

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）]

分担研究報告書

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

研究代表者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発のため、今回、核酸アナログを投与された109例の慢性B型肝炎例の肝癌発生率を解析した。治療中の肝発癌と関連する因子として、肝組織進展度(Fib-4 index)とHBcrAg陽性が関連することが明らかとなった。興味深いことに、HBcrAg陽性例・陰性例共に血中のHBV-DNAは良好にコントロールされていたが、HBcrAg陽性例では陰性例に比し有意に肝組織内HBV-DNA、pgRNAが高かった。肝組織遺伝子発現解析では、HBcrAg陽性例ではHBVの転写促進に働くCEBP α 、PPAR、HNF4、Sp1の発現上昇が認められ、HBcrAg陽性例では肝組織内で転写因子を介した活発なHBVの複製が起こっていると考えられた。また、HBcrAg陽性例ではpDCの機能の低下を示唆する遺伝子変化を認め、有用な免疫分子の絞り込みを行った。

A. 研究目的

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発のため、B型慢性肝炎例に於けるコア関連抗原(HBcrAg)に注目し、HBcrAg陽性例と陰性例に於ける肝組織及び末梢血樹状細胞の遺伝子発現を解析した。

B. 研究方法

核酸アナログを投与された109例の慢性B型肝炎例の肝癌発生率を解析した。また23例の肝組織遺伝子発現を解析した。遺伝子発現プロファイリングはAffymetrics gene chip (133U Plus 2.0)にて解析した。また、末梢血の形質細胞様樹状細胞(pDC)の遺伝子発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究において試料提供者、その家族・

血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて十分な配慮を行った。

本解析は遺伝子発現及び蛋白の発現についての解析であるが、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省)に準じた十分な対応を行い、患者よりの試料採取については、金沢大学の「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」で承認された説明文書を用いてインフォームドコンセントを得て行っており、十分な対応を行った。

C. 研究結果

核酸アナログを投与された109例の慢性B型肝炎例の内訳は年齢 54 ± 10 歳、男:女=76:33、平均投与期間 5.4 ± 3 年、肝組織F12:F34=48:61、eAg陽性:eAb陽性=55:54

であった。経過中 36 例(33%)に肝発癌が認められた。肝発癌と関連する治療開始時のウイルス学的及び臨床因子を Cox 比例ハザードモデルにて解析すると、単変量で開始時年齢(56 歳超)、eAb 陽性、ゲノタイプ C、AFP 陽性(>10)、肝組織進展例(F34)が挙げられた。多変量解析では開始時年齢(56 歳超)と肝組織進展例(F34)が有意であった(表1)。

表1 肝発癌と関連する治療前因子

Variables	Univariate		Multivariate
	p values	p values	HR (95% CI)
Sex (M vs. F)	NS		
Age (>56 vs. ≤56)	0.0016	0.0042	3.16 (1.42-7.46)
HBsAg (>2000 vs. ≤2000 IU/mL)	NS		
HBeAg (+ vs. -)	NS		
HBeAb (+ vs. -)	0.035	NS	
HBcrAg (LogU/mL)	NS		
HBV-DNA (Log copies/mL)	NS		
PC (W vs. M)	NS		
BCP (W vs. M)	NS		
Genotype (B vs. C)	0.035	NS	
AFP (>10 vs. ≤10 ng/mL)	0.011	NS	
F stage (F12 vs. F34)	0.0013	0.009	3.41 (1.34-9.99)
A grade (A0-1 vs A2-3)	NS		

また、治療中のウイルス学的及び臨床因子を同様に解析すると、単変量で治療中年齢(60 歳超)、HBcrAg 陽性、Fib-4 高値が挙げられた。多変量解析でも同様の因子が有意であった(表2)。

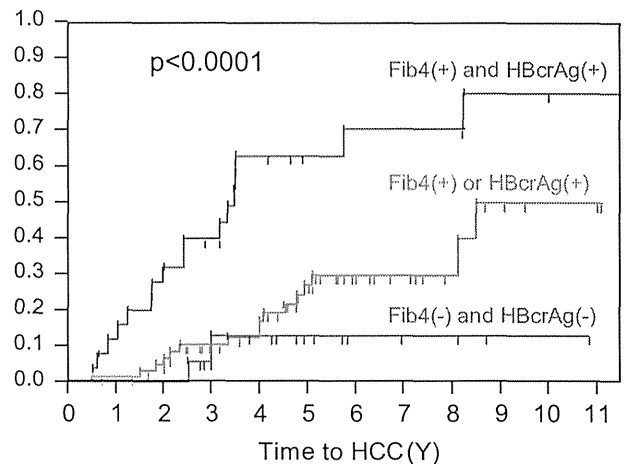
表2 肝発癌と関連する治療中因子

Variables	Univariate		Multivariate
	p values	p values	HR (95% CI)
Sex (M vs. F)	NS		
Age (>60 vs. ≤60)	0.0092	0.009	2.66 (1.27-5.96)
HBsAg (>2000 vs. ≤2000 IU/mL)	NS		
HBeAg (+ vs. -)	NS		
HBeAb (+ vs. -)	NS		
HBcrAg (+ vs. -)	0.026	0.0025	3.53 (1.52-9.63)
AFP (>10 vs. ≤10 ng/mL)	NS		
Fib-4 index (>2.1 vs. ≤2.1 ng/mL)	0.0022	0.0067	2.57 (1.30-5.27)

Kaplan-meier による累積発癌率は Fib-4 高値・低値及び HBcrAg 陽性・陰性によっ

て層別化された ($p < 0.0001$) (図1)。

図1 Fib-4 及び HBcrAg による累積発癌率



核酸アナログ投与中 HBcrAg 陽性例 12 例と HBcrAg 陰性例 11 例で肝内遺伝子発現を比較した。HBcrAg 陽性例では陰性群に比し DNA 損傷、アポトーシス、蛋白翻訳、組織修復に関する遺伝子群の発現亢進を認め、免疫応答関連遺伝子の発現低下を認めた。

また、末梢血液の pDC の遺伝子発現変化では HBcrAg 陽性例では pDC の機能の低下を示唆する遺伝子変化を認め、免疫制御分子の絞り込みを行った。

HBcrAg 陽性例の肝で発現増加する遺伝子 1204 個 ($p < 0.05$) のシグナルパスウェイを MetaCore™ にて作成したところ、幾つかのパスウェイの中心となる Hub (ハブ) 遺伝子が同定された。興味深いことに Hub 遺伝子として Capase3, p53, NRF2 の発現亢進があり、これらは HBV 感染に伴う DNA 損傷、アポトーシスを反映していると考えられた。加えて、これまでに HBV の転写を促進すると報告されている CEBP α 、PPAR、HNF4、Sp1 の発現亢進が認められた。

肝組織内の cccDNA、HBV-DNA 及び pre-genome RNA (pgRNA) を測定すると、HBcrAg

陽性例では陰性群に比し有意に HBV-DNA、pgRNA の発現高値が認められた。一方、cccDNA 量では差が見られず、HBcrAg 陽性例の肝組織では転写因子を介した活発な HBV の複製が起こっていると考えられた。

D. 考察

今回、核酸アナログを投与された 109 例の慢性 B 型肝炎例の肝癌発生率を解析し、治療中の肝発癌と関連する因子として、肝組織進展度 (Fib-4 index) と HBcrAg 陽性が関連することが明らかとなった。興味深いことに、HBcrAg 陽性例・陰性例共に血中の HBV-DNA は良好にコントロールされていたが、HBcrAg 陽性例では陰性例に比し有意に肝組織内 HBV-DNA、pgRNA の発現高値が認められた。一方、cccDNA 量は両群で差が見られなかった。肝組織遺伝子発現解析では、HBcrAg 陽性例では HBV の転写促進に働く CEBP α 、PPAR、HNF4、Sp1 の発現上昇が認められた。従って HBcrAg 陽性例では肝組織内で cccDNA を鋳型として、転写因子を介した活発な HBV の複製が起こっていると考えられた。これらの転写因子をターゲットとした薬剤が肝内の HBV 複製制御に働くと考えられた。

また、HBcrAg 陽性例では pDC の機能の低下を示唆する遺伝子変化を認めた。HBV 持続感染の機序の 1 つに HBcrAg 陽性肝細胞が宿主免疫から逃避する可能性が示唆され、有用な免疫分子の絞り込みを行っている。

E. 結論

HBcrAg 陽性かつ組織学的に進行した症例では核酸アナログ服用中においても高率に発癌する。HBcrAg 陽性肝では HBV の複製亢進が見られ、HBV 複製を支持する転写因子の発現亢進が見られた。これらの転写因子をターゲットとした薬剤が肝内 HBV 複製制御に働くと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T Terashima, T Yamashita, N Iida, T Yamashita, H Nakagawa, K Arai, K Kitamura, T Kagaya, Y Sakai, E Mizukoshi, M Honda, S Kaneko. Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy. Hepatol Res (in press)
- 2) K Yamada, E Mizukoshi, H Sunagozaka, K Arai, T Yamashita, Y Takeshita, H Misu, T Takamura, S Kitamura, Y Zen, Y Nakanuma, M Honda, S Kaneko. Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Liver Int (in press)
- 3) T Yamashita, A Kitao, O Matsui, T Hayashi, K Nio, M Kondo, N Ohno, T Miyati, H Okada, T Yamashita, E Mizukoshi, M Honda, Y Nakanuma, H Takamura, T Ohta, Y Nakamoto, M Yamamoto, T Takayama, S Arii, XW Wang, S Kaneko. Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. Hepatology 60(5):1674-85, 2014.

- 4) K Ishikura, H Misu, M Kumazaki, H Takayama, N Matsuzawa-Nagata, N Tajima, K Chikamoto, F Lan, H Ando, T Ota, M Sakurai, Y Takeshita, K Kato, A Fujimura, KI Miyamoto, Y Saito, S Kameo, Y Okamoto, Y Takuwa, K Takahashi, H Kidoya, N Takakura, S Kaneko, T Takamura. Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells. Diabetologia 57(9):1968-76, 2014.
- 5) T Shirasaki, M Honda, T Shimakami, K Murai, T Shiimoto, H Okada, R Takabatake, A Tokumaru, Y Sakai, T Yamashita, SM Lemon, S Murakami, S Kaneko. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway. Hepatology 60(5):1519-30, 2014
- 6) T Yamashita, S Kaneko. Orchestration of hepatocellular carcinoma development by diverse liver cancer stem cells. J Gastroenterol 49(7):1105-10, 2014.
- 7) M Kitahara, E Mizukoshi, Y Nakamoto, N Mukaida, K Matsushima, S Kaneko. Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. Int Immunopharmacol 21(2):346-353, 2014.
- 8) N Oishi, T Yamashita, S Kaneko. Molecular biology of liver cancer stem cells. Liver Cancer 3(2):71-84, 2014.
- 9) F Lan, H Misu, K Chikamoto, H Takayama, A Kikuchi, K Mohri, N Takata, H Hayashi, N Matsuzawa-Nagata, Y Takeshita, H Noda, Y Matsumoto, T Ota, T Nagano, M Nakagen, KI Miyamoto, K Takatsuki, T Seo, K Iwayama, K Tokuyama, S Matsugo, H Tang, Y Saito, S Yamagoe, S Kaneko, T Takamura. LECT2 functions as a hepatokine that links obesity to skeletal muscle insulin resistance. Diabetes 63(5):1649-64, 2014.
- 10) Y Takeshita, T Takamura, M Honda, Y Kita, Y Zen, KI Kato, H Misu, T Ota, M Nakamura, K Yamada, H Sunagozaka, K Arai, T Yamashita, E Mizukoshi, S Kaneko. The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. Diabetologia 57(5):878-90, 2014.
- 11) T Shimakami, M Honda, T Shirasaki, R Takabatake, F Liu, K Murai, T Shiimoto, M Funaki, D Yamane, S Murakami, SM Lemon, S Kaneko. The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. Sci Rep 4:4688, 2014.
- 12) H Nakagawa, E Mizukoshi, N Iida, T Terashima, M Kitahara, Y Marukawa, K Kitamura, Y Nakamoto, K Hiroishi, M Imawari, S Kaneko. In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation. Cancer Immunol Immunother 63(4):347-56, 2014.

13) K Kato, T Takamura, Y Takeshita, Y Ryu, H Misu, T Ota, K Tokuyama, S Nagasaka, M Matsuhisa, O Matsui, S Kaneko. Ectopic fat accumulation and distant organ-specific insulin resistance in Japanese people with nonalcoholic Fatty liver disease. PLoS One 9(3): e92170, 2014.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）]

分担研究報告書

HBV感染マウスを用いたHBV cccDNA制御に関する研究

研究分担者：今村 道雄 広島大学病院 消化器・代謝内科 診療講師

研究要旨：HBVのcccDNAを制御または排除する新規治療法の開発には、その有効性の評価が可能となるモデル動物が必要である。本研究によりわれわれは、HBV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて肝臓内cccDNAを定量するシステムを構築した。本モデルを用いて核酸アナログおよびインターフェロン（IFN）の併用療法の効果を検討した。2 mg/kgのエンテカビル（連日経口投与）または30 µg/kgのPegIFN α （週2回皮下注）を12週間併用投与したところ肝臓内cccDNAは0.7 copy/cellに低下した。さらにより高用量である20 mg/kgのエンテカビルおよび300 µg/kgのPegIFN α を6頭のマウスに6週間投与したところすべてのマウスにおいて血中HBV DNAは検出感度以下に低下し、肝臓内cccDNAは0.12 ± 0.14 copy/cellに低下した。治療終了13週後、2頭のマウスでは血中HBV DNAが再陽性化したが、4頭のマウスでは感度以下が維持されていた。治療終了13週後の肝臓内cccDNAは、血中HBV DNAが再陽性化したマウスにおいては、0.84 ± 0.12copy/cellと終了時に比べやや増加していたが、血中HBV DNAが検出感度以下を維持していたマウスでは0.08 ± 0.06copy/cellと低値で維持されていた。高容量のエンテカビルおよびPegIFN α を併用投与することにより、短期間の治療においても肝臓内cccDNAの著明な低下が得られた。肝臓内cccDNAを十分に低下させることにより、治療中止後も肝内HBVの増殖を制御できる可能性が示された。

A. 研究目的

HBV 持続感染マウスを用いて肝臓内cccDNA を制御または排除する治療法を開発する。

B. 研究方法

HBV を感染させたヒト肝細胞キメラマウスからヒト肝細胞を摘出し DNA を抽出し real-time PCR にて HBV DNA を測定した。一部は S1 ヌクレアーゼ処理後、real-time

PCR にて cccDNA を測定した。またマウスに 2 mg/kg のエンテカビル（連日経口投与）、30 µg/kg の PegIFN α （週 2 回皮下注）を 12 週間、単独あるいは併用投与、または 20 mg/kg のエンテカビル（連日経口投与）、300 µg/kg の PegIFN α （週 2 回皮下注）を 6 週間投与し、血中 HBV DNA 量および肝臓内 HBV cccDNA 量を測定した。（倫理面の配慮）

投与する血清は患者の同意が得られてい

るものを使用した。

C. 研究結果

抽出した DNA をヌクレアーゼ処理し、primer を 17 塩基から 25 塩基に伸ばし PCR を行うことにより、血中 HBV DNA は検出されず、マウス肝臓内の cccDNA を特異的に検出することが可能となった。HBV 患者血清投与 8 週後、マウス血中 HBV DNA は 10^{10} copy/mL、肝臓内 cccDNA は 6.02 copies/hepatocyte であった。2 mg/kg のエンテカビル（連日経口投与）または 30 μ g/kg の PegIFN α （週 2 回皮下注）を 12 週間投与したところ肝臓内 cccDNA はそれぞれ 5.1, 4.7 copy/cell であったが、両者を併用投与することにより肝臓内 cccDNA は 0.7 copy/cell に低下した。さらにより高用量である 20 mg/kg のエンテカビル（連日経口投与）または 300 μ g/kg の PegIFN α （週 2 回皮下注）を 6 頭のマウスに 6 週間投与したところマウス血中 HBV DNA は検出感度以下に低下し、肝臓内 cccDNA は 0.12 ± 0.14 copy/cell に低下した。治療終了 13 週後、2 頭のマウスでは血中 HBV DNA が再陽性化した。4 頭のマウスでは感度以下が維持されていた。治療終了 13 週後の肝臓内 cccDNA は、血中 HBV DNA が再陽性化したマウスにおいては、 0.84 ± 0.12 copy/cell であったが、血中 HBV DNA が検出感度以下を維持していたマウスでは、 0.08 ± 0.06 copy/cell とより低値であった。

D. 考察

高容量のエンテカビルおよび PegIFN α

を併用投与することにより、短期間の治療においても肝臓内 cccDNA は、より低下した。肝臓内 cccDNA を十分に低下させることにより、治療中止後も肝内 HBV の増殖を制御できる可能性が示された。エンテカビルは比較的安全性の高い薬剤であり、高容量投与も今後考慮すべき治療法と思われた。

E. 結論

HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて肝臓内 cccDNA を測定するシステムを構築した。高容量のエンテカビルおよび PegIFN α の併用療法により cccDNA が制御される可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）]

分担研究報告書

抗HBV反応を増強する免疫賦活分子の探索

研究分担者：中本 安成 福井大学医学部内科学(2)領域 教授

研究要旨：宿主の免疫監視機構は肝細胞に表出している微量のB型肝炎ウイルス（HBV）抗原を正確に認識し特異的な免疫反応を誘導する。3年間の研究課題として、HBV免疫反応による慢性肝炎モデルおよびin vitroでの発現系を用いて、ウイルス産生を制御する分子免疫機序について検討した。慢性肝炎モデルの肝組織における発現遺伝子プロファイル（K-meansクラスタリング解析）では、ウイルス産生の持続的な低下と逆相関してケモカインCCL5/CCR5分子とSTAT3経路が亢進していることが示された。また、1.3倍長HBVゲノムを用いたin vitro発現系において、組換え型CCL5分子の抗ウイルス作用、HBVジェノタイプの違いによるウイルス発現・産生効率の特徴が明らかとなった。これより、HBV生活環におけるウイルス産生、cccDNAを制御する免疫反応の機序と標的治療の候補となる分子の可能性が示唆された。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）cccDNAは、ウイルスゲノムとすべての構成タンパクの鋳型になっているものの、その発現や制御の分子メカニズムは不明のままである。これまでウイルスタンパクの発現は、サイトカインなどの免疫機序によって制御されることが報告されてきたが、慢性に経過するHBV感染症において抗ウイルス作用に関わる免疫病態やcccDNAに及ぼす影響についての詳細な検討は行われて来なかった。本研究では、HBV慢性感染状態における抗ウイルス免疫の本態を解析するために、ウイルス蛋白（表面抗原HBsAg）の遺伝子導入マウスモデルおよびウイルスゲノムのin vitro発現系を用いて、分子・細胞免

疫機序について検討した。

B. 研究方法

既報のHBVに対する細胞障害性Tリンパ球エピトープ（L^d拘束性HBs 28-39）を含む免疫反応が、慢性肝炎を発症するモデルが確立されている（Nakamoto Y, et al., J. Exp. Med. 188:341, 1998; Cancer Res. 64:3326, 2004）。本モデルにおいて、胸腺摘除、骨髄再構築、脾細胞移植の操作によって、慢性肝炎を誘導し約18カ月の経過で肝細胞がん（肝がん）を発症するという特長がある。本研究では、経時的に得られた肝組織を用いて、RNAレベルの網羅的発現解析（DNAチップ）、タンパクレベルの検討（Western blot法、免疫組織学

的)を行った。

in vitro ウイルス発現系の作成は、1.3 倍長HBVゲノム(自治医科大学・岡本宏明教授との共同研究)を用いて、肝臓細胞株HepG2細胞に遺伝子導入することにより確立した。HBV-DNA, cccDNA, pgRNAの定量は既報(Hepatology 44:694, 2006)に基づいて quantitative real-time PCR法を用いた。

(倫理面の配慮)

動物実験については、動物愛護と動物福祉の観点から適切な配慮を行うため、厚生労働省の所管する実施機関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日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)に基づき、実施機関の倫理委員会あるいは実験動物委員会の審査と承認を得て行った。

また、in vitro ウイルス発現系は第二種使用等拡散防止措置に則り遺伝子組換え実験(大臣確認実験)として承認の下で実施した。

C. 研究結果

1) 慢性肝炎モデルでは発症9ヵ月以降のHBsAg染色性が著明に低下しており、これと逆相関するように、肝組織の発現遺伝子プロファイル(K-means Cluster Analysis; ANOVA)において、ケモカインCCL5/CCR5分子とその下流シグナルSTAT3経路が亢進していた。

2) 1.3倍長HBVゲノムをHepG2細胞に遺伝子導入することによって、一過性発現系を確立し培養上清にHBsAgを検出した。

3) HepG2細胞に対して組換え型CCL5を

作用したところ、リン酸化STAT3(pSTAT3)の誘導を認めた。

4) HBVゲノム一過性発現系においてCCL5を作用したところ、HBsAg発現がIL-6(陽性対照)と同様に低下した。

5) 1.3倍長HBVゲノムをHepG2細胞株に導入して恒常的に発現するクローン(安定発現系)を作成して検討したところ、CCL5の効果は明らかではなかった。

6) HBVジェノタイプB1/C2を用いて一過性発現系において比較したところ、ジェノタイプC2において細胞内および培養上清でのHBV-DNAやHBsAg産生が亢進していた。これに対して、ジェノタイプB1では細胞内cccDNAの高値を認めた。またB1を用いた際の培養上清にはHBV-DNAが検出されなかった。

D. 考察

過去二年度における検討に引き続いて、慢性肝炎モデルの経時的な発現遺伝子プロファイルから抽出されたCCL5/CCR5分子に関するHBVへの抗ウイルス活性について検討した。CCL5についてはCD4陽性Tリンパ球に発現しており、肝細胞上の受容体であるCCR5に作用してウイルス産生や肝細胞の分化・生存に関与することが報告されている(J. Virol. 84:5860, 2010; PLoS One 8:e53992, 2013)。CCR5の細胞内シグナルの下流にはSTAT3経路が位置しており、この活性化(pSTAT3)を介してHBVの複製に関わっているとの報告が見られている(PLoS Pathog. 7:e1002159, 2011; J. Virol. 86:9599, 2012)。

本研究では、HepG2 細胞への組換え型 CCL5 の作用 (pSTAT3) を認め、HBV ゲノム一過性発現系における HBsAg 発現が低下した。これらの結果は、CCL5 が肝細胞に作用して STAT3 経路を活性化することによって抗ウイルス効果を発揮することを示唆するものである。しかし、ウイルス感染系における作用の検証、機序の解明が必要と考えられる。

HBV ジェノタイプの異なるウイルスクローンを用いて検討することによって、細胞内や培養上清のウイルスゲノム・HBsAg 量に違いを認めた。なかでもジェノタイプ B 1 / C 2 間の比較において、産生されるウイルスゲノム量と細胞内 cccDNA 量が相関していないことが観察された。細胞内における cccDNA の制御については不明な点が多いが、最近の研究において IFN α および LT β が一本鎖 DNA を標的とするシチジンデアミナーゼ (APOBEC3) を誘導して、cccDNA 特異的な分解作用を発揮することが報告された (Science 343:1221, 2014)。今後は、HBV ジェノタイプの違いや変異株における cccDNA の制御機構を検討することによって、より詳細な抗ウイルス機序が明らかになる可能性が示唆された。

E. 結論

B型慢性肝炎モデルおよび in vitro ウイルス発現系を用いて、ケモカイン CCL5 分子の抗ウイルス作用、HBV ジェノタイプの違いによるウイルス発現・産生効率の特徴が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nemoto T, Matsuda H, Nosaka T, Saito Y, Ozaki Y, Hayama R, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y: Comparison of hepatic arterial infusion chemotherapy and sorafenib in elderly patients with advanced hepatocellular carcinoma: A case series. *Mol. Clin. Oncol.* 2014; 2: 1028-1034.
- 2) Ofuji K, Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Yoshimura M, Saito K, Nakamoto Y and Nakatsura T: A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 2014; 46: 497-504.
- 3) Kitahara M, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Mukaida N, Matsushima K, Kaneko S: Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Int. Immunopharmacol.* 2014; 21: 346-353.
- 4) Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang X, Kaneko S: Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2014; 60: 1674-1685.
- 5) Miyake Y, Yamamoto K, Matsushita H, Abe M, Takahashi A, Umemura T, Tanaka A,

Nakamuta M, Nakamoto Y, Ueno Y, Saibara T, Takikawa H, Yoshizawa K, Ohira H, Zeniya M, Onji M, Tsubouchi H; Intractable Liver and Biliary Diseases Study Group of Japan: Multicenter validation study of anti-programmed cell death-1 antibody as a serological marker for type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatol. Res.* 2014 ; 44: 1299-1307.

2. 学会発表

1) Nakamoto Y, Yamashita T, Hiramatsu K, Nemoto T, Suto H, Kaneko S: Identification of Hypermethylation and Non-Synonymous Mutations in Genes Down-Regulated during the Process of Hepatocarcinogenesis in a Model of Chronic Hepatitis B. 第 65 回 **American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** *Hepatology* 60 (1, Suppl.) 637A; 一般; poster: Nov. 9, 2014.

2) Naito T, Baba T, Mukaida N, Nakamoto Y: Cytotoxic CD4+ Cells Play a Pivotal Role in Cyclophosphamide-Mediated Cytotoxicity against Hepatoma without Antigen Priming. 第 65 回 **American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** *Hepatology* 60 (1, Suppl.) 497A; 一般; poster: Nov. 8, 2014.

3) Ofuji K, Yoshikawa T, Tada Y, Shimomura M, Nakamoto Y: Identification of a Novel HLA-A2 Restricted Immunotherapeutic Target Derived from an EGFR Mutated Antigen for the Treatment of Metastatic Liver Tumors. 第 65 回 **American**

Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): *Hepatology* 60 (1, Suppl.) 508A; 一般; poster: Nov. 8, 2014.

4) Matsuda H, Naito T, Nosaka T, Nemoto T, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y: Serial Changes of Cellular, Humoral, and Innate Immune Responses following Immunosuppressive Chemotherapies Responsible for Hepatitis B Virus Reactivation. 第 65 回 **American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** *Hepatology* 60 (1, Suppl.) 1039A; 一般; poster: Nov. 11, 2014.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金
[肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）]
分担研究報告書

HBV感染細胞のエピゲノム

研究分担者：橋本 真一 金沢大学医学保健研究域医学系 特任教授

研究要旨：HBV感染においてエピジェネティックな制御がHBVの複製にどのように関与しているかを調べる目的で、細胞株、新鮮ヒト肝細胞を用い、エピジェネティック薬剤によるHBV複製の影響について検討した。ヒストンメチル化阻害剤(Chaetocin, BIX01294)及びヒストン脱アセチル化阻害剤(TSA, SAHA)でHBV感染細胞株(Hep38.7, KM細胞)を処理したところBIX01294, SAHAでcccDNAのコピー数の増加が観察された。一方、PXBマウス由来新鮮ヒト肝細胞において、逆にSAHAは細胞内のHBV DNAの量を低下させた。また、エピジェネティック薬剤と相乗効果がある抗HIV薬、prostratinについても同様な検討をしたところ単独でHBV DNAの量を低下させた。次にHBV DNAの量を低下させたSAHA, prostratin両薬剤の抗ウイルス剤ラミブジン、エンテカビル、IFN- α との併用について検討した結果、両薬剤ともにラミブジン、エンテカビル剤の効果を若干増強した。この結果から、ヒストンアセチル化及びメチル化の変化がヒト肝細胞におけるHBVの複製に影響を与えるだけでなく現在臨床で使用されている薬剤の効果にも影響を及ぼすことが示唆された。

A. 研究目的

HBV 増殖感染および潜伏感染時においてエピジェネティックな制御がHBVcccDNAの遺伝子発現制御に関与していることが報告されている。しかしながらcccDNAの発現促進、抑制に関与する分子機構について詳細な検討はされていない。そこで今回、臨床検体、Full length HBV DNAを発現する培養細胞系、またHBVを感染させたヒト型肝臓キメラマウスを用いて、宿主ゲノム、HBVcccDNAのヒストン修飾やDNAメチル化の状態とその制御に関わるポリコム群やトライソラックス群タンパク複合体につい

て検討し、cccDNAの潜在化機構、複製制御について解明する。

B. 研究方法

エピゲネティック薬剤を用いHBV複製について、ヒストンメチル化阻害剤(BIX01294, Chaetocin)、ヒストン脱アセチル化阻害剤(SAHA, TSA)、DNAメチル化阻害剤(5-aza-deoxycytidine)、NF-kappaB活性化剤(prostratin)をHBV感染PXBキメラマウス由来ヒト肝細胞に添加した。その後、一定時間で培地を交換し、12日目に培養上清、細胞内DNAをスマイテストに

て精製した。また、cccDNA については単離した細胞の DNA を ATP-dependent DNase により処理し使用した。HBV DNA の量は以下の TaqMan probe を用いて測定した。5' -FAM-TATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGT-TAMRA-3' (368-391), HBV-S-F(333-352)5' -ACTCACCAACCTCTTGTCCCT-3' , HBV-S-R(476-456), 5' -GACAAACGGGCAACATACCT-3' (433-452) さらに DMSO, Prostratin, SAHA 処理の細胞から mRNA をそれぞれ精製し、RNA-Seq 法にて遺伝子発現の変化について観察した。

(倫理面の配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針の規程、二重使用等拡散防止措置承認に関しては手続き済み。

C. 研究結果

HBV 感染においてエピジェネティックな制御が HBV の複製にどのように関与しているかを調べる目的で、細胞株、新鮮ヒト肝細胞を用い、エピジェネティック薬剤による HBV 複製の影響について検討した。ヒストンメチル化阻害剤 (Chaetocin, BIX01294) 及びヒストン脱アセチル化阻害剤 (TSA, SAHA) で HBV 感染細胞株 (Hep38.7, KM 細胞) を処理したところ BIX01294, SAHA で cccDNA のコピー数の増加が観察された。一方、PXB マウス由来新鮮ヒト肝細胞においてヒストンメチル化阻害剤及び TSA 添加により細胞内の HBV DNA が増加する傾向が観察されたが、逆に SAHA は細胞内の HBV DNA の量を低下させた。また、エピジェネティック薬剤と相乗効果がある抗 HIV 薬、prostratin につい

ても同様な検討をしたところ興味深い事に HBV DNA の量を低下させた。

次にこれらの2つの薬剤により変化した遺伝子について RNA-Seq により検討した。その結果、SAHA では synaptic transmission, cell-cell signaling、negative regulation of circadian sleep/wake cycle, prostratin では adenylate cyclase-activating serotonin receptor signaling pathway, cellular component movement に関連する遺伝子が増加した。

続いて HBV 複製に抑制効果があった SAHA, prostratin について抗ウイルス剤 ラミブジン、エンテカビルとの併用を検討した結果、両薬剤ともにラミブジン、エンテカビル剤の効果を若干増強した。さらに IFN-alpha についても同様に検討したところ、prostratin では HBV DNA 量を低下させたが、SAHA 刺激では逆に上昇させた。

D. 考察

RNA-Seq により HBV 複製に関与していると予想される遺伝子が同定された。これらの遺伝子の局在は VCAN, ADAM12 を含めて細胞膜に関連する遺伝子が多く観察された。このことは HBV の複製に細胞同士の相互作用が重要である事を示している。HBV に対する抗体が何らかの作用で HBV 複製を抑制している事を考えると、今回、明らかになった遺伝子のシグナルを調べる事は非常に興味深い。

今後、SAHA, prostratin の HBV 複製抑制効果についてエピジェネティックな観点と共に解析する。また、ヒストン修飾や

DNA メチル化の状態とその制御に関わる分子群を解析する予定である。

E. 結論

ヒストンアセチル化及びヒストンメチル化の変化がヒト肝細胞におけるHBVの複製に影響を与えるだけでなく現在臨床で使用されている薬剤の効果にも影響することが示唆された。

細胞株においてヒストンメチル化阻害剤及びヒストン脱アセチル化阻害剤は、HBVを増加させる傾向にあったが、ヒト肝細胞では抑制効果が認められた。このことは細胞の状態、（たとえば潜伏状態や癌化状態）によりエピジェネティック薬剤の効果に違いがあることを示し、今後実用化に向けて更なる検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakamura, R., Tsukahara, T., Qu, W., Otsuka, T., Ogoshi, K., Saito, T.L., Matsushima, K., Sugano, S., Hashimoto, S., Suzuki, Y., Morishita S., Takeda H. Large hypomethylated domain serves as strong repressive machinery for key developmental genes in vertebrates. *Development*. 141,2568-2580 (2014)

2. 学会発表

1) 橋本真一、本多政夫、金子周一：「エピジェネティック薬剤によるHBV複製への影響」（日本分子生物学会年会）2014年11月25-27日（横浜）

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金
[肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）]
分担研究報告書

HBVccc肝細胞株の樹立とHBVcccの制御機構

研究分担者：村上 清史 金沢大学医薬保健研究域医学系 分子遺伝学 研究員

研究要旨：HBVの持続感染と再活性化の鍵となるのは、pgRNA合成の鋳型となる核内HBVcccである。HBVccc生成にはHBx機能が必須であり、IFN α によるHBVccc阻害効果がHBV EnhI領域にあることが報告されている。しかしHBVcccに対するそれらの作用機作は未だ不明であり、HBV複製に関与する未知の宿主因子の同定はHBVcccおよびpgRNAの制御機構解明に必要である。計画3年度の研究では、引き続き、HBx ORF、HBV EnhI及びEnh IIなどHBV転写制御域等に変異を持つ各種HBVレプリコン系の構築と、トランスに働く野生型及び各領域に変異を持つHBx発現系を準備し、HBV持続産生細胞からHBV粒子の高効率な産生条件の検討と濃縮HBV粒子を用いた感染系の構築の検討を行った。また、HBxをHepG2細胞に導入して遺伝子発現パターンを包括的に検討することにより、HBxが影響を与える転写因子の同定を行い、そのHBV複製に与える影響を評価した。

A. 研究目的

HBxを導入したHepG2細胞を用いて、HBxが影響を及ぼす転写因子を同定する。その転写因子の調節機構を明らかにし、新たな治療標的の可能性を探る。

肝癌細胞株を用いてHBVcccの転写に与える影響を評価する。

B. 研究方法

HBxのsiRNAを作成し、HepG2.2.15細胞に導入してHBxがHBV複製に及ぼす影響を検討した。

野生型HBx、HBx-D5（転写活性化能を有しないHBxドメイン）、空ベクターをHepG2細胞に導入しRNAを抽出、マイクロアレイ法にて遺伝子発現パターンの包括的

検討を行った。

Ingenuity Pathway Analysis (IPA)ソフトウェアを用いて、HBx導入が影響を及ぼす転写因子の同定を行った。

247例のHBVによる慢性肝炎患者のアレイデータ、臨床データを用いて同定した転写因子の検討を行った。

転写因子を制御する上流因子の検討を行った。

C. 研究結果

siRNAによるHBx発現抑制の実験において、HBx発現の60%抑制でHBVの複製が約40%抑制された（図1）。

図1a. HBx発現量

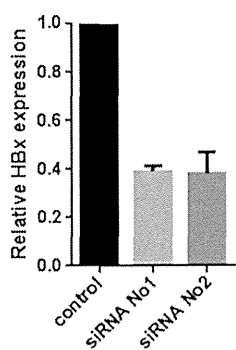
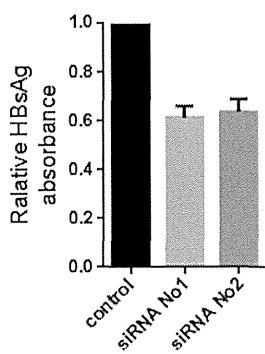


図1b. 培養液中HBs抗原量

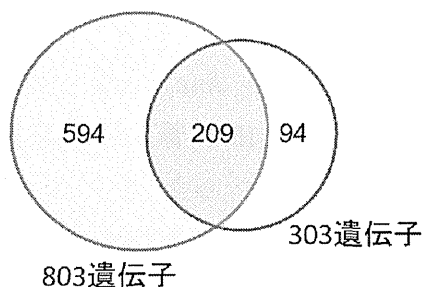


遺伝子発現の包括的検討により、野生型 HBx 導入細胞は空ベクター導入細胞と異なった遺伝子発現パターンを有していた。

発現パターンの比較により、野生型 HBx 関連遺伝子 773 個、HBx-D5 関連遺伝子 303 個が同定され、HBx-D5 関連遺伝子の 69% が野生型 HBx 関連遺伝子と重複していた (図 2)。

図2. HBx関連遺伝子とHBx-D5関連遺伝子

HBx関連遺伝子 (p<0.001, FDR<0.1) HBx-D5関連遺伝子 (p<0.001, FDR<0.1)



IPA 解析により、HBx 導入により活性される 11 個の転写因子が同定された。

11 個の転写因子に関して、転写因子ごとに阻害剤、siRNA による発現抑制を用いて HBV 複製の検討を行った結果、6 個の転写因子が HBV 複製の活性化に関与していることが分かった。

さらに 247 例の HBV 感染患者の臨床サンプルを用いた検討により、6 個の転写因子のうち 3 個 (DNMT3A1、NR3C1、KDM5B) が

特に重要な働きをしていることが示された (図 3)。

図3a. DNMT3A1発現量

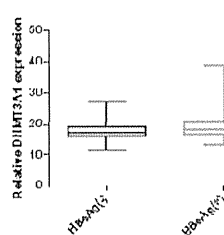


図3b. KDM5 B発現量

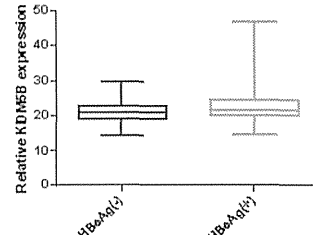
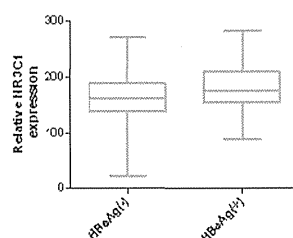


図3c. NR3C1発現量



転写因子を制御する因子の検討では、1 個のマイクロRNAが重要な働きをする可能性が示され。

247 例の肝癌患者の臨床サンプルを用いた検討では、3 個の転写因子が発現亢進し、予後に関与していることが分かった。

D. 考察

HBx は HBV の複製に必須の蛋白質であり、その転写活性を調節することで HBV の複製を制御できる可能性が示唆された。さらに HBx は幹細胞性を有する肝細胞癌で高発現しており、HBx の転写活性化能の解明が予後不良な HBV 関連肝癌の予後改善に繋がる可能性が示唆された。

E. 結論

HBx は宿主の転写因子を制御し HBV の複製に関与していた。HBx の発現が正常肝細

胞におけるウイルス複製能の活性化および肝細胞癌細胞における幹細胞性の導入、維持に参与している可能性が示唆された。

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. Sci Rep. 2014 Apr 15.

2) Impaired interferon signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the transforming growth factor beta signaling pathway. Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Hepatology; 60(5): 1519-30, 2014.

2. 学会発表

1) Hepatitis B virus X protein regulates virus replication through activation of host transcription factors. Oishi N, Wang X, Kaneko S, Murakami S. Internal Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles, 2014.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）]

分担研究報告書

HBV特異的免疫応答誘導の高効率化の試み

研究分担者：石川 哲也 名古屋大学大学院医学系研究科医療技術学専攻 教授

研究要旨：臨床応用可能な効率よいHBV特異的免疫応答誘導法の確立を目指し、マウスモデルにおける基礎実験を行った。野生型マウス（H-2d）を、K3（K-type CpG ODN）あるいはK3-SPG（K3 wrapped by schizophyllan）をアジュバントとしてHBs抗原蛋白（HBsAg）とともに免疫すると、 α -galactosylceramide（ α -GalCer）をアジュバントとして用いた場合に比較して、HBsAg特異的CTL（HBs-CTL）の誘導効率は有意に上昇した。HBVキャリアのモデルであるHBsAgトランスジェニックマウス（HBsTg）を、K3あるいはK3-SPGとHBsAgとで免疫した場合にはHBs-CTLの誘導はみられなかったが、HBsTgとindoleamine2,3-dioxygenase（IDO）ノックアウトマウスとを掛け合わせたマウス（HBsTg-IDO^{-/-}）においては同様の免疫法によりHBs-CTLの誘導が確認された。野生型マウスでは、IDO阻害剤である1-methyl-d-tryptophan（1-MT）投与でIDO遺伝子ノックダウンと同様のCTL誘導効率の上昇が認められることより、K3あるいはK3-SPG、1-MTとHBsAgとを組み合わせた免疫法によってもHBsTgの免疫寛容を打破できる可能性がある。この免疫法はHBVキャリアに対する免疫治療の有効な候補であることが示唆される。

共同研究者：伊藤弘康、岐阜大学大学院医学系研究科病態情報解析医学

石井 健、小檜山 康司、医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト

石上雅敏、名古屋大学医学部附属病院

A. 研究目的

HBV cccDNA の制御と排除のためには、効率よいHBV特異的獲得免疫応答の誘導法の確立が必要である。現在、感染予防に使用されているHBs抗原ワクチンは、B型慢性肝疾患患者に使用した場合のウイルス制御効果が報告されているものの、効率の面で十分とは言えない。本研究では、高効率な免疫法の確立を目的として、マウスモデ

ルにおける基礎研究を行った。

B. 研究方法

B10.D2マウス（H-2d）、HBsTg（B10.D2 background）、HBsTg-IDO^{-/-}（HBsTgとIDOノックアウトマウスとを掛け合わせたもの）を、それぞれHBsAgにより免疫、脾細胞を回収し、HBsAg特異的免疫応答、特にHBs-CTLの誘導効率を解析した。さらに、

HBsAg での免疫時、 α -GalCer、K3、K3-SPG をアジュバントとして使用した場合の HBs-CTL の誘導効率について、それぞれのマウスを用いて比較した。HBs-CTL の誘導効率は、Dimer X を用いた HBs 28-39 (HBs 抗原 28-39 番目のアミノ酸よりなる Ld 拘束性 CTL エピトープ) 特異的 CD8 陽性細胞比率、ELISPOT (IFN- γ 陽性細胞を検出) による HBs 28-39 反応性 T 細胞数を解析することにより評価した。

(倫理面への配慮)

マウスでの実験は組換え DNA 実験安全委員会及び動物実験委員会での承認を取得した。

C. 研究結果

B10. D2において、HBsAg 単独での免疫時に比較し、 α -GalCer をアジュバントとして使用した場合に HBs-CTL の誘導効率は上昇した。また、K3あるいは K3-SPG をアジュバントとして使用した場合には、更に HBs-CTL の誘導効率が上昇した。HBsTg においては、HBsAg 免疫時に α -GalCer、K3、K3-SPG のいずれをアジュバントとして使用した場合でも、HBs-CTL の誘導はみられなかった。しかし、HBsTg-ID0-/-においては、 α -GalCer では HBs-CTL の誘導は明らかでなかったものの、K3あるいは K3-SPG をアジュバントとして用いた場合には、比較的効率よい HBs-CTL の誘導が確認された。

B10. D2において、HBsAg + K3での免疫時、IDO阻害剤である1-MTを併用するとHBs-CTL の誘導効率が上昇したことより、IDOのノックダウンによる効果は1-MTの併用でも得られる可能性が示唆された。

D. 考察

抗原特異的免疫応答誘導効率を向上させるため、アジュバント、免疫作動薬の併用は有効な手段である。CpG ODN については B 型肝炎、マラリアなどに対する臨床試験が行われており、1-MT についても肺癌や前立腺癌などの固形癌に対する臨床試験が進められている (いずれも国外)。このように、今回の検討で用いた CpG ODN である K3、1-MT は、いずれも臨床での使用が視野に入っている薬物であり、また、免疫に用いた HBsAg は実際に感染予防用ワクチンとして実際に使用されているものを用いている。今後は、実際の臨床応用を視野に入れ、ヒトキャリアのモデルである HBsTg における HBsAg + K3 + 1-MT の HBs-CTL の誘導効果を確認するとともに、ヘルパー T 細胞、抗体など、CTL 以外の免疫応答の誘導効果についても多面的に検討していく予定である。

E. 結論

マウスモデルにおいて、HBsAg 特異的免疫応答誘導の高効率化について検討し、アジュバントとしての K3 及び K3-SPG の使用、1-MT の併用が有用な方法であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito H, Ando T, Ando K, Ishikawa T, Saito K, Moriwaki H, Seishima M. Induction of hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can be up-regulated

by the inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. Immunology 142: 614–623, 2014.

- 2) Ohtaki H, Ito H, Ando K, Ishikawa T, Hoshi M, Ando T, Takamatsu M, Hara A, Moriwaki H, Saito K, Seishima M. Kynurenine production mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase aggravates liver injury in HBV-specific CTL-induced fulminant hepatitis. Biochimica et Biophysica Acta 1842:1464–1471, 2014.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし