

換えワクチニアワクチンを接種する事で、肝炎症状が消失し、HBV 抗原も排除されることが示された。）

11. B型肝炎ウイルス排除機序の研究（ヒト肝細胞中で感染・増殖しているHBVの排除にはIFN- λ が重要であることをヒト肝臓キメラマウスを用いて明らかにした。）

・これまでの研究実績

1. 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 (2013) in press.
2. Tomoko Fujiyuki, Misako Yoneda, Fumihiko Yasui, Takeshi Kuraishi, Shosaku Hattori, Hyun-jeong Kwon, Keisuke Munekata, Yuri Kiso, Hiroshi Kida, Michinori Kohara, Chieko Kai. Infection of a Japanese isolate of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) to macaques by aerosol exposure. PLoS ONE (2013) in press.
3. 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)
4. Haru Ogiwara, Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Asako Takagi-Kamiya, Tsubasa Munakata, Namiko Nomura, Futoshi Shibasaki, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida and Michinori Kohara. : Histopathological evaluation of the diversity of cells susceptible to H5N1 virulent avian influenza virus. The American Journal of Pathology (2013) in press
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. Akira Sakurai, Katuyoshi Takayama, Namiko Nomura, Tsubasa Munakata, Naoki Yamamoto, Tsuruki Tamura, Jitsuho Yamada, Masako Hashimoto, Kazuhiro Kuwahara, Masatoshi Okamoto, Yoshihiro Sakoda, Yoshihiko Suda, Yukuharu Kobayashi, Nobuo Sakaguchi, Hiroshi Kida, Michinori Kohara and Futoshi Shibasaki. : Broad-spectrum detection of H5 subtype influenza A viruses with a new fluorescent immunochromatography system. PLoS ONE PLoS ONE 8(11):e76753 (2013) (2013)
9. Shinichiro Nakagawa, Yuichi Hirata, Takeshi Kameyama, Yuko Tokunaga, Yasumasa Nishitoh, Kazuko Hirabayashi, Junichi Yano, Takahiro Ochiya, Chise Tateno, Yasuhiro Tanaka, Masashi Mizokami, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Kazuaki Inoue, Makoto Yoshida, 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)
10. 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- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut* 62(9):1340-6 (2013)
11. 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)
12. Yasui F., Sudoh M., Arai M., Kohara M.: Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication.

J. Medical Virology 85(2):241-9 (2013)

13. Sekiguchi S., Kimura K., Chiyo T., Ohtuki T., Tobita Y., Tokunaga Y., Yasui F., Tsukiyama-Kohara K., Wakita T., Tanaka T., Miyasaka M., Mizuno K., Hayashi Y., Hishima T., Matsushima K., Kohara M.,: Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS ONE* 7(12):e51656.doi:10.1371 (2012)

14. Kazuaki Inoue, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Chiho Matsuda¹, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita, Shusuke Kuge, Makoto Yoshiba and Michinori Kohara. Impairment of interferon regulatory factor-1 3 activation by hepatitis C virus core protein basic region 1. *BBRC* 428(4):494-499 (2012).

15. Yuichi Hirata, Kazutaka Ikeda, Masayuki Sudoh, Akemi Suzuki, Yuko Tokunaga, Leiyun Weng, Masatoshi Ohta, Yoshimi Tobita, Ken Okano, Kazuhisa Ozeki, Kenichi Kawasaki, Takuo Tsukuda, Asao Katsume, Yuko Aoki, Takuya Umehara, Satoshi Sekiguchi, Tetsuya Toyoda, Kunitada Shimotohno, Tomoyoshi Soga, Masahiro Nishijima, Ryo Taguchi, and Michinori Kohara. Self-enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis. *PLoS Pathog.* 2012 Aug;8(8):e1002860. Epub 2012 Aug 16. (2012).

16. Qiang Wang, Shijian Zhang, Hongbing Jiang, Jinalan Wang, Leiyun, Weng, Yingying Mao, Satoshi Sekiguchi, Fumihiko Yasui, Michinori Kohara, Philippe Buchy, Vincent Deubel, Ke Xu, Bing Sun and Tetsuya Toyoda. PA from an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus activates viral transcription and replication, and induces apoptosis and interferon expression. *Virology Journal* 8;9:106-118 (2012).

17. Naoko Kubota, Yasutaka Inayoshi, Naoko Satoh, Takashi Fukuda, Kenta Iwai, Hiroshi Tomoda, Michinori Kohara, Kazuhiro Kataoka, Akira Shimamoto, Yasuhiro Furuichi, Akio Nomoto, Akira Naganuma and Shusuke Kuge. HSC90 is required for nascent hepatitis C virus core protein stability in yeast cells. *FEBS letter* 586(16):2318-2325 (2012)

18. Hideyuki Konishi, Koichi Okamoto, Yusuke Ohmori, Hitoshi Yoshino, Hiroshi Ohmori, Motooki Ashiara, Yuichi Hirata, Atsunori Ohta, Hiroshi Sakamoto, Natsuko Hada, Asao Katsume, Michinori Kohara, Kazumi Morikawa, Takuo Tsukuda, Nobuo Shimma, Graham Foster, William Alazawi, Yuko Aoki, Mikio Arisawa, and Masayuki Sudoh. An orally available, small-molecule interferon inhibits hepatitis C virus replication. *Sci. Comm* 2: 259 : 1 – 9 (2012).

19. Leiyun Weng; Michinori Kohara; Takaji Wakita; Kunitada Shimotohno; Tetsuya Toyoda. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene* 496:79-87 (2012).

20. Makoto Saito, Michinori Kohara, Yuri Kasama and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus induces overexpression of β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Sp1. *J. Med. Virol.* 84:733-746 (2012).

21. Yuri Kasama, Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Masaaki Satoh, Zhongzhi Wang, Nagla Elwy, Shinji Harada, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. *Virus Res.* 163: 405-409 (2012).

22. 発明の名称： 肝炎ウイルスの感染・増殖方法

①発明者：小原道法、林仁寿、池谷武志

②出願日：2012年7月4日

③出願番号：特願 2012-150818

④出願人：公益財団法人東京都医学総合研究所；株式会社トランスパレント

⑤発明の内容の概略：HBV, HCV in vitro 3D 培養系と感染増殖に関する

23. 発明の名称： ウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベータートランスジェニックマウス

①発明者：小原道法、寺社下 浩一、川瀬 洋介、向谷 知世、大下 浩樹、浜村 理子

②出願日：2012年4月27日

③出願番号：特願 2012-102814

④出願人：(財)東京都医学総合研究所；中外製薬(株)；(株)フェニックスバイオ

⑤発明の内容の概略：ヒト肝臓キメラマウス作成のための肝炎発症トランスジェニックマウスに関する

24. 発明の名称： 新型インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンタンパク質遺伝子が組み込まれた B5R 遺伝子欠損組換えワクシニアウイルス

①発明者：小原道法、安井 文彦

②出願日：2012年4月18日

③出願番号：特願 2012-094872

④出願人：(財)化学及血清療法研究所；(財)東京都医学総合研究所

⑤発明の内容の概略：インフルエンザウイルス組換え B5R 遺伝子欠損ワクシニアウイルスに関する

25. Masaaki Satoh, Makoto Saito, Takashi Takano, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Yasumasa Nishito, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Masayuki Sudo, Chieko Kai, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1. *J Infect Dis.* 204(8):1172-80 (2011).

26. Tomoko Chiyo, Satoshi Sekiguchi, Masahiro Hayashi, Yoshimi Tobita, Yumi Kanegae, Izumu Saito, and Michinori Kohara. Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice. *Virus Res.* 160(1-2):89-97 (2011).

27. Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masahiro Hayashi, Yuichi Hirata, Masaaki Satoh, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Masayuki Sudo, and Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology* 55(3):512-21 (2011)

28. Kiminori Kimura, Michinori Kohara. *Frontiers of Model Animals for Human Diseases. Experimental Animals* 60(2), 93-100 (2011).

29. Takashi Takano, Michinori Kohara, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Makoto Saito, Chieko Kai, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J. Med. Virol.* 83:801-809 (2011).

30. Kiminori kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* 89:433-442 (2011).

31. Masaaki Arai, Hidenori Suzuki, Yoshimi Tobita, Asako Takagi, Koichi Okamoto, Atsunori Ohta, Masayuki Sudoh, Kunitada Shimotohno, Michinori Kohara. Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. *Arch. Virol.* 156:295-304 (2011).

32. Kayo Yoshikawa, Aya Ogata, Chiho Matsuda, Michinori Kohara, Hideo Iba, Yukio Kitade, Yoshihito Ueno. Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance. *Bioconjugate Chemistry* 22:42-49 (2011).

33. 発明の名称： バイオアッセイ用プレート及びアッセイ方法

①発明者：高井 まどか、福島 達郎、小原道法

②出願日：2011年12月8日

③出願番号：特願 2011-268549

④出願人：東京大学；(財)東京都医学総合研究所

⑤発明の内容の概略：微量高感度測定系に関する

34. 発明の名称： 抗インフルエンザウイルス活性を有するペプチド

①発明者：小原道法、佐々木 亨、パトリック・リード

②出願日：2011年9月27日

③出願番号：特願 2011-211100

④出願人：財団法人東京都医学総合研究所、ペプチドリーム株式会社

⑤発明の内容の概略：抗インフルエンザウイルス活性を有する特殊環状ペプチド等に関する

35. 発明の名称： 新型インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンタンパク質遺伝子を有する DIs 株由来組換えワクシニアウイルス

①発明者：小原道法、安井 文彦、喜田 宏、迫田 義博、石井 孝司

②出願日：2011年8月31日

③出願番号：特願 2011-189251

④出願人：(財)東京都医学総合研究所；北海道大学；国立感染症研究所長；(財)化学及血清療法研究所

⑤発明の内容の概略：インフルエンザウイルスワクチンに関する

36. Leiyun Weng, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Ying He, Jin Zhong, Tetsuya Toyoda. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype specific manner. J. Virol. 84(22):11761-70 (2010).

37. Hideko Nuriya, Kazuaki Inoue, Takeshi Tanaka, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Kyosuke Kaji, Seishu Hayashi, Shuichi Kaneko and Michinori Kohara. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based *in situ* hybridization. J. Clin. Microbiol. 48(11):3843-3851 (2010).

38. Yuri Kasama, Satoshi Sekiguchi, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Masaaki Satoh, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Motohiro Takeya, Yoichi Hiasa, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas *in vivo*. Blood 116(23):4926-4933 (2010).

39. Kenichi Satoh, Hiroki Takahashi, Chiho Matsuda, Takuya Umehara, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Mikio Zeniya and Michinori Kohara. Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. J. Med. Virol. 82(9):1545-1553 (2010).

40. Masaaki Satoh, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Sumako Iwanaga, Salem Nagla Elwy Salem Ali, Takahiro Seki, Seiji Okada, Michinori Kohara, Shinji Harada, Chieko Kai, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. Dec;33(6):e81-8 (2010).

41. Chen Y-Z, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, and Nishimura Y. Identification of SARS-COV spike protein-derived and HLA-A2-restricted human CTL epitopes by using a new muramyl dipeptidederivative adjuvant. International Journal of Immunopathology and Pharmacolog 23(1):165-77 (2010).

42. Yutaka Amako, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Yuichi Hirata, Satoshi Sekiguchi, Yoshimi Tobita, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Hiromichi Yonekawa and Michinori Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* J. Virology 84(1):303-311 (2010).

43. 発明の名称： 新型インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンタンパク質遺伝子を有する組換えワクシニアウイルス

①発明者：小原道法、安井文彦、迫田義博、喜田宏、村上利夫

②出願日：2010年10月15日

③出願番号：特願2010-233064

④出願人：(財)東京都医学研究機構、国立大学法人 北海道大学、(財)化学及血清療法研究所

⑤発明の内容の概略：感染予防及び治療効果を示すインフルエンザウイルス HA 遺伝子を有する組換えワクシニアウイルス

44. 発明の名称：) 難治性ウイルス感染症の治療剤

①発明者：小原道法、中川慎一郎

②出願日：2010年9月9日

③出願番号：特願 2010-202355④出願人：(財)東京都医学研究機構

⑤発明の内容の概略：インターフェロンを誘導して非常に強い抗 HCV, HBV 活性を示す、カチオニックリポソーム製剤

45. 発明の名称： RRM2 のアンタゴニストを有効成分として含有する C 型肝炎治療剤

①発明者：小原道法、小原恭子、佐藤正明、須藤正幸

- ②出願日：2010年8月12日
- ③出願番号：特願 2010-180981
- ④出願人：中外製薬株式会社、(財)東京都医学研究機構、国立大学法人 熊本大学
- ⑤発明の内容の概略：C型肝炎ウイルス複製に必須な宿主因子 RRM2 に対する阻害剤

46. Tomohiro Nishimura, Michinori Kohara, Kosuke Izumi, Yuri Kasama, Yuichi Hirata, Ying Huang, Masahiro Shuda, Hideko Nuriya, Yuko Tokunaga, Masaaki Sato, Makoto Saito, Chieko Kai and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus impairs P53 via persistent over-expression of 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase. *J. Biol. Chem.* 284(52):36442-36452 (2009).

47. Uto H, Stuver SO, Hayashi K, Kumagai K, Sasaki F, Kanmura S, Numata M, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Kohara M, Tsubouchi H. Increased rate of death related to presence of viremia among hepatitis C virus antibody-positive subjects in a community-based cohort study. *Hepatology.* Aug;50(2):393-9. (2009)

48. Keigo Machida, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Eiji Seike, Shigenobu Tóne, Yukiko Hayashi, Yuri Kasama, Masumi Shimizu, Hidemi Takahashi, Chyoji Taya, Hiromichi Yonekawa, Nobuyuki Tanaka, and Michinori Kohara. Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins. *Gastroenterology* 137(1):285-96. (2009).

49. Leiyun Weng, Jiamu Du, Jingling Zhou, Jianping Ding, Takaji Wakita, Michinori Kohara, Tetsuya Toyoda. Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain. *Arch Virol.* 154(5):765-773. (2009).

50. Yoshihito Ueno, Yuuji Watanabe, Aya Shibata, Kayo Yoshikawa, Takashi Takano, Michinori Kohara, Yukio Kitade. Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing universal overhangs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 17(5):1974-81. (2009).

51. 発明の名称：抗C型肝炎ウイルス効果を有するベンゾフラン誘導体

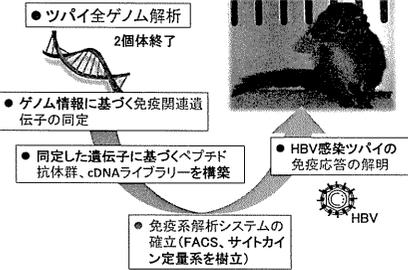
- ①発明者：小原道法、安井文彦、須藤正幸
- ②出願日：2009年4月8日
- ③出願番号：特願 2009-93608
- ④出願人：中外製薬株式会社、財団法人東京都医学研究機構
- ⑤発明の内容の概略：C型肝炎ウイルスの複製を阻害する抗酸化剤

VII. III(2年間の研究成果)の概要図

A. ツパイ全ゲノム解析とHBV感染免疫応答の解析

ツパイの全ゲノム解析

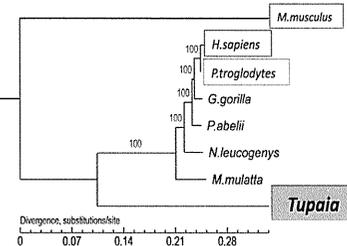
免疫系解析システムの確立・免疫応答の解明



ツパイ免疫関連遺伝子の同定

ツパイ免疫系解析ツール(cDNAと特異抗体群)の樹立

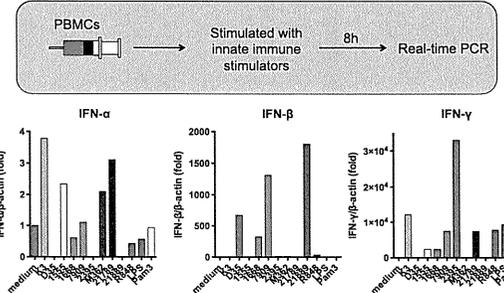
HBV感染ツパイの免疫応答の解析



抗体作成済み及び作成中ツパイ標的分子

抗体名	抗原	種別	状態
AT1	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT2	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT3	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT4	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT5	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT6	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT7	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT8	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT9	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT10	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT11	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT12	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT13	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT14	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT15	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT16	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT17	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT18	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT19	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT20	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT21	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT22	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT23	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT24	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT25	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT26	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT27	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT28	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT29	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT30	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT31	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT32	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT33	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT34	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT35	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT36	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT37	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT38	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT39	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT40	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT41	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT42	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT43	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT44	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT45	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT46	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT47	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT48	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT49	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT50	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT51	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT52	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT53	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT54	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT55	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT56	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT57	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT58	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT59	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT60	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT61	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT62	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT63	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT64	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT65	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT66	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT67	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT68	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT69	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT70	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT71	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT72	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT73	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT74	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT75	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT76	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT77	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT78	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT79	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT80	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT81	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT82	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT83	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT84	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT85	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT86	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT87	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT88	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT89	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT90	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT91	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT92	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT93	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT94	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT95	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT96	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT97	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT98	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT99	HBV DNA	中和抗体	作成済み
AT100	HBV DNA	中和抗体	作成済み

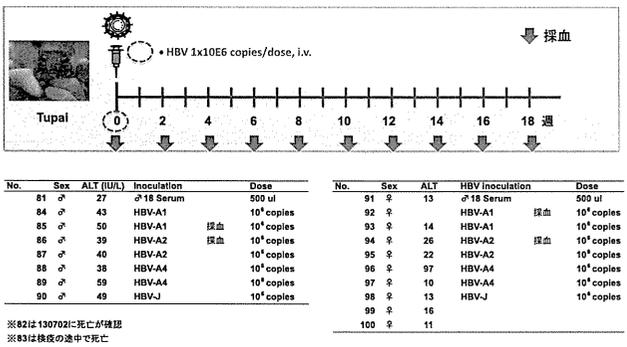
TLR9リガンドに対するツパイPBMCsの応答はヒトに近かった



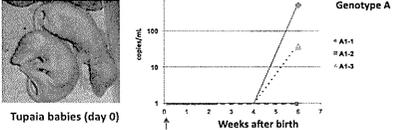
B. HBV-ツパイ感染系の確立 感染法と感染・発症評価系の改良

1) ツパイ感受性HBV株の樹立

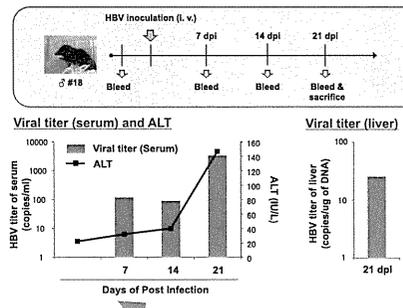
ツパイへの各種HBV感染・サンプリング



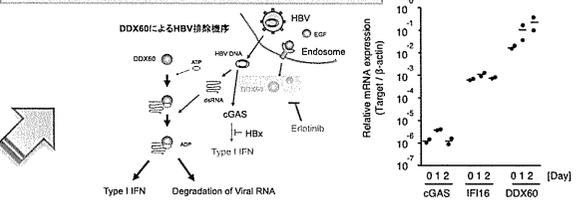
新生ツパイへのHBV感染後の血清中ウイルス量



ツパイ成獣へのHBV感染後の血清中ウイルス量

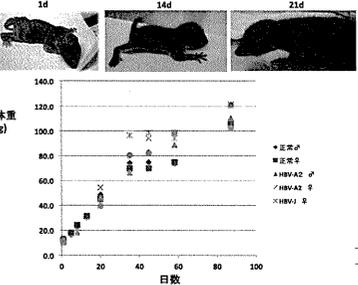


HBV感染ツパイ肝臓ではDDX60が誘導されていた



2) HBV高感受性ツパイの系統化

ツパイの育成期間中の体重増加



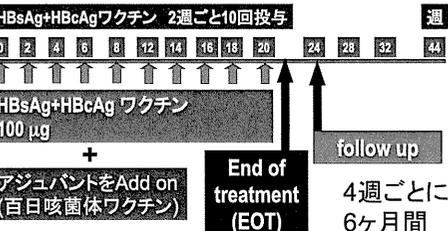
ツパイの繁殖・育成の成績 (医薬基盤研究所)

母ツパイ番号	妊娠までの交配数	出生数	死亡数	離乳数
T011305012	2	4	1	3
T011305016	2	3	3	0
T011305017	2	3	4	0
T011305018	1	4	4	0
T011305019	2	4	0	4
T011305020	1	3	0	3
T011305021	未妊娠	1	3	0
T011305023	2	1	0	1
T011305024	2	2	2	0
T011305025	未妊娠	2	4	1
T011305026	2	4	1	3
T011305028	2	4	0	4
T011305029	4	1	1	0
T011305030	2	1	1	0
		42	16	22 (+4)

・42頭のうち22頭が親と分離して離乳済み
・2個体が妊娠していないが、胎どの場合で2週間の同居で妊娠が成立

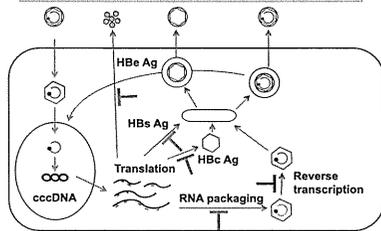
C. HBV治療効果判定法の確立 (新規HBV感染治療法の効果判定)

HBV感染ツパイを用いた治療実験プロトコール

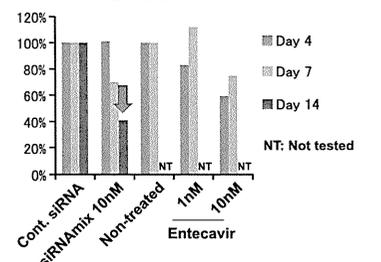


HBV感染ツパイにHBsAg+HBcAgワクチン接種し、HBV-DNA, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HbcAb, ALTIについてフォローする

MEND/siRNA投与によるHBVcccDNAの排除



HBV感染初代ヒト肝臓キメラマウス培養肝細胞でのHBVcccDNA阻害活性



siRNAはETVよりも効果的にcccDNAを排除した。HBV感染ツパイにMEND/siRNAを投与し、HBV-DNA, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HbcAb, ALTIについて解析する。剖検後、cccDNAの検索を行う。

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

- ・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 小原 道法
- ・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 保富 康宏
- ・鹿児島大学共同獣医学部 越境性動物疾病制御研究センター
教授・センター長 小原 恭子
- ・独立行政法人医薬基盤研究所・免疫学
プロジェクトリーダー 石井 健
- ・北海道大学大学院・医学研究科
講師 押海 裕之
- ・公立大学法人名古屋市立大学院医学研究科
助教 村上 周子
- ・北海道大学大学院薬学研究院
助教 櫻井 遊
- ・愛媛大学医学部
教授 日浅 陽一

HBV感染感受性動物モデル



チンパンジー

- HBV感染実験に最適の動物モデル
- 動物愛護の観点から、実験動物としての使用できなくなった。

ヒト肝臓キメラマウス

- ヒトの肝臓組織を持つマウス、HBVが効率よく感染増殖
- 獲得免疫系が機能しておらず、炎症など免疫実験動物モデルとしては不適



ツパイ

- 肝炎ウイルスが感染増殖でき、肝硬変肝がんを発症する (Hepatology1996,24,1-5, Hepatology2005,41,247-56, J.Virol.2010,84,303-311,
- 獲得免疫系が機能しており、肝炎発症・ワクチン免疫実験動物モデルとして使用できる

体重100-150グラム

ツパイ研究の目的

ツパイの解決すべき課題

1. 実験動物としての研究は、ほとんど進んでいない。とりわけ、その免疫系の仕組みに関する知見は少ない。
2. 感染感受性に個体差があり、治療薬評価系として使いにくい。

1. 高感受性HBV-ツパイ感染実験系の確立
2. ツパイ免疫系解析システムの開発

1. HBV感染に対する病態及び免疫応答の解明
2. ツパイを用いたHBV治療効果判定法を確立し、非臨床試験への応用

ツパイの交配と産仔数・育成期間中の体重増加

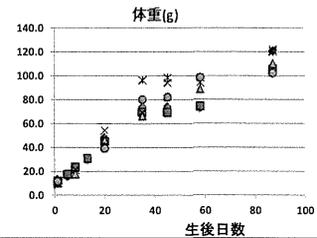


妊娠期間: 40~45日

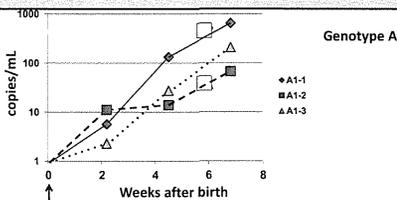
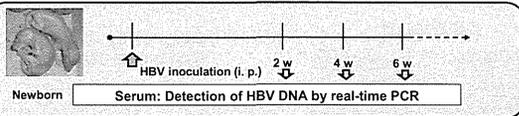
*妊娠率 91% (39/43)

*産仔数 3.67±0.67 (3~5)

*新生仔ツパイの体重 10.4±1.7g (6.6~14.9g)



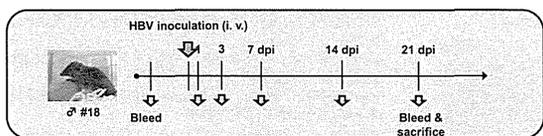
HBV感染新生仔ツパイからのウイルス検出



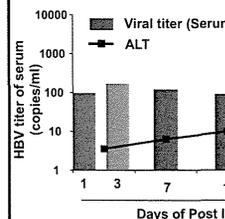
Tupaia	1d	3d	7d	2w	4w	6w	8w	10w	12w
Newborn				18/24	16/23	8/16	9/16	7/16	7/16

number of serum HBV genome-positive / number of inoculated animals

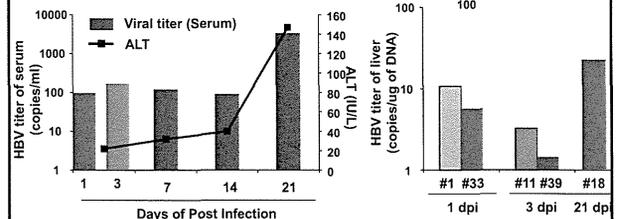
成獣ツパイへのHBV感染①



Viral titer (serum) and ALT



Viral titer (liver)



HBV感染ツパイ肝臓のHE染色所見

Uninfected X200, 1 dpi X200, 3 dpi X200, 21 dpi X200

- ✓ Inflammation was not observed at 1 dpi. (upper right)
- ✓ Degeneration of hepatocytes were observed at 3 dpi. (lower)
- ✓ Hepatocellular proliferation, degeneration and infiltration of inflammatory cells were observed at 21 dpi.

⇒ HBV infected tupaia causes quick degeneration of hepatocytes.

HBV感染ツパイ肝臓におけるmRNAの発現解析

HBV感染ツパイの肝臓におけるRNAの発現量の解析を行った。
肝臓より抽出したRNA資試料をillumina社 次世代HiSeq2000シーケンサーにより網羅的RNAシーケンシングを行った。

<サンプル>
 ・非感染個体 4個体
 ・感染個体
 HBV-C感染 1 dpi 2個体
 HBV-C感染 3 dpi 2個体
 HBV-A2感染 21 dpi 1個体
 計9個体

成獣ツパイへのHBV感染②

HBV titer (copies/mL) and ALT (IU/L) over 12 weeks post-infection.

⇒ HBV infected tupaia showed persistent infection.

相同分子種遺伝子クラスター

A. 相同分子種遺伝子のベン図
 B. HBVレセプター; NTCPの相同性

Among genomes of *Tupaia*, *P. troglodytes*, *M. musculus* and *H. sapiens*.

□ pre-S1 binding region (Yan et al., eLife 2012)

ツパイを用いたワクチン治療実験のプロトコール

HBV感染ツパイ

- ツパイを用いた、HBVを排除する免疫治療(HBs抗原+HBc抗原ワクチン)の確立
- より適切なアジュバントの模索・・・百日咳菌体ワクチンの併用
- より高効率な治療プロトコールへの改訂
- Peg-IFN+HBVワクチン、テノホビル+HBVワクチン等の併用治療により治療効果向上を目指す

HBsAg+HBcAg ワクチン 2週ごと10回投与

HBsAg+HBcAg ワクチン 33 ug + 33 ug

アジュバントをAdd on (百日咳菌体ワクチン)

投薬終了 経過観察

2週ごとに採血、6ヶ月間

HBV-DNA, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, ALTについてフォローする

HBV感染評価方法の確立

免疫学的評価

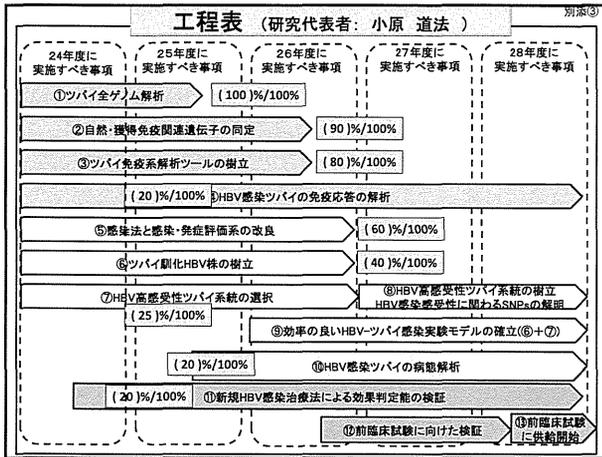
富士レビオ ルミバリスG1200

HBs 抗原 (HBsAg)
 HBコア関連抗原 (HBcAg)
 など

HBsAg-HQIによる測定結果
 急性期HBV感染患者血清

血清 10-20 uL で検討しなければならない

※ツパイより経日的に採取可能な血液量は少量であるが、これまでにヒト肝細胞系メラマウスにおけるHBV感染実験において微量サンプルからのHBs抗原、HBc抗原、ALT等の測定ができるようになった。



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)

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。
 イ 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)「〇〇〇研究班」(研究代表者名: 〇〇〇〇)
 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「ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの開発に関する研究研究班」(研究代表者名: 小原道法)

② HCV治療を目指したDNAワクチンおよびHCV組換えワクチンアワクチンの開発を目指した研究で、慢性肝炎を発症しているHCVトランスジェニックマウス(①)に接種しその治療効果を判定しており、本研究とは異なる。

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24年度)

ア 他の研究班と合同で研究会議を開催していない。
 イ 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)

平成25年12月13日 4班合同班会議

- 免疫系を保持した次世代型B型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発とその応用(研究代表者: 竹原徹郎)
- 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(研究代表者: 茶山一彰)
- ツバイン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)
- ヒトチンパンジー・マウスハイブリッド技術を利用したB型肝炎ウイルス感染モデルマウスの開発(研究代表者: 山村研一)

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： 免疫系を保持した次世代型 B型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発とその応用
課題番号： H24-B創-肝炎-一般-015
予定期間： H24年度からH28年度まで
研究代表者： 竹原 徹郎
所属研究機関： 大阪大学
所属部局： 医学系研究科
職名： 教授
年次別研究費(交付決定額)：1年目 100,000,000 円 2年目 130,000,000 円

I. 研究の意義

- (1) B型肝炎の病態の解明や画期的な治療法の開発にはモデル動物を用いた研究が必要である。
- (2) 既存の uPA-SCID モデルでは、ウイルスに対する免疫応答を解析できない、系統維持が困難であり高価である、短命であり長期の病態解析ができないなどの欠点がある。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 免疫能を保持した安定した新規 B型肝炎小動物モデルの開発を目的として、新規レシピエントマウスの確立、ドナー細胞の開発、イノキュラムの調整について研究を推進する。
- (2) ハイδροダイナミック法に使用する種々の HBV コンストラクトを作成し、B型肝炎に対するマウス免疫応答を解析できるシステムを樹立する。
- (3) マウスの免疫系をヒト細胞で再構成する方法を確立し、B型肝炎に対するヒト免疫応答を解析できるシステムを樹立する。
- (4) TK-NOG マウスを用いた成人型 B型肝炎モデルを樹立する。
- (5) Bcl-2 関連分子欠損マウスを用いた新規の肝細胞キメラマウスを作成し、B型肝炎モデルの開発を行う。
- (6) Bcl-2 関連分子欠損マウスを用いて胎児期からの肝細胞キメラマウスを作成し、これにより HBV キャリアマウスを樹立し B型肝炎治療への応用を目指す。
- (7) ES/iPS 細胞からの肝細胞・血液細胞の誘導法を確立し、同じ遺伝的背景をもつヒト細胞がマウス個体内で相互作用する新規のキメラマウスを作成し、B型肝炎モデルへの応用を目指す。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者

- (1) ゲノタイプ A およびゲノタイプ C の HBV 遺伝子それぞれ 1.2-mer をタンデムに繋いだ発現プラスミドを作成した。NOD マウス、NOD-SCID マウス (T、B 細胞欠損)、NOG マウス (T、B、NK 細胞欠損) にこれらの遺伝子をハイδροダイナミック法にて投与したところ、約 5% の肝細胞において HBV 関連抗原が陽性となり、HBs 抗原血症およびウイルス血症が成立した。NOD マウスではウイルス血症は一過性であったが、NOD-SCID、NOG マウスでは遷延化し、また NOD-SCID に比し NOG マウスで高いウイルス血症を示したことから、獲得免疫応答、自然免疫応答の双方がウイルス排除には関与していることが示唆された。またゲノタイプ A ではゲノタイプ C に比

し高いウイルス血症を示し、ハイドロダイナミック法でマウスに成立するウイルス増殖システムがヒトの B 型急性感染でみられる応答と酷似していることが示された。

- (2) ヒト肝細胞への置換率が 30~70%の TK-NOG マウスにゲノタイプ A、ゲノタイプ C の患者血清を投与することにより、1~2 週間で持続的な感染が成立することを明らかにした。感染が成立したマウスに、ヒト PBMC を投与することにより、肝障害が誘導され、血中ウイルス量が低下することを明らかにした。

・研究分担者

- (1) NOG-MHC class I/class II KO マウスにヒト末梢血単核球を静注すると、肝臓より分離される単核球は経時的に増加し、移植後 28 日で約 90%がヒト細胞に置換した（移植後当初は NK 細胞、B 細胞、DC の増加を認め、その後徐々に T 細胞の増加を認めた）。NOG マウスへの移植で認められる GVH 応答は著明に抑制され、肝障害も極めて軽微であり、マウス免疫系ヒト化の有望なツールになることが示された。このようなマウスに HBs ワクチンを投与したところ、50%のマウスで HBs 抗体価の上昇がみられた。また、ハイドロダイナミック法による HBV の投与により、HBc ペプチドに対する T 細胞応答が誘導されたことから、移植されたヒト免疫細胞がマウス個体内で HBV に対して機能的に応答し得ることが明らかとなった。（巽 智秀）
- (2) Bcl-xL/Mcl-1 KO マウスおよび野生型マウスの ED16.5 の胎児の卵黄嚢静脈より GFP トランスジェニックマウス由来の初代培養肝細胞を投与し、生下時において GFP 陽性肝細胞がマウス肝臓内に生着していることを確認した。（疋田隼人）
- (3) EGFP を遺伝子として組込んだ非増殖性組換え HBV (EGFP-HBV) を作成し、その産生を確認した。（上田啓次）
- (4) ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞から細胞シートを作成し、肝障害免疫不全マウスへ移植した。血中アルブミン濃度が 100~2000 ng/ml に達し、生着することを確認した。ヒト肝キメラマウス作製に適すると予想されるヒト iPS 細胞として、センダイウイルスベクターを用いることでヒト肝細胞からゲノムインテグレーションフリー・ヒト iPS 細胞株を多数樹立することに成功した。（水口裕之）
- (5) マウス ES/iPS 細胞に対して、転写因子 Lhx2 をオン・オフ発現することにより、造血幹細胞を誘導し、さらに造血細胞、免疫細胞への分化が誘導できることを明らかにした。（北島健二）
- (6) TK-NOG マウスにヒト肝細胞を移植し、30~70%の置換率をもつキメラマウスを作成した。Mcl-1 KO (C57BL 系統) マウスを免疫不全化するため、スピードコンジェニック法による NOG マウスへの戻し交配を N5 世代まで行った。ヒト末梢血単核球移植後も GVHD が起こりにくい NOG-MHC class I/class II KO マウスと、ヒト肝細胞移植可能な TK-NOG を交配することで、ヒトの肝臓と免疫の両者を有する TK-NOG-MHC class I/class II KO マウスの作製を開始した。（末水洋志）
- (7) HLA-DR4 を発現する NOG マウスを作成し、ヒト液性免疫反応が惹起することを確認した。ヒト IL-2 発現 NOG マウスにおいてヒト NK 細胞が分化誘導され、細胞傷害活性を有することを確認した。NOG-MHC class I/class II KO マウスを作成した。ヒト T 細胞を HLA-DR4tgI-Aβ KO/NOG マウス内で発分化させ、抗原による免疫により、生体内での T 細胞の分裂増殖、サイトカイン産生能を確認した。（高橋武司）

IV. 平成 26～28 年度の課題

- (1) ヒト末梢血単核球を用いたマウス免疫系のヒト化についてさらに解析をするとともに、造血幹細胞の移植実験を推進する。
- (2) ヒト HLA を発現する NOG マウスを用いて免疫系のヒト化を行う。
- (3) TK-NOG マウスを用いた B 型肝炎モデルについて、免疫系のヒト化を行い、B 型肝炎に対するヒト免疫応答の解析を行う。
- (4) TK-NOG マウスの MHC class I/ class II をノックアウトし、ヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスの免疫系のヒト化を進める。
- (5) NOG 化した Mcl-1 KO マウスを用いて、肝細胞キメラマウスを作成する。
- (6) 胎児期細胞移植法による、肝細胞キメラマウスを作成する。
- (7) iPS 細胞から樹立した肝細胞の TK-NOG マウスへ移植し、キメラマウス作成する。
- (8) ヒト iPS 細胞から血液細胞への分化誘導に必要な転写因子を明らかにする。
- (9) HBV の感染動態を追跡できる組換え HBV コンストラクトを作成する。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 安価で安定した B 型肝炎モデルが作成されることにより、B 型肝炎に対する創薬研究が推進される。
- (2) 免疫系を保持した B 型肝炎モデルが作出されることにより、免疫系を標的とした新たな機序の抗 HBV 薬の開発に繋がる。
- (3) CCC DNA の排除を目的とした治療法の開発において有用な in vivo モデルを提供できる。

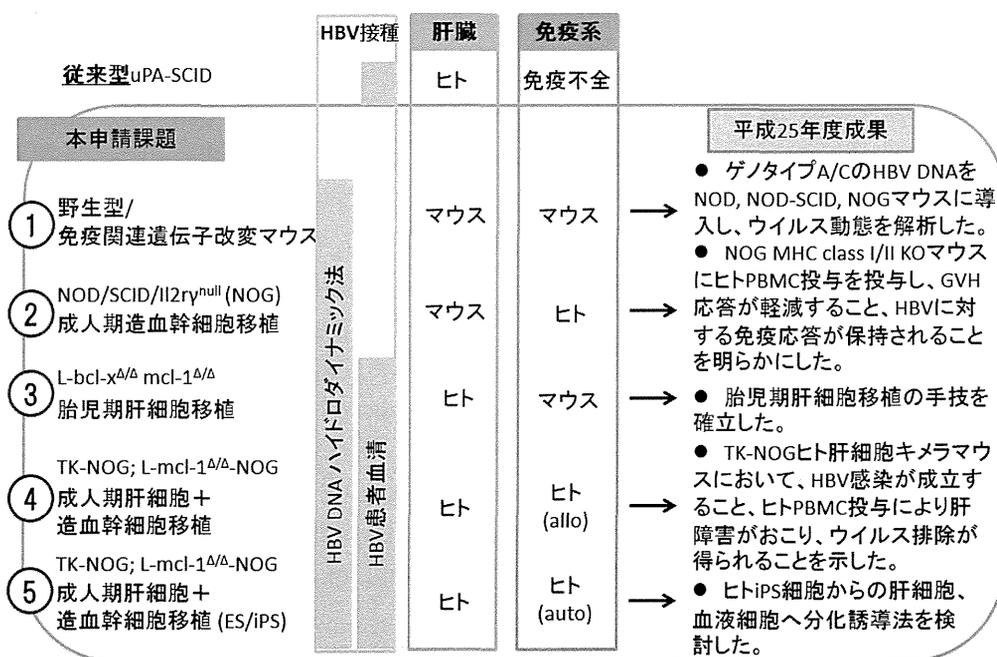
VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- (1) Nawa T, Tatsumi T, Hikita H, Takehara T, et al. Interferon- α suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via the protein kinase C pathway. **Virology** 432: 452-459, 2012.
- (2) Kurokawa M, Tatsumi T, Takehara T, et al. Long-term effect of lamivudine treatment on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection. **J Gastroenterol** 47: 577-585, 2012.
- (3) Hikita H, Tatsumi T, Takehara T, et al. Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: A causal link between apoptosis and carcinogenesis. **J Hepatol** 57: 92-100, 2012.
- (4) Nishida T, Tatsumi T, Takehara T, et al. Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic. **Hepatol Res** 43: 339-346, 2013.
- (5) Matsubara T, Takehara T, et al. TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlated with angiogenesis. **Hepatology** 57: 1416-1425, 2013.
- (6) Yoshio S, Takehara T, et al. Human BDCA3(+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. **Hepatology** 57: 1705-1715, 2013.
- (7) Kodama T, Hikita H, Tatsumi T, Takehara T, et al. The Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins Bim and Bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins in healthy liver. **J Biol Chem** 288: 30009-30018, 2013.
- (8) Takayama K, Mizuguchi H, et al. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction. **J Hepatol** 57: 628-636, 2012.
- (9) Takayama K, Mizuguchi H, et al. Long-term self-renewal of human ES/iPS-derived hepatoblast-like cells on human Laminin 111-coated dishes. **Stem Cell Rep** 1: 322-335, 2013.
- (10) Takayama K, Mizuguchi H, et al. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. **Biomaterials** 34: 1781-1789, 2013.
- (11) Kawabata K, Mizuguchi H, et al. Endodermal and hepatic differentiation from human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. **J Stem Cell Res Ther (in press)**
- (12) Okada Y, Kitajima K, et al. Embryonic stem cell differentiation system for evaluating gene functions involved in physiological megakaryocytic differentiation. **Biochem Biophys Res Commun** 419: 477-81, 2012.
- (13) Tanaka K, Kitajima K, et al. Tumor suppressive function of protein tyrosine phosphatase non-receptor type 23 in testicular germ cell tumors is lost upon

overexpression of miR142-3p. **J Biol Chem** **288**: 23990-9, 2013. (14) Kitajima K, et al. Molecular functions of the LIM-homeobox transcription factor Lhx2 in hematopoietic progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells. **Stem Cells (in press)** (15) Nagamoto Y, Mizuguchi H, et al. Promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. **Biomaterials** **33**: 4526-4534, 2012. (16) Ito R, Suemizu H, et al. Efficient xenograftment in severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2rynull mice is attributed to a lack of CD11c+B220+CD122+ cells. **J Immunol** **189**: 4313-4320, 2012. (17) Yamazaki H, Suemizu H, et al. In vivo formation of dihydroxylated and glutathione conjugate metabolites derived from thalidomide and 5-Hydroxythalidomide in humanized TK-NOG mice. **Chem Res Toxicol** **25**: 274-276, 2012. (18) Nishimura T, Suemizu H, et al. Using chimeric mice with humanized livers to predict human drug metabolism and a drug-drug interaction. **J Pharmacol Exp Ther** **344**: 388-396, 2013. (19) Yamazaki H, Suemizu H, et al. In vivo drug interactions of the teratogen thalidomide with midazolam: heterotropic cooperativity of human cytochrome P450 in humanized TK-NOG mice. **Chem Res Toxicol** **26**: 486-489, 2013. (20) Tsukada A, Suemizu H, et al. Plasma concentrations of melengestrol acetate in humans extrapolated from the pharmacokinetics established in in vivo experiments with rats and chimeric mice with humanized liver and physiologically based pharmacokinetic modeling. **Regul Toxicol Pharmacol** **65**: 316-324, 2013. (21) Gutti TL, Suemizu H, et al. Human Hepatocytes and Hematolymphoid Dual Reconstitution in Treosulfan-Conditioned uPA-NOG Mice. **Am J Pathol (in press)**. (22) Higuchi Y, Suemizu H, et al. The human hepatic cell line HepaRG as a possible cell source for the generation of humanized liver TK-NOG mice. **Xenobiotica (in press)** (23) Moriya K, Takahashi T, et al. Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice. **PLoS One** **7**:e37892, 2012. (24) Ito R, Takahashi T, et al. Current advances in humanized mouse models. **Cell Mol Immunol** **9**: 208-214, 2012. (25) Suzuki M, Takahashi T, et al. Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/γnull mouse. **Int Immunol** **24**: 243-252, 2012. (26) Ito R, Takahashi T, Suemizu H, et al. Establishment of a human allergy model using human IL-3/GM-CSF transgenic NOG mice. **J Immunol** **191**: 2890-2899, 2013.

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

目的: HBVと肝細胞、免疫細胞の複雑な相互作用をマウス個体内で再現できる次世代型のHBV感染・増殖小動物モデルを開発する



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和63年7月～平成10年4月 大阪大学医学部第一内科

平成10年5月～12年9月 マサチューセッツ総合病院 (MGH) 消化器内科/ハーバード大学医学部

平成12年10月～17年7月 大阪大学大学院医学系研究科分子制御治療学

平成17年8月～現在 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

鎌田武信、林 紀夫

・主な研究課題

ウイルス肝炎、肝臓、細胞死、自然免疫

・これまでの研究実績

1. *Human BDCA3(+) dendritic cells are a potent producer of IFN-λ in response to hepatitis C virus. Hepatology 57:1704-1715, 2013.*
2. *Mcl-1 and Bcl-xL regulate Bak/Bax-dependent apoptosis of the megakaryocytic lineage at multistages. Cell Death Diff 11: 1856-1869, 2012.*
3. Altered oligosaccharide structures reduce colitis induction in mice defective in β-1,4-galactosyltransferase. **Gastroenterology 142: 1172-1182, 2012.**
4. *Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: A causal link between apoptosis and carcinogenesis. J Hepatol 57: 92-100, 2012.*
5. Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. **J Clin Invest 121: 3343-3356, 2011.**
6. Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. **Hepatology 54: 240-251, 2011.**
7. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. **Hepatology 52: 1310-1321, 2010.**
8. Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. **Gastroenterology 138: 2487-2498, 2010.**
9. Sorafenib inhibited the shedding of MICA on hepatocellular carcinoma cells by downregulating ADAM9. **Hepatology 51: 1264-1273, 2010.**
10. The let-7 family of microRNAs negatively regulates Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. **J Hepatol 52: 698-704, 2010.**
11. *BH3-only protein Bid participates in the Bcl-2 network in healthy liver cells. Hepatology 50: 1972-1980, 2009.*
12. Anti-cancer therapy inhibits MICA ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. **Cancer Res 69: 8050-8057, 2009.**

13. *Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. Hepatology 50: 1217-1226, 2009.*
14. Declining incidence of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan, from 1990 to 2003. **Ann Intern Med 148: 820-826, 2008.**
15. Signal transducer and activator of transcription 3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. **Hepatology 46: 1564-1573, 2007.**
16. Intrahepatic delivery of α -galactosylceramide-pulsed dendritic cells suppresses liver tumor. **Hepatology 45: 22-30, 2007.**
17. *Viral covalently closed circular DNA in a non-transgenic mouse model for chronic hepatitis B virus replication. J Hepatol 44: 267-274, 2005.*
18. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. **J Immunol 173: 6072-6081, 2004.**
19. Concanavarin A injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an anti-tumor effect in murine liver. **Hepatology 40: 1190-1196, 2004.**
20. *Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. Gastroenterology 127: 1189-1197, 2004.*
21. Hepatitis C virus core functions as a suppressor of cyclin-dependent kinase-activating kinase and impairs cell cycle progression. **J Biol Chem 279: 11719-11726, 2004.**
22. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. **J Infect Dis 190: 1919-1926, 2004.**
23. Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. **J Immunol 171: 5423-5429, 2003.**
24. Hepatitis C virus core protein differentially regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon- γ stimuli. **J Biol Chem 278: 28562-28571, 2003.**
25. Suppression of Bcl-xL deamidation in human hepatocellular carcinomas. **Cancer Res 63: 3054-3057, 2003.**
26. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on interferon α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: Impairment in chronic hepatitis C virus infection. **J Immunol 170:1249-1256, 2003.**
27. *Intravenous injection of naked plasmid DNA encoding hepatitis B virus (HBV) produces HBV and induces humoral immune response in mice. Biochem Biophys Res Commun 300: 784-788, 2003.*
28. Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. **Hepatology 34:55-61, 2001.**

研究課題の実施を通じた政策提言（寄与した指針又はガイドライン等）

- 「2005年度版 B型およびC型肝炎ウイルス感染者に対する治療の標準化に関するガイドライン」(平成17年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2006年度版 B型およびC型肝炎ウイルス感染者に対する治療の標準化に関するガイドライン」(平成18年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2007年度版 B型およびC型肝炎ウイルス感染者に対する治療の標準化に関するガイドライン」(平成19年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2008年度版 肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関するガイドライン」(平成20年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2009年度版 肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関するガイドライン」(平成21年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2010年度版 肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関するガイドライン」(平成22年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2011年度版 B型C型慢性肝炎・肝硬変治療のガイドライン」(平成23年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2012年度版 B型C型慢性肝炎・肝硬変治療のガイドライン」(平成24年3月 主任 熊田博光、申請者は班員として参画)
- 「2013年度版 B型C型慢性肝炎・肝硬変治療のガイドライン」(平成25年3月 主任 熊田博光、申請者は班員として参画)

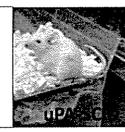
免疫能を保持した次世代型B型肝炎ウイルス感染
小動物モデルの開発とその応用

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)

大阪大学大学院医学系研究科
消化器内科学

竹原 徹郎

B型肝炎の病態を解明し、画期的な創薬研究を推進するには、動物モデルの開発が必要である



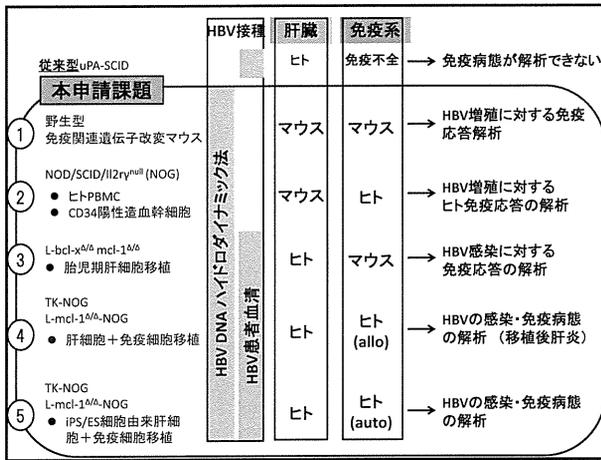
- 系統維持に労力がかかる
- 長期の解析ができない
- 免疫応答の解析ができない

安定した新規
肝細胞キメラマウス

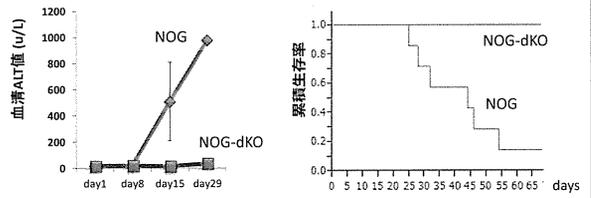
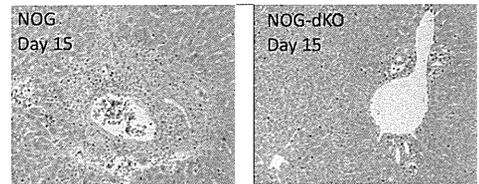
HBVに対する免疫解
析と免疫系のヒト化

次世代型B型肝炎モデル

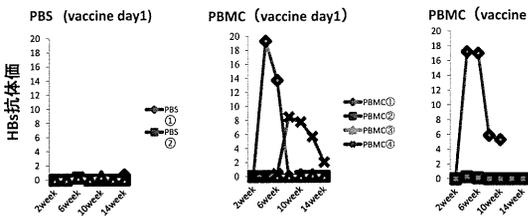
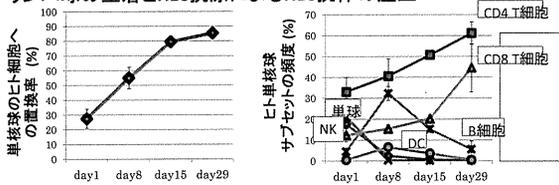
iPS/ES細胞を用いた
ドナー細胞の作製



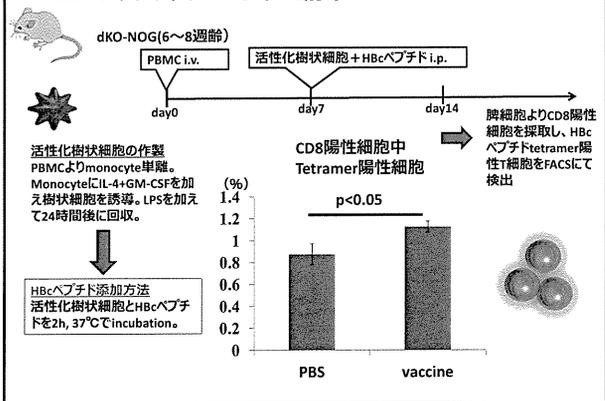
MHC class I/II dKO NOGマウスではヒトPBMC投与後のGVHDが回避される

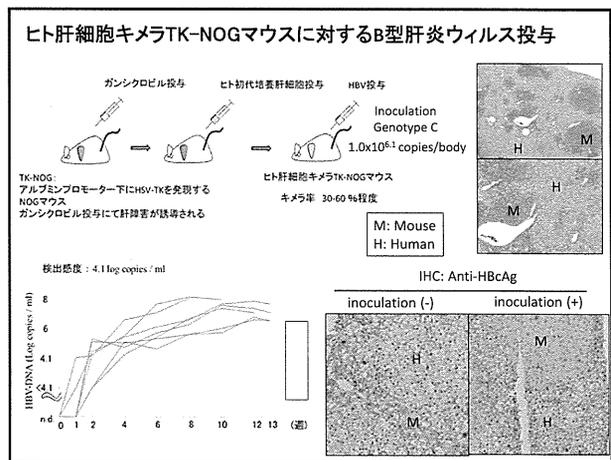
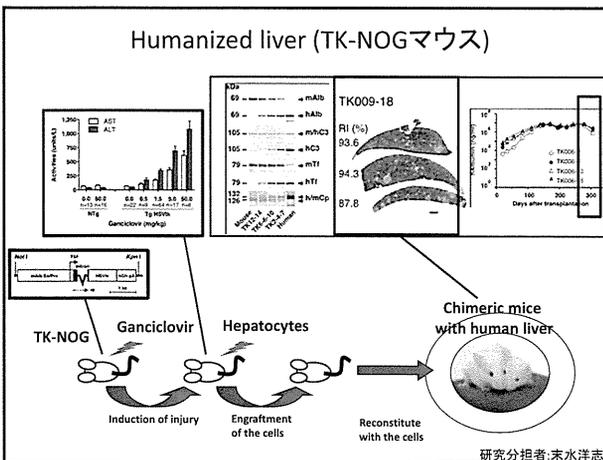
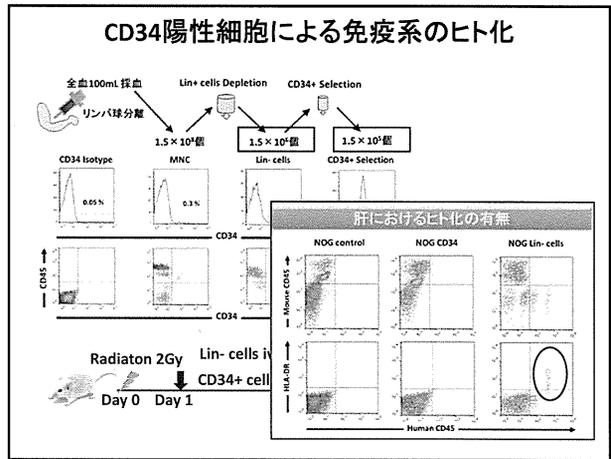
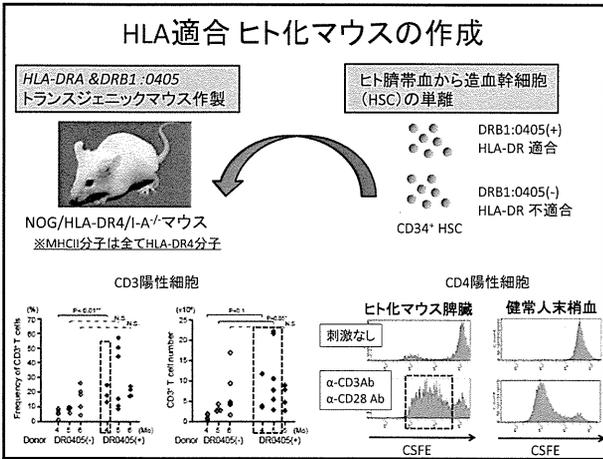
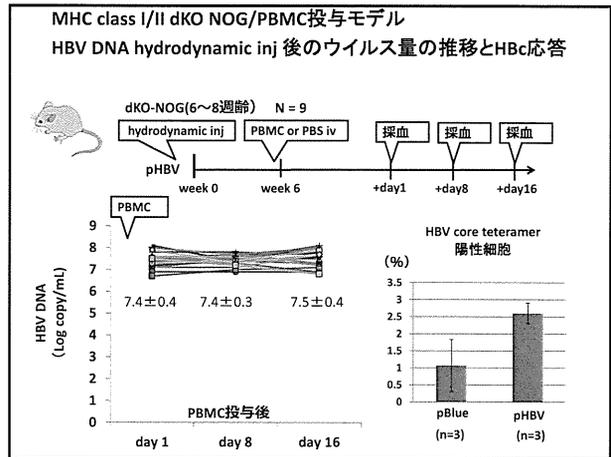
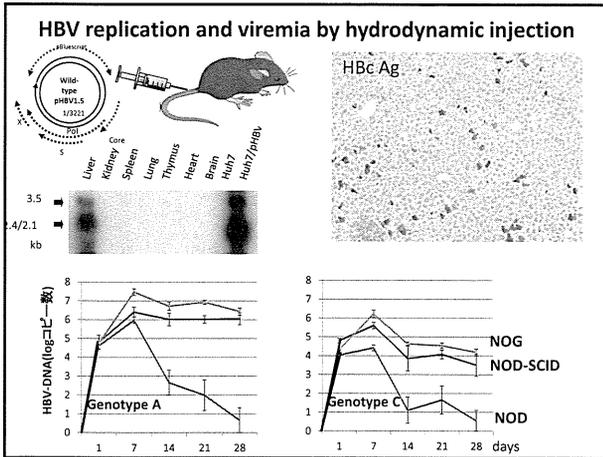


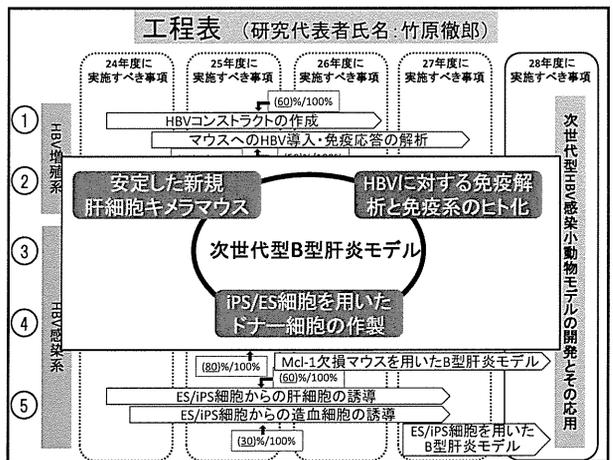
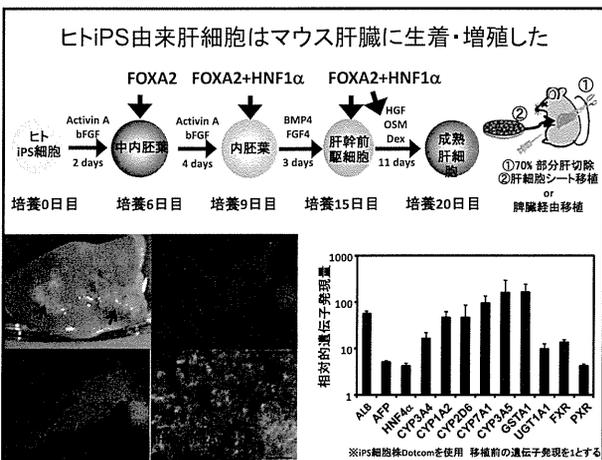
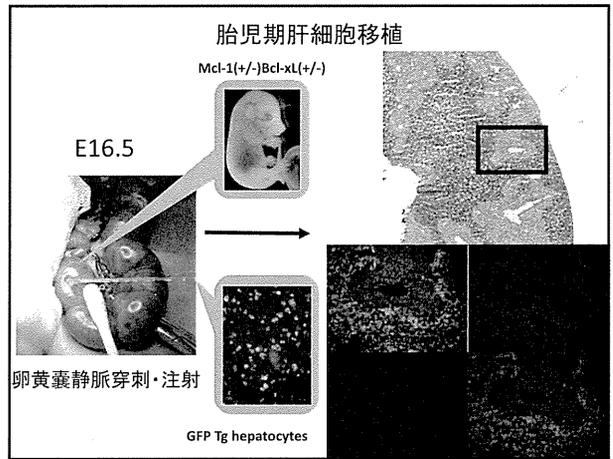
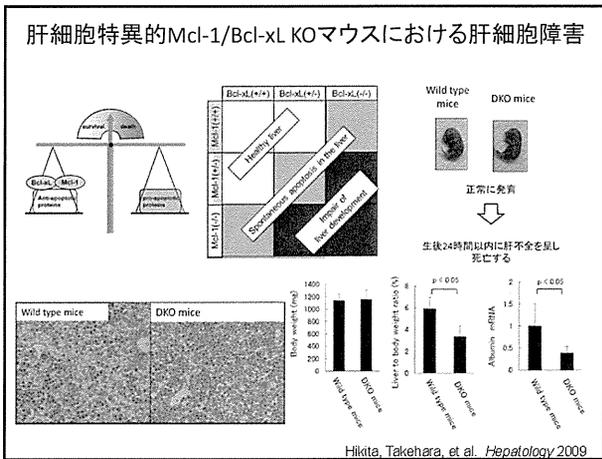
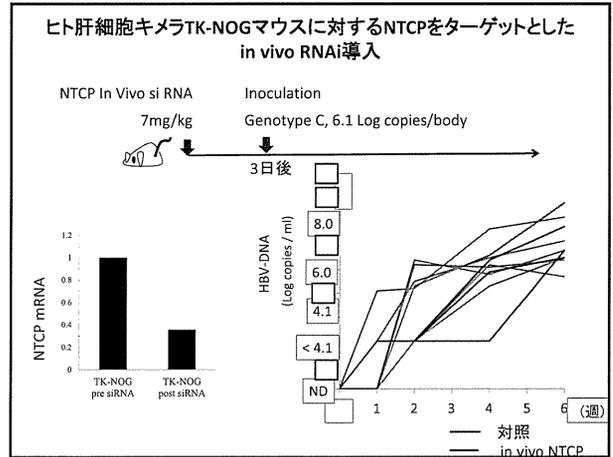
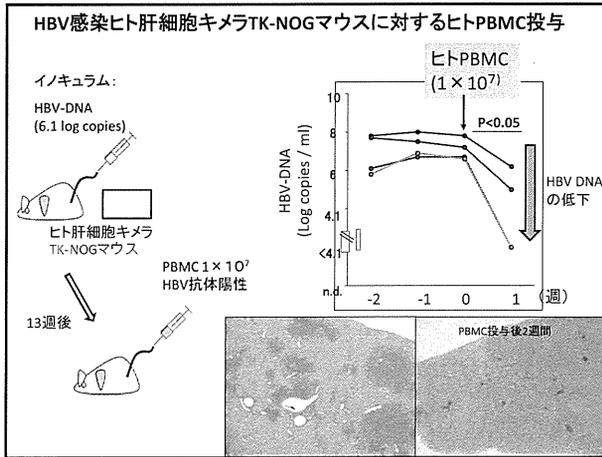
MHC class I/II dKO NOG/PBMC投与モデル
リンパ球の生着とHBs抗原によるHBs抗体の産生



MHC class I/II dKO NOG/PBMC投与モデル
HBcペプチドワクチンによるCTL誘導







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)

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。
イ 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)「〇〇〇〇研究班」(研究代表者名:〇〇〇〇)
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)

合同研究班会議開催状況

他の研究班と合同での研究班会議開催状況(平成25年度)

- ア 他の研究班と合同で研究班会議を開催していない。
① 他の研究班と合同で研究班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)

平成25年12月3日 広島大学医学部 3班合同班会議
動物モデル(竹原)、動物・培養技術(茶山)、自然免疫(藤田)
①①①
平成25年12月13日 グランヴィア広島 4班班長会議
動物モデル(竹原)、ツバイモデル(小原)
ハイブリッド動物モデル(山村)、動物・培養技術(茶山)