh-A1b測定に、10 μ LをHBV DNAコピー数測定に用いた。

定量性リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現量の定量およびマイクロアレイ解析

HBV感染、非感染cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウス肝臓の以下に示す遺伝子の発現を昨年度報告の方法で real-time RT-PCR法により解析した。

マウス由来の肝臓線維化に關与す

ると思われる遺伝子 (α -SMA, mCD14, mHGF, mTNF α , mTLR4, mProcollagen type1, mTGFBR, mTGF β 1)、およびHBVの4週間感染によりこれまでキメラマウス肝臓で発現が変化することが報告されている一部の遺伝子

(hTNFRSF10C, hFAS、hPBK, hRRM2, hNCAPG、Tsuge M, et al. The Journal of Infectious Diseases 2011;204:224-8より)のprimerを作製し解析に用いた。primerは、ヒトとマウスに交差反応しないことを確認した。

また、HBV感染、非感染3匹ずつの Total RNAを用いて、Affimetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (株式会社バイオマトリックス研究所、千葉)マイクロアレイ解析を行った。

血清中ウイルス濃度測定

マウス血清中HBV DNA量を昨年度報告した方法で実施した。

キメラマウスの剖検、および病理学的検査

動物の安楽死確認後に剖検を実施し、血液と肝臓を採取した。肝臓の一部はホルマリン固定し、パラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色標本を顕微鏡下で観察、写真撮影し、一定面積あたりのヒト肝細胞数をカウントした。

(倫理面への配慮)

キメラマウスに移植するヒト肝細胞は、海外において適切な手続きを

経て加工・販売されているものを、(株)フェニックスバイオのヒト組織利用倫理委員会において承認を得た上で、購入して使用した。

ヒト肝細胞を持つキメラマウス作製実験に関しては、(株)フェニックスバイオの動物実験倫理委員会において研究計画の承認を得た上で行った。

C. 研究結果

cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウス肝臓における線維化に関与すると思われるマウス遺伝子、HBV感染で変動があることが報告されているヒト遺伝子発現

線維化に関与すると思われるマウス遺伝子発現は、HBV感染、非感染で差は見られなかった。HBV感染で変化することが知られている遺伝子の発現では、Apoptosisに関与するヒト遺伝子発現 (hTNFRSF10C, hFAS) の増加傾向、および増殖に関与するヒト遺伝子発現 (hPBK, hRRM2, hNCAPG) の低下傾向がみられた。

HBV感染、非感染cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスのマイクロアレイ解析

HBV感染、非感染 cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスの肝臓のマイクロアレイ解析を行ったところ、HBV感染で2倍以上上昇した17遺伝子、低下した18遺伝子が見られた。

cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスのHBV感染におけるヒト肝細胞の細胞サイズ

HBV感染、非感染14週間のキメラマウス肝臓における一定面積あたりのヒト肝細胞数をカウントした。その結果、HBV感染ヒト肝細胞半径は約1.6倍増加していた。

表 2. HBV感染、非感染キメラマウスの1定面積あたりのヒト肝細胞数

	肝細胞数/cm ²	半径*	面積*	体積*
非感染	2.04 ± 0.31 x10 ⁵	1	1	1
感染	1.34 ± 0.07 x10 ⁵	1.6	2.7	4.3

* 肝細胞を球と仮定して計算した。

cDNA-uPA/SCIDへミキメラマウスへのHBV感染における、一般状態、体重、h-Albの推移

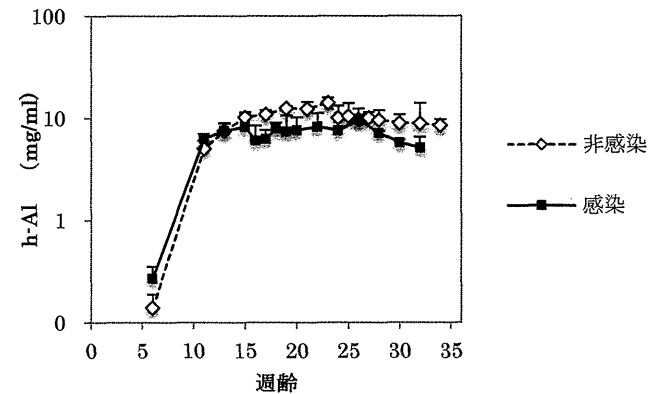


図 1 HBV感染、非感染へミマウスの血中ヒトアルブミン濃度

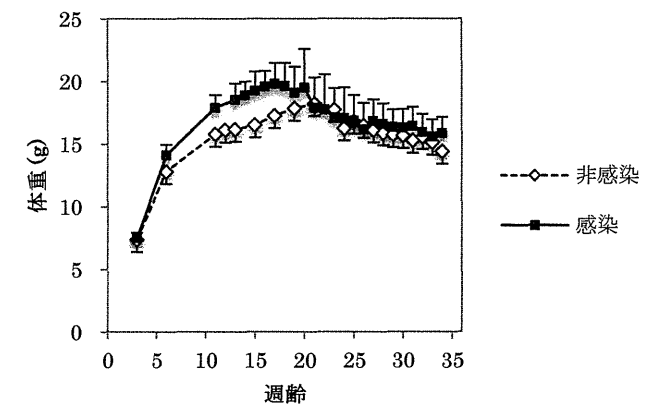


図 2 HBV感染、非感染へミマウスの体重

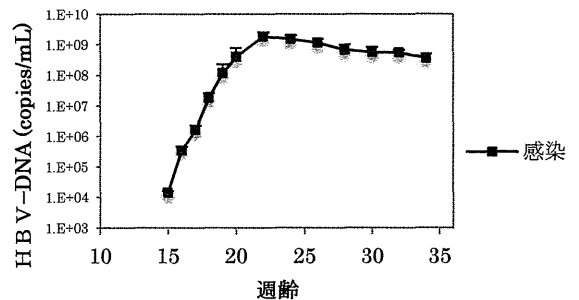


図 3 HBV感染へミマウスの血中HBV濃度

感染 8 週 (22 週齢) で HBV 感染キメラマウスが 1 匹死亡した。感染開始 20 週目にすべてのマウスの剖検を実施した。

体重に関しては、両群とも 20 週齢以降より徐々に体重減少が観察された。h-Alb 値は両群ともほぼ安定していた。HBV 感染群では、血中の HBV レベルは感染翌週から検出され、8 週よりプラトーに達した (図 1-3)。

D. 考察

これまでのヒト肝細胞キメラマウスでは、導入 uPA ゲノム遺伝子の欠失により、長期間飼育すると、正常マウス肝細胞の結節状の増殖のためヒト肝細胞による置換率の低下が生じ、組織学的に線維化や炎症が見られる個体もあった。このことから、キメラマウスへの HBV 長期感染における組織学的変化を判定することは難しかった。そこで、昨年度、新たに作製した uPA 遺伝子欠失の見られない cDNA-uPA/SCID homozygote をホストマウスとして作成したキメラマウスに HBV を感染させることにより、肝臓組織への HBV 感染 (14 週齢) の影響がより明らかになるのではないかと考えた。その結果、HBV 感染により、線維化、Apoptosis の増加などの病理学的な変化は見られず、炎症や線維化に関与するマウス遺伝子発現にも差は見られなかった。しかし、Apoptosis に関与するヒト遺伝子発現の増加傾向、および増殖に関与するヒト遺伝子発現の低下傾向がみられ、HBV 感染のヒト肝細胞

は非感染に比べて肥大しているのが確認された。このことから、今回調べたの遺伝子以外の発現にも差があるのではないかと考え、マイクロアレイ解析を行った。その結果、HBV 感染で 2 倍以上上昇した 17 遺伝子、低下した 18 遺伝子が見つかった。来年度、これらの遺伝子発現を real-time RT-PCR で検証する。

今年度はさらに長期間の感染飼育が可能と思われる、cDNA-uPA/SCID へミキメラマウスに HBV を接種し長期飼育観察 (20 週) を行った。来年度は、この肝臓の病理組織学的検査、および遺伝子解析も行う予定。

E. 結論

14 週間 HBV 感染 cDNA-uPA/SCID ホモキメラマウスでは、非感染に比べて炎症や線維化に関与するマウス遺伝子発現に差は見られなかったが、Apoptosis に関与する遺伝子の増加傾向、および増殖に関与するヒト遺伝子発現の低下傾向、ヒト肝細胞の肥大が観察された。マイクロアレイ解析により、HBV 感染で 2 倍以上上昇した 17 遺伝子、低下した 18 遺伝子が見られた。今後、HBV 20 週間感染、非感染 cDNA-uPA/SCID へミキメラマウスの肝臓における病理学的、遺伝子学的解析を実施する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kakuni M, Yamasaki C, Tachibana A, Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C. Chimeric mice with humanized livers: a unique tool for in vivo and in vitro enzyme induction studies. *Int J Mol Sci.* 2013 Dec 20;15(1):58-74.

(2) Shi N, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Zhang Y, Kosaka K, Okazaki A, Murakami E, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Takahashi S, Ochi H, Tateno-Mukaidani C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Gao M, Chayama K. Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *Gut* 62;1055-61, 2013

(3) Asato Tachibana, Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato Repopulation of the Immunosuppressed Retrorsine-treated Infant Rat Liver with Human Hepatocytes. *Xenotransplantation* 20;227-38, 2013

(4) Nakagawa S, Hirata Y, Kameyama T, Tokunaga Y, Nishito Y, Hirabayashi K, Yano J, Ochiya T, Tateno C, Tanaka Y, Mizokami M, Tsukiyama-Kohara K, Inoue K, Yoshiba M, Takaoka A, Kohara M.

Targeted induction of interferon- λ in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. *PLoS One.* 8:e59611, 2013

(5) Kosaka, K. Hiraga, N. Imamura, M. Yoshimi, S. Murakami, E. Nakahara, T. Honda, Y. Ono, A. Kawaoka, T. Tsuge, M. Abe, H. Hayes, C. N. Miki, D. Aikata, H. Ochi, H. Ishida, Y. Tateno, C. Yoshizato, K. Sasaki, T. 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

(6) Arai M, Tokunaga Y, Takagi A, Tobita Y, Hirata Y, Ishida Y, Tateno C, Kohara M. Isolation and characterization of highly replicable hepatitis C virus genotype 1a strain HCV-RMT. *PLOS ONE* 2013 Dec 16;8(12):e82527.

(7) 石田雄二、山崎ちひろ、立野知世. ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞 "PXB-cells" 「細胞」7月号 "細胞移植" 特集, 2013

2. 学会発表

(1) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi Y, Yoshizane Y, Chayama K, Tateno C. Development of a novel in vitro hepatitis B virus-infection model by using fresh human hepatocytes isolated from humanized mouse

liver. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses 平成 25 年 10 月 21 日 Shanghai Medical College, Fudan University

(2) Kakuni M, Tachibana, A, Shimada T, Tateno C. Using PXB-mice® to Study the Effects of Antiviral Agents against Hepatitis B Virus. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses 平成 25 年 10 月 21 日 Shanghai Medical College, Fudan University

(3) Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Ishida Y, Tateno C. In vitro evaluation of human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice®) transplanted from two different donor cells 第 28 回 日本薬物動態学会 平成 25 年 10 月 9 日 東京都 江戸川区ターナーホール船堀

(4) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Chayama K, Tateno C. Primary human hepatocytes isolated from mice with humanized livers as a novel in vitro hepatitis B virus infection model. 第 20 回 肝細胞研究会 平成 25 年 9 月 27 日 大阪国際会議場

(5) Tateno C. Recent improvement and applications of chimeric mice

with humanized livers for drug development. 第 20 回 肝細胞研究会 平成 25 年 9 月 27 日 大阪国際会議場

(6) Yanagi A, Yamasaki C, Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C. Cellular reaction of the humanized chimeric mouse liver after bile-duct ligation. 第 20 回 肝細胞研究会 平成 25 年 9 月 26 日 大阪国際会議場

(7) Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H. Over-expression of Bcl-xL mutant (FNK) improves the engraftment efficacy of human iPS cell-derived hepatocytes in the liver of uPA/SCID mice. 第 20 回 肝細胞研究会 平成 25 年 9 月 26 日 大阪国際会議場

(8) 石田雄二、山崎ちひろ、柳愛美、吉実康美、藤川和幸、茶山一彰、立野知世 PXB マウス由来の初代培養ヒト肝細胞に対する HBV の持続感染 第 9 回 広島肝臓研究プロジェクト研究センターシンポジウム 平成 25 年 6 月 29 日 ホテルグランヴィア広島

(9) 立野知世、岩成宏子、島田卓、木村達治、岩崎由実子、山崎ちひろ、加国雅和 ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト肝毒性検出のためのヒト ALT-1 特異的 ELISA の開発 第 40

回日本毒性学会学術年会 平成 25
年 6 月 19 日 幕張メッセ 国際会議
場

(10) 石田雄二、茶山一彰、立野知世
肝細胞キメラマウス由来培養ヒト肝
細胞の HBV に対する感染性に関する
解析 第 49 回 日本肝臓学会 平成
25 年 6 月 6 日 京王プラザホテル

(11) 立野知世 “ヒト肝細胞キメラ
マウス由来” “新鮮ヒト肝細胞” の薬
物代謝研究への利用 薬物動態談話
会 4 月定例会 平成 25 年 4 月 10 日
千里ライフサイエンスセンター

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特願 2012-102814 (H24 年 4 月 27 日
出願中) 「ウロキナーゼ型プラスミ
ノーゲンアクチベータトランスジェ
ニックマウス」、PCT/JP2013/062806
(H25 年 4 月 25 日出願中)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究
分担研究報告書（平成25年度）

TALEを用いたB型肝炎ウイルスの増殖を抑制するシステムの開発

研究分担者 山本 卓 広島大学大学院理学研究科 教授

研究要旨：

本研究では、B型肝炎ウイルス（HBV）の増殖を抑制するシステムを確立するために、HBVに結合する人工タンパク質TALEおよびHBVゲノムを切断するTALENおよびCRISPRシステムを設計・合成し、HBVの増殖に対する影響を調べた。その結果、CRISPR/CasシステムによってHBVの増殖を強く抑制する効果が確認された。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）の共有結合性閉環状型DNA（cccDNA）は肝細胞の核内に存在し、ウイルス増殖の際の複製中間体として働く。抗ウイルス薬投与後もcccDNAは肝細胞に残存することから、このDNAの完全除去が完全治療につながると考えられる。そこで本研究では、cccDNAを標的として結合あるいは切断する人工タンパク質やCRISPR/Casシステムを設計・作製し、肝炎ウイルスの増殖を抑制する作用について検討することを目的とする。

B. 研究方法

HBVのコアプロモーター領域の転写調節因子FTFやHNF4の結合するTALEタンパク質およびHBVのコアタンパク質を切断する人工酵素TALENの作製し、HepG2細胞におけるHBVの増殖抑制効果について調べた。さらに、HBVのコアタンパク質を標的とするCRISPR/

Casシステムを構築し、HBVの増殖抑制効果を調べた。

C. 研究結果

TALEタンパク質およびTALENを用いて、HepG2細胞でのHBVの増殖に与える効果を調べたが、有意な抑制効果は確認できなかった。これに対して、CRISPR/Casシステムを用いた場合、コントロールのHBV量を1/5程度に低下させることが示された。

D. 考察

昨年、海外の複数のグループからTALENを用いたHBVの増殖抑制効果について報告された。今回我々の行ったTALEやTALENの実験では、明確な抑制効果は見られなかったが、作製したTALEやTALENがゲルシフト解析および培養細胞での評価において高い活性を示していることから、条件検討によって抑制効果を改善できると考えている。しかし

ながら、HBVの多型性を考慮すると、複数の標的配列をTALENによって同時に切断することが必要と考えられる。この点では、TALEやTALENよりCRISPR/Casシステムの方がHBV破壊に適していると思われる。

今年度の研究によってCRISPR/Casシステムを用いたHBVの増殖抑制が可能であることを示した。しかしながら、CRISPR/Casシステムには、類似配列へ変異を導入するoff-target効果が知られており、より安全性の高いシステムの利用が必要である。

E. 結論

CRISPR/CasシステムによってHBVの増殖を抑制する効果を確認した。今後は、off-target効果を抑えるDouble nickase型のCasを用いて、同時にHBVの複数個所を切断するシステムの確立を目指す。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1)Tokumasu D, Sakuma T, Hayashi Y, Hosoi S, Hiyama E and Yamamoto T. FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions, *Genes Cells*, 2014, in press
- 2)Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii T, Yamamoto T and Matsuura S. TALEN-mediated single-base-pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS

(MVA) syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 1461-1466

3)Nakagawa Y, Yamamoto T, Suzuki KI, Araki K, Takeda N, Ohmuraya M and Sakuma T. Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice. *Exp Anim*, 2014, 63: 79-84

4) Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S and Yamamoto T. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3379

5)Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki KI, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S and Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for humancell and animal applications. *Genes Cells*,2013, *Genes Cells*, 18: 315-326

2. 学会発表

- 1)山本 卓、Platinum TALENの開発と様々な動物におけるゲノム編集、理研シンポジウム「ゲノムデザイン技術と疾患モデル研究」、つくば、2013
- 2)Yamamoto T, Targeted genome editing using highly-active TALENs、京都大学iPS研究所セミナー、京都、2013
- 3)Sakuma T, Woltjen K, Hosoi S, Suzuki K, Kawahara A, Okada Y, Ochiai H, Matsuura S and Yamamoto T, Improved TALEN construction and evaluation methods for animal and human cell applications, *Genome Engineering-Research & Applications*, Italy, 2013

4) Sakuma T and Yamamoto T, Platinum Gate TALEN: Establishment of highly-active TALEN construction system, 46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Matsue, 2013

5) 山本 卓、鈴木賢一、相田知海、田中光一、佐久間哲史、高活性型TALENを用いたゲノム編集、第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「ゲノム編集研究の新展開」、神戸、2013

6) 李 紅梅、藤本直子、笹川典子、白井紗矢、山本 卓、Woltjen Knut、櫻井英俊、山中伸弥、堀田秋津。TALENやCRISPR/Cas9を用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来iPS細胞のゲノム手術、第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「ゲノム編集研究の新展開」、神戸、2013

7) 山本 卓、高活性型TALENの開発と哺乳類培養細胞および動物での標的遺伝子改変、第65回日本生物工学会シンポジウム「次世代植物バイオテクノロジー」、広島、2013

8) 山本 卓、ゲノム編集技術を利用した培養細胞および動物個体での標的遺伝子改変、奈良県立医科大学講演会、橿原、2013

9) 山本 卓、ゲノム編集革命-人工ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変技術の開発、平成25年度広島バイオフィォーラム「ここまで進んだゲノム科学とその活用」、広島、2013

10) 山本 卓、ゲノム編集技術を利用した培養細胞や動物での遺伝子改変、第15回京都心血管代謝セミナー、京都、2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1) PPRモチーフを利用したDNA結合性タンパク質の設計方法及びその利用、特願2013-88940

2) ヌクレアーゼを発現させるためのベクターおよびベクターセット、ならびに変異を受けた細胞の取得方法、特願2013-098724

3) DNA結合ドメインを含むポリペプチド、特願2013-166768

4) 核酸挿入用ベクター、特願2013-2303

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）
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究
分担研究報告書（平成25年度）

次世代シーケンスを用いたB型肝炎血中体液マイクロRNAの網羅的解析

研究分担者 田原栄俊 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨

次世代シーケンサーを用いたB型肝炎排除のための網羅的解析から、B型肝炎の予後診断およびB型肝炎根治のための治療法の開発をめざす。本研究では、HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性肝癌の3つのタイプの同一患者の肝がん組織から癌部および非癌部の検体を用いてIonPGMを用いた次世代シーケンス解析を行った。既知のマイクロRNAに関しては、非がん部比較してHBVで顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ41種、21種を見いだした。HCVで顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ10種、11種を見いだした。非ウイルス肝がん顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ29種、23種を見いだした。これらの結果から肝臓癌で共通に増加するマイクロRNAとして3種見いだすことに成功した。

A. 研究目的

肝臓癌の発症には、B型肝炎やC型肝炎などのウイルス性肝炎からの発症と非ウイルス性の肝がんがある。本研究では、HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性肝癌の3つのタイプの同一患者の肝がん組織から癌部および非癌部の検体を用いてライフテクノロジーズIonPGMを用いた次世代シーケンス解析を行い、HBVウイルス性肝癌、HCVウイルス性肝癌、非ウイルス性肝癌の発生におけるマイクロRNAの発現変化を網羅的に明らかにして、肝炎から肝癌へと移行するリスク診断マーカーの同定を目的にする。

B. 研究方法

- ①HBV感染性肝がん患者8名（男性7名、女性1名）、HCV感染性肝がん10名（男性6名、女性4名）、非ウイルス性肝がん7名（男性4名、女性3名）から、採取した癌部組織および非がん部組織を採取した。
- ②採取した組織から、RNAを精製して、Agilent bioanalyzerを用いて、精製されたRNAの品質を確認した。
- ③精製したRNAを簡易型次世代シーケンサーIonPGMシステムを用いて、RNAシーケンスを行い網羅的解析し疾患に

より変動するマイクロRNAを明らかにする。

- ④得られた次世代シーケンスデータを既知のマイクロRNAデータベース配列と照合する解析を行い、そのリード数からそれぞれの組織で発現しているマイクロRNAを定量する。
- ⑤次世代シーケンスで解析した既知のマイクロRNAの定量解析データをデータベース化し、ウイルス肝炎、HBV肝がん、HCV肝癌と比較して、肝癌発症におけるマイクロRNA変動を網羅的に解析し、肝がんへの進行にともなうマイクロRNA変動による肝炎診断の開発に結びつける。

（倫理面への配慮）

本研究は、平成13年3月に3省（文部科学省、厚生労働省、経済産業省）合同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」ならびに関連8学会によって作成された「遺伝学的検査に関するガイドライン」に準拠して行う。具体的には、資料は最初に連結可能匿名化し、広島大学医学部付属病院の指定する個人情報管理者の下に、一般医学研究よりも厳格な管理を行う。資料提供者からの質問・意見等に関しては、各病院が責任を持って対応す

る。

C. 研究結果

HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性肝癌の3つのタイプの同一患者の肝がん組織から癌部および非癌部の検体からRNAを抽出して、ライフテクノロジーIon PGM解析のためのバーコード標識を用いたライブラリー構築を行った。作成したライブラリーを318シーケンスタップを用いてIon PGMを用いた次世代シーケンズ解析をおこなった。得られたシーケンズデータをmiR baseのデータベースと照合して、既知のマイクロRNAに一致するものと、一致しない配列に分類し、既知のマイクロRNAについては、HBVウイルス性肝癌、HCVウイルス性肝癌、非ウイルス性肝癌におけるリード数によりその発現解析を個行った。その結果、同一患者の非がん部と比較してHBV肝癌組織で発現が顕著に増加するマイクロRNAとして、41種類を同定した。また、HCV肝癌組織で発現が顕著に増加するマイクロRNAとして10種を同定した。さらに、非ウイルス性肝癌では、29種類のマイクロRNAの発現が顕著に増加していた。これらの肝癌において増加するマイクロRNAのうち、何れのタイプの肝癌でも共通に発現が増加するマイクロRNAは、miR-221を含む3種であった。一方で、同一患者の非がん部で減少するマイクロRNAは、HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性発がんにおいて、それぞれ21個、11個、23個であった。何れのタイプの肝癌でも減少するマイクロRNAではなかった。ウイルス性発がんと非ウイルス性発がんを分類した場合、HBV肝癌で共通に増加していたマイクロRNAは5種、共通に減少していたマイクロRNAは4種であった。

D. 考察

HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性肝癌の3つのタイプの同一患者の肝がん組織におけるマイクロRNAの発現は、同一患者の非がん部と比較した結果、共通に変化しているマイクロRNAは見いだしたものの、マイクロRNAの発現変化はその発がん過程により大きく異なることが示唆された。つまり、ウイルス性と非ウイルス性での発がんの過程は、異なるエピゲノム変化に起因している可能性が考えられた。

癌部および非癌部の検体からRNA非癌部と比較して癌部で共通に発現が増加していたマイクロRNA 3種のうち、miR-221は、E2F、MYC、NF- κ B、 β -catenin、RB1、細胞周

期に関わるWEE1、アポトーシスプロテアーゼ活性化因子1のAPAF1、ANXA1、転写抑制因子CTCFなどの重要な分子を直接の標的にして様々な癌種で寄与していることが知られており、肝癌発がんにおいてもmiR-221が大きく寄与している可能性が示唆された。その他の2種のマイクロRNAは、肝癌での関与の報告はないが、他の癌種では細胞周期やEMT(上皮間葉転移)を制御しているマイクロRNAの機能が知られており、今後肝癌の発がん過程におけるこれらのマイクロRNAの寄与について詳細に検討する必要がある。

E. 結論

本年度は、既知のマイクロRNAに関しては、非がん部比較してHBVで顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ41種、21種を見いだした。HCVで顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ10種、11種を見いだした。非ウイルス肝がん顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ29種、23種を見いだした。これらの結果から肝臓癌で共通に増加するマイクロRNAとして3種見いだすことに成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Mikihiisa Takano, Chieko Yamamoto, Keisuke Sambuichi, Keisuke Oda, Junya Nagai, Akira Shimamoto, Hidetoshi Tahara, and Ryoko Yumoto, Introduction of a Single Transporter Gene ABCA3 Directs RLE-6TN to More Type II-like Alveolar Epithelial Cells, MEMBRANE, Vol.38 (5), 246-253 (2013).

(2) Shiotani B, Nguyen HD, Håkansson P, Maréchal A, Tse A, Tahara H, Zou L., Two distinct modes of ATR activation orchestrated by Rad17 and Nbs1., Cell Rep. 2013 May 30;3(5):1651-62,(10.1016/j.celrep.2013.04.018).

2. 学会発表

(1) Hidetoshi Tahara, Proteomic analysis of EV in senescence and cancer., ISEV Workshop on EV Proteomics and Lipidomics, Melbourne 2014

(2) 岡田恵、田原栄俊, 老化細胞由来エクソ

- ソームの生物学的意義とがん微小環境への影響, がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム, 東京都 2014
- (3) 鶴崎慎也, 塩谷文章, 志戸岡友希, 嶋本顕, 田原栄俊, PRPF19 をターゲットとした siRNA の抗がん剤としての応用の可能性, 第36回分子生物学会年会, 神戸 2013
- (4) 藏元達谷, 福永早央里, 石原えりか, 山本佑樹, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊, 細胞老化における miR-22 の新規ターゲット探索と機能解析, 第36回分子生物学会年会, 神戸市 2013
- (5) 志戸岡 友希, 鶴崎 慎也, 塩谷 文章, 嶋本 顕, 田原 栄俊, 細胞老化におけるPRPF19の発現抑制に関与するmiR-27bの解析, 第36回分子生物学会年会, 神戸市 2013
- (6) 石原えりか, 竹下文隆, 小坂展慶, 高橋陵宇, 藏元達谷, 塩谷文章, 嶋本顕, 落谷孝広, 田原栄俊, マクロファージ細胞を用いた新規 small RNA デリバリーモデルの構築への試み, 第36回分子生物学会年会, 神戸市 2013
- (7) 岡田恵, 中村亜由美, 宗岡美紗, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊, 老化細胞由来exosomeの分泌メカニズムと生物学的意義の探索, 第36回分子生物学会年会, 神戸市 2013
- (8) 福永早央里, 石原えりか, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊, 老化を調節する microRNA による膵臓がん細胞抑制メカニズムの解明, 第36回分子生物学会年会, 神戸 2013
- (9) 池田梢, 岡本沙矢香, 二瀬由宇, 田原栄俊, 血漿中miRNAを用いた膵がん特異的なバイオマーカーの探索と次世代シーケンサーによる配列解析の可能性, 第36回分子生物学会年会, 神戸市 2013
- (10) 田原栄俊, Therapeutic role of micro RNAs in cancer and cellular senescence, Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic Reprogramming Asia-2013 Meeting, 東京 2013
- (11) 田原栄俊, 老化を誘導する抗腫瘍核酸医薬の可能性, 第72回日本癌学会学術総会, 横浜市 2013
- (12) 福永早央里, 石原えりか, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊, 老化関連 microRNA による膵臓がん抑制メカニズム, 第72回日本癌学会学術総会, 横浜市 2013
- (13) 塩谷文章, 志戸岡友希, 田原栄俊, PRPF19 の発現抑制は DNA 損傷を誘発し細胞老化を誘導する, 第72回日本癌学会学術総会, 横浜市 2013
- (14) 福永早央里, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊, 老化関連miRNAによる膵臓がん抑制機構の解明, がん若手ワークショップ, 蓼科 2013
- (15) 志戸岡友希, 塩谷文章, 鶴崎慎也, 田原栄俊, 細胞老化におけるPRPF19の発現抑制に関与するmiRNAの解析, 第5回日本RNAi研究会, 広島市 2013
- (16) 藏元達谷, 石原えりか, 福永早央里, 山本佑樹, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊, 細胞老化における miR-22 の新規ターゲット探索と機能解析, 第5回日本RNAi研究会, 広島市 2013
- (17) 岡田恵, 中村亜由美, 宗岡美紗, 藤田知信, 河上裕, 田原栄俊, 細胞老化によって増加するexosome分泌の機能とメカニズム解析, 第5回日本RNAi研究会, 広島市 2013
- (18) 田原栄俊, がんの発生・進展における

マイクロRNAの関与，名古屋大学H25特徴あるプログラム_キャンサーサイエンスコース，名古屋市 2013

(19) 田原栄俊，マイクロ RNA を用いた革新的がん診断・治療，第14回ホルモンと癌研究会，東京都文京区 2013

(20) 田原栄俊、岡本沙矢香，Ion Torrent(TM) を利用した最新研究成果，第2回Ion Torrent ユーザーグループミーティング，大阪市 2013

(21) 田原栄俊，老化を誘導する核酸抗がん剤にむけた exosome DDSの開発，第29回日本DDS学会学術集会，京都市 2013

(22) 塩谷文章、志戸岡友希、田原栄俊，PR PF19の発現抑制による細胞老化誘導とがん分子標的としての可能性，第17回日本がん分子標的治療学会学術集会，京都 2013

(23) M. Okada, A. Nakamura, M. Muneoka and H. Tahara, Characterization Of Exosomes Secreted From Senescent Fibroblasts., ISEV 2013, Boston 2013

(24) H. Tahara, M. Okada, M. Muneoka and A. Nakamura, Secretary mechanism and functions of senescence-associated exosomes, ISEV 2013, Boston 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

1. 出願番号：特願2014-XXXXX

発明者：田原栄俊、落谷孝広

発明等の名称：アルツハイマーを診断できる方法

出願日：平成26年03月20日（2014年）予定

2. 出願番号：特願2014-41594

発明者：田原栄俊、池田梢

発明等の名称：膵がんの検出を補助する方法

出願日：平成26年03月4日

出願国：日本国、国際特許申請予定

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究
分担研究報告書（平成25年度）

抗HBV免疫応答を惹起する新規肝炎モデルマウスの開発
in vitro HBV感染系の樹立

研究分担者 丸澤 宏之 京都大学医学研究科 消化器内科 講師

研究要旨：

HBV感染により惹起される多様な免疫応答が、病態形成や治療効果に深く関与していることが知られている。本研究課題では、薬剤誘導性に肝細胞特異的にCreタンパクを発現する遺伝子改変マウスと、CreによるLoxPの組換え作用によりHBVウイルス抗原を発現する遺伝子改変マウスを新たに作成し、これらの2種のモデルマウスを交配することにより、ヒト肝炎を模倣した免疫応答の誘導が可能な新規B型肝炎モデルマウスの開発を目指している。また*in vitro* HBV感染モデルとして、TALENを用いた遺伝子破壊技術を活用し、肝培養細胞において抗HBV分子、DNAウイルス感染センサー分子のノックアウトを行い、新しいHBV感染細胞系の樹立を進めている。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)はさまざまなウイルス感染症の中でも、そのウイルス感染に対する多彩な宿主免疫応答が誘導されることが特徴のひとつである。事実、HBV感染者には、急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎、無症候性キャリアと、きわめて多様な臨床病像が生じることが知られている。こうしたHBV感染による多様な病態の形成には、ウイルスが感染した肝細胞に対する免疫応答が中心的な役割を果たしている。加えて、インターフェロンや核酸アナログ製剤によるHBVに対する抗ウイルス療法に際しても、背景に存在する免疫系の応答機構の理解が、HBs抗原の消失などの臨床的治癒状態を達成するための必須条件となる。したがって、HBV治療における新しい創薬ターゲットを探求するためには、HBVにより惹起される多様な免疫応答を模倣し

た*in vivo*モデルの樹立が急務である。しかしながら、幼少時にHBV感染したヒトの場合には無症候性キャリアとなるのと同様に、モデルマウスにおいても胎児期にわずかでもHBV抗原提示が存在すると免疫寛容状態となってしまう、肝炎を発症しないことが知られている。このため、薬剤誘導性に成人期にHBV抗原タンパクを肝細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスがひとつのモデル候補となりうる。しかしながら、HBVは自らのゲノム中にpromoterやenhancerモチーフを有していることから、胎児期から完全にウイルス抗原タンパクの発現を抑制したモデルの構築がきわめて困難である。そこで、薬剤誘導性に肝細胞特異的にCreタンパクを発現する遺伝子改変マウスと、CreによるLoxPの組換え作用により内在性ウイルスpromoter配列を含まないHBV抗原タンパクを発現す

る遺伝子改変マウスを新規に作成し、これらの2種のモデルマウスを交配することにより、肝炎としての免疫応答の惹起が可能なB型肝炎モデルマウスの新規開発を目指すことを本研究課題の目的とする。

一方、DNA ウィルスである HBV が肝細胞に感染する際に、宿主側因子にどのように認識され、どのように抗ウイルス免疫応答が誘導されているかについては不明な点が多い。近年、遺伝子情報をコードしている DNA や RNA の配列に変異を導入する活性をもつ複数のヒト遺伝子編集酵素が、HBV に対する抗ウイルス作用を発揮していることが明らかになりつつある。この遺伝子編集酵素の中心を占めるのが、Apolipoprotein B100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC) ファミリーである。APOBEC ファミリー分子は、塩基配列上のシチジン (C) を脱アミノ化する酵素活性を有しており、その結果、標的となる DNA や RNA の塩基配列が変化をきたす作用を有している。遺伝子編集酵素群の生理的役割は現時点では不明なものが多いが、複数のファミリー分子は、生体に感染したウイルスに対する防御機構として機能していることがわかってきている。この中でも、APOBEC3G, APOBEC3F, APOBEC3C は HBV のゲノム配列において C→T/G→A への遺伝子変異を高頻度に誘導する作用をもつことが報告され、APOBEC ファミリー分子が感染時にウイルス遺伝子に塩基変化を導入することによって、ウイルスを不活化する役割を担っていると考えられるようになった。我々のこれまでの検討結果から、肝炎ウイルス感染とそれに伴う炎症反応、ならびにイン

ターフェロン産生反応により、肝細胞にこれらの遺伝子編集酵素群のいくつかが特異的に発現誘導されること、APOBEC ファミリー分子のひとつである activation induced cytidine deaminase(AID)が抗 HBV 作用を有していること、などが明らかになってきた。しかしながら、HBV が肝細胞に感染した際に、どのようにして宿主因子に認識され、抗ウイルス応答が誘導されているかについては不明なままである。感染した肝細胞からのウイルスの完全排除を達成するためには、十分な免疫応答の乏しい慢性感染持続状態においても HBV 感染時のセンサー機構を活性化することが、新しい抗 HBV 制御機構につながるものと期待される。そこで、近年、DNA ウィルス感染のセンサー分子として同定された STING, cGAS に着目し、抗 HBV 作用を有する APOBEC family とともにこれらの遺伝子を完全ノックアウトした肝培養細胞系を構築して HBV 感染感受性を検証することにより、HBV 制御の分子機構を明らかにすることにした。この目的を達成するために、同じ研究班に所属する山本卓教授の研究グループとの共同開発により、TALEN を用いた新しい遺伝子破壊技術による *in vitro* ノックアウト肝細胞の樹立に着手した。

B. 研究方法

1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

まずはじめに、薬剤誘導性に肝細胞で特異的に Cre タンパクを発現する遺伝子改変マウスの作成を行った。マウス作成のためのコンストラクトとしては、Cre を誘導可能にするために、estrogen 受容体部分に点

突然変異を複数導入し、内在性 estrogen に反応せず、tamoxifen に反応する性質をもつ変異型 estrogen 受容体(ERT2)と Cre の融合タンパク質をヒト Albumin promoter 配列の下流に挿入したコンストラクトを作成した。このコンストラクトを用いてマウス胚への injection を実施し、F0, F1 マウスを取得した。また、Cre による LoxP の組換え作用により promoter 配列を含まない個々の HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウス作成のためのコンストラクトとしては、まず CAG promoter 下流に loxP で挟んだ緑色蛍光タンパク(GFP)を置き、その下流に HBs 抗原の遺伝子配列を配置したものを作成した。すなわち、Cre の存在しない状況ではマーカー分子としての GFP を発現し、Cre の存在下では LoxP の組換え作用によって HBs 抗原を発現することが期待できる構造としている。このコンストラクト作成を行い、マウス胚への injection を実施し、目的とする遺伝子改変を達成した F0 マウスを合計7ライン確保した。引き続き、得られた各ラインの F0 マウスから F1 マウスをそれぞれ樹立し、薬剤誘導刺激後のそれぞれの F1 ラインの表現型を検討した。

2. *in vitro* HBV 感染系の樹立；

抗 HBV 作用を有する APOBEC family とともに、近年、DNA ウィルス感染のセンサー分子として同定された STING, cGAS に着目し、これらの遺伝子を完全ノックアウトした肝培養細胞系を構築することによる新しい *in vitro* HBV 感染モデルの作成を開始した。標的遺伝子のノックアウト技術として、同じ研究班に所属する山本卓教授の

研究グループが専門とする人工ヌクレアーゼのひとつである TALEN 技術を用いることとし、共同研究を開始した。植物病原細菌キサントモナス属がもつ TALE を DNA 結合ドメインとして利用した TALEN では、TALE は約 34 アミノ酸からなるほぼ完全な繰り返し構造からなっている。そのうちの 12,13 番目のアミノ酸の違いが DNA 塩基認識特異性を決定することから、AID, APOBEC3F/G, STING, cGAS それぞれに対応するユニットの作成を行った。同時に、薬剤耐性遺伝子を構成的に発現するカセットを挿入した targeting vector を作成した。

(倫理面への配慮)

肝疾患患者等からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるように十分に配慮した。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」(平成 17 年 6 月 29 日一部改正)及び「疫学研究に関する倫理指針」(平成 19 年 8 月 16 日全部改正)並びに「臨床研究に関する倫理指針」(平成 20 年 7 月 31 日全部改正)に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供試料や個人情報に適正に管理保存した。

組換え DNA 実験を含む遺伝子組換え生物等の第二種使用等については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)、「同施行規則」(平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済

産業省・環境省令第一号)、「研究開発等に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき核酸防止措置などを定める省令」(平成16年文部科学省・環境省令第一号)、その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じた。

動物実験に関しては、「動物の保護およ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」(平成18年6月1日一部改正)に従った。また、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、実施した。

C. 研究結果

1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

モデルマウス作成のためのコンストラクト作成、マウス胚への injection、F0 マウスを7ライン樹立し、それぞれのラインの F1 マウスの獲得までの作業を完了した。薬剤誘導性に肝細胞で特異的に Cre タンパクを発現する遺伝子改変マウス作成のためのコンストラクトとしては、変異型 estrogen 受容体(ERT2)と Cre の融合タンパク質をヒト Albumin promoter 配列の下流に挿入したベクターを構築した。このコンストラクトをマウス胚に injection し、F0 マウスを2ライン確保することができた。他方、Cre による LoxP の組換え作用により HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウス作成のためのコンストラクトとしては、CAG promoter 下流に loxP で挟んだ GFP を挿入し、その下流に HBs 抗原の遺伝子配列を配置したベクターを作成した。また、上記、誘導型 Cre 発現コンストラクトと同様に、

HBs 抗原発現用コンストラクトもマウス胚への injection を実施し、F0 マウスを7ライン確保することに成功した。うち、先行する1ラインからの F1 マウスを用いて、薬剤誘導性に GFP 発現の消失すること、それと同時に血中に HBs 抗原タンパク質が発現・分泌されることを確認した。しかしながら、薬剤誘導1週間、2週間後のマウス肝組織には有意な炎症細胞浸潤が認められなかったことから、肝炎としての免疫応答は乏しい可能性が示唆された。同じ肝組織から抽出した RNA を用いた Real-time-RT PCR 解析からは、薬剤誘導によりインターフェロン下流遺伝子の発現が誘導されていることが示唆されたため、少なくとも HBs 抗原への免疫応答は惹起されているものと推定されたことから、今後、免疫応答を活性化する工夫を追加していくこととした。

2. *in vitro* HBV 感染系の樹立；

まず、*in vitro* の HBV 感染系の基盤となる DMSO+PEG 処理した HepG2 細胞への血清検体由来の HBV 感染の至適条件を設定した。このモデルを活用して、HepG2 細胞への TALEN を用いた特異的な遺伝子破壊を導入することとした。引き続き、AID, APOBEC3F/G, STING, cGAS それぞれに対応する TALE ユニットの設計を行い、それぞれの TALEN 発現ベクター作成した。また同時に、薬剤耐性遺伝子(puromycin)を構成的に発現するカセットを挿入した targeting vector を作成した。リポフェクションによりこれらの新規作成 vector を HepG2 細胞に導入し、puromycin でのセレクションを開始した。現在、hetero-knockout

細胞の構築までが完了しており、homo-knockout 細胞の樹立次第、HBV 陽性血清の *in vitro* 感染実験を開始する予定である。

D. 考察

薬剤誘導性に任意の時期に HBV 抗原タンパクを肝細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成することにより、ヒト B 型肝炎病態を模倣した新しい B 型肝炎モデル動物の構築を目指すことを本研究課題の目標としている。同時に、*in vitro* においても培養細胞を用いた HBV 感染系を樹立することができれば、薬剤スクリーニングに際して異なる genotype やさまざまな変異ウイルスを含んだ血清検体を感染実験に簡便に試用することが可能となり、多様な HBV 感染病態に対応可能な創薬への貢献が期待できる。

E. 結論

肝炎としての免疫応答の惹起が可能な B 型肝炎モデルマウスの新規開発を目指し、薬剤誘導性に肝細胞特異的に HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウスの作成を行った。また、*in vitro* HBV 感染モデルの樹立をめざし、TALEN を用いた抗 HBV 分子の特異的な遺伝子破壊を行った肝培養細胞の樹立を継続していく。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeda A, Shimizu T, Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Mizuguchi A, Shimizu K, Hatano E, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Leptin Receptor Somatic Mutations are frequent in HCV-infected Cirrhotic Liver and associated with Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2014.146(1):222-232.
- 2) Ueda Y, Kaido T, Ito T, Ogawa K, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Mori A, Miyagawa-Hayashino A, Hga H, Marusawa H, Chiba T, Uemoto S: Chronic rejection associated with antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2014(in press)
- 3) Kim SK, Nasu A, Komori J, Shimizu T, Matsumoto Y, Minaki Y, Kohno K, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: A model of liver carcinogenesis originating from hepatic progenitor cells with accumulation of genetic alterations. *Int J Cancer*.2014.134(5):1067-76.
- 4) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T: Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase. *AID. J Biol Chem*. 2013. 288(44):31715-27.
- 5) Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto

Y, Nishijima N, Chiba T, Uemoto S:
Efficacy and safety of prophylaxis with
entecavir and hepatitis B immunoglobulin
in preventing hepatitis B recurrence after
living donor liver transplantation.
Hepatol Res.2013.43: 67-71.

- 6) Ohtsuru S, Ueda Y, Marusawa H, Inuzuka
T, Nishijima N, Nasu A, Shimizu K,
Koike K, Uemoto S, Chiba T: Dynamics
of defective hepatitis C virus clones in
reinfected liver grafts in liver transplant
recipients; ultra-deep sequencing analysis.
Journal of Clinical Microbiology. 2013.
51:3645-3652.
- 7) Ueda Y, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K,
Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y,
Miyagawa-Hyashino A, Haga H,
Marusawa H, Teramukai S, Chiba T:
Pretransplant serum hepatitis C virus RNA
levels predict response to antiviral
treatment after living donor liver
transplantation. PLoS One .2013.8:e58380.

2. 学会発表

- (1) 丸澤宏之. 慢性炎症によるゲノム異常
生成と肝発癌. 第 72 回日本癌学会学術
総会. パシフィコ横浜 2013.
- (2) 千葉勉、丸澤宏之. 炎症と遺伝子不安
定性. 第 72 回日本癌学会学術総会.
パシフィコ横浜 2013.
- (3) 金秀基、丸澤宏之. 肝幹/前駆細胞を起
源とする肝発癌モデルを用いたゲノム
異常の網羅的解析. 第 17 回日本肝臓学
会大会. 品川プリンスホテル 2013.

- (4) 渡士幸一、Guoxin Liang、岩本将士、丸
澤宏之、喜多村晃一、脇田隆宇.
IL-1/TNF- α によるシチジンデアミナー
ゼ AID 誘導を介した B 型肝炎ウイルス
感染排除機構. 第 61 回日本ウイルス学
会学術集会. 神戸国際会場 2013.

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特記事項なし

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）
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究
分担研究報告書（平成 25 年度）

The discovery of host restriction factors required for HBV entry (infection) into mouse cells.

研究分担者 Hussein Hassan Aly Ibrahim 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨：

There is no immunocompetent small animal model that is permissive to hepatitis B virus (HBV) infection. We are trying to identify the host factors that are required for the species restriction of HBV infection in human and chimpanzees, and use it to construct an immune-competent transgenic mouse that is permissive for HBV. The block of HBV infection in mouse cells is reported to be at the entry level, since all other parts of HBV life cycle can be efficiently recapitulated in mouse. Recently, sodium taurocholate transporter (NTCP) was discovered as a new entry receptor for HBV infection. NTCP overexpression rendered HepG2 cells permissive to HBV infection, in this year we tried to establish HBV infectivity in mouse hepatocytes by the overexpression of human NTCP.

A. 研究目的 Aim

The aim of this study is to understand the anti-HBV immune response and to utilize this knowledge for the development of novel and evidence-based therapeutic regimen for chronic HBV infection. To accomplish this, the primary aim of this study is to first establish an immunocompetent small animal model supporting HBV infection. The intermediate objective is to assess if an evidence-based and innovative therapy can be developed for chronic HBV-infected subjects with retrieved information. The final target is to provide a strategy and road map of immune therapy for HBV patients.

B. 研究方法 Method

In order to establish immune-competent HBV small animal model system we are aiming to first discover the human restriction host factors that limit HBV infectivity to only human and Chimpanzee hepatocytes. Last year, we used induced pluripotent stem cells (IPS) cells. These cells were previously shown to pass into 4 different stages until they differentiate into human hepatocytes (Definitive endoderm, Hepatic specification, Immature hepatocytes, Mature hepatocytes.) We aimed on identifying the stage of differentiation that is permissive for HBV infection, and by comparing the gene expression in this stage and the previous non permissive stage, we aimed to identify the