

利益相反について

利益相反の有無等(平成25年度)

H24-B創-肝炎一般-012森屋恭爾は利益相反無

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

研究代表 森屋恭爾

100万円をこえる寄付金
MSD 田辺三菱

他の研究班への参加状況

研究代表者が、「肝炎等克服緊急対策研究事業」または「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(肝炎関係研究分野)」研究班の研究代表者として参加しているか(ア又はイに記載)

H24-B創-肝炎一般-012森屋恭爾は
ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していません

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

研究代表 森屋恭爾

合同研究会議開催状況

他の研究班と合同での研究会議開催状況(平成25年度)

H24-B創-肝炎一般-012森屋恭爾は
班会議
2013年8月2日
「次世代生命基盤技術を用いたB型肝炎制圧のための創業研究」
研究代表者 小島聡一先生 参加

2013年11月28日実施
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

研究代表 森屋恭爾

平成 25 年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究

課題番号：H24-B創-肝炎-一般-013

予定期間：H24年度からH28年度まで

研究代表者：田中 靖人

所属研究機関：公立大学法人名古屋市立大学

所属部局：大学院医学研究科

職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：1年目 208,000,000円 2年目 200,000,000円

I. 研究の意義

B型肝炎ウイルス(HBV)根絶を目指したB型肝炎創薬実用化研究を効率良く推進するためには、HBV持続感染を再現する培養細胞評価系を開発し、HBV感染感受性・増殖機構から病態メカニズムの解明、レセプターの同定、薬剤スクリーニング等を効率的に実施できる簡便なシステムを構築することが重要である。

II. 研究の目的、期待される成果

すでに作成済の複製クローンや感染源を最大限活用し、(1)最適なヒト肝細胞の選択(初代肝細胞、肝細胞株、iPS細胞由来肝細胞)、(2)新規培養システムの構築(3次元培養)、(3)ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明(microRNA、脂質代謝、トランスポーター、免疫反応)、(4)HBV感染感受性環境の構築(HBVライフサイクル解明から創薬)により、できるだけ早期にHBV持続感染感受性培養細胞評価系を完成させ、B型肝炎創薬実用化研究の推進を目指す。また、(5) 生体多光子励起イメージングを駆使して、*in vitro/in vivo*におけるHBVウイルス動態を可視化し、感染細胞への免疫応答について実体的な解析により、免疫応答を誘導・調節する画期的な治療法の開発につながることが強く期待される。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者(田中靖人)

a) 組換えDNA実験に関する大臣申請用の書類を作成・分担者へ配布。b) 1.2倍長のHBV plasmid(HBV genotype A~C)及び肝細胞株を各分担施設に分配(MTA)。c) キメラマウス由来の肝細胞を用いたHBV持続感染系の構築。HBV感染防御試験や薬剤感受性試験を開始。新規薬剤の薬効評価。d) microRNA解析、リポミクス解析のための研究計画を立案・実施。microRNAによるHBV複製制御の解析。

・研究分担者

(1) 最適なヒト肝細胞の選択 (調、水口、石田)

水口: HBV発現アデノウイルスベクター作製、HBV複製を確認。ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞を肝障害免疫不全マウス(uPA-SCIDマウス)に移植、キメラマウス作成に成功。石田: ヒト肝細胞キメラマウスより分離したヒト肝細胞を用いたHBV持続感染培養モデルの評価。再感染による感染拡大を確認。薬効評価が可能となり、大量生産を実現。調: 九州大学倫理委員会承認後、肝移植ドナー由来の新鮮肝細胞をuPA-SCIDマウスに移植、世界初の日本人由来のヒト肝細胞高置換マウス(置換率86%)の作成に成功。

(2) 新規培養システム(3次元培養)の構築 (田中・村上、小原・棟方、松永)

松永: *in vitro*におけるHBV感染は肝細胞スフェロイド表面膜における血管側極性構造を介して促進。
小原・棟方: 3次元培養により肝機能を維持し、HBVを60日以上にわたり感染・増殖させることに成功。
 遺伝子型間で保存されている3カ所の塩基配列を標的としたsiRNAを作成、単回投与でウイルス量及びcccDNA減少。
田中・村上: キメラマウス肝細胞を用いた3次元HBV持続感染培養系を構築。HBV genotype別の感染防御試験を実施、薬効評価も継続している。

(3) ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明 (落谷、中西、深澤、石井、高岡)

落谷: 網羅的 microRNA アレイ解析を実施、HBV感染により変化する複数の microRNA 同定。microRNA148a 導入により、肝細胞機能(NTCP 発現増強、miR122 発現上昇)を誘導。
中西: リピドミクス解析を継続。生理活性分子であるリゾリン脂質とイノシトールリン脂質(PIPs)を高感度に測定・解析、HBV感染により LysoPC、LysoPE と PIP2 量が増加。
深澤: 高度不飽和脂肪酸(アラキドン酸、EPA、DHA)、特に DHA が HBV 産生阻害。Hexadimethrine bromide が HBV 産生・放出を阻害。
石井: HBsAg を発現させたバイオナノカプセル(BNC)に抗 ASGPR 抗体を負荷してマウス肝細胞への取り込み能を賦与した粒子を蛍光標識し、これを *in vivo* (2光子励起顕微鏡)で、肝細胞への粒子の取り込み及び初期免疫応答を可視化する実験系を世界に先駆けて確立。
高岡: HBV は RIG-I を介して III 型 IFNs 誘導。RIG-I は、 ϵ RNA を認識し自然免疫応答を活性化するのみならず、P タンパク質を阻害する。

(4) HBV 感染感受性環境の構築 (渡士、石川、土方、池田、坂本)

渡士: HepG2-hNTCP-C4 細胞は HBV に対して感染許容性を示し、この感染は HBs 抗体、NTCP トランスポーター阻害剤あるいはシクロスポリン A 及びその誘導體、オキシステロールにより阻害。
石川: 蛍光ラベル HBs 粒子は効率よく HuSE/2 細胞に取込まれ、細胞質内に局在。HBs 粒子の取込みはエンドサイトーシス(クラスリン介在性経路)によって惹起。NTCP、アジアロ糖蛋白レセプターの阻害剤は、HuSE/2 細胞での取込み抑制。
池田: 細胞外に分泌される HBV 粒子は HuH7 や Hep3B で高く、pgRNA は HepG2 で高い。
土方: 独自に樹立したヒト肝幹細胞を分化させて、HBV 感染実験。HBV RNA 発現と培養上清中に HBV DNA 検出。
坂本: HBX 蛋白の機能ドメインの探索と分子標的化合物の開発。

IV. 平成 26~28 年度の課題

これまでに構築したスクリーニング系を用いて他班(満屋班、小嶋班)との共同研究を展開し、新規薬剤の探索、評価、前臨床試験を進める。また、HBV 感染制御する宿主因子を標的として、DEGIMA スパコンを利用した *in silico* 創薬スクリーニングを開始(濱田)、候補化合物の合成展開、薬効評価を行う(田中)。

(1) **最適なヒト肝細胞の選択**: キメラマウス由来のヒト肝細胞(石田)、日本人由来の正常肝細胞・同一個体からの免疫担当細胞分離・移植(調)、インテグレーション・フリーヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞(水口)、不死化した各種肝細胞(土方・池田)における HBV 感染・複製効率を検討し、最適な細胞を選択。肝機能に関わる遺伝子(薬物代謝酵素、トランスポーター等)の発現等について解析する。すでに日本人由来のヒト肝細胞キメラマウスの作成に成功、HBV の持続感染実験や抗ウイルス薬の薬効評価を行う(田中)。今後は日本人由来の初代肝細胞を大量に作成し、HBV 持続感染培養系を確立する。

(2) **新規培養システム(3次元培養)の構築**: 肝非実質細胞と肝細胞との3次元共培養系構築と HBV 感染維持との関連を明らかにする(松永)。HBV 持続感染培養系のハイスループット解析への適応と新規肝培養細胞の検討(田中、棟方)。

(3) **ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明**: HBV 持続感染を制御する microRNA を同定し、HBV 感染阻止の microRNA 創薬を実現する(落谷)。リピドミクス・脂質代謝・遺伝子発現解析データ統合によ

る HBV 感染各段階に必須の脂質分子の絞り込み(中西・深澤)。RIG-I 経路に対する免疫回避の分子機構の解明。各種 HBV 感染系を用いて、 ϵ RNA-MEND の効果を評価。核酸に対する認識受容体を介する自然免疫シグナルを広範に抑制する分子の同定(高岡)。HBV 粒子の可視化技術を用いた HBV ライフサイクルの解析と新たな治療法の確立。免疫応答を利用したウイルス制御(石川)。マクロファージや T 細胞が蛍光標識されたリポーターマウスを用いて、aASGPR-BNC の肝細胞への感染、および惹起される初期免疫応答について統合的な解析(石井)。

(4) HBV 感染感受性環境の構築: HepG2-NTCP-C4 細胞を用いて、抗 HBV 効果をもつ化合物や生理活性物質のスクリーニングを行い(300-2000 化合物程度)、単独での抗 HBV 効果、既存薬との併用効果を検討(渡士)。新たに樹立したヒト肝幹細胞様細胞を用いて、新規培養系を開発し、HBV の生活環のすべてを効率良く再現する(土方)。HBX 蛋白の機能ドメインの探索と分子標的化合物の開発(坂本)。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) HBV 持続感染を再現する培養細胞系を用いた薬剤感受性及び毒性評価(低コスト化実現)
- (2) HBV 根絶を目指した個別化医療の実現: 核酸アナログ長期投与からの離脱(医療費削減)
- (3) B 型肝炎治療薬に関する多くのシーズが創出できると予想され B 型肝炎創薬実用化研究が推進

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者 田中靖人、4=研究分担者 渡士幸一、3=研究協力者 村上周子

1. Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, **Tanaka Y**, Joh T, Sato S, Takahashi S, Wakita T, Zhu J, Issa JP, Kondo Y. Hepatitis Virus Infection Affects DNA Methylation in Mice with Humanized Livers. **Gastroenterology**. 2013 in press.
2. Kusumoto S, **Tanaka Y**, Mizokami M, Ueda R. Is Antiviral Prophylaxis Necessary to Prevent Hepatitis B Virus (HBV) Reactivation in Patients With HBV-Resolved Infection Receiving Rituximab-Containing Chemotherapy?. **J Clin Oncol**. 2013 in press.
3. Shinkai N, Matsuura K, Sugauchi F, Watanabe T, **Murakami S**, Iio E, Ogawa S, Nojiri S, Joh T, **Tanaka Y**. Application of a newly developed high-sensitivity HBsAg chemiluminescent enzyme immunoassay for hepatitis B patients with HBsAg seroclearance. **J Clin Microbiol**. 2013;51(11):3484-3491.
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 Activation-induced Cytidine Deaminase (AID). **J Biol Chem**. 2013;288(44):31715-31727.

研究分担者 落谷孝広

1. Gailhouste L, Gomez-Santos L, Hagiwara K, Hatada I, Kitagawa N, Kawaharada K, Thirion M, Kosaka N, Takahashi RU, Shibata T, Miyajima A, **Ochiya T**. miR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells. **Hepatology**. 2013;58(3):1153-1165.

研究分担者 水口裕之

1. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Kanda K, Hayakawa T, Furue MK, **Mizuguchi H**. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. **Biomaterials**. 2013;34(7):1781-1789.

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

目的：HBV持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系を開発し、B型肝炎創薬実用化研究を推進する

HBV持続培養系開発 → HBVライフサイクル解明 → 薬剤スクリーニング

2年間の研究成果

1) 最適なヒト肝細胞の選択

- ・ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞を移植したキメラマウス作成に成功(水口)
- ・ヒト肝細胞キメラマウスより分離したヒト肝細胞を用いたHBV感染モデルの評価薬効評価が可能となり、大量生産を実現(石田)
- ・世界初の日本人由来のヒト肝細胞高置換マウス(置換率86%)作成に成功(調)

2) 新規培養系開発

- ・肝細胞長期培養のためのスフェロイド形成を用いた3次元培養法の確立及び機能解析(田中、小原、松永)。遺伝子型間で保存されたsiRNAを作成、単回投与でHBV-DNA及びcccDNA減少。キメラマウス肝細胞による3次元培養系を用いたHBV genotype別の中和試験を実施、薬効評価も継続(田中・村上)

評価モデル① HBV持続感染培養系 ② HBV感染キメラマウス

各種HBVクローン (HBV genotype, 変異株), 感染源, 細胞株の作成・提供

3) ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明

- ・HBV感染により変化する複数のmicroRNA同定(落谷)
- ・リポミクス解析: HBV感染により LysoPC, LysoPEとPIP2の量が増加(中西)
- ・高度不飽和脂肪酸(アラキドン酸, EPA, DHA)、特にDHAがHBV産生阻害、hexadimethrine bromideがHBV産生・放出を阻害(深澤)
- ・2光子励起顕微鏡により、HBVの肝細胞への粒子の取り込み及び初期免疫応答を可視化(石井)。HBVはRIG-Iを介してⅢ型IFNs誘導。RIG-Iは、ε RNAを認識し自然免疫応答を活性化するのみならず、Pタンパク質を阻害する(高岡)

4) HBV感染感受性環境の構築

- ・HepG2-hNTCP-C4細胞樹立。HBV感染は、NTCPトランスポーター阻害剤やシクロスポリンA及びその誘導體、オキシステロールにより阻害(渡土)
- ・HBV粒子の可視化に成功。NTCP、アジアロ糖蛋白レセプターの阻害剤は、HuSE/2細胞での取り込み効率を抑制(石川)
- ・独自に樹立したヒト肝幹細胞を分化させて、HBV感染実験: HBV RNA発現と培養上清中にHBV DNA検出(土方)。ヒト不死化肝細胞株によりHBV粒子形成能が異なる(池田)
- ・HBX蛋白の機能ドメインの探索と分子標的化合物の開発(坂本)

●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

1991年5月～2001年7月	名古屋市立大学医学部第二内科 研究員
1997年4月～2001年3月	名古屋市立大学大学院医学研究科 医学博士
1999年11月～2001年7月	米国立保健研究所 (NIH) 留学 (Harvey J Alter)
2001年8月～2009年9月	名古屋市立大学大学院医学研究科 臨床分子情報医学
2009年10月～現在	名古屋市立大学大学院医学研究科 ウイルス学
2006年6月～現在	国立感染症研究所ウイルス第二部 客員研究員

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

1991年5月～1997年3月	名古屋市立大学医学部第二内科 山本正彦、溝上雅史
1997年4月～2001年3月	名古屋市立大学大学院医学研究科 上田龍三、溝上雅史
1997年4月～現在	国立遺伝学研究所 五條堀孝
1999年～2001年	米国立保健研究所 (NIH) Visiting fellow, Harvey J Alter
2006年6月～現在	国立感染症研究所ウイルス第二部 脇田隆字
2008年10月～現在	国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター 溝上雅史

・主な研究課題

- 1) HBVの基礎的・臨床的研究 (HBV複製モデルを用いた検討)
- 2) 世界各国における肝炎ウイルスの分子疫学 (感染ルートの解明及び拡散時期の推定)
- 3) ウイルス性肝炎におけるSNPs解析

・これまでの研究実績

政策提言

新規先進医療：「IL28Bの遺伝子診断によるインターフェロン治療効果の予測評価」

厚生労働省第50回先進医療専門家会議、平成22年7月12日認可

発表論文

1. Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y, Joh T, Sato S, Takahashi S, Wakita T, Zhu J, Issa JP, Kondo Y. Hepatitis Virus Infection Affects DNA Methylation in Mice with Humanized Livers. *Gastroenterology*. 2013 in press.
2. Kusumoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Ueda R. Is Antiviral Prophylaxis Necessary to Prevent Hepatitis B Virus (HBV) Reactivation in Patients With HBV-Resolved Infection Receiving Rituximab-Containing Chemotherapy? . *J Clin Oncol*. 2013 in press.
3. Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M; the

- Japanese AHB Study Group. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology*. 2013 in press.
4. *Shinkai N, Matsuura K, Sugauchi F, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Ogawa S, Nojiri S, Joh T, Tanaka Y. Application of a newly developed high-sensitivity HBsAg chemiluminescent enzyme immunoassay for hepatitis B patients with HBsAg seroclearance. J Clin Microbiol. 2013;51(11):3484-3491.*
 5. *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 Activation-induced Cytidine Deaminase (AID). J Biol Chem. 2013 ;288(44):31715-31727.*
 6. *Elkady A, Aboulotuh S, Ali EM, Sayed D, Abdel-Aziz NM, Ali AM, Murakami S, Iijima S, Tanaka Y. Incidence and characteristics of HBV reactivation in hematological malignant patients in south Egypt. World J Gastroenterol. 2013;19(37):6214-6220.*
 7. *Matsui T, Kang JH, Nojima M, Tomonari A, Aoki H, Yamazaki H, Yane K, Tsuji K, Andoh S, Andoh S, Sakai H, Maemori M, Maguchi H, Tanaka Y. Reactivation of hepatitis B virus in patients with undetectable HBsAg undergoing chemotherapy for malignant lymphoma or multiple myeloma. J Med Virol. 2013;85(11):1900-1906.*
 8. *Watanabe T, Tanaka Y. Reactivation of hepatitis viruses following immunomodulating systemic chemotherapy. Hepatol Res. 2013 ;43(2):113-121.*
 9. *Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Fuminaka S, Mizokami M. Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. J Viral Hepat. 2013;20(4):e27-36.*
 10. *Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. PLoS One. 2012;7(6):e39175.*
 11. *Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular*

- carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. **BMC Med Genet.** 2012;13:47.
12. Kondo Y, Ueno Y, Ninomiya M, Tamai K, **Tanaka Y**, Inoue J, Kakazu E, Kobayashi K, Kimura O, Miura M, Yamamoto T, Kobayashi T, Igarashi T, Shimosegawa T. Sequential immunological analysis of HBV/HCV co-infected patients during Peg-IFN/RBV therapy. **J Gastroenterol.** 2012;47(12):1323-1335.
 13. Watanabe T, Sugauchi F, **Tanaka Y**, Matsuura K, Yatsuhashi 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- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. **Gut.** 2012;62(9):1340-1346.
 14. Kani S, **Tanaka Y**, Matsuura K, Watanabe T, Yatsuhashi H, Orito E, Inose K, Motojuku N, Wakimoto Y, Mizokami M. Development of new IL28B genotyping method using Invader Plus assay. **Microbiol Immunol.** 2012;56(5):318-323.
 15. Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, **Tanaka Y**, Mizokami M, Wakita T. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. **J Virol.** 2012;86(19):10805-10820.
 16. Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, **Tanaka Y**, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. **Hepatology.** 2012;56(4):1448-1456.
 17. **Tanaka Y**, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **Hum Mol Genet.** 2011;20(17):3507-3516.
 18. Sugiyama M, **Tanaka Y**, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. **PLoS One.** 2011;6(10):e26620.
 19. Seto WK, **Tanaka Y**, Liu K, Lai CL, Yuen MF. The Effects of IL-28B and ITPA Polymorphisms on Treatment of Hepatitis C Virus Genotype 6. **Am J Gastroenterol.** 2011;106(5):1007-1008.
 20. Raghwani J, Thomas XV, Koekkoek SM, Schinkel J, Molenkamp R, van de Laar TJ, Takebe Y, **Tanaka Y**, Mizokami M, Rambaut A, Pybus OG. Origin and evolution of the unique hepatitis C virus circulating recombinant form 2k/1b. **J Virol.** 2011;86(4):2212-2220.

21. Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, **Tanaka Y**, Shinkai N, Hige S, Yatsunami H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y, Kumada H. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. **Hepatol Res.** 2011;42(2):139-149.
22. Wang J, Singh US, Rawal RK, Sugiyama M, Yoo J, Jha AK, Scroggin M, Huang Z, Murray MG, Govindarajan R, **Tanaka Y**, Korba B, Chu CK. Antiviral activity of novel 2'-fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine against wild-type and drug-resistant hepatitis B virus mutants. **Bioorg Med Chem Lett.** 2011;21(21):6328-6331.
23. Matsuura K, **Tanaka Y**, Kusakabe A, Hige S, Inoue J, Komatsu M, Kuramitsu T, Hirano K, Ohno T, Hasegawa I, Kobashi H, Hino K, Hiasa Y, Nomura H, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. Recommendation of lamivudine-to-entecavir switching treatment in chronic hepatitis B responders: Randomized controlled trial. **Hepatol Res.** 2011;41(6):505-511.
24. Yokosuka O, Kurosaki M, Imazeki F, Arase Y, **Tanaka Y**, Chayama K, Tanaka E, Kumada H, Izumi N, Mizokami M, Kudo M. Management of hepatitis B: Consensus of the Japan Society of Hepatology 2009. **Hepatol Res.** 2011;41(1):1-21.
25. Kusakabe A, **Tanaka Y**, Inoue M, Kurbanov F, Tatematsu K, Nojiri S, Joh T, Tsugane S, Mizokami M. A population-based cohort study for the risk factors of HCC among hepatitis B virus mono-infected subjects in Japan. **J Gastroenterol.** 2011;46(1):117-124.
26. Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, Fukai K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, **Tanaka Y**, Mizokami M, Yokosuka O. Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species during hepatitis B e antigen seroconversion. **J Hepatol.** 2011;54(1):19-25.
27. Afdhal NH, McHutchison JG, Zeuzem S, Mangia A, Pawlotsky JM, Murray JS, Shianna KV, **Tanaka Y**, Thomas DL, Booth DR, Goldstein DB; Pharmacogenetics and Hepatitis C Meeting Participants. Hepatitis C pharmacogenetics: state of the art in 2010. **Hepatology.** 2011;53(1):336-345.
28. Yuen MF, Wong DK, Lee CK, **Tanaka Y**, Allain JP, Fung J, Leung J, Lin CK, Sugiyama M, Sugauchi F, Mizokami M, Lai CL. Transmissibility of hepatitis B virus (HBV) infection through blood transfusion from blood donors with occult HBV infection. **Clin Infect Dis.** 2011;52(5):624-632.
29. **Tanaka Y**, Nishida N, Sugiyama M, et al. lambda-Interferons and the single nucleotide polymorphisms: A milestone to tailor-made therapy for chronic hepatitis C. **Hepatol Res.** 2010;40(5):449-460.
30. Kondo Y, **Tanaka Y**, et al. Hepatitis B virus replication could enhance regulatory T cell activity by producing soluble heat shock protein 60 from hepatocytes. **J Infect Dis.** 2010;202(2):202-213.

31. Mukaide M, **Tanaka Y**. et al. Mechanism of entecavir resistance of hepatitis B virus with viral breakthrough as determined by long-term clinical assessment and molecular docking simulation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(2):882-889.
32. Honda M, Sakai A, **Tanaka Y**, et al. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in IL28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2010;139(2):499-509.
33. Kurbanov F, **Tanaka Y**, Matsuura K, et al. Positive selection of core 70Q variant genotype 1b hepatitis C virus strains induced by pegylated interferon and ribavirin. *J Infect Dis*. 2010;201(11):1663-1671.
34. **Tanaka Y**, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genet*. 2009;41(10):1105-1109.
35. Sugiyama M, **Tanaka Y**, et al. Direct Cytopathic Effects of Particular Hepatitis B Virus Genotypes in uPA/SCID Mouse with Human Hepatocytes. *Gastroenterology*. 2009;136(2):652-662.
36. Tatematsu K, **Tanaka Y**. et al. A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype J. *J Virol*. 2009;83(20):10538-10547.
37. Fung J, Lai CL, **Tanaka Y**. et al. The Duration of Lamivudine Therapy for Chronic Hepatitis B: Cessation vs. Continuation of Treatment After HBeAg Seroconversion. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(8):1940-1946.
38. Matsuura K, **Tanaka Y**. (corresponding author) et al. Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes among Patients with Chronic Infection in Japan Shifting toward an Increase of Genotype A. *J Clin Microbiol*. 2009;47(5):1476-1483.
39. Kusakabe A, **Tanaka Y**. (corresponding author) et al. A Case-Control Study for the Identification of Virological Factors associated with Fulminant Hepatitis B. *Hepatol Res*. 2009;39(7):648-656.
40. Kurbanov F, **Tanaka Y**, et al. When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype?. *J Virol*. 2008;82(16):8241-8242.
41. Yuen MF, **Tanaka Y**, et al. Risk for hepatocellular carcinoma with respect to hepatitis B virus genotypes B/ C, specific mutations of enhancer II/ core promoter/ precore regions and HBV DNA levels. *Gut*. 2008;57(1):98-102.
42. Sugiyama M, **Tanaka Y** (equal first author), et al. Early Dynamics of Hepatitis B Virus in Chimeric Mice Carrying Human Hepatocytes Mono- or Coinfected with Genotype G. *Hepatology*. 2007;45(4):929-937.
43. **Tanaka Y**, Mizokami M. Genetic diversity of hepatitis B virus as an important factor associated with differences in clinical outcomes. *J Infect Dis*. 2007; 195(1):1-4.

44. Osiowy C, Giles E, **Tanaka Y**, Mizokami M, Minuk GY. Molecular evolution of hepatitis B virus over 25 years. **J Virol.** 2006;80(21):10307-10314.
45. Sugiyama M, **Tanaka Y**, et al. Influences of Hepatitis B Virus Genotypes on the Intra- and Extracellular Expression of Viral DNA and Antigens. **Hepatology.** 2006.44(4):915-24.
46. **Tanaka Y**, Mukaide M, et al. Specific Mutations in Enhancer II/Core Promoter of Hepatitis B Virus Subgenotypes C1/C2 Increase the Risk of Hepatocellular Carcinoma. **J Hepatol.**2006;45(5):646-653.
47. Ozasa A, **Tanaka Y**, et al. Influence of Genotypes and Precore Mutations on Fulminant or Chronic Outcome of Acute Hepatitis B Virus Infection. **Hepatology.** 2006;44(2):326-334.
48. **Tanaka Y**, Kurbanov F, et al. Molecular Tracing of Global Hepatitis C Virus Epidemic Predicts Regional Patterns of Hepatocellular Carcinoma Mortality. **Gastroenterology.** 2006;130(3):703-714.
49. Fujiwara K, **Tanaka Y**, et al. Novel type of hepatitis B virus mutation - “replacement mutation” involving hepatocyte nuclear factor 1 binding site tandem repeat in chronic hepatitis B genotype E. **J Virol.** 2005;79(22):14404-14410.
50. **Tanaka Y**, Hanada K, et al. Molecular Evolutionary Analyses Implicate Injection Treatment for Schistosomiasis in the Initial Hepatitis C Endemic of Japan. **J Hepatol.** 2005;42(1):47-53.
51. **Tanaka Y**, Hasegawa I, et al. A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. **Hepatology.** 2004;40:747-755.
52. Hasegawa I, **Tanaka Y**, et al. A novel hepatitis B virus genotype A subtyping assay that distinguishes subtypes Aa from Ae and its application in epidemiological studies. **J Virol.** 2004;78(14):7575-7578.
53. **Tanaka Y**, Hanada K, et al. A comparison of molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the US will increase over the next two decades. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2002;99(24):15584-15589.

特許

1. 糖タンパク質の測定方法、肝疾患の検査方法および糖タンパク質定量用試薬
成松久、池原譲、久野敦、久野敦、**田中靖人**、溝上雅史、伊藤清顕、松原俊介、鶴野親是、高浜洋一、香川孝司、永井慎也。2011年10月6日。特許公開2012-185172。財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、公立大学法人名古屋市立大学、独立行政法人国立国際医療研究センター、シスメックス株式会社。
2. C型肝炎の治療効果を予測するためのマーカー群、検査方法及び検査用キット。
田中靖人、溝上雅史、徳永勝士。2011年3月3日。特許公開2011-193786。財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、公立大学法人名古屋市立大学。
3. C型肝炎の治療効果を予測するためのマーカー及びC型肝炎の治療効果の予測を行う方法並びにC型肝炎の予防又は治療剤。

田中靖人、溝上雅史、徳永勝士. 2011年3月3日. 特許公開 2011-41526. 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、公立大学法人名古屋市立大学.

4. HBV 感染症を治療または予防するための医薬組成物.
溝上雅史、田中靖人、杉山真也、須藤正幸. 2009年12月23日. 国際公開 W02009/154248. 公立大学法人名古屋市立大学、中外製薬株式会社.
5. 肝炎ウイルスの生体外増殖方法およびその用途
山口達哉、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人. 2008年4月3日. 国際公開 W02008/038641. 東洋紡績株式会社.
6. B型肝炎ウイルスのジェノタイプCのサブタイプの識別方法及びそのためのキット.
溝上雅史、田中靖人、向出雅一. 2007年1月18日. 特許公開 2007-6734. 名古屋市、株式会社エスアールエル.
7. B型肝炎ウイルスのジェノタイプAのサブタイプの判別方法.
溝上雅史、田中靖人. 2005年10月6日. 特許公開 2005-270031. 株式会社エスアールエル.
8. B型肝炎ウイルスのジェノタイプBのサブタイプの判別方法.
溝上雅史、田中靖人. 2005年10月6日. 特許公開 2005-269994. 株式会社エスアールエル.

B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究

名古屋市立大学大学院 医学研究科
田中靖人

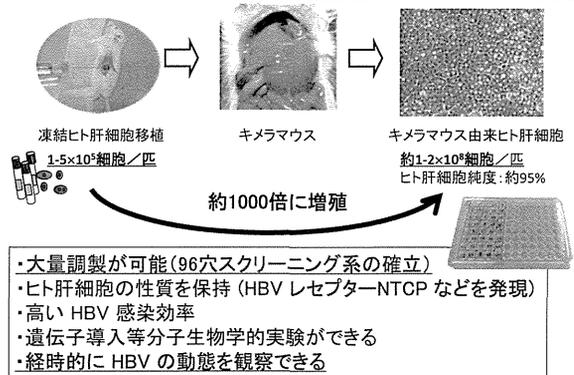
目的

HBV根絶を目指したB型肝炎創薬実用化研究を効率良く推進するために、**HBV持続感染を再現する培養細胞評価系を開発**し、HBV感染感受性・増殖機構（ライフサイクル）から病態メカニズムの解明、**薬剤スクリーニング**等を効率的に実施できる簡便なシステムを構築することである。

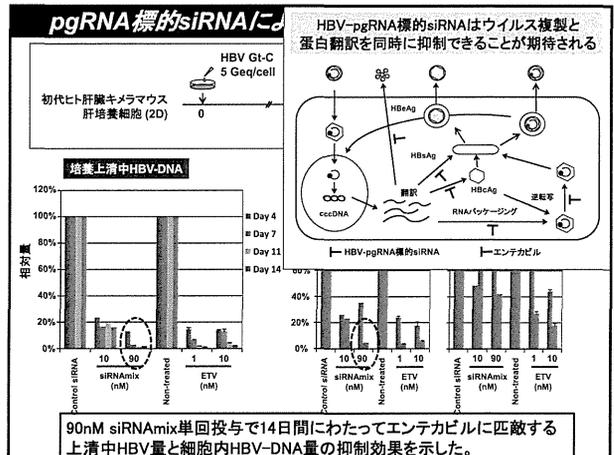
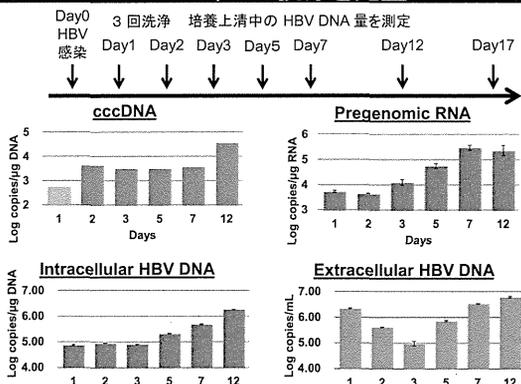
HBV感染(培養)評価系～2年間の成果

1. キメラマウス肝細胞を用いたHBV持続感染モデルの構築 → HBV持続感染実験から薬剤スクリーニング系の構築 (HTS: ハイスループットスクリーニング)
2. HepG2-NTCP-C4細胞(DMSO処理)
3. 3次元培養系による薬効・毒性評価 (iPS細胞由来肝細胞、初代肝細胞、ヒト肝幹細胞など)
4. HepAD38.7-Tet細胞(Genotype D)
5. HBV粒子蛍光標識～培養・生体イメージング
6. In vivo HBV感染系での薬効評価 (前臨床試験)

大量調製可能な肝細胞キメラマウスのヒト肝細胞 (PHH) を用いて HBV の増殖サイクルを再現



PHHにHBVを感染させ cccDNA, pregenomic RNA, HBV-DNA, HBs抗原を定量



pH応答性MEND/高活性siRNA (in vivo実験へ応用)

効率の良いDDSの無いことがsiRNAの臨床応用を阻んでいた

多機能性エンベロープ型ナノ構造体
Multifunctional envelope-type nano device (MEND)

siRNA核酸コア
標的化リガンド
PEG (血中滞留化)
膜透過性ペプチド (細胞内動態制御)

pH応答性脂質を含む高導入効率脂質エンベロープ

体内や細胞内におけるMENDの動態を制御するために様々な機能性素子を搭載することが可能である。

- エンベロープを構成する脂質にpH応答性脂質が含まれている。脂質エンベロープがエンドソームの低pHに反応して、細胞質にsiRNAを速やかに放出する。
- 平均粒子径80nm
- siRNA封入後4°Cで2週間安定

Kogure, et al. J. Control. Release 98, 317-323. (2004)
Kogure, et al. J. Control. Release 122, 246-251. (2007)

iPS細胞由来肝細胞キメラマウスの作出

#肝細胞由来ゲノムインテグレーションフリーヒトiPS細胞株iHC-1を使用

uPA/SCIDマウス 肝障害 + 免疫不全

脾臓経由で移植

マウス血中ヒトアルブミン濃度 (µg/ml)

過去に報告された血中ヒトALB濃度の値と比較して非常に値が高い 最高1.9 mg/mlのヒトアルブミンが検出された
Woo DH et al. Gastroenterology. 2011. : 4,000 ng/ml
Basma H et al. Gastroenterology. 2009. : 2,000 ng/ml など

非常に高濃度のヒトアルブミンが検出された上、これまでの2倍以上生存期間が延長した。

HBV感染許容性細胞株の樹立

hNTCP発現プラスミド → セレクション → hNTCP

Red:HBc Blue:DAPI

HepG2-hNTCP細胞を用いたHBV阻害剤のスクリーニング

- 細胞の播種 (Day 0)
- 化合物の前処理 HBV感染 (Day 1)
- 洗浄 (Day 2)
- HBs抗原の検出 (Day 12)

HepG2-hNTCP-C4細胞

3. 洗浄 (Day 2)

4. HBs抗原の検出 (Day 12)

HepG2-hNTCP細胞を用いたHTS系による抗HBV活性を有する化合物の探索

HBs in the medium

Reduced HBs protein (< 1/5) 6 compounds

22(S)hydroxycholesterol (Ezetimibe:ゼチーア®)

Cholesterol

Oxysterol

cccDNA

Metabolism Inflammation & Immunity Development & Differentiation Transcriptional control etc.

Iwamoto M et al. Biochem Biophys Res Commun (2014)

HBV産生に対する各種脂質(成分)添加の影響

高度不飽和脂肪酸 (PUFA)

Arachidonic acid (AA) 20:4(n-6)

Eicosapentaenoic acid (EPA) 20:5 (n-3)

Docosahexaenoic acid (DHA) 22:6 (n-3)

HBV in cells

HBV (copies/µg gDNA)

EtOH AA EPA DHA

各10 µMで処理 ラット:2000mg/kg毒性なし

高度不飽和脂肪酸、特にDHAがHBV産生を阻害した

n-3 PUFAsはHBV-associated HCCのriskを低下させる

Consumption of n-3 Fatty Acids and Fish Reduces Risk of Hepatocellular Carcinoma

NORIE SUGAZAKI, MITSUMI INOUE, MOTOKI MIYASUO, SHUNJIKA SASAZUKI, TADASHI GHIMAZU, TOSHI YAMAZAKI, RIEBEKA TAKAKUCHI, YUKIHIRO TANAKA, YUKIKAZUSHI MIZUKAWA, SHICHIHIRO TSUGANE, and the Japan Public Health Center-based Prospective Study Group

GASTROENTEROLOGY 2012;142:1468-1475

Consumption of n-3 PUFA-rich fish or n-3 PUFAs, particularly EPA, DPA, and DHA, appears to protect against the development of HCC, even among subjects with HBV and/or HCV infection.

富山化学との共同研究

HTS系を使用し、培養上清中HBV DNA量に対する阻害活性を指標にスクリーニング

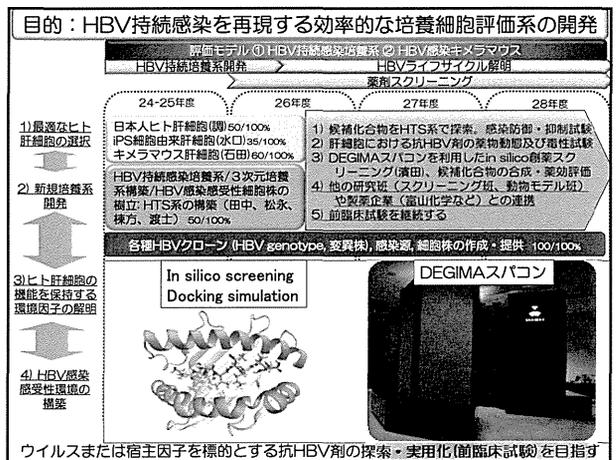
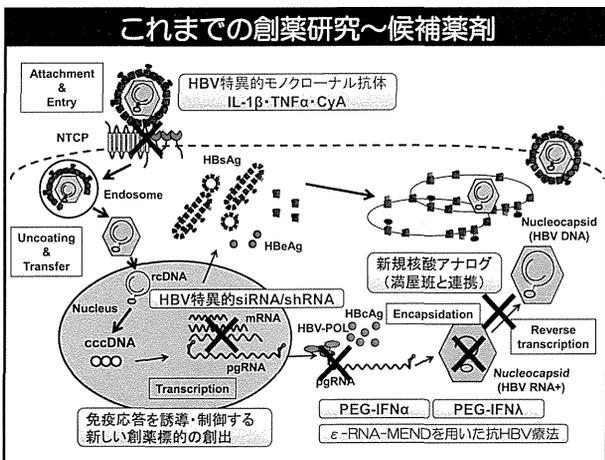
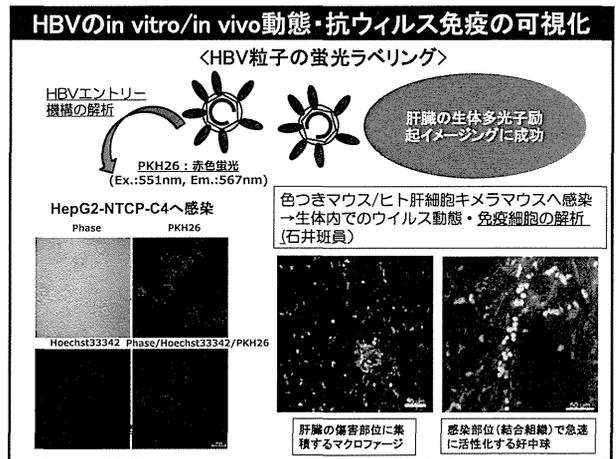
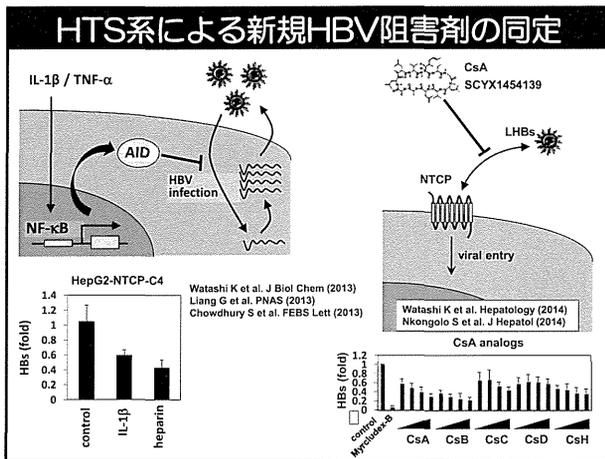
2 µMで阻害率50%以上を示す8化合物が得られている → 一部の化合物でIC50を算出した

化合物	HepG2.2.15 (7 days culture)		MaRBLÉ* (7 days culture)
	抗HBV活性, µM	細胞毒性, µM	抗HIV活性, µM
化合物1	0.031	>5	<0.010
化合物2	0.020	>5	<0.010
化合物3	0.0065	>5	<0.010
lamivudine	0.034	>5	0.044

*Human T cell line

いずれも非核酸系低分子化合物

作用機序解析については未実施だが、本化合物は強い抗HIV活性も有している



利益相反について

利益相反の有無等(平成25年度)

ア 利益相反の有無 有・無(いずれかを記載)

イ 利益相反がある場合には具体的内容(以下に記載)

無

他の研究班への参加状況

研究代表者が、「肝炎等克服緊急対策研究事業」または「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(肝炎関係研究分野)」研究班の研究代表者として参加しているか(ア又はイに記載)

ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。

① 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加している。(以下①、②を記載)

①(研究班名)「○○○○研究班」(研究代表者名:○○○○)

② 他の研究班で担当している研究と、今回申請している研究の違い(研究内容が重複していないことを具体的に説明)

①(研究班名)「C型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド関連解析の手法を用いた宿主因子の解析に関する研究」(研究代表者:田中靖人)

②C型肝炎ウイルス感染に対する自然経過、新規薬剤に対する応答性、病態進展(特に発癌)に関わる宿主要因をSNP-based GWASに加えて、CNV-based GWAS、次世代シーケンズ(NGS)を用いたSequencing-based GWASにより同定することを目的とする研究班のため、B型肝炎創薬実用化研究とは研究対象、目的においても重複は全くありません。

合同研究会議開催状況

他の研究班と合同での研究会議開催状況(平成25年度)

- ア 他の研究班と合同で研究会議を開催していない。
① 他の研究班と合同で研究会議を開催している。
(開催している場合は、①開催日、②他の研究班の名称、③他の研究班の研究代表者名を記載してください)

①平成26年1月10日
② HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発
③(金子周一) ①②③

平成 25 年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：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

課題番号：H24-B創-肝炎-一般-014

予定期間：H24年度から H28年度まで

研究代表者：小原 道法

所属研究機関：公益財団法人 東京都医学総合研究所

所属部局：ゲノム医科学研究分野

職名：副参事研究員・プロジェクトリーダー

年次別研究費(交付決定額)：1年目 100,000,000円 2年目 100,000,000円

I. 研究の意義

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、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。ツパイはHBVの感染が認められる小型動物であり、実験動物としての実績もある。本研究では、ツパイの全ゲノムを解析し、この配列情報を基にcDNAクローニング、抗体作製を進めることで、短期間にツパイ免疫系の解析ツールを樹立する。さらに、より効率・感度の高い動物実験モデルの確立を目指し、ウイルス・宿主の両面からHBV-ツパイ感染実験系を改良する。これらの研究を通じて、正常な免疫機能を持つツパイをHBV感染モデル動物として確立する。本研究で開発されるHBV-ツパイ感染実験系は、HBV病原性解析やHBV感染に起因する肝炎・肝がんの治療法の開発に大きく貢献できる。

II. 研究の目的、期待される成果

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。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。

III. 2年間の研究成果

研究代表者(小原道法)

- (1) ツパイを実験動物として樹立するため、全ゲノム解析を進め終了した。
- (2) 得られたゲノム情報から小原恭子班員が同定した、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130種類を選択し、ペプチド抗体作成を行った。
- (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1, 3, 21日後に剖検を行い、肝臓組織中の遺伝子発現の変化を次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。発現mRNAの同定は全ゲノム解析データと照合することで行っている。

研究分担者(保富康宏)

ツパイにおける高感受性系統の樹立は非常に重要であり、現在までに未知であるHBV獲得免疫の解析は病態解明に極めて意義深い。

- (1) ツパイの繁殖系を樹立し、繁殖率、離乳率、育成率のいずれも過去の報告を上回るものであった。
- (2) 新生ツパイへ成人感染で持続感染化した感染者血清を接種し、経日的に採血をして経過を観察している。全ての感染個体血清中からHBV遺伝子が検出されている。これらの新生児を主とした感染系をさらに増加させ、持続感染の有無、並びに肝炎等の病態の観察を行う。

研究分担者(小原恭子)

(1) ツパイのゲノム解析を進めた。HCV, HBV レセプターはアミノ酸の相同性がいずれもヒトの分子と 80%以上で CD81 や NTCP などのレセプター蛋白質ではウイルス感染に重要な機能配列も保存していた。ツパイのアミノ酸配列でカニクイサルよりもヒトに近いものも多く存在し、ゲノム配列からもツパイはヒトに近い動物である事が明らかとなった。これら分子は進化の過程で保存される Missing link となっている可能性が考えられた。

(2) 同定したツパイのアミノ酸配列に基づき、主要な 130 種類について抗体作成に必要なエピトープの検索を行い、抗体を作製した。

(3) ツパイの飼育繁殖法が確立し、95%の♀が出産し一頭あたり、3-4 匹の新生児が得られた。これまでに、新生仔ツパイ及び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ている。全てのツパイに感染が成立することが明らかとなった。新生児を主とした感染系をさらに増加させ、持続感染の有無、並びに肝炎等の病態の観察を進めている。

研究分担者(石井健)

(1) 新規 CTL 誘導型ワクチンアジュバントの開発に成功。

(2) ツパイ全血を用いたアジュバントとしての TLR リガンドスクリーニングを行った。ヒト、ツパイで使用可能なアジュバントのスクリーニングのために、ツパイ全血を種々の TLR リガンドで刺激を行い 8 時間後のサイトカインの mRNA レベルを real-time PCR 法を用いて検討した。その結果、ツパイ全血ではいくつかの TLR リガンドに反応し、炎症性サイトカインの mRNA レベルの上昇が確認された。これらの TLR リガンドはヒトでの反応性は確立されており、ツパイにおいても TLR が認識し、自然免疫応答を誘導している事が示された。

研究分担者(押海裕之)

(1) DDX60 分子が HBV の複製を抑制することを解明: HBV 感染時の自然免疫応答機構は殆ど解明されていない。我々が発見した自然免疫で働く DDX60 分子が HBV 感染時の自然免疫応答と、HBV の増殖の抑制に重要であることを細胞レベルで解明した。

(2) ツパイ感染モデルを用いて HBV 感染時の自然免疫応答を解明: HBV に感染したツパイより臓器を採取し、各臓器での自然免疫応答を遺伝子発現を指標に調べたところ、これまでウイルス DNA の認識に必要だと考えられていた cGAS や IFI16 分子の発現は、HBV 感染でも殆ど変化しないのに対し、DDX60 分子の発現は 10 倍以上に速やかに上昇することから、DDX60 依存的な自然免疫応答が HBV 感染初期に生じていることが明らかとなった。

研究分担者(村上周子)

(1) ツパイより経時的に採取可能な血液量は限られており、微量の血清による HBV 感染評価系を確立した。HBV-DNA の定量は、血清 5 μ l より、HBs 抗原、HBc 抗原、AST、ALT、アルブミン等の評価にはそれぞれ約 2 μ l の血清で測定することが可能である高感度測定系を確立した。

研究分担者(櫻井 遊)

(1) 新規 pH 応答型カチオン性脂質である YSK05 の合成に成功し、脂質エンベロープに組み込むことにより、in vivo 肝臓へ効率よく siRNA の送達を可能とする YSK-MEND の開発を試みた。MEND の調製法の改変、脂質組成比、等の最適化を行った。

(2) その結果、マウス肝臓へ siRNA を送達し、効率よくノックダウン (ED50: 0.015mg/kg) する YSK-MEND の開発に成功した。そこで、小原道法班員との共同研究により、HCV 感染したヒト肝臓キメラマウスへ HCV-mRNA に対する siRNA を搭載した YSK-MEND を静脈内投与したところ、HCV の感染を 1mg/kg で高効率に抑制することに成功した。

研究分担者(日浅陽一)

(1) HBs 抗原パルス DC 投与では HBs 抗原特異的免疫反応しか得られなかったが、HBc 抗原パルス DC 投与では、HBs 抗原の陰性化、HBs 抗体の陽転、HBc 抗原のみならず HBs 抗原特異的 CTL の産生がみられた。これらの結果より、HBc 抗原投与が HBV に対して有効な免疫治療となりうる事が示唆された。

(2) HBV-DNA 持続陽性が確認されたツパイを用いて、HBs 抗原および HBc 抗原ワクチンを投与し、その免疫治療効果を見る実験のプロトコールを作成した。投与する HBV 治療ワクチンについては既に作成している。今後、投与による細胞免疫の誘導能、炎症性サイトカインの変化などについて検討し、上記治療ワクチンによる免疫病態変化について検討する。

IV. 平成26~28年度の課題

(1) 全ゲノム情報から、さらに必要なペプチド抗体作成、cDNA クローン化、蛋白発現系の構築を行う。これにより、ツパイ免疫学的解析系の確立を行う。

(2) 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。これにより、新生児への感染から持続感染、さらにはその個体を繁殖し垂直感染系を樹立するシステム構築を行う。

(3) ツパイ馴化 HBV と高感受性ツパイ系統を組み合わせ、確立した感染法・評価系を用いて、肝炎・肝硬変・肝がんの発症頻度を指標にしながら、より効率の良い感染・発症評価系の改良を進める。より感染効率の良いツパイの確立を目指して、遺伝子改変なども見据えて発生物学的な手法を導入する (ES 細胞を利用した遺伝子改変など)。

(4) ツパイワクチンモデルの確立とワクチンアジュバントのスクリーニングを進める。ツパイを用いて、B 型肝炎ウイルス抗原とともに、これまでに得られたアジュバント共に免疫し、ツパイにおける獲得免疫の誘導に関して検討する。

(5) DDX60 分子が HBV の複製を抑制することを発見した。この詳細なメカニズムを解明するとともに、DDX60 を活性化する薬剤が HBV を抑制するかどうかを、ツパイ動物モデルを用いて検討する。

(6) HBV cccDNA を標的とした TALEN の MEND への高効率パッケージング技術の確立を行う。

(7) 最適化 YSK-MEND の GMP 基準による大量製造法、製剤試験評価法の確立を図る。物性試験を通じて品質管理された GMP 基準製造の YSK-MEND の大量製造を行い、前臨床試験への供給を目指す。

これらにより、HBV 感染ツパイの、新規抗ウイルス薬のスクリーニングや、長期的な肝線維化抑制試験などへの応用、新たなワクチンや治療薬投与時の免疫応答の評価系の確立をめざす。

V. 行政施策への貢献の可能性

B 型肝炎に対する有効なワクチンや治療薬開発の為の基礎研究の推進に貢献し、新たなワクチンや治療薬、HBV 感染の新たな検査薬の開発に繋がり、より良い肝炎治療法の開発に繋がると期待される。B 型肝炎の病態の解明、予防法や治療法を確立するために有用な新たな小動物モデルの樹立により、診断や治療の新たなガイドライン策定に貢献する可能性が考えられる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1) 研究代表者：小原道法

1. 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- λ in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. *PLoS ONE* 8(3):e59611(2013)
2. 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)

(2) 研究分担者：保富康宏

1. 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)

(3) 研究分担者：小原恭子

1. Saito M, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Hepatitis C virus promotes expression of the 3 β -hydroxysterol D24-reductase through Sp1. *J Med Virol.* 84 (5): 733-346, 2012.
2. Kasama Y, Saito M, Nishimura T, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. *Virus Research* 163: 405-409, 2012.

(4) 研究分担者：石井 健

1. Kobiyama K, Jounai N, Aoshi T, Tozuka M, Takeshita F, Coban C and Ishii KJ. "Innate Immune Signaling by, and Genetic Adjuvants for DNA Vaccination" *Vaccines* 2013, 1, 278-292; doi:10.3390/vaccines1030278.

(5) 研究分担者：押海裕之

1. Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, Seya T. A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog.* 2013, 9(8): e1003533.

(6) 研究分担者：村上周子

1. Shinkai N, Matsuura K, Sugauchi F, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Ogawa S, Nojiri S, T, Tanaka Y. Application of a newly developed high-sensitivity HBsAg chemiluminescent enzyme immunoassay for hepatitis B patients with HBsAg seroclearance. *J Clin Microbiol.* 2013, 51 (11): 3484-91, 2013.

(7) 研究分担者：櫻井 遊

1. Yu Sakurai, Hiroto Hatakeyama, Yusuke Sato, Mamoru Hyodo, Hidetaka Akita, Hideyoshi Harashima. Gene silencing via RNAi and siRNA quantification in tumor tissue using MEND, a liposomal siRNA delivery system., *Mol Ther* 2013, 21(6):1195-1203

(8) 研究分担者：日浅陽一

1. Watanabe T, Hiasa Y, Tokumoto Y, Hirooka M, Abe M, Ikeda Y, Matsuura B, Chung RT, Onji M. Protein kinase R modulates c-Fos and c-Jun signaling to promote proliferation of hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus infection. *PLoS One.* 2013, 2;8(7):e67750.

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

別添①

●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

1. 昭和48年4月 (財)日本ポリオ研究所 研究員(ポリオウイルスの分子生物学的解析)
2. 昭和57年1月 北里大学薬学部公衆衛生学教室講座研究員(ポリオウイルス遺伝子機能の解析)
3. 昭和59年5月 東京大学医学部細菌学教室受託研究員(ポリオウイルス遺伝子機能の解析)
4. 平成元年4月 東燃、総合研究所、基礎研究所、免疫工学グループ・グループヘッド(肝炎ウイルスの分子生物学的解析及びその制御)
5. 平成4年4月 東京都臨床医学総合研究所、微生物研究部門・室長(肝炎ウイルスの分子生物学的解析及びその制御)
6. 平成16年4月 東京都臨床医学総合研究所、部長、SARS,C型肝炎等感染症プロジェクト・プロジェクトリーダー(肝炎ウイルス複製機構、病原性発現機序の解析、治療法の開発に関する研究及びHBV、HCVワクチン、SARS、高病原性インフルエンザワクチン開発、動物モデルの開発)、組織改編に伴い名称変更
7. 平成23年4月 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(肝炎ウイルス複製機構、病原性発現機序の解析、治療法の開発に関する研究及びHBV、HCVワクチン、高病原性インフルエンザワクチン開発、動物モデルの開発)、組織統合に伴い名称変更

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

1. 野本 明男：東京大学名誉教授、微生物科学研究所所長
2. 服部 信：東京都立駒込病院・元院長
3. 下遠野 邦忠：京都大学名誉教授、千葉工業大学客員教授
4. 溝上 雅史：国立国際医療研究センター、肝炎免疫研究センター長
5. 徳久剛史：千葉大学医学部教授
6. 宮村 達男：元国立感染症研究所所長
7. 脇田 隆字：国立感染症研究所ウイルス二部部長

・主な研究課題

1. ポリオウイルスの神経病原性の研究(ポリオウイルスの増殖機能と神経病原性が相関していることを示した)
2. ポリオウイルス生ワクチン株の全塩基配列の決定および病原性発現遺伝子領域の研究(弱毒及び強毒ポリオウイルス株の各遺伝子領域のキメラクローンを用いて神経毒力を担う領域を明らかにした。)
3. ポリオウイルスの複製と病原性発現に関する研究(5'非翻訳領域の塩基変異による翻訳効率の変化が病原性の強さに関与していることを明らかにした。)
4. C型肝炎ウイルス遺伝子のクローニング及び遺伝子機能研究(C型肝炎ウイルスは内部認識機構により翻訳が開始されること、および遺伝子群の解析からグループに分類し、それぞれのインターフェロン治療応答性が異なることを明らかにした。此の知見を基に、治療前に有効な抗体診断薬を上市し臨床現場で使用されている。)
5. C型肝炎ウイルス粒子構造の解析と複製、病原性発現に関する研究(免疫電顕法によりウイルス粒子を同定した。此の知見を基にウイルス量定量ELISAを構築し上市した臨床現場で使用されている。)
6. 超高感度B型肝炎ウイルス遺伝子定量系の樹立(同定されている1コピーから検出できるRTD-PCRシステムを構築した。確定診断薬として上市し臨床現場で使用されている。)
7. B型肝炎ウイルス感染ヒト肝臓での感染動態の研究(B型肝炎ウイルス遺伝子を高感度に検出するRT-PCR in situ法を樹立し、その動態を明らかにした。)
8. B型肝炎ウイルス粒子構造の解析と複製、病原性発現に関する研究(免疫電顕法によりコブラ様ウイルス粒子を同定した。)
9. B型肝炎病態モデルマウスの樹立と病原性に関する研究(B型肝炎ウイルス遺伝子を発現したトランスジェニックマウスが肝炎・肝硬変・肝がんを発症することを明らかにした。)
10. B型肝炎の免疫治療に関する研究(慢性肝炎を発症しているトランスジェニックマウスにHBV遺伝子組